UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

TURNOVER ISOTÓPICO DO CARBONO EM TECIDOS CORPORAIS DE SUÍNOS: MÚSCULOS, FÍGADO, GORDURA ABDOMINAL, PLASMA, CASCO E COSTELA

REGINA MARIA NASCIMENTO AUGUSTO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia como parte das exigências para obtenção do título de Doutora.

BOTUCATU - SP
Dezembro – 2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

TURNOVER ISOTÓPICO DO CARBONO EM TECIDOS CORPORAIS DE SUÍNOS: MÚSCULOS, FÍGADO, GORDURA ABDOMINAL, PLASMA, CASCO E COSTELA

REGINA MARIA NASCIMENTO AUGUSTO
Médica Veterinária

ORIENTADOR: Prof. Dr. CARLOS DUCATTI
CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. JULIANA CÉLIA DENADAI

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia como parte das exigências para obtenção do título de Doutora.

BOTUCATU - SP
Dezembro – 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ***ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE***

Augusto, Regina Maria Nascimento.

Turnover isotópico do carbono em tecidos corporais de suínos : músculos, fígado, gordura abdominal, plasma, casco e costela / Regina Maria Nascimento Augusto. – Botucatu : [s.n.], 2012

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Carlos Ducatti

Coorientador: Juliana Célia Denadai

Capes: 50400002

1. Suínos – Estudos experimentais. 2. Carbono – Isotopos. 3. Isotopos estáveis. 4. Análise por diluição isotópica.

Palavras-chave: Carbono-13; Dieta; Diluição isotópica; Equilíbrio isotópico; Isótopos estáveis; Tecido.

À memória da amada mãe Vera e vó Zulmira,
e aos meus queridos pais Luiz e tio Gerson, pelo amor e dedicação durante todos os momentos da minha vida. Sem o apoio deles, não seria possível manter-me firme nos propósitos e desafios encontrados. Meus pais são merecedores do sucesso por me apoiarem nesta jornada. Obrigada pelo incentivo!

A minha irmã pelo apoio incondicional e por acompanhar mais uma etapa essencial de minha vida.

Ao meu companheiro Alexandre pelo amor, carinho, amizade e dedicação. Que sempre me deu força, incentivo, acreditou que ia dar certo, sempre esteve ao meu lado em todos os momentos em que precisei.

Dedico!

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Ducatti, pela oportunidade, pelos ensinamentos e amizade.

Ao Prof. Dr. Dirlei Antonio Berto, pela amizade, auxílio no planejamento, condução do experimento e por disponibilizar as instalações experimentais para execução do projeto.

À Prof. Dra. Juliana Célia Denadai, na co-orientação, no empenho incansável para o sucesso deste trabalho, além da valiosa amizade.

À FAPESP, pelo auxílio financeiro concedido.

À professora Dra. Maria Márcia Pereira Sartori, pela atenção e disponibilidade na realização das análises estatísticas.

Aos funcionários da Fábrica de Ração e do Setor de Suínos, Paulo Sérgio dos Santos e Marcos, pela amizade e imensa ajuda no desenvolvimento dos experimentos.

Aos secretários da Seção de Pós-Graduação em Zootecnia, Seila e Carlos, pela atenção e auxílios prestados.

À funcionária do Laboratório de Bromatologia, Gisele, pela amizade e colaboração na realização das análises laboratoriais.

A meus irmãos e ao meu cunhado, pela presença permanente, apesar da distância.

À minha amiga Vivian, que se transformou em irmã, pela amizade sincera desde o mestrado. Tenho eterna gratidão à sua generosidade e companheirismo desde quando nos conhecemos.

Aos amigos Filipe e Danilo, pela imensa ajuda durante as coletas de dados e processamento das análises deste trabalho, e também pelos momentos de descontração.

Aos funcionários e amigos do Centro de Isótopos Estáveis Ambientais, Evandro, Cibele, Silvia e Mariana, pelas horas agradáveis de convívio, pelo acolhimento e auxílio na execução deste trabalho.

A toda minha família e amigos em Sorocaba, São Paulo e Botucatu, que sempre torceram pela realização deste trabalho.

E a todos aqueles que de alguma maneira, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, a minha enorme gratidão.

SUMÁRIO

Página
CAPÍTULO 1.....01
CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....01
Introdução.....02
Isótopos Estáveis do Carbono.....03
Turnover do carbono.....06
Referências.....09
CAPÍTULO 2..... 10
TURNOVER ISOTÓPICO DO CARBONO NOS MÚSCULOS RETO DO ABDOME E SEMITENDINOSO DE SUÍNOS.....12
Resumo.....13
Abstract.....14
Introdução.....14
Material e Métodos.....17
Resultados e Discussão.....25
Conclusões.....32
Referências.....33
CAPÍTULO 3.....36
TURNOVER ISOTÓPICO DO CARBONO NO CASCO E COSTELA DE SUÍNOS.....36
Resumo.....37
Abstract.....37
Introdução.....38
Material e Métodos.....40
Resultados e Discussão.....47
Conclusões.....53
Referências.....54

CAPÍTULO 4.....57
TURNOVER ISOTÓPICO DO CARBONO NO FÍGADO, GORDURA E PLASMA SANGUÍNEO DE SUÍNOS.....57
Resumo.....58
Abstract.....59
Introdução.....59
Material e Métodos.....61
Resultados e Discussão.....70
Conclusões.....79
Referências.....80
CAPÍTULO 5.....83
IMPLICAÇÕES.....84
ANEXO 1.....85
ANEXO 1 - Ajustes referentes a comparação entre os músculos semitendinoso e reto do abdome de suínos que tiveram a dieta a base de milho (C_4) substituída pela dieta à base de quirera de arroz (C_3) aos 21, 42 e 63 dias de idade, em função dos intervalos de avaliação.....86

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2 Página

Figura 1 - Curvas de diluição isotópica do carbono do músculo reto do abdome de suínos que tiveram a dieta a base de milho (C_4) substituída pela dieta à base de quirera de arroz (C_3) aos 21 (A), 42 (B), 63 (C) e 110 (D) dias de idade, em função dos intervalos de avaliação.....25

Figura 2 - Curvas de diluição isotópica do carbono do músculo semitendinoso de suínos que tiveram a dieta a base de milho (C_4) substituída pela dieta à base de quirera de arroz (C_3) aos 21 (A), 42 (B), 63 (C) e 110 (D) dias de idade, em função dos intervalos de avaliação.....26

CAPÍTULO 3

Figura 1 - Curvas de diluição isotópica do carbono do casco de suínos que tiveram a dieta a base de milho (C_4) substituída pela dieta à base de quirera de arroz (C_3) aos 21 (A), 42 (B), 63 (C) e 110 (D) dias de idade, em função dos intervalos de avaliação.....47

Figura 2 - Curvas de diluição isotópica do carbono da costela de suínos que tiveram a dieta a base de milho (C_4) substituída pela dieta à base de quirera de arroz (C_3) aos 21 (A), 42 (B), 63 (C) e 110 (D) dias de idade, em função dos intervalos de avaliação.....48

CAPÍTULO 4

Figura 1 - Curvas de diluição isotópica do carbono do fígado de suínos que tiveram a dieta a base de milho (C_4) substituída pela dieta à base de quirera de arroz (C_3) aos 21 (A), 42 (B), 63 (C) e 110 (D) dias de idade, em função dos intervalos de avaliação.....70

Figura 2 - Curvas de diluição isotópica do carbono da gordura de suínos que tiveram a dieta a base de milho (C_4) substituída pela dieta à base de quirera de arroz (C_3) aos 21 (A), 42 (B), 63 (C) e 110 (D) dias de idade, em função dos intervalos de avaliação.....71

Figura 3 - Curvas de diluição isotópica do carbono do plasma de suínos que tiveram a dieta a base de milho (C_4) substituída pela dieta à base de quirera de arroz (C_3) aos 21 (A), 42 (B), 63 (C) e 110 (D) dias de idade, em função dos intervalos de avaliação.....72

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2 Página

Tabela 1 - Descrição dos tratamentos experimentais para suínos em diferentes períodos de criação comercial.....18

Tabela 2 - Composição percentual, níveis nutricionais e valores isotópicos das dietas experimentais nas fases pré-inicial e inicial de suínos.....23

Tabela 3 - Composição percentual, níveis nutricionais e valores isotópicos das dietas experimentais nas fases de crescimento e terminação de suínos.....24

Tabela 4 - Equações exponenciais das diluições isotópicas, do músculo reto do abdome, em função do período de substituição da dieta a base de milho (C_4) pela dieta à base de quirera de arroz (C_3) aos 21, 42, 63 e 110 dias de idade, com seus respectivos coeficientes de determinação (R^2)....., 27

Tabela 5 - Equações exponenciais das diluições isotópicas, do músculo semitendinoso, em função do período de substituição da dieta a base de milho (C_4) pela dieta à base de quirera de arroz (C_3) aos 21, 42, 63 e 110 dias de idade, com seus respectivos coeficientes de determinação (R^2).....28

Tabela 6 - Valores calculados de meias-vidas (dias) e tempo para substituição (dias) de 95% dos átomos iniciais pelos átomos finais do carbono nos músculos reto do abdome e semitendinoso de suínos que tiveram a dieta a base de milho (C_4) substituída pela dieta a base de quirera de arroz (C_3) aos 21, 42, 63 e 110 dias de idade.....28

Tabela 7 - Fator de fracionamento isotópico (Δ) entre tecido e dieta dos animais que tiveram a dieta a base de milho (C_4) substituída pela dieta a base de quirera de arroz (C_3) aos 21, 42, 63 e 110 dias de idade ($\Delta = \delta$tecido $- \delta$dieta).....28

CAPÍTULO 3

Tabela 1 - Descrição dos tratamentos experimentais para suínos em diferentes períodos de criação comercial.....41

Tabela 2 - Composição percentual, níveis nutricionais e valores isotópicos das dietas experimentais nas fases pré-inicial e inicial de suínos.....45

Tabela 3 - Composição percentual, níveis nutricionais e valores isotópicos das dietas experimentais nas fases de crescimento e terminação de suínos.....46

Tabela 4 - Equações exponenciais das diluições isotópicas, do casco de suínos, em função do período de substituição da dieta a base de milho (C_4) pela dieta à base de quirera de arroz (C_3) aos 21, 42, 63 e 110 dias de idade, com seus respectivos coeficientes de determinação (R^2).....51

Tabela 5 - Equações exponenciais das diluições isotópicas, da costela de suínos, em função do período de substituição da dieta a base de milho (C_4) pela dieta à base de quirera de arroz (C_3) aos 21, 42, 63 e 11 dias de idade, com seus respectivos coeficientes de determinação (R^2).....51

Tabela 6 - Valores calculados de meias-vidas (dias) e tempo para substituição (dias) de 95% dos átomos iniciais pelos átomos finais do carbono no casco e costela de suínos que tiveram a dieta a base de milho (C_4) substituída pela dieta a base de quirera de arroz (C_3) aos 21, 42, 63 e 110 dias de idade.....52

Tabela 7 - Fator de fracionamento isotópico (Δ) entre tecido e dieta dos animais que tiveram a dieta a base de milho (C_4) substituída pela dieta a base de quirera de arroz (C_3) aos 21, 42, 63 e 110 dias de idade ($\Delta = \delta$tecido – δdieta).....52

CAPÍTULO 4

Tabela 1 - Descrição dos tratamentos experimentais para suínos em diferentes períodos de criação comercial.....62

Tabela 2 - Composição percentual, níveis nutricionais e valores isotópicos das dietas experimentais nas fases pré-inicial e inicial de suínos.....68

Tabela 3 - Composição percentual, níveis nutricionais e valores isotópicos das dietas experimentais nas fases de crescimento e terminação de suínos.....69

Tabela 4 - Equações exponenciais das diluições isotópicas, do fígado de suínos, em função da substituição da dieta a base de milho (C_4) pela dieta à base de quirera de arroz (C_3) aos 21, 42, 63 e 110 dias de idade, com seus respectivos coeficientes de determinação (R^2).....72

Tabela 5 - Equações exponenciais das diluições isotópicas, da gordura de suínos, em função da substituição da dieta a base de milho (C_4) pela dieta à base de quirera de arroz (C_3) aos 21, 42, 63 e 110 dias de idade, com seus respectivos coeficientes de determinação (R^2).....73

Tabela 6 - Equações de Boltzmann e exponenciais das diluições isotópicas, do plasma de suínos, em função da substituição da dieta a base de milho (C_4) pela dieta à base de quirera de arroz (C_3) aos 21, 42, 63 e 110 dias de idade, com seus respectivos coeficientes de determinação (R^2).....73

Tabela 7 - Valores calculados de meias-vidas (dias) e tempo para substituição (dias) de 95% dos átomos iniciais pelos átomos finais do carbono no fígado, gordura e plasma de suínos que tiveram a dieta a base de milho (C_4) substituída pela dieta a base de quirera de arroz (C_3) aos 21, 42, 63 e 110 dias de idade.....73

Tabela 8 - Fator de fracionamento isotópico (Δ) entre tecido e dieta dos animais que tiveram a dieta a base de milho (C_4) substituída pela dieta a base de quirera de arroz (C_3) aos 21, 42, 63 e 110 dias de idade (Δ = δtecido – δdieta).....74

CAPÍTULO 1
CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. Introdução

A produção de carne suína brasileira em 2011 foi de 3,362 milhões de toneladas e o abate de suínos de 36, 2 milhões de cabeças, sendo que 85% dessa produção foram destinadas ao mercado interno e 15% às exportações. O consumo per capita de carne suína pelo mercado interno permaneceu estável nos anos anteriores, porém cresceu aproximadamente 1,5 quilos em 2011, sendo de aproximadamente 15 kg/ pessoa, tornando o Brasil um dos cinco maiores exportadores de carne suína no mundo (ABIPECS, 2011). Apesar de este mercado ter se tornado altamente competitivo e esta ser a espécie de carne mais consumida no mundo, no Brasil seu consumo ainda é menor que o de carne bovina e de frango (LAURENTI et al., 2009).

De acordo com Bridi et al. (2006) o Brasil é apontado como o país que poderá liderar a produção mundial de suínos por ser considerado um dos maiores produtores de grãos, primeira exigência para a manutenção da cadeia suinícola. No entanto, as possibilidades de atendimento deste mercado exigem investimento contínuo para beneficiar a produtividade e a qualidade da carne.

O aumento do consumo *per capita* é um desafio para o setor da carne suína, porque as necessidades e expectativas do consumidor contribuem significativamente para a escolha da fonte proteica (MOELLER et al., 2010); sendo crescente a consciência da relação alimentação e saúde e o maior interesse quanto à origem da carne e o sistema de criação dos animais de produção (GRUNERT, 2006). Desta forma, o mercado importador tem se mostrado cada vez mais exigente em relação à rastreabilidade de subprodutos de origem animal utilizados na alimentação dos animais, dessa forma, a técnica dos isótopos estáveis apresenta grande potencial de aplicação prática para detecção destes subprodutos por meio da análise dos tecidos de suínos em diferentes fases de desenvolvimento.

No entanto, para o emprego desta linha de pesquisa, inicialmente existe a necessidade de realizar estudos que contribuam para o conhecimento da assimilação isotópica do carbono (*turnover*) em diferentes tecidos nas várias fases de criação dos animais. As plantas dos ciclos fotossintéticos C_3 e C_4 possuem assinaturas isotópicas distintas ($^{13}C/^{12}C$), pelo fracionamento que ocorre durante a assimilação do carbono (FARQUHAR et al, 1982). Como a composição isotópica dos tecidos e fluidos de

animais depende principalmente da sua alimentação (KENNEDY e KROUSE, 1990), dietas com assinaturas isotópicas distintas podem ser usadas para medir taxas de *turnover* em todo o corpo do animal. Após a troca da dieta, a alteração da composição isotópica do tecido depende da velocidade com que os constituintes são incorporados pelo organismo (TIESZEN et al., 1983).

2. Isótopos Estáveis do Carbono

Os isótopos estáveis de elementos ocorrem na natureza em proporções quase constantes como exemplo: hidrogênio - ^{1}H (99, 985%) e ^{2}H (0,0151%); carbono - ^{12}C (98,892%) e ^{13}C (1,108%); nitrogênio - ^{14}N (99,634%) e ^{15}N (0,366%); oxigênio - ^{16}O (99,759%), ^{17}O (0,037%) e ^{18}O (0,204%), entre outros. Os isótopos de ^{2}H (deutério), ^{13}C, ^{15}N e ^{18}o apresentam concentrações mais baixas que seus homólogos (^{1}H, ^{12}C, ^{14}N e ^{16}O) e, por possuírem maior massa (maior número de nêutrons no núcleo), são denominados de isótopos pesados. São usados como traçadores em pesquisas, tanto com o uso de compostos contendo o elemento de interesse, com proporções de isótopos diferentes daquela de ocorrência natural (compostos marcados no isótopo pesado), como através das variações na abundância isotópica natural, devido ao fracionamento isotópico (físico, químico e/ou biológico) devido às pequenas diferenças de massa no núcleo atômico.

O fracionamento isotópico define-se como a variação na proporção entre os isótopos estáveis em um determinado composto ao passar por um processo físico-químico. As diferenças naturais nos valores isotópicos do carbono entre espécies de plantas de diferentes ciclos fotossintéticos (C_3 e C_4) oferecem a possibilidade de utilizar produtos dessas plantas como traçadores em animais, sem a necessidade de sintetizar compostos especificamente marcados, além de evitar os problemas de saúde e segurança associados ao uso de isótopos radioativos (TYRREL, 1984). Ao longo do processo de fotossíntese o carbono sofre discriminação isotópica que indica enriquecimento ou empobrecimento isotópico relativo do produto em relação à fonte precursora. Particularmente, no processo de fotossíntese das plantas ocorre empobrecimento (diminuição) da concentração de carbono-13 e aumento da concentração de carbono-12.

Entretanto, poucos estudos têm sido realizados em animais usando alimentos naturalmente enriquecidos em ^{13}C. A técnica dos isótopos estáveis do carbono é particularmente apropriada para determinar a contribuição relativa de duas fontes isotopicamente distintas de matéria orgânica na dieta animal, além de fornecer informação do tempo de integração do alimento assimilado e não somente daquele ingerido (TIESZEN et al., 1983). Minson et al. (1975), trabalhando com grupos de bovinos alimentados em pastagens temperadas ou tropicais, observaram que a razão de $^{13}C/^{12}C$ dos animais reflete a razão de $^{13}C/^{12}C$ da dieta. Com base nesses resultados, esses autores já visualizavam a possibilidade de usar essas razões de carbono como marcadores naturais em estudos de fisiologia, evolução animal e ciência forense, indicando inclusive a possibilidade de avaliar a substituição de proteína e gordura corporal.

Assim os isótopos estáveis do carbono apresentam-se como alternativa promissora para estudar processos relacionados à digestão, absorção e metabolismo de nutrientes, por estarem presentes em todos os nutrientes capazes de gerar energia aos animais e por representarem cerca de 50% dos elementos químicos que compõem o corpo dos animais (MURRAY, 1990).

Os estudos com determinação de razões de $^{13}C/^{12}C$ direcionaram-se quase que exclusivamente ao uso de medidas de variação naturais, onde os valores do carbono-13 são expressos na terminologia dos isótopos estáveis em delta per mil da referida razão ($\delta^{13}C$) do produto, em relação a um padrão internacional definido, *Peedee Belemnite* (PDB). Segundo Friedman e O'neill (1977), o padrão PDB é aceito universalmente na comparação das composições isotópicas do carbono. Refere-se ao fóssil carbonatado sólido da era *cretáceos*, denominado *Belemnitela americana*, da formação *PeeDee* da Carolina do Sul, Estados Unidos, o qual foi empregado inicialmente como padrão por Craig (1957). A mensuração da relação entre isótopos estáveis é realizada por espectrometria de massas, que detecta a concentração dos diferentes isótopos do elemento. O enriquecimento isotópico relativo é obtido pela expressão (1):

$$\delta \boldsymbol{i} \text{ (amostra, padrão)} = [(R_{amostra} / R_{padrão}) - 1] \times 10^3 \qquad (1)$$

A simbologia da expressão (1) indica que: (***i***) isótopo pesado do elemento químico em consideração; (R) razão entre o isótopo pesado e o leve, tanto para a amostra quanto para seu padrão internacional. A terminologia δ reflete o enriquecimento relativo da razão isotópica da amostra, comparativamente a razão isotópica do padrão internacional e é utilizada na análise de mensuração das variações isotópicas naturais.

Ducatti et al. (2002), fundamentados em resultados da literatura, apresentaram um modelo teórico capaz de mostrar os resultados do enriquecimento relativo de carbono (^{13}C) em função do tempo de alimentação, fornecendo dietas contrastantes deste elemento (formuladas com grãos de plantas dos ciclos fotossintéticos C_3 e C_4) a animais adultos. Partindo do pressuposto que o metabolismo de determinado tecido animal depende da taxa de entrada de compostos pré-existentes, os autores chegaram a equação (2) :

$$\delta^{13}C(t) = \delta^{13}C(f) + [\delta\ ^{13}C(i) - \delta^{13}C(f)]\ e^{-kt} \qquad (2)$$

Onde a simbologia empregada significa:

$\delta^{13}C(t)$ = enriquecimento isotópico do tecido em qualquer tempo (t). Adimensional.

$\delta^{13}C(f)$ = enriquecimento isotópico do tecido no patamar de equilíbrio, ou condição final. Adimensional.

$\delta^{13}C(i)$ = enriquecimento isotópico do tecido, na condição inicial. Adimensional.

k = constante de troca (*turnover*) em unidades de tempo^{-1}.

t = tempo (em dias) desde a substituição da ração.

A integração da composição isotópica do carbono incorporado no corpo do animal e o que foi perdido na respiração e excreção deve ser igual à composição isotópica de carbono da dieta. Esta afirmação tornou-se a base da maioria dos pressupostos dos experimentos que utiliza os isótopos estáveis do carbono (DENIRO e EPSTEIN, 1978).

3. *Turnover* do Carbono

As proteínas e outros componentes do tecido encontram-se em estado de equilíbrio dinâmico, novos componentes são constantemente sintetizados, enquanto outros mais antigos são continuamente degradados (HOBSON e CLARK, 1992). Os tecidos precisam ser remodelados, enzimas desnecessárias precisam ser removidas em períodos de inanição, fazendo com que o organismo possa sobreviver à custa dos seus próprios tecidos (MAYNARD et al., 1984), minimizando os efeitos da flutuação na ingestão diária de proteínas que pode variar consideravelmente em quantidade e qualidade (SWICK e BENEVENGA, 1977).

Segundo Gannes et al. (1998), dietas purificadas com assinaturas isotópicas contrastantes podem ser usadas para mensurar o *turnover* de componentes corporais de animais. Após a mudança da dieta, a alteração da composição isotópica no tecido ou corpo depende da velocidade que esses constituintes são substituídos (TIESZEN et al., 1983), embora as escalas de tempo associadas a tais alterações não estejam bem documentadas (FRAZER et al., 1997).

O período de tempo para que a concentração isotópica tecidual reflita a assinatura isotópica de uma dieta em particular depende, em parte, da taxa de *turnover* isotópico no tecido ou órgão, pois depende das taxas de aquisição, síntese e catabolismo de cada componente tecidual (GANNES et al., 1998). De modo geral, os tecidos mais ativos metabolicamente (fígado, pâncreas e gordura abdominal) apresentam taxas de *turnover* mais rápidas que os tecidos menos ativos metabolicamente, como o colágeno dos ossos (DUCATTI, 2007).

Em animais, o destino do alimento absorvido é mais complexo que simples combustão metabólica para obtenção de energia ou deposição de matéria no crescimento, principalmente em função da influência dos fatores ambientais sobre o estado bioquímico dos organismos (BRETT e GROVES, 1979), pois qualquer fator ambiental que afete o metabolismo e/ou consumo de energia e outros nutrientes pode influenciar o *turnover* de compostos teciduais e o crescimento.

Tem sido demonstrado que o *turnover* proteico é influenciado por fatores nutricionais (quantidade e qualidade dos alimentos, frequência e horário alimentar), ambientais (temperatura) e estado fisiológico. Como as medidas isotópicas de um tecido

são resultantes da integração das assinaturas isotópicas dos vários componentes que formam os tecidos, o *turnover* de carbono compreende o *turnover* de proteínas e de todas as outras frações teciduais, e deve ser influenciado pelos mesmos fatores que interferem no metabolismo proteico (TIESZEN et al., 1983).

Há dois tecidos de extrema importância para as funções fisiológicas do corpo: o tecido muscular e o fígado, que se comportam de maneiras distintas. Os músculos apresentam principalmente função mecânica, mas também são muito importantes no crescimento, atuando como fonte de aminoácidos para outros tecidos. Os músculos tendem a reagir mais lentamente que o fígado em termos metabólicos, basicamente em função das diferenças na necessidade de adaptação às mudanças na composição da dieta. O fígado é principalmente um órgão homeostático, redistribuindo os metabólitos para os outros tecidos corporais (PERAGÓN et al., 2001).

Porém outros tecidos são igualmente importantes, pois podem refletir a assinatura isotópica de uma dieta dependendo da taxa de *turnover* isotópico no tecido. Tecidos com *turnover* isotópico rápido refletirão dietas mais recentes, enquanto aqueles com taxas de *turnover* mais lento refletirão dietas de períodos mais remotos (HOBSON e CLARK, 1992). Desta forma, tecidos mais ativos metabolicamente (sangue e plasma sanguíneo) apresentam taxas de *turnover* mais rápidas que os tecidos menos ativos metabolicamente, como ossos e cascos.

A partir da realização de estudos que contribuam para o conhecimento da assimilação isotópica da matéria orgânica nos tecidos dos suínos (*turnover*), quando submetidos a dietas formuladas com ingredientes estritamente vegetais, será possível aplicar a técnica no processo de rastreabilidade de subprodutos de origem animal na alimentação de suínos através da análise de seus tecidos (CARRIJO, 2000). Porém, a literatura se apresenta escassa com relação aos trabalhos que avaliam o *turnover* em suínos, durante os diferentes períodos de criação comercial, ou seja, do desmame até a terminação.

Dessa forma, é importante expandir o conhecimento do tempo de substituição do carbono nos diferentes tecidos de suínos em todo o ciclo de criação, para que seja possível detectar a inclusão de produtos de origem animal em dietas de suínos, e,

consequentemente, garantir produto de qualidade e seguros aos consumidores e importadores.

O Capítulo 2, intitulado **"*Turnover* isotópico do carbono nos músculos reto do abdome e semitendinoso de suínos"** apresenta-se de acordo com as normas para publicação na Revista *Pesquisa Agropecuária Brasileira.* O trabalho teve com o objetivo avaliar a velocidade de troca do carbono nos músculos reto do abdome e semitendinoso de suínos em diferentes períodos de desenvolvimento.

O Capítulo 3, denominado **"*Turnover* isotópico do carbono no casco e na costela de suínos"** apresenta-se de acordo com as normas para publicação na Revista *Acta Scientiarum Animal Sciences*. O presente trabalho objetivou avaliar a velocidade de troca do carbono em tecidos de suínos, como casco e costela, em diferentes períodos de desenvolvimento.

O Capítulo 4, intitulado **"*Turnover* isotópico do carbono no fígado, gordura abdominal e plasma sanguíneo de suínos"** apresenta-se de acordo com as normas para publicação na Revista Brasileira de Zootecnia. O objetivo deste trabalho foi avaliar a velocidade de troca do carbono no fígado, gordura e plasma sanguíneo de suínos, em diferentes períodos de desenvolvimento.

4. Referências

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA PRODUTORA E EXPORTADORA DE CARNE SUÍNA – ABIPECS, 2011. Disponível em: www.abipecs.com.br. Acesso em 20/06/2012.

BRETT, J. R.; GROVES, T. T. D. Physiological energetics. *In* Fish Physiology. Edited by W.S. Hoar, D.J. Randall and J.R. Brett. Academic Press, New York, v. VIII, p. 280-352, 1979.

BRIDI, A. M.; OLIVEIRA, A, R., FONSECA, N. A. N.; SHIMOKOMAKI, M.; COUTINHO, L. L.; SILVA, C. A. Efeito do genótipo halotano, da ractopamina e do sexo do animal na qualidade da carne suína. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, p. 2027-2033, 2006.

CARRIJO, A. S. Avaliação do metabolismo nutricional em poedeiras, pela técnica dos isótopos estáveis do carbono ($^{13}C/^{12}C$), provenientes de rações formuladas com plantas do ciclo C_3 e C_4. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, p. 40, 2000.

CRAIG, H. Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass spectrometric analysis of carbon dioxide. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v.12, p.133-149, 1957.

DE NIRO, M. J.; EPSTEIN, S. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. **Geochimica et Cosmichimica Acta**, v. 42, p. 495-506, 1978.

DUCATTI, C. Aplicação dos isótopos estáveis em aquicultura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 1-10, 2007.

DUCATTI, C.; CARRIJO, A.S.; PEZZATO, A.C.; MANCERA, P.F.A. Modelo teórico e experimental da reciclagem do carbono-13 em tecidos de mamíferos e aves. **Scientia Agrícola,** v.59, n.1, p.29-33, 2002.

FARQUHAR, G. D.; O´LEARY, M.H.; BERRY, J. A. On the relationship between carbono isotope discrimination and intracelular carbono dioxide concentration um leaves. Australian Journal of Plant Physiology, v. 9, p. 121-137, 1982.

FRAZER, T. K.; ROSS, R. M.; QUETIN, L. B.; MONTOYA, J. P. *Turnover* of cabon and nitrogen during growth of larval krill, *Euphausia superba Dana*: a stable isotope approach. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 212, p. 259-275, 1997.

FRIEDMAN, I; O`NEIL, J. R. Compilation of stable isotope fractionation factors of geochemical interest. In Fleischer M. Editors. Data of Geochemistry 6ª ed. United States government printing office, p. kk1-kk12, 1977.

GANNES, L. Z.; MARTINEZ DEL RIO, C.; KOCH, P. Natural abundance variations in stable isotopes and their potential uses in animal physiological ecology. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v. 119, p. 725-737, 1998.

GRUNERT, K. G. Future trends and consumer lifestyles with regard to meat consumption. **Meat Science**, v. 74, p. 149-160, 2006.

HOBSON, K.; CLARK, R. G. Assessing avian diet using stable isotopes I: *turnover* of ^{13}C in tissues. Condor, v. 94, p.181-188, 1992.

KENNEDY, B. V.; KROUSE, H. R. Isotope fractionation by plants and animals: implications for nutrition research. **Canadian Journal Physiology and Pharmacology**, v. 68, p. 960-972, 1990.

LAURENTI, E. et al. Impacto das anomalias suínas na indústria. **Revista Nacional da Carne**, v. 384, p. 20-32, 2009.

MAYNARD, L.A.; LOOSLI, J.K.; HINTZ, H.F. Nutrição animal. Livraria Freitas Bastos, p. 726, 1984.

MINSON, D.J.; LUDLOW, M.M.; TROUGHTON, J.H. Differences in natural carbon isotope ratios of milk and hair from cattle grazing tropical and temperate pastures. **Nature**, p. 256-602, 1975.

MOELLER, S. J.; MILLER, R. K.; EDWARDS, K. K.; ZERBY, H. N.;LOGAN,K. E.; ALDREDGE, T. L.; STAHL, C. A.; BOGGESS, M.; BOX-STEFFENSMEIER, J. M. Consumer perceptions of pork eating quality as affected by pork quality attributes and end-point cooked temperature. **Meat Science**, v. 84, p. 14-22, 2010.

MURRAY, T. E. Phosphorus dynamics in Crystal Lake, Ellington and Stafford, Connecticut. Masters Thesis, p. 91, 1990.

PERAGÓN, J.; BARROSO,J.B.; SALGUERO,L.G.; HIGUERA, M.; LUPIÁÑEZ, J.A. Growth, protein-*turnover* rates and nucleic-acid concentrations in the white muscle of rainbow trout during developmenthttp://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TCH44656RTC&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_searchStrId=1136594929&_rerunOrigin=scholar.google&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=de63c4edf50dde787ef7d926942a41e4 - m4.1. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 33, p. 1227-1238, 2001.

SILVA, C. A.; RIBEIRO, P. R.; SOTTO, W. C.; FRANCIS, D. G. Contexto social da suinocultura brasileira. **Revista Semina**, v. 19, p. 94-98, 1998.

SWICK, R. W.; BENEVENGA, N. J. Labile protein reserves and protein *turnover*. **Journal of Dairy Science**, v. 60, p. 505-515, 1977.

TIESZEN, L.L.; BOUTTON, T.W.; TESDAHL, K.G.; SLADE, N.A. Fractionation and *turnover* of stable carbon isotopes in animal tissues: implications for δ‰^{13}C analysis of diet. **Oecologia**, v. 57, p. 32-37, 1983.

TYRRELL, H. F.; PELLETIER, G.; CHEVALIER, R.; HILLAIRE-MARCELL, C.; GAGNON, M. Use of carbon 13 as tracer in metabolism studies. **Canadian Journal of Animal Science**, suppl., p. 127-129, 1984.

CAPÍTULO 2
TURNOVER ISOTÓPICO DO CARBONO NOS MÚSCULOS RETO DO ABDOME E SEMITENDINOSO DE SUÍNOS

Turnover isotópico do carbono nos músculos reto do abdome e semitendinoso de suínos

Resumo - Objetivou-se com este trabalho avaliar o *turnover* e o comportamento da incorporação do carbono nos músculos reto do abdome e semitendinoso de suínos em diferentes períodos de desenvolvimento. Foram utilizados 132 leitões (machos castrados e fêmeas) híbridos comerciais, desmamados com idade média de 21 dias, distribuídos em delineamento experimental inteiramente casualizado em quatro tratamentos com dias distintos de substituição do milho (grão de planta do ciclo fotossintético C_4) das dietas por quirera de arroz (grão produzido por planta do ciclo fotossintético C_3) aos 21; 42; 63 e 110 dias de idade, para mudança do sinal isotópico de carbono-13. As curvas de diluição isotópica dos músculos analisados demonstraram que os animais que tiveram a dieta C_4 substituída pela dieta C_3 com 42 dias de idade, atingiram o patamar de equilíbrio isotópico de forma mais evidente que os suínos que receberam dieta C_3 a partir dos 21 ou 63 dias de idade. Amostras de músculos são boas escolhas para refletir mudanças na dieta de suínos por um período mais longo, apresentando grande potencial de aplicação prática para a rastreabilidade de subprodutos de origem animal na alimentação de suínos.

Termos para indexação: equilíbrio isotópico, carbono-13, tecido, dieta.

***Turnover* isotopic carbon in the rectus abdomen and semitendinous muscles of swines**

Abstract - The objective of this study was to evaluate the behavior of the turnover and incorporation of carbon in the rectus abdomen and semitendinous muscles of swines at different periods of development. We used 132 commercial hybrids (barrows and females), weaned at an average age of 21 days, distributed in a completely randomized design with four treatments on different days of substitution of corn (grain plant the C_4 photosynthetic cycle) diets by broken rice (grain produced per plant photosynthetic cycle C_3) at 21, 42, 63 and 110 days of age to change the signal isotope carbon-13. The isotopic dilution curves of the muscles analyzed showed that animals that had the C_4 diet replaced by C_3 with 42 days of age, reached the new level of equilibrium isotopic more evident that swines fed the diet C_3 from 21 or 63 days of age.Samples of muscles are good choicesto reflect changes in the diet of pigs for a longer period, showing great potential for practical application for the traceability of animal by-products in feed for pigs.

Index terms: isotopic equilibrium, carbon-13, tissue, diet.

Introdução

O aumento do consumo *per capita* é um desafio para o setor da carne suína, porque as necessidades e expectativas do consumidor contribuem significativamente para a escolha da fonte proteica (Moeller et al., 2010); sendo crescente a consciência da

relação alimentação e saúde e o maior interesse quanto à origem da carne e o sistema de criação dos animais de produção (Grunert, 2006). Desta forma, o mercado importador tem se mostrado cada vez mais exigente em relação à rastreabilidade de subprodutos de origem animal utilizados na alimentação dos animais, dessa forma, a técnica dos isótopos estáveis apresenta grande potencial de aplicação prática para detecção destes subprodutos por meio da análise dos tecidos de suínos em diferentes fases de desenvolvimento. Entretanto, poucos estudos têm sido realizados em animais usando alimentos naturalmente enriquecidos em ^{13}C.

Nas últimas décadas, constatou-se crescente uso de isótopos estáveis nos mais diferentes campos da ciência. Os elementos C, N, S, H e O possuem mais que um isótopo estável, e a composição isotópica natural dos materiais pode ser medida, com grande precisão, utilizando o espectrômetro de massa (Brooks, 2001).

A técnica dos isótopos estáveis do carbono é particularmente apropriada para determinar a contribuição relativa de duas fontes isotopicamente distintas de matéria orgânica na dieta animal, além de fornecer informação do tempo de integração do alimento incorporado e não somente daquele ingerido (Tieszen et al., 1983). As diferenças naturais nos valores isotópicos do carbono entre espécies de plantas de diferentes ciclos fotossintéticos (C_3 e C_4) oferecem a possibilidade de utilizar produtos dessas plantas como traçadores em animais, sem a necessidade de sintetizar compostos especificamente marcados, além de evitar os problemas de saúde e segurança associados ao uso de radioisótopos (Tyrrel, 1984).

A interpretação dos dados isotópicos para tecidos animais requer informações a respeito do *turnover* (taxa que os isótopos de um elemento químico são incorporados e eliminados de determinado compartimento biológico), promovendo-se assim, a sua

renovação isotópica (*turnover* isotópico). Estas taxas variam entre espécies, tecidos, frações bioquímicas e são influenciadas pelo estado fisiológico do animal (Kennedy e Krouse, 1990). Bem como, estão associadas à curva de crescimento, pois um indivíduo que possui um rápido crescimento terá uma rápida taxa de *turnover*, quando comparado com os organismos que possuem crescimento mais lento. A inclusão do crescimento nesta taxa foi feita por Fry e Arnold (1982), que determinaram o crescimento no decorrer do aumento relativo à biomassa.

Os constituintes corporais encontram-se em estado dinâmico, sendo continuamente formados e utilizados para diferentes propósitos. Esse processo é geralmente chamado *turnover*. Todas as substâncias do corpo sejam elas metabólitos orgânicos ou inorgânicos, estão sujeitas ao *turnover* (Hetenyi et al., 1983). Entretanto, grande parte dos estudos envolvendo *turnover* de compostos celulares se concentra nas proteínas, pois depois da água são os principais constituintes das células da maioria dos tecidos dos animais (Murray, 1990) e a síntese de proteínas é a principal atividade anabólica da célula (Maynard et al., 1984); e na criação de animais de interesse zootécnico os ingredientes proteicos são grandes responsáveis pela elevação dos preços das dietas. Dessa forma, grande parte das informações disponíveis baseia-se nos estudos realizados com o metabolismo proteico animal.

De acordo com Hobson e Clark (1992) tecidos com *turnover* isotópico rápido refletirão a incorporação de dietas mais recentes, enquanto aqueles com taxas de *turnover* mais lento refletirão dietas de períodos mais remotos. Assim, a escolha do tecido ou órgão animal a ser coletado para análise poderá influenciar significativamente nas conclusões sobre a dieta, devido à variação nas taxas de *turnover* de carbono nos diferentes tecidos do organismo animal.

A literatura se apresenta escassa com relação aos trabalhos que avaliam a taxa de *turnover* isotópico em suínos durante os diferentes períodos de criação comercial, ou seja, da creche até a terminação. Pela realização de estudos que contribuam para o conhecimento da assimilação isotópica da matéria orgânica nos tecidos e órgãos dos suínos (*turnover*), quando submetidos a dietas formuladas com ingredientes estritamente vegetais, será possível aplicar a técnica no processo de rastreabilidade de subprodutos de origem animal na alimentação de suínos através da análise de seus tecidos (Oliveira, 2005).

Neste sentido, objetivou-se com este trabalho avaliar a velocidade de troca e o comportamento da incorporação do carbono nos músculos reto do abdome e semitendinoso de suínos em diferentes períodos de desenvolvimento.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido na Universidade Estadual Paulista (UNESP), nas instalações de creche e de crescimento e terminação, na área de produção de suínos da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), *Campus* de Botucatu.

Foram utilizados 132 leitões (machos castrados e fêmeas) híbridos comerciais, desmamados com idade média de 21 dias e peso inicial de 6,87 ± 0,65 kg, distribuídos em delineamento experimental inteiramente casualizado em quatro unidades experimentais. Nas fases pré-inicial e inicial, até 63 dias de idade, os animais foram alojados em salas de creche, contendo baias metálicas suspensas com piso ripado, equipadas com bebedouro tipo chupeta, comedouro e campânula para o aquecimento. Quando alcançaram, em média, 63 dias de idade, foram transferidos para a unidade de

crescimento e terminação, com baias contendo comedouro automático, localizado na parte frontal e um bebedouro do tipo chupeta, no fundo da baia. Os tratamentos experimentais estão discriminados na Tabela 1.

Tabela 1. Descrição dos tratamentos experimentais para suínos em diferentes períodos de criação comercial.

Idade de substituição das dietas	Período avaliado (dias)	Dias de coleta das amostras dos músculos
21 dias	21 a 150	1; 3; 6; 13; 18; 25; 35; 45; 60; 80; 100; 129
42 dias	42 a 150	1; 3; 6; 13; 18; 25; 35; 45; 60; 80; 100; 108
63 dias	63 a 150	1; 3; 6; 13; 18; 25; 35; 45; 60; 80; 87
110 dias	110 a 175	1; 3; 6; 13; 18; 25; 35; 50; 65

Antes da substituição das dietas, os animais receberam ração predominantemente composta por grãos de plantas do ciclo fotossintético C_4 (milho), possuindo sinal isotópico de carbono-13 semelhante ao das rações fornecidas às matrizes que deram origem a estes animais, até o momento da troca. A partir do dia da substituição, os animais passaram a receber dieta composta por grãos de plantas do ciclo fotossintético C_3 (quirera de arroz), com sinal isotópico distinto das dietas que vinham consumindo anteriormente (milho).

O programa de alimentação foi dividido em duas fases na creche, sendo a primeira de 21 aos 42 dias de idade (pré-inicial) e a segunda dos 43 aos 63 dias de idade (inicial) e nas fases de crescimento (64 aos 105 dias) e terminação (106 aos 175 dias). O alimento foi fornecido à vontade. Todas as rações foram formuladas para atenderem as

exigências nutricionais propostas por Rostagno et al. (2005) e são apresentadas nas Tabelas 2 e 3.

A cada dia de coleta, foram abatidos, após insensibilização elétrica, três animais para coleta dos tecidos. Imediatamente após o abate, o abdome dos animais foi aberto e as vísceras retiradas. Com o auxílio de pinças e bisturi, foram colhidas amostras (aproximadamente 2,0 x 2,0 x 1,0 cm) dos músculos reto do abdome (composto em sua maioria por fibras musculares de contração rápida e metabolismo glicolítico) e do músculo semitendinoso (composto predominantemente por fibras musculares de contração lenta e metabolismo oxidativo). As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos, identificadas e imediatamente congeladas (-18°C) até a sua preparação para as análises isotópicas. As coletas foram agrupadas nos primeiros dias, em cada tratamento, devido a maior velocidade na diluição isotópica do carbono no tecido durante esse período (Hobson e Clark, 1992).

As amostras foram descongeladas e secas em estufa de ventilação forçada MA 035/5 Série 9610072 a 56°C, por um período de 48h. Todas as amostras teciduais e as dietas experimentais foram moídas em moinho criogênico modelo *Spex Sample*, Geno/Grinder 2010, à -196ºC. Aproximadamente 2,0 g de amostra foi colocada em frasco de policarbonato juntamente com três esferas de aço inoxidável (modelo 440, sem óleo/graxa), em seguida foi devidamente fechado e imerso em nitrogênio líquido. Pelo impacto entre a amostra e as esferas, pulverizou-se a amostra. O programa utilizado na moagem das amostras consistiu de uma etapa de congelamento de 3 minutos e uma segunda etapa de pulverização, em alta frequência (15 impactos/segundo), por 10 minutos.

Após a moagem, como a fração lipídica pode ocasionar fracionamento isotópico de até 5‰ nos valores de carbono-13 (Pinnegar e Polunin, 1999; Roth e Hobson, 2000; Tieszen et al., 1983) as amostras foram acondicionadas em papel filtro, imersas em éter etílico, à temperatura de 65ºC, utilizando aparelho de *Soxhlet* (TE-044), para serem desengorduradas, durante quatro horas. Após esse período, as amostras foram suspensas durante uma hora para que apenas o éter recondicionado as lavasse. Posteriormente, as amostras foram retiradas do aparelho e secas em estufa de ventilação forçada durante uma hora, para que houvesse evaporação do éter.

Para a realização das análises isotópicas, as amostras foram acondicionadas e pesadas (50 a 70 µg) em cápsulas de estanho e introduzidas, por meio de um amostrador automático, no analisador de Carbono, Hidrogênio, Oxigênio, Nitrogênio e Enxofre, modelo Flash 2000 EA, fabricante *Thermo Scientific*, no qual, em presença de oxigênio (O_2) e óxido de cobre (CuO), foram queimadas quantitativamente para CO_2 e outros gases (N_2, O_2 e H_2O). O gás formado foi separado em coluna cromatográfica gasosa e analisado no espectrômetro de massa de razões isotópicas (Delta V *Advantage*) do Centro de Isótopos Estáveis Ambientais, do Instituto de Biociências da Unesp, *Campus* de Botucatu.

Os resultados foram expressos em *delta per mil* da razão isotópica em relação ao padrão internacional *Peedee Belemnite* (PDB) para o elemento carbono, de acordo com a Equação 1:

$$\delta^{13}C_{(amostra,\ padrão)} = [(R_{amostra}/R_{padrão}) - 1] \times 10^3 \quad (1)$$

Em que, $\delta^{13}C$(amostra, padrão) = enriquecimento da razão $^{13}C/^{12}C$ da amostra em relação ao padrão e R = razão isotópica ($^{13}C/^{12}C$) da amostra e do padrão.

Para avaliar a velocidade de substituição do carbono nos tecidos dos animais após determinado intervalo de tempo, foi empregada a função exponencial do tempo expressa pela Equação 2, do software Origin® 6.0 Professional (Microcal Software, 1999):

$$\delta^{13}C(t) = \delta\ ^{13}C(f) + [\delta^{13}C(i) - \delta^{13}C(f)]e^{-kt} \quad (2)$$

Em que, $\delta^{13}C(t)$ = enriquecimento isotópico do tecido em qualquer tempo (t); $\delta^{13}C(f)$ = enriquecimento isotópico do tecido no patamar de equilíbrio, ou condição final; $\delta^{13}C(i)$ = enriquecimento isotópico do tecido, na condição inicial; k = constante de troca (*turnover*) em unidades de tempo^{-1} e t = tempo (em dias) desde a substituição da ração (Ducatti et al., 2002).

A meia-vida do carbono para os tecidos envolvidos nos tratamentos foi calculada pela Equação 3:

$$T = \ln 2/k \quad (3)$$

Em que, T = meia-vida, unidade: tempo (dias); ln = logaritmo neperiano; k = constante de *turnover*, unidade: dia^{-1}, sugerindo uma ideia da "velocidade" no processo de troca dos isótopos estáveis nos tecidos (Ducatti et al., 2002).

O tempo necessário para que ocorra a substituição de 95% dos átomos iniciais pelos átomos finais ($t_{95\%}$) pode ser determinado pela equação 4:

$$t_{95\%} = (-1/k)\ \ln(1-F) \quad (4)$$

Em que, F (átomos trocados) igual a 95% foi considerado como sistema estabilizado.

Os valores do fracionamento isotópico dos tecidos ao final do período experimental em relação à dieta foram calculados de acordo com DeNiro e Epstein (1978) pela equação 5:

$$\Delta = \delta\text{tecido} - \delta\text{dieta} \quad (5)$$

Onde:

Δ = fator de fracionamento entre o tecido e a dieta, em parte per mil (‰);

δtecido = enriquecimento relativo do tecido em questão, em parte per mil (‰);

δdieta = enriquecimento relativo médio da respectiva dieta, em parte per mil (‰);

Tabela 2. Composição percentual, níveis nutricionais e valores isotópicos das dietas experimentais nas fases pré-inicial e inicial de suínos.

Ingredientes	Pré-Inicial C_3	Pré-Inicial C_4	Inicial C_3	Inicial C_4
Concentrado	40[1]	40[1]	16[2]	16[2]
Milho	-	40	-	54
Quirera de Arroz	40	-	54	-
Farelo de Soja	20	20	25	25
Açúcar	-	-	5	5
Total	100	100	100	100
Níveis Nutricionais Calculados				
PB (%)	18,72	19,00	19,04	19,27
EM (kcal/kg)	3.408	3.320	3.385	3.360
Calcio (%)	0.78	0,74	0,64	0,64
Fósforo Disp. (%)	0,61	0,62	0,58	0,65
Lisina Digest. (%)	1,32	1,32	1,07	1,07
Metionina Digest. (%)	0,48	0,48	0,37	0,37
Treonina Digest. (%)	0,80	0,80	0,63	0,63
Triptofano Digest. (%)	0,19	0,19	0,20	0,20
Na (%)	0,45	0,43	0,32	0,31
Cobre (ppm)	140,00	140,00	130	130
Zinco (ppm)	3.140,00	3.140,00	2.920,00	2920,00
Valores isotópicos médios analisados*				
	-26,72±1,2	-19,58±1,9	- 28,11±1,1	-16,97±0,09

[1]Produto comercial para fase pré-inicial fornecendo por Kg do produto: cálcio, 14,20 g; extrato etéreo, 63,80 g; fibra bruta, 16,70 g; fósforo, 7.300,00 mg; lisina, 2,00 mg; matéria mineral, 78,30 g; metionina, 0,97 mg; proteína bruta, 172,50 g; umidade, 56,90 g; ácido fólico, 2,25 mg; cobalto, 2,50 mg; cobre, 250,00 mg, colina, 2.487,35 mg, colistina, 100,00 mg; ferro, 65,27 mg; flúor, 20,80 mg; fitase, 1.200,00 ftu; iodo,3,75 mg; manganês, 107,00 mg; niacina, 75,00 mg; pantotenato de cálcio, 35,06 mg; selênio, 1,13 mg; treonina, 14,50 g; triptofano, 2.400,00 mg; vitamina A, 22.500,00 UI; vitamina B1, 5,06 mg; vitamina B12, 75,00 mcg; vitamina B2, 15,00 mg; vitamina B6, 7,50 mg; vitamina D3, 5.630,00 UI; vitamina E, 56,25 UI; vitamina H, 0,30 mg; vitamina K, 5,63 mg; zinco, 8.050,00 mg.

[2]Produto comercial para fase inicial I fornecendo por Kg do produto: cálcio, 37,70 g; extrato etéreo, 99,60 g; fibra bruta, 12,70 g; fósforo, 15,50 g; lisina, 24,30 g; matéria mineral, 139,10 g; metionina, 9.700,00 mg; proteína bruta, 180,20 g; umidade, 51,50 g; ácido fólico, 6,00 mg; cobalto, 6,50 mg; cobre, 690,00 mg; colina, 2.516,74 mg; colistina, 250,00 mg; ferro, 145,75 mg; fitase, 3.000,00 ftu, iodo, 9,75 mg; manganês, 274,00 mg; niacina, 200,00 mg; pantotenato de cálcio, 93,50 mg, selênio, 3,00 mg; treonina, 12,10 g; vitamina A, 60.000,00 UI; vitamina B1, 13,50 mg; vitamina B12, 200,00 mcg; vitamina B2, 40,00 mg; vitamina B6, 20,00 mg; vitamina D3, 15.000,00 UI; vitamina E, 150,00 UI; vitamina H, 0,80 mg; vitamina K, 15,00 mg; zinco, 16,00 g.

*Valores isotópicos médios expressos em $\delta^{13}C$ relativos ao padrão *PeeDee Belemnite* (PDB), em ‰.

Tabela 3. Composição percentual, níveis nutricionais e valores isotópicos das dietas experimentais nas fases de crescimento e terminação de suínos.

Ingredientes	Cresc. C_3	Cresc. C_4	Term. C_3
Núcleo	3[1]	3[1]	3[2]
Milho	-	70	-
Quirera de Arroz	70	-	73
Farelo de Soja	27	27	24
Total	100	100	100
Níveis Nutricionais			
PB (%)	18,18	19,39	16,64
EM (Kcal/kg)	3.289	3.267	3.296
Cálcio (%)	0,709	0,75	0,735
Fósforo Disp. (%)	0,43	0,53	0,39
Lisina Digest. (%)	0,85	0,85	0,77
Metionina Digest. (%)	0,28	0,28	0,26
Treonina Digest. (%)	0,57	0,57	0,53
Triptofano Digest.(%)	0,22	0,22	0,20
isotópicosmédios analisados*			
	-28,79±0,80	-17,3±0,98	-28,5±0,75

[1] Produto comercial para fase de crescimento fornecendo por Kg de produto: ácido fólico, 20,00 mg; cálcio, 150,00 g; cobalto, 33 mg; cobre, 3333,00 mg; ferro, 3369,00 mg; fósforo, 20,000 g; iodo; 50,00 mg; manganês, 1333,00 mg; niacina, 666,00 mg; selênio, 10,00 mg; vitamina A, 200.000,00 UI; vitamina B1, 45 mg; vitamina B2, 133 mg; vitamina B6, 66 mg; vitamina D3, 50.000,00 UI, vitamina E, 500,00 UI; vitamina H, 2,66mg; vitamina K, 50,00 mg; zinco, 3333,00 mg.

[2] Produto comercial para fase de terminação fornecendo por Kg de produto: ácido fólico, 20,00 mg; cálcio, 140,00 g; cobalto, 35 mg; cobre, 3333,00 mg; ferro, 3500,00 mg; fósforo, 20,000 g; iodo; 52,00 mg; manganês, 1400,00 mg; niacina, 670,00 mg; selênio, 10,00 mg; vitamina A, 201.000,00 UI; vitamina B1, 45 mg; vitamina B2, 134 mg; vitamina B6, 67 mg; vitamina D3, 50.250,00 UI, vitamina E, 502,00 UI; vitamina H, 2,68 mg; vitamina K, 50,00 mg; zinco, 3500,00 mg.

*Valores isotópicos médios expressos em $\delta^{13}C$ relativos ao padrão *PeeDee Belemnite* (PDB), em ‰.

Resultados e Discussão

Durante o crescimento dos animais o valor do $\delta^{13}C$ dos tecidos foi alterado gradativamente ao longo do tempo.

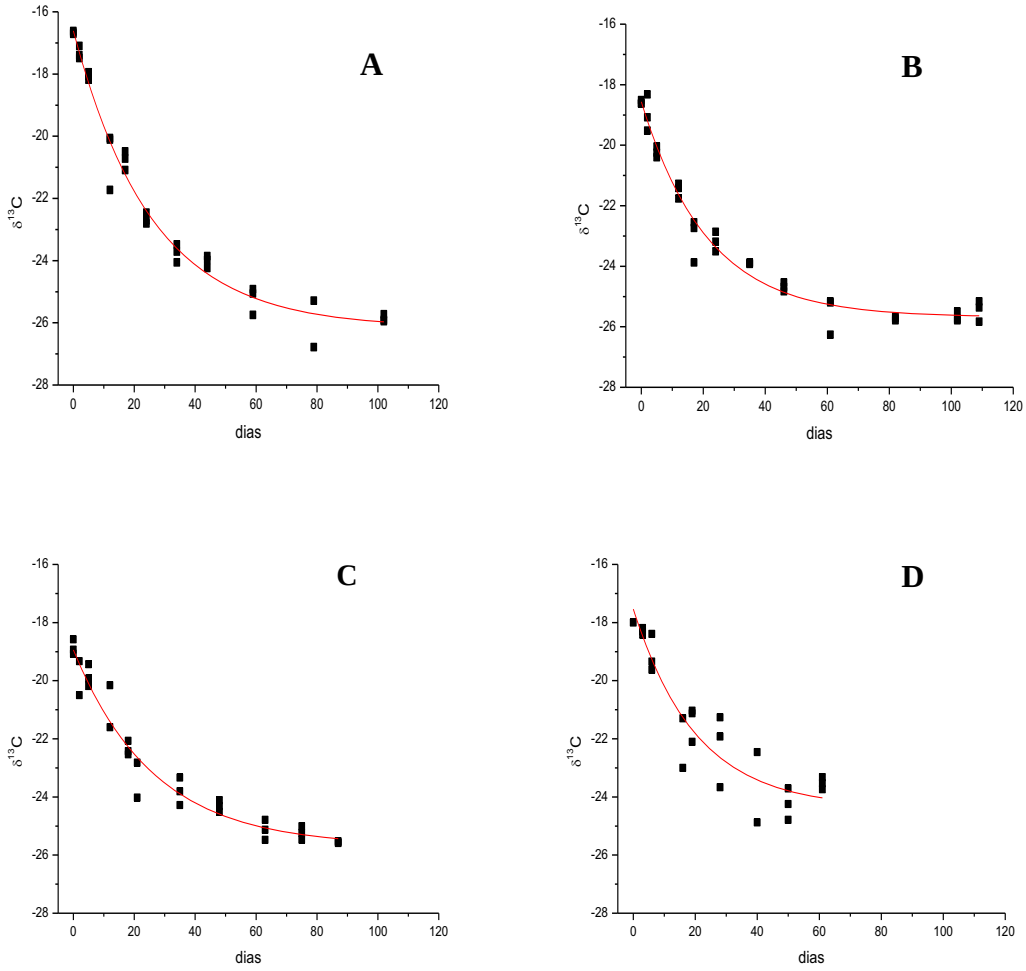


Figura 1 – Curvas de diluição isotópica do carbono do músculo reto do abdome de suínos que tiveram a dieta a base de milho (C_4) substituída pela dieta à base de quirera de arroz (C_3) aos 21 (A), 42 (B), 63 (C) e 110 (D) dias de idade, em função dos intervalos de avaliação.

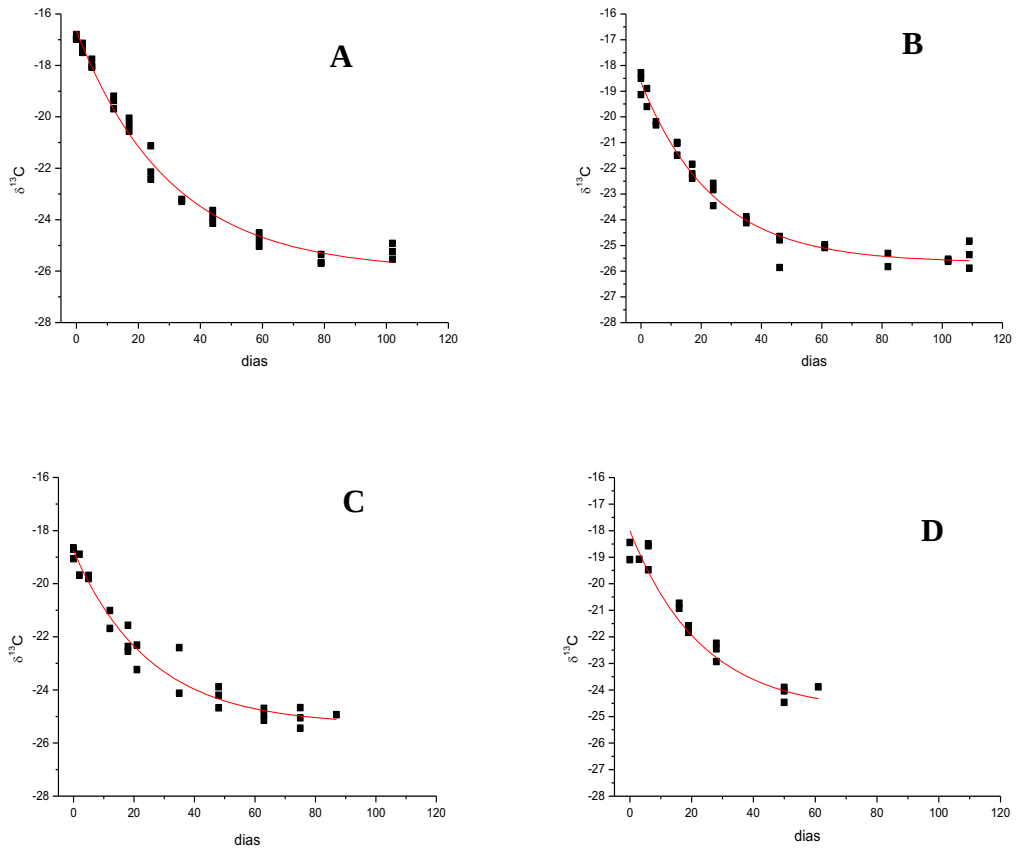


Figura 2 – Curvas de diluição isotópica do carbono do músculo semitendinoso de suínos que tiveram a dieta a base de milho (C_4) substituída pela dieta à base de quirera de arroz (C_3) aos 21 (A), 42 (B), 63 (C) e 110 (D) dias de idade, em função dos intervalos de avaliação.

As curvas de diluição isotópica dos músculos analisados (Figuras 1 e 2) demonstraram que os animais que tiveram a dieta C_4 substituída pela dieta C_3 com 42 dias de idade, atingiram o patamar de equilíbrio isotópico de forma mais evidente que os suínos que receberam dieta C_3 a partir dos 21 ou 63 dias de idade. Porém, aqueles que tiveram suas rações substituídas aos 110 dias de idade não atingiram o patamar de equilíbrio isotópico, por isso não pôde ser avaliado e nem comparado com os demais tratamentos.

Por meio da comparação das equações exponenciais (Tabelas 4 e 5) e dos fatores de fracionamento (Tabela 7), pode-se verificar que os valores referentes aos dois músculos foram muito próximos entre os animais cuja dieta C_4 foi substituída pela dieta C_3 aos 21, 42 e 63 dias de idade.

O avanço do período das coletas experimentais produziu aumento no fator de fracionamento, e isto pode ser decorrente do tempo limitado de avaliação para todos os tratamentos e não pelo fato de o fator de fracionamento aumentar com o aumento da idade (Mituo, 2008). Estes dados podem ser justificados pelo aumento gradativo e constante do tecido muscular de suínos, porém com menor velocidade a partir dos 100 kg de peso vivo, como demonstrou Dutra Junior et al. (2001). A velocidade de crescimento dos diferentes tecidos do corpo varia em função das fases de crescimento e maturidade fisiológica do animal Lawrence e Fowler (1997). Os músculos representam alta porcentagem do peso total ao nascimento passando a diminuir a partir do início da fase de deposição de gordura. Ou seja, a troca da dieta é refletida na composição isotópica dos tecidos, e refere-se ao período de desenvolvimento e ao crescimento do novo tecido, e não somente ao *turnover* metabólico presente nos tecidos.

Tabela 4 – Equações exponenciais das diluições isotópicas, do músculo reto do abdome de suínos, em função da substituição da dieta a base de milho (C_4) pela dieta à base de quirera de arroz (C_3) aos 21, 42, 63 e 110 dias de idade, com seus respectivos coeficientes de determinação (R^2).

Idade de substituição	Equações	R^2
21	$\delta^{13}C = -26,15 + 9,54e^{-0,0389t}$	0,980
42	$\delta^{13}C = -25,68 + 7,12e^{-0,0468t}$	0,974
63	$\delta^{13}C = -25,69 + 6,75e^{-0,0379t}$	0,958
110	$\delta^{13}C = -24,37 + 6,61e^{-0,0471t}$	0,887

Tabela 5 – Equações exponenciais das diluições isotópicas, do músculo semitendinoso de suínos, em função da substituição da dieta a base de milho (C_4) pela dieta à base de quirera de arroz (C_3) aos 21, 42, 63 e 110 dias de idade, com seus respectivos coeficientes de determinação (R^2).

Idade de substituição	Equações	R^2
21	$\delta^{13}C = -25,98 + 9,31e^{-0,0329t}$	0,987
42	$\delta^{13}C = -25,67 + 7,01e^{-0,0416t}$	0,977
63	$\delta^{13}C = -25,32 + 6,56e^{-0,0396t}$	0,965
110	$\delta^{13}C = -24,85 + 7,03e^{-0,0443t}$	0,715

Tabela 6 – Valores calculados de meias-vidas (dias) e tempo para substituição (dias) de 95% dos átomos iniciais pelos átomos finais do carbono nos músculos reto do abdome e semitendinoso de suínos que tiveram a dieta a base de milho (C_4) substituída pela dieta a base de quirera de arroz (C_3) aos 21, 42, 63 e 110 dias de idade.

Idade de substituição	Músculo reto do abdome		Músculo semitendinoso	
	50%	95%	50%	95%
21	17,8	77	21,0	91
42	14,8	64	16,7	72
63	18,3	79	17,5	76
110	14,7	64	15,7	68

Tabela 7 – Fator de fracionamento isotópico (Δ) entre tecido e dieta* dos animais que tiveram a dieta a base de milho (C_4) substituída pela dieta a base de quirera de arroz (C_3) aos 21, 42, 63 e 110 dias de idade ($\Delta = \delta tecido - \delta dieta$).

Idade de substituição	Músculo reto do abdome	Músculo semitendinoso
21	3,41	2,78
42	3,63	3,53
63	3,94	3,44
110	5,48	5,12

*O enriquecimento relativo das dietas foi calculado a partir da média da(s) ração(s) consumida(s) antes da substituição do milho pela quirera de arroz para obtenção do valor isotópico da dieta consumida inicialmente e após a substituição, até o final de cada período experimental, para encontrar o valor isotópico da dieta final.

Pelas tabelas (vide ANEXO 1) pode-se observar um comportamento semelhante entre os dois músculos avaliados; nos animais cuja dieta C_4 foi substituída pela dieta C_3 aos 21 e 42 dias de idade o músculo semitendinoso, apresentou uma absorção pouco

mais lenta com diferença de até 2,5% para a troca da dieta em aproximadamente 24 dias. O mesmo não foi observado nos animais que tiveram a dieta C_4 substituída pela dieta C_3 aos 63 dias de idade que, apresentaram um comportamento inverso, sendo que este músculo apresentou valores ajustados superiores ao do músculo reto do abdome, no entanto essa diferença é irrelevante sendo no máximo de aproximadamente 0,7%. Portanto, apesar de apresentarem características metabólicas diferentes os dois músculos analisados mostraram comportamento semelhante de assimilação da nova dieta. As fibras de metabolismo glicolítico mobilizam energia principalmente por meio da glicogenólise, enquanto as fibras oxidativas obtêm energia por meio de várias reservas como os ácidos graxos livres, fosfocreatina e glicogênio. Garlick et al., (1989) avaliaram o *turnover* de proteína em nove diferentes músculos de rato e observaram que o *turnover* de proteínas e o modo de deposição destas também diferem entre os tipos de fibras musculares.

Com os valores das meias-vidas do carbono dos animais em que a dieta C_4 foi substituída pela dieta C_3 aos 21, 42 e 63 dias de idade foi possível verificar que os músculos refletiram o sinal isotópico da nova dieta (Tabela 6). Para os suínos que receberam dieta C_3 a partir dos 21 dias de idade o tempo de substituição de 50% dos átomos de carbono dos músculos reto do abdome e semitendinoso pela nova dieta foi de 17,8 e 21,0 dias, respectivamente. Estes valores sugerem a demora dos músculos em refletir a nova dieta no período avaliado, e que provavelmente ocorreu devido ao baixo consumo de alimentos pelos leitões determinado pelo estresse ao desmame.

Em pesquisa realizada por Caldara et al. (2007) que avaliaram o uso de glutamina e *turnover* do carbono no tecido adiposo de leitões também foi verificada demora na troca da metade dos átomos de carbono no tecido adiposo (meia-vida do

carbono em torno de 21 dias). No desmame há uma mudança abrupta na dieta dos leitões, quando o leite materno é substituído por ração sólida de menor digestibilidade composta, principalmente, por grãos de cereais e proteínas vegetais. Como consequência o período de 10 a 14 dias pós-desmame é considerado crítico e se caracteriza normalmente pelo consumo de ração abaixo do necessário, acompanhado de uma depressão no *status* sanitário e no desempenho produtivo dos animais (Le Dividich e Herpin, 1994).

Os animais que receberam dieta C_3 aos 42 dias de idade foram os que mais bem refletiram o patamar de equilíbrio com valores de meias-vidas de 14,8 e 16,7, para os músculos reto do abdome e semitendinoso, respectivamente. Houve menor tempo para a troca do carbono nesta fase, provavelmente devido à transposição do período crítico relacionado ao estresse imposto pelo desmame. Este menor tempo de incorporação de carbono-13, em relação aos suínos que tiveram suas dietas trocadas aos 63 dias de idade por dieta C_3 (diferença entre 42 e 63 dias de 3,5 e 0,8 dias na meia-vida dos músculos reto e semitendinoso, respectivamente), ocorreu provavelmente porque os animais ainda estavam em crescimento, isto é, possuíam o metabolismo mais rápido.

A maior parte das pesquisas realizadas para determinação das taxas de *turnover* isotópico vem utilizando animais adultos, provavelmente para evitar erros de interpretações causadas pelo fator crescimento, contudo Zuanon et al. (2006) avaliando o *turnover* do carbono muscular de tilápias do Nilo em crescimento concluíram que o modelo matemático apresentado por Ducatti et al. (2002) também é indicado para animais em crescimento em que o acréscimo de massa tecidual é o principal fator na velocidade de diluição isotópica do carbono (*turnover* isotópico) em relação ao *turnover* metabólico.

Bahar et al. (2009) pesquisaram dois tipos de músculos bovinos e encontraram meias-vidas longas variando de 133 a 151 dias enquanto, Cruz et al. (2005) analisaram frangos de 1 a 30 dias de idade e encontraram valores de meia-vida de músculos de 5 a 8 dias. A alta taxa de *turnover* referente aos músculos analisados nesta pesquisa é maior que a encontrada no tecido ósseo, como a costela (Augusto 2012, dados não publicados), provavelmente devido à ordem de prioridade de crescimento do tecido ósseo que antecede o tecido muscular, pois são os ossos que dão sustentação aos tecidos muscular e adiposo.

Os fatores de fracionamento isotópico demonstraram que as relações isotópicas do tecido podem variar dentro de um indivíduo alimentado com uma dieta constante (Tabela 7), já que os isótopos fracionam de maneira diferente entre diferentes tecidos e a dieta (Tieszen et al., 1983). A causa destas variações e diferenças ainda não é conhecida, no entanto, uma vez que frações como proteínas, carboidratos e lipídeos diferem umas das outras isotopicamente dentro do organismo animal, podem ocorrer variação na composição bioquímica nos tecidos (Tieszen et al, 1983, DeNiro e Epstein, 1978). Como se observa na pesquisa de Nardoto et al. (2006), que determinaram os valores de $\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$ em diferentes tecidos como unha, pelo, fígado, músculo, gordura e cartilagem em função da alimentação de suínos, com o objetivo de documentar o fracionamento existente entre os tecidos e a dieta e verificaram que os tecidos como gordura, fígado e músculo foram em média 2,1‰ mais leves que a dieta, enquanto que o pelo e a unha não apresentaram enriquecimento do ^{13}C em relação à dieta.

O avanço das coletas determinou aumento do fator de fracionamento nos tecidos, pois não houve tempo suficiente para que os mesmos alcançassem o novo patamar de equilíbrio isotópico no último tratamento (substituição da dieta C_4 pela C_3

aos 110 dias de idade). Este fato sugere que novos estudos devam ser realizados, estendendo o tempo de avaliação a fim de obter maiores informações sobre a assimilação isotópica do carbono (*turnover*), já que no processo de rastreabilidade de subprodutos de origem animal na alimentação de suínos, buscam-se tecidos com diferentes metabolismos que possam refletir as dietas: recente (substituição rápida do carbono tecidual) e antiga (substituição lenta do carbono tecidual), para encontrar possíveis fraudes na alimentação desses animais.

Conclusões

Amostras de músculos são boas escolhas para refletir mudanças na dieta de suínos por um período mais longo, pois apresenta substituição lenta do carbono tecidual.

Referências

AUGUSTO, R.M.N. *Turnover* isotópico do carbono em tecidos corporais de suínos: músculos, fígado, tecido adiposo, plasma, casco e costela. 2012. 47p. Tese (Doutorado) Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, Botucatu.

BAHAR, B.; MONOLEY, A.P.; MONAHAN, F.J.; HARRISON, S.M.; ZAZZO,A.; SCRIMGEOUR,C.M.; et al. *Turnover* of carbon, nitrogen, and sulfur in bovine longissimus dorsi and psoas major muscles: Implications for isotopic authentication of meat. Journal o Animal Science, v. 87, p. 905-913, 2009.

BROOKS, P.H.; BEAL, J.D.; NIVEN, S. Liquid feeding of pigs: potential for reducing environmental impact and for improving productivity and food safety. Recent Advances in Animal Nutrition, Australia, v. 13, p. 49-63, 2001.

CALDARA, F.R.; DUCATTI, C.; BERTO, D.A.; DENADAI, J. C.; ANDRADE, G. A.; GIOSO, M. M. Glutamina e *turnover* do carbono no tecido adiposo de leitões. Pesquisa Agropecuária Brasileira. v.42, p. 1601-1607, 2007.

CRUZ, V.C. DUCATTI, C. PEZZATO, A. PINHEIRO, D.; SARTORI, J.R.; GONÇALVES, J. C. Influence of diet on assimilation and *turnover* of ^{13}C in the tissues of broiler chickens. British Poultry Science, v. 83, p.1376-1381, 2005

DENIRO, M.; EPSTEIN, S. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. Geochimica Cosmochim Acta, v. 42, p. 495-506, 1978.

DUCATTI, C.; CARRIJO, A.S.; PEZZATO, A.C.; MANCERA, P.F.A. Modelo teórico e experimental do reciclagem do carbono-13 em tecidos de mamíferos e aves. Scientia Agrícola**,** v.59, n.1, p.29-33, 2002.

DUTRA JR., W.M.; FERREIRA, S.; DONZELE, J.L. et al. Predição de curvas de crescimento de tecidos de fêmeas suínas por intermédio da função alométrica estendida. Revista Brasileira de Zootecnia, v. 30, n. 3, p. 1007-1014, 2001.

FRY, B.; ARNOLD, C. Rapid $^{13}C/^{12}C$ *turnover* during growth of brown shrimp (*Penaeus aztecus*). Oecologia*,* Berlin*,* v. 54, p. 200-204, 1982.

GARLICK, P. J.; MALTIN, C. A.; BAILLIE, A. G.; DELDAY, M. I.; GRUBB, D. A. Fiber-type composition of nine rat muscles. II. Relationship to protein *turnover*. American Journal Physiology Endocrinology Metabolism v. 6, p. 828-832, 1989.

GRUNERT, K.G. Future trends and consumer life styles with regard to meat consumption. Meat Science, v. 74, p. 149-160, 2006.

HETENYI, G.J.R.; PEREZ, G.; VRANIC, M. *Turnover* and precursor-product relationships of nonlipid metabolites. Physiological Reviews, v. 63, n. 2, p. 606-667, 1983.

HOBSON, K. A; CLARK, R. G. Assessing avian diets using stable isotopes I: *Turnover* of ^{13}C in tissues. The Condor, v. 94, p. 181-188, 1992.

KENNEDY, B.V.; KROUSE, H.R. Isotope fractionation by plants and animals: implications for nutrition research. Canadian Journal Physiology and Pharmacology, v. 68, p. 960-972, 1990.

LAWRENCE, T.L.J.; FOWLER, V.R. Growth of farm animals. New York: CAB International, 1997.

LE DIVIDICH, J.; HERPIN, P. Effect of climatic conditions on the performance, metabolism and health status of weaned piglets: a review. Livestock Production Science, v. 38, p. 79-90, 1994.

MAYNARD, L.A.; LOOSLI, J.K.; HINTZ, H.F. Nutrição animal, 1984. 726 p. Livraria Freitas Bastos.

MICROCAL SOFTWARE ORIGIN®6.0 PROFESSIONAL. Origin Data Analysis and Technical Graphics. USA, Microcal Software Inc., 1999.

MITUO, M.A.O. *Turnover* do carbono-13 nos tecidos de frangos de corte em diferentes fases de crescimento. 2008. 35 p. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

MOELLER, S. J.; MILLER, R. K.; EDWARDS, K. K.; ZERBY, H. N.;LOGAN,K. E.; ALDREDGE, T. L.; STAHL, C. A.; BOGGESS, M.; BOX-STEFFENSMEIER, J. M. Consumer perceptions of pork eating quality as affected by pork quality attributes and end-point cooked temperature. Meat Science, v. 84, p. 14-22, 2010.

MURRAY, T.E. Phosphorus dynamics in Crystal Lake. 1990. 91 p. Masters Thesis. Ellington and Stafford, Connecticut.

NARDOTO, G.B.; GODOY, P.B.; FERRAZ, E.S.B.; OMETTO, J.P.H.B.; MARTINELLI, L. A. Stable carbon and nitrogen isotopic fractionation between diet and swine tissues. Scientia Agricola, v. 63, 2006.

OLIVEIRA, R.P. Rastreabilidade da farinha de vísceras de aves na alimentação de frangos de corte pela técnica dos isótopos estáveis ($\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$). 2005. 109 p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

PINNEGAR, J.K.; POLUNIN, N.V.C. Differential fractionation of $\delta^{13}C$ and delta $\delta^{15}N$ among fish tissues: implications for the study of trophic interactions. Functional Ecology, v.13, p.225-231, 1999.

ROSTAGNO, H.S. et al. Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. UFV, 2005.

ROTH, J.D.; HOBSON, K.A. Stable carbon and nitrogen isotopic fractionation between diet and tissue of captive red fox: implications for dietary reconstruction. Canadian Journal of Zoology, v.78, p.848-852, 2000.

TIESZEN, L.L.; BOUTTON, K.G.; TESDAHL, K.G.; SLADE, N.A. Fractionation and *turnover* of stable carbon isotopes in animal tissues: implications for $\delta^{13}C$ analysis of diet. Oecologia, v. 57, p. 32–37, 1983.

TYRRELL, H.F.; PELLETIER, G.; CHEVALIER, R.; HILLAIRE-MARCELL, C.; GAGNON, M. Use of carbon 13 as tracer in metabolism studies. Canadian Journal of Animal Science, p. 127-129, 1984.

ZUANON, J.A.S.; PEZZATO, A.C.; PEZZATO, L.E.; PASSOS, J.R.S.; BARROS, M.M.; DUCATTI, C. Muscle $\delta\ ^{13}C$ change in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Effects of growth and carbon *turnover*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, v.145, p.1001-107, 2006.

CAPÍTULO 3
TURNOVER ISOTÓPICO DO CARBONO NO CASCO E COSTELA DE SUÍNOS

Turnover isotópico do carbono no casco e costela de suínos

RESUMO. O objetivo deste trabalho foi avaliar a velocidade de troca do carbono no casco e costela de suínos em diferentes períodos de desenvolvimento na busca de tecidos que reflitam por mais tempo a dieta antiga. Foram utilizados 132 leitões (machos castrados e fêmeas) híbridos comerciais, desmamados com idade média de 21 dias, distribuídos em delineamento experimental inteiramente casualizado em quatro tratamentos com dias distintos de substituição do milho (grão de planta do ciclo fotossintético C_4) das dietas por quirera de arroz (grão produzido por planta do ciclo fotossintético C_3) aos 21; 42; 63 e 110 dias de idade, para mudança do sinal isotópico de carbono-13. Pelas curvas de diluição isotópica foi possível observar que os animais cuja dieta C_4 foi substituída pela dieta C_3 aos 21, 42, 63 e 110 dias de idade, para o casco e costela, atingiram o novo patamar de equilíbrio isotópico. As amostras ósseas são melhores escolhas para refletir a dieta antiga de suínos, devido à conservação do sinal isotópico por mais tempo.
Palavras-chave: Isótopos estáveis, diluição isotópica, equilíbrio isotópico, carbono-13.

ABSTRACT. Carbon isotopic turnover in the hoof and rib of swines. The objective of this study was to evaluate the behavior of the turnover and incorporation of carbon in hoof and ribs of swines at different periods of development in the search for tissues that reflect longer former diet. We used 132 commercial hybrids (barrows and females), weaned at an average age of 21 days, distributed in a completely randomized design with four treatments on different days of substitution of corn (grain plant the C_4 photosynthetic cycle) diets by broken rice (grain produced per plant photosynthetic cycle C_3) at 21, 42, 63 and 110 days of age to change the signal isotope carbon-13. Through isotopic dilution curves was observed that animals whose diet was replaced C_4 by C_3 diet at 21, 42, 63 and 110 days of age for hoof and bone, reached the new level of equilibrium isotope. Bone samples are better choices to reflect the old swine diet, due to conservation of the isotopic longer.
Key words: Stable isotope, isotopic dilution, isotopic equilibrium, carbon-13.

INTRODUÇÃO

O aumento do consumo *per capita* é um desafio para o setor da carne suína, porque as necessidades e expectativas do consumidor contribuem significativamente para a escolha da fonte proteica (MOELLER et al., 2010); sendo crescente a consciência da relação alimentação e saúde e o maior interesse quanto à origem da carne e o sistema de criação dos animais de produção (GRUNERT, 2006). Desta forma, o mercado importador tem se mostrado cada vez mais exigente em relação à rastreabilidade de subprodutos de origem animal utilizados na alimentação dos animais, dessa forma, a técnica dos isótopos estáveis apresenta grande potencial de aplicação prática para detecção destes subprodutos por meio da análise dos tecidos de suínos em diferentes fases de desenvolvimento. Entretanto, poucos estudos têm sido realizados em animais usando alimentos naturalmente enriquecidos em ^{13}C.

Os constituintes corporais encontram-se em estado dinâmico, sendo continuamente formados e utilizados para diferentes propósitos. Esse processo é geralmente chamado *turnover*. Todas as substâncias do corpo sejam elas metabólitos orgânicos ou inorgânicos, estão sujeitas ao *turnover* (HETENYI et al., 1983). Entretanto, grande parte dos estudos envolvendo *turnover* de compostos celulares se concentra nas proteínas, por vários motivos: são, depois da água, os principais constituintes das células da maioria dos tecidos dos animais (MURRAY 1990); a síntese de proteínas é a principal atividade anabólica da célula (MAYNARD et al., 1984); e na criação de animais de interesse zootécnico os ingredientes proteicos são grandes responsáveis pela elevação dos preços das dietas. Dessa forma, boa parte das informações disponíveis baseia-se nos estudos realizados com o metabolismo proteico animal.

Dietas com assinaturas isotópicas diferentes podem ser usadas para mensurar o *turnover* de componentes corporais e órgãos de animais (GANNES et al.,1998). Após a mudança da dieta, a alteração da composição isotópica no tecido depende da velocidade com que os constituintes da nova dieta serão incorporados. A escolha do tecido é importante, pois tecidos que são ativos metabolicamente no organismo apresentarão *turnover* mais rápido, como o fígado, músculo e sangue, e tecidos menos ativos apresentarão taxas menores, como o colágeno e o osso (HOBSON e CLARK, 1992).

Nesta pesquisa foram avaliados o tecido ósseo que é descrito como um tipo especializado de tecido conjuntivo. É constituído por células e matriz extracelular calcificada, a matriz óssea. As células que formam o tecido ósseo são osteócitos, osteoblastos, e osteoclastos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004) e o casco de suínos que é separado em duas regiões, uma sensível e outra insensível. O córion, camada sensível, é constituído de tecido conjuntivo altamente vascularizado que nutre várias partes do casco e se situa logo abaixo da camada insensível do casco, constituída por tecido córneo duro que por sua vez é formada por duas camadas, uma basal mole e outra de tecido cornificado (LOPEZ et al., 1997).

A interpretação dos dados isotópicos para tecidos animais requer informações a respeito da taxa de *turnover*, a taxa sobre a qual os isótopos de um elemento químico são incorporados e eliminados de determinado compartimento biológico promovendo-se, assim, a sua renovação isotópica (*turnover* isotópico). Essas taxas variam entre espécies, tecidos, frações bioquímicas e são influenciadas pelo estado fisiológico do animal (KENNEDY e KROUSE, 1990). Bem como, estão associadas à curva de crescimento, pois um indivíduo que possui um rápido crescimento terá uma rápida taxa de *turnover*, quando comparado com os organismos que possuem crescimento mais lento. A inclusão do crescimento nesta taxa foi feita por Fry e Arnold (1982), que determinaram o crescimento no decorrer do aumento relativo à biomassa.

O *turnover* proteico, definido como a contínua quebra e reposição de proteínas celulares, provê fluxo necessário para a regulação e adaptação metabólica (HAWKINS e DAY, 1996), e é considerado mecanismo homeostático importante para a sobrevivência animal. Como apenas uma porção dos aminoácidos teciduais (1% do total de aminoácidos corporais) apresenta-se na forma livre, o *turnover* provê um mecanismo pelo qual ocorre a redistribuição contínua dos aminoácidos entre as proteínas essenciais para a vida (SWICK e BENEVENGA, 1977).

As medidas isotópicas de um tecido são resultantes da integração das assinaturas isotópicas dos vários componentes que formam os tecidos. O *turnover* de carbono compreende o *turnover* de proteínas e de todas as outras frações teciduais, e deve ser influenciado pelos mesmos fatores que interferem no metabolismo proteico (TIESZEN et al., 1983), consequentemente, a avaliação do processo de diluição isotópica de carbono em tecidos de animais em crescimento, por meio da variação natural da

abundância isotópica de carbono, representa ferramenta promissora a ser utilizada em estudos de nutrição e fisiologia animal, uma vez que o crescimento é o principal fator na diluição isotópica (DeNIRO e EPSTEIN, 1978).

Os tecidos precisam ser remodelados, enzimas desnecessárias precisam ser removidas em períodos de inanição (ou alimentação), fazendo com que o organismo possa sobreviver à custa dos seus próprios tecidos (MAYNARD et al., 1984), minimizando os efeitos da flutuação na ingestão diária de proteínas, que pode variar consideravelmente em quantidade e qualidade (SWICK e BENEVENGA, 1977). Segundo Gannes et al. (1998), dietas purificadas com assinaturas isotópicas contrastantes podem ser usadas para mensurar o *turnover* de componentes corporais e órgãos de animais. Após a mudança da dieta, a alteração da composição isotópica no tecido ou corpo depende da velocidade que esses constituintes são substituídos (TIESZEN et al., 1983), embora as escalas de tempo associadas a tais alterações não estejam bem documentadas (FRAZER et al., 1997).

Em animais, o destino do alimento absorvido é mais complexo que simples combustão metabólica para obtenção de energia ou deposição de matéria no crescimento, principalmente em função da influência dos fatores ambientais sobre o estado bioquímico dos organismos (BRETT e GROVES, 1979), pois qualquer fator ambiental que afete o metabolismo e/ou consumo de energia e outros nutrientes pode influenciar o *turnover* de compostos teciduais e o crescimento. Neste sentido, objetivou-se com este trabalho avaliar a velocidade de troca e o comportamento da incorporação do carbono no casco e costela de suínos em diferentes períodos de desenvolvimento.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Universidade Estadual Paulista (UNESP), nas instalações de creche e de crescimento e terminação, na área de produção de suínos da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), *Campus* de Botucatu. Foram utilizados 132 leitões (machos castrados e fêmeas) híbridos comerciais, desmamados com idade média de 21 dias e peso inicial de 6,87 ± 0,65 kg, distribuídos aleatoriamente em quatro tratamentos. Nas fases pré-inicial e inicial os animais foram alojados em salas de creche, contendo baias metálicas suspensas com piso ripado, equipadas com

bebedouro tipo chupeta, comedouro e campânula para o aquecimento. Quando alcançaram, em média, 63 dias de idade, foram transferidos para a unidade de crescimento e terminação, com baias contendo comedouro automático, localizado na parte frontal e um bebedouro do tipo chupeta, no fundo da baia. Os tratamentos experimentais estão discriminados na Tabela 1.

Tabela 1. Descrição dos tratamentos experimentais para suínos em diferentes períodos de criação comercial.

Idade de substituição das dietas	Período avaliado (dias)	Dia de coleta das amostras do casco e costela
21 dias	21 a 150	1; 3; 6; 13; 18; 25; 35; 45; 60; 80; 100; 129
42 dias	42 a 150	1; 3; 6; 13; 18; 25; 35; 45; 60; 80; 100; 108
63 dias	63 a 150	1; 3; 6; 13; 18; 25; 35; 45; 60; 80; 87
110 dias	110 a 175	1; 3; 6; 13; 18; 25; 35; 50; 65

Antes da substituição das dietas, os animais receberam ração predominantemente composta por grãos de plantas do ciclo fotossintético C_4 (milho), possuindo sinal isotópico de carbono-13 semelhante ao das rações fornecidas às matrizes que deram origem a estes animais, até o momento da troca. A partir do dia da substituição, os animais passaram a receber dieta contendo quirera de arroz (grãos de plantas do ciclo fotossintético C_3), com sinal isotópico distinto das dietas que vinham consumindo anteriormente.

O programa de alimentação foi dividido em duas fases na creche, sendo a primeira de 21 aos 42 dias de idade (pré-inicial) e a segunda dos 43 aos 63 dias de idade (inicial) e nas fases de crescimento (64 aos 105 dias) e terminação (106 aos 175 dias). O alimento foi fornecido à vontade. Todas as rações foram formuladas para atenderem as exigências nutricionais propostas por Rostagno et al. (2005) e são apresentadas nas

Tabelas 2 e 3. A cada dia de coleta, após insensibilização elétrica, foram abatidos três animais para coleta dos tecidos. As amostras ósseas foram retiradas coletando-se a décima terceira costela e o casco posterior direito foi retirado integralmente, em seguida as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos, identificadas e imediatamente congeladas (-18°C) até a sua preparação para as análises isotópicas. Em cada tratamento as coletas foram agrupadas nos primeiros dias devido a velocidade na diluição isotópica do carbono no tecido durante esse período (HOBSON e CLARK, 1992).

As amostras foram descongeladas e secas em estufa de ventilação forçada MA 035/5 Série 9610072 a 56°C, por um período de 48h. Todas as amostras teciduais e as dietas experimentais foram moídas em moinho criogênico *Spex Sample*, modelo Geno/Grinder 2010, à -196ºC. Aproximadamente 2,0 g de amostra foi colocada em frasco de policarbonato juntamente com três esferas de aço inoxidável (modelo 440, sem óleo/graxa), em seguida foi devidamente fechado e imerso em nitrogênio líquido. Pelo impacto entre a amostra e as esferas, pulverizou-se a amostra. O programa utilizado na moagem das amostras consistiu de uma etapa de congelamento de 3 minutos e uma segunda etapa de pulverização, em alta frequência (15 impactos/segundo), por 10 minutos.

Após a moagem, como a fração lipídica pode ocasionar fracionamento isotópico de até 5‰ nos valores de carbono-13 (PIASENTIER et al., 2003), as amostras foram desengorduradas em éter etílico, à temperatura de 65ºC, utilizando aparelho de *Soxhlet* (TE-044), durante quatro horas. Após esse período, as amostras foram suspensas durante uma hora para que apenas o éter recondicionado as lavasse. Posteriormente, as amostras foram retiradas do aparelho e secas em estufa de ventilação forçada durante uma hora, para que houvesse evaporação do éter.

Para a realização das análises isotópicas, as amostras foram acondicionadas e pesadas (50 a 70 µg), em cápsulas de estanho e introduzidas, por meio de um amostrador automático, no analisador de Carbono, Hidrogênio, Oxigênio, Nitrogênio e Enxofre, modelo Flash 2000 EA, fabricante *Thermo Scientific*, no qual, em presença de oxigênio (O_2) e óxido de cobre (CuO), foram queimadas quantitativamente para CO_2 e outros gases (N_2, O_2 e H_2O). O gás formado foi separado em coluna cromatográfica gasosa e analisado no espectrômetro de massa de razões isotópicas (Delta V *Advantage*)

do Centro de Isótopos Estáveis Ambientais, do Instituto de Biociências da Unesp, *Campus* de Botucatu.

Os resultados foram expressos em *delta per mil* da razão isotópica em relação ao padrão internacional *Peedee Belemnite* (PDB) para o elemento carbono, de acordo com a Equação 1:

$$\delta^{13}C_{(amostra,\ padrão)} = [(R_{amostra}/R_{padrão}) - 1]x\ 10^3 \quad (1)$$

Em que, $\delta^{13}C$(amostra, padrão) = enriquecimento da razão $^{13}C/^{12}C$ da amostra em relação ao padrão e R = razão isotópica ($^{13}C/^{12}C$) da amostra e do padrão.

Para avaliar a velocidade de substituição do carbono nos tecidos dos animais após determinado intervalo de tempo, foi empregada a função exponencial do tempo expressa pela Equação 2, do software Origin® 6.0 Professional (Microcal Software, 1999):

$$\delta^{13}C(t) = \delta\ ^{13}C(f) + [\delta^{13}C(i) - \delta^{13}C(f)]e^{-kt} \quad (2)$$

Em que, $\delta^{13}C(t)$ = enriquecimento isotópico do tecido em qualquer tempo (t); $\delta^{13}C(f)$ = enriquecimento isotópico do tecido no patamar de equilíbrio, ou condição final; $\delta^{13}C(i)$ = enriquecimento isotópico do tecido, na condição inicial; k = constante de troca (*turnover*) em unidades de tempo^{-1} e t = tempo (em dias) desde a substituição da ração (DUCATTI et al., 2002).

A meia-vida do carbono para os tecidos envolvidos nos tratamentos foi calculada pela Equação 3:

$$T = \ln 2/k \quad (3)$$

Em que, T = meia-vida, unidade: tempo (dias); ln = logaritmo neperiano; k = constante de *turnover*, unidade: dia^{-1}, sugerindo uma ideia da "velocidade" no processo de troca dos isótopos estáveis nos tecidos (DUCATTI et al., 2002).

O tempo necessário para que ocorra a substituição de 95% dos átomos iniciais pelos átomos finais ($t_{95\%}$) pode ser determinado pela equação 4:

$$t_{95\%} = (-1/k)\ \ln(1-F) \quad (4)$$

Em que, F (átomos trocados) igual a 95% foi considerado como sistema estabilizado.

Os valores do fracionamento isotópico dos tecidos ao final do período experimental em relação à dieta foram calculados de acordo com DeNiro e Epstein (1978) pela equação 5:

$$\Delta = \delta\text{tecido} - \delta\text{dieta} \quad (5)$$

Onde:

Δ = fator de fracionamento entre o tecido e a dieta, em parte per mil (‰);

δtecido = enriquecimento relativo do tecido em questão, em parte per mil (‰);

δdieta = enriquecimento relativo médio da respectiva dieta, em parte per mil (‰);

Tabela 2. Composição percentual, níveis nutricionais e valores isotópicos das dietas experimentais nas fases pré-inicial e inicial de suínos.

Ingredientes	Pré-Inicial C_3	Pré-Inicial C_4	Inicial C_3	Inicial C_4
Concentrado	40[1]	40[1]	16[2]	16[2]
Milho	-	40	-	54
Quirera de Arroz	40	-	54	-
Farelo de Soja	20	20	25	25
Açúcar	-	-	5	5
Total	100	100	100	100
Níveis Nutricionais Calculados				
PB (%)	18,72	19,00	19,04	19,27
EM (kcal/kg)	3.408	3.320	3.385	3.360
Calcio (%)	0.78	0,74	0,64	0,64
Fósforo Disp. (%)	0,61	0,62	0,58	0,65
Lisina Digest. (%)	1,32	1,32	1,07	1,07
Metionina Digest. (%)	0,48	0,48	0,37	0,37
Treonina Digest. (%)	0,80	0,80	0,63	0,63
Triptofano Digest. (%)	0,19	0,19	0,20	0,20
Na (%)	0,45	0,43	0,32	0,31
Cobre (ppm)	140,00	140,00	130,00	130,00
Zinco (ppm)	3.140,00	3.140,00	2.920,00	2.920,00
Valores isotópicos médios analisados*				
	−26,72±1,2	−19,58±1,9	−28,11±1,1	−16,97±0,(

[1]Produto comercial para fase pré-inicial fornecendo por Kg do produto: cálcio, 14,20 g; extrato etéreo, 63,80 g; fibra bruta, 16,70 g; fósforo, 7.300,00 mg; lisina, 2,00 mg; matéria mineral, 78,30 g; metionina, 0,97 mg; proteína bruta, 172,50 g; umidade, 56,90 g; ácido fólico, 2,25 mg; cobalto, 2,50 mg; cobre, 250,00 mg, colina, 2.487,35 mg, colistina, 100,00 mg; ferro, 65,27 mg; flúor, 20,80 mg; fitase, 1.200,00 ftu; iodo,3,75 mg; manganês, 107,00 mg; niacina, 75,00 mg; pantotenato de cálcio, 35,06 mg; selênio, 1,13 mg; treonina, 14,50 g; triptofano, 2.400,00 mg; vitamina A, 22.500,00 UI; vitamina B1, 5,06 mg; vitamina B12, 75,00 mcg; vitamina B2, 15,00 mg; vitamina B6, 7,50 mg; vitamina D3, 5.630,00 UI; vitamina E, 56,25 UI; vitamina H, 0,30 mg; vitamina K, 5,63 mg; zinco, 8.050,00 mg.

[2]Produto comercial para fase inicial I fornecendo por Kg do produto: cálcio, 37,70 g; extrato etéreo, 99,60 g; fibra bruta, 12,70 g; fósforo, 15,50 g; lisina, 24,30 g; matéria mineral, 139,10 g; metionina, 9.700,00 mg; proteína bruta, 180,20 g; umidade, 51,50 g; ácido fólico, 6,00 mg; cobalto, 6,50 mg; cobre, 690,00 mg; colina, 2.516,74 mg; colistina, 250,00 mg; ferro, 145,75 mg; fitase, 3.000,00 ftu, iodo, 9,75 mg; manganês, 274,00 mg; niacina, 200,00 mg; pantotenato de cálcio, 93,50 mg, selênio, 3,00 mg; treonina, 12,10 g; vitamina A, 60.000,00 UI; vitamina B1, 13,50 mg; vitamina B12, 200,00 mcg; vitamina B2, 40,00 mg; vitamina B6, 20,00 mg; vitamina D3, 15.000,00 UI; vitamina E, 150,00 UI; vitamina H, 0,80 mg; vitamina K, 15,00 mg; zinco, 16,00 g.

*Valores isotópicos médios expressos em $\delta^{13}C$ relativos ao padrão *PeeDee Belemnite* (PDB) em ‰.

Tabela 3. Composição percentual, níveis nutricionais e valores isotópicos das dietas experimentais nas fases de crescimento e terminação de suínos.

Ingredientes	Cresc. C_3	Cresc. C_4	Term. C_3
Núcleo	3[1]	3[1]	3[2]
Milho	-	70	-
Quirera de Arroz	70	-	73
Farelo de Soja	27	27	24
Total	100	100	100
Níveis Nutricionais			
PB (%)	18,18	19,39	16,64
EM (Kcal/kg)	3.289	3.267	3.296
Cálcio (%)	0,709	0,75	0,735
Fósforo Disp. (%)	0,43	0,53	0,39
Lisina Digest. (%)	0,85	0,85	0,77
Metionina Digest. (%)	0,28	0,28	0,26
Treonina Digest. (%)	0,57	0,57	0,53
Triptofano Digest.(%)	0,22	0,22	0,20
Valores isotópicos	médios analisados*		
	-28,79±0,80	-17,3±0,98	-28,5±0,75

[1] Produto comercial para fase de crescimento fornecendo por Kg de produto: ácido fólico, 20,00 mg; cálcio, 150,00 g; cobalto, 33 mg; cobre, 3333,00 mg; ferro, 3369,00 mg; fósforo, 20,000 g; iodo; 50,00 mg; manganês, 1333,00 mg; niacina, 666,00 mg; selênio, 10,00 mg; vitamina A, 200.000,00 UI; vitamina B1, 45 mg; vitamina B2, 133 mg; vitamina B6, 66 mg; vitamina D3, 50.000,00 UI, vitamina E, 500,00 UI; vitamina H, 2,66mg; vitamina K, 50,00 mg; zinco, 3333,00 mg.

[2] Produto comercial para fase de terminação fornecendo por Kg de produto: ácido fólico, 20,00 mg; cálcio, 140,00 g; cobalto, 35 mg; cobre, 3333,00 mg; ferro, 3500,00 mg; fósforo, 20,000 g; iodo; 52,00 mg; manganês, 1400,00 mg; niacina, 670,00 mg; selênio, 10,00 mg; vitamina A, 201.000,00 UI; vitamina B1, 45 mg; vitamina B2, 134 mg; vitamina B6, 67 mg; vitamina D3, 50.250,00 UI, vitamina E, 502,00 UI; vitamina H, 2,68 mg; vitamina K, 50,00 mg; zinco, 3500,00 mg.

*Valores isotópicos médios expressos em $\delta^{13}C$ relativos ao padrão *PeeDee Belemnite* (PDB) em ‰.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores isotópicos de $\delta^{13}C$ dos dois tecidos analisados (casco e costela) demonstram o processo de substituição do carbono nestes tecidos (Figuras 1 e 2).

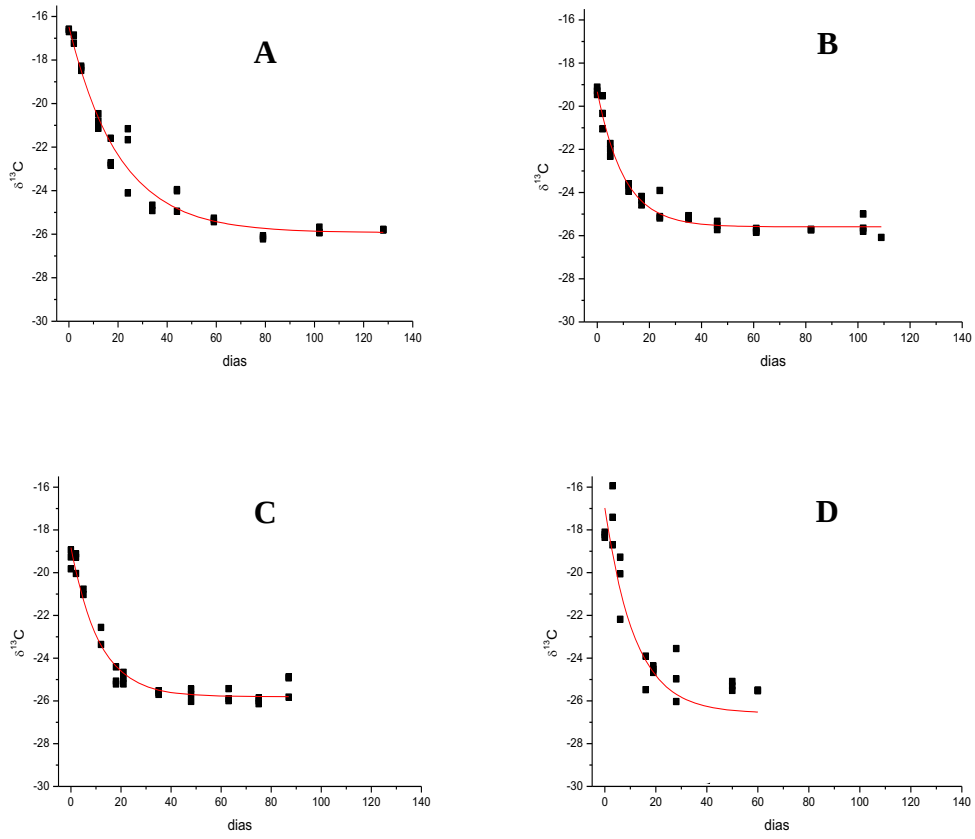


Figura 1 – Curvas de diluição isotópica do carbono no casco de suínos que tiveram a dieta a base de milho (C_4) substituída pela dieta à base de quirera de arroz (C_3) aos 21 (A), 42 (B), 63 (C) e 110 (D) dias de idade, em função dos intervalos de avaliação.

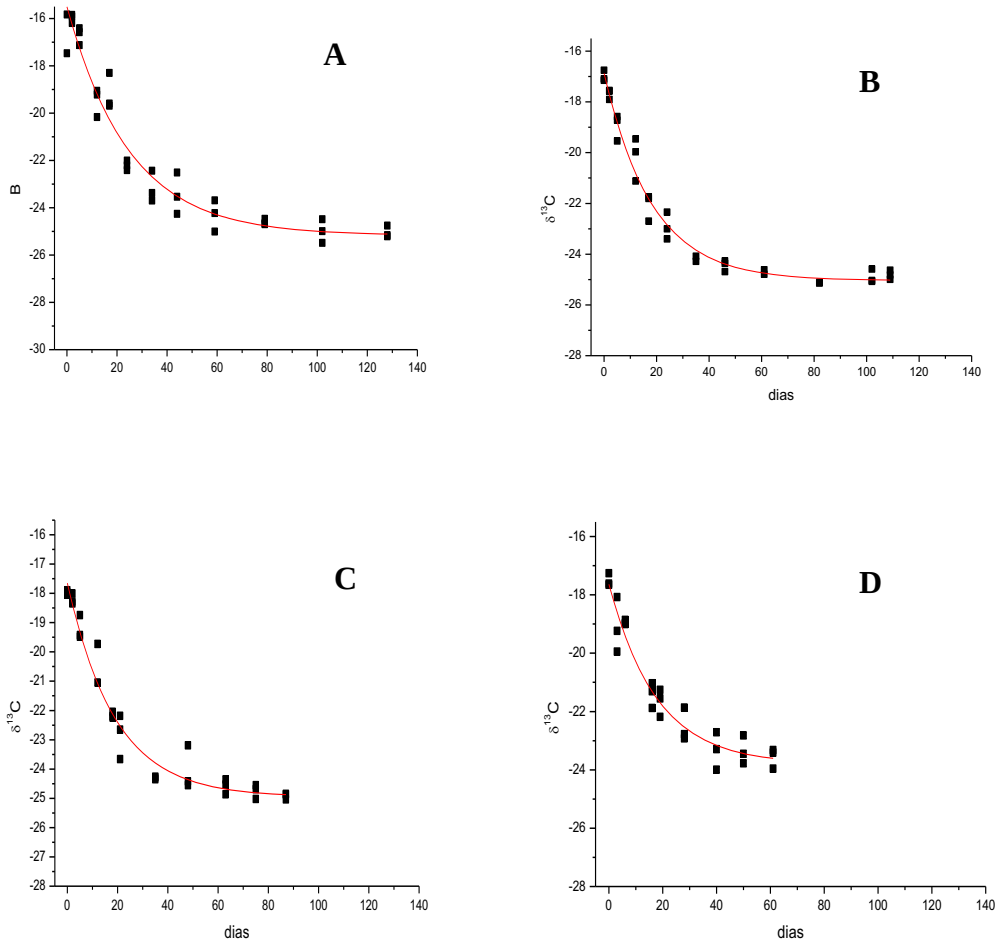


Figura 2 – Curvas de diluição isotópica do carbono da costela de suínos que tiveram a dieta a base de milho (C_4) substituída pela dieta à base de quirera de arroz (C_3) aos 21 (A), 42 (B), 63 (C) e 110 (D) dias de idade, em função dos intervalos de avaliação.

Os gráficos mostram que, com o passar do tempo o $\delta^{13}C$ dos dois tecidos avaliados foram movimentando-se em direção ao sinal isotópico das rações contendo quirera de arroz. As curvas de diluição isotópica das amostras analisadas (Figuras 1 e 2) demonstraram que os suínos que receberam dieta C_3 a partir dos 21, 63 e 110 dias de idade, no casco e costela, atingiram o patamar de equilíbrio isotópico, no entanto para os animais cuja dieta C_4 foi substituída pela dieta C_3 aos 42 dias, este efeito ficou mais evidente.

Através da aplicação da terminologia isotópica à equação geral do modelo, estimou-se a contribuição porcentual das fontes de alimentação dos leitões a partir do

período pós-desmame na composição dos dois tecidos analisados. As Tabelas 4 e 5 mostram as equações exponenciais em função do tempo e os coeficientes de determinação para as variáveis analisadas nos diferentes tratamentos. Os valores destas equações para os tratamentos referentes aos animais que tiveram suas dietas a base de milho substituídas pelas dietas a base de quirera de arroz aos 21, 42 e 63 dias de idade, referentes aos dois tecidos foram muito próximos, porém os valores do último tratamento (animais que receberam dieta C_3 a partir dos 110 dias de idade) se diferenciaram dos outros. Estas equações comprovaram a diluição isotópica do carbono-13 dos tecidos ao longo do período experimental.

Os valores das meias-vidas são apresentados na Tabela 6 e os fatores de fracionamento isotópico calculados para os dois tecidos são mostrados na Tabela 7. A costela apresentou valores maiores de meias-vidas em relação ao casco provavelmente pelo fato de ser um tecido ósseo e possuir *turnover* maior, ou seja, menores velocidades de metabolismo e incorporação do carbono-13 que o casco. Os valores das meias-vidas do casco podem estar relacionados com a mudança no tipo de piso a partir da saída da creche (aproximadamente com 63 dias de idade), com consequente maior desgaste que ocorre quando os animais são mantidos sobre o piso de cimento, especialmente quando apresentam maior peso corporal. Os animais que receberam dieta C_3 a partir de 21 dias de idade apresentaram valores de meias-vidas do carbono no casco e costela de 14,2 e 17,3 dias, respectivamente. A demora em substituir cerca de 50% dos átomos de carbono destes dois tecidos, provavelmente, se deve ao baixo consumo de alimentos pelos leitões, logo após o desmame.

Caldara et al. (2007), avaliaram o *turnover* do tecido adiposo de leitões pós-desmame, e constataram que a incorporação do sinal isotópico da dieta C_3 só começa após o fim do período crítico atribuído ao desmame. Esta fase crítica é caracterizada por reduções no consumo de alimento e na taxa de crescimento, e aumento na ocorrência de diarreia nos leitões (ARMSTRONG e CLAWSON, 1980).

Apesar dos animais que receberam dieta C_3 a partir dos 21 e 63 dias de idade também terem atingido o equilíbrio isotópico, provavelmente, os que receberam esta dieta aos 42 dias mostraram tal fato de forma mais evidente através dos valores de meias-vidas, 7,1 e 12,7, para o casco e a costela, respectivamente, provavelmente devido ao fato dos leitões terem saído do período crítico relacionado ao desmame. Além

disto, a troca da dieta é refletida na composição isotópica dos tecidos, e refere-se ao período de desenvolvimento e ao crescimento do novo tecido, e não somente ao *turnover* metabólico presente nos tecidos.

Conforme Tieszen *et al*. (1983), os tecidos e componentes do corpo que possuem alto nível de atividade metabólica, ou alta quantidade de gordura, assim como sangue e fígado de cobaias, apresentaram rápida taxa de *turnover* em relação aos tecidos menos ativos ou gordurosos como, por exemplo, colágeno e pelo.

Os valores do fracionamento isotópico (Tabela 7) demonstraram que provavelmente os animais que receberam dieta C_3 aos 21, 42 e 63 dias de idade, alcançaram o patamar de equilíbrio referente a esta nova dieta. Estes resultados estão de acordo com DeNiro e Epstein (1978), quando afirmam que o animal é aquilo que consome ±1‰ para os isótopos do carbono.

A costela apresentou maiores valores de fracionamento isotópico em relação ao casco, isto demonstra que as relações isotópicas dos tecidos podem variar dentro de um indivíduo alimentado com uma dieta constante, porque os isótopos fracionam diferentemente entre a dieta e os vários tecidos (TIESZEN et al.,1983). Os resultados desta pesquisa concordam com os obtidos por Howland et al. (2003) que utilizaram dietas com diferentes composições de aminoácidos para suínos e verificaram que os fatores de fracionamento no colágeno do osso dos animais variaram de 0,5 ‰ para 6,1 ‰. Assim como Nardoto et al. (2006) que determinaram os valores de $\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$ em diferentes tecidos de suínos, como pelo, unha, fígado, músculo, gordura e cartilagem, em função da alimentação dos animais, com o objetivo de documentar o fracionamento existente entre os tecidos e a dieta e observaram que os tecidos como gordura, fígado e músculo foram em média 2,1‰ mais leves que a dieta, enquanto que o pelo e a unha não apresentaram enriquecimento do ^{13}C em relação à dieta.

Outros fatores podem influenciar o fracionamento isotópico como as diferenças na ingestão de alimentos (MIRON et al, 2006), idade (JENKINS et al, 2001), taxa metabólica (MACAVOY, ARNESON e BASSETT, 2006) e estado reprodutivo (KURLE, 2002). Além disso, diferentes pressões externas ambientais ou conteúdo nutricional das rações podem levar a diferenças na assimilação e armazenamento de nutrientes entre os diferentes tipos de tecidos.

Tabela 4 – Equações exponenciais das diluições isotópicas, do casco de suínos, em função do período de substituição da dieta a base de milho (C_4) pela dieta à base de quirera de arroz (C_3) aos 21, 42, 63 e 110 dias de idade, com seus respectivos coeficientes de determinação (R^2).

Idade de substituição	Equações	R^2
21	$\delta^{13}C = -25,93 + 9,45e^{-0,0487t}$	0,966
42	$\delta^{13}C = -25,59 + 6,26e^{-0,0974t}$	0,973
63	$\delta^{13}C = -25,80 + 6,98e^{-0,0884t}$	0,961
110	$\delta^{13}C = -26,58 + 9,60e^{-0,0848t}$	0,801

Tabela 5 – Equações exponenciais das diluições isotópicas, da costela de suínos, em função do período de substituição da dieta a base de milho (C_4) pela dieta à base de quirera de arroz (C_3) aos 21, 42, 63 e 110 dias de idade, com seus respectivos coeficientes de determinação (R^2).

Idade de substituição	Equações	R^2
21	$\delta^{13}C = -25,17 + 9,66e^{-0,0401t}$	0,956
42	$\delta^{13}C = -25,04 + 8,16e^{-0,0548t}$	0,979
63	$\delta^{13}C = -25,95 + 7,30e^{-0,0527t}$	0,968
110	$\delta^{13}C = -23,80 + 6,17e^{-0,0565t}$	0,944

Tabela 6 – Valores calculados de meias-vidas (dias) do casco e costela de suínos que tiveram a dieta a base de milho (C_4) substituída pela dieta a base de quirera de arroz (C_3) aos 21, 42, 63 e 110 dias de idade.

Idade de substituição	Casco		Costela	
	50%	95%	50%	95%
21	14,2	62	17,3	75
42	7,1	31	12,7	55
63	7,8	34	13,1	57
110	8,2	35	12,3	53

Tabela 7 – Fator de fracionamento isotópico (Δ) entre tecido e dieta* dos animais que tiveram a dieta a base de milho (C_4) substituída pela dieta a base de quirera de arroz (C_3) aos 21, 42, 63 e 110 dias de idade ($\Delta = \delta tecido - \delta dieta$).

Idade de substituição	Casco	Costela
21	2,84	3,59
42	3,49	4,16
63	3,00	4,08
110	3,14	5,08

*O enriquecimento relativo das dietas foi calculado a partir da média da(s) ração(s) consumida(s) antes da substituição do milho pela quirera de arroz para obtenção do valor isotópico da dieta consumida inicialmente e após a substituição, até o final de cada período experimental, para encontrar o valor isotópico da dieta final.

Foi possível verificar que com o avanço das coletas houve um aumento do valor do fator de fracionamento isotópico nos tecidos, porém, houve tempo suficiente para que os dois tecidos alcançassem o patamar de equilíbrio isotópico nos animais que receberam dieta C_3 aos 21, 42, 63 e 110 dias de idade.

No processo de rastreabilidade buscam-se tecidos ou fragmentos com diferentes metabolismos que possam refletir as dietas recentes, como sangue (substituição rápida do carbono tecidual), e antigas, como costela (substituição lenta do carbono tecidual). Através da análise de diferentes tecidos animais, amostras de músculos também se mostraram boas opções para refletir por tempo mais prolongado o valor isotópico da

dieta antiga (AUGUSTO 2012, dados não publicados). Assim os dados fornecidos por esta pesquisa e a anterior (músculos reto do abdome e semitendinoso) são ferramentas que podem auxiliar nos sistemas de autenticação e rastreabilidade, que permite a certificação de origem dos produtos brasileiros, gerando maior competitividade no mercado internacional, além de proporcionar mais segurança ao consumidor.

A costela demonstrou ser a melhor opção para ser utilizada no processo de rastreabilidade, pois reflete mudanças na dieta de suínos por um período mais longo apresentando grande potencial de aplicação prática com a finalidade de encontrar subprodutos de origem animal na alimentação de suínos.

CONCLUSÃO

Amostra do osso da costela é a melhor opção para refletir a dieta antiga que o casco de suínos, devido à conservação do sinal isotópico por mais tempo.

REFERÊNCIAS

ARMSTRONG, W. D.; CLAWSON, A. J. Nutrition and management of early weaned pigs: effect of increased nutrient concentrations and (or) supplemental liquid feeding. **Journal of Animal Science**, v. 50, p. 377-384, 1980.

AUGUSTO, R. M. N. *Turnover* isotópico do carbono em tecidos corporais de suínos: músculos, fígado, tecido adiposo, plasma, casco e costela. 2012. 25 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu.

BRETT, J. R.; GROVES, T. T. D. Physiological energetics. *In* Fish Physiology. Edited by W. S. Hoar, D. J. Randall and J. R. Brett. **Academic Press**, New York, v. VIII, p. 280-352, 1979.

CALDARA, F. R.; DUCATTI, C.; BERTO, D. A.; DENADAI, J. C.; ANDRADE, G. A.; GIOSO, M. M. Glutamina e *turnover* do carbono no tecido adiposo de leitões. **Pesquisa Agropecuária Brasileira.** v.42, p.1601-1607, 2007.

DENIRO, M.; EPSTEIN, S. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. **Geochim Cosmochim** Acta, v. 42, p. 495-506, 1978.

DUCATTI, C.; CARRIJO, A. S.; PEZZATO, A. C.; MANCERA, P. F. A. Modelo teórico e experimental do reciclagem do carbono-13 em tecidos de mamíferos e aves. **Scientia Agrícola,** v.59, n.1, p.29-33, 2002.

FRAZER, T. K.; ROSS, R. M.; QUETIN, L. B.; MONTOYA, J. P. *Turnover* of carbon and nitrogen during growth of larval krill, *Euphausia superba Dana*: a stable isotope approach. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 212, p. 259-275, 1997.

FRY, B.; ARNOLD, C. Rapid $^{13}C/^{12}C$ *turnover* during growth of brown shrimp (*Penaeus aztecus*). Oecologia, Berlin, v. 54, p. 200-204, 1982.

GANNES, L. Z.; MARTINEZ DEL RIO, C.; KOCH, P. Natural abundance variations in stable isotopes and their potential uses in animal physiological ecology. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v. 119, p. 725-737, 1998.

GRUNERT, K. G. Future trends and consumer lifestyles with regard to meat consumption. **Meat Science**, v. 74, p. 149-160, 2006.

HAWKINS, A. J. S.; DAY, A. J. The metabolic basis of genetic differences in growth efficiency among marine animals. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 203, p. 93-115, 1996.

HETENYI, G. J. R.; PEREZ, G.; VRANIC, M. *Turnover* and precursor-product relationships of nonlipid metabolites. **Physiological Reviews**, v. 63, n. 2, p. 606-667, 1983.

HOBSON, K.; CLARK, R. G. Assessing avian diet using stable isotopes I: *turnover* of ^{13}C in tissues. **The Condor**, v. 94, p.181-188, 1992.

HOWLAND, M. R.; CORR, L. T.; YOUNG, S. M. M.; JONES, V.; JIM, S.; VAN DER MERWE, N. J.; MITCHELL, A. D.; EVERSHED, R. P. Expression of the dietary isotope signal in the compound-specific $\delta^{13}C$ values of pig bone lipids and amino acids. **International Journal of Osteoarchaeology**, v. 13, p. 54–65, 2003.

JENKINS, S. G., PARTRIDGE, S. T., STEPHENSON, T. R., FARLEY, S. D.; ROBBINS, C. T. Nitrogen and carbon isotope fractionation between mothers, neonates, and nursing offspring. **Oecologia**, v. 129, p. 336–341, 2001.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica.** 10ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KENNEDY, B. V.; KROUSE, H. R. Isotope fractionation by plants and animals: implications for nutrition research. **Canadian Journal Physiology and Pharmacology**, v. 68, p. 960-972, 1990.

KURLE, C. M.; WORTHY, G. A. J. Stable carbon and nitrogen isotope ratios in multiple tissues of the northern fur seal *Callorhrinus ursinus*: implications for dietary and migratory reconstructions. **Marine Ecology - Progress Series**, v. 236, p. 289–300, 2002.

LOPEZ, A. C.; SOBESTIANSKY, J.; COIMBRA, J. B. S.; AFONSO, S. B. **Lesões nos cascos e claudicações em suínos**. Boletim Informativo EMBRAPA – CNPSA e EMATER. Porto Alegre – RS, n.10, p. 29, 1997.

MACAVOY, S. E.; ARNESON, L. S.; BASSETT, E. Correlation of metabolism with tissue carbon and nitrogen *turnover* rate in small mammals. **Oecologia**, v. 150, p. 190-201, 2006.

MAYNARD, L. A.; LOOSLI, J. K.; HINTZ, H. F. Nutrição animal. Livraria Freitas Bastos, p. 726, 1984.

MICROCAL SOFTWARE ORIGIN®6.0 PROFESSIONAL. Origin Data Analysis and Technical Graphics. USA, Microcal Software Inc., 1999.

MIRÓN, L. L. M., HERRERA, L. G. M., RAMÍREZ, N. P.; HOBSON, K. A. Effect of diet quality on carbon and nitrogen *turnover* and isotopic discrimination in blood of a New World nectarivorous bat. **Journal of Experimental Biology**, v. 209, p. 541–548, 2006.

MOELLER, S. J.; MILLER, R. K.; EDWARDS, K. K.; ZERBY, H. N.; LOGAN, K. E.; ALDREDGE, T. L.; STAHL, C. A.; BOGGESS, M.; BOX-STEFFENSMEIER, J. M. Consumer perceptions of pork eating quality as affected by pork quality attributes and end-point cooked temperature. **Meat Science**, v. 84, p. 14-22, 2010.

MURRAY, T. E. Phosphorus dynamics in Crystal Lake, Ellington and Stafford, Connecticut. Masters Thesis, p. 91, 1990.

NARDOTO, G. B.; GODOY, P. B.; FERRAZ, E. S. B.; OMETTO, J. P. H. B.; MARTINELLI, L. A.· Stable carbon and nitrogen isotopic fractionation between diet and swine tissues. **Scientia Agricola**, v. 63, 2006.

PIASENTIER, E.; VALUSSO, R.; CAMIN, F.; VERSINI, G. Stable isotope ratio analysis for authentication of lamb meat. **Meat Science**, v. 64, p.239-247, 2003.

ROSTAGNO, H. S. et al. Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. UFV, 2005.

SPONHEIMER, M.; ROBINSON, T. F.; CERLING, T. E.; TEGLAND, L.; ROEDER, B. L.; AYLIFFE, L.; DEARING, M. D.; EHLERINGER, J. R. *Turnover* of stable carbon isotopes in the muscle, liver, and breath CO_2 of alpacas (*Lama pacos*). **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 20, p. 1395–1399, 2006.

SWICK, R. W.; BENEVENGA, N. J. Labile protein reserves and protein *turnover*. **Journal of Dairy Science**, v. 60, p. 505-515, 1977.

TIESZEN, L. L.; BOUTTON, K. G.; TESDAHL, K. G.; SLADE, N. A. Fractionation and *turnover* of stable carbon isotopes in animal tissues: implications for $\delta^{13}C$ analysis of diet. **Oecologia**. v. 57, p. 32–37, 1983.

CAPÍTULO 4

TURNOVER ISOTÓPICO DO CARBONO NO FÍGADO, GORDURA ABDOMINAL E PLASMA SANGUÍNEO DE SUÍNOS

Turnover isotópico do carbono no fígado, gordura abdominal e plasma sanguíneo de suínos

Resumo: Este trabalho objetivou avaliar o *turnover* e o comportamento da incorporação do carbono no fígado, gordura abdominal e plasma sanguíneo de suínos em diferentes períodos de desenvolvimento. Foram utilizados 132 leitões (machos castrados e fêmeas) híbridos comerciais, desmamados com idade média de 21 dias, distribuídos em delineamento experimental inteiramente casualizado em quatro tratamentos com dias distintos de substituição do milho (grão de planta do ciclo fotossintético C_4) das dietas por quirera de arroz (grão produzido por planta do ciclo fotossintético C_3) aos 21; 42; 63 e 110 dias de idade, para mudança do sinal isotópico de carbono-13. As curvas de diluição isotópica do fígado mostraram que os animais que tiveram suas dietas substituídas por dieta C_3 aos 21, 42, 63 e 110 dias de idade, atingiram o patamar de equilíbrio isotópico. Os dados de meias-vidas encontrados no fígado e no plasma indicaram maior rapidez para refletir o sinal isotópico da nova dieta que na gordura. De acordo com os tecidos avaliados, pode-se concluir que a gordura apresentou taxa de *turnover* e metabolismo lentos, podendo elegê-lo como tecido que reflete por tempo mais prolongado o valor isotópico da dieta antiga enquanto que o plasma e o fígado indicam alterações mais recentes na dieta.

Palavras-chave: carbono-13, tecido, dieta, rastreabilidade

Carbon isotopic *turnover* in the liver, fat and blood plasma of swines

Abstract: The objective of this study was to evaluate the behavior of the turnover and incorporation of carbon in the liver, abdominal fat and blood plasma of swines, so you can use them in studies of turnover of carbon in different. This study aimed to evaluate the carbon *turnover* in liver, fat and blood plasma of swines in different periods of development. We used 132 commercial hybrids (barrows and females), weaned at an average age of 21 days, distributed in a completely randomized design with four treatments on different days of substitution of corn (grain plant the C_4 photosynthetic cycle) diets by broken rice (grain produced per plant photosynthetic cycle C_3) at 21, 42, 63 and 110 days of age to change the signal isotope carbon-13. The curves of isotopic dilution of the liver showed that the animals that had their diets diet replaced by C3 at 21, 42, 63 and 110 days of age, reached a plateau isotopic. Data for half-lives found in liver and plasma showed faster to reflect the new isotopic signal of the fat diet. According to the tissues studied, it can be concluded that abdominal fat presented *turnover* rate and metabolism slow, as it may elect tissue for a longer time reflects the isotopic value of the diet while the former plasma and liver indicates the most recent changes in the diet.

Key Words: carbon-13, tissue, diet, rastreability

Introdução

O aumento do consumo *per capita* é um desafio para o setor da carne suína, porque as necessidades e expectativas do consumidor contribuem significativamente

para a escolha da fonte proteica (Moeller et al., 2010); sendo crescente a consciência da relação alimentação e saúde e o maior interesse quanto à origem da carne e o sistema de criação dos animais de produção (Grunert, 2006).

Os isótopos estáveis, em particular, do carbono apresentam-se como alternativa promissora para estudar processos relacionados à digestão, absorção e metabolismo de nutrientes por estarem presentes em todos os nutrientes capazes de gerar energia aos animais e por representarem cerca de 50% dos elementos químicos que compõem o corpo dos animais superiores (Murray, 1990). Entretanto a literatura se apresenta escassa com relação aos trabalhos que avaliam o *turnover* do carbono em suínos, durante os diferentes períodos de criação comercial, ou seja, do desmame até a terminação.

Existem dois tecidos de grande importância para as funções fisiológicas do corpo: fígado e tecido muscular, que se comportam de diferentes maneiras. O fígado é principalmente um órgão homeostático, redistribuindo os metabólitos para os outros tecidos corporais, enquanto os músculos apresentam principalmente função mecânica, mas também são fundamentais no crescimento (Peragón et al., 2001). O tecido adiposo não tem sido considerado importante no metabolismo de aminoácidos, porém estudos apontaram que esse tecido metaboliza aminoácidos de maneira semelhante ao músculo esquelético (Newsholme e Leech, 1983).

A espectrometria de massas, por meio da análise da razão isotópica para o elemento químico carbono tem sido usada com sucesso para testar a autenticidade e a qualidade de vários produtos, além da caracterização e diferenciação do regime dietético de suínos ibéricos, possibilitando a classificação dos animais de acordo com o tipo de alimentação recebida durante o período de engorda (González-Martin et al., 1999) e a

certificação de origem e de qualidade dos produtos de origem animal (González-Martin et al., 2001).

Através da realização de estudos que contribuam para o conhecimento da assimilação isotópica da matéria orgânica nos tecidos de suínos (*turnover*), quando submetidos a dietas formuladas com ingredientes estritamente vegetais, é possível aplicar a técnica no processo de rastreabilidade de subprodutos de origem animal na alimentação destes animais (Carrijo, 2000).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a velocidade de troca e o comportamento da incorporação do carbono no fígado, gordura e plasma sanguíneo de suínos em diferentes períodos de desenvolvimento.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido na Universidade Estadual Paulista (UNESP), nas instalações de creche e de crescimento e terminação, na área de produção de suínos da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), *Campus* de Botucatu.

Foram utilizados 132 leitões (machos castrados e fêmeas) híbridos comerciais, desmamados com idade média de 21 dias e peso inicial de 6,87 ± 0,65kg, distribuídos aleatoriamente em quatro tratamentos. Nas fases pré-inicial e inicial os animais foram alojados em salas de creche, contendo baias metálicas suspensas com piso ripado, equipadas com bebedouro tipo chupeta, comedouro e campânula para o aquecimento. Quando alcançaram, em média, 63 dias de idade, foram transferidos para a unidade de crescimento e terminação com baias contendo comedouro automático, localizado na

parte frontal, e um bebedouro, no fundo da baia. Os tratamentos experimentais estão discriminados na Tabela 1.

Tabela 1. Descrição dos tratamentos experimentais para suínos em diferentes períodos de criação comercial.

Idade de substituição das dietas	Período avaliado (dias)	Dia de coleta das amostras de plasma (após a troca de ração)	Dia de coleta das amostras de gordura e fígado
21 dias	21 a 150	1; 2; 3; 4; 5; 6; 8; 11; 15; 20; 27; 37	1; 3; 6; 13; 18; 25; 35; 45; 60; 80; 100; 129
42 dias	42 a 150	1; 2; 3; 4; 5; 6; 8; 11; 15; 20; 27; 37	1; 3; 6; 13; 18; 25; 35; 45; 60; 80; 100; 108
63 dias	63 a 150	1; 2; 3; 4; 5; 6; 8; 11; 15; 20; 27; 37	1; 3; 6; 13; 18; 25; 35; 45; 60; 80; 87
110 dias	110 a 175	1; 2; 3; 4; 5; 6; 8; 11; 15; 20; 27; 37	1; 3; 6; 13; 18; 25; 35; 50; 65

Antes da substituição das dietas, os animais receberam ração predominantemente composta por grãos de plantas do ciclo fotossintético C_4 (milho), possuindo sinal isotópico de carbono-13 semelhante ao das rações fornecidas às matrizes que deram origem a estes animais, até o momento da troca. A partir do dia da substituição, os animais passaram a receber dieta contendo grãos de plantas do ciclo fotossintético C_3 (quirera de arroz), com sinal isotópico distinto das dietas que vinham consumindo anteriormente (milho).

O programa de alimentação foi dividido em duas fases na creche, sendo a primeira de 21 aos 42 dias de idade (pré-inicial) e a segunda dos 43 aos 63 dias de idade

(inicial) e nas fases de crescimento (64 aos 105 dias) e terminação (106 aos 175 dias). O alimento foi fornecido à vontade. Todas as rações foram formuladas para atenderem as exigências nutricionais propostas por Rostagno et al. (2005) e são apresentadas nas Tabelas 2 e 3.

A cada dia de coleta, após insensibilização elétrica, foram abatidos três animais e coletados tecidos e sangue (± 5mL) da veia cava anterior em tubos contendo 14,3 UI de heparina sódica que foi imediatamente centrifugado a 3000 x G durante 15 minutos para obtenção do plasma.

Imediatamente após o abate, o abdome dos animais foi aberto e as vísceras retiradas. Foram coletadas amostras do fígado (lobo lateral esquerdo), tecido adiposo subcutâneo (região abdominal). As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos, identificadas e imediatamente congeladas (-18°C) até a sua preparação para as análises isotópicas. Em cada tratamento as coletas foram agrupadas nos primeiros dias devido a maior velocidade na diluição isotópica do carbono no tecido durante esse período (Hobson e Clark, 1992).

As amostras do fígado e tecido adiposo foram descongeladas e secas em estufa de ventilação forçada MA 035/5 Série 9610072 a 56°C, por um período de 48h. Todas as amostras teciduais e as dietas experimentais foram moídas em moinho criogênico *Spex Sample*, modelo Geno/Grinder 2010, à -196ºC. Aproximadamente 2,0 g de amostra foi colocada em frasco de policarbonato juntamente com três esferas de aço inoxidável (modelo 440, sem óleo/graxa), em seguida foi devidamente fechado e imerso em nitrogênio líquido. Pelo impacto entre a amostra e as esferas, pulverizou-se a amostra. O programa utilizado na moagem das amostras consistiu de uma etapa de

congelamento de 3 minutos e uma segunda etapa de pulverização, em alta frequência (15 impactos/segundo), por 10 minutos.

Após a moagem, como a fração lipídica pode ocasionar fracionamento isotópico de até 5‰ nos valores de carbono-13 (Piasentier et al., 2003), as amostras do fígado foram desengorduradas em éter etílico, à temperatura de 65ºC, utilizando aparelho de *Soxhlet* (TE-044), para serem desengorduradas durante quatro horas. Após esse período, as amostras foram suspensas durante uma hora para que apenas o éter recondicionado as lavasse. Posteriormente, as amostras foram retiradas do aparelho e secas em estufa de ventilação forçada durante uma hora, para que houvesse evaporação do éter. O plasma sofreu apenas um processo de liofilização que visa a total desidratação do produto, permitindo conservação ideal e estocagem em pequenos espaços (tubos de *eppendorf* contendo 1ml de plasma). Este processo foi realizado em equipamento Terroni modelo LB 1500, a temperatura de 28°C e vácuo parcial de 100 µ Hg.

Para a realização das análises isotópicas, as amostras foram acondicionadas e pesadas (50 a 70 µg), em cápsulas de estanho e introduzidas, por meio de um amostrador automático, no analisador de Carbono, Hidrogênio, Oxigênio, Nitrogênio e Enxofre, modelo Flash 2000 EA, fabricante *Thermo Scientific*, no qual, em presença de oxigênio (O_2) e óxido de cobre (CuO), foram queimadas quantitativamente para CO_2 e outros gases (N_2, O_2 e H_2O). O gás formado foi separado em coluna cromatográfica gasosa e analisado no espectrômetro de massa de razões isotópicas (Delta V *Advantage*) do Centro de Isótopos Estáveis Ambientais, do Instituto de Biociências da Unesp, *Campus* de Botucatu.

Os resultados foram expressos em *delta per mil* da razão isotópica em relação ao padrão internacional *Peedee Belemnite* (PDB) para o elemento carbono, de acordo com a Equação 1:

$$\delta‰ {}^{13}C_{(amostra,\ padrão)} = [(R_{amostra}/R_{padrão}) - 1]x\ 10^3 \quad (1)$$

Em que, $\delta^{13}C$(amostra, padrão) = enriquecimento da razão $^{13}C/^{12}C$ da amostra em relação ao padrão e R = razão isotópica ($^{13}C/^{12}C$) da amostra e do padrão.

Para avaliar a velocidade de substituição do carbono nos tecidos dos animais após determinado intervalo de tempo, foi empregada a função exponencial do tempo, expressa pela Equação (2a), do software Origin® 6.0 Professional (Microcal Software, 1999) ou o modelo sigmoidal de regressão de Boltzmann (2b), de acordo com Caldara et al. (2007), que melhor explicou o comportamento dos resultados isotópicos referente ao plasma dos animais que receberam dieta C_3 aos 21 dias de idade.

$$\delta^{13}C(t) = \delta^{13}C(f) + [\delta^{13}C(i) - \delta^{13}C(f)]e^{-kt} \quad (2a)$$

Em que, $\delta^{13}C(t)$ = enriquecimento isotópico do tecido em qualquer tempo (t); $\delta^{13}C(f)$ = enriquecimento isotópico do tecido no patamar de equilíbrio, ou condição final; $\delta^{13}C(i)$ = enriquecimento isotópico do tecido, na condição inicial; k = constante de troca (*turnover*) em unidades de tempo^{-1} e t = tempo (em dias) desde a substituição da ração (Ducatti et al., 2002).

$$\delta^{13}C(t) = \delta^{13}C\ (f) + [\delta^{13}C\ (i) - \delta^{13}C\ (f)/(1 + e^{\ (t-x_o)/dx})] \quad (2b)$$

Em que, $\delta^{13}C(i)$ é o enriquecimento relativo inicial no tecido; $\delta^{13}C(f)$ é o enriquecimento relativo final no tecido; $\delta^{13}C(t)$ é o enriquecimento relativo no tecido em qualquer tempo (t); χ_0 é o ponto de inflexão da sigmóide, representa a meia-vida do carbono, expressada em unidade de tempo; dx é a constante de tempo, expressada em unidade de tempo; t é o tempo experimental, expressado em unidade de tempo (dias após o desmame).

A meia-vida do carbono para os tecidos envolvidos nos tratamentos foi calculada pela Equação 3:

$$T = \ln 2/k \quad (3)$$

Em que, T = meia-vida, unidade: tempo (dias); ln = logaritmo neperiano; k = constante de *turnover*, unidade: dia^{-1}, sugerindo uma ideia da "velocidade" no processo de troca dos isótopos estáveis nos tecidos (Ducatti et al., 2002).

O tempo necessário para que ocorra a substituição de 95% dos átomos iniciais pelos átomos finais ($t_{95\%}$) pode ser determinado pela Equação 4:

$$t_{95\%} = (-1/k) \ln(1-F) \quad (4)$$

Em que, F (átomos trocados) igual a 95% foi considerado como sistema estabilizado.

Os valores do fracionamento isotópico dos tecidos ao final do período experimental em relação à dieta foram calculados de acordo com DeNiro e Epstein (1978) pela Equação 5:

$$\Delta = \delta\text{tecido} - \delta\text{dieta} \quad (5)$$

Onde:

Δ = fator de fracionamento entre o tecido e a dieta, em parte per mil (‰);

δtecido = enriquecimento relativo do tecido em questão, em parte per mil (‰);

δdieta = enriquecimento relativo médio da respectiva dieta, em parte per mil (‰);

Tabela 2. Composição percentual, níveis nutricionais e valores isotópicos das dietas experimentais nas fases pré-inicial e inicial de suínos.

Ingredientes	Pré-Inicial C_3	Pré-Inicial C_4	Inicial C_3	Inicial C_4
Concentrado	40[1]	40[1]	16[2]	16[2]
Milho	-	40	-	54
Quirera de Arroz	40	-	54	-
Farelo de Soja	20	20	25	25
Açúcar	-	-	5	5
Total	100	100	100	100
Níveis Nutricionais Calculados				
PB (%)	18,72	19,00	19,04	19,27
EM (kcal/kg)	3.408	3.320	3.385	3.360
Calcio (%)	0.78	0,74	0,64	0,64
Fósforo Disp. (%)	0,61	0,62	0,58	0,65
Lisina Digest. (%)	1,32	1,32	1,07	1,07
Metionina Digest. (%)	0,48	0,48	0,37	0,37
Treonina Digest. (%)	0,80	0,80	0,63	0,63
Triptofano Digest. (%)	0,19	0,19	0,20	0,20
Na (%)	0,45	0,43	0,32	0,31
Cobre (ppm)	140,00	140,00	130,00	130,00
Zinco (ppm)	3.140,00	3.140,00	2.920,00	2.920,00
Valores isotópicos médios analisados*				
	-26,72±1,2	-19,58±1,9	- 28,11±1,1	-16,97±0,09

[1]Produto comercialpara fase pré-inicial fornecendo por Kg do produto: cálcio, 14,20 g; extrato etéreo, 63,80 g; fibra bruta, 16,70 g; fósforo, 7.300,00 mg; lisina, 2,00 mg; matéria mineral, 78,30 g; metionina, 0,97 mg; proteína bruta, 172,50 g; umidade, 56,90 g; ácido fólico, 2,25 mg; cobalto, 2,50 mg; cobre, 250,00 mg, colina, 2.487,35 mg, colistina, 100,00 mg; ferro, 65,27 mg; flúor, 20,80 mg; fitase, 1.200,00 ftu; iodo,3,75 mg; manganês, 107,00 mg; niacina, 75,00 mg; pantotenato de cálcio, 35,06 mg; selênio, 1,13 mg; treonina, 14,50 g; triptofano, 2.400,00 mg; vitamina A, 22.500,00 UI; vitamina B1, 5,06 mg; vitamina B12, 75,00 mcg; vitamina B2, 15,00 mg; vitamina B6, 7,50 mg; vitamina D3, 5.630,00 UI; vitamina E, 56,25 UI; vitamina H, 0,30 mg; vitamina K, 5,63 mg; zinco, 8.050,00 mg.

[2]Produto comercial para fase inicial I fornecendo por Kg do produto: cálcio, 37,70 g; extrato etéreo, 99,60 g; fibra bruta, 12,70 g; fósforo, 15,50 g; lisina, 24,30 g; matéria mineral, 139,10 g; metionina, 9.700,00 mg; proteína bruta, 180,20 g; umidade, 51,50 g; ácido fólico, 6,00 mg; cobalto, 6,50 mg; cobre, 690,00 mg; colina, 2.516,74 mg; colistina, 250,00 mg; ferro, 145,75 mg; fitase, 3.000,00 ftu, iodo, 9,75 mg; manganês, 274,00 mg; niacina, 200,00 mg; pantotenato de cálcio, 93,50 mg, selênio, 3,00 mg; treonina, 12,10 g; vitamina A, 60.000,00 UI; vitamina B1, 13,50 mg; vitamina B12, 200,00 mcg; vitamina B2, 40,00 mg; vitamina B6, 20,00 mg; vitamina D3, 15.000,00 UI; vitamina E, 150,00 UI; vitamina H, 0,80 mg; vitamina K, 15,00 mg; zinco, 16,00 g.

*Valores isotópicos médios expressos em $\delta^{13}C$ relativos ao padrão *PeeDeeBelemnite* (PDB) em ‰.

Tabela 3. Composição percentual, níveis nutricionais e valores isotópicos das dietas experimentais nas fases de crescimento e terminação de suínos.

Ingredientes	Cresc. C_3	Cresc. C_4	Term. C_3
Núcleo	3[1]	3[1]	3[2]
Milho	-	70	-
Quirera de Arroz	70	-	73
Farelo de Soja	27	27	24
Total	100	100	100
Níveis Nutricionais			
PB (%)	18,18	19,39	16,64
EM (Kcal/kg)	3.289	3.267	3.296
Cálcio (%)	0,709	0,75	0,735
Fósforo Disp. (%)	0,43	0,53	0,39
Lisina Digest. (%)	0,85	0,85	0,77
Metionina Digest. (%)	0,28	0,28	0,26
Treonina Digest. (%)	0,57	0,57	0,53
Triptofano Digest. (%)	0,22	0,22	0,20
Valores isotópicos	médios analisados*		
	-28,79±0,80	-17,3±0,98	-28,5±0,75

[1]Produto comercial para fase de crescimento fornecendopor Kg de produto:ácido fólico, 20,00 mg; cálcio, 150,00 g; cobalto, 33 mg; cobre, 3333,00 mg; ferro, 3369,00 mg; fósforo, 20,000 g; iodo; 50,00 mg; manganês, 1333,00 mg; niacina, 666,00 mg; selênio, 10,00 mg; vitamina A, 200.000,00 UI; vitamina B1, 45 mg; vitamina B2, 133 mg; vitamina B6, 66 mg; vitamina D3, 50.000,00 UI, vitamina E, 500,00 UI; vitamina H, 2,66mg; vitamina K, 50,00 mg; zinco, 3333,00 mg.

[2]Produto comercial para fase de terminação fornecendo por Kg de produto: ácido fólico, 20,00 mg; cálcio, 140,00 g; cobalto, 35 mg; cobre, 3333,00 mg; ferro, 3500,00 mg; fósforo, 20,000 g; iodo; 52,00 mg; manganês, 1400,00 mg; niacina, 670,00 mg; selênio, 10,00 mg; vitamina A, 201.000,00 UI; vitamina B1, 45 mg; vitamina B2, 134 mg; vitamina B6, 67 mg; vitamina D3, 50.250,00 UI, vitamina E, 502,00 UI; vitamina H, 2,68 mg; vitamina K, 50,00 mg; zinco, 3500,00 mg.

*Valores isotópicos médios expressos em $\delta^{13}C$ relativos ao padrão *PeeDee Belemnite* (PDB) em ‰.

Resultados e Discussão

O comportamento da diluição isotópica do fígado, da gordura e do plasma em relação aos tratamentos experimentais está ilustrado nas Figuras 1, 2 e 3, respectivamente. As equações exponenciais em função do tempo e os coeficientes de determinação dos tecidos avaliados estão apresentados nas Tabelas 4, 5 e 6.

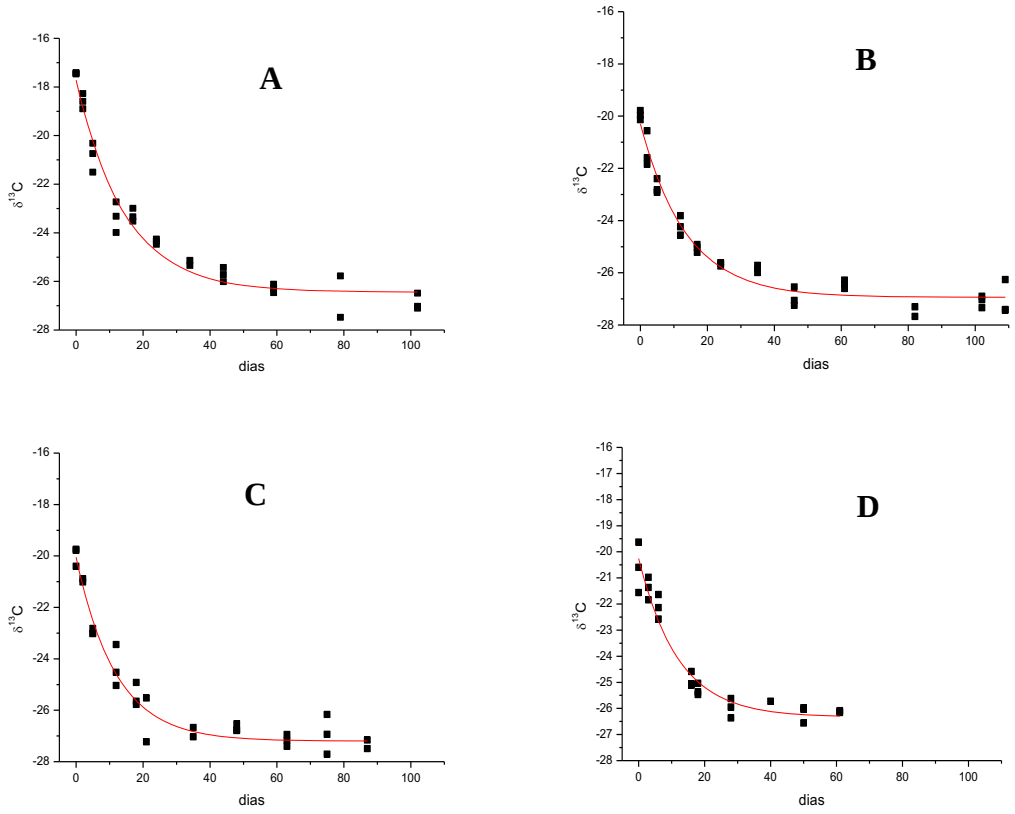


Figura 1 – Curvas de diluição isotópica do carbono do fígado de suínos que tiveram a dieta a base de milho (C_4) substituída pela dieta à base de quirera de arroz (C_3) aos 21 (A), 42 (B), 63 (C) e 110 (D) dias de idade, em função dos intervalos de avaliação.

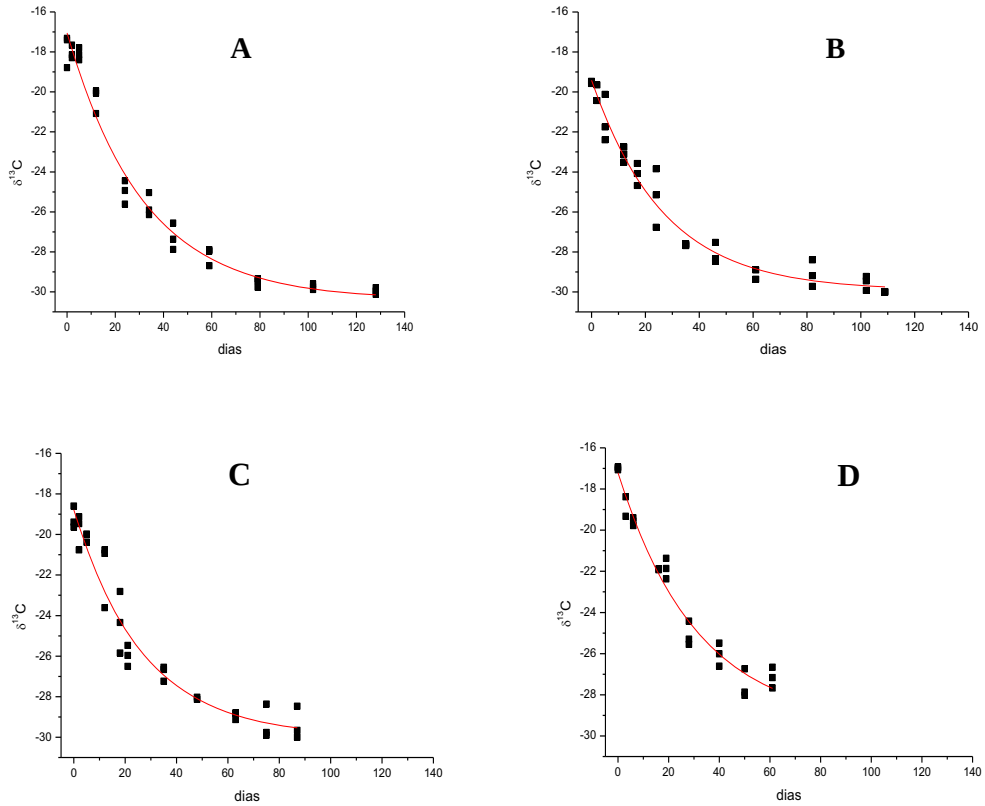


Figura 2 – Curvas de diluição isotópica do carbono da gordura de suínos que tiveram a dieta a base de milho (C_4) substituída pela dieta à base de quirera de arroz (C_3) aos 21 (A), 42 (B), 63 (C) e 110 (D) dias de idade, em função dos intervalos de avaliação.

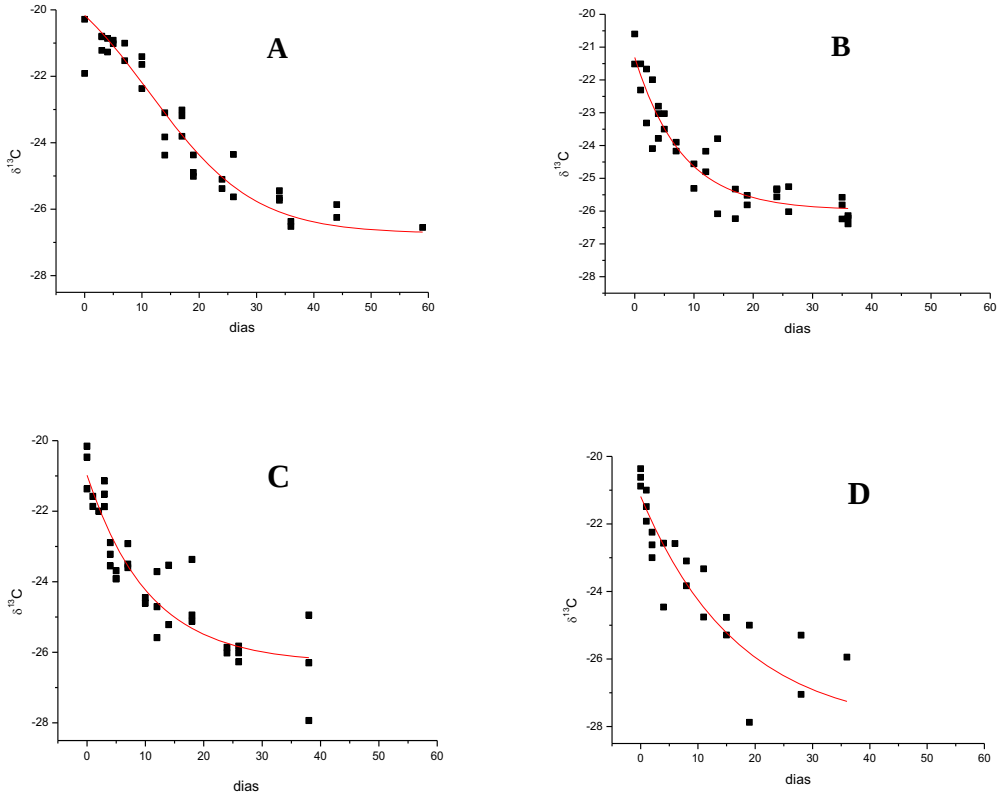


Figura 3 – Curvas de diluição isotópica do carbono do plasma de suínos que tiveram a dieta a base de milho (C_4) substituída pela dieta à base de quirera de arroz (C_3) aos 21 (A), 42 (B), 63 (C) e 110 (D) dias de idade, em função dos intervalos de avaliação.

Tabela 4 – Equações exponenciais das diluições isotópicas, do fígado de suínos, em função do período de substituição da dieta a base de milho (C_4) pela dieta à base de quirera de arroz (C_3) aos 21, 42, 63 e 110 dias de idade, com seus respectivos coeficientes de determinação (R^2).

Idade de substituição	Equações	R^2
21	$\delta^{13}C = -26,44 + 8,72e^{-0,0687t}$	0,968
42	$\delta^{13}C = -26,94 + 6,64e^{-0,0730t}$	0,966
63	$\delta^{13}C = -27,20 + 7,15e^{-0,0843t}$	0,951
110	$\delta^{13}C = -26,33 + 6,08e^{-0,0835t}$	0,949

Tabela 5 – Equações exponenciais das diluições isotópicas, da gordura de suínos, em função do período de substituição da dieta a base de milho (C_4) pela dieta à base de quirera de arroz (C_3) aos 21, 42, 63 e 110 dias de idade, com seus respectivos coeficientes de determinação (R^2).

Idade de substituição	Equações	R^2
21	$\delta^{13}C = -30,39 + 13,33e^{-0,0314t}$	0,979
42	$\delta^{13}C = -29,93 + 10,51e^{-0,0373t}$	0,967
63	$\delta^{13}C = -29,97 + 11,19e^{-0,0373t}$	0,947
110	$\delta^{13}C = -29,40 + 12,18e^{-0,0322t}$	0,967

Tabela 6 – Equações de Boltzmann e exponenciais das diluições isotópicas, do plasma de suínos, em função do período de substituição da dieta a base de milho (C_4) pela dieta à base de quirera de arroz (C_3) aos 21, 42, 63 e 110 dias de idade, com seus respectivos coeficientes de determinação (R^2).

Idade de substituição	Equações	R^2
21	$\delta^{13}C = -26,73 + [18,29/1 + e^{(t-11,4)/9,11}]$	0,907
42	$\delta^{13}C = -25,97 + 4,65e^{-0,1249t}$	0,872
63	$\delta^{13}C = -26,29 + 5,32e^{-0,0944t}$	0,822
110	$\delta^{13}C = -28,09 + 6,90e^{-0,0587t}$	0,809

Tabela 7 – Valores calculados de meias-vidas (dias) do fígado, gordura e plasma de suínos que tiveram a dieta a base de milho (C_4) substituída pela dieta a base de quirera de arroz (C_3) aos 21, 42, 63 e 110 dias de idade.

Idade de substituição	Fígado		Gordura		Plasma	
	50%	95%	50%	95%	50%	95%
21	9,9	44	21,8	95	11,4	49
42	9,5	41	18,6	80	5,6	24
63	8,2	36	18,6	80	7,3	32
110	8,3	36	21,6	93	11,8	51

Tabela 8 – Fator de fracionamento isotópico (Δ) entre tecido e dieta* dos animais que tiveram a dieta a base de milho (C_4) substituída pela dieta a base de quirera de arroz (C_3) aos 21, 42, 63 e 110 dias de idade (Δ = δtecido – δdieta).

Idade de substituição	Fígado	Gordura	Plasma
21	1,77	-1,32	2,48
42	1,94	-0,76	2,78
63	1,25	-0,38	2,61
110	2,52	1,48	2,87

*O enriquecimento relativo das dietas foi calculado a partir da média da(s) ração(s) consumida(s) antes da substituição do milho pela quirera de arroz para obtenção do valor isotópico da dieta consumida inicialmente e após a substituição, até o final de cada período experimental, para encontrar o valor isotópico da dieta final.

As curvas de diluição isotópica do fígado e do plasma (Figuras 1 e 3) mostraram que os animais que tiveram a substituição da dieta C_4 pela C_3 com 21, 42 e 63 dias de idade, atingiram o patamar de equilíbrio isotópico mais rapidamente que os mesmos tratamentos avaliados na gordura. Os valores de $\delta^{13}C$, encontrados no fígado, alcançaram o patamar de equilíbrio isotópico de forma clara em todos os tratamentos, indicando que a escolha do tecido ou fração do animal para o estudo de *turnover*, influencia nas informações sobre a dieta, pois tecidos com rápido metabolismo indicam dietas recentes, enquanto aqueles com taxa de substituição lenta indicam alimentos ingeridos anteriormente. Porém, aqueles que tiveram suas rações substituídas aos 110 dias de idade (na gordura e no plasma) não atingiram o patamar de equilíbrio isotópico, por isso não puderam ser avaliados e nem comparados com os demais tratamentos.

Três fatores podem colaborar com erros na reconstituição da dieta através do uso de isótopos estáveis de carbono. Os materiais endógenos ou tecidos animais refletem a soma do carbono ao longo de diferentes períodos de tempo (Gratton e Forbes, 2006), ou seja, os tecidos mais ativos metabolicamente apresentam *turnover* mais rápido que os tecidos menos ativos metabolicamente; materiais exógenos ou tecidos podem ser relativamente empobrecidos ou enriquecidos em $\delta^{13}C$ em relação à dieta, devido ao

fracionamento isotópico (Gannes et al., 1997) e as diferenças na eficiência de assimilação dos componentes da dieta podem estar ligadas a diferenças na digestibilidade dos componentes de dietas C_3 e C_4 (Garcia et al., 2000).

Outra observação importante é que o cálculo do carbono deve ser se possível, de todo o animal para avaliação do $\delta^{13}C$ da dieta, pois nenhum tecido isolado é ideal para determinar a relação entre a composição isotópica do animal e a de sua dieta (De Niro e Epstein, 1978).

Os valores de fracionamento isotópico (Tabela 8) sugerem que os animais que receberam dieta C_3 aos 21, 42 e 63 dias de idade alcançaram o patamar de equilíbrio referente à nova dieta e estão de acordo com DeNiro e Epstein (1978), segundo os quais o animal é aquilo que consome ±1‰ para os isótopos do carbono.

Os resultados deste trabalho confirmam aqueles obtidos por Nardoto et al. (2006) que observaram diferenças isotópicas entre os tecidos e os valores depletados de ^{13}C nos tecidos com maior metabolismo como, fígado, músculo e tecido adiposo ($P = 0.0082$, $P = 0.0372$, e $P = 0.0188$, respectivamente). Outros estudos também mostraram a depleção do ^{13}C nos tecidos (Tieszen et al., 1983, Pinnegar e Polunin, 1999; Roth e Hobson, 2000).

De acordo com Tieszen et al.(1983), um tecido contendo proporção elevada de lipídios possui, provavelmente, valor de ^{13}C mais negativo do que um tecido com menor teor do mesmo, uma vez que os lipídios são relativamente empobrecidos em ^{13}C, podendo contribuir com a queda do fracionamento isotópico. Os mesmos autores verificaram em pesquisa realizada com gerbil, diferenças significativas entre os valores de ^{13}C nos tecidos destes animais alimentados com dieta de composição isotópica constante de carbono. Os valores de ^{13}C diferiram em menos de 1‰ entre: cérebro,

músculo, fígado e unha, enquanto pelo e gordura diferiram da dieta por + l‰ e -3‰, respectivamente.

González-Martín et al. (1999), relacionaram a abundância de ^{13}C em tecidos de suínos ibéricos com a alimentação fornecida aos animais. Esta pesquisa permitiu diferenciar o tipo de alimentação recebida por esses animais e demonstrar que existiam diferenças no fracionamento isotópico entre as amostras de tecido do fígado e tecido adiposo, com valores menos enriquecidos em ^{13}C nas amostras de animais alimentados com dietas compostas por bellota (planta predominantemente C_3, típica da Península Ibérica), -0,51 e -1,73, respectivamente. A diferença foi mais ampla, no caso do tecido adiposo, o que permitiu concluir que este tecido era adequado para comparação.

Um dos principais impulsionadores desta variabilidade é a diferença em que as taxas de isótopos são fracionadas em diferentes tecidos (Sponheimer et al., 2006). Outros fatores que podem levar à variabilidade no fracionamento tecido-dieta incluem diferenças na ingestão de alimentos (Miron et al, 2006), idade (Jenkins et al, 2001), taxa metabólica (MacAvoy, Arneson e Bassett, 2006) e estado reprodutivo (Kurle, 2002).

No processo de rastreabilidade buscam-se tecidos com diferentes metabolismos que possam refletir as dietas recentes, como sangue e fezes (substituição rápida do carbono tecidual), e antigas, como colágeno (substituição lenta do carbono tecidual).

Pelas equações exponenciais de diluição isotópica (Tabelas 4, 5 e 6), foram calculadas as meias-vidas do carbono nos tecidos avaliados (Tabela 7). Os valores encontrados no fígado e no plasma também indicaram maior rapidez para refletir o sinal isotópico da nova dieta em relação a gordura. Estes dados são confirmados pela pesquisa feita por Caldara et al. (2007), que encontraram valores de meias-vidas do carbono da gordura, da região mandibular, de 22,3 e 20,8 dias para a dieta controle e

contendo glutamina, respectivamente, refletindo uma lenta incorporação do carbono, proveniente da dieta, no tecido adiposo animal.

Os valores de meias-vidas do carbono no fígado foram levemente maiores aos encontrados por Tieszen et al (1983) em gerbil, que foi de 6,4 dias para o fígado e 47,5 para o pelo, demonstrando que o *turnover* do carbono foi linearmente correlacionado com a taxa metabólica dos tecidos. Isso pode estar relacionado à afirmação de Thompson (1953), que especulou que a taxa de *turnover* de um tecido está relacionada com a sua atividade metabólica, uma vez que o consumo de oxigênio diminui à medida que o tamanho corporal do animal aumenta.

O tempo de substituição de 50% dos átomos de carbono do plasma pela nova dieta foi de 11,4 nos animais que passaram a consumir dieta contendo quirera de arroz à partir do desmame, indica a demora do plasma em refletir a nova dieta, provavelmente devido ao baixo consumo de alimentos pelos leitões nesta fase de estresse causado pelo desmame. Os resultados deste trabalho confirmam aqueles obtidos por Caldara et al. (2007), que avaliaram o uso de glutamina e *turnover* do carbono no tecido adiposo submandibular de leitões verificando que também houve demora na troca da metade dos átomos de carbono neste tecido (21 dias). Além disto, a troca da dieta é refletida na composição isotópica dos tecidos, e refere-se ao período de desenvolvimento e ao crescimento do novo tecido, e não somente ao *turnover* metabólico presente nos tecidos.

No desmame há uma mudança abrupta na dieta dos leitões, quando o leite materno é substituído por ração sólida de menor digestibilidade, composta principalmente por grãos de cereais e proteínas vegetais. Como consequência o período de 10 a 14 dias pós-desmame é considerado crítico e se caracteriza normalmente pelo

consumo de ração abaixo do necessário, acompanhado de uma depressão no *status* sanitário e no desempenho produtivo dos animais (Le Dividich e Herpin, 1994).

Os valores obtidos de meias-vidas do carbono no plasma dos suínos foram maiores do que os verificados no plasma de ursos negros (3,5 dias) por Hilderbrand et al., 1996 e *corvos americanus* (*Corvus brachyrhynchos*; 2,9 dias) por Hobson e Clark, 1993. Valores maiores também foram encontrados no trabalho de Pearson et al. (2003), que avaliaram os efeitos da incorporação de nitrogênio da dieta e assinaturas isotópicas de carbonono no sangue total e plasma de pássaros onívoros, e observaram que o plasma fornece informação a curto prazo (aproximadamente de 1 a 4 dias) e o sangue total fornece informações a longo prazo (cerca de 8 a 12 dias).

Hobson e Clark (1992), utilizando codornas em cativeiro, observaram que a meia-vida do plasma sanguíneo é curta, de 2,9 dias, e próxima do valor de 2,6 dias encontrado para o fígado. De acordo com Shaner, Bowers e Macko (2007), o plasma sanguíneo tem rápida taxa de *turnover*, o que significa que dará informação dietética abrangendo poucos dias antes da coleta da amostra, enquanto que as células vermelhas do sangue podem persistir durante vários meses, dependendo das espécies em questão e assim indicam integração dietética ao longo de um período mais longo, além de possibilitar o fornecimento de informações durante o ciclo de criação de suínos sem a necessidade de abate dos animais.

Conclusões

A gordura abdominal apresentou taxa de *turnover* e metabolismo lentos desta forma, reflete por tempo mais prolongado o valor isotópico da dieta antiga, enquanto que o plasma e o fígado indicam as alterações mais recentes na dieta.

Referências

CALDARA, F.R.; DUCATTI, C.; BERTO, D. A. et al. Glutamina e *turnover* do carbono no tecido adiposo de leitões.*Pesquisa* **Agropecuária Brasileira.** v.42, p.1601-1607, 2007.

CARRIJO, A.S.; PEZZATO, A.C.; DUCATTI,C. Avaliação do metabolismo nutricional em poedeiras pela técnica dos isótopos estáveis do carbono ($^{13}C/^{12}C$). **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.2, n.3, p. 209-218, 2000.

DENIRO, M.; EPSTEIN, S. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. **Geochim Cosmochim Acta**, v. 42, p. 495-506, 1978.

DUCATTI, C.; CARRIJO, A.S.; PEZZATO, A.C.; MANCERA, P.F.A. Modelo teórico e experimental do reciclagem do carbono-13 em tecidos de mamíferos e aves. **Scientia Agrícola,** v.59, n.1, p.29-33, 2002.

GANNES, L.Z.; OBRIEN, D.M.; DEL RIO, C.M. Stable isotopes in animal ecology: assumptions, caveats, and a call for more laboratory experiments. **Ecology,** v.78, p.1271–1276, 1997.

GARCIA, S.C.; HOLMES, C.W.; HODGSON, J. et al. The combination of the n-alkanes and ^{13}C techniques to estimate individual dry matter intakes of herbage and maize silage by grazing dairy cows. **Journal of Agricultural Science,** v.135, p.47–55, 2000.

GONZÁLEZ-MARTIN, I.; GONZÁLEZ-PÉREZ, C.; HERNÁNDEZ-MÉNDEZ, J. et al. Differentiation of dietary regimen of Iberian swine by means of isotopic analysis of carbon and sulphur in hepatic tissue. **Meat Science**, v.58, p.25-30, 2001.

GONZÁLEZ-MARTIN, I.; GONZÁLEZ-PÉREZ, C.; HERNÁNDEZ-MÉNDEZ, J. ET AL. Use of isotope analysis to characterize meat from Iberian-breed swine. **Meat Science**, v. 52, p. 437-441, 1999.

GRATTON, C.; FORBES, A.E. Changes in delta ^{13}C stable isotopes in multiple tissues of insect predators fed isotopically distinct prey. **Oecologia,** v.147, p.615–624, 2006.

GRUNERT, K.G. Future trends and consumer life styles with regard to meat consumption. **Meat Science**, v. 74, p. 149-160, 2006.

HILDERBRAND, G. V.; FARLEY, S. D.; ROBBINS, C. T. et al. Use of stable isotopes to determine diets of living and extinct bears. **Canadian Journal of Zoology**, v.74, p. 2080-2088, 1996.

HOBSON, K.; CLARK, R. G. *Turnover* of ^{13}C in cellular and plasma reations of blood: implications for nondestructive sampling in avian dietary studies. **Auk**, v. 110, p. 638-641, 1993.

HOBSON, K.; CLARK, R. G. Assessing avian diet using stable isotopes I: *turnover* of ^{13}C in tissues.**The Condor**, v. 94, p.181-188, 1992.

JENKINS, S. G., PARTRIDGE, S. T., STEPHENSON, T. R. et al. Nitrogen and carbon isotope fractionation between mothers, neonates, and nursing off spring. **Oecologia**, v. 129, 336–341, 2001.

KURLE, C.M.;WORTHY, G.A.J. Stable carbon and nitrogen isotope ratios in multiple tissues of the northern fur seal *Callorhrinus ursinus*: implications for dietary and migratory reconstructions. **Marine Ecology - Progress Series**, v. 236, p. 289–300, 2002.

LE DIVIDICH, J.; HERPIN, P. Effect of climatic conditions on the performance, metabolism and health status of weaned piglets: a review. **Livestock Production Science**, v. 38, p. 79-90, 1994.

MACAVOY, S.E.; ARNESON, L.S.; BASSETT, E. Correlation of metabolism with tissue carbon and nitrogen *turnover* rate in small mammals. Oecologia, v. 150, p. 190-201, 2006.

MICROCAL SOFTWARE ORIGIN®6.0 PROFESSIONAL. Origin Data Analysis and Technical Graphics. USA, Microcal Software Inc., 1999.

MIRÓN, L.L.M., HERRERA, L. G. M., RAMÍREZ, N. P. et al. Effect of diet quality on carbon and nitrogen *turnover* and isotopic discrimination in blood of a New World nectarivorous bat. **Journal of Experimental Biology**, v. 209, p. 541–548, 2006.

MOELLER, S. J.; MILLER, R. K.; EDWARDS, K. K.; ZERBY, H. N.;LOGAN,K. E.; ALDREDGE, T. L.; STAHL, C. A.; BOGGESS, M.; BOX-STEFFENSMEIER, J. M. Consumer perceptions of pork eating quality as affected by pork quality attributes and end-point cooked temperature. **Meat Science**, v. 84, p. 14-22, 2010.

MURRAY, T.E. Phosphorus dynamics in Crystal Lake. 1990. 91 p. Masters Thesis. Ellington and Stafford, Connecticut.

NARDOTO, G. B.; GODOY, P. B.; FERRAZ, E. S. B. et al. Stable carbon and nitrogen isotopic fractionation between diet and swine tissues. Scientia Agricola, v. 63, 2006.

NEWSHOLME, E.A.; LEECH, A.R. **Biochemistry for the Medical Sciences**. New York: John Willey & Sons, 1983.

PEARSON, D.F.; LEVEY, D.J.; GREENBERG, C.H. et al. Effects of elemental composition on the incorporation of dietary nitrogen and carbon isotopic signatures in an omnivorous songbird. **Oecologia**, v.135, p.516-523, 2003.

PERAGÓN, J.; BARROSO,J.B.; SALGUERO,L.G. et al. Growth, protein-*turnover* rates and nucleic-acid concentrations in the white muscle of rainbow trout during development.**The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 33,p. 1227-1238, 2001.

PIASENTIER, E.; VALUSSO, R.; CAMIN, F. et al. Stable isotope ratio analysis for authentication of lamb meat. **Meat Science**, v. 64, p.239-247, 2003.

PINNEGAR, J.K.; POLUNIN, N.V.C. Differential fractionation of $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ among fish tissues: implications for the study of trophic interactions. **Functional Ecology**, v.13, p.225-231, 1999.

ROSTAGNO, H.S. et al. Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. UFV, 2005.

ROTH, J.D.; HOBSON, K.A. Stable carbon and nitrogen isotopic fractionation between diet and tissue of captive red fox: implications for dietary reconstruction. **Canadian Journal of Zoology**, v.78, p.848-852, 2000.

SHANER, P.J., BOWERS, M.;MACKO, S.Giving-up density and dietary shifts in the white-footed mouse, *Peromyscus leucopus. Ecology, v.* **88***,* 87–95, 2007.

SPONHEIMER, M.; ROBINSON, T.F.; CERLING, T.E. et al. *Turnover* of stable carbon isotopes in the muscle, liver, and breath CO_2 of alpacas (*Lama pacos*). **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 20, p. 1395–1399, 2006.

THOMPSON, R.C. Studies of metabolic *turnover* with tritium as a tracer. II. Gross studies on the rat. **Journal Biological Chemistry**, Bethesda, v. 200, p. 731-743, 1953.

TIESZEN, L.L.; BOUTTON, T.W.; TESDAHL, K.G. et al. Fractionation and *turnover* of stable carbon isotopes in animal- Tissues - Implications for $\delta\ ^{13}C$ analysis of diet. **Oecologia**, v.57, p.32-37, 1983.

CAPÍTULO 5
IMPLICAÇÕES

Implicações

Pode-se concluir, de acordo com os tecidos avaliados, que amostras de gordura abdominal, costela e músculos são as melhores opções para refletir a dieta antiga de suínos, devido a conservação do sinal isotópico por mais tempo. Já o plasma, fígado e casco são provavelmente os mais adequados exemplos para indicar as alterações mais recentes na dieta. Além disso, a pesquisa aponta que os períodos mais adequados para avaliação dos tecidos estão entre 42 aos 150 dias de vida.

Novos estudos são importantes para confirmar os valores de meias-vidas encontrados em todos os tecidos analisados, bem como estender o tempo de avaliação para se obter mais informações sobre a assimilação isotópica do carbono (*turnover*).

Com isso será possível desenvolver futuros estudos sobre certificação da carne e rastreabilidade de subprodutos de origem animal na alimentação de suínos, para encontrar possíveis fraudes na alimentação desses animais. Adicionalmente é preciso separar a constante k, relativa ao crescimento e ao *turnover* metabólico, para que seja possível avaliar suas contribuições de maneiras isoladas em relação à incorporação de isótopos de carbono em diferentes tecidos de suínos.

ANEXO 1

ANEXO 1 – Ajustes referentes a comparação entre os músculos semitendinoso e reto do abdome de suínos que tiveram a dieta a base de milho (C_4) substituída pela dieta à base de quirera de arroz (C_3) aos 21, 42 e 63 dias de idade, em função dos intervalos de avaliação.

DIAS	M.RETO	M.SEMI	Redução
Substituição da dieta aos 21 dias de idade			
0	-16,6121	-16,6121	0
2	-17,3257	-17,2201	0,006095
5	-18,2973	-18,0603	0,012954
12	-20,1684	-19,7259	0,021938
17	-21,2251	-20,7012	0,024682
24	-22,3984	-21,8229	0,02569
34	-23,6065	-23,0368	0,024132
44	-24,4253	-23,9099	0,021099
59	-25,1865	-24,7824	0,016044
79	-25,7061	-25,4412	0,010303
102	-25,9671	-25,8165	0,0058
128	-26,0819	-26,007	0,002873

DIAS	M.RETO	M.SEMI	Redução
Substituição da dieta aos 42 dias de idade			
0	-16,6121	-16,6121	0
2	-17,4648	-17,3733	0,005238
5	-18,6031	-18,4028	0,010768
12	-20,7122	-20,3593	0,017034
17	-21,8471	-21,4463	0,018343
24	-23,0493	-22,634	0,018017
35	-24,2968	-23,9242	0,015336
46	-25,042	-24,7406	0,012036
61	-25,6	-25,3937	0,008058
82	-25,9428	-25,8328	0,004237
102	-26,0673	-26,0106	0,002175
109	-26,0897	-26,0452	0,001707

DIAS	M.RETO	M.SEMI	Redução
Substituição da dieta aos 63 dias de idade			
0	-16,6121	-16,6121	0
2	-17,3084	-17,3386	0,00174
5	-18,2588	-18,326	0,00368
12	-20,0977	-20,2207	0,00612
18	-21,3287	-21,4749	0,00685
21	-21,8468	-21,9986	0,00695
35	-23,6182	-23,7652	0,00623
48	-24,6025	-24,7243	0,00495
63	-25,2727	-25,3621	0,00354
75	-25,5925	-25,6593	0,00261
87	-25,7954	-25,8441	0,00189