

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

**ISÓTOPOS ESTÁVEIS DE CARBONO EM ESTUDO COM
BOVINOS DE CORTE EM PASTEJO, SUPLEMENTADOS NO
PERÍODO DA SECA**

MARCELA BUOSI MARTINS

Tese apresentada ao Programa de
Pós Graduação em Zootecnia,
Área de Concentração: Produção
Animal, como parte das exigências
para obtenção do título de Doutora.

BOTUCATU - SP
Janeiro de 2014

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

**ISÓTOPOS ESTÁVEIS DE CARBONO EM ESTUDO COM
BOVINOS DE CORTE EM PASTEJO, SUPLEMENTADOS NO
PERÍODO DA SECA**

MARCELA BUOSI MARTINS
Zootecnista

Orientador: Prof. Dr. CARLOS DUCATTI

Co-orientadora: Profa. Dra. CYNTIA LUDOVICO MARTINS

Tese apresentada ao Programa de
Pós Graduação em Zootecnia,
Área de Concentração: Produção
Animal, como parte das exigências
para obtenção do título de Doutora.

BOTUCATU - SP
Janeiro de 2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA
- LAGEADO - BOTUCATU (SP)

Martins, Marcela Buosi, 1984-
M386i Isótopos estáveis de carbono em estudo com bovinos de
corte em pastejo, suplementados no período da seca / Marce-
la Buosi Martins. - Botucatu : [s.n.], 2014
vii, 83 f. : grafs., tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Fa-
culdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2014
Orientador: Carlos Ducatti
Coorientador: Cyntia Ludovico Martins
Inclui bibliografia

1. Bovino de corte - Alimentação e rações. 2. Óxido de
cromo. 3. Carbono 13. I. Ducatti, Carlos. II. Martins, Cyn-
tia Ludovico. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências
Agronômicas. IV. Título.

DEDICATÓRIA

À Deus, por me proteger, iluminar meu caminho e guiar meus passos.

Aos meus pais, Norberto de Oliveira Martins e Maria Inês Buosi, pelo amor incondicional, apoio, palavras de conforto nos meus momentos mais difíceis.

Á minha irmã Karina Buosi Martins, pela amizade, companheirismo e por me mostrar um exemplo de pessoa em que posso me espelhar.

Ao meu sobrinho lindo, Felipe Martins Morandin Ranzani, pela felicidade que trouxe à nossa família com sua chegada.

Á minha querida avó Alice (in memorian), que sempre se orgulhou de mim e continua se orgulhando com certeza, distante de mim e mais próxima de Deus protegendo todos meus passos...

Sem eles nada seria possível ou valeria a pena!

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, pela minha formação profissional.

À Fundação de Amparo e Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de estudo concedida no Brasil e parte dela na Irlanda (Processo 2010/15637-6) e pelo financiamento do projeto temático “Isótopos Estáveis em Zootecnia” (Processo 2008/57411-4).

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Ducatti, pela oportunidade de novos conhecimentos, orientação e confiança durante meu mestrado e doutorado.

A minha co-orientadora Profa. Dra. Cyntia Ludovico Martins, pela ajuda, atenção, incentivo e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto de Lima Meirelles pela imensa ajuda, paciência, pela orientação dada, atenção, auxílio, amizade, sempre me acolhendo com muito carinho.

Ao Prof. Dr. Olaf Schmidt (University College Dublin), por ter me acolhido em seu grupo de pesquisa e pela oportunidade de novos conhecimentos na aplicabilidade da técnica dos isótopos.

Ao Prof. Dr. Luiz Edivaldo Pezzato, por disponibilizar o laboratório (AquaNutri) para análises de cromo.

Aos funcionários e grandes amigos do Centro de Isótopos Estáveis Ambientais, Cibele, Mariana, Silvia e Evandro, pelo acolhimento, momentos de descontração e auxílio na execução deste trabalho.

À professora Dra. Juliana Célia Denadai, pela amizade construída, imensa ajuda, boa convivência todos esses anos, mostrando ser uma pessoa de muita competência dentro do Centro de Isótopos Estáveis.

À professora Dra. Maria Márcia Pereira Sartori, pela atenção dada às análises estatísticas.

A todos meus amigos do Centro de Isótopos Estáveis, Adriele Nayara Dias Ishizuka, Ana Cristina Stradiotti, Bárbara Cristina da Silva Fernandes, Cibele Regina de Souza-Kruliski, Cintia Maria Marchiori, Danilo Fernandes, Evandro Tadeu da Silva, Guilherme Mendes Pimenta, Juliana Célia Denadai, Maria Márcia Pereira Sartori, Marco Antônio Gonzales de Carvalho, Mariana Sasso Andreasi, Michele Novaes Ravelli, Rhani Ducatti, Regina Maria Nascimento Augusto, Rodrigo Gennari, Silvia Regina Américo Maschette, Vivian Lo Tierzo, pelos momentos agradáveis que passamos juntos, pela ajuda, pela amizade. Viva os isótopos!!

Às amigas Marina Toledo, Elza Oliveira e Gabriela Granghelli, pelo apoio, convívio e amizade construída.

À Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), Pólo Regional do Extremo Oeste, por conceder a área e os animais para a execução do experimento.

À Profa. Dra. Cristiana Andrighetto e ao Prof. Dr. Gelci Carlos Lupatini pela ajuda na condução do experimento.

Aos amigos da UNESP – Dracena, Aline Sampaio Aranha, Juliana Aparecida Alves dos Santos, Camila Ferraz Bezerra da Silva, Jéssika Pereira, Polyana Vellone Giacomini, Ana Paula San Jorge, Gustavo Lineu Sartorello, Eduardo Estevanato Gimenes Penteado, Vinícius Carreteiro Gomes, Daniel Vitor Ferreira Vicari, Wilson Inácio da Silva Filho, Diego Piovezan da Silva, Fábio Luan Sakamoto, Anderson Augusto e Gustavo Perina Bertoldi pela amizade construída, imensa ajuda, ótima convivência em Andradina e bons momentos de risada e descontração.

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

À funcionária do Laboratório de Bromatologia, Gisele, pela amizade e ajuda nas análises de cromo.

Aos amigos Renan e Mariucha, pela ajuda nas análises de cromo.

Ao amigo Luiz Carlos Vieira Junior, pela ajuda e companheirismo em Andradina. Sem ele, teria sido muito mais difícil.

Ao amigo André Alves de Oliveira (UNESP – Jaboticabal), pelos esclarecimentos de minhas dúvidas antes, durante e após a execução do experimento e pela ajuda nas análises de FDNi.

À todos os amigos da Graduação e Pós Graduação da Zootecnia e Agronomia.

A toda minha família e amigos em Vargem Grande do Sul, que sempre torceram pela realização deste trabalho.

“Meu muito obrigada a todos”

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	2
CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	2
1. INTRODUÇÃO	3
2.1. Desempenho animal	5
2.2. Suplementação de bovinos de corte em pastejo	8
2.3. Estimativa do consumo de animais em pastejo.....	11
2.4. Isótopos Estáveis Ambientais como ferramenta em estudos com animais ruminantes	17
3. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS.....	23
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25
CAPÍTULO II	36
Resumo.....	37
Abstract	38
Introdução	39
Material e Métodos	40
Resultados e Discussão	47
Conclusões	55
Referências Bibliográficas	56
CAPÍTULO III.....	62
Resumo.....	63
Abstract	64
Introdução	65
Material e Métodos	66
Resultados e Discussão	70
Conclusões	76
Referências Bibliográficas	76
CAPÍTULO IV.....	81
Implicações	82

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II	36
Tabela 1. Composição do suplemento, em percentagem de inclusão dos ingredientes (II) na matéria natural (MN), composição química em percentagem da matéria seca (MS) e valor isotópico em ‰ ($\delta^{13}\text{C}$).	43
Tabela 2. Valores médios de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) e Carbono total (%) da forragem e do suplemento, e $\delta^{13}\text{C}$ (‰) das fezes dos animais com seus respectivos desvios-padrão. ..	51
Tabela 3. Consumo médio de massa seca total (CMST) e massa seca do pasto (CMSP) em $\text{kg} \cdot \text{dia}^{-1}$ e % de peso vivo, estimado pelo óxido de cromo e isótopos de ^{13}C , e ganho médio diário (GMD) em $\text{kg} \cdot \text{dia}^{-1}$ de bovinos de corte, no 3º período experimental.	52
 CAPÍTULO III	 62
Tabela 1. Composição do suplemento, em percentagem de inclusão dos ingredientes (II) na matéria natural (MN), composição química em percentagem da matéria seca (MS) e valor isotópico em ‰ ($\delta^{13}\text{C}$).	67
Tabela 2. Valores médios de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) e Carbono total (%) da forragem (capim-marandu) e do suplemento fornecido aos animais (media $\pm$ desvio padrão).	70
Tabela 3. Valores isotópicos médios em $\delta^{13}\text{C}$ (‰), do sangue total, plasma e fezes em cada período avaliado (média $\pm$ desvio padrão).	72

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II	36
Figura 1. Distribuição média mensal da precipitação pluvial (mm) e temperatura (°C) média dos meses de março a novembro de 2011.	41
Figura 2. Teores de proteína bruta (% PB) das amostras de simulação de pastejo ao longo do período experimental.....	49
Figura 3. Valores médios de teores de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) em % e ganho médio diário (GMD) em gramas.	50
Figura 4. Consumo médio estimado de matéria seca do pasto (CMSP) em kg.dia ⁻¹ e ganho médio diário (GMD) em g.dia ⁻¹	53
 CAPÍTULO III.....	 62
Figura 1. Incorporação de carbono proveniente da suplementação (C ₃) nas fezes, sangue total e plasma em bovinos de corte criados em pasto (C ₄), ao longo do período experimental (dia 0 até 140 dias).	71
Figura 2. Composição isotópica de carbono no sangue total, plasma, acém (<i>M. Trapezius cervicis</i>), contra filé (<i>M. Longissimus dorsi</i>) e lagarto (<i>M. Semitendinosus</i>) de bovinos de corte, 140 dias após introdução de suplementação (C ₃) na dieta.....	74

CAPÍTULO I
CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. INTRODUÇÃO

A pecuária tornou-se de grande importância para a economia brasileira, exportando só em carne bovina, mais de US\$ 4 bilhões por ano. Este segmento do agronegócio representa mais de 7% do PIB brasileiro e gera milhões de empregos (ABIEC, 2013). No Brasil, há mais de um milhão de fazendas, sendo a grande maioria do gado criado em sistema extensivo.

No ano de 2012 foram abatidas cerca de 41,5 milhões de cabeças bovinas, das quais aproximadamente 37,8 milhões (91%) foram criadas e terminadas exclusivamente em pastagens, principalmente pastagens tropicais (ANUALPEC, 2013). O manejo inadequado dessas pastagens tem se tornado a principal limitação para que a pecuária de corte seja atividade competitiva frente às demais atividades agrícolas. Este fato tem resultado em crescente substituição das áreas de pasto por outras culturas como a soja e, mais recentemente, a cana-de-açúcar.

Os animais estão sujeitos às mudanças das pastagens de acordo com a época do ano. Há excesso de produção no período das águas, enquanto no período seco, os baixos índices de precipitação e temperatura reduzem o crescimento e o valor nutritivo da forragem produzida.

Este fenômeno conhecido como estacionalidade de produção de forragem tem sido considerado um dos principais responsáveis pelos baixos índices de produtividade da pecuária brasileira. Para eficiência produtiva nos sistemas em pasto, a oferta de nutrientes das pastagens deve atender à exigência nutricional do animal. Pastagens tropicais no período seco, geralmente não constituem em dieta balanceada, pois seus constituintes estão presentes em concentrações e proporções insuficientes para atender às exigências nutricionais dos bovinos. Nesse período, animais exclusivamente em pasto sofrem carências nutricionais, o que pode comprometer o desenvolvimento animal e o retorno financeiro da atividade. Práticas de manejo adequadas, como suplementação (protéica e/ou energética) apresentam bons resultados no desempenho animal, quando comparadas com suplementação mineral exclusiva, principalmente compensando perdas ocorridas durante períodos de baixa produção (GOES et al., 2005).

O diferimento de 20 a 30% da área da fazenda para utilização no período seco do ano pode amenizar problemas de quantidade de forragem. No entanto, pastagens

diferidas apresentam baixo valor nutricional, pois o diferimento do pasto consiste na vedação de áreas que serão utilizadas no período de escassez de forragem. O teor protéico abaixo do mínimo para o bom funcionamento do rúmen constitui-se na principal limitação à ingestão de forragem nessa época. Devido a este fato, cresceram de forma significativa nos últimos anos, a prática de suplementação dos animais na seca.

O objetivo da suplementação é fechar as lacunas deixadas pela curva sazonal de produção das forrageiras no período da seca. Nesta época, os pastos estão maduros, com reduzido crescimento e menores teores de nutrientes. A utilização da suplementação alimentar pode contribuir para melhoria de diversos índices zootécnicos importantes e, conseqüentemente, melhorar a eficiência dos sistemas produtivos.

A deficiência que ocorre em pesquisas conduzidas no Brasil, avaliando o uso da suplementação, diz respeito a pouca atenção dada à quantificação do consumo de forragem. Com base, exclusivamente, nos resultados de desempenho animal, não se pode explicar se os melhores ou piores desempenhos devem-se apenas ao suplemento ou ao aumento no consumo de forragem. Somado a este fato, seria importante relatar dados a respeito da disponibilidade e valor nutritivo da pastagem, pois estes fatores juntamente com a quantidade de suplemento consumido, determinam o grau de substituição da dieta (MALAFAIA et al., 2003).

A mensuração do consumo de animais alimentados em pasto não pode ser realizada diretamente como em confinamentos (MINSON, 1990), exigindo assim, a necessidade de utilização de metodologias alternativas para sua determinação.

A utilização de indicadores externos e internos consiste em alternativa na estimativa do consumo de pasto, pela utilização dos indicadores nas estimativas de digestibilidade do pasto ingerido e da quantidade de fezes excretadas (AROEIRA, 1997). No entanto, tais indicadores possuem suas limitações, não existindo um indicador considerado como sendo ideal na estimativa do consumo.

Neste contexto, a técnica dos isótopos estáveis pode ser visualizada como ferramenta para auxiliar pesquisas relacionadas à nutrição animal, em que metodologias convencionais não podem prever resultados tão seguros (BAHAR et al., 2005). A técnica dos isótopos estáveis merece destaque como método alternativo ao uso dos indicadores. Este marcador tem sido usado para diferenciar a ingestão de plantas C_3 e C_4 pelos animais (JONES et al., 1979).

Além disso, a técnica dos isótopos pode ser utilizada em pesquisas relacionadas a processos de rastreabilidade de produtos de origem animal, devido ao fato dos isótopos serem marcadores naturais, que refletem a alimentação dos animais nos seus tecidos corporais e produtos (HOBSON; CLARK, 1992).

Diversos trabalhos demonstraram a confiabilidade da técnica em experimentos com diversas espécies de interesse zootécnico. A utilização dos isótopos como marcador dietético tem sido incrementada nos países desenvolvidos, porém, no Brasil, seu uso ainda é incipiente, necessitando de mais estudos e esclarecimentos quanto ao seu uso.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Desempenho animal

Disponibilidade de forragem, seu valor nutritivo e consumo pelo animal

A produção animal depende do consumo e valor nutritivo do alimento disponível. Em condições de pastejo, o consumo voluntário é influenciado por características relacionadas à planta, ao animal, ambiente e manejo adotado.

A regulação do consumo voluntário em animais ruminantes está na dependência da demanda energética do animal e do enchimento físico do rúmen. Se a densidade energética da dieta for maior em relação às exigências do animal, o consumo será limitado pela demanda energética do animal, podendo reduzir o consumo, mesmo o rúmen não estando repleto (MERTENS, 1994). Mas, se a dieta apresentar menor densidade energética, o consumo será limitado pelo enchimento físico do rúmen. A fibra insolúvel em detergente neutro pode caracterizar esses dois mecanismos de controle de consumo, por estar relacionada diretamente ao efeito de enchimento do rúmen e inversamente à concentração energética da dieta (MERTENS, 1992). Porém, se a disponibilidade de alimento for limitada, nenhum dos dois fatores limitará o consumo.

Segundo Doble; Lancaster; Holt (1971), o desempenho animal está significativamente correlacionado com disponibilidade de forragens quando a digestibilidade da matéria seca (DMS) é relativamente uniforme. Os autores agruparam seis gramíneas de clima quente em três categorias de digestibilidade e, verificaram que o ganho de peso médio diário aumentava dentro de cada grupo de digestibilidade com

maior disponibilidade de forragem, até um ponto acima do qual não ocorria incremento no ganho de peso.

Muitos trabalhos com forrageiras tropicais têm comprovado que a produção animal não está relacionada ao total de forragem disponível, mas à disponibilidade de forragem verde (EUCLIDES; EUCLIDES FILHO, 1997). Assim torna-se relevante expressar a oferta de forragem com base na massa de forragem verde.

A produção de bovinos em pasto depende das características bromatológicas e estruturais da pastagem como altura, densidade da biomassa vegetal (kg/ha/cm), relação folha/caule, proporção de inflorescência e material morto. Estas características estruturais determinam o grau de pastejo seletivo exercido pelos bovinos, assim como a eficiência que o animal colhe a forragem, afetando a quantidade ingerida de nutrientes. Brâncio et al. (2003) verificaram que novilhos em pastejo apresentam elevada seletividade por folhas verdes (92,4%) e menor preferência por colmos verdes (6,7%). As características estruturais dependem da espécie botânica e do manejo adotado, principalmente pressão de pastejo (GOMIDE, 1998). Há uma relação planta-animal em que diferentes estruturas do dossel forrageiro determinam padrões distintos de comportamento ingestivo do animal, como tempo de pastejo, taxa de bocados e tamanho de bocado (ALLDEN; WHITTAKER, 1970).

Análises bromatológicas demonstram que simulação manual de pastejo possibilita estimativa aceitável da forragem selecionada por animais, constituindo em alternativa de substituição à coleta de extrusa esofágica.

Em estudo realizado por Goes et al. (2004), o pastejo simulado apresentou valores para proteína bruta de 7,2%, superior ao teor apresentado pela forragem disponível (5,1%). A digestibilidade “in vitro” da matéria seca (DIVMS) para planta inteira foi de 60,6%, superior ao encontrado na forragem disponível de 51,2%, mostrando que o animal seleciona a dieta de acordo com suas necessidades.

Para Hodgson (1990), níveis máximos de consumo e desempenho animal estão relacionados à ofertas de forragem cerca de duas a três vezes as necessidades diárias do animal, de forma que ofertas diárias de matéria seca da ordem de 10 a 12 kg/100 kg peso vivo permitiriam o máximo desempenho individual de animais em pastejo.

Sob condições normais de uso das pastagens, os animais são forçados a pastejar até menores níveis de altura residual, a fim de aproveitar ao máximo a forragem

disponível na área, ou porque a forragem está sendo racionada durante períodos de déficit. Como consequência, a oferta de forragem se torna restrita e seu consumo é diminuído. Sollenberger et al. (2005) observaram a importância da oferta de forragem que prevalece em relação à taxa de lotação, de modo que taxas de lotação similares podem resultar em diferenças no desempenho animal dependendo da espécie forrageira, massa de forragem e outras características de cobertura do relvado.

De acordo com Demment; Laca (1994), a taxa de consumo aumenta com altura ou massa de forragem do dossel até atingir uma assíntota decorrente da saturação da capacidade do animal em processar o alimento ingerido (GORDON; ILLIUS, 1992).

O consumo de nutrientes constitui outro importante fator no desempenho animal, sendo um dos principais fatores que limitam a produção. A variação no desempenho é determinada principalmente pela qualidade da forragem disponível e ao consumo de energia digestível. O consumo de matéria seca de forragem e seu valor nutritivo refletem a qualidade da forragem (REIS et al., 2009). Quanto melhor a qualidade da forragem, maiores os ganhos de peso por animal e menor a oferta de forragem necessária para isso (EUCLIDES, 2001). Todavia, de acordo com Santos et al. (2004), em situações de menor ingestão de matéria seca e elevada oferta de forragem, o aumento desta oferta pode não alterar necessariamente o consumo e o desempenho animal, uma vez que o animal pode não conseguir utilizar essa forragem.

O valor nutritivo de uma espécie forrageira é influenciado pela fertilidade do solo, condições climáticas, idade fisiológica, manejo, digestibilidade e seus teores de proteína bruta e parede celular (LEITE; EUCLIDES, 1994). O baixo valor nutritivo das forragens está associado ao reduzido teor de proteína bruta, minerais, elevado conteúdo de fibra e menor digestibilidade da matéria seca.

Pensando no cenário brasileiro, a produção de carne bovina está fundamentada na utilização do gênero *Brachiaria*. Segundo Lupatini (2010), *Brachiaria brizantha* é a forrageira mais utilizada como pastagem no país, com área estimada em 50-60 milhões de hectares. Por ser gramínea tropical, apresenta alto potencial para produção de carne, mas com limitações impostas pelo seu crescimento estacional (THIAGO et al., 2000).

A cultivar Marandu possui elevado potencial de produção de forragem (ANDRADE, 2003) e pode ser recomendada como alternativa para áreas de cerrado com fertilidade considerada de média a boa. Isso se justifica pela alta produção,

tornando viável sua utilização nas fases de desmama até a engorda de bovinos. Entretanto, o manejo inadequado dessas pastagens tem se constituído na principal limitação para que a pecuária de corte seja uma atividade competitiva frente às demais atividades agrícolas.

No Brasil, durante o período das águas, há excesso de produção de pastagens de maior qualidade nutricional. No período da seca, a taxa de crescimento reduz, associada geralmente à menor qualidade nutricional. A sazonalidade na produção e qualidade das pastagens está diretamente relacionada à estação seca, estação chuvosa e ao manejo, propiciando ganho de peso na época das águas e perda na seca.

No período seco, à medida que o animal vai pastejando, ocorre redução de rebrota, proporcionando consumo de forragem menos palatável, com maior porcentagem de colmo e lignina e, naturalmente menos nutritiva, podendo resultar em balanço negativo de energia e perda de peso (PAULINO et al., 2002). Sendo o desempenho animal obtido por meio da interação forragem disponível e seu valor nutricional, raramente a forragem atende às exigências nutricionais necessárias para maximizar o desempenho animal. No intuito de manter o desempenho em níveis satisfatórios, práticas de manejo adequadas como suplementação alimentar, têm sido utilizadas especialmente durante o período de escassez de forragem (BRITO et al., 2007).

2.2. Suplementação de bovinos de corte em pastejo

Para obter produção contínua de carne bovina que seja eficiente e competitiva, os animais necessitam se desenvolver durante todo ano, a fim de alcançar condições de abate mais precocemente. Para isso, faz-se necessário manter o suprimento de nutrientes em equilíbrio com os requisitos dos animais (REIS et al., 2004).

O objetivo da suplementação na seca baseia-se no fornecimento de fontes adicionais de nutrientes aos animais, devido à curva sazonal de crescimento de forragem. Deve atender aos requerimentos nutricionais dos microrganismos ruminais e dos bovinos propriamente ditos. Quando os teores de proteína bruta das forragens encontram-se abaixo de 7% (base na matéria seca), o primeiro objetivo da suplementação é atender à demanda das bactérias ruminais por nitrogênio. O suprimento de nitrogênio possibilitará que essas bactérias possam extrair energia da forragem

ingerida pelo animal, pelo processo de digestão. A população de bactérias no rúmen afeta diretamente a digestibilidade e o consumo dos alimentos (THIAGO, 1999). O resultado dessa medida geralmente se traduz em maior ingestão de forragem pelos animais, levando à manutenção do peso vivo ou até moderadas taxas de ganho de peso, desde que a disponibilidade de matéria seca não seja limitante.

Ganhos de peso mais elevados podem ser obtidos nessa época com a inclusão de fontes de energia nas misturas múltiplas e fornecidas em doses maiores (PAULINO et al., 2000). Os benefícios diretos da aplicação desta técnica são a otimização dos nutrientes fornecidos pela pastagem e os incrementos em desempenho individual e na capacidade de suporte do pasto.

Suplementação de fêmeas, por exemplo, resulta em redução da idade à primeira cria, aumento na taxa de concepção de vacas primíparas e no peso à desmama. Suplementação de machos e fêmeas não destinadas à reprodução, assegura maior ganho de peso e redução na idade de abate. A combinação desses benefícios produz incrementos na taxa de desfrute, maior giro de capital e maior rentabilidade do sistema (EUCLIDES; MEDEIROS, 2005).

Santos et al. (2004) destacaram que suplementação de bovinos em pastejo deve ser feita na proporção de 0,8 a 1,0% de peso vivo. Euclides et al. (2001), suplementando animais mantidos em pastagens com concentrado protéico e energético a 0,8% do peso vivo, durante a seca, encontraram melhor desempenho animal quando comparado à suplementação mineral.

Ganhos médios de novilhos em pasto, suplementados na primeira estação seca, em torno de 400 a 700 g/dia, refletirão no desempenho futuro dos animais (PERUCHENA, 1999).

Em sistemas de terminação de bovinos em pasto durante o período seco, níveis de suplementos, em torno de 0,8 a 1,0% do peso vivo, são fornecidos almejando-se ganhos superiores a 0,8 kg/dia. Contudo, adiamento na data de abate dos animais ou antecipação do início das chuvas constituem eventos de possível ocorrência. Sob tais circunstâncias, a composição da forragem disponível ao pastejo altera-se rapidamente, devendo-se adequar à formulação dos suplementos fornecidos, principalmente quanto à composição protéica (DETMANN et al., 2005).

Barbosa et al. (2007) estudaram o efeito de níveis (0,17 e 0,37% do peso vivo (PV) de suplementação protéico-energética no desempenho e consumo de matéria seca de novilhos em pastagens de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. Os autores encontraram ganhos de peso médio diário de 0,54; 0,66 e 0,75 kg e consumo em matéria seca de forragem de 2,6; 2,4 e 2,3% PV para os tratamentos controle e suplementação com ingestão média diária de 0,17% e 0,37% do peso vivo, respectivamente. Concluíram que a suplementação protéico-energética para bovinos criados em pasto, aumentou os ganhos de peso dos animais suplementados em relação aos animais que consumiram apenas suplemento mineral, na época de transição entre o período das águas e da seca.

A disponibilidade de matéria seca aos animais durante todo período de suplementação possui extrema importância. Há necessidade em garantir massa disponível (vedação do pasto) para o consumo. A utilização do método de pastejo diferido tem sido sugerida como alternativa para corrigir a falta de forragem na época da seca. O pastejo diferido constitui-se em manejo estratégico de pastagens, consistindo basicamente, em selecionar determinadas áreas e vedá-las à entrada de animais ao final da estação de crescimento. É possível promover acúmulo de forragem para pastejo durante o período crítico de disponibilidade de alimentos. No entanto, com o diferimento do pasto ocorre redução no valor nutritivo da forragem. Com essa forma de manejo adotada, o pastejo diferido fornecerá massa de forragem aos animais, enquanto que a suplementação garantirá níveis nutricionais adequados às exigências dos mesmos.

Em pastagens diferidas com elevada oferta de forragem, a suplementação alimentar possibilita níveis aceitáveis de desempenho animal no período seco, desde que se conheça a composição bromatológica desta pastagem (MORAES et al., 2005).

Normalmente, a ingestão de suplementos altera a quantidade de forragem consumida. Essa mudança é dependente da qualidade da forragem e do tipo de suplemento. Suplementos com elevada porcentagem de proteína aumentam o consumo e digestibilidade de forragem de menor qualidade. Suplementos com altos níveis de energia geralmente diminuem o consumo de forragem e podem reduzir sua digestibilidade. A queda no consumo de forragem será maior com forragem mais madura e menos palatável, e dependente da quantidade de suplemento fornecido e de sua concentração energética (CARDOSO, 1997).

O problema encontrado em pesquisas conduzidas no Brasil avaliando a utilização da suplementação, diz respeito a pouca atenção dada à quantificação do consumo de forragem. Com base, exclusivamente, nos resultados de desempenho animal, não se pode explicar se os melhores ou piores desempenhos devem-se apenas ao suplemento ou ao aumento no consumo de forragem. Assim, faz necessário à adequação de métodos de estimativa de consumo de animais em pastejo.

2.3. Estimativa do consumo de animais em pastejo

Segundo Mertens (1994), o desempenho animal está relacionado ao consumo de nutrientes digestíveis e metabolizáveis, com cerca de 60 a 90% das variações em desempenho explicadas pelas variações correspondentes em consumo e, apenas 10 a 40% pelas variações correspondentes em digestibilidade.

A avaliação do consumo se torna complexa em relação à digestibilidade, pois o consumo está associado a outras variáveis relacionadas ao meio (BURNS; POND; FISHER, 1994). Sua avaliação em animais alimentados em pasto não pode ser realizada diretamente como em confinamentos (MINSON, 1990), exigindo assim, a necessidade ao uso de metodologias alternativas para sua determinação.

Existem vários métodos em estimar consumo de animais em pasto, incluindo medidas diretas e indiretas. Dentre as medidas diretas, há a pesagem dos animais com a finalidade de estimar o consumo em curtos períodos de tempo, inicialmente sugerida por Erizian em 1932 (MINSON, 1990). Esta metodologia requer mensurações não só do peso animal antes e após pastejo, como também das perdas de peso insensíveis, por urina e fezes (McMENIMAN, 1997) e do consumo de água durante o período de determinação (LE DU; PENNING, 1982).

Segundo Aroeira (1997), a necessidade em considerar as variações de peso por defecação e micção consista, talvez, na principal limitação da técnica, pois a utilização de bolsas coletoras causa desconforto ao animal, interferindo no comportamento de pastejo, e assim, em seu consumo (FRANCE et al., 1988; MOORE; SOLLEMBERGER, 1997). Outro fato que pode induzir a erros na estimativa do consumo é a perda de peso insensível, caracterizada pela perda de água nos processos respiratórios, de transpiração e evaporação (KLEIBER, 1961), sendo mensurada como perda de peso do animal em jejum, em período anterior ou posterior à entrada dos

animais na pastagem. Dados na literatura mostram que diferenças significativas existem em função das condições ambientais e da atividade exercida pelo animal.

O consumo de matéria seca é o produto do tempo de pastejo e da taxa de ingestão. No entanto, a taxa de ingestão de um animal pode variar durante o período de pastejo ao longo do dia. Ronney et al. (1996), citados por McMeniman (1997), compararam a metodologia à estimativas paralelas, obtidas pelo uso de n-alcanos, e concluíram que a diferença de peso dos animais superestima o consumo, pois a taxa de ingestão diminui à medida que se prolonga o tempo de pastejo.

Apesar de todas possíveis fontes de erro, a utilização desta técnica tem aumentado devido à legislação existente nos países desenvolvidos que restringe o uso de animais cirurgicamente preparados em pesquisa (PENNING; RUTTER, 2004). Essa metodologia despende um período de tempo relativamente curto, apenas duas horas de trabalho por dia (PENNING; HOOPER, 1985), quando comparada, por exemplo, à utilização de óxido crômico, que requer tempo de avaliação maior, além de procedimentos laboratoriais mais complexos.

A estimativa do consumo animal em pastejo também pode ser realizada pelo comportamento ingestivo. Neste método, o consumo de matéria seca pode ser definido a partir de variáveis que relacionem a interface planta:animal (CARVALHO, 1997), uma relação entre tempo de pastejo, taxa de bocados e tamanho do bocado. Como ocorre na técnica do diferencial de peso vivo, a avaliação em um único período do dia pode levar a erros nos cálculos das variáveis. Segundo Chacon; Stobbs; Sandland (1976), são necessárias pelo menos duas avaliações durante os dois grandes períodos de pastejo do animal, pela manhã e pela tarde.

A estimativa do consumo pelo comportamento ingestivo apresenta vantagem em relação a outros métodos, pelo fato de exigir poucas análises laboratoriais (CHACON et al., 1976, MOORE; SOLLEMBERGER, 1997). Contudo, como podem existir erros nesta técnica, torna-se mais prudente considerar estas mensurações como meio de explicar os efeitos observados no consumo, do que propriamente estimá-lo.

Outra maneira direta em avaliar o consumo de animais em pasto, é realizada pela diferença de peso da pastagem, conhecida como método agrônômico. O consumo é determinado pela diferença entre a matéria seca ou orgânica disponível antes e após pastejo. A redução da forragem observada no piquete devido ao pastejo, dividida pelo

produto do número de animais e dias de pastejo, pode dar uma ideia do consumo diário (EUCLIDES et al., 1992). O consumo só poderá ser calculado de forma exata se a disponibilidade de matéria seca do pasto puder ser mensurada acuradamente.

Outro ponto a ser considerado está atribuído à variações relacionadas ao crescimento do pasto, o qual, quando não considerado, leva a subestimativas do consumo de matéria seca (AROEIRA, 1997). A correção para taxa de crescimento do pasto pode ser realizada com utilização de gaiolas de exclusão. No entanto, as gaiolas podem constituir uma fonte de erro, pois se conclui que a taxa de crescimento determinada seja igual àquela da forrageira sob pastejo. Segundo Parsons; Collet; Lewis (1984), o acúmulo de forragem na área pastejada será menor que da área não pastejada, devido à desfolhação, pisoteio e contaminação por fezes. Para tentar minimizar estes efeitos de correção para taxa de crescimento, Linehan e colaboradores propuseram um fator de correção.

Medidas diretas em estimar consumo em pasto estão associadas ao consumo em curto prazo, em escala de minutos a horas de pastejo. O consumo de forragem é resultado da estrutura e acessibilidade do pasto, bem como de sua abundância e qualidade (CARVALHO et al., 2007).

As medidas indiretas do consumo estão baseadas na mensuração de elementos diferentes daqueles ingeridos pelo animal. Estão associadas ao consumo em longo prazo, em escalas que vão de dias a semanas (CARVALHO et al., 2007). Os fatores que controlam o consumo, neste caso, passam a ser focalizados nos processos digestivos, em que a taxa de passagem e capacidade gastrointestinal assumem importância. Tais medidas indiretas são utilizadas pela comunidade científica nacional para estimar o consumo no longo prazo.

Uma das técnicas mais frequentemente utilizadas está baseada no princípio de que a quantidade de alimento ingerido é diretamente relacionada à excreção fecal por um animal e inversamente relacionada à indigestibilidade da dieta consumida.

A excreção fecal de animais em pastejo pode ser mensurada diretamente por intermédio da coleta total de fezes, por arreios e bolsas coletoras. A principal crítica ao uso desta técnica está relacionada ao desconforto animal, interferindo no comportamento de pastejo (FRANCE et al., 1988, MOORE; SOLLEMBERGER, 1997). Além disso, o manejo e mensuração de grande quantidade de fezes tornam-se

laboriosos e pouco práticos. Há possibilidades em haver perda dos excrementos para fora da sacola. Estes problemas parecem ser mais limitantes em bovinos em relação aos ovinos, principalmente em animais de alto nível de consumo e mantidos em pastagens com alto teor de umidade (MOORE; SOLLENBERGER, 1997).

A excreção fecal tem sido mais frequentemente estimada pela utilização de indicador externo, o qual, sendo ingerido juntamente com a dieta, deve ser recuperado totalmente nas fezes (COELHO da SILVA et al., 1968).

Diferentes elementos, na forma de sais ou óxidos, são empregados como indicadores, dentre eles, podendo destacar: itérbio, érbio, európio, cádmio, ouro, cério, titânio e cromo. Este último, na forma de óxido crômico (Cr_2O_3), é, sem dúvida, o indicador mais utilizado na determinação da excreção fecal, por ser barato e pela relativa simplicidade dos procedimentos analíticos (MORENZ et al., 2006). Em estudos com ruminantes, o óxido crômico pode ser ministrado por cápsulas de gelatina, impregnado em papel filtro ou na forma de peletes (ELAM et al., 1962), sendo fornecido uma ou duas vezes ao dia, em cápsulas de 1 a 15 gramas. Normalmente, a concentração do Cr_2O_3 nas fezes alcança o equilíbrio em torno de 6 a 7 dias após o início de seu fornecimento. Contudo, há problemas ao seu uso, como recuperação fecal incompleta (MIR; KALNIN; GARVEY, 1989; SOARES et al., 2004) e sua irregularidade na excreção ao longo do dia (MORENZ et al., 2006; KOZLOSKI et al., 2006). De forma contrária, Paixão (2004) observou passagem inerte pelo trato digestivo, com recuperação completa da dose administrada na matéria fecal, independente do número de dias de coleta de fezes (1 a 5 dias).

A fim de reduzir a amplitude de variação da excreção do indicador, o ideal seria o fornecimento da dose diária de Cr_2O_3 , fracionada em duas porções de mesmo peso (BRISSON; PIGDES; SYLVESTRE, 1957; BURNS et al., 1994). Cada vez que o indicador é fornecido, os animais devem ser contidos, e este manejo intenso aumenta o estresse, podendo alterar o consumo e, conseqüentemente, a excreção fecal (BURNS et al., 1994; POND et al., 1995). Assim, a redução no número de dosagens diárias poderia fornecer valores de consumo mais próximos ao real, devido ao menor distúrbio do comportamento de pastejo (OWENS; HANSON, 1992).

Depois de determinada a excreção fecal, o próximo passo consiste na determinação da digestibilidade. A digestibilidade da forragem consumida em situação de pastejo não pode ser mensurada diretamente.

Para obtenção de amostras representativas da dieta ingerida (extrusa), a utilização de animais fistulados, principalmente no esôfago se faz necessário (MINSON et al., 1976). No entanto, há problemas com sua utilização, como: contaminação por nitrogênio salivar ou perda de materiais solúveis (MINSON et al., 1976), pouco tempo que as amostras são obtidas pode torná-las não representativas da forragem consumida durante todo período de pastejo (McMENIMAN, 1997), mudança no comportamento ingestivo dos animais e necessidade em obter animais fistulados. Com isso, há recomendação em coletar amostras de forragem por simulação de pastejo. Este método é considerado subjetivo, com relação à amostragem do pasto, pelo fato de que a decisão da coleta da amostra fica a critério do observador. Este, por sua vez, deve-se ressaltar que o grau de seletividade do animal é bastante variável devido à estação do ano, espécie forrageira, carga animal, compostos antinutritivos como taninos ou alcalóides e material senescente.

A digestibilidade de forragens pode ser estimada pelo método *in vitro*, com utilização de microrganismos do rúmen. Tal procedimento não simula as alterações na digestibilidade por efeito associativo, nível de consumo e taxa de passagem observados *in vivo*, sendo, portanto, a técnica *in vitro* inadequada para determinação do consumo em pasto (COCHRAN et al., 1986).

Assim, os indicadores internos, que são componentes naturais e indigestíveis da forragem, tornam-se alternativa na estimativa da digestibilidade (BERCHIELLI et al., 1996). A utilização desses indicadores, em teoria, expressa o real processo de digestão dos animais em condições de pastejo.

Conforme o alimento transita pelo trato gastrointestinal, a concentração do indicador aumenta progressivamente pela remoção de outros componentes, por digestão e absorção (ASTIGARRAGA, 1997).

Os indicadores internos mais utilizados são os alcanos, a matéria seca indigestível (MSi), fibra em detergente ácido indigestível (FDAi) e fibra em detergente neutro indigestível (FDNi).

Detmann et al. (2001) avaliaram o óxido crômico e diversos indicadores internos na determinação do consumo de novilhos mestiços. A FDNi juntamente com MSi não diferiram entre si nos resultados de consumo de matéria seca, sendo recomendados em estudos com animais em pastejo.

Em situações onde os animais encontram-se em pastejo sendo suplementados em grupo, se faz necessário a associação de outro indicador, com objetivo de estimar o consumo individual do suplemento, pois há considerável variação no consumo individual (CURTIS; HOLST; MURRAY, 1994). Essa variação pode ser afetada por diversos fatores, como espaço de cocho, oferta de suplemento, dominância entre animais, entre outros.

Os indicadores utilizados para estimar o consumo individual do suplemento são inorgânicos, como o lítio (KAHN, 1994), itérbio (EARLEY; SOWELL; BOWMAN, 1999) e mais recentemente, óxido crômico (Cr_2O_3) e dióxido de titânio (TiO_2) (KINCHELOE, 2004; MARCONDES et al., 2006).

Marcondes et al. (2006) estimaram produção de matéria seca fecal utilizando coleta total, Cr_2O_3 , TiO_2 , lignina isolada purificada e enriquecida do *Eucalyptus grandis* (LIPE®) e FDNi. Avaliaram a utilização de 10 g de Cr_2O_3 ou TiO_2 na estimativa do consumo de suplemento e FDNi no consumo de volumoso. O Cr_2O_3 e o TiO_2 foram misturados diariamente ao suplemento e a LIPE® foi colocada via fístula ruminal. Os autores observaram que todos os indicadores estimaram adequadamente a produção de matéria seca fecal e que o Cr_2O_3 e TiO_2 estimaram igualmente o consumo individual de suplemento. Tais autores afirmaram que tanto o Cr_2O_3 quanto TiO_2 podem ser utilizados na estimativa do consumo individual de suplemento, e que FDNi é adequada para avaliar o consumo de volumoso.

Há muitos trabalhos na literatura avaliando indicadores externos e internos na estimativa de produção fecal, digestibilidade e consumo de pasto e suplemento pelos animais. No entanto, tais indicadores possuem suas vantagens assim como suas desvantagens, não existindo na literatura uma recomendação ao uso de um melhor indicador na estimativa das variáveis citadas acima.

Existe maior complexidade em estimar o consumo em pasto, sendo que todas as metodologias possuem vantagens e desvantagens. Apesar de existirem várias barreiras metodológicas, há avanços muito claros nessa área. Neste contexto, a técnica dos

isótopos estáveis pode ser visualizada como ferramenta no auxílio à pesquisas em que metodologias convencionais não podem prever resultados totalmente seguros (BAHAR et al., 2005).

2.4. Isótopos Estáveis Ambientais como ferramenta em estudos com animais ruminantes

Os isótopos são átomos do mesmo elemento químico, que possuem o mesmo número de prótons, mas que diferem em seu número de nêutrons, apresentando diferentes massas (KENNEDY; KROUSE, 1990). Por possuírem sua camada eletrônica igual, ou seja, mesmo número de elétrons, pode-se dizer que os isótopos são elementos que apresentam mesmas propriedades químicas (eletrosfera) e diferentes propriedades físicas (núcleo).

O termo isótopo vem do grego *ISO* (mesmo ou igual) e *TOPOS* (lugar), referindo-se ao fato que são elementos que ocupam o mesmo lugar na tabela periódica. Ocorrem naturalmente, podendo ser utilizados como marcadores internos em processos dietéticos. A expressão *estável* significa que não emitem radiação. Ainda, exercem vantagem sobre os isótopos radioativos, devido ao fato de poderem ser utilizados sem riscos à saúde humana e ao ambiente (DUCATTI, 2007).

Os isótopos estáveis foram utilizados inicialmente em estudos geológicos e arqueológicos. Nas últimas décadas têm sido aplicados de forma crescente e contínua em pesquisas agrícolas, ecológicas, bem como em estudos de digestibilidade e metabolismo humano e animal. Estas investigações demonstraram que as composições isotópicas dos tecidos de animais dependem principalmente da alimentação, da água ingerida e gases inalados. Associado a isto, os efeitos dos isótopos estão ligados aos processos metabólicos (KENNEDY; KROUSE, 1990).

Os isótopos estáveis do carbono apresentam-se como alternativa em estudos relacionados à digestão, absorção e metabolismo de nutrientes, por estarem presentes em todos 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 isótopos estáveis do carbono ocorrem naturalmente na biosfera. Cada elemento apresenta um isótopo estável leve dominante: carbono-12 (^{12}C) e um isótopo estável pesado: carbono-13 (^{13}C) (KENNEDY; KROUSE, 1990).

Em função da grande diferença na abundância natural dos isótopos estáveis do carbono, a mensuração da relação entre eles na maioria das amostras gera valores muito pequenos. Para converter esta relação, os valores isotópicos do carbono ($\delta^{13}\text{C}$) são expressos na terminologia dos isótopos estáveis, em delta per mil da razão isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ do produto em relação ao padrão internacional definido, Peedee Belemnite (PDB). Segundo Friedman; O'Neill (1977), este padrão é aceito universalmente na comparação das composições isotópicas do carbono. Trata-se de um carbonato sólido de *Belemnitela do cretáceo*, *Belemnitela americana*, da formação Peedee da Carolina do Norte, empregado inicialmente como padrão por Craig (1957). No Centro de Isótopos Estáveis Ambientais da UNESP – Campus de Botucatu, é utilizada como subpadrão de trabalho, uma rocha carbonatada (mármore) com alta pureza em calcita (DUCATTI; SALATI; MATSUI, 1979). Quando se tem sinal negativo no $\delta^{13}\text{C}$, indica que o material estudado apresenta menor concentração de carbono em relação ao padrão internacional PDB. (DUCATTI et al., 1979; DUCATTI, 2007; VOGEL, 1993). A medida da relação entre isótopos estáveis é realizada por espectrometria de massas, que detecta a concentração dos diferentes isótopos do elemento.

A fonte primária do carbono para as plantas terrestres é o gás carbônico atmosférico, o qual apresenta valor de $\delta^{13}\text{C}$ de aproximadamente -7,7‰ (KENNEDY; KROUSE, 1990). Este carbono sofre discriminação isotópica ao longo do processo de fotossíntese. O termo discriminação isotópica indica enriquecimento ou empobrecimento isotópico relativo do produto em relação à fonte precursora.

De acordo com seu ciclo fotossintético, as plantas podem ser classificadas em sua maioria, em dois grupos principais: plantas C_3 (arroz, leguminosas, trigo, cevada, hortaliças, beterraba, mandioca, algodão, alfafa, soja, feijão, frutíferas em geral, gramíneas temperadas, entre outros) e C_4 (cana de açúcar, milho, gramíneas tropicais, entre outras). A diferença entre elas ocorre devido às distintas rotas bioquímicas na produção de carboidratos. As plantas que seguem o ciclo fotossintético C_3 , o primeiro composto orgânico formado pelo Ciclo de Calvin, contém 3 átomos de carbono. A enzima fixadora do CO_2 , a RuBP-carboxilase, discrimina o CO_2 , resultando em valores de $\delta^{13}\text{C}$ menores em relação às plantas C_4 (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001). Outra forma de fixação do carbono pelas plantas ocorre nas células do mesófilo, em que o dióxido de carbono é fixado ao fosfoenolpiruvato (PEP), formando o oxalacetato, um

composto de 4 carbonos. Por esse motivo, são denominadas de plantas de ciclo fotossintético C_4 . Neste caso, a enzima catalisadora da reação de fixação de carbono (PEP-carboxilase) não discrimina o CO_2 como a RuBP-carboxilase e, desta forma, estas plantas possuem valores de $\delta^{13}C$ maiores que das plantas C_3 (RAVEN et al., 2001).

Nas plantas C_3 , o valor de $\delta^{13}C$ varia de -22 a -34‰, dependendo da espécie e da parte da planta analisada, enquanto que nas plantas C_4 o valor encontra-se entre -9 e -16‰ (VOGEL, 1993). O contraste existente na razão isotópica de $^{13}C/^{12}C$ das plantas C_3 e C_4 possibilita estudos na área de nutrição animal, utilizando como marcador o $\delta^{13}C$ e sua concentração natural existente nos alimentos (DUCATTI, 2007). Devido ao fato das plantas serem fonte de alimento aos animais, a “impressão digital isotópica” destas fontes será refletida nos tecidos específicos dos animais, após certo tempo de metabolismo (DeNIRO; EPSTEIN, 1978; GANNES; DEL-RIO; KOCH, 1998), possibilitando evidenciar as dietas a partir da análise isotópica nos tecidos (DUCATTI, 2007).

O principal elemento considerado na análise alimentar é o carbono, contudo a complexidade na interpretação dos valores isotópicos sobre as possíveis fontes alimentares sugere a complementação com outros isótopos como o nitrogênio (FRY; SHERR, 1984).

Piasentier et al. (2003), ao avaliarem a técnica dos isótopos estáveis de C e N, observaram que as diferenças encontradas nos valores de $\delta^{13}C$ no tecido de ovinos deveram-se principalmente ao tipo de regime alimentar. Entretanto, para $\delta^{15}N$, os valores podem ter sofrido interferência em função do tipo de solo, possível presença de plantas leguminosas na dieta e ainda ser oriunda dos próprios fatores metabólicos do animal.

A técnica dos isótopos estáveis tem possibilitado pesquisas relacionadas à nutrição animal, devido ao fato de que os valores isotópicos determinados terem como base alimentos assimilados e não apenas alimentos ingeridos. Portanto, permite a obtenção de informações de dietas consumidas recentemente ou até mesmo aquelas que foram fornecidas no período inicial da vida dos animais (HOBSON; CLARK, 1992).

A utilização dos isótopos estáveis ambientais na Zootecnia acontece há muitos anos. Ludlow e colaboradores, em 1976 propuseram a técnica para determinação das

proporções ingeridas de espécies de plantas C_3 e C_4 pelos animais. Posteriormente, Lourenço; Matsui; Arcaro Júnior (1984) estudaram o grau de seletividade da dieta em vacas leiteiras, mantidas em pastos de gramínea e leguminosa, através do $\delta^{13}C$ determinado nas fezes, leite e sangue. Estes trabalhos partiram do mesmo pressuposto de que a técnica dos isótopos baseia-se no fato de que, no processo fotossintético, o ^{13}C do CO_2 atmosférico sofre discriminação isotópica em relação ao total de carbono, quando integrado aos tecidos das plantas. Assim, existe diferença isotópica da ordem de 16‰ nos valores em $\delta^{13}C$ entre as plantas do ciclo fotossintético C_3 e C_4 , podendo caracterizar a dieta do animal através da análise isotópica do carbono dos tecidos (DUCATTI, 2007). A confiabilidade da técnica dos isótopos como ferramenta na determinação de proporções ingeridas de plantas C_3 e C_4 também foi demonstrada por Coates (1996), Norman et al. (2009) e Martins (2010).

Os isótopos estáveis também podem ser utilizados combinados a outros marcadores, como por exemplo, os alcanos (GARCIA et al., 2000; MACHADO et al., 2006), analisados nas fezes. Garcia et al. (2000), estudaram o uso combinado dos alcanos aos isótopos de carbono na determinação do consumo de pasto e suplemento em vacas leiteiras. Os resultados indicaram que a combinação dos n-alcanos ao $\delta^{13}C$ pode ser utilizada com sucesso na estimativa do consumo de silagem de milho e pasto, em vacas suplementadas em grupo.

Diversas pesquisas têm utilizado os isótopos estáveis como ferramenta em estudos com diferentes objetivos, tais como, caracterização e diferenciação do regime dietético de suínos ibéricos de acordo com a alimentação recebida no período de engorda (GONZALEZ-MARTIN et al., 1999), certificação da origem geográfica e tipos de alimentação de ovinos (PIASENTIER et al., 2003), avaliação dos sistemas produtivos convencional e orgânico da carne de bovinos (SCHIMIDT et al., 2005), no processo de rastreabilidade do leite de vacas sob diferentes regimes alimentares (KNOBBE et al., 2006), como indicadores na autenticação do leite orgânico na Alemanha (MOLKENTIN, 2009), entre outras.

Pesquisas utilizando a técnica dos isótopos estáveis em processos de rastreabilidade de produtos de origem animal tem sido interesse por vários pesquisadores. Nos últimos anos, a segurança e a qualidade dos alimentos tornaram-se a principal demanda do consumidor, bem como a determinação da autenticidade e origem

geográfica dos alimentos. Um sistema de rastreabilidade eficiente contribui com a prevenção de fraudes, fornece método eficaz para avaliação dos alimentos, facilita os procedimentos de controle de doenças transmitidas por alimentos e contribui pela confiança dos consumidores na segurança do produto (PRACHE, 2007).

Em processos de certificação de produtos de origem animal utilizando a técnica dos isótopos estáveis, devem-se levar em consideração alguns fatores que podem causar variações da razão isotópica no animal. Estas variações podem estar relacionadas às diferenças existentes entre tecidos e produtos animais, ao *turnover* isotópico, a qualidade e natureza da dieta, assim como informações a respeito do fracionamento isotópico que possa existir entre a dieta e tecido do animal (POST, 2002; TIESZEN et al., 1983).

O fracionamento isotópico é resultante de processos decorrentes durante a digestão, absorção, assimilação e excreção dos nutrientes (DeNIRO; EPSTEIN, 1978).

Sponheimer et al. (2003), realizaram estudo de fracionamento isotópico em diversos mamíferos herbívoros, analisando fezes e pêlos dos animais. As fezes foram escolhidas para refletirem a alimentação consumida recentemente, enquanto os pêlos foram escolhidos para refletirem alimentação realizada há alguns meses. Os resultados encontrados mostraram diferenças de fracionamento isotópico entre as amostras analisadas.

Quando a técnica dos isótopos é aplicada em partes específicas do corpo, gera informação mais precisa de qual foi a fonte alimentar efetivamente incorporada ao tecido do animal ao longo do tempo (SPONHEIMER et al., 2003). Essa incorporação pode variar de acordo com o tecido analisado e seu *turnover* isotópico. Quando determinado organismo utiliza diferentes fontes alimentares com composição isotópica distinta, deve-se levar em consideração o tempo necessário para que o carbono da nova dieta seja incorporado aos tecidos. Esse tempo é denominado de taxa de *turnover* isotópico (TIESZEN; BOUTTON, 1983). Tecidos mais ativos metabolicamente apresentam *turnover* mais rápido que tecidos menos ativos metabolicamente. Com isso, se faz necessário eleger um tecido ou componente corporal que reflita as alimentações dos animais em diferentes períodos de avaliação, em processos de certificação.

São poucos os trabalhos nacionais avaliando a aplicação da metodologia dos isótopos estáveis em estudos com animais ruminantes.

A utilização da técnica dos isótopos estáveis vem se consolidando como metodologia consistente e de potencial para auxiliar no entendimento de pesquisas direcionadas aos animais ruminantes. Para isso, mais estudos são necessários, associados ou não a outras metodologias convencionais, fazendo com que os isótopos se transformem em mais um meio de auxiliar e proporcionar suporte de cunho científico em pesquisas no Brasil.

3. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

A demanda por carne bovina de qualidade no mercado mundial é crescente. Neste contexto, novas técnicas para complementar e dar maior suporte às pesquisas relacionadas à produção animal assumem extrema importância. Metodologias para diversos tipos de análises têm sido desenvolvidas buscando maior eficiência e facilidade na obtenção de resultados. Sendo assim, a técnica dos isótopos estáveis torna-se uma importante ferramenta em estudos com foco na produção animal.

São poucos os trabalhos nacionais avaliando a aplicação da metodologia dos isótopos estáveis em animais ruminantes. O Brasil tem liderança declarada de maior produtor comercial e exportador de carne bovina do mundo. Por isso se torna de extrema importância o desenvolvimento de pesquisas direcionadas à Nutrição e Produção de Ruminantes, a fim de melhor compreender e proporcionar suporte de cunho científico ao sistema de produção da carne bovina. Além disto, avaliar a real contribuição dos resultados obtidos pela metodologia dos isótopos estáveis nas condições tropicais, a qual se insere o Brasil.

O Capítulo II, intitulado **“Estimativa de consumo de pasto pela técnica dos isótopos estáveis do carbono, em bovinos de corte em pasto suplementados na seca”**, apresenta-se de acordo com as normas para publicação na revista **“Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia”** (*Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences*). O objetivo deste trabalho foi avaliar a técnica dos isótopos estáveis de carbono em comparação ao indicador externo óxido de cromo (Cr_2O_3), aliados ao indicador interno fibra em detergente neutro indigestível (FDNi), na estimativa de consumo de pasto de bovinos em pastejo recebendo suplementação na fase de terminação.

O Capítulo III, intitulado **“Alteração isotópica de carbono em tecidos de bovinos de corte criados em pasto suplementados no período da seca: Implicações na autenticação isotópica da carne bovina”**, apresenta-se de acordo com as normas para publicação na revista **“Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia”** (*Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences*). Objetivou

investigar mudanças na composição isotópica do $\delta^{13}\text{C}$ em diferentes cortes cárneos, sangue total, plasma e fezes de bovinos de corte criados em pasto (planta C_4) durante o período de terminação recebendo suplementação a base de plantas C_3 no período da seca, além de avaliar o potencial da técnica dos isótopos estáveis de carbono na detecção de diferentes fontes alimentares em tecidos de bovinos.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIEC: associação brasileira das indústrias exportadoras de carne. São Paulo, 2013. Disponível em: <<http://www.abiec.com.br>>.

ALLDEN, W.G.; WHITTAKER, McD. The determinants of herbage intake by grazing sheep: the interrelationship of factors influencing herbage intake and availability. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 21, p. 755-766. 1970.

ANDRADE, F. M. E. **Produção de forragem e valor alimentício do capim-marandu submetido a regimes de lotação contínua por bovinos de corte**. 2003. 141 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Ciência Animal e Pastagens). Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz. ESALQ/USP, Piracicaba. 2003.

ANUALPEC. Anuário da Pecuária Brasileira. FNP. São Paulo, 2013.

AROEIRA, L.J.M. Estimativa de consumo de gramíneas tropicais. In: DIGESTIBILIDADE EM RUMINANTES, 1997, Lavras. **Anais...** Lavras: FAEP, 1997. p.127-163.

ASTIGARRAGA, L. Técnicas para la medición del consumo de rumiantes en pastoreo. In: SIMPÓSIO SOBRE AVALIAÇÃO DE PASTAGENS COM ANIMAIS, 1997, Maringá. **Anais...** Maringá: UEM, 1997. p.1-23.

BAHAR, B.; MONAHAN, F.J.; MOLONEY, A.P.; O'KIELY, P.; SCRIMGEOUR, C.M.; SCHMIDT, O. Alteration of the carbon and nitrogen stable isotope composition of beef by substitution of grass silage with maize silage. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.19, p.1937-1942, 2005.

BARBOSA, F.A.; GRAÇA, D.S.; MAFFEI, W.E.; SILVA JÚNIOR, F.V.; SOUZA, G.M. Desempenho e consumo de matéria seca de bovinos sob suplementação protéico-energética, durante a época de transição água-seca. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.1, p.160-167, 2007.

BERCHIELLI, T.T.; MAURO, F.R.C.; FURLAN, C.L. et al. Avaliação de indicadores internos para determinação da digestibilidade da matéria seca. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 33, 1996, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: SBZ, 1996. v.3, p.44-45.

BRÂNCIO, P.A.; NASCIMENTO JUNIOR, D.; EUCLIDES, V.P.B.; FONSECA, D.M.; ALMEIDA, R.G.; MACEDO, M.C.M.; BARBOSA, R.A. Avaliação de três cultivares de *Panicum maximum* Jacq. sob pastejo: composição da dieta, consumo de matéria seca e ganho de peso animal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 32, n. 5, p. 1037-1044, 2003.

BRISSON, G.J.; PIGDES, W.J.; SYLVESTRE, P.E. Effect of frequency of administration of chromic oxide on its fecal excretion pattern by grazing cattle. **Canadian Journal Animal Science**, v. 37, p. 90-94, 1957.

BRITO, R.M.; SAMPAIO, A.A.M.; FERNANDES, A.R.M.; HENRIQUE, W.; CATTELAN, J.W.; ROUTMAN, K.S. Degradabilidade *in situ* e parâmetros ruminais em bovinos alimentados com dietas balanceadas para diferentes ganhos de peso e potenciais de fermentação microbiana. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.5, p.1639-1650, 2007. (suplemento).

BURNS, J.C.; POND, K.R.; FISHER, D.S. Measurements of forage intake. In: FAHEY JR., G.C. (Ed.) **Forage Quality, Evaluation and Utilization**, Madison: ASA, CSSA, SSSA, p. 494-532, 1994.

CARDOSO, E.G. Suplementação de bovinos de Corte em Pastejo (semiconfinamento). In: IV SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO ANIMAL, 1997. Confinamento de bovinos. **Anais...** Piracicaba: FEALD, 1997.

CARVALHO, P.C.F. A estrutura das pastagens e o comportamento ingestivo de ruminantes em pastejo. In: Jobim, C.C., Santos, G.T., Cecato, U. (Eds.). Simpósio sobre avaliação de pastagens com animais, 1, Maringá-PR, 1997. p. 25-52.

CARVALHO, P.C.F.; KOZLOSKI, G.V.; RIBEIRO FILHO, H.M.N.; REFFATI, M.V.; GENRO, T.C.M.; EUCLIDES, V.P.B. Avanços metodológicos na determinação do consumo de ruminantes em pastejo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p.151-170, 2007. (suplemento especial).

CHACON, E.; STOBBS, T.H.; SANDLAND, R.L. Estimation of herbage consumption by grazing cattle using measurements of eating behaviour. **J. Br. Graasl. Soc.**, v. 31, p. 81-87, 1976.

COATES, D.B. Diet selection by cattle grazing *Stylosanthes* — grass pastures in the seasonally dry tropics: effect of year, season, stylo species and botanical composition. **Australian Journal Experimental Agriculture**, v.36, p.781–789, 1996.

COCHRAN, R.C.; ADAMS, D.C.; WALLACE, J.D.; GALYEAN, M.L. Predicting digestibility of different diets with internal markers: Evaluation of four potential markers. **Journal of Animal Science**, v. 63, p. 1476-1483, 1986.

COELHO DA SILVA, J.F.; CAMPOS, J.; CONRAD, J.H. Uso do óxido crômico na determinação da digestibilidade. **Experientiae**, v. 8, p. 1-23, 1968.

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

CURTIS, K.M.S.; HOLST, P.J.; MURRAY, P.J. Measuring supplement intake in the field using ytterbium as a marker. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.34, p.339-343, 1994.

DEMMENT, M.W.; LACA, E.A. Reductionism and synthesis in grazing sciences: models and experiments. **Proceedings Australian Society of Animal Production**, p.1-18, 1994.

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

DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; ZERVOUDAKIS, J.T.; VALADARES FILHO, S.C.; EUCLYDES, R.F.; LANA, R.P.; QUEIROZ, D.S. Cromo e indicadores internos na determinação do consumo de novilhos mestiços, suplementados, a pasto. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.5, p.1600-1609, 2001.

DETMANN, E.; PAULINO, M.P.; CECON, P.R.; VALADARES FILHO, S.C.; ZERVOUDAKIS, J.T.; CABRAL, L.S.; LEÃO, M.I.; LANA, R.P.; PONCIANO, N.J. Níveis de proteína em suplementos para terminação de bovinos em pastejo durante o período de transição seca/águas: consumo voluntário e trânsito de partículas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.4, p.1371-1379, 2005.

DUBLE, R.L.; LANCASTER, J.A.; HOLT, E.C. Forage characteristics limiting animal performance on warm-season perennial grasses. **Agronomy Journal**, v.63, n.3, p.795-798, 1971.

DUCATTI, C. Isótopos Estáveis Ambientais [Apostila]. 2007. 204p. Curso de Pós-graduação. Disciplina: **Aplicação de Isótopos Estáveis Ambientais**. Programa de Pós-graduação em Zootecnia. FMVZ/UNESP, 2007.

DUCATTI, C.; SALATI, E; MATSUI, E. Método de análises da razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ em matéria orgânica e das razões $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ em carbonatos. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.51, p.275-86. 1979.

EARLEY, A.V.; SOWELL, B.F.; BOWMAN, J.G.P. Liquid supplementation of grazing cows and calves. **Animal Feed Science and Technology**, v.80, p.281-296, 1999.

ELAM, C.J.; REYNOLDS, P.J.; DAVIS, R.E.; EVERSON, D.O. Digestibility Studies by means of chromic oxide lignin and total collection techniques with sheep. **Journal of Animal Science**, v.21, n.2, p.189-192, 1962.

EUCLIDES, V.P.B. Produção Intensiva de Carne Bovina em Pasto. In: SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE, 2, 2001, Viçosa. **Anais...** Viçosa-MG: UFRV, 2001. p.55-82.

EUCLIDES, V.P.B.; MACEDO, M.C.M.; OLIVEIRA, M.P. Avaliação de diferentes métodos de amostragem para se estimar o valor nutritivo de forragens sob pastejo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.21, n.4, p.691-702, 1992.

EUCLIDES, V.P.B.; EUCLIDES FILHO, K. Avaliação de forrageiras sob pastejo. In: SIMPÓSIO SOBRE AVALIAÇÃO DE PASTAGENS COM ANIMAIS, 1997, Maringá. **Anais...** Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 1997. p.85-111.

EUCLIDES, V.P.B.; EUCLIDES FILHO, K.; COSTA, F.P.; FIGUEIREDO, G.R. Desempenho de novilhos F1 Angus-Nelore em pastagens de *Brachiaria decumbens* submetidos a diferentes regimes alimentares. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.2, p.470-481, 2001.

EUCLIDES, V.P.B.; MEDEIROS, S.R. Suplementação animal em pastagens e seu impacto na utilização da pastagem. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 22, 2005. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, Piracicaba, 2005. p. 33-70.

FRANCE, J.; DHANOA, M.S.; SIDDONS, R.C.; THORNLEY, J.H.; POPPI, D.P. Estimating the fecal producing by ruminants from faecal marker concentration curves. **Journal of Theoretical Biology**, v.135, p.383-391, 1988.

FRIEDMAN I.; O'Neil J.R. Compilation of stable isotope fractionation factors of geochemical interest. In: FLEISCHER M. Editors. **Data of Geochemistry**, 6^a ed. United States government printing office, 1977. p. 1-12.

FRY, B.; SHERR, E.B. $\delta^{13}\text{C}$ measurements as indicators of carbon flow in marine and fresh water ecosystems. **Contribution in Marine Science**, v.27, p.13-47, 1984.

GANNES, L.Z.; DEL-RIO, C.M.; KOCH, P. Natural abundance variations in stable isotopes and their potential uses in animal physiological ecology. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.119, p.725-737, 1998.

GARCIA, S.C.; HOLMES, C.W.; HODGSON, J.; MACDONALD, A. The combination of 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.

GOES, R.H.T.B.; MANCIO, A.B.; LANA, R.P.; ALVES, D.D.; LEÃO, M.I.; SILVA, A.T.S. Recria de novilhos mestiços em pastagens de *Brachiaria brizantha*, com diferentes níveis de suplementação na Região Amazônica. Desempenho animal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.5, p.1740-1750, 2005.

GOES, R.H.T.B.; MANCIO, A.B.; ALVES, D.D.; SILVA, A.T.S.; LAMBERTUCCI, D.M. Avaliação da qualidade da pastagem de capim *Brachiaria* sob pastejo: Considerações sobre o método de pastejo simulado. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia**. UNIPAR. 7(2) Suplemento: p.113, 2004.

GOMIDE, J. A. Fatores da produção de leite a pasto. In: CONGRESSO NACIONAL DOS ESTUDANTES DE ZOOTECNIA. **Anais...** Viçosa/MG, 1998. p.1-32.

GORDON, L.I.; ILLIUS, A.W. Foraging strategy: From monoculture to mosaics. In: SPEEDY, A.W.(Ed.). Progress in sheep and goat research. CAB International, Wallingford, UK. 1992 p.153-178.

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

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.

HODGSON, J. **Grazing management: Science into practice**. New York. Longman Scientific Technical. 1990. 203p.

JONES R.; LUDLOW M.; TROUGHTON J. Estimation of the proportion of C₃ and C₄ plant species in diet of animals from the ratio of natural ¹²C and ¹³C isotopes in the faeces. **Journal of Agricultural Science**, v.18, p.91-100; v.92, p.91-100, 1979.

KAHN, L. P. The use of lithium chloride for estimating supplement intake in grazing sheep: estimates of heritability and repeatability. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.45, p.1731-1739, 1994.

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.

KINCHELOE, J.J. **Variation in supplement intake by grazing beef cows**. M.S. Montana State University, 2004.

KLEIBER, M. **The fire of life: an introduction to animal energetics**. New York: Robert E. Krieger Publishing Co. 453p, 1961.

KNOBBE, N.; VOGL, J.; PRITZKOW, W.; PANNEN, U.; FRY, H.; LOCHOTZKE, H.M.; PREISS-WEIGERT, A. C and N stable isotope variation in urine and milk of cattle depending on the diet. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.386, p.104-108, 2006.

KOZLOSKI, G.V.; PEREZ NETTO, D.; OLIVEIRA L.; MAIXNER, A.R.; LEITE, D.T.; MACCARI, M.; BRONDANI, I.L.; SANCHEZ, L.M.B.; QUADROS, F.L.F. Uso do óxido de cromo como indicador da excreção fecal de bovinos em pastejo: variação das estimativas em função do horário de amostragem. **Ciência Rural**, v.36, n.2, p.599-603, 2006.

LE DU, Y.L.P.; PENNING, P.D. Animal based techniques for estimating herbage intake. In: LEAVER, J.D. **Herbage intake handbook**. Dumfries: The British Grassland Society. p.37-76, 1982.

LEITE, G.G.; EUCLIDES, V.P.B. Utilização de pastagens de *Brachiaria* ssp. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DE PASTAGEM, 11, 1994, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1994. p. 267-297.

LOURENÇO, A.J.; MATSUI, E.; ARCARO JÚNIOR, I. Variações de valores de $\delta^{13}\text{C}$ nas fezes, leite e sangue de vacas em lactação mantidas em pastagens exclusivas de gramíneas ou consorciadas. **Boletim da Indústria Animal**, v.41 (n.único), p.183-192, 1984.

LUDLOW, M.M.; TROUGHTON, J.H.; JONES, R.J. A technique for determining the proportion of C_3 and C_4 species in plant samples using stable natural isotopes of carbon. **Journal Agricultural Science**, v.87, p.625-632, 1976.

LUPATINI, G.C. **Produção, Características morfológicas e Valor Nutritivo de Cultivares de Brachiaria brizantha submetidas a duas alturas de resíduo**. 2010. 72f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, 2010.

MACHADO, C.F.; MORRIS, S.T.; HODGSON, J.; BERGER, H.; AUZA, N.J. Effect of maize grain and herbage allowance on estimated metabolizable energy and animal performance in beef cattle finishing systems. **Grass and Forage Science**, v.61, p.385-397, 2006.

MALAFAIA, P.; CABRAL, L.S.; VIEIRA, R.A.; COSTA, R.M.; CARVALHO, C.A.B. Suplementação protéico-energética para bovinos criados em pastagens: Aspectos teóricos e principais resultados publicados no Brasil. **Livestock Research for Rural Development**, v.15, n.12, p.107, 2003.

MARCONDES, M.I.; VALADARES FILHO, S.C.; BRITO, A.F.; FONSECA, M.A.; PAULINO, M.F.; COSTA E SILVA, L.F.; DIN, L.L. Uso de diferentes indicadores para estimar a produção de matéria seca fecal e avaliar o consumo individual de concentrado e volumoso em novilhas. In: 43ª REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA. João Pessoa. **Anais...**, SBZ, 2006 (CD-ROM, Nutrição de Ruminantes).

MARTINS, M.B. **Turnover de carbono e a preferência alimentar de ovelhas por isótopos estáveis**. 2010. 68p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, 2010.

McMENIMAN, N.P. Methods of estimating intake of grazing animals. In: SIMPÓSIO SOBRE TÓPICOS ESPECIAIS EM ZOOTECNIA. REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 34, 1997, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: SBZ, 1997. p.131-168.

MERTENS, D.R. Análise da fibra e sua utilização na avaliação e formulação de rações. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE RUMINANTES, Reunião da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 29, Lavras, 1992. **Anais...** Lavras, S.B.Z., 1992. p.188-219.

MERTENS, D.R. Regulation of forage intake. In: G.C. Fahey; M. Collins; D.R. Mertens e L.E. Moser (ed). **Forage Quality Evaluation and Utilization**. ASA. CSSA, SSSA, Madison, WI. P. 450-493. 1994.

MINSON, D.J.; STOBBS, T.H.; HEGARTY, M.P.; PLAYNE, M.J. Measuring the nutritive value of pasture plants. In: SHAW, N.H., BRYAN, W.W. (Eds.) **Tropical pasture research**. Oxford: CAB International. p.308-338, 1976.

MINSON, D.J. **Forage in ruminant nutrition**. San Diego: Academic Press. 483p. 1990.

MIR, P.S.; KALNIN, C.M.; GARVEY, S.A. Recovery of fecal chromium used as a digestibility marker in cattle. **Journal of Dairy Science**, v.72, p.2549-2553, 1989.

MOLKENTIN, J. Authentication of organic milk using ^{13}C and the α -linolenic acid content of milk fat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p.785-790, 2009.

MOORE, J.E.; SOLLEMBERGER, L.E. Techniques to predict pasture intake. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE PRODUÇÃO ANIMAL SOB PASTEJO, 1997, Viçosa. **Anais...** Viçosa: UFV, 1997. p.81-96.

MORAES, E.H.B.K.; PAULINO, M.F.; ZERVOUDAKIS, J.T.; VALADARES FILHO, S.C.; MORAES, K.A.K. Avaliação qualitativa da pastagem diferida de *Brachiaria decumbens* Stapf., sob pastejo, no período da seca, por intermédio de três métodos de amostragem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, p.30-35, 2005.

MORENZ, M.J.F.; DA SILVA, J.F.C.; AROEIRA, L.J.M.; DERESZ, F.; VÁSQUEZ, H.M.; PACIULLO, D.S.C.; LOPES, F.C.F.; ELYAS, A.C.W.; DETMANN, E. Óxido de cromo e alcanos na estimativa do consumo de forragem de vacas em lactação em condições de pastejo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.4, p.1535-1542, 2006.

MURRAY, R. K.; Biomoléculas e métodos bioquímicos. In: MURRAY, R. K., editor. Harper: Bioquímica. Atheneu Editora, São Paulo, p. 4-11, 1990.

NORMAN, H.C.; WILMOT, M.G.; THOMAS, D.T.; MASTERS, D.G.; REVELL, D.K. Stable carbon isotopes accurately predict diet selection by sheep fed mixtures of C₃ annual pastures and saltbush or C₄ perennial grasses. **Livestock Science**, v.121, p.162-172, 2009.

OWENS, F.N.; HANSON, C.F. External and internal markers for appraising site and extent of digestion in ruminants. **Journal Dairy Science**, v. 75, p. 2605-2617, 1992.

PAIXÃO, M.L. **Uréia em dietas para bovinos em confinamento: desempenho, consumo, digestibilidade, parâmetros ruminais e variação diária na excreção de indicadores**. 2004. 62p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 2004. Viçosa, MG: UFV, 2004.

PARSONS, A.J.; COLLET, B.; LEWIS, J. Changes in the structure and physiology of a perennial ryegrass sward when released from a continuous stocking management: implications for the use of exclusion cages in continuously stocked swards. **Grass and Forage Science**, v. 39, p. 1-9, 1984.

PAULINO, M.F.; KABEYA, L.S.; VALADARES FILHO, S.C.; PEREIRA, O.G. Suplementação de novilhos mestiços em pastagem de *Brachiaria decumbes* durante o período das águas. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 37., 2000, Viçosa. **Anais...** Viçosa: SBZ, 2000. 1 CD-ROM.

PAULINO, M.F.; ZERVOUDAKIS, J.T.; MORAES, E.H.B.K.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C. Bovinocultura de ciclo curto em pastagens. In: SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE, 3., Viçosa, 2002. **Anais...** Viçosa: UFV, DZO, 2002. p. 153-192.

PENNING, P.D.; HOOPER, G.E. An evaluation of the use of short-term weight changes in grazing sheep for estimating herbage intake. **Grass and Forage Science**, v.40, p. 79-84, 1985.

PENNING, P.D.; RUTTER, S.M. Ingestive behaviour. In: PENNING, P.D. (Ed.). **Herbage Intake Handbook**. 2ed. Reading: The British Grassland Society, 2004. p.151-175.

PERUCHENA, C.A. Suplementación de bovinos para carne sobre pasturas tropicales, aspectos nutricionales, productivos y economicos. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 36., 1999, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: SBZ/Gmosis, 1999. CD-Rom. Palestras.

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

POND, K.R.; BURNS, J.C.; FISHER, D.S. et al. **Intake monitoring systems: eletronic and markers**. Raleigh: Department of Animal Science. 15p, 1995.

POST, D.M. Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods and assumptions. **Ecology**, v.83, p.703-718, 2002.

PRACHE S. Developing a diet authentication system from the composition of milk and meat in sheep: A review. **Journal of Agricultural Science**, v. 145, p.435–444, 2007.

RAVEN, P.H., EVERT, R.F., EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. Ed. Gunabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 2001, 906p.

REIS, R.A.; BERTIPAGLIA, L.M.A.; FREITAS, D. et al. Suplementação protéico-energética e mineral em sistemas de produção de gado de corte nas águas e nas secas. In: SANTOS, F.A.P.; MOURA, J.C de; FARIA, V. P. de (ed.). SIMPÓSIO SOBRE BOVINOCULTURA DE CORTE, 5, 2004, Piracicaba. Pecuária Intensiva nos trópicos. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 2004. p. 171-226.

REIS, R.A.; RUGGIERI, A.C.; CASAGRANDE, D.R.; PÁSCOA, A.G. Suplementação da dieta de bovinos de corte como estratégia do manejo das pastagens. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 147-159, 2009 (suplemento especial).

SANTOS, E.D.G.; PAULINO, M.F.; QUEIROZ, D.S.; VALADARES FILHO, S.C.; FONSECA, D.M.; LANA, R.P. Avaliação de pastagem diferida de *Brachiaria decumbens* Stapf: Características químico bromatológicas da forragem durante a seca. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, p.203-213, 2004.

SCHIMIDT, O.; QUILTER, J.M.; BAHAR, B.; MOLONEY, A.P.; SCRIMGEOUR, C.M.; BEGLEY, I.S.; MONAHAN, F.J. Inferring the origin and dietary history of beef from C, N and S stable analysis. **Food Chemistry**, v.91, p.545-549, 2005.

SPONHEIMER, M.; ROBINSON, T.; AYLIFFE, L.; PASSEY, B.; ROEDER, B.; SHIPLEY, L.; LOPEZ, E.; CERLING, T.; DEARING, D.; EHLENGER, J. An experimental study of carbon-isotope fractionation between diet, hair, and feces of mammalian herbivores. **Canadian Journal of Zoology**, v.81, p.871–876, 2003.

SOARES, J.P.G.; BERCHIELLI, T.T.; AROEIRA, L.J.M.; DERESZ, F.; VERNEQUE, R.S. Estimativas de consumo de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum), fornecido picado para vacas lactantes utilizando a técnica do óxido de crômico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.3, p.811-820, 2004.

SOLLENBERGER, L.E.; MOORE, J.E.; ALLEN, V.G.; PEDREIRA, C.G.S. Reporting forage allowance in grazing experiments. **Crop Science**, Madison, v. 45, n. p.896-900. 2005.

THIAGO, L. R. L. 1999. **Suplementação de Bovinos em Pastejo – Aspectos práticos para o seu uso na manutenção ou ganho de peso**. Palestra apresentada no 11º Encontro de Tecnologias para a Pecuária de Corte. Campo Grande - MS.

THIAGO, L.R.L.S.; VALLE, L.C.S.; SILVA, J.M.; MACEDO, M.CM.; JANK, L. Uso de *B. brizantha* cv. Marandu, *P. purpureum* cv. Cameroon e *P. maximum* cv. Mombaça em pastejo rotativo visando produção intensiva de carne. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 37., 2000, Viçosa. **Anais...** Viçosa: SBZ, São Paulo: Videolar, 2000.

TIESZEN, L.L.; BOUTTON, T.W. Stable isotopes in terrestrial ecosystem research. Stable isotopes in ecological research. **Springer**, p.167-195, 1983.

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

VOGEL, J.C. Variability of carbon isotope fractionation during photosynthesis. In: EHRLINGER, J.R.; HALL, A.E.; FARQUHAR, G.D. (Eds). **Stable isotopes and plant carbon**: Water Relations. San Diego: Academic Press, 1993. p.29-46, 1993.

CAPÍTULO II

Estimativa do consumo de pasto pela técnica dos isótopos estáveis do carbono, em bovinos de corte em pasto suplementados na seca

Resumo – Foi realizada avaliação da técnica dos isótopos estáveis de carbono em comparação ao indicador externo óxido de cromo (Cr_2O_3), aliados ao indicador interno fibra em detergente neutro indigestível (FDNi), na estimativa de consumo de bovinos em pastejo recebendo suplementação na fase de terminação. Foram utilizados 36 bovinos de corte da raça Guzerá, 18 machos e 18 fêmeas, com 20 meses de idade e média de peso vivo inicial de 358,18 kg e 317,83 kg, respectivamente, distribuídos em 12 piquetes, sendo 3 animais por piquete. Os animais foram mantidos em pastagem de *Brachiaria brizantha* (C_4) sob método de pastejo de lotação contínua, recebendo suplementação (C_3) na fase de terminação. Realizaram-se administrações de Cr_2O_3 aos animais por período de 10 dias, sendo realizadas nos últimos três dias, coletas de fezes para as análises. Ambas as metodologias possibilitaram estimativas de consumo semelhantes ($P > 0,05$). Houve diferença ($P < 0,05$) na estimativa do consumo de matéria seca entre os machos e fêmeas, sendo o maior consumo correspondente aos machos. Houve alta correlação entre consumo animal e ganho de peso médio diário ($r = 0,80$), e os valores de consumo e ganho foram menores no período mais crítico da seca, onde a pastagem encontrava-se com reduzida produtividade e qualidade nutricional. A estimativa de consumo do pasto por intermédio dos isótopos de carbono mostra-se viável na experimentação com animais em condições de pastejo, apresentando vantagens quanto a menor interferência ao comportamento animal.

Palavras-chave: carbono-13, FDNi, óxido de cromo, plantas C_3 , plantas C_4 .

**Estimated intake by the technique of carbon stable isotopes in beef cattle on
pasture supplemented in dry**

Abstract – We evaluated the carbon stable isotope technique in comparison to the external indicators of chromium oxide (Cr_2O_3), together with the internal indicators indigestible neutral detergent fiber (NDFi), in estimated of the intake of cattle grazing and supplementation in the finishing phase. Thirty-six Guzerá breed beef cattle (18 males and 18 females) were used, with 20 months old and average initial weight of 358.18 kg and 317.83 kg, respectively, divided into 12 paddocks, 3 animals per paddock. The animals were reared at pasture dominated by *Brachiaria brizantha* (C_4) under grazing continuous method, and supplemented (C_3 feed) in the finishing phase. Cr_2O_3 were applied into animals for 10 days, and the last three days, fecal samples were collected for analysis. Both methodologies enabled similar intake estimates ($P > 0.05$). There were differences ($P < 0.05$) in the estimated dry matter intake between males and females, with the highest intake for males. There was a high correlation between intake and daily weight gain ($r = 0.80$), and the intake and weight gain values were lower in the most critical dry period, where the pasture had reduced productivity and nutritional quality. The estimate of the pasture intake through the C isotopes provides to be feasible in animal experiments under grazing conditions. Besides, this technique has advantage in terms of less interference to animal behavior.

Key words: carbon-13, chromium oxide, NDFi, C_3 plants, C_4 plants.

Introdução

A avaliação do desempenho animal em condições de pastejo é de fundamental importância para os nutricionistas. Sendo o desempenho animal função direta do consumo de matéria seca digestível, a determinação deste, se torna um dos parâmetros mais importantes para essa avaliação. Entretanto, a mensuração do consumo em pasto é complexa e não pode ser realizada diretamente, como em confinamentos (Minson, 1990).

A utilização dos indicadores externos e internos consiste em alternativa na estimativa do consumo de matéria seca do pasto. Baseia-se na obtenção da massa consumida por meio da relação entre a excreção fecal e a digestibilidade da dieta (Detmann *et al.*, 2001).

Entre os indicadores externos existentes, o óxido de cromo (Cr_2O_3) tem sido o mais utilizado (Astigarraga, 1997), por ser barato, facilmente incorporado à dieta e analisado com relativa facilidade (Merchen, 1988). Existem algumas desvantagens quanto sua utilização, tais como incompleta mistura com a digesta ruminal, recuperação incompleta e possibilidade de acúmulo em alguma parte do trato digestivo (Silva *et al.*, 2010b). Além disso, a cada fornecimento os animais devem ser contidos, o que aumenta o estresse, podendo alterar o comportamento de pastejo, o consumo e consequentemente, a excreção fecal (Burns *et al.*, 1994).

Os indicadores internos podem ser utilizados tanto na estimativa da produção fecal, quanto na estimativa de digestibilidade e ingestão de alimentos, quando se conhece a produção fecal (Berchielli *et al.*, 2000). Dentre eles, podem-se destacar alguns componentes da fração fibrosa dos alimentos, como por exemplo, a fibra em detergente neutro indigestível (FDNi). No entanto, assim como os indicadores externos, os indicadores internos possuem suas limitações, tais como resultados variáveis, incluindo resultados sub ou superestimados.

Pode-se notar que nenhuma das substâncias utilizadas como indicadores preenchem todas as características de indicador ideal. As limitações inerentes aos indicadores impulsionam a busca por outros métodos mais precisos, e de preferência, com metodologias de análise mais simples e confiáveis.

A diferença existente entre as concentrações de $\delta^{13}\text{C}$ nas plantas C_3 e C_4 , possibilita a utilização do isótopo de carbono como marcador natural (Martins *et al.*, 2012). Uma vantagem a este método é a menor interferência ao comportamento natural dos animais, evitando assim o estresse e consequentemente a mudança no comportamento de pastejo.

A técnica dos isótopos estáveis merece destaque como método alternativo ao uso dos indicadores. Os isótopos estáveis são utilizados como marcadores naturais na determinação dos alimentos ingeridos por uma variedade de espécies animais, incluindo bovinos (Jones *et al.*, 1981), ovinos (Norman *et al.*, 2009), lhamas, caprinos e coelhos (Sponheimer *et al.*, 2003), entre outros.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a técnica dos isótopos estáveis de carbono em comparação ao indicador externo óxido de cromo (Cr_2O_3), aliados ao indicador interno fibra em detergente neutro indigestível (FDNi), na estimativa de consumo de pasto de bovinos em pastejo recebendo suplementação na fase de terminação.

Material e Métodos

O experimento foi realizado na APTA – Pólo Regional do Extremo Oeste, localizada no município de Andradina, oeste do Estado de São Paulo, em parceria com a Universidade Estadual Paulista (UNESP), da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, conforme normas do comitê de ética (protocolo nº 35/2011 - CEUA) desta Universidade.

Segundo dados climáticos da APTA, no ano de 2011 (Fig. 1) a temperatura média mensal variou entre 20 a 27°C ao longo do ano e a precipitação total foi de 1.355 mm. O ano de 2011 foi considerado atípico, em função da ocorrência de duas geadas ao final do mês de julho e início do mês de agosto.

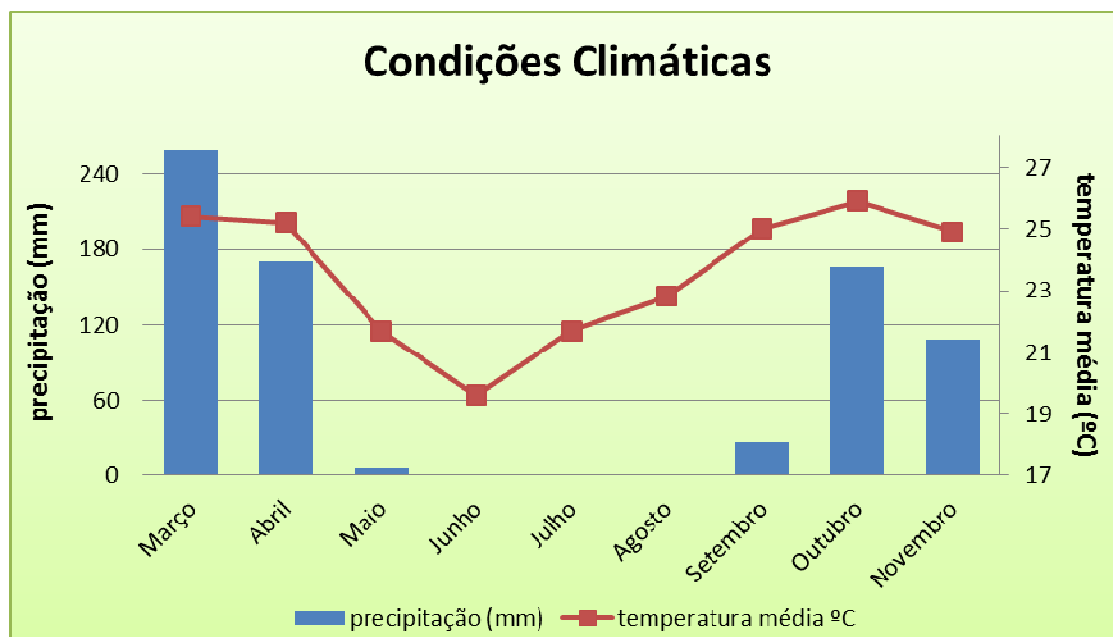


Figura 1. Distribuição média mensal da precipitação pluvial (mm) e temperatura (°C) média dos meses de março a novembro de 2011.

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado. Foram testados dois métodos de estimativa de consumo (óxido de cromo e isótopos de C, associados ao indicador interno de digestibilidade (FDNi) em duas categorias animal (machos e fêmeas). Utilizaram-se 36 bovinos de corte da raça Guzerá, 18 machos e 18 fêmeas, com 20 meses de idade e média de peso vivo inicial de $358,18 \pm 27,09$ kg e $317,83 \pm 24,94$ kg, respectivamente. Os animais foram identificados, pesados e distribuídos de forma homogênea e aleatória em 12 piquetes (3 animais por piquete), a fim de garantir as médias de peso vivo semelhantes entre as repetições (piquetes).

Os piquetes foram divididos com cerca eletrificada e providos de comedouros de madeira com espaço de 60 cm linear por cabeça e bebedouros tipo australiano de 1000 litros. Os animais foram vacinados contra febre aftosa e realizado o controle de endoparasitas ao início do experimento e posteriormente conforme a necessidade.

Foi realizada adubação de 80, 60 e 40 kg/ha/ano de N, P_2O_5 e K_2O , na forma de superfosfato simples (333 kg/ha) e da fórmula 20-00-20 (200 kg/ha) em novembro de 2010 e aplicação de 134 kg/ha de nitrato de amônio (30-00-01) em fevereiro de 2011.

Os piquetes foram pastejados intensamente para uniformização das áreas antes do diferimento, a fim de melhorar a qualidade da massa de forragem acumulada. Posteriormente, foi realizado o diferimento (vedação do pasto) dos piquetes

experimentais com capim-marandu (*Urochloa brizantha* Stapf cv Marandu sin.: *Brachiaria brizantha*) no mês de março de 2011 com utilização no mês de julho do mesmo ano, quando se iniciou o período experimental.

Antes do início do período experimental, os bovinos estavam sob regime de pastejo, recebendo apenas fontes alimentares de planta de ciclo fotossintético C₄. Ao iniciar o período experimental, os animais foram transferidos para os piquetes diferidos e começaram a receber a suplementação (C₃) até o abate.

A fase experimental constituída por 140 dias (julho a novembro) foi dividida em cinco períodos de 28 dias. No 3º período experimental realizou-se o estudo de avaliação de metodologias na estimativa do consumo. Nesta ocasião, os animais estavam com média de peso vivo de 408,00 ± 26,38 kg e 342,20 ± 22,50 kg, para machos e fêmeas respectivamente.

O suplemento fornecido aos animais foi na quantia de 0,8% do peso vivo e o teor de proteína foi compatível com desempenho esperado de 0,7 kg/dia. A dieta foi formulada pelo programa Super Crac para bovinos de corte 4.7 (2010).

Para o preparo do suplemento (Tab. 1) foi utilizado misturador vertical de 500 kg. O suplemento foi pesado, identificado por piquete e ajustado a cada 28 dias após pesagem dos animais.

Os animais passaram por período de adaptação de duas semanas recebendo inicialmente 1,5 kg de suplemento/cabeça/dia, aumentando-se gradativamente até atingir 0,8% PV. Os suplementos foram fornecidos diariamente, às 10 horas da manhã, procurando não alterar o comportamento e os ciclos de pastejo dos animais.

O valor isotópico do suplemento foi calculado pelas porcentagens de inclusão de cada ingrediente na formulação, seus valores isotópicos e de carbono total (%) presente em cada ingrediente (Tab. 1).

Tabela 1. Composição do suplemento, em percentagem de inclusão dos ingredientes (II) na matéria natural (MN), composição química em percentagem da matéria seca (MS) e valor isotópico em ‰ ($\delta^{13}\text{C}$).

Ingredientes	II	PB	FDN	FDA	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	C total (%)
	%MN	% MS				
Casca de soja	46,70	14,00	64,50	46,50	-27,22	39,99
Polpa cítrica	31,00	5,93	25,90	18,50	-28,18	43,03
Farelo de soja	18,00	51,40	24,60	10,60	-26,18	45,67
Sal mineral	2,10	-	-	-	-	-
Uréia	2,00	281,00	-	-	-	-
Sulfato de amônio	0,20	-	-	-	-	-
Suplemento	100	23,26	42,57	29,35	-27,43	41,63

PB: proteína bruta. FDN: fibra em detergente neutro. FDA: fibra em detergente ácido

As avaliações da disponibilidade de massa de forragem de cada piquete foram realizadas pelo método direto rente ao solo de toda a forragem presente no interior de uma moldura metálica, medindo 1,0 x 0,5 m (0,5 m²). A moldura foi lançada ao acaso por nove vezes, de acordo com a determinação da altura dos pastos em cada avaliação, pela medição de 84 pontos por piquete com régua graduada. As amostragens foram realizadas na mesma semana das pesagens dos animais.

Foi realizada coleta de amostras do pasto por meio de simulação de pastejo, método proposto por Sollenberger & Cherney (1995) citado por Andrade (2003). As amostras foram coletadas manualmente pelo mesmo observador, pelo método “*hand-plucking*”, após prévia observação do hábito de pastejo dos animais (Andrade, 2003), na tentativa de se obter uma porção da planta similar àquela selecionada por eles.

No laboratório de Forragicultura da UNESP – Campus Dracena, as amostras de forragem foram pesadas, homogeneizadas e submetidas à secagem em estufa de ar forçado a 65°C por no mínimo 72 horas e, após este período, foram pesadas para determinação da matéria seca. Posteriormente, foram moídas em moinho tipo Wiley, com peneira de malha de 1 mm e guardadas em sacos plásticos para análises bromatológica e isotópica.

As amostras de forragem e suplemento foram analisadas quanto aos teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), segundo procedimentos descritos por Silva e

Queiroz (2002), e fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), pelo método proposto por Van Soest (1994). Os valores de todas as análises foram corrigidos para 100% de matéria seca (MS). As análises da composição química das amostras de simulação de pastejo foram realizadas no Laboratório de Bromatologia da FMVZ (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia) da UNESP, Campus de Botucatu.

Para relacionar o consumo ao peso corporal dos animais, foi utilizado como referência o peso médio no período (3º período), estimado pela média entre os valores inicial e final.

As pesagens dos animais foram realizadas a cada 28 dias, com jejum de forragem e suplemento de 16 horas. O ganho de peso médio diário (GMD) foi obtido pela diferença entre as pesagens realizadas ao início e final de cada período experimental, dividido pelo número de dias do período.

A mensuração do consumo de forragem foi realizada por meio do óxido de cromo (Cr_2O_3), associado ao indicador interno FDNi. Para estimativa da excreção de MS fecal foram fornecidas cápsulas contendo 15 g de Cr_2O_3 /animal diariamente. As cápsulas foram introduzidas via sonda esofágica em dose única às 11:00 h, durante 10 dias, sendo nos últimos 3 dias realizadas coletas de amostras de fezes (aproximadamente 300 g) via reto, coletadas às 16:00 h do 8º dia; no 9º dia às 12:00 h e no 10º dia às 8:00 h. Imediatamente após a coleta, as amostras de fezes foram acondicionadas em sacos plásticos, identificadas e congeladas a -10°C , para posteriores análises laboratoriais.

Para tal procedimento, os animais foram conduzidos ao curral e contidos, para que se procedesse às aplicações e coletas. As amostras foram analisadas quanto ao teor de cromo, em espectrofotômetro de absorção atômica, conforme a metodologia descrita por Willians *et al.* (1962).

A estimativa da excreção fecal de MS (EFMS) foi realizada considerando-se a razão entre a quantidade de indicador fornecido e sua concentração nas fezes: $\text{EFMS (g/dia)} = [\text{Quantidade fornecida do indicador} / \text{concentração do indicador nas fezes}] \times 100$.

A fibra em detergente neutro indigestível (FDNi) foi o indicador interno utilizado para estimar o consumo voluntário de MS do pasto e a digestibilidade utilizada

nos cálculos da estimativa de consumo pelos isótopos estáveis do carbono. Amostras de pastejo simulado, suplementos e fezes foram incubadas por 240 horas (Casali *et al.*, 2008) no rúmen de um bovino para estimativa da FDNi. Os cálculos do consumo voluntário de MS foram realizados através da equação proposta por Detmann *et al.* (2001):

$$\text{CMS (kg/dia)} = \{[(\text{EFMS} \times \text{FDNiF}) - \text{IFDNiS}] / \text{CFDNiF}\} + \text{CMSS}$$

Em que: CMS (kg/dia) = consumo de matéria seca; EFMS = excreção fecal de MS (kg/dia); CFDNiF = concentração de FDNi nas fezes (kg/kg); IFDNiS = Ingestão de FDNi via suplemento (kg/dia); FDNiF = concentração de FDNi na forragem (kg/kg) e CMSS = consumo de matéria seca de suplemento (kg/dia).

Para estimar o consumo individual do suplemento, foi utilizado como marcador o dióxido de titânio (TiO₂), fornecido diariamente aos animais, misturado ao suplemento (10 g/animal/dia).

Para determinação do percentual de consumo do suplemento e do pasto pelas análises isotópicas, foram coletadas fezes e alimentos fornecidos aos animais, de acordo com Lourenço *et al.* (1981).

As amostras de fezes utilizadas para estimar o consumo pelo Cr₂O₃ e TiO₂ foram as mesmas utilizadas para as análises isotópicas, onde estas foram congeladas a -10°C até posterior mensuração isotópica no Centro de Isótopos Estáveis do Instituto de Biociências da UNESP, Campus de Botucatu.

As amostras dos alimentos e fezes foram secadas em estufa à temperatura de 50°C por 48 horas. Posteriormente, foram moídas em moinho criogênico Spex Sample Prep, modelo Geno/Grinder 2010, à -196°C. Foram utilizadas aproximadamente 2,0 g de amostras depositadas em frasco de polycarbonato juntamente com duas esferas de aço inoxidável (modelo 440, sem óleo/graxa), o qual foi devidamente fechado e imerso em nitrogênio líquido durante três minutos para congelamento das amostras, e posterior moagem.

Após moagem das amostras, foram pesadas alíquotas entre 50 a 70 µg e acondicionadas em cápsulas de estanho para análise isotópica.

Para determinação da composição isotópica, foi utilizado o Espectrômetro de Massas modelo *Delta V. Advantage* acoplado ao analisador elementar modelo *FLASH 2000 EA* do Centro de Isótopos Estáveis do Instituto de Biociências da UNESP, Campus de Botucatu. Os resultados foram expressos em notação δ , em relação ao padrão *Peedee Belemnite* (PDB) para $\delta^{13}\text{C}$, com erro de análise da ordem de 0,2‰ e calculado pela equação 1:

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

onde:

δ = enriquecimento relativo da amostra em relação ao padrão. Adimensional.

R = razão isotópica da amostra e do padrão. Adimensional.

Para cálculo de consumo pela técnica dos isótopos estáveis, foram utilizadas amostras dos alimentos ofertados e das fezes dos animais, pois segundo Martins *et al.* (2012), as fezes são os melhores indicativos da dieta recentemente ingerida, por apresentar rápido *turnover*. Os cálculos foram realizados pela equação 2 (Norman *et al.*, 2009), por levar em consideração a digestibilidade dos alimentos e o fator de fracionamento isotópico nos cálculos.

$$\% C_4 = 100 - (100 / (\{ [Dx((B+F)-A)] / [Ex(A-(C+F))] \} + 1)) \quad (2)$$

Na qual, a simbologia significa:

% C_4 = proporção de consumo de forragem proveniente de plantas C_4

A = $\delta^{13}\text{C}$ da amostra dos animais (fezes)

B = $\delta^{13}\text{C}$ das plantas C_3 (suplemento)

C = $\delta^{13}\text{C}$ das plantas C_4 (pasto)

D = 100 - % Digestibilidade pelos cálculos de FDNi do suplemento

E = 100 - % Digestibilidade pelos cálculos de FDNi do pasto

F = discriminação isotópica dieta/ tecido

O fracionamento isotópico foi expresso pela diferença entre o $\delta^{13}\text{C}$ das fezes e do pasto (C_4) conforme equação 3, encontrando valor de -0,5‰.

$$\Delta = \delta^{13}\text{C}_{\text{tecido}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{dieta}} \quad (3)$$

Para fracionamento isotópico fezes-suplemento (C_3) foi utilizado valor fixo de -1,0‰ (Coates *et al.*, 1987; Sponheimer *et al.*, 2003).

Para análise dos dados entre os grupos de resposta, foi utilizado o teste t “Student”, considerando diferenças significativas para $P < 0,05$. As análises foram realizadas no Software Minitab 16 (Minitab®16, 2010).

Para as análises de correlação foi utilizado o programa R (R Development Core Team, 2006).

Resultados e Discussão

A disponibilidade total de massa seca (MST) do capim marandu diferido para utilização no período experimental foi de 5.982 kg.ha^{-1} , enquanto que a disponibilidade de massa seca verde (MSV) foi de 1.616 kg.ha^{-1} . No entanto, as avaliações de consumo ocorreram no 3º período experimental, onde os bovinos já haviam consumido grande parte dessa forragem. Neste período, as disponibilidades de MST e MSV foram de 4.806 kg.ha^{-1} e $806,5 \text{ kg.ha}^{-1}$, respectivamente.

Em revisão de literatura, Silva *et al.* (2009) buscaram nos últimos onze anos (1998-2009) na literatura nacional, artigos que utilizaram suplementação ou não de animais no período da seca em pastejo de *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria brizantha*. Observaram que a disponibilidade total de matéria seca das *Brachiaris* diferidas para utilização na seca possuiu uma amplitude de 1.300 kg.ha^{-1} (Euclides *et al.*, 1998) a valores excessivos de $14.386 \text{ kg.ha}^{-1}$ (Acedo, 2004), com média de todos os experimentos de 6.431 kg.ha^{-1} . A disponibilidade de matéria seca verde variou de 407 kg.ha^{-1} (Euclides, 2001) a 3.868 kg.ha^{-1} (Paulino *et al.*, 2002), com média de 2.173 kg.ha^{-1} . Nota-se que a disponibilidade de forragem pode variar de acordo com situações de cada experimento, dependendo de fatores como níveis e tipos de suplementação, taxa

de lotação, qualidade nutricional da forragem disponível aos animais, características estruturais da pastagem, entre outros.

De acordo com o NRC (1996), pastagens com menos de 2.000 kg de matéria seca por hectare ensejam menor consumo de pasto e aumento do tempo de pastejo, portanto, os resultados de oferta de forragem no presente trabalho garantiram consumo sem restrição aos animais.

Pode-se inferir que a disponibilidade média de massa seca de forragem total não limitou o consumo dos animais no presente estudo, porém a disponibilidade de massa seca de forragem verde pode ter influenciado no consumo e consequentemente, no desempenho animal, principalmente nos períodos mais críticos da seca, pois os melhores ganhos de peso ocorreram no final do período experimental (Fig. 3), período de transição seca-águas, com disponibilidade de MFV em torno de 1.933,5 kg.ha⁻¹ e melhora na qualidade nutricional da forragem (menores teores de fibra e maiores teores de proteína bruta).

Santos *et al.* (2004), ao estudarem pastagem diferida, disponibilidade e desempenho animal durante a seca, concluíram que a utilização contínua da pastagem diferida não afetou a disponibilidade média de forragem total, e sim, menor disponibilidade e proporção de folhas verdes influenciando no peso dos animais.

Os teores médios de proteína bruta (% PB) obtidos pelas amostragens da pastagem pelo método de simulação de pastejo foram decrescendo nos meses de agosto e setembro, o qual era esperado, mas não com a intensidade verificada. O principal agravante para os menores valores encontrados nos períodos, além da redução da precipitação, foi a ocorrência de duas geadas, nos meses de julho e agosto.

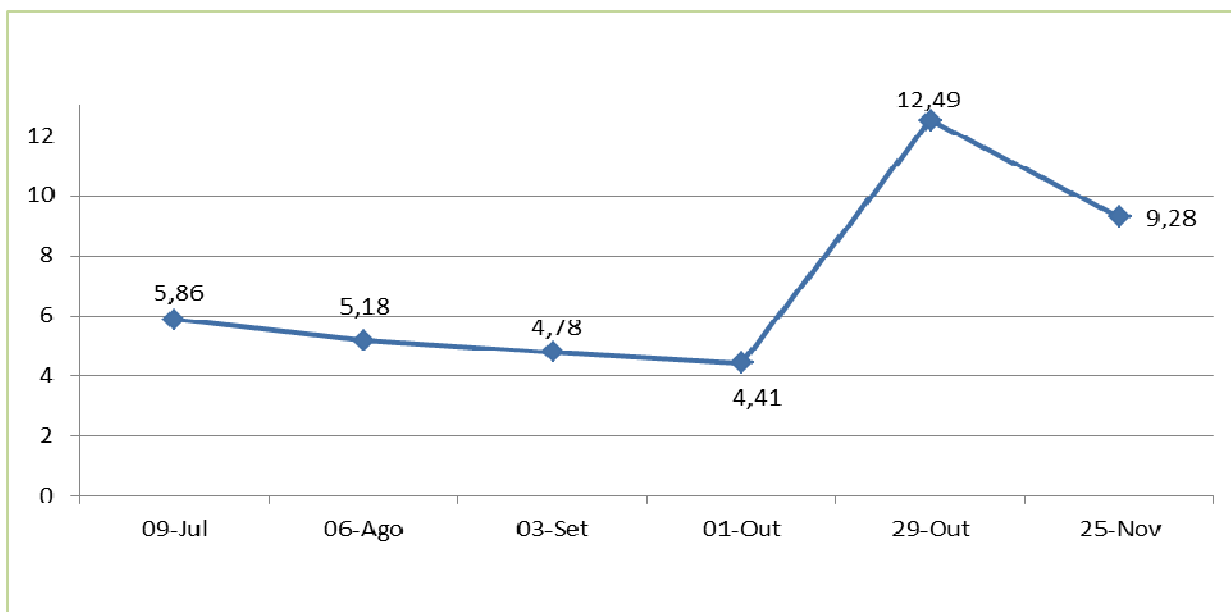


Figura 2. Teores de proteína bruta (% PB) das amostras de simulação de pastejo ao longo do período experimental.

Em meados do mês de outubro, os teores de PB aumentaram em decorrência do aumento da precipitação pluviométrica e assim, da rebrota, que de forma geral melhorou a composição química do pasto.

Estes valores estão de acordo com relatos de Silva *et al.* (2009), onde os teores de PB variaram de 2,33 a 8,97%, com média de 5,59% durante o período da seca. Os menores valores de PB, assim como, os elevados de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) no período da seca estão relacionados ao processo de senescência da planta, onde ocorre diminuição dos componentes digestíveis, como os carboidratos solúveis e as proteínas, e aumento da proporção de fibras (Euclides, 2000). À medida que aumentam os teores de FDN e FDA, ocorre redução do valor nutritivo da forragem, com menor concentração do conteúdo celular, limitando a energia disponível para os ruminantes (Mello *et al.*, 2006). Com isso, segundo Van Soest (1994), pastagens durante o período seco em sua maioria, apresentam menos de 7% de proteína bruta da matéria seca, havendo assim, deficiência de proteína degradável no rúmen para crescimento microbiano, causando diminuição na digestão da celulose e no consumo, acarretando baixo desempenho animal.

Na Fig. 3 encontram-se os valores médios de GMD e teores de FDN e FDA nos períodos de avaliação. Pode-se observar que houve alta correlação negativa ($P < 0,05$) do GMD com FDN (-0,75) e FDA (-0,76) nos períodos avaliados.

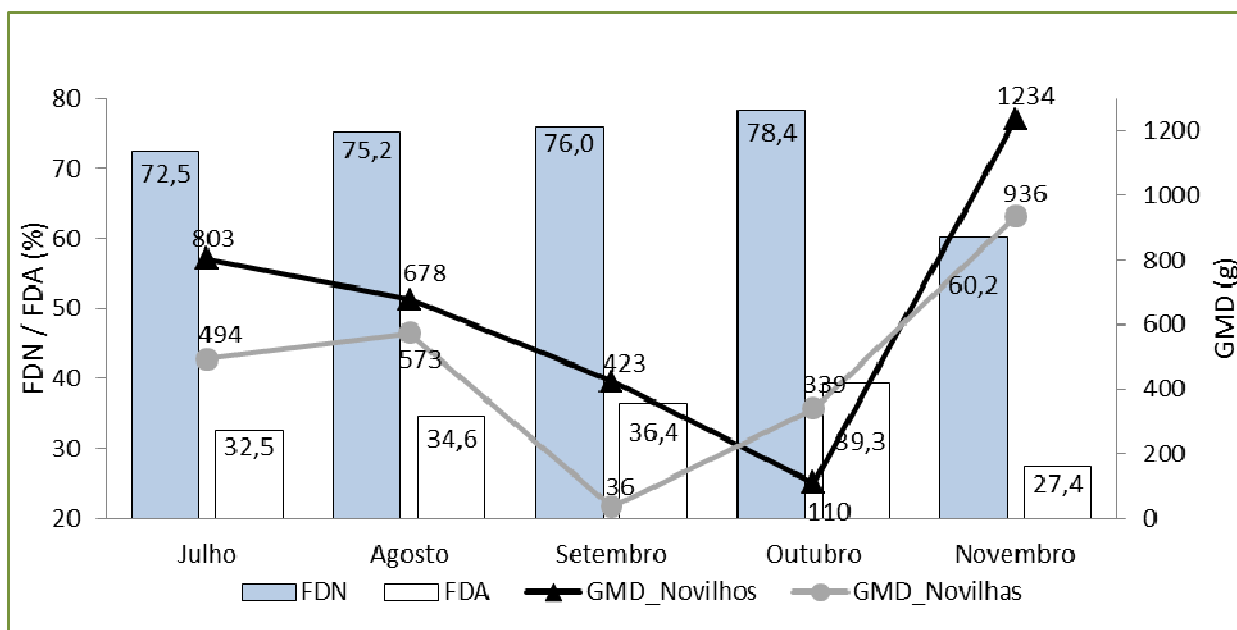


Figura 3. Valores médios de teores de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) em % e ganho médio diário (GMD) em gramas.

Os ganhos médios diários não atingiram o desempenho esperado em todos os períodos experimentais, e este fato foi mais evidenciado nas fêmeas em relação aos machos. O suplemento foi formulado para teor de proteína compatível com desempenho de 0,7 kg/dia, ao nível de suplementação de 0,8% do peso vivo. O reduzido desempenho animal pode ter ocorrido devido à reduzida qualidade nutricional da forragem disponível, com elevados teores de fibra (FDN e FDA), e menores teores de proteína bruta, e baixa disponibilidade de massa seca verde, que mesmo associada à suplementação, não propiciou ganho de peso esperado.

A suplementação exerce efeito positivo no consumo de nutrientes, independente do período em que é fornecida, pois aumenta a capacidade de digestão do pasto por esses animais (Fernandes *et al.*, 2010; Fernandes *et al.*, 2012). Entretanto, constatou-se que a suplementação foi dependente dos componentes qualiquantitativos da pastagem. Houve baixa correlação entre o GMD e consumo de suplemento (coeficiente de

correlação = 0,16), provavelmente em função da quantidade fornecida do suplemento, que foi fixa durante todo o período experimental, não sendo ajustado de acordo com a melhora nutricional do pasto. Além disso, o baixo ganho de peso no 3º período, pode estar relacionado ao manejo intenso dos animais para administrar o óxido de cromo durante vários dias consecutivos, o que pode ter causado maior estresse e consequentemente, queda no consumo e no desempenho.

O valor de $\delta^{13}\text{C}$ na forragem foi típico de plantas C_4 , que pode variar de -9 a -16‰, segundo Vogel (1993). O suplemento apresentou maior valor negativo de $\delta^{13}\text{C}$, pois todos os ingredientes utilizados na formulação foram originários de plantas do ciclo fotossintético C_3 , e segundo Vogel (1993), o valor de $\delta^{13}\text{C}$ pode variar de -22 a -34‰, dependendo da espécie e da parte da planta analisada (Tab. 2).

Tabela 2. Valores médios de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) e Carbono total (%) da forragem e do suplemento, e $\delta^{13}\text{C}$ (‰) das fezes dos animais com seus respectivos desvios-padrão.

	Nº amostras	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	C (%)
Forragem	05	-14,35 ± 0,14	42,94 ± 2,0
Suplemento	05	-27,43 ± 0,20	41,63 ± 0,6
Fezes (machos)	18	-18,45 ± 0,67	-
Fezes (fêmeas)	18	-19,07 ± 1,21	-

Os valores de $\delta^{13}\text{C}$ nas fezes indicaram a incorporação do carbono proveniente da suplementação. Estes valores foram utilizados para cálculo das proporções ingeridas pelos animais de pasto e suplemento, pela técnica dos isótopos do carbono. Como a quantidade de suplemento fornecida aos animais era conhecida, por diferença pode-se calcular o consumo de pasto.

Os resultados de consumo médio de massa seca total (CMST) e massa seca do pasto (CMSP) em $\text{kg} \cdot \text{dia}^{-1}$ e percentagem do peso vivo (% PV) obtidos pelas diferentes metodologias (Cr_2O_3 e $\delta^{13}\text{C}$), e o ganho médio diário (GMD) com seus respectivos desvios padrão são apresentados na Tab. 3.

Tabela 3. Consumo médio de massa seca total (CMST) e massa seca do pasto (CMSP) em kg.dia⁻¹ e % de peso vivo, estimado pelo óxido de cromo e isótopos de ¹³C, e ganho médio diário (GMD) em kg.dia⁻¹ de bovinos de corte, no 3º período experimental (média ± desvio padrão).

Variáveis	<u>Metodologia</u>					
	Cr ₂ O ₃	¹³ C	Média	Cr ₂ O ₃	¹³ C	Média
	MACHOS			FÊMEAS		
CMST (kg.dia ⁻¹)	7,42±1,52	7,54±1,38	7,48 ^a	4,70±1,01	4,83±1,05	4,76 ^b
CMST (% PV)	1,82±0,40	1,86±0,36	1,84 ^a	1,39±0,37	1,43±0,38	1,41 ^b
CMSP (kg.dia ⁻¹)	4,42±0,90	4,54±0,76	4,48 ^a	2,65±0,64	2,78±0,67	2,71 ^b
CMSP (% PV)	1,09±0,24	1,12±0,20	1,11 ^a	0,79±0,23	0,82±0,24	0,80 ^b
GMD (kg.dia ⁻¹)	0,423±0,22 ^a			0,036±0,026 ^b		

Médias seguidas de letras distintas na linha diferem significativamente pelo teste t (P <0,05)

As estimativas de consumo não diferiram entre metodologias pelo teste “t” (P >0,05). Houve diferença (P <0,05) de consumo de matéria seca entre machos e fêmeas, onde o maior consumo correspondeu aos machos. Como não houve diferença entre as metodologias, foi utilizada a média das estimativas de CMST para os machos e fêmeas.

O consumo de 1,84% do peso vivo nos machos foi inferior ao resultado encontrado por Silva *et al.* (2010a), de 2,00% PV em novilhos Nelore recebendo diferentes níveis de suplementação na fase de terminação na seca.

A Fig. 4 representa o consumo de matéria seca do pasto (CMSP) e ganho médio diário (GMD) dos animais ao longo do período experimental. Os resultados de consumo (Fig. 4) foram realizados por meio da técnica dos isótopos estáveis de carbono.

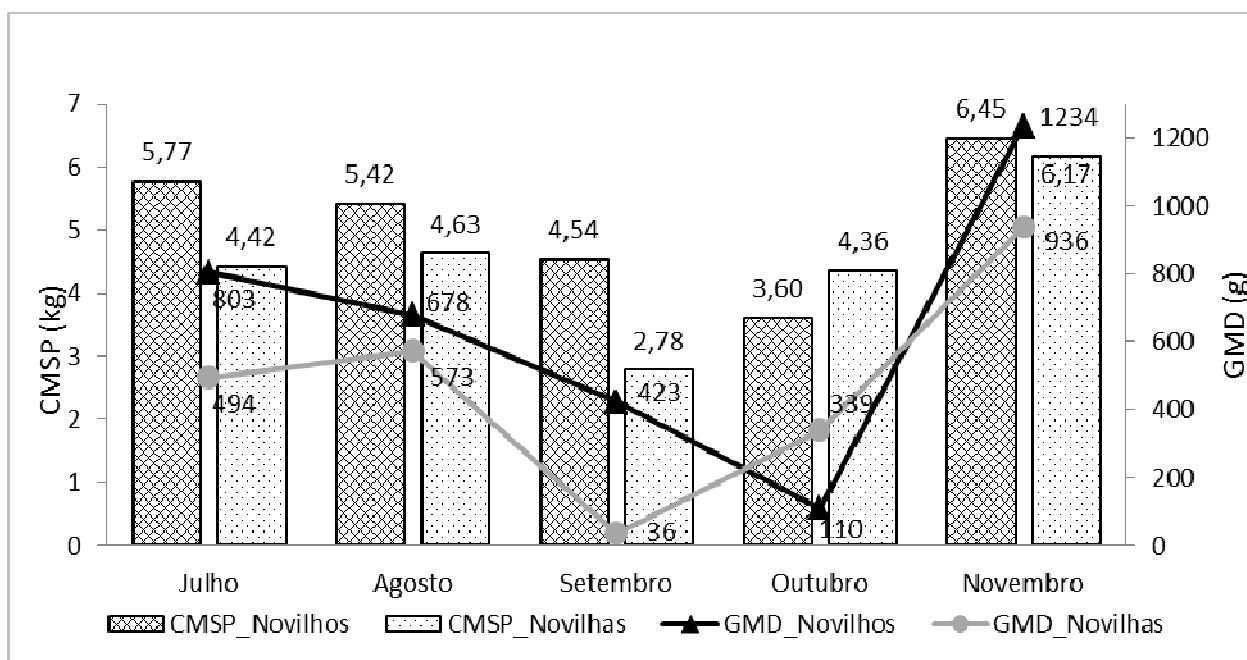


Figura 2. Consumo médio estimado de matéria seca do pasto (CMSP) em $\text{kg}\cdot\text{dia}^{-1}$ e ganho médio diário (GMD) em $\text{g}\cdot\text{dia}^{-1}$.

Houve alta correlação entre CMSP e GMD ($r = 0,80$), onde o CMSP foi menor, principalmente nos meses mais críticos da seca (setembro e outubro), como já discutido anteriormente. No mês de novembro, houve o maior GMD em ambas as categorias, e este fato pode ter ocorrido devido ao aumento no consumo de pasto pela rebrota, melhora na qualidade nutricional e disponibilidade de massa seca verde. Verificou-se ainda, que o desempenho animal durante os períodos esteve diretamente relacionado ao valor nutritivo da forragem e, a suplementação pode ter auxiliado na eficiência de utilização dessa forragem.

Os resultados presentes na Tab.3 mostram que as metodologias para estimativa do consumo não diferiram entre si pelo teste “t” ($P > 0,05$), comprovando a hipótese de que é possível estimar consumo de matéria seca de animais em condições de pastejo recebendo suplementação, a partir dos isótopos estáveis de carbono, desde que o sinal isotópico do pasto seja diferente do sinal isotópico do suplemento. Outros autores que também utilizaram a técnica dos isótopos estáveis partindo do mesmo princípio do balanço de massa e isotópico entre duas fontes participativas de um produto, obtiveram êxito em suas pesquisas. Lourenço *et al.* (1984) estudaram o grau de seletividade da dieta em vacas leiteiras, mantidas em pastagens de gramínea e leguminosa pelo $\delta^{13}\text{C}$

determinado nas fezes, leite e sangue. Martins (2010), trabalhando com ovelhas confinadas, estimaram com exatidão a proporção de silagem de milho e feno de alfafa ingeridos pelos animais.

Norman *et al.* (2009) estudaram a técnica dos isótopos na determinação das proporções de plantas de C_3 e C_4 ingeridas por ovelhas. Estes autores enfatizaram a importância do fracionamento isotópico, assim como da digestibilidade dos alimentos, devendo ser levados em consideração nos cálculos. Estes fatos já haviam sido questionados por Jones *et al.* (1979), que realizaram estudos com bovinos. Estes autores, assim como outros que utilizaram a técnica dos isótopos com este mesmo propósito, obtiveram êxito em suas pesquisas, confirmando a confiabilidade deste método.

No entanto, semelhante ao que ocorre com outros indicadores, a técnica dos isótopos possui limitações. Os isótopos permitem calcular as proporções dos alimentos ingeridos. No caso do presente estudo, a quantidade de suplemento fornecido aos animais era conhecida, então pôde-se calcular por diferença, a quantidade do pasto que foi consumida. Em casos onde a quantidade de suplemento não é conhecida, faz-se necessário a combinação dos isótopos com outro marcador, como por exemplo, os n -alcanos. Garcia *et al.* (2000), estudaram o uso combinado dos alcanos com os isótopos de carbono na determinação do consumo de pasto e suplemento em vacas leiteiras, e concluíram que essa combinação pôde ser utilizada com sucesso em seu estudo.

Considerando que, em condições de pastejo não se conhece o consumo verdadeiro, os valores estimados pelos isótopos só podem ser comparados aos obtidos a partir de outros métodos, que também possuem “vícios”. No entanto, os resultados de consumo estimados pela metodologia do óxido de cromo associado ao FDNi foram satisfatórios no presente estudo.

O óxido de cromo, apesar de suas conhecidas deficiências como marcador, tem se consolidado como um dos indicadores mais utilizados na estimativa do consumo de ruminantes em pastejo. Vários problemas têm sido relatados na literatura em relação ao seu uso, como por exemplo, incompleta mixagem com a digesta ruminal (Coelho da Silva *et al.*, 1968), passagem mais rápida pelo rúmen que o material fibroso (Van Soest, 1994), grandes variações de seu fluxo fecal de acordo com a quantidade de dosagens diárias (Owens e Hanson, 1992), entre outros.

No presente estudo, foi utilizada única dosagem diária de cromo nos animais, a fim de se reduzir o estresse causado, que pode alterar o comportamento de pastejo e, conseqüentemente o consumo (Burns *et al.*, 1994), pois cada vez que fornece o indicador aos animais, estes devem ser contidos, e este manejo causa estresse. Detmann (1999) ao comparar os valores de excreção fecal obtidos por diferentes metodologias, concluiu que, a aplicação de óxido de cromo uma vez ao dia, às 13 horas, forneceu o melhor valor de excreção fecal com vistas à determinação do consumo de animais sob pastejo. No entanto, alguns autores questionam a utilização de dose única diária, devido à sua recuperação fecal incompleta (Soares *et al.*, 2004) e sua irregularidade na excreção ao longo do dia (Morenz *et al.*, 2006). Por estes motivos, a utilização dos isótopos estáveis se apresenta como alternativa viável na estimativa de consumo dos animais.

Uma vantagem da técnica dos isótopos é o fato de que o estágio de maturidade da planta analisada e assim, seu valor nutritivo, não interfere na acurácia dos resultados, pois o valor do $\delta^{13}\text{C}$ na planta de ciclo fotossintético C_4 não sofre alterações devido à condições ambientais adversas (Smith, 1972), sendo seu sinal isotópico muito semelhante a partir das raízes até mesmos em suas sementes. Além disso, quando se utiliza esta metodologia, a interferência no comportamento dos animais é mínima, pois os isótopos são marcadores existentes naturalmente nas plantas, seguindo o princípio que “o animal é o que ele come” (DeNiro & Epstein, 1978). Não há necessidade de contenção, evitando estresse e conseqüentemente alteração no consumo, além de que as coletas das fezes para análises isotópicas podem ser realizadas nos piquetes.

Conclusões

A estimativa do consumo de pasto por intermédio dos isótopos de carbono é viável para animais suplementados em condições de pastejo, apresentando estimativas semelhantes ao método do óxido de cromo com aplicação única diária, mostrando-se vantagem ao seu uso por menor interferência ao comportamento dos animais.

A metodologia dos isótopos na estimativa do consumo de pasto, pode ser utilizada em substituição à metodologias já consagradas, desde que as fontes

alimentares possuam sinais isotópicos distintos e a quantidade de suplemento oferecida aos animais seja conhecida.

Referências Bibliográficas

ACEDO, T.S. *Suplementos múltiplos para bovinos em terminação, durante a época seca, e em recria, nos períodos de transição seca-águas e águas*. 2004. 58f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2004.

ANDRADE, F.M.E. *Produção de forragem e valor alimentício do capim-marandu submetido a regimes de lotação contínua por bovinos de corte*. 2003. 141 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Ciência Animal e Pastagens). Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz. ESALQ/USP, Piracicaba, SP, 2003.

ASTIGARRAGA, L. Técnicas para la medición del consumo de rumiantes en pastoreo. In: SIMPÓSIO SOBRE AVALIAÇÃO DE PASTAGENS COM ANIMAIS, 1997, Maringá. *Anais...* Maringá: UEM, 1997. p.1-23.

BERCHIELLI, T.T.; ANDRADE, P.; FURLAN, C.L. Avaliação de indicadores internos em ensaios de digestibilidade. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.29, p. 830- 833, 2000.

BURNS, J.C.; POND, K.R.; FISHER, D.S. 1994. Measurement of forage intake. In: FAHEY JR., G.C. (Ed.) *Forage quality, evaluation, and utilization*. Winsconsin: American Society of Agronomy. p.494-532.

CASALI, A. O.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S. C. et al. Influência do tempo de incubação e do tamanho de partículas sobre os teores de compostos indigestíveis em alimentos e fezes bovinas obtidos por procedimento *in situ*. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 37, n.2, p. 335-342, 2008.

COATES, D.B.; SCHACHENMANNAND, P.; JONES, R.J. Reliability of extrusa samples collected from steers fistulated at the oesophagus to estimate the diet of

resident animals in grazing experiments. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, v.27, p. 739-745, 1987.

COELHO DA SILVA, J.F.; CAMPOS, J.; CONRAD, J.H. Uso do óxido crômico na determinação da digestibilidade. *Experientiae*, v. 8, p. 1-23, 1968.

DETMANN, E. *Cromo e constituintes da forragem como indicadores, consumo e parâmetros ruminais em novilhos mestiços, suplementados, durante o período das águas*. Viçosa, MG: UFV, 1999, 115p. Tese (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, MG, 1999.

DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; ZERVOUDAKIS, J.T. et al. Cromo e Indicadores Internos na Determinação do Consumo de Novilhos Mestiços, Suplementados, a Pasto. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.30, n.5, p.1600-1609, 2001.

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

EUCLIDES, V.P.B. *Alternativas para intensificação da produção de carne bovina em pastagem*. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2000. 65p.

EUCLIDES, V.P.B. Produção intensiva de carne bovina a pasto. In: SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE, 2., 2001, Viçosa, MG. *Anais...* Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, p. 55-82, 2001.

EUCLIDES, V.P.B.; EUCLIDES FILHO, K.; ARRUDA, Z.J. et al. Desempenho de novilhos em pastagens de *Brachiaria decumbens* submetidos a diferentes regimes alimentares. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.27, p.246-254, 1998.

FERNANDES, L. O.; REIS, R.A.; PAES, J.M.V. Efeito da suplementação no desempenho de bovinos de corte em pastagem *brachiaria brizanta* cv. Marandu. *Ciência Agrotecnologia*, v.34, n.1, p. 240-248, 2010.

FERNANDES, J.F.; PAULINO, M.F.; DETMANN, E. et al. Avaliação nutricional, durante a amamentação, de tourinhos em pastejo recebendo suplementação proteica da amamentação à terminação. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.41, n.2, p. 374-383, 2012.

GARCIA, S.C.; HOLMES, C.W.; HODGSON, J. et al. The combination of 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.

JONES R.; LUDLOW M.; TROUGHTON J. Estimation of the proportion of C_3 and C_4 plant species in diet of animals from the ratio of natural ^{12}C and ^{13}C isotopes in the faeces. *Journal of Agricultural Science*, v.18, p.91-100; v.92, p. 91-100, 1979.

JONES, R.J.; LUDLOW, M.M.; TROUGHTON, J.H. et al. Changes in the natural carbon isotope ratios of the hair from steers fed diets of C_4 , C_3 and C_4 species in sequence. *Search* (Sydney), v. 12, p. 85–87, 1981.

LOURENÇO, A.J.; MATSUI, E.; DELISTOIANOV, J. Avaliação de forragem selecionada por bovinos em pastagem consorciada com diferentes lotações utilizando-se dados de ^{13}C . *Boletim de Indústria Animal*, v.38, p.145-153, 1981.

LOURENÇO, A.J.; MATSUI, E.; ARCARO JÚNIOR, I. Variações de valores de $\delta^{13}\text{C}$ nas fezes, leite e sangue de vacas em lactação mantidas em pastagens exclusivas de gramíneas ou consorciadas. *Boletim da Indústria Animal*, v.41 (n.único), p.183-192, 1984.

MARTINS, M.B. *Turnover de carbono e a preferência alimentar de ovelhas por isótopos estáveis*. 2010. 68p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, 2010.

MARTINS, M.B.; DUCATTI, C.; MARTINS, C.L. et al. Stable isotopes for

determining carbon turnover in sheep feces and blood. *Livestock Science*, v.149, p.137–142, 2012.

MELLO, A.C.L.; LIRA, M.A.; DUBEUX JR., J.C.B. et al. Degradação ruminal da matéria seca de clones de capim-elefante em função da relação folha/colmo. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.35, p.1316-1322, 2006.

MERCHEN, N.R. 1988. Digestion, absorption and excretion in ruminants. In: CHURCH, D.C. (Ed.) *The ruminant animal: digestive physiology and nutrition*. New Jersey: Prentice Hall. p.172-201.

Minitab® 16 Statistical Software, 2010.

MINSON, D.J. 1990. Forage in ruminant nutrition. San Diego: Academic Press. 483p.

MORENZ, M.J.F.; DA SILVA, J.F.C.; AROEIRA, L.J.M. et al. Óxido de cromo e alcanos na estimativa do consumo de forragem de vacas em lactação em condições de pastejo. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.35, n.4, p.1535-1542, 2006.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). *Nutrient requirements of beef cattle*. 7 ed. Washington D.C., 1996. 242p.

NORMAN, H.C.; WILMOT, M.G.; THOMAS, D.T. et al. Stable carbon isotopes accurately predict diet selection by sheep fed mixtures of C₃ annual pastures and saltbush or C₄ perennial grasses. *Livestock Science*, v.121, p.162-172, 2009.

OWENS, F.N.; HANSON, C.F. External and internal markers for appraising site and extent of digestion in ruminants. *Journal Dairy Science*, v. 75, p. 2605-2617, 1992.

PAULINO, M.F.; ZERVOUDAKIS, J.T.; DE MORAES, E.H.B.K. et al. Bovinocultura de ciclo curto em pastagens. In: Simpósio de Produção de Gado de Corte, Viçosa, MG. *Anais...* Viçosa, MG: UFV, p.153-196, 2002.

R DEVELOPMENT CORE TEAM (2006). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>

SANTOS, E.D.G.; PAULINO, M.F.; QUEIROZ, D.S. et al. Avaliação de pastagem diferida de *Brachiaria decumbens* Stapf: 1. Características químico bromatológicas da forragem durante a seca. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.33, p.203-213, 2004.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. *Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos)*. 3.ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 235p; 2002.

SILVA, F.F.; FIRMINO DE SÁ, J.; SCHIO, A.R. et al. Suplementação a pasto: disponibilidade e qualidade x níveis de suplementação x desempenho. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.38, p.371-389, 2009 (supl. especial).

SILVA, R.R.; PRADO, I.N.; CARVALHO, G.G.P. et al. Novilhos nelore suplementados em pastagens: consumo, desempenho e digestibilidade. *Archivos de Zootecnia*, v.228, p. 549-560. 2010a.

SILVA, J. J.; SALIBA, E. O. S.; BORGES, I. et al. Indicadores para estimativa de consumo total por novilhas holandês x zebu mantidas em confinamento. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v.11, n.3, p.838-848, 2010b.

SMITH, B. N. Natural abundance of the stable isotopes of carbon in biological systems. *BioScience*, v.22, p.226-231, 1972.

Software de formulação de ração (Super Crac Bovinos). Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, versão 4.7, 2010.

SOARES, J.P.G.; BERCHIELLI, T.T.; AROEIRA, L.J.M. et al. Estimativas de consumo de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum), fornecido picado para

vacas lactantes utilizando a técnica do óxido de cromo. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.33, n.3, p.811-820, 2004.

SPONHEIMER, M.; ROBINSON, T.; AYLIFFE, L. et al. An experimental study of carbon-isotope fractionation between diet, hair, and feces of mammalian herbivores. *Canadian Journal of Zoology*, v. 81, p. 871–876, 2003.

VAN SOEST, P.J. 1994. *Nutritional ecology of the ruminant*. 2 ed. Ithaca: Cornell University Press. 476p.

VOGEL, J.C. Variability of carbon isotope fractionation during photosynthesis. In: EHRLINGER, J.R.; HALL, A.E.; FARQUHAR, G.D. (Eds). *Stable isotopes and plant carbon*: Water Relations. San Diego: Academic Press, 1993. p.29-46, 1993.

WILLIAMS, C.H.; DAVID, D.J.; IISMA, O. The determination of chromic oxide in faeces samples by atomic absorption spectrophotometry. *Journal Agricultural Science*, v.59, p.381-385, 1962.

CAPÍTULO III

Alteração isotópica de carbono em tecidos de bovinos de corte criados em pasto suplementados no período da seca: Implicações na autenticação isotópica da carne bovina

Resumo – A adequação de novas técnicas para complementar e oferecer suporte aos programas de rastreabilidade da carne bovina brasileira se torna de importância frente ao mercado consumidor. Objetivou estudar mudanças na composição isotópica de carbono em diferentes músculos, sangue (total e plasma) e fezes de bovinos de corte criados em pasto (planta C₄), recebendo suplementação a base de plantas C₃ no período da seca, além de avaliar o potencial da técnica dos isótopos estáveis de carbono na detecção de fontes alimentares distintas em tecidos de bovinos durante a fase de terminação. Foram utilizados 36 bovinos de corte da raça guzerá de 20 meses de idade, distribuídos aleatoriamente em 12 piquetes (3 animais por piquete). Foram realizadas colheitas de fezes, sangue total e plasma a cada 28 dias durante a fase experimental (140 dias no total), e amostras de músculos no último dia do experimento. As amostras de fezes refletiram o sinal isotópico da suplementação rapidamente, quando comparadas às amostras de sangue total e plasma. Os valores médios do $\delta^{13}\text{C}$ da suplementação nos músculos foram menores ($P < 0,05$) quando comparados aos valores no sangue total e plasma. A técnica dos isótopos estáveis do carbono se mostra útil para detectar mudanças de dietas em curto e longo prazo, dependendo do tecido ou produto avaliados. Dietas suplementares são detectáveis, mesmo que contribuindo apenas com uma porção do carbono total da dieta.

Palavras-chave: *Brachiaria brizantha*, planta C₃, planta C₄, suplemento.

Carbon isotopic changes in tissues of pasture-raised beef cattle supplemented in dry season: Implications for isotopic authentication of meat

Abstract – The adaptation of new techniques to complement and offer support to the programs of Brazilian beef traceability becomes important. This work aimed to assess changes in stable isotope compositions carbon in different muscles, blood (whole and plasma) and faeces of cattle raised on pasture (C_4 plant) and supplemented with C_3 plant feed during the finishing period in dry. Besides, this study aimed at evaluating the potential of stable carbon isotopes technique to detect food sources, introduced during finishing, in different tissues of cattle. Thirty-six Guzerá breed beef cattle (20 months old) were randomly divided into 12 paddocks (3 animals per paddock). Samples were collected from whole blood and plasma as well as feces every 28 days during the experimental phase (140 days total), while samples of muscles were sampled on the last day of the experiment. Feces reflected the supplement's isotopic composition more quickly than did whole blood and plasma. Muscles incorporated less ($P < 0.05$) supplemental carbon compared to whole blood and plasma. The carbon isotope technique provides a tool to detect diet changes, in the short and long term, depending on the tissue or product evaluated. Supplemental diets are detectable even if they only contribute a portion of the total dietary carbon.

Key words: *Brachiaria brizantha*, C_3 plant, C_4 plant, supplement feed.

Introdução

Atualmente há crescente interesse dos consumidores pela segurança alimentar, bem estar animal, e qualidade da produção de alimentos (Opara & Mazaud, 2001), assim como pela imagem “verde” de produtos de origem animal (Prache *et al.*, 2005). Riscos à saúde como, por exemplo, a encefalopatia espongiforme bovina (EEB), mostraram que sistemas de rastreabilidade são necessários para atender e aumentar a confiança pelos consumidores.

A rastreabilidade existe para garantir ao consumidor produto seguro e saudável, por meio do controle de todas as fases de produção, industrialização, transporte, distribuição e comercialização (Lehr, 2013), possibilitando perfeita correlação entre o produto final e a matéria-prima que lhe deu origem. São de fundamental importância informações a respeito do histórico da alimentação ou do sistema de produção em que o animal foi criado.

Os isótopos estáveis dos elementos químicos leves (carbono, nitrogênio, entre outros) podem auxiliar no processo de rastreabilidade para autenticação de produtos de origem animal, por estarem presentes naturalmente nos tecidos dos animais, refletindo a composição isotópica da dieta (DeNiro & Epstein, 1978). Esta técnica demonstra quais elementos foram efetivamente incorporados pelos tecidos e quais suas possíveis fontes alimentares (Monahan *et al.*, 2012; Vinci *et al.*, 2013).

O principal elemento considerado na análise alimentar é o carbono, pois o contraste existente na razão isotópica de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ das plantas C_3 e C_4 devido ao distinto fracionamento isotópico durante a fixação do carbono, possibilita estudos na área de nutrição animal, utilizando como marcador o carbono e sua concentração natural existente nos alimentos (Ducatti, 2007).

A técnica dos isótopos estáveis vem sendo utilizada em processos de autenticação de produtos alimentares como queijo (Manca *et al.*, 2001), leite (Renou *et al.*, 2004), certificação de origem geográfica da carne bovina (Bahar *et al.*, 2008), entre outros. Para o desenvolvimento desta técnica em processos de autenticação de carne bovina, mais informações a respeito do tempo de incorporação do carbono proveniente da nova dieta em diferentes tecidos dos animais são necessárias, especialmente em

sistemas de produção que os animais recebem suplementação durante o período de terminação (Bahar *et al.*, 2005; De Smet *et al.*, 2004).

Objetivou investigar mudanças na composição isotópica de carbono em diferentes cortes cárneos, sangue total, plasma e fezes de bovinos de corte criados em pasto (planta C₄) durante o período de terminação recebendo suplementação a base de plantas C₃ no período da seca, além de avaliar o potencial da técnica dos isótopos estáveis de carbono na detecção de diferentes fontes alimentares em tecidos de bovinos.

Material e Métodos

O experimento foi realizado na APTA – Pólo Regional do Extremo Oeste, localizada no município de Andradina, oeste do Estado de São Paulo, em parceria com a Universidade Estadual Paulista (UNESP), da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, conforme normas do comitê de ética (protocolo nº 35/2011 - CEUA) desta Universidade.

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, com 36 bovinos de corte da raça Guzerá com 20 meses de idade, distribuídos aleatoriamente em 12 piquetes (3 animais por piquete). Os piquetes foram divididos com cerca eletrificada e providos de comedouros de madeira com espaço de 60 cm linear por cabeça e bebedouros tipo australiano de 1000 litros. Os animais foram vacinados contra febre aftosa e, realizado o controle de endoparasitas ao início do experimento e posteriormente conforme necessidade.

Foi realizado diferimento dos piquetes experimentais com capim-marandu (*Urochloa brizantha* Stapf cv Marandu sin.: *Brachiaria brizantha*) no mês de março de 2011 com utilização no mês de julho, quando se iniciou o experimento.

Antes do início do período experimental, os bovinos estavam sob pastejo, recebendo apenas fontes alimentares de planta de ciclo fotossintético C₄. Ao iniciar o período experimental, os animais foram transferidos para os piquetes diferidos e começaram a receber a suplementação (C₃) até o abate.

O suplemento fornecido aos animais foi na quantia de 0,8% do peso vivo, com teor de proteína compatível com desempenho esperado de 0,7 kg/dia. A dieta foi formulada pelo programa Super Crac para bovinos de corte 4.7 (2010).

Para o preparo do suplemento (Tab. 1) foi utilizado misturador vertical de 500 kg. O suplemento foi pesado, identificado por piquete e ajustado a cada 28 dias após pesagem dos animais.

Os animais passaram por período de adaptação de duas semanas recebendo inicialmente 1,5 kg de suplemento/cabeça/dia, aumentando-se gradativamente até atingir 0,8% PV. Os suplementos foram fornecidos diariamente, às 10 horas da manhã, procurando não alterar o comportamento e os ciclos de pastejo dos animais.

O valor isotópico do suplemento foi calculado pelas porcentagens de inclusão de cada ingrediente na formulação, seus valores isotópicos e de carbono total (%) presente em cada ingrediente (Tab. 1).

Tabela 1. Composição do suplemento, em percentagem de inclusão dos ingredientes (II) na matéria natural (MN), composição química em percentagem da matéria seca (MS) e valor isotópico em ‰ ($\delta^{13}\text{C}$).

Ingredientes	II	PB	FDN	FDA	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	C total (%)
	%MN	% MS				
Casca de soja	46,70	14,00	64,50	46,50	-27,22	39,99
Polpa cítrica	31,00	5,93	25,90	18,50	-28,18	43,03
Farelo de soja	18,00	51,40	24,60	10,60	-26,18	45,67
Sal mineral	2,10	-	-	-	-	-
Uréia	2,00	281,00	-	-	-	-
Sulfato de amônio	0,20	-	-	-	-	-
Suplemento	100	23,26	42,57	29,35	-27,43	41,63

PB: proteína bruta. FDN: fibra em detergente neutro. FDA: fibra em detergente ácido

A fase experimental foi dividida em cinco períodos de 28 dias (julho a novembro), sendo realizadas coletas de fezes e sangue dos animais e da pastagem nestes períodos. Foram coletadas amostras dos suplementos e da forragem de cada piquete experimental. As amostras foram secadas em estufa a 50°C por 48 horas, trituradas (peneira de 1mm), homogeneizadas, e então uma subamostra de forragem e de suplemento foi triturada em moinho criogênico para análises isotópicas.

Para realização das colheitas de fezes e sangue, os animais foram contidos no curral de manejo. Foram coletados 4 ml de sangue pela veia jugular dos animais por

meio de vacutainers com EDTA. Posteriormente, 1 ml de sangue total foi acondicionado em *eppendorfs* e congelado, e o restante foi imediatamente centrifugado para separação do plasma. As colheitas de fezes foram realizadas diretamente na ampola retal, acondicionadas em sacos plásticos e congeladas.

Os bovinos foram abatidos em frigorífico comercial, obedecendo ao fluxo normal. Foram coletadas amostras dos seguintes cortes cárneos comerciais dos músculos: *trapezius cervicis* (Acém), *longissimus dorsi* (Contra-filé) e *semitendinosus* (Lagarto), que correspondem respectivamente à região dianteira, mediana e traseira.

As amostras foram congeladas a -18°C até posterior mensuração isotópica no Centro de Isótopos Estáveis do Instituto de Biociências da UNESP, Campus de Botucatu.

Posteriormente, as amostras foram secadas em estufa à temperatura de 50°C por 48 horas. As amostras dos músculos foram cortadas em pequenas peças, secadas e desengorduradas com éter etílico em aparelho de Soxhlet, à temperatura de 65°C, durante 4 horas. Posteriormente, foram secadas em estufa de ventilação forçada a 50°C durante meia hora, para que houvesse evaporação do éter. Esse procedimento foi realizado com a finalidade de eliminar o efeito do lipídeo no valor isotópico dos músculos, pois o valor isotópico no lipídeo é mais negativo que no músculo livre de lipídeo, devido a discriminação que ocorre com o ^{13}C durante a oxidação do piruvato em acetil CoA no processo de síntese lipídica (Melzer & Schmidt, 1987).

Após o descongelamento das amostras de sangue e plasma, estas foram liofilizadas em aparelho Micromodulyo-115 (Edwardsvacuun®). As amostras foram congeladas em freezer a -80°C por 15 minutos e posteriormente acomodadas nas bandejas do equipamento. Após acomodação, foi efetuado o início da descompressão por 15 minutos. A duração do processo de liofilização foi de 24 horas e as amostras foram secadas a vácuo a -55°C e pressão em torno 30 μHg .

Todas as amostras foram moídas em moinho criogênico Spex Sample Prep, modelo Geno/Grinder 2010, à -196°C. Foram utilizadas aproximadamente 2,0 g de amostras depositadas em frasco de polycarbonato juntamente com duas esferas de aço inoxidável (modelo 440, sem óleo/graxa), o qual foi devidamente fechado e imerso em nitrogênio líquido durante três minutos para congelamento das amostras, e posterior moagem.

Após moagem das amostras, foram pesadas alíquotas entre 50 a 70 µg e acondicionadas em cápsulas de estanho para análise isotópica.

Para determinação da composição isotópica, foi utilizado o Espectrômetro de Massas modelo *Delta V. Advantage* acoplado ao analisador elementar modelo *FLASH 2000 EA* do Centro de Isótopos Estáveis do Instituto de Biociências da UNESP, Campus de Botucatu. Os resultados foram expressos em notação δ , em relação ao padrão *Peedee Belemnite* (PDB) para $\delta^{13}\text{C}$, com erro de análise da ordem de 0,2‰ e calculado pela equação 1:

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

onde:

δ = enriquecimento relativo da amostra em relação ao padrão. Adimensional.

R = razão isotópica da amostra e do padrão. Adimensional.

Para os cálculos da contribuição do pasto e suplemento na constituição dos tecidos dos animais pela técnica dos isótopos, foi empregado o modelo de diluição isotópica simples (Gearing, 1991), baseado na equação do balanço de massa e isotópico entre duas fontes participativas do produto, expresso pela equação 2:

$$\delta a(A) + \delta b(B) = \delta p \quad (2)$$

Na qual, a simbologia significa:

A = proporção do alimento “A” na dieta (alimentação C_3). Adimensional.

B = proporção do alimento “B” na dieta (alimentação C_4). Adimensional.

δa = composição isotópica das amostras com alimento exclusivo “A”. Adimensional.

δb = composição isotópica das amostras com alimento exclusivo “B”. Adimensional.

δp = composição isotópica das amostras, proveniente da dieta A e dieta B (produto). Adimensional.

O fracionamento isotópico foi expresso pela diferença entre o $\delta^{13}\text{C}$ do tecido e da dieta, conforme equação 3:

$$\Delta = \delta^{13}\text{C}_{\text{tecido}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{dieta}} \quad (3)$$

Foi avaliado o comportamento da incorporação do carbono nas fezes, sangue total e plasma em função do tempo, pelo ajuste exponencial de primeira ordem.

Os dados de $\delta^{13}\text{C}$ de todos os tecidos coletados em cada período foram avaliados pela análise de variância e complementados pelo teste de Tukey. O software utilizado para as análises foi o Minitab 16 (Minitab®16, 2010).

Resultados e Discussão

O valor de $\delta^{13}\text{C}$ encontrado na forragem é típico de plantas C_4 , que pode variar de -9 a -16‰, segundo Vogel (1993). O suplemento apresentou maior valor negativo de $\delta^{13}\text{C}$, pois todos os ingredientes utilizados na formulação foram originários de plantas do ciclo fotossintético C_3 , e segundo Vogel (1993), o valor de $\delta^{13}\text{C}$ pode variar de -22 a -34‰, dependendo da espécie e da parte da planta analisada (Tab. 2).

Tabela 2. Valores médios de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) e carbono total (%) da forragem (capim-marandu) e do suplemento fornecido aos animais (média $\pm$ desvio padrão).

	Nº amostras	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	C (%)
Forragem	05	-14,35 $\pm$ 0,14	42,94 $\pm$ 2,0
Suplemento	05	-27,43 $\pm$ 0,20	41,63 $\pm$ 0,6

A incorporação do $\delta^{13}\text{C}$ nas fezes, sangue total e plasma proveniente da suplementação fornecida aos animais, foi refletida ao longo do período experimental (Fig. 1). O dia zero representou o início do período experimental, ou seja, o período em que os animais começaram receber a suplementação. As fezes, sangue total e plasma no dia zero, refletiam o valor isotópico apenas da forragem, com valores de -14,85‰, -12,62‰ e -13,53‰ e com fracionamento isotópico tecido-dieta de -0,50‰, 1,73‰ e 0,82‰, respectivamente.

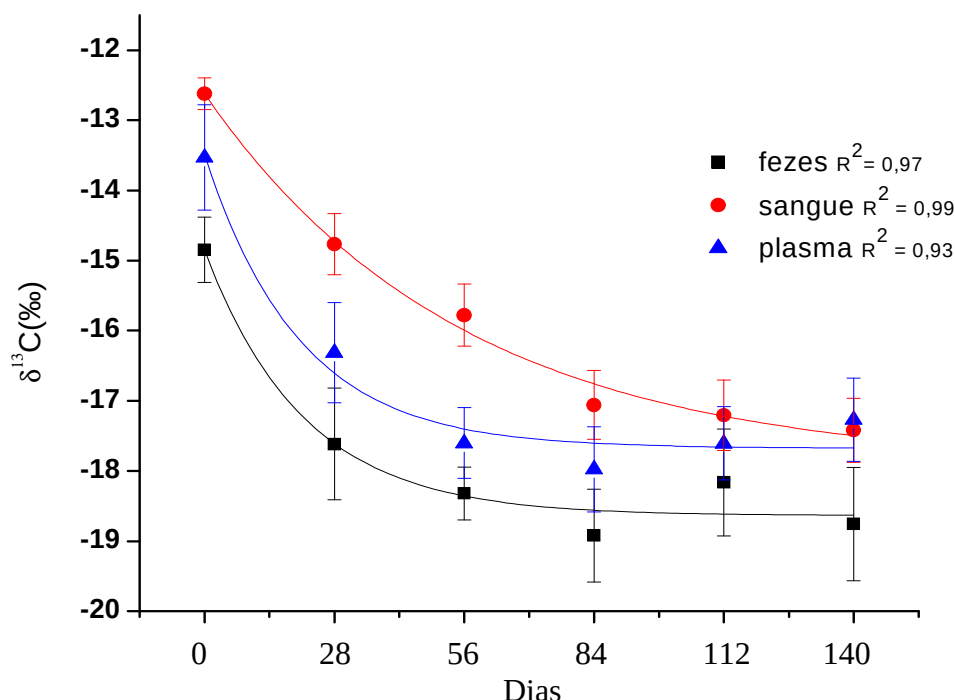


Figura 1. Incorporação de carbono proveniente da suplementação (C_3) nas fezes, sangue total e plasma em bovinos de corte criados em pasto (C_4), ao longo do período experimental (dia 0 até 140 dias).

O fracionamento isotópico negativo nas fezes pode estar relacionado à contaminação destas por materiais endógenos do intestino (descamação da parede interna do trato gastrointestinal). Jones *et al.* (1979), trabalhando com bovinos e ovinos, encontraram valores de $\delta^{13}C$ das fezes dos animais mais negativos em relação aos alimentos, correspondentes em 0,4 a 2,0 unidades. Tal fato foi explicado por possível descamação de células do intestino, com valores de $\delta^{13}C$ inferiores.

O fracionamento isotópico encontrado para sangue total e plasma pode ser resultante dos processos decorrentes durante a digestão, assimilação e excreção dos nutrientes (DeNiro & Epstein, 1978).

Quando os animais passaram a consumir o suplemento, os valores isotópicos das amostras analisadas começaram a ficar empobrecidos em $\delta^{13}C$, indicando a incorporação do carbono da suplementação C_3 . Essa incorporação foi maior ($P < 0,05$) nas fezes em relação ao sangue total e plasma em todos os períodos (Tab. 3). Segundo

Martins *et al.* (2012), as fezes são os melhores indicadores da dieta recentemente ingerida, por apresentar rápido *turnover* isotópico, pois o tempo que as fezes levam para refletir o sinal isotópico da nova dieta, está associado ao tempo que o alimento demora para se mover pelo trato gastrointestinal (Sudekum et al., 1995). No entanto, quando se considerou amostras de sangue total e plasma, a composição isotópica dependeu dos componentes alimentares que foram assimilados e não apenas ingeridos e, da diluição do pool de carbono existente no sangue pelo carbono dietético recém-assimilado. Portanto, quando comparados às fezes, sangue total e plasma demoraram mais tempo para refletirem a nova alimentação.

Tabela 3. Valores isotópicos médios em $\delta^{13}\text{C}$ (‰), do sangue total, plasma e fezes em cada período avaliado (média $\pm$ desvio padrão).

Dias	Amostras		
	Sangue	Plasma	Fezes
0	-12,62 $\pm$ 0,22 ^a	-13,53 $\pm$ 0,75 ^b	-14,85 $\pm$ 0,46 ^c
28	-14,77 $\pm$ 0,43 ^a	-16,31 $\pm$ 0,71 ^b	-17,62 $\pm$ 0,79 ^c
56	-15,78 $\pm$ 0,44 ^a	-17,60 $\pm$ 0,50 ^b	-18,32 $\pm$ 0,37 ^c
84	-17,06 $\pm$ 0,48 ^a	-17,98 $\pm$ 0,60 ^b	-18,92 $\pm$ 0,66 ^c
112	-17,21 $\pm$ 0,50 ^a	-17,60 $\pm$ 0,52 ^b	-18,16 $\pm$ 0,76 ^c
140	-17,42 $\pm$ 0,45 ^a	-17,27 $\pm$ 0,50 ^a	-18,76 $\pm$ 0,80 ^b

Médias seguidas de letras distintas na linha diferem significativamente pelo teste Tukey (P < 0,05)

Em relação aos valores isotópicos no sangue total e plasma, notou-se que a incorporação de carbono foi maior (P < 0,05) no plasma (Tab. 3). Apenas no último período, o valor isotópico no plasma se comportou de maneira contrária à esperada. Examinando as amostras desse último período, pode-se inferir que houve hemólise do sangue durante o processo de centrifugação para separação do plasma, alterando seu sinal isotópico. No entanto, pode-se considerar que no plasma o tempo de incorporação de carbono vindo da nova alimentação foi menor. Este fato pode ter ocorrido devido à composição estrutural do sangue. Este é um tecido que consiste de células de diferentes tipos, constituído por glóbulos vermelhos, glóbulos brancos, plaquetas e plasma. Dentre eles, os glóbulos vermelhos, também conhecidos por hemácias, são as unidades morfológicas da série vermelha do sangue relacionadas ao transporte de oxigênio pelo

corpo. A vida útil das hemácias é de aproximadamente 120 dias (Dukes, 2006). A formação das células sanguíneas é dependente da manipulação da dieta. Inúmeros estudos demonstraram que diferenças na formação e função das células sanguíneas podem ser indicativos de manipulação da alimentação. O plasma é a parte do sangue que faz o transporte dessas células sanguíneas e outras substâncias, como proteínas, nutrientes, excretas, hormônios, etc. Transporta essas substâncias por todo o organismo, permitindo às células receber nutrientes. Os constituintes do plasma têm relação direta com a composição química da dieta (Dukes, 2006). Desta forma, diferentes fontes alimentares apresentaram efeitos na composição do plasma.

No presente estudo, quando o plasma foi separado dos outros constituintes sanguíneos, o $\delta^{13}\text{C}$ encontrado, certamente refletiu a dieta mais recentemente consumida pelo animal, pois no processo de separação do plasma, ocorreu a exclusão das células sanguíneas citadas à cima. Portanto, o plasma apresentou incorporação do carbono mais rapidamente quando comparado ao sangue total, pois as células sanguíneas possuem maior longevidade quando comparadas aos constituintes do plasma (Schoenheimer, 1949).

Em estudo conduzido por Hobson & Clark (1993), o plasma refletiu a dieta fornecida aos animais na primeira semana, enquanto as células vermelhas do sangue refletiram a dieta após 2 a 3 meses depois da mudança da dieta. Trabalhando com ursos, Hilderbrand *et al.* (1996) encontraram valores de meia-vida de 4 dias e 28 dias para plasma e glóbulos vermelhos do sangue, respectivamente. Em 10 dias, os valores isotópicos do plasma já haviam equilibrado com os valores da dieta, enquanto que para as células vermelhas do sangue, os valores continuaram mudando após 40 dias de experimento.

Para fins de rastreabilidade de bovinos, a análise isotópica de materiais como fezes (estudo) ou urina (Monahan *et al.*, 2012) pode fornecer informações sobre as dietas mais recentes, por exemplo, da suplementação alimentar na fase de terminação. No entanto, se esses materiais não estiverem disponíveis, então a análise de frações do sangue, como aqui apresentado, oferece resultados de diferentes períodos de tempo antes do dia da coleta de sangue, pois a incorporação de carbono da dieta nessas frações depende das vias metabólicas de assimilação e tempo de *turnover*. Deste modo, deve-se levar em consideração o objetivo da pesquisa antes da escolha dos tecidos a serem

analisados, pois a fixação do elemento carbono nos tecidos ocorre de diferentes maneiras.

Se forem realizadas mudanças na dieta a curto prazo antes do abate, é possível que diferentes músculos reflitam a antiga dieta em graus diferentes, se o *turnover* isotópico desses músculos forem diferentes (Harrison *et al.*, 2010). No presente estudo, três músculos foram analisados juntamente com sangue total e plasma para comparação da incorporação do carbono da suplementação em 140 dias (Fig. 2).

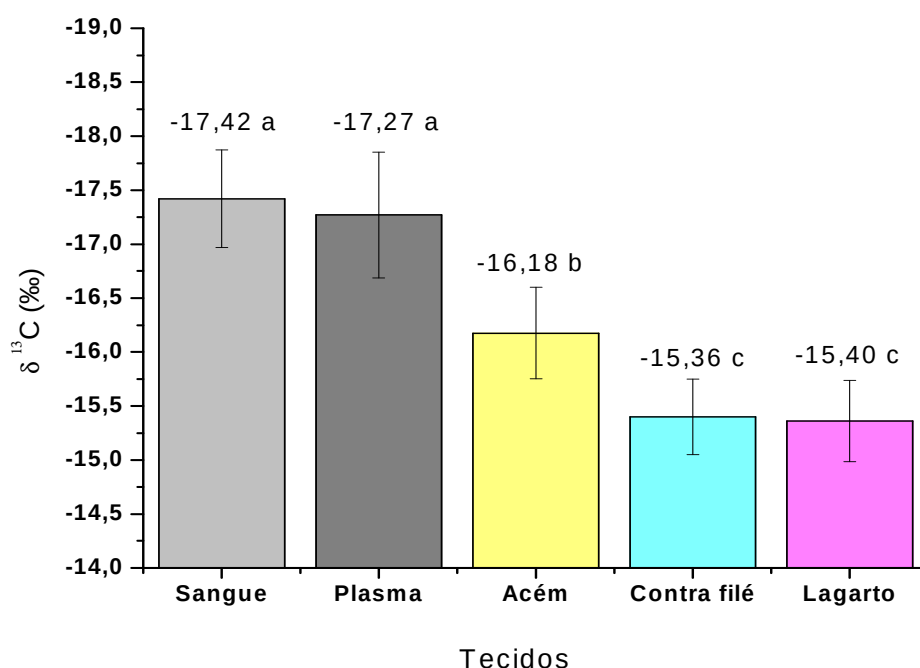


Figura 2. Composição isotópica de carbono no sangue total, plasma, acém (*M. Trapezius cervicis*), contra filé (*M. Longissimus dorsi*) e lagarto (*M. Semitendinosus*) de bovinos de corte, 140 dias após introdução de suplementação (C_3) na dieta.

Analisando os resultados dos tecidos dos animais, notou-se que, os valores isotópicos no sangue total e plasma não diferiram entre si ($P < 0,05$), sendo mais negativos em relação aos valores encontrados nos tecidos musculares, indicando maior incorporação do carbono do suplemento (Fig. 2) após 140 dias. Estes resultados diferiram dos encontrados por Roth & Robson (2000), que encontraram valores isotópicos no sangue muito próximos aos valores nos músculos, em estudo com raposas.

O músculo apresentou enriquecimento de 0,6‰ em comparação ao sangue. Hobson & Clark (1992), em estudo com codornas, também verificaram valores isotópicos no sangue próximos aos valores no músculo, -20,41‰ e -19,85‰, respectivamente.

O percentual de carbono proveniente do suplemento (C₃) incorporados no sangue total, plasma, acém, contra filé e lagarto após 140 dias de experimento, foram 23%, 22%, 14%, 8% e 8%, respectivamente.

Estes resultados confirmam que em animais ruminantes, a mensuração isotópica no tecido muscular não foi apropriada na quantificação do real valor ingerido de plantas C₃ e C₄, devido à baixa taxa de *turnover* isotópico no músculo bovino. Bahar *et al.* (2005), em estudo com bovinos, verificaram que o *turnover* do músculo *Longissimus thoracis et lumborum* não foi completo após 167 dias de experimento. Em estudo similar, Gebbing *et al.* (2004), encontraram que a troca total da dieta não foi atingida no músculo em nenhum momento após alimentação de novilhos de corte recebendo silagem de milho por 230 dias. Ao contrário, em outro estudo, o valor isotópico da nova dieta foi refletido no sangue total e plasma em touros jovens após 70 dias (De Smet *et al.*, 2004).

Os valores isotópicos no sangue total e plasma não se assemelharam aos valores isotópicos nos músculos em 140 dias de experimento, e esta baixa incorporação do carbono nos músculos, proveniente da suplementação, pode estar relacionada à quantidade restrita de suplemento fornecida aos animais e ao tempo de troca de carbono mais lento. Certamente, os músculos estudados no presente trabalho possuem diferentes taxas metabólicas, fazendo com que necessitem de mais tempo para refletirem o carbono da nova dieta.

Quando comparados os valores isotópicos dos músculos estudados, verificou-se que o músculo *Trapezius cervicis* (acém), teve maior ($P < 0,05$) incorporação do $\delta^{13}\text{C}$ em 140 dias, em relação ao *Longissimus dorsi* (contra filé) e *Semitendinosus* (lagarto). Este fato pode ter ocorrido, pois o músculo acém se localiza na parte dianteira do bovino, com predominância de fibras vermelhas, utilizado para sustentação e movimentos (Huges & Blau, 1990), o que pode contribuir para a maior taxa de troca de proteínas musculares contráteis.

Analisando os resultados do presente estudo, pode notar que as fezes indicariam recente mudança na dieta, pois rapidamente refletiram o valor isotópico da

suplementação oferecida aos animais. No entanto, se o fornecimento da suplementação fosse interrompido, o valor isotópico nas fezes não refletiria mais o valor de $\delta^{13}\text{C}$ da suplementação. Em relação ao sangue total e plasma, estes levaram mais tempo em relação às fezes para refletirem o valor isotópico da nova dieta. No entanto, essas amostras refletiriam por mais tempo o valor isotópico da suplementação. Nos músculos, a incorporação do carbono da nova dieta foi mais lenta em relação às outras amostras avaliadas. Porém, em 140 dias, o músculo *Trapezius cervicis* (acém) principalmente, poderia ser indicativo de que aqueles animais estavam recebendo outra alimentação além do pasto.

Conclusões

As análises dos isótopos estáveis de carbono detectam mudanças nos valores isotópicos dos tecidos analisados (fezes, sangue total, plasma, músculos) em tempos diferentes, de acordo com a taxa de incorporação do carbono proveniente da suplementação.

O sangue total e plasma refletiram mais rapidamente o valor isotópico da suplementação quando comparados aos tecidos musculares, podendo ser utilizados como ferramenta confiável em processos de rastreabilidade em sistemas de produção de bovinos de corte criados em pasto.

Dietas suplementares são detectáveis, mesmo que contribuindo apenas com uma porção do carbono total da dieta.

Referências Bibliográficas

BAHAR, B.; MONAHAN, F.J.; MOLONEY, A.P. et al. Alteration of the carbon and nitrogen stable isotope composition of beef by substitution of grass silage with maize silage. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v.19, p.1937–1942, 2005.

BAHAR, B.; SCHMIDT, O.; MOLONEY, A.P. et al. Seasonal variation in the C, N and S stable isotope composition of retail organic and conventional Irish beef. *Food Chemistry*, v.106, p.1299–1305, 2008.

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

DE SMET, S.; BALCAEN, A.; CLAEYS, E. et al. Stable carbon isotope analysis of different tissues of beef animals in relation to their diet. *Rapid Communications Mass Spectrometry*, v.18, p.1227-1232, 2004.

DUCATTI, C. Stable isotopes in aquaculture. *Brazilian Journal of Animal Science*, v.36, p.01-10, 2007.

DUKES. Fisiologia dos animais domésticos / editorial de William O. Reece; (revisão técnica Newton da Cruz Rocha; tradução Cid Figueiredo, Idilia Ribeiro Vanzellotti, Ronaldo Frias Zanon). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

GEARING, J.N. The study of diet and trophic relationships through natural abundance ^{13}C . Pag. 201-218 in Coleman, D. C. e B. Fry, editors. *Carbon Isotope Techniques*. Academic Press, London, 1991.

GEBBING, T.; SCHELLBERG, J.; KU"HBACH, W. Switching from grass to maize diet changes the C isotope signature of meat and fat during fattening of steers. In: *Proceedings of the 20th general meeting of the European grassland federation. Grassland Science in Europe*, v. 9, p.1130–1132, 2004.

HARRISON, S.M.; MONAHAN, F.J.; MOLONEY, A.P. et al. Intra-muscular and inter-muscular variation in carbon turnover of ovine muscles as recorded by stable isotope ratios. *Food Chemistry*, v. 123, p. 203-209, 2010.

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

HOBSON, K.A.; CLARK, R.G. Turnover of ^{13}C in cellular and plasma fractions of blood: implications for nondestructive sampling in avian dietary studies. *The Auk*, v. 110(3), p.638-641, 1993.

HUGHES, S.M.; BLAU, H.M. Migration of myoblasts across basal lamina during skeletal muscle development. *Nature*, v.345, p.350-353, 1990.

JONES R.; LUDLOW M.; TROUGHTON J. Estimation of the proportion of C_3 and C_4 plant species in diet of animals from the ratio of natural ^{12}C and ^{13}C isotopes in the faeces. *Journal of Agricultural Science*, v.18, p.91-100; v.92, p.91-100, 1979.

LEHR, H. Communicating food safety, authenticity and consumer choice: Field experiences. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, v. 5, p. 19-34, 2013.

MANCA, G.; CAMIN, F.; COLORU, G. et al. Characterization of the geographical origin of *Pecorino Sardo* cheese by casein stable isotope ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) ratios and free-amino acid ratios. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.49, p.1404-1409, 2001.

MARTINS, M.B.; DUCATTI, C.; MARTINS, C.L. et al. Stable isotopes for determining carbon turnover in sheep feces and blood. *Livestock Science*, v.149, p.137-142, 2012.

MELZER, E.; SCHMIDT, H.L. Carbon Isotope Effects on the Pyruvate Dehydrogenase Reaction and Their Importance for Relative Carbon-13 Depletion in Lipids. *The Journal of Biological Chemistry*, v.262, p. 8159-8164, 1987.

Minitab[®] 16 Statistical Software, 2010.

MONAHAN, F.J., MOLONEY, A.P., OSORIO, M.T. et al. Authentication of grass-fed beef using bovine muscle, hair or urine. *Trends in Food Science and Technology*, v. 28, p. 69-76, 2012.

OPARA, L.; MAZAUD, F. Food traceability from field to plate. *Outlook on Agriculture*, v.30, p.239–247, 2001.

PRACHE, S.; CORNU, A.; BERDAGUÉ, J.L.; PRIOLO, A. Traceability of animal feeding diet in the meat and milk of small ruminants. *Small Ruminant Research*, v. 59, p. 157-168, 2005.

RENOU J. P.; BIELICKI G.; DEPONGE C. et al. Characterization of animal products according to geographic origin and feeding diet using nuclear magnetic resonance and isotope ratio mass spectrometry. Part II. Beef meat. *Food Chemistry*, v.86, p.251-256, 2004.

ROTH, J.D.; ROBSON, 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.

SCHOENHEIMER., 1949. The dynamic state of body constituents. Harvard Univ. Press, Cambridge.

Software de formulação de ração (Super Crac Bovinos). Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, versão 4.7, 2010.

SUDEKUM, K.H., ZIGGERS, W., ROOS, N. et al. Estimating the passage of digesta in steers and wethers using the ratio of ^{13}C to ^{12}C and Titanium (IV)-oxide. *Isotopes in Environment and Health Studies*, v. 31, p. 219-227, 1995.

VINCI, G., PRETI, R., TIERI, A., VIERI, S. Authenticity and quality of animal origin food investigated by stable isotope ratio analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 93, p. 439-448, 2013.

VOGEL, J.C. Variability of carbon isotope fractionation during photosynthesis. In: EHLENGER, J.R.; HALL, A.E.; FARQUHAR, G.D. (Eds). *Stable isotopes and plant carbon: Water Relations*. San Diego: Academic Press, 1993. p.29-46, 1993.

CAPÍTULO IV

Implicações

A técnica dos isótopos estáveis está sendo utilizada em pesquisas de diversas áreas. No entanto, sua utilização como ferramenta aplicada em estudos com animais ruminantes é recente e, por este motivo, outros estudos são necessários para contribuir com o desenvolvimento desta técnica.

No presente trabalho, a técnica mostrou-se viável na estimativa do consumo de bovinos em pasto recebendo suplementação. No entanto, assim como em outros marcadores, os isótopos também possuem suas limitações, tais como: necessidade de fontes alimentares de diferentes valores isotópicos e o fato de que os cálculos são baseados nas proporções dos alimentos ingeridos, havendo assim, necessidade em se conhecer o consumo de uma das fontes alimentares. Caso essa informação não seja conhecida, faz-se necessário o uso de outro marcador combinado aos isótopos, como por exemplo, os n-alcanos. Há necessidade de mais estudos avaliando a combinação dos n-alcanos aos isótopos, como metodologia que possa substituir ao uso do óxido de cromo, ou de outros indicadores externos. A utilização dos n-alcanos não influencia no comportamento natural dos animais, pois sua utilização se dá apenas uma vez durante a fase experimental, ao contrário do óxido de cromo, no qual é ministrado vários dias consecutivos para cada animal.

Embora o óxido de cromo seja o indicador mais utilizado no meio científico para estimativa de consumo, sua utilização possui desvantagens. A contenção dos animais por dias consecutivos para administração do indicador causa estresse aos animais, podendo interferir nos resultados.

Sugerem-se mais estudos para analisar diferentes indicadores na avaliação da digestibilidade, no qual tem grande importância nos cálculos de consumo pelos isótopos estáveis.

Sabe-se que não existe “o melhor método” em estimar consumo de ruminantes em pastejo. Com isso, tornam-se imprescindíveis estudos que avaliem um método, ou uma combinação de procedimentos, que melhor se ajuste aos objetivos do estudo, à hipótese a ser testada, à precisão requerida e às condições estruturais disponíveis em cada experimento.

Em relação à utilização da técnica dos isótopos como ferramenta para auxiliar no processo de rastreabilidade e certificação de produtos de origem animal, o presente estudo apresentou resultados satisfatórios. No entanto, outros estudos são necessários para avaliar o *turnover* de tecidos em bovinos de corte em diferentes categorias animal dentro do sistema de produção.