

## RESSALVA

Atendendo solicitação do autor ,  
o texto completo desta dissertação  
será disponibilizado somente a partir  
de 07/08/2020.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
CÂMPUS DE BOTUCATU

***TURNOVER ISOTÓPICO EM LEITE, SANGUE E FEZES DE VACAS  
LEITEIRAS ALIMENTADAS COM CAMA DE AVIÁRIO***

LUCIANE DO CARMO SERAPHIM

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

Botucatu - SP

Agosto/2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
CÂMPUS DE BOTUCATU

***TURNOVER ISOTÓPICO EM LEITE, SANGUE E FEZES DE VACAS  
LEITEIRAS ALIMENTADAS COM CAMA DE AVIÁRIO***

LUCIANE DO CARMO SERAPHIM

Zootecnista

Orientador: Prof. Dr. Roberto de Oliveira Roça

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

Botucatu - SP

Agosto/2018

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

S481t Seraphim, Luciane do Carmo, 1984-  
*Turnover isotópico em leite, sangue e fezes de vacas leiteiras alimentadas com cama de aviário / Luciane do Carmo Seraphim. - Botucatu: [s.n.], 2018*  
xi, 43 p.: grafs. color., tabs.

Tese (Doutorado)- Universidade Estadual Paulista Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2018

Orientador: Roberto de Oliveira Roça  
Inclui bibliografia

1. Bovino de leite - Alimentação e rações. 2. Cama de galinha. 3. Carbono 13. 4. Isótopos estáveis. 5. Metabolismo animal. I. Roça, Roberto de Oliveira. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. III. Título.

Elaborada por Ana Lucia G. Kempinas - CRB-8:7310

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte"

## BIOGRAFIA DA AUTORA

**Luciane do Carmo Seraphim**—nascida em 03 de maio de 1984, na cidade de Botucatu – SP, filha de Luiz Seraphim e Lucia do Carmo Sobrinho Seraphim, concluiu o ensino médio em 2001 na escola EE Dom Lúcio Antunes de Souza, na cidade de Botucatu – SP. Graduou-se em Zootecnia pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Campus de Botucatu-SP em Dezembro de 2011. Bolsista pelo CNPq em Iniciação Tecnológica e Industrial (ITI - A) no segundo semestre de 2011 auxiliando nas pesquisas desenvolvidas pelo Instituto de Zootecnia de Sertãozinho - SP, onde auxiliou nas linhas de pesquisa com ênfase na relação entre emissão de metano, comportamento ingestivo, desempenho e eficiência alimentar de bovino Nelore. Em Agosto de 2012, ingressou no curso de Mestrado em Zootecnia, sob orientação do Prof. Dr. Carlos Ducatti, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Campus de Botucatu-SP, onde foi bolsista pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), obtendo o título de Mestre em Novembro de 2014, na área de Nutrição e Produção Animal. Em Março de 2015, iniciou o curso de Doutorado em Zootecnia na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Botucatu, sob orientação do Prof. Dr. Carlos Ducatti e, devido ao seu falecimento, em Agosto de 2016 passou sob orientação do Prof. Dr. Roberto de Oliveira Roça até seu término. Durante o curso de doutorado, a autora foi bolsista pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) até o mês de Janeiro de 2016. A defesa da tese de doutorado realizou-se no dia 07 de Agosto de 2018.

**DEDICO**

Aos meus pais, por todo carinho, amor, incentivo e por serem minha rede de apoio.

Aos meus filhos, por me proporcionarem o amor incondicional e fazerem eu ser uma pessoa melhor a cada dia.

Ao meu esposo pelo seu amor, companheirismo e paciência em todas as horas.

Ao Prof. Dr. Carlos Ducatti

Não seria possível ter chegado até aqui se o Sr. não tivesse me apoiado e incentivado. No meio do caminho o Sr. se foi desse plano mas, acredito que de onde estiver continua nos orientando! Com toda certeza o Sr. deixou em nós seu amor pela ciência e o desejo de que nunca devemos deixar de acreditar em nossos sonhos!

*“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.”* Antoine de Saint-Exúpery

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por seu imenso amor e infinita misericórdia, por ter me concedido chegar até aqui.

Aos meus pais, Lucia e Luiz, agradeço infinitamente pelo apoio em todas as etapas de minha educação. Sempre me incentivando e apoiando. Obrigada pelo amor incondicional.

A meu querido esposo, Wellington, por ser tão importante na minha vida. Sempre a meu lado, me pondo para cima. Devido a seu companheirismo, amizade, paciência, compreensão, apoio, alegria e amor, este trabalho pôde ser concretizado. Obrigada por ter feito do meu sonho o nosso sonho!

Aos meus filhos, Lucas e Luiza, por serem a minha inspiração em querer ser melhor do que fui até hoje!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Roberto de Oliveira Roça, pela confiança em me aceitar como sua orientada, pelo apoio, por sempre estar disponível e prestativo.

Ao Prof. Dr. Carlos Ducatti (*in memoriam*), pelo apoio desde a nossa primeira conversa até última. Por sempre me apoiar e não ter soltado da minha mão em nenhum momento.

Aos funcionários/ amigos do Centro de Isótopos Estáveis: Evandro Tadeu da Silva, Cibele Regina de Souza Kruliski, Nádia dos Reis Carvalho e Mariana Sasso Andreasi pelo auxílio nas análises, apoio e amizade nesses anos.

À Dr. Juliana Célia Denadai, por toda paciência, disponibilidade, por me auxiliar com os dados e sempre responder meus questionamentos.

Ao Prof. Dr. Vladimir Eliodoro Costa por todo apoio, disponibilidade e incentivo.

Ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, e à Coordenação da Raiva dos Herbívoros e das Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis, pela autorização da execução do projeto através da Informação CRHE nº 79/2013, referente ao processo nº 21052.009187/2013-02.

À Bárbara Cristina da Silva Fernandes e a Natalia pela ajuda durante as pesagens.

À Adrielle Nayara Dias Ishizuka, Marco Antônio Gonzales de Carvalho, Matheus Betelli Piccolo, Ramon Argentin Rizzieri, Rodrigo da Silva Gennari e a todos os envolvidos durante as coletas do período experimental.

Aos meus amigos, Letícia Tomazini, Lucas Schimidt Dibbern, Natalia Santos Leal, Priscila de Santi e Vânia Fournou de Lima, pela amizade e companheirismo. Durante esses anos cada um de vocês foram importantes em vários momentos da minha vida.

Aos amigos conquistados na pós-graduação: Ana Cristina Stradiotti, Bárbara Cristina da Silva Fernandes, Michelle Novaes Ravelli, Vanessa Cristina Pelícia.

Ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia pela oportunidade.

Aos funcionários da Seção de Pós-graduação da FMVZ, Cláudia Cristina Moreci, Carlos Pazini, Ellen Cassemiro Guilhen e Seila Cristina Cassineli pela atenção e auxílios prestados.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

**Muito Obrigada!**

## SUMÁRIO

RESUMO GERAL .....	1
CAPÍTULO 1 .....	3
CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	3
1. Introdução .....	4
2. Revisão de Literatura .....	4
2.1. Encefalopatia Espongiforme Bovina .....	4
2.2. Isótopos Estáveis Ambientais .....	6
2.3. <i>Turnover</i> isotópico .....	8
3. Referências bibliográficas .....	11
CAPÍTULO 2 .....	16
<i>Turnover</i> isotópico em leite, sangue e fezes de vacas leiteiras alimentadas com cama de aviário.....	17
Resumo.....	17
Abstract .....	18
INTRODUÇÃO .....	19
MATERIAL E MÉTODOS .....	20
RESULTADO E DISCUSSÃO .....	24
CONCLUSÕES .....	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36
CAPÍTULO 3 .....	40
IMPLICAÇÕES .....	41

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

Tabela 1. Composição percentual dos ingredientes (% matéria seca), composição química e valor isotópico médio (n=3) das dietas com desvio padrão. ....	21
Tabela 2. Ajuste exponencial, seus respectivos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) do leite e fezes dos animais nos 1° e 2° períodos experimentais em função o tempo. ....	25
Tabela 3. Ajuste exponencial, seus respectivos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) do leite e fezes dos animais no 2° período experimental em função o tempo.....	25
Tabela 4. Valores calculados de meia vida (T, dias), e do tempo necessário para a troca de 99% dos átomos de Carbono e Nitrogênio ( $t_{(0,99)}$ , dias) do leite e fezes nos 1° período experimental. ....	25
Tabela 5. Valores calculados de meia vida (T, dias), e do tempo necessário para a troca de 99% dos átomos de Carbono e Nitrogênio ( $t_{(0,99)}$ , dias) do leite e fezes nos 2° período experimental. ....	26
Tabela 6. Comparação das médias do $\delta^{13}\text{C}$ nas fezes, sangue e leite dos tratamentos Vegetal e Cama de aviário no 1° e 2° períodos.....	34
Tabela 7. Comparação das médias do $\delta^{15}\text{N}$ no leite dos tratamentos Vegetal e Cama de aviário no 1° e 2° períodos.....	34

**LISTA DE FIGURAS**

## CAPÍTULO 2

- Figura 1. Curvas de *turnover* do isótopo estável de carbono em função do tempo no leite durante o 1º período (a) e 2º período (b), e do isótopo estável de nitrogênio durante o 1º período (c) e 2º período (d). ..... 28
- Figura 2. Curvas de *turnover* do isótopo de estável de carbono em função do tempo no sangue durante o 1º período (a) e 2º período (b). ..... 29
- Figura 3. Curvas de *turnover* do isótopo de estável de carbono em função do tempo nas fezes durante o 1º período (a) e 2º período (b). ..... 30

**LISTA DE ANEXOS**

ANEXO 1.....	42
ANEXO 2.....	43

## **TURNOVER ISOTÓPICO EM LEITE, SANGUE E FEZES DE VACAS LEITEIRAS ALIMENTADAS COM CAMA DE AVIÁRIO**

**RESUMO GERAL:** Por meio do projeto Temático nº2008/57411-4 foi desenvolvido o seguinte experimento: Foram utilizadas 12 vacas mestiças, com produção média de 6 litros/leite/dia, distribuídas em delineamento inteiramente casualizado com seis repetições e dois tratamentos avaliadas por 90 dias, dividido em 2 períodos. Os tratamentos foram: T1 – controle – dieta estritamente vegetal durante todo o período experimental; T2 – cama de aviário – que teve a inclusão inicial de cama de aviário na dieta durante o primeiro período experimental de 55 dias e depois dieta vegetal por 35 dias. As vacas foram ordenhadas 1 vez ao dia, e alimentadas, *ad libitum*, 2 vezes ao dia. Foram colhidas amostras de leite, sangue e fezes diariamente e analisadas com espectrômetro de massas de razão isotópica. A partir deste projeto inicial foram derivados mais projetos: 1) Rastreabilidade da cama de aviário por isótopos estáveis em bovinos leiteiros, 2) *Turnover* dos isótopos estáveis do carbono-13 e nitrogênio-15 no plasma sanguíneo e soro do leite de vacas alimentadas com cama de aviário e o presente projeto intitulado: *Turnover* isotópico em leite, sangue e fezes de vacas leiteiras alimentadas com cama de aviário, o qual teve como objetivo avaliar o *turnover* isotópico de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  no leite, sangue e fezes, ocasionados pela inclusão da cama de aviário na dieta de vacas leiteiras, a fim de determinar o tempo de incorporação do valor isotópico da dieta. Para mensurar o *turnover* de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  em determinado intervalo de tempo, foi utilizada a função exponencial de primeira ordem. Os dados isotópicos foram submetidos ao teste t-Student. Foi possível observar que o tempo experimental foi suficiente para que ocorresse o *turnover* total no leite e nas fezes para a incorporação de 99% dos átomos de carbono e de nitrogênio para o leite. O sangue não conseguiu atingir o patamar de equilíbrio nos períodos avaliados indicando ser um tecido para detecção de dietas de períodos mais longos. O resultado do teste de t Student ( $p < 0,05$ ) foi semelhante ao encontrado pela análise dos isótopos estáveis mostrando que no primeiro período os valores isotópicos das fezes do T1 diferiram do T2, e para o leite não houve diferença entre os tratamentos. No segundo período, os valores isotópicos das fezes e do leite do T1 não diferiram do T2. Os valores isotópicos de  $\delta^{15}\text{N}$  no leite para o 1º período diferiram entre o T1 e o T2. De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que o *turnover* isotópico do  $^{13}\text{C}$  nas fezes e do  $^{15}\text{N}$  no leite indicam

valores de meia vida de 1,4 dias quando houve a troca da dieta contendo cama de aviário para a somente vegetal.

**PALAVRAS-CHAVE:** cama de aviário, carbono-13, meia-vida, nitrogênio-15

O Capítulo 2 intitulado “**Turnover isotópico em leite, sangue e fezes de vacas leiteiras alimentadas com cama de aviário**” está com redação provisória de acordo com as normas para publicação no *International Dairy Journal*.

### 3. Referências Bibliográficas

ALVES-STANLEY, C.D.; WORTHY, G.A.J. Carbon and nitrogen stable isotope turnover rates and diet–tissue discrimination in Florida manatees (*Trichechus manatus latirostris*). **The Journal of Experimental Biology**, v.212, p.2349-2355, 2009.

BONTEMPO, L; LOMBARDI, G.; PAOLETTI, R.; ZILLER, L; CAMIN, F. H, C, N and O stable isotope characteristics of alpine forage, milk and cheese. **International Dairy Journal**, v. 23, n. 2, p. 99-104, 2012.

BOUTTON, T. W.; TYRRELL, H. F.; PATTERSON, B. W.; VARGA, G. A.; KLEIN, P. D. Carbon kinetics of milk formation in holstein cows in late lactation. **Journal of Animal Science**, v. 66, n. 10, p. 2636-2645, 1988.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. **Cartilha: Sistema Brasileiro de Prevenção e Vigilância de Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB)**. Abril, 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Sislegis, versão 1.0**. Instrução Normativa nº 08 de 26 de março de 2004. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/legislacao/sislegis>>, Acesso em: 03 fev. 2017.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Doença de Creutzfeldt Jakob, 2017**. Disponível em <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/647-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/doenca-de-creutzfeldt-jakob-dcj/11210-descricao-da-doenca>> Acesso em: 05 dez. 2017.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de defesa agropecuária Brasília 2008, **Cartilha Técnica Encefalopatia Espongiforme Bovina – EEB**. MAPA (ministério da agricultura e abastecimento) doença da vaca louca. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/arquivos-das-publicacoes-de-saude-animal/cartilha-tecnica-eeb-2008.pdf/view>> Acesso em: 22 jan. 2017.

CARRIJO, A. S.; DUCATTI, C. Utilização de isótopos estáveis do carbono para a rastreabilidade de rações. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2007, Santos. **Anais...** Campinas: FACTA, 2007. p. 289-307.

CHOI, W.J.; LEE, S.M.; RO, H.M.; KIM, K.C.; YOO, S.H. Natural <sup>15</sup>N abundances of maize and soil amended with urea and composted pig manure. **Plant and Soil**, v.245, 223-232, 2002.

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

CRISS, R. E. **Principles of stable isotope distribution**. New York: Oxford University Press., 1999. 254 p.

CRUZ, V.C.; ARAUJO, P.C.; SARTORI, J.R.; PEZZATO, A.C.; DENADAI, J.C.; POLYCARPO, G.V.; ZANETTI, L.H.; DUCATTI, C. Poultry offal meal in chicken: Traceability using the technique of carbon ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) and nitrogen ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) stable isotopes. **Poultry Science**, v.91, p.478-486, 2012.

DENADAI, J.C.; DUCATTI, C.; PEZZATO, A.C.; CARRIJO, A.S.; CALDARA, F.R.; OLIVEIRA, R.P. Studies on carbon-13 turnover in eggs and blood of commercial layers. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.8, p.251-256, 2006.

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.

DUCATTI, C. Aplicação dos Isótopos Estáveis em Aquicultura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, suplemento especial, p.01-10, 2007.

DUCATTI, C. Isótopos Estáveis Ambientais. [Apostila] 2004. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004, 184p.

DUCATTI, C.; MARTINS, C.L.; ARRIGONE, M.B.; MARTINS, M.B.; VIEIRA JÚNIOR, L.C.; DENADAI, J.C. Utilização de Isótopos Estáveis em Ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, suplemento especial, p.68-75, 2011.

DUCATTI, C.; SALATI, E.; MATSUI, E. Método de análise da ração  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  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**, Rio de Janeiro, v. 51, n. 2, p. 275-286, 1979.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2016. **FAOSTAT**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL>>. Acesso em: 03/04/2018.

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 Physiology**, New York, v.119A, n.3, p.725-737, 1998.

GONZÁLES, Hector E. “**Encefalopatia Espongiforme Bovina**” - MVZ-CORDOBA – 2000; 5:(1), 26-28p.

GOTELIPE, F. M. S. **Avaliação do sistema de vigilância da encefalopatia espongiforme bovina no Brasil**. 2006. 99f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

GROOT, P. A. **Handbook of stable isotope analytical techniques**. Amsterdam: Elsevier, 2004. v. 1, 1234 p.

HANDLEY, L.L.; RAVEN, J.A. The use of natural abundance of nitrogen isotopes in plant physiology and ecology. **Plant Cell and Environment**, v.15, p.965-985, 1992.

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

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – **Produção da Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro: IBGE, v. 43, 2015. 49p.

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

KNOBBE, N.; VOGL, J.; PRITZKOW, W. et al. 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.

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

MARTINS, M.B.; DUCATTI, C.; MARTINS, C.L.; DENADAI, J.C.; NATEL, A.S.; SOUZA-KRULISKI, C.R.; SARTORI, M.M.P. Stable isotopes for determining carbon turnover in sheep feces and blood. **Livestock Science**, v.149, p. 137-142, 2012.

MENDES, R.E. O impacto financeiro da rastreabilidade em sistemas de produção de bovinos no Estado de Santa Catarina, Brasil. **Ciência Rural**, v.36, p. 1524-1528, 2006.

MOLKENTIN, J. Authentication of Organic Milk Using  $\delta^{13}\text{C}$  and the  $\alpha$ -Linolenic Acid Content of Milk Fat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p.785-790, 2009.

OIE, World Organization for animal Health, 2016. **Number of cases of bovine spongiform encephalopathy (BSE) reported in the United Kingdom**. Disponível em: <<http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/bse-specific-data/number-of-cases-in-the-united-kingdom/>> Acesso em: 05 dez. 2017.

OIE, World Organization for animal Health, 2016. **Number of reported cases of bovine spongiform encephalopathy (BSE) in farmed cattle worldwide (excluding the United Kingdom)**. Disponível em: <<http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/bse-specific-data/number-of-reported-cases-worldwide-excluding-the-united-kingdom/>> Acesso em: 05 dez. 2017.

OIE, World Organization for animal Health, 2017. **OIE member countries official BSE risk status map on may 2017**. Disponível em: <<http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/official-disease-status/bse/en-bse-carte/>> Acesso em: 05 dez. 2017.

ORTOLANI, E. L.; Encefalite espongiforme bovina: considerações epizootiológicas, etiológicas e clínicas. **Revista de educação continuada do Crmv- SP**. São Paulo, v. 2, p. 3 – 8, 1999.

PRESTON, T. The measurement of stable isotope natural abundance variations. **Plant Cell and Environment**, v. 15, p. 1091-1097, 1992.

PARLAMENTO EUROPEU E CONSELHO. **EUR-Lex Acesso ao direito da União Europeia**. Regulamento (CE) nº 1760/2000 de 17 de Julho de 2000. Disponível em: <<http://eurlex.europa.eu/legalcontent/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32000R1760&from=PT>>. Acesso em: 14 mai. 2017.

PARLAMENTO EUROPEU E CONSELHO. **EUR-Lex Acesso ao direito da União Europeia**. Regulamento (CE) nº 999/2001 de 22 de Maio de 2001. Disponível em: <<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2001:147:0001:0040:PT:PDF>>. Acesso em: 25 fev. 2017.

PARLAMENTO EUROPEU E CONSELHO. **EUR-Lex Acesso ao direito da União Europeia**. Regulamento (CE) nº 1774/2002 de 03 de Outubro de 2002. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32002R1774&from=PT>>. Acesso em: 14 mai. 2017.

PARLAMENTO EUROPEU E CONSELHO. **EUR-Lex Acesso ao direito da União Europeia**. Regulamento (CE) nº 1069/2009 de 21 de Outubro de 2009. Disponível em: <<http://eurlex.europa.eu/legalcontent/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009R1069&qid=1425822763700&from=PT>>. Acesso em: 25 fev. 2017.

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.

SALA, C.; MORIGNAT, E.; OUSSAÏD, N.; GAY, E.; ABRIAL, D.; DUCROT, C.; CALAVAS, D. Individual factors associated with L- and H-type Bovine Spongiform Encephalopathy in France. **BMC Veterinary Research**, v.8, p.74-79, 2012.

SANCHES, R.L.; ALKMIN-FILHO, J.F.; SOUZA, S.V.C.; JUNQUEIRA, R.G. In house validation of a method for detection of animal meals in ruminant feeds by microscopy. **Food Control**, v.17, n.2, p.85-92, 2006.

SILVA, S.; SOUZA, C. **Avaliação microbiológica de queijo tipo minas frescal comercializado na cidade de Belém - Pará**. Belém: Laboratório Central do Estado do Pará; Centro Tecnológico da Universidade Federal do Pará, 2006.

SHIBUYA, E.K.; SARKIS, J.E.S.; NETO, O.N.; MOREIRA, M.Z.; VICTORIA, R.L. Souring Brazilian marijuana by applying IRMS analysis to seized samples. **Forensic Science International**, v.160, p.35-43, 2006.

SILVA, D. A. F.; BISCOLA, N. P.; SOUZA, R. M. F.; CAETANO, D. A.; DENADAI, J. C.; SARTORI, M. M. P.; SILVA, E. T.; DUCATTI, C.; MARTINS, C. L.; JORGE, A. M.; SANTOS, L. D.; FERREIRA JUNIOR, R. S.; BARRAVIERA, B. Carbon-13 and nitrogen-15 turnover in serum of bubaline donos of biological material for medical use. **Toxicon**, v. 60, n. 2, p. 117, 2012.

STRADIOTTI, A.C. **Técnica dos isótopos estáveis na incorporação de  $^{13}\text{C}$  proveniente da L-metionina nos tecidos de frangos de corte em fases de crescimento.** 2013. 82f. Tese (Doutorado em nutrição e alimentação animal) – Faculdade e Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.

SUN Z. et al. Application of Stable Isotope Techniques in Studies of Carbon and Nitrogen Biogeochemical Cycles of Ecosystem. **Chinese Geographical Science**, v. 21, n. 2, p. 129-148, 2011.

VIEIRA JÚNIOR, L.C. **Diferenciação de sistemas de produção de bovinos de corte pela técnica da análise dos isótopos estáveis.** 2013. 68f. Tese (Doutorado em nutrição e alimentação animal) – Faculdade e Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.

WALKER, J.; POTTER, C.; MACK, S. The diets of modern and historic bottlenose dolphin populations reflect through stable isotopes. **Marine Mammal Science**, v.15, p.335-350, 1999.

WERNER, R.A.; SCHIMIDT, H.L. The in vivo nitrogen isotope discrimination among organic plant compounds. **Phytochemistry**, v.61, p.465-784 2002.

YONEYAMA, T. **Characterization of natural  $^{15}\text{N}$  abundances of soils.** In: BOUTTON, T.W.; YAMASAKI, S.I. (Eds.). Mass spectrometry of soils. New York: Marcel Dekker, p.205-224, 1996.

## **Turnover isotópico em leite, sangue e fezes de vacas leiteiras alimentadas com cama de aviário**

### **Resumo**

O objetivo deste estudo foi avaliar o *turnover* isotópico de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  no leite, sangue e fezes, ocasionados pela inclusão da cama de aviário na dieta de vacas leiteiras, a fim de determinar o tempo de incorporação do valor isotópico da dieta. Foram utilizadas 12 vacas mestiças, distribuídas em delineamento inteiramente casualizado com seis repetições e dois tratamentos. Os tratamentos foram: T1 – dieta estritamente vegetal durante todo o período experimental; T2 – 50% cama de aviário e 50% vegetal durante o primeiro período experimental e depois dieta vegetal. Foram colhidas amostras diariamente e analisadas com espectrômetro de massas de razão isotópica. Para mensurar o *turnover* de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  em determinado intervalo de tempo, foi utilizada a função exponencial de primeira ordem. Os dados isotópicos foram submetidos ao teste t-Student. Os valores isotópicos das fezes e do leite atingiram o patamar de equilíbrio. O sangue não conseguiu atingir o patamar de equilíbrio nos períodos avaliados indicando ser um tecido para detecção de dietas de períodos mais longos. O resultado do teste de t-Student ( $p < 0,05$ ) foi semelhante ao encontrado pela análise dos isótopos estáveis mostrando que no primeiro período os valores isotópicos das fezes do T1 diferiram do T2, e para o leite não houve diferença entre os tratamentos. No segundo período, os valores isotópicos das fezes e do leite do T1 não diferiram do T2. Os valores isotópicos de  $\delta^{15}\text{N}$  no leite para o 1º período diferiram entre o T1 e o T2. De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que o *turnover* isotópico do  $^{13}\text{C}$  nas fezes e do  $^{15}\text{N}$  no leite indicam valores de meia vida de 1,4 dias quando houve a troca da dieta contendo cama de aviário para a somente vegetal.

**Palavras-chave:** cama de aviário, carbono-13, meia-vida, nitrogênio-15

## **Isotopic turnover in milk, blood and feces of dairy cows fed poultry litter**

### **Abstract**

The objective of this study was to evaluate the isotopic turnover of  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  in milk, blood and feces, caused by the inclusion of poultry litter in the diet of dairy cows, in order to determine the incorporation time of the isotopic value of the diet. Were used twelve crossbred cows, distributed in a completely randomized design with six replicates and two treatments. The treatments were T1 - strictly vegetable diet throughout the experimental period; T2 – 50% poultry litter an 50% vegetable during the first experimental period and after vegetable diet. Samples were collected daily and analyzed with isotope ratio mass spectrometers. The first order exponential function was used to measure the turnover of  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  in a certain period of time. Were submitted the isotopic data to Student's t-test. The isotopic values of feces and milk reached the plateau isotope. The blood was not able to reach the plateau isotope in the evaluated periods indicating to be a tissue for detection of diets of longer periods. The results of the Student's t-test ( $p < 0.05$ ) were similar to those found by the stable isotope analysis, showing that in the first period, the isotopic values of the feces of the T1 differed from the T2, and for the milk there was no difference between the treatments. In the second period, the isotopic values of the feces and the milk of the T1 did not differ from the T2. The isotopic values of  $\delta^{15}\text{N}$  in milk for the 1st period differed between T1 and T2. According to the results obtained, it can be concluded that the isotopic turnover of  $^{13}\text{C}$  in feces and  $^{15}\text{N}$  in milk indicate half-life values of 1.4 days when there was a change from diet containing poultry litter to vegetable only.

**Key words:** carbon-13, half-life, nitrogen-15, poultry litter.

## CONCLUSÕES

Os resultados indicam que pode ser utilizada a análise dos isótopos estáveis para identificar as mudanças nos valores isotópicos dos tecidos analisados em tempos diferentes dependendo da taxa de incorporação do carbono e do nitrogênio provenientes das dietas com ou sem cama de aviário. Nas condições do presente estudo, a detecção da inclusão de cama de aviário na alimentação de vaca leiteiras pelas fezes ( $\delta^{13}\text{C}$ ) e pelo leite ( $\delta^{15}\text{N}$ ) indicou dietas recentes. Sendo as fezes a primeira a refletir o valor isotópico da dieta, seguido pelo leite e por último o sangue.

De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que o *turnover* isotópico do  $^{13}\text{C}$  nas fezes e do  $^{15}\text{N}$  no leite para meia vida foi de 1,4 dias quando houve a troca da dieta contendo cama de aviário para a somente vegetal.

O sangue não conseguiu atingir o patamar de equilíbrio no período avaliado indicando ser um material para detecção de dietas de períodos mais longos.

Por essas diferenças apresentadas podemos inferir que o tipo de material influencia no *turnover* isotópico, ou seja, havendo troca mais rápida ou mais lenta do isótopo estudado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- BAHAR, B.;SCHMIDT, O.;MOLONEY, A.P.; SCRIMGEOUR, C.M.; BEGLEY, I.S.; MONAHAN, F.J. 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, 2007.
- BATEMAN, A. S.; KELLY, S. D. Fertilizer nitrogen isotope signatures. **Isotopes in Environmental and Health Studies**, v. 43, p, 237-247, 2007.
- BOUTTON, T. W.; TYRRELL, H. F.; PATTERSON, B. W.; VARGA, G. A.; KLEIN, P. D. Carbon kinetics of milk formation in holstein cows in late lactation. **Journal of Animal Science**, v. 66, n. 10, p. 2636-2645, 1988.
- BRAUN, A., SCHNEIDER, S., AUERSWALD, K., BELLOF, G., & SCHNYDER, H. (2013). Forward modeling of fluctuating dietary  $^{13}\text{C}$  signals to validate  $^{13}\text{C}$  turnover models of milk and milk components from a diet-switch experiment. **PloS One**, 8, e85235.
- CAMIN, F.; BONER, M.; BONTEMPO, L.; FAUHL-HASSEK, C.; KELLY, S.D.; RIEDL, J.; ROSSMANN, A. Stable isotope techniques for verifying the declared geographical origin of food in legal cases. **Trends in Food Science & Technology** v. 61, p. 176–187, 2017.
- CAMIN, F.; PERINI, M.; BONTEMPO, L.; FABRONI, S.; FAEDI, W.; MAGNANI, S.; BARUZZI, G.; BONOLI, M.; TABILIO, M.R.; MUSMECI, S.; ROSSMANN, A.; KELLY, S.D.; RAPISARDA, P. Potential isotopic and chemical markers for characterising organic fruits. **Food Chemistry**, v. 125, n. 3, p. 1072-1082, 2011.
- CARVALHO, M. A. G. Rastreabilidade da cama e aviário por isótopos estáveis em bovinos leiteiros,2015. 70 p. **Dissertação (Mestrado em Zootecnia)** – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2015.
- CHUNG, I.; PARK, I.; YOON, J.Y.; YANG, Y.S.; KIM, S.H. Determination of organic milk authenticity using carbon and nitrogen natural isotopes. **Food Chemistry**, v. 160, p. 214-218, 2014.
- DALERUM, F., ANGERBJÖRN, A. Resolving temporal variation in vertebrate diets using naturally occurring stable isotopes. **Oecologia**, v.144, p.647–658, 2005.
- DENIRO MJ AND EPSTEIN S. Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. **Geochimica et Cosmochimica Acta** v.45, p.341–351, 1981.

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 in Mass Spectrometry**, v.18, p.1227-1232, 2004.

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

DUCATTI, C. **Isótopos estáveis ambientais**. Botucatu (SP): Universidade Estadual Paulista, 2004, 138p. (Apostila).

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2016. **FAOSTAT**. Disponível em: < <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL>>. Acesso em: 03 abr. 2018.

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

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

GONZÁLEZ-MARTIN I, GONZÁLES-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.

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

GUO BL, WEI YM, PAN JR, LI Y. Stable C and N isotope ratio analysis for regional geographical traceability of cattle in China. **Food Chemistry**, v.118, p.915–920, 2010.

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

JONES R.; LUDLOW M.; TROUGHTON J. Estimation of the proportion of  $\text{C}_3$  and  $\text{C}_4$  plant species in diet of animals from the ratio of natural  $^{12}\text{C}$  and  $^{13}\text{C}$  isotopes in the faeces. **Journal of Agricultural Science**, v.18, p.91-100; v.92, p.91-100, 1979.

KNOBBE, N.; VOGL, J.; PRITZKOW, W. et al. 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.

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

MARTINS, M. B.; DUCATTI, C.; MARTINS, C. L.; DENADAI, J. C.; NATEL, A. S.; SOUZA-KRULISKI, C. R.; SARTORI, M. M. P. Stable isotopes for determining

carbono turnover in sheep feces and blood. **Livestock Science**, v. 149, n. 1-2, p. 137-142, 2012.

MOLKENTIN, J. Applicability of organic milk indicators to the authentication of processed products. **Food Chemistry**, v. 137, p. 25-30, 2013.

MOLKENTIN, J.; GIESEMANN, A. Follow-up of stable isotope analysis of organic versus conventional milk. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, p. 1493-1500, 2010.

NORMAN, H.C.; WILMOT, M.G.; THOMAS, D.T. et al. Stable carbon isotopes accurately predict diet selection by sheep fed mixtures of C<sub>3</sub> annual pastures and saltbush or C<sub>4</sub> perennial grasses. **Livestock Science**, v.121, p.162-172, 2009.

PARLAMENTO EUROPEU E CONSELHO. **EUR-Lex Acesso ao direito da União Europeia**. Regulamento (CE) nº 51/2013 de 16 de Janeiro de 2013. Disponível em:<<http://eurlex.europa.eu/legalcontent/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32013R0051&qid=1425822722085&from=PT>>. Acesso em: 25 fev. 2017.

PERDIGÃO, A. **Rastreabilidade de Sistemas produtivos de bovinos pela análise de isótopos estáveis**.2017. 59f. Tese (Doutorado em nutrição e alimentação animal) – Faculdade e Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2017.

PETERSON, B. J.; FRY, B. Stable isotopes in ecosystem studies. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 18, n. 1, p. 293-320, 1987.

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.

RAPISARDA, P.; CAMIM, F.; FABRONI, S.; PERINI, M.; TORRISI, B.; INTRIGLIOLO, F. Influence of different organic fertilizers on quality parameters and the  $\delta^{15}\text{N}$ ,  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^2\text{H}$ ,  $\delta^{34}\text{S}$ , and  $\delta^{18}\text{O}$  values of orange fruit (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 6, p. 3502-3506, 2010.

RIBEIRO, F. A. Técnica dos Isótopos Estáveis para Determinar o *Turnover* de Carbono nas Fezes, no Sangue e Plasma de Bovinos Jovens Confinados,2013. 51p. **Dissertação (Mestrado em Zootecnia)** – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.

ROGERS, K. M. Stable isotopes as a tool to differentiate eggs laid by caged, barn, free range, and organic hens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 4236-4242, 2009.

SCAMPICCHIO, M.; MIMMO, T.; CAPICI, C.; HUCK, C.; INNOCENTE, N.; DRUSCH, S.; CESCO, S. Identification of milk origin and process-induced changes in milk by stable isotope ratio mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, n.45, p. 11268-11273, 2012.

SICK, H.; ROOS, N.; SAGGAU, E.; HAAS, K.; MEYN, V.; WALCH, B.; TRUGO, N. Amino acid utilization and isotope discrimination of amino nitrogen in nitrogen metabolism of rat liver in vivo. **Zeitschrift für Ernährungswissenschaft. Journal of nutritional sciences**, v.36, p.340-346, 1997.

SPONHEIMER, M.; ROBINSON, T.F.; CERLING, T.E. Turnover of stable carbon isotopes in the muscle, liver, and breath CO<sub>2</sub> of alpacas (*Lama pacos*). **Rapid Communication Mass Spectrometry**, v.20, p.1395–1399, 2006.

STEELE, K.W.; DANIEL, R.M. Fractionation of nitrogen isotopes by animals: a further complication to the use of variations in the natural abundance of <sup>15</sup>N for tracer studies, **The Journal of Agricultural Science**, v.90, p. 7-9, 1978.

SUTOH, M.; KOYAMA, T.; YONEYAMA, T. Variations of natural <sup>15</sup>N abundances in the tissues and digesta of domestic animals. **Radioisotopes**, v.60, p.74-77, 1987.

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

UNIÃO EUROPEIA. (2010). Directiva 2010/63/UE do Parlamento Europeu e do Conselho de 22 de Setembro de 2010 relativa à proteção dos animais utilizados para fins científicos. **Jornal Oficial da União Europeia**, v. 276, p.33-79, 2010.

VIEIRA JUNIOR, L.C. **Potencial da técnica dos isótopos estáveis para caracterização de diferentes sistemas de produção de bovinos e corte em condições tropicais**. 2013. 54f. Tese (Doutorado em nutrição e alimentação animal) – Faculdade e Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.

WATTIAUX, M.A.; REED, J.D. Fractionation of nitrogen isotopes by mixed ruminal bacteria. **Journal Animal Science**, v.73, p.257-266, 1995.

WHEADON, N. M. **Nitrogen isotopic fractionation and nitrogen use efficiency in beef and dairy cattle**. 2014. 217f. Tese (Degree of doctor of philosophy) – Universidade de Lincoln, Christchurch, Nova Zelândia, 2014.