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

FRANGOS DE CORTE DE PRODUTORES DO ESTADO DE SÃO PAULO: RASTREABILIDADE DA ALIMENTAÇÃO POR $\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$

BARBARA CRISTINA DA SILVA FERNANDES

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

BOTUCATU - SP
Janeiro – 2016

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

FRANGOS DE CORTE DE PRODUTORES DO ESTADO DE SÃO PAULO: RASTREABILIDADE DA ALIMENTAÇÃO POR $\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$

BARBARA CRISTINA DA SILVA FERNANDES
Zootecnista

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ducatti
Co-orientadora: Dra. Juliana Célia Denadai

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

BOTUCATU - SP
Janeiro – 2016

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

Fernandes, Barbara Cristina da Silva, 1987-
F363f Frangos de corte de produtores do Estado de São Paulo: rastreabilidade da alimentação por $\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$ / Barbara Cristina da Silva Fernandes. – Botucatu : [s.n.], 2016
x, 81 f. : tabs., grafs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2016
Orientador: Carlos Ducatti
Coorientador: Juliana Célia Denadai
Inclui bibliografia

1. Análise multivariada. 2. Isótopos estáveis. 3. Reação em cadeia de polimerase. 4. Carbono 13. 5. Nitrogênio 15. I. Ducatti, Carlos. II. Denadai, Juliana Célia. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. IV. Título.

Dedico

A minha filha, meu marido, meus pais, meu irmão e a toda minha família. Pessoas que sempre tiveram paciência e amor incondicional, que me apoiam sem limites e não medem esforços para me verem feliz. Pessoas a quem desejo sempre dar orgulho e o meu melhor. Amo muito vocês.

Agradeço

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Ducatti, e minha co-orientadora, Dra. Juliana Célia Denadai, por todos os ensinamentos, paciência e por me ajudar a crescer profissionalmente.

A todos os professores, em especial a Dra. Maria Márcia Pereira Sartori, Prof. Dr. José Roberto Sartori, Prof. Dr. Vladmir Eliodoro Costa, Prof. Dr. Antonio Celso Pezzato, Prof. Dr. Dirlei Antonio Berto e Prof. Dr. Ariel Antonio Mendes. Obrigada pela disposição em ajudar, aconselhar e ensinar.

A todos os funcionários da Fazenda Lageado e técnicos de laboratórios por onde passei, em especial a Cibele Regina de Souza-Kruliski, Evandro Tadeu da Silva e Mariana Sasso do Centro de Isótopos Estáveis Ambientais do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho (UNESP), Câmpus de Botucatu e a Gisele Setznagl do Laboratório de Bromatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da UNESP, Câmpus de Botucatu, pela grande ajuda, experiências trocadas e momentos vividos.

Aos amigos e colegas da pós-graduação, por todos os momentos e experiências vividas, pelo apoio e amizade. Em especial a Cristiane Sanfelice, Édina de Fátima Aguiar, Priscila Cavalca de Araujo, Ana Cristina Stradiotti, Adriele Nayara Dias Ishizuka, Marco Antonio Gonzales de Carvalho, Michelle N. Ravelli, Thatiane Mendes Mitsunaga, Vanessa Cristina Pelícia, Guilherme Emygdio Mendes Pimenta, Vânia Luiza Fournou de Lima, Luciane do Carmo Seraphim e Fabiana Golin Luiggi.

A FMVZ-UNESP, Câmpus de Botucatu, pela minha formação profissional e pessoal, oferecendo-me apoio institucional e infra-estrutura necessária para o desenvolvimento das atividades de pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da FMVZ-UNESP, Câmpus de Botucatu, pela oportunidade de realizar este curso e a sua funcionária, Seila Cristina Cassinele Vieira, pela paciência e dedicação com os alunos.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa (processo nº 2013/04339-2) e pelo auxílio financeiro (projeto temático n° 2008/57411-4) concedidos para execução do projeto.

As empresas de frangos de corte que permitiram a coleta dos animais, assim como a coleta dos ingredientes da fabrica de ração, por toda a confiança, apoio e experiência trocada.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta pesquisa e que eu possa ter cometido a injustiça de esquecer neste momento.

SUMÁRIO

Página

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....1

1. Introdução geral.....2
2. Revisão de literatura.....4
   2.1 Isótopos estáveis.....4
   2.2 Isótopos estáveis e variação natural.....6
   2.3 Isótopos estáveis na rastreabilidade de produtos avícolas com restrição ao uso de subprodutos de origem animal na dieta.....7
3. Referências Bibliográficas.....13

CAPÍTULO 2 – RASTREABILIDADE DE SUBPRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL NO MÚSCULO PEITORAL E MUCOSA INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE DE GRANJAS COMERCIAIS POR $\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$.....19

Resumo.....20

Abstract.....21

Introdução.....22

Material e Métodos.....23

Resultados e Discussão.....26

Conclusão.....52

Referências Bibliográficas.....52

CAPÍTULO 3 - DETECÇÃO DE SUBPRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL POR $\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$ NO SANGUE E PENAS DE FRANGOS DE CORTE DE GRANJAS COMERCIAIS.....55

Resumo.....56

Abstract.....57

Introdução.....58

Material e Métodos.....59

Resultados e Discussão.....62

Conclusão.....78

Referências Bibliográficas.....78

CAPÍTULO 4 – IMPLICAÇÕES.....80

LISTA DE TABELAS

Página

CAPÍTULO 2 – RASTREABILIDADE DE SUBPRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL NO MÚSCULO PEITORAL E MUCOSA INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE DE GRANJAS COMERCIAIS POR $\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$.....19

Tabela 1. Peso das amostras (µg) para determinação das razões isotópicas do carbono e nitrogênio.....25

Tabela 2. Informações das diferentes empresas avícolas no estado de São Paulo quanto ao mercado destino, linhagem utilizada e esquema nutricional.....27

Tabela 3. Detecção de *DNA** de origem animal em rações de frangos de corte de diferentes empresas avícolas no estado de São Paulo pela técnica de *PCR***.....27

Tabela 4. Valores médios de $\delta^{13}C$ (média ± desvio padrão) da ração de frangos de corte de diferentes empresas avícolas ao longo do período de criação.....30

Tabela 5. Valores médios de $\delta^{15}N$ (média ± desvio padrão) da ração de frangos de corte de diferentes empresas avícolas ao longo do período de criação.....31

Tabela 6. Valores de participação das razões isotópicas de nitrogênio e carbono ($\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$) na primeira (PC1) e segunda (PC2) componentes da análise de componentes principais na ração de frangos de corte de diferentes empresas avícolas.....33

Tabela 7. Valores médios de $\delta^{13}C$ (média ± desvio padrão) do músculo peitoral de frangos de corte de diferentes empresas avícolas ao longo do período de criação.....34

Tabela 8. Valores médios de $\delta^{15}N$ (média ± desvio padrão) do músculo peitoral de frangos de corte de diferentes empresas avícolas ao longo do período de criação.....35

Tabela 9. Valores médios de $\delta^{13}C$ (média ± desvio padrão) da mucosa intestinal de frangos de corte de diferentes empresas avícolas ao longo do período de criação.....36

Tabela 10. Valores médios de $\delta^{15}N$ (média ± desvio padrão) da mucosa intestinal de frangos de corte de diferentes empresas avícolas ao longo do período de criação.....37

Tabela 11. Valores de participação das razões isotópicas de nitrogênio e carbono ($\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$) na primeira (PC1) e segunda (PC2) componentes da análise de componentes principais no músculo peitoral de frangos de corte de diferentes empresas avícolas.....47

Tabela 12. Classificação das amostras isotópicas ($\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$) de músculo peitoral de frangos de corte de diferentes empresas avícolas ao longo do período de criação*.....47

Tabela 13. Valores de participação das razões isotópicas de nitrogênio e carbono ($\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$) na primeira (PC1) e segunda (PC2) componentes da análise de componentes principais da mucosa intestinal de frangos de corte de diferentes empresas avícolas.....48

Tabela 14. Classificação das amostras isotópicas ($\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$) da mucosa intestinal de frangos de corte de diferentes empresas avícolas ao longo do período de criação*.....48

Tabela 15. Valores bromatológicos e isotópicos do ingrediente farelo de soja.....49

Tabela 16. Valores bromatológicos e isotópicos do ingrediente milho grão.....50

Tabela 17. Valores bromatológicos e isotópicos do ingrediente soja em grão (integral).....51

Tabela 18. Valores bromatológicos e isotópicos das farinhas de origem bovina.....51

Tabela 19. Valores bromatológicos e isotópicos das farinhas de origem avícola.....52

CAPÍTULO 3 - DETECÇÃO DE SUBPRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL POR $\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$ NO SANGUE E PENAS DE FRANGOS DE CORTE DE GRANJAS COMERCIAIS.....55

Tabela 1. Peso das amostras (µg) para determinação das razões isotópicas do carbono e nitrogênio.....61

Tabela 2. Valores médios de $\delta^{13}C$ (média ± desvio padrão) do sangue de frangos de corte de diferentes empresas avícolas ao longo do período de criação.....63

Tabela 3. Valores médios de $\delta^{15}N$ (média ± desvio padrão) do sangue de frangos de corte de diferentes empresas avícolas ao longo do período de criação.....64

Tabela 4. Valores médios de $\delta^{13}C$ (média ±desvio padrão) das penas de frangos de corte de diferentes empresas avícolas ao longo do período de criação.....65

Tabela 5. Valores médios de $\delta^{15}N$ (média ±desvio padrão) das penas de frangos de corte de diferentes empresas avícolas ao longo do período de criação.....65

Tabela 6. Valores de participação das razões isotópicas de nitrogênio e carbono na primeira (PC1) e segunda (PC2) componentes da análise de componentes principais no sangue de frangos de corte de diferentes empresas avícolas.....76

Tabela 7. Classificação das amostras isotópicas ($\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$) do sangue de frangos de corte de diferentes empresas avícolas ao longo do período de criação*.....76

Tabela 8. Valores de participação das razões isotópicas de nitrogênio e carbono na primeira (PC1) e segunda (PC2) componentes da análise de componentes principais nas penas de frangos de corte de diferentes empresas avícolas.....77

Tabela 9. Classificação das amostras isotópicas ($\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$) das penas de frangos de corte de diferentes empresas avícolas ao longo do período de criação*.....77

LISTA DE FIGURAS

Página

CAPÍTULO 2 – RASTREABILIDADE DE SUBPRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL NO MÚSCULO PEITORAL E MUCOSA INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE DE GRANJAS COMERCIAIS POR $\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$.....19

Figura 1. Valores isotópicos médios de carbono ($\delta^{13}C$) da ração coletada ao longo do período de criação (do alojamento aos 42 dias de idade) de diferentes empresas avícolas (empresas A, B, C, E e G utilizam ração com inclusão de subprodutos de origem animal na alimentação dos frangos e as empresas D e F utilizam ração estritamente vegetal).....28

Figura 2. Valores isotópicos médios de nitrogênio ($\delta^{15}N$) da ração coletada ao longo do período de criação (do alojamento aos 42 dias de idade) de diferentes empresas avícolas (empresas A, B, C, E e G utilizam ração com inclusão de subprodutos de origem animal na alimentação dos frangos e as empresas D e F utilizam ração estritamente vegetal).....29

Figura 3. Análise de componentes principais do $\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$ da ração de frangos de corte de diferentes empresas avícolas no período total de criação (do alojamento aos 42 dias de idade; empresas A, B, C, E e G utilizam ração com inclusão de subprodutos de origem animal na alimentação dos frangos e as empresas D e F utilizam ração estritamente vegetal).....32

Figura 4. Dispersão dos valores isotópicos de carbono ($\delta^{13}C$) e nitrogênio ($\delta^{15}N$) do músculo peitoral e mucosa intestinal de frangos de corte de diferentes empresas avícolas no dia do alojamento, respectivamente (empresas A, B, C, E e G utilizam ração com inclusão de subprodutos de origem animal na alimentação dos frangos e as empresas D e F utilizam ração estritamente vegetal).....39

Figura 5. Dispersão dos valores isotópicos de carbono ($\delta^{13}C$) e nitrogênio ($\delta^{15}N$) do músculo peitoral e mucosa intestinal de frangos de corte de diferentes empresas avícolas aos sete dias de idade, respectivamente (empresas A, B, C, E e G utilizam ração com inclusão de subprodutos de origem animal na

alimentação dos frangos e as empresas D e F utilizam ração estritamente vegetal).....40
Figura 6. Dispersão dos valores isotópicos de carbono ($\delta^{13}C$) e nitrogênio ($\delta^{15}N$) do músculo peitoral e mucosa intestinal de frangos de corte de diferentes empresas avícolas aos 14 dias de idade, respectivamente (empresas A, B, C, E e G utilizam ração com inclusão de subprodutos de origem animal na alimentação dos frangos e as empresas D e F utilizam ração estritamente vegetal).....41
Figura 7. Dispersão dos valores isotópicos de carbono ($\delta^{13}C$) e nitrogênio ($\delta^{15}N$) do músculo peitoral e mucosa intestinal de frangos de corte de diferentes empresas avícolas aos 21 dias de idade, respectivamente (empresas A, B, C, E e G utilizam ração com inclusão de subprodutos de origem animal na alimentação dos frangos e as empresas D e F utilizam ração estritamente vegetal).....42
Figura 8. Dispersão dos valores isotópicos de carbono ($\delta^{13}C$) e nitrogênio ($\delta^{15}N$) do músculo peitoral e mucosa intestinal de frangos de corte de diferentes empresas avícolas aos 28 dias de idade, respectivamente (empresas A, B, C, E e G utilizam ração com inclusão de subprodutos de origem animal na alimentação dos frangos e as empresas D e F utilizam ração estritamente vegetal).....43
Figura 9. Dispersão dos valores isotópicos de carbono ($\delta^{13}C$) e nitrogênio ($\delta^{15}N$) do músculo peitoral e mucosa intestinal de frangos de corte de diferentes empresas avícolas aos 35 dias de idade, respectivamente (empresas A, B, C, E e G utilizam ração com inclusão de subprodutos de origem animal na alimentação dos frangos e as empresas D e F utilizam ração estritamente vegetal).....44
Figura 10. Dispersão dos valores isotópicos de carbono ($\delta^{13}C$) e nitrogênio ($\delta^{15}N$) do músculo peitoral e mucosa intestinal de frangos de corte de diferentes empresas avícolas aos 42 dias de idade, respectivamente (empresas A, B, C, E e G utilizam ração com inclusão de subprodutos de origem animal na alimentação dos frangos e as empresas D e F utilizam ração estritamente vegetal).....45

Figura 11. Análise de componentes principais do $\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$ do músculo peitoral e mucosa intestinal de frangos de corte de diferentes empresas avícolas no período total de criação (7 a 42 dias de idade), respectivamente (empresas A, B, C, E e G utilizam ração com inclusão de subprodutos de origem animal na alimentação dos frangos e as empresas D e F utilizam ração estritamente vegetal).....46

CAPÍTULO 3 - DETECÇÃO DE SUBPRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL POR $\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$ NO SANGUE E PENAS DE FRANGOS DE CORTE DE GRANJAS COMERCIAIS.....55

Figura 1. Dispersão dos valores isotópicos de carbono ($\delta^{13}C$) e nitrogênio ($\delta^{15}N$) do sangue e penas de frangos de corte de diferentes empresas avícolas no dia do alojamento, respectivamente (empresas A, B, C, E e G utilizam ração com inclusão de subprodutos de origem animal na alimentação dos frangos e as empresas D e F utilizam ração estritamente vegetal).....68

Figura 2. Dispersão dos valores isotópicos de carbono ($\delta^{13}C$) e nitrogênio ($\delta^{15}N$) do sangue e penas de frangos de corte de diferentes empresas avícolas aos sete dias de idade, respectivamente (empresas A, B, C, E e G utilizam ração com inclusão de subprodutos de origem animal na alimentação dos frangos e as empresas D e F utilizam ração estritamente vegetal).....69

Figura 3. Dispersão dos valores isotópicos de carbono ($\delta^{13}C$) e nitrogênio ($\delta^{15}N$) do sangue e penas de frangos de corte de diferentes empresas avícolas aos 14 dias de idade, respectivamente (empresas A, B, C, E e G utilizam ração com inclusão de subprodutos de origem animal na alimentação dos frangos e as empresas D e F utilizam ração estritamente vegetal).....70

Figura 4. Dispersão dos valores isotópicos de carbono ($\delta^{13}C$) e nitrogênio ($\delta^{15}N$) do sangue e penas de frangos de corte de diferentes empresas avícolas aos 21 dias de idade, respectivamente (empresas A, B, C, E e G utilizam ração com inclusão de subprodutos de origem animal na alimentação dos frangos e as empresas D e F utilizam ração estritamente vegetal).....71

Figura 5. Dispersão dos valores isotópicos de carbono ($\delta^{13}C$) e nitrogênio ($\delta^{15}N$) do sangue e penas de frangos de corte de diferentes empresas avícolas aos 28 dias de idade, respectivamente (empresas A, B, C, E e G utilizam ração com inclusão de subprodutos de origem animal na alimentação dos frangos e as empresas D e F utilizam ração estritamente vegetal).....72

Figura 6. Dispersão dos valores isotópicos de carbono ($\delta^{13}C$) e nitrogênio ($\delta^{15}N$) do sangue e penas de frangos de corte de diferentes empresas avícolas aos 35 dias de idade, respectivamente (empresas A, B, C, E e G utilizam ração com inclusão de subprodutos de origem animal na alimentação dos frangos e as empresas D e F utilizam ração estritamente vegetal).....73

Figura 7. Dispersão dos valores isotópicos de carbono ($\delta^{13}C$) e nitrogênio ($\delta^{15}N$) do sangue e penas de frangos de corte de diferentes empresas avícolas aos 42 dias de idade, respectivamente (empresas A, B, C, E e G utilizam ração com inclusão de subprodutos de origem animal na alimentação dos frangos e as empresas D e F utilizam ração estritamente vegetal).....74

Figura 8. Análise de componentes principais do $\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$ do sangue e penas de frangos de corte de diferentes empresas avícolas no período total de criação (7 a 42 dias de idade), respectivamente (empresas A, B, C, E e G utilizam ração com inclusão de subprodutos de origem animal na alimentação dos frangos e as empresas D e F utilizam ração estritamente vegetal).....75

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. INTRODUÇÃO GERAL

Segundo a Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA) a produção de carne de frango no país chegou a 12,69 milhões de toneladas em 2014. Do volume total de frangos produzidos pelo Brasil, 67,7% foi destinado ao consumo interno e 32,3% para exportações. O consumo per capita de carne de frango foi de 42,78 quilos por pessoa e os embarques somaram 4,099 milhões de toneladas em 2014, conferindo ao Brasil a continuidade de maior exportador de carne de frango. Em 2014, o Oriente Médio se manteve como a principal região de destino da carne de frango brasileira (33,85%), seguido da Ásia para onde foi destinado aproximadamente 27,52% das exportações. A África (14,10%) e a União Européia (10,10%) também têm representatividade nas exportações brasileiras de carne de frango (ABPA, 2015).

Influências culturais e religiosas dos diferentes mercados importadores da carne de frango brasileira, assim como nichos de mercado interno, estabelecem critérios distintos em relação a produção e consumo de produtos avícolas como por exemplo, frangos alternativos, orgânicos, caipiras e *Halal* (OLIVEIRA et al., 2012). Nesse contexto de produtos avícolas diferenciados há demanda por animais que não tenham sido alimentados com subprodutos de origem animal, como os frangos alternativos, orgânicos e caipiras ou que não receberam determinado subproduto de origem animal na ração. Por exemplo, os animais destinados à produção de carne para o mercado muçulmano (produtos *Halal*) não podem receber subprodutos provenientes de suínos ou farinha de sangue e os animais destinados à produção de carne para a União Europeia não podem receber subprodutos animais da mesma espécie (canibalismo) na sua alimentação. Estas exigências ganham cada vez mais importância no mercado nacional e internacional.

Além disto, a substituição dos alimentos proteicos como o farelo de soja por subprodutos de origem animal na alimentação dos frangos de corte, com intuito de redução de custos, vem causando nos últimos anos muitas discussões entre produtores e consumidores de carne de frango. Em parte, isto tem ocorrido devido à insegurança dos consumidores após os surtos da Encefalopatia Espongiforme Bovina e os problemas de contaminações de produtos de origem animal, principalmente por *Salmonella e*

Escherichia coli (OLIVEIRA et al., 2010). Esses surtos de doenças e contaminações assustam o consumidor de produtos alimentícios de origem animal, definitivamente marcando a necessidade de implementação de programas de rastreabilidade e certificação de produtos avícolas.

A rastreabilidade é uma ferramenta chave no processo de certificação de carnes e outros produtos, que por sua vez é essencial para a sobrevivência e o sucesso das empresas num mercado cada vez mais competitivo e exigente. Por definição, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), rastreabilidade é a capacidade de traçar o histórico, a aplicação ou a localização de um item por meio de informações previamente registradas. Entretanto, apenas dados de registro não são suficientes para assegurar as características específicas de um determinado produto.

Dessa forma, seria desejável que houvesse além de um programa eficiente de rastreabilidade na indústria avícola, uma análise de contraprova que auxiliasse a testar a veracidade das informações constantes no histórico alimentar de lotes de produtos diferenciados como os frangos com alimentação estritamente vegetal. Isso pode funcionar como um controle de qualidade para monitorar o processo de rastreabilidade e também fornecer laudos técnicos para as auditorias, como instrumento de confiabilidade (OLIVEIRA et al., 2010). O constante aprimoramento do processo de certificação de carnes de aves pode ajudar a indústria avícola brasileira com as barreiras não tarifárias impostas pelos países importadores, além de funcionar como uma ferramenta de exploração e conquista de diferentes nichos de mercado (CRUZ et al., 2012).

A metodologia dos isótopos estáveis foi usada inicialmente em estudos geológicos e arqueológicos. Nas últimas décadas tem sido aplicada de forma crescente e contínua em pesquisas agrícolas, ecológicas e fisiológicas e apresentam-se como alternativa promissora para estudos de processos relacionados à digestão, absorção e metabolismo de nutrientes em humanos e animais, assim como em estudos para identificar a procedência e qualidade de produtos de origem animal e vegetal (GANNES et al., 1998).

A razão isotópica de diferentes elementos químicos tem sido utilizada com sucesso para testar a autenticidade, a qualidade e a origem geográfica de vários produtos como sucos de frutas (NOGUEIRA et al., 2011; FIGUEIRA et al., 2011 a e b; FIGUEIRA et al., 2013), vinhos e vinagres (ROLAND et al., 2010; DUTRA et al.,

2011; DORDEVIC et al., 2012; CAMIN et al., 2013), méis (ARAUCO et al., 2008; SOUZA-KRULISKI et al., 2010; SCHELLENBERG et al., 2010), leite e produtos lácteos (CRITTENDEN et al., 2007; CHESSON et al., 2010; BONTEMPO et al., 2012), assim como identificar possíveis fraudes na comercialização do bacalhau, diferenciando o bacalhau de outros peixes salgados e secos (OLIVEIRA et al., 2011).

A razão isotópica do carbono associado a razão isotópica do nitrogênio permitiu a detecção da inclusão de subprodutos de origem animal na alimentação de frangos de corte experimentais (CARRIJO et al., 2006; GOTTMANN et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2010; ARAUJO et al., 2011; KANAYAMA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2012; CRUZ et al., 2012). Entretanto, os estudos citados acima com objetivo de rastrear a presença de subprodutos de origem animal na alimentação de frangos de corte foram realizados, até o presente momento, dentro de universidades. Para dar continuidade aos estudos faz-se necessário experimentos de campo com os frangos de corte de granjas comerciais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Isótopos estáveis

Os isótopos estáveis de carbono (C), hidrogênio (H), oxigênio (O) e nitrogênio (N) ocorrem naturalmente na biosfera. Isótopo é um termo que vem do grego: *ISO* (mesmo ou igual) e *TOPOS* (lugar), referindo-se ao fato dos elementos ocuparem o mesmo lugar na tabela periódica. O termo *estável* significa que não emitem radiação (DUCATTI, 2007).

Isótopos são átomos de um mesmo elemento químico que diferem em número de nêutrons, e por consequência apresentam diferentes massas atômicas. Por possuírem sua carga elétrica igual, ou seja, com o mesmo número de elétrons, pode-se inferir que os isótopos são elementos que apresentam as mesmas propriedades químicas e diferentes propriedades físicas (DUCATTI et al., 2011).

Cada elemento apresenta um isótopo estável mais abundante: carbono-12 (^{12}C), hidrogênio-1 (^{1}H), oxigênio-16 (^{16}O) e nitrogênio-14 (^{14}N) e um ou dois isótopos estáveis menos abundantes: carbono-13 (^{13}C), hidrogênio-2 (^{2}H), oxigênio-17 (^{17}O), oxigênio-18 (^{18}O) e nitrogênio-15 (^{15}N), expressa em átomos %. Há naturalmente a ocorrência de dois isótopos estáveis de carbono (^{12}C e ^{13}C), com abundâncias naturais

de aproximadamente 98,89 e 1,11 átomos %, respectivamente (KENNEDY & KROUSE**,** 1990). O nitrogênio possui dois isótopos estáveis, ^{14}N e ^{15}N, cujas abundâncias naturais são 99,64 e 0,36 átomos %, respectivamente (DUCATTI, 2007).

Isótopos do mesmo elemento têm comportamento químico muito semelhante, com a exceção de que isótopos mais pesados tendem a reagir com velocidade menor do que os isótopos mais leves do mesmo elemento, tendo em vista que as moléculas de isótopos mais leves têm maiores energias vibracionais, um fenomeno chamado efeito isotópico cinético. À medida que há existência do efeito isotópico cinético, a abundância natural dos isótopos no substrato pode tornar-se gradualmente enriquecida durante os processos do ciclo de elementos, se a reação é incompleta, e tais modificações são chamadas de fracionamento isotópico (SUN et al., 2011).

O segundo mecanismo que faz com que ocorra fracionamento isotópico é chamado de efeito isotópico de equilíbrio. Em reações de troca quando o equilíbrio é alcançado, isótopos pesados concentram-se onde as ligações são mais fortes. Além disso, os processos físicos, tais como evaporação, difusão e destilação e processos bioquímicos, tais como a fotossíntese, assimilação animal e transferência trófica na cadeia alimentar podem discriminar os isótopos pesados e provocar assim fracionamento isotópico significativo (SUN et al., 2011).

As moléculas isotópicas $^{12}CO_2$ e $^{13}CO_2$ não são diferenciadas pelas membranas biológicas de origem vegetal ou animal, ou seja, a pequena sutileza escondida no núcleo (nêutron a mais) não é detectada, tornando o isótopo estável do carbono-13 excelente traçador em nível de variação natural ou compostos enriquecidos, o que é extensivo para os demais bioelementos (DUCATTI et al., 2011).

A medida da razão entre isótopos, expressa em delta per mil (‰), é realizada pelo espectrômetro de massa de razões isotópicas (IRMS), com erro analítico da ordem de 0,2‰, que mede a concentração dos diferentes isótopos do elemento admitido no sistema sob a forma gasosa (H_2, CO_2, N_2 e SO_2) em relação a um padrão internacional definido. As composições isotópicas dos padrões internacionais são dadas pela Agência Internacional de Energia Atômica. O padrão internacional para os isótopos estáveis do carbono é o *Peedee Belemnite* (PDB), sendo aceito universalmente na comparação das composições isotópicas do carbono. Para os isótopos estáveis do nitrogênio, o padrão

internacional é o nitrogênio do ar atmosférico, o qual é considerado mistura isotópica homogênea na superfície terrestre (DUCATTI et al., 2011).

2.2 Isótopos estáveis e variação natural

A utilização dos isótopos estáveis ambientais na Zootecnia e a rastreabilidade nos animais começa com a sua principal fonte de alimentação: as plantas e seus subprodutos. As plantas, na sua maioria, podem ser classificadas em dois grupos principais, de acordo com a via fotossintética de fixação do CO_2: plantas do ciclo fotossintético C_3 e plantas do ciclo fotossintético C_4. Nestas plantas o primeiro composto orgânico a ser formado é um ácido carboxílico, que nas plantas C_3 possui três átomos de carbono e nas plantas C_4 possui quatro átomos de carbono. A via fotossintética C_3 é realizada pela soja, arroz, trigo, cevada, algodão, leguminosas, hortaliças, frutíferas em geral, gramíneas temperadas, entre outros, e a via fotossintética C_4 é encontrada no milho, cana de açúcar, sorgo, gramíneas de origem tropical ou subtropical, entre outras.

O CO_2 atmosférico que possui valor de $\delta^{13}C$ de aproximadamente -7,7‰ (KENNEDY & KROUSE**,** 1990), é a fonte primária de carbono para as plantas terrestres. Este carbono sofre discriminação isotópica ao longo do processo de fotossíntese, ocorrendo diminuição da concentração de ^{13}C e aumento da concentração de ^{12}C. Durante a assimilação fotossintética, as plantas do ciclo fotossintético C_3 fixam o CO_2 atmosférico através do ciclo *Calvin-Benson* e apresentam valores de $\delta^{13}C$ entre -22 e -34‰ (valor modal = -26,7‰), enquanto as plantas do ciclo fotossintético C_4 fixam o CO_2 atmosférico através do ciclo *Hatch-Slack* e apresentam valores de $\delta^{13}C$ entre -9 e -16‰ (valor modal = -12,6‰). O valor negativo indica que a planta ou seu subproduto apresenta menor concentração de ^{13}C que o padrão internacional. Portanto, as plantas C_3 e C_4 possuem assinaturas isotópicas diferentes, devido ao fracionamento que ocorre durante a fixação fotossintética do carbono (SMITH & EPSTEIN, 1971; O'LEARY, 1981; KENNEDY & KROUSE, 1990; VOGEL, 1993).

A diferença natural, da ordem de 14 per mil mais rico em carbono-13 nas plantas do ciclo fotossintético C_4, em relação às do ciclo fotossintético C_3, torna possível a utilização destas plantas e seus subprodutos como marcadores em animais, sem a necessidade de sintetizar compostos especificamente marcados, além de evitar

problemas de saúde e segurança por não serem isótopos radioativos (METGES et al., 1990).

Diferentemente do carbono, a razão isotópica do nitrogênio ($^{15}N/^{14}N$) nas plantas não depende do ciclo fotossintético realizado, e sim do modo de fixação. Entretanto, embora a atmosfera seja abundante em N_2, somente as plantas que possuem bactéria fixadora de nitrogênio conseguem fixá-lo do ar, enquanto as demais plantas o fixam por meio da incorporação de compostos nitrogenados do solo. Quando o nitrogênio é absorvido do ar atmosférico pelas bactérias fixadoras ou pelo uso de fertilizantes industriais, o valor do $\delta^{15}N$ é baixo. Na maioria das leguminosas, por realizar simbiose com micorrizas, o valor de ^{15}N varia em torno de uma unidade, próximo ao padrão ($^{15}N = 0,0 \pm 1,0‰$) (HANDLEY & RAVEN, 1992; WERNER & SCHIMIDT, 2002).

O ^{15}N das plantas que não conseguem fixar o nitrogênio atmosférico é dependente, em grande parte, da abundância isotópica do solo e da variação causada pela adubação (CHOI et al., 2002). Se for absorvido da matéria orgânica decomposta, o valor do $\delta^{15}N$ é mais significativo, ao redor de 5‰ e quando for adicionado esterco como fertilizante natural, a taxa de fracionamento é alta, com valores de $\delta^{15}N$ em torno de 10‰ (SHIBUYA et al., 2006).

Contrariamente, valores negativos de $\delta^{15}N$ são observados em solos com baixa porcentagem de matéria orgânica, em particular solos secos e arenosos ou fertilizados com adubos industriais. Conforme Yoneyama (1996), adubos nitrogenados utilizados na agricultura possuem valores de enriquecimento relativo para ^{15}N próximo a 0‰, porque a fonte de nitrogênio utilizada pelas indústrias para a fabricação de adubo é o nitrogênio atmosférico.

2.3 Isótopos estáveis na rastreabilidade de produtos avícolas com restrição ao uso de subprodutos de origem animal na dieta

As composições isotópicas dos tecidos de animais assemelham-se às suas dietas, em relação ao carbono-13 (MINSON & LUDLOW, 1975; DeNIRO & EPSTEIN, 1978; HOBSON & CLARK, 1992a, 1992b), por estar ligado aos processos metabólicos (KENNEDY & KROUSE, 1990), estar presente em todos os nutrientes capazes de gerar energia aos animais e por representar cerca de 50% dos elementos químicos que compõem o corpo dos animais superiores (MURRAY, 1990).

O valor isotópico das dietas refletido nos tecidos corporais animais varia por volta de 1‰ para o $\delta^{13}C$ (DeNIRO & ESPTEIN, 1978) e em torno de 3‰, para o $\delta^{15}N$, devido o nitrogênio do organismo animal sofrer enriquecimento em cada elevação do nível trófico (DeNIRO & EPSTEIN, 1981; KOCH et al., 1994). A integração da composição isotópica do carbono incorporado no corpo do animal e o que foi perdido na respiração e excreção deve ser igual à composição isotópica de carbono da dieta, isto é a base da maioria dos pressupostos dos experimentos que utilizam os isótopos estáveis do carbono, segundo DeNiro & Epstein (1978).

Fundamentadas nestes pressupostos, no Brasil, pesquisas utilizando os isótopos estáveis de carbono e nitrogênio estão sendo desenvolvidas no Centro de Isótopos Estáveis Ambientais do Instituto de Biociências, em conjunto com a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, ambos da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de Botucatu, no intuito de identificar a utilização de subprodutos de origem animal na alimentação animal. Tais estudos têm como objetivo atender a necessidade de métodos que auxiliem na certificação da carne de frango, visto as exigências de alguns mercados importadores e nichos de mercado interno quanto à restrição de utilização de subprodutos de origem animal na alimentação de frangos, como segue abaixo:

Frango Alternativo: normas de produção da Associação Brasileira da Avicultura Alternativa – AVAL, que teve alguns de seus tópicos descritos por Demattê Filho (2014) definem o sistema de produção de frangos alternativos ou também chamado AF (*Antibiotic Free*) como um sistema de produção de aves sem restrição de linhagem, mas criados sem o uso de antibióticos, anticoccidianos, melhoradores de desempenho de base antibiótica, quimioterápicos e ingredientes de origem animal na dieta. Os frangos alternativos podem ser totalmente confinados ou com acesso às áreas de piquete. O frango alternativo diferencia-se dos demais devido, entre outras coisas, à sua alimentação, mas não deve ser confundido com o frango orgânico, por não utilizar matérias primas orgânicas na composição da ração e nem com o frango caipira, por se tratar de um frango de crescimento mais rápido, alojado em granjas sem obrigatoriedade de acesso às áreas externas.

Frango Orgânico: sistema de produção de aves de corte definido pela lei nº 10.831, de 23/12/2003 (BRASIL, 2003), cujas especificações produtivas encontram-se principalmente descritas na Instrução Normativa nº 46 de 06/10/2011 e nº 17 de 18/06/2014 do MAPA (BRASIL, 2011 e 2014). Sua principal característica produtiva é a ração das aves com ingredientes que tenham origem orgânica certificada, cultivados sem a utilização de defensivos e fertilizantes químicos, respeitando-se o bem-estar animal e o meio ambiente, assim como sem o uso de antibióticos, anticoccidianos, melhoradores de desempenho de base antibiótica, quimioterápicos e ingredientes de origem animal na dieta. Não há restrição de linhagens, mas há necessidade de acesso a áreas externas.

Frango Caipira: o emprego da designação Frango Caipira ou Colonial; Frango Tipo ou Estilo Caipira ou Colonial foi normatizado no Brasil pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) no Ofício Circular DOI/DIPOA número sete de 19 de maio de 1999 (BRASIL, 1999) e mais recentemente pela normativa da Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT NBR 16389:2015 de 27 de Agosto de 2015 que define: regime alimentar constituído por ingredientes de origem vegetal, sendo proibido o uso de melhoradores de desempenho de base antibiótica; criação em sistema com acesso a áreas externas para pastejo e manifestação de comportamentos inerentes à espécie; linhagens exclusivas para este fim com crescimento lento (superior a 70 dias), vedadas, portanto, aquelas linhagens comerciais específicas para frango de corte; entre outros aspectos da produção, abate, processamento e identificação do frango caipira, colonial ou capoeira.

Frango *Halal:* segundo a Alimentos *Halal* Brasil os muçulmanos, de acordo com as leis islâmicas, só podem consumir alimentos *Halal.* Tudo que está em conformidade com as leis é denominado de "alimentos *Halal",* o oposto são "alimentos *Haram*", ou seja, itens de consumo ilícito de acordo com a jurisprudência islâmica. Como exemplos de alimentos *Haram* temos: qualquer animal que não foi abatido pelos métodos considerados islamicamente aceitáveis; os suínos ou qualquer derivado deles (são considerados impuros); sangue, mesmo sendo oriundo de abate *Halal*, quando é coletado separadamente da carne. Portanto, para atender este mercado consumidor da carne de frango brasileira é interessante produzir aves que se alimentem de rações

exclusivamente vegetais ou que não recebam subprodutos provenientes de suínos e farinha de sangue em sua alimentação.

Frango destinado a União Europeia: o regulamento do Parlamento Europeu e do Conselho de 21 de outubro de 2009 (CE nº 1069/2009) define regras sanitárias relativas a subprodutos animais e produtos derivados não destinados ao consumo humano, a fim de garantir um nível elevado de saúde e segurança, proibindo a administração a qualquer animal de proteínas obtidas por transformação de cadáveres da mesma espécie – ou canibalismo. Portanto, para atender este mercado consumidor da carne de frango brasileira é interessante produzir aves que se alimentem de rações exclusivamente vegetais ou que não recebam subprodutos provenientes de aves em sua alimentação.

Deste modo, Carrijo et al. (2006), utilizando as razões isotópicas de carbono e de nitrogênio, rastrearam no músculo peitoral a inclusão de farinha de carne e ossos bovinos na alimentação de frangos de corte aos 42 dias de idade. Os autores observaram que o aumento da inclusão da proteína de origem animal na ração reflete em aumento nos valores isotópicos do carbono ($\delta^{13}C$) e nitrogênio ($\delta^{15}N$) do tecido muscular, o que permitiu rastrear a adição de farinha de carne e ossos bovinos em dietas de aves.

Móri et al. (2007 e 2008) e Móri et al. (2013) detectaram a utilização de subprodutos de origem animal na alimentação de codornas japonesas no músculo peitoral, quilha e tíbia ou ovos e suas frações (gema e albúmen) respectivamente, aos 42 dias de idade, por meio da análise de isótopos estáveis de carbono e nitrogênio. Sernagiotto et al. (2013) estudaram pela mesma metodologia a inclusão de farinha de vísceras de aves na dieta de codornas japonesas, criados por longo período, onde foi retirada a ração com proteína animal e substituída por ração vegetal ou vice versa, em diferentes idades, concluindo que é possível rastrear a inclusão de farinha de vísceras de aves, no músculo peitoral de codornas, somente se este ingrediente fizer parte da alimentação da ave durante pelo menos 14 dias.

Denadai et al. (2008; 2009 e 2011) detectaram a utilização de subprodutos de origem animal na alimentação de poedeiras por meio da análise dos isótopos de carbono e nitrogênio na gema, albúmen e ovos de poedeiras comerciais. Já Madeira et al. (2015) com objetivo de verificar se a inclusão de outros ingredientes, como farelo de trigo, glúten de milho e levedura na dieta de poedeiras, poderia interferir na rastreabilidade da farinha de carne e ossos bovinos (FCOB) em ovos e suas frações (albúmen e gema),

concluíram que a detecção de 2,0% de FCOB no ovo e suas frações é possível, porém, os tratamentos com inclusão de 3,0% de glúten e ou de levedura não foram diferentes dos tratamentos com inclusão da FCOB.

Gottmann et al. (2008) e Kanayama et al. (2012) identificaram no músculo peitoral a inclusão de farinha de vísceras de aves na alimentação de frangos de corte, mesmo com a adição de outros ingredientes alternativos (farelo de trigo e levedura), que poderiam influenciar os resultados. Os autores concluíram que níveis mais elevados de inclusão de levedura podem interferir na rastreabilidade das farinhas de origem animal, entretanto, esses níveis mais altos são impraticáveis comercialmente atualmente.

Oliveira et al. (2010), analisaram músculo peitoral, quilha e tíbia de frangos de corte aos 42 dias de idade alimentados com farinha de vísceras de aves e concluíram que, em condições experimentais, a metodologia dos isótopos estáveis é capaz de rastrear a inclusão da farinha de vísceras de aves em dietas de frangos de corte, mesmo em níveis inferiores aos normalmente praticados em ambientes comerciais. Portanto, o uso das razões isotópicas de carbono ($^{13}C/^{12}C$) e nitrogênio ($^{15}N/^{14}N$) é uma ferramenta com potencial para ser usado no processo de certificação de frangos de corte alimentados com dietas sem subprodutos de origem animal para dar cumprimento às exigências de mercados específicos. No entanto, mais estudos devem ser realizados para melhorar a aplicação desta metodologia.

Semelhante conduta experimental foi realizada no músculo peitoral de frangos de corte aos 42 dias de idade onde foi retirada a ração com proteína animal e substituída por ração vegetal ou vice versa, em diferentes idades no intuito de mascarar a inclusão de ração com proteína animal. A metodologia dos isótopos estáveis somente não foi capaz de rastrear a utilização de farinha de vísceras de aves na alimentação de frangos de corte, quando esse ingrediente fez parte da dieta das aves apenas nos primeiros 7, 14 ou 21 dias de idade. Entretanto, os autores concluíram que se deve fazer a aplicação da metodologia em aves mais jovens, amostradas antes de uma eventual mudança de dieta, pois podem ter a assinatura isotópica da alimentação estabilizada em torno de duas semanas de idade (CRUZ et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2012).

Araujo et al. (2011) rastrearam a presença de farinha de vísceras de aves na alimentação de frangos de corte, por meio da analise isotópica de carbono-13 e nitrogênio-15 nas penas da região do peito, em diferentes fases de criação e concluíram

que a utilização da metodologia isotópica em penas de frango de corte detecta a utilização de farinha de vísceras na alimentação das aves, por um período de até 21 dias após a retirada desse ingrediente da dieta ou após 21 dias da inclusão da farinha de vísceras na dieta.

Gottmann (2010) trabalhou com inclusão de farinha de vísceras de aves (4%) em diferentes períodos de criação na alimentação de frangos de corte e analisou isotopicamente o sangue e músculo peitoral semanalmente. A autora concluiu que para garantir a detecção de farinha de vísceras na alimentação de frangos de corte em determinado período da criação é necessário a coleta de mais de um tipo de tecido/fração corporal e coletar estas amostras ao longo do período de criação e não somente no final do período produtivo.

Os estudos realizados para avaliar a inclusão de subprodutos de origem animal na dieta de frangos de corte realizados até o presente momento foram conduzidos dentro de universidades, ou seja, onde as possíveis variações dos valores isotópicos das dietas são menores e controláveis, pois os ingredientes são geralmente adquiridos de um mesmo lote ou local de produção. Para dar continuidade aos estudos faz-se necessário experimentos de campo com os frangos de corte de granjas comerciais.

Diante do exposto, o Capítulo 2 denominado **"Rastreabilidade de subprodutos de origem animal no músculo peitoral e mucosa intestinal de frangos de corte de granjas comerciais por $\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$"**, apresenta-se de acordo com as normas para publicação na **Revista Animal Science Journal**, tendo como objetivo rastrear a presença de subprodutos de origem animal na alimentação de frangos de corte de granjas comerciais por meio da metodologia dos isótopos estáveis de carbono e nitrogênio ($\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$) no músculo peitoral e mucosa intestinal, assim como iniciar um banco de dados dos valores isotópicos e bromatológicos dos ingredientes da ração de maior interesse na avicultura de corte.

O Capítulo 3 denominado **"Detecção de subprodutos de origem animal por $\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$ no sangue e penas de frangos de corte de granjas comerciais"**, apresenta-se de acordo com as normas para publicação na **Revista Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, tendo como objetivo rastrear a presença de

subprodutos de origem animal na alimentação de frangos de corte de granjas comerciais por meio da metodologia dos isótopos estáveis de carbono e nitrogênio ($\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$) no sangue e penas.

3. REFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual 2015.** Disponível: <http://abpabr.com.br/files/publicacoes/c59411a243d6dab1da8e605be58348ac.pdf>. Acesso em: 02 de Dezembro de 2015.

ARAUCO, E.M.R.; FUNARI, S.R.C.; DUCATTI, C.; SILVA, E.T.; VENTURINI FILHO, W.G.; VANDERLINDE, R. Variabilidade isotópica do nitrogênio ($\delta^{15}N$) e carbono ($\delta^{13}C$) em proteína de méis brasileiros. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.11, p.190-193, 2008.

ARAUJO, P.C.; SARTORI, J.R.; CRUZ, V.C.; PEZZATO, A.C.; DUCATTI,C.; STRADIOTTI, A.C.; PELICIA, V.C. Rastreabilidade de farinha de vísceras de aves por isótopos estáveis em penas de frangos de corte. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, n.5, p.538-545, 2011.

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.99-104, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Instrução **Normativa n.46,** de 07 de outubro de 2011. Estabelece o regulamento técnico para os sistemas orgânicos de produção animal e vegetal, bem como as listas de substâncias permitidas para usos nestes sistemas. **Diário Oficial [da] União,** Brasília, DF.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Instrução **Normativa n.17,** de 18 de junho de 2014. Alterar os artigos 1º, 2º, 3º, 8º, 13, 14, 15, 20, 21, 29, 34, 35, 38, 39, 42, 59, 60, 63, 80, 81, 82, 85, 89, 100, 101, 103, 106, 108, todos da Instrução Normativa nº 46, de 6 de outubro de 2011. **Diário Oficial [da] União,** Brasília, DF.

BRASIL. Ofício Circular DOI / DIPOA **n. 007/99** de 19 de maio de 1999. Dispõe sobre o Registro do Produto "Frango Caipira ou Frango Colonial" ou "Frango Tipo ou Estilo Caipira" ou "Tipo ou Estilo Colonial". **Diário Oficial [da] União,** Brasília, DF.

BRASIL. Presidência da República. Casa Civil. **Lei n.10.831,** de 23 de dezembro de 2003. Dispõe sobre a agricultura orgânica e dá outras providências. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/2003/L10.831.htm>. Acesso em: 18 de novembro de 2015.

CAMIN, F.; BONTEMPO, L.; PERINI, M.; TONON, A.; BREAS, O.; GUILLOU, C.; MORENO-ROJAS, J.M.; GAGLIANO, G. Control of wine vinegar authenticity through $\delta^{18}O$ analysis. **Food Control**, v.29, n.1, p.107-111, 2013.

CARRIJO, A.S.; PEZZATO, A.C.; DUCATTI, C.; SARTORI, J.R.; TRINCA, L.; SILVA, E.T. Traceability of Bovine Meat and Bone Meal in Poultry by Stable Isotope Analysis. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.8, n.1, p.63-68, 2006.

CHESSON, L.A.; VALENZUELA, L.O.; O'GRADY, S.P.; CERLING, T.E; EHLERINGER, J.R. Hydrogen and Oxygen Stable Isotope Ratios of Milk in the United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p.2358-2363, 2010.

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

CRITTENDEN, R.G.; ANDREW, A.S.; LEFOURNOUR, M.; YOUNG, M.D.; MIDDLETON, H.; STOCKMANN, R. Determining the geographical origin of milk in Australasia using multi-element stable isotope ratio analysis. **International Dairy Journal**, v.17, p.421–428, 2007.

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 ($^{13}C/^{12}C$) and nitrogen ($^{15}N/^{14}N$) stable isotopes. **Poultry Science**, v.91, p.478-486, 2012.

DEMATTÊ FILHO, L.C. **Sistema agroalimentar da avicultura fundada em princípios da Agricultura Natural: multifuncionalidade, desenvolvimento territorial e sustentabilidade**. 2014. 252 f. Tese (Doutorado em Ciências: Área de Concentração Ecologia Aplicada) – Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Centro de Energia Nuclear na Agricultura.

DENADAI, J.C.; DUCATTI, C.; SARTORI, J.R.; PEZZATO, A.C.; MORI, C.; MITUO, M.A.O.; BORDINHON, A.M. The traceability of animal meals in layer diets as detected by stable carbon and nitrogen isotope analyses of eggs. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.10, p.147-152, 2008.

DENADAI, J.C.; DUCATTI, C.; SARTORI, J.R.; PEZZATO, A.C.; MORI, C; GOTTMANN, R.; MITUO, M.A.O. Rastreabilidade da farinha de carne e ossos bovinos em ovos de poedeiras alimentadas com ingredientes alternativos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** v.44, p.1-7, 2009.

DENADAI, J.C.; DUCATTI, C.; SARTORI, J.R.; PEZZATO, A.C.; MORI, C; GOTTMANN, R.. Rastreabilidade da farinha de carne e ossos bovinos em ovos de poedeiras comerciais pela técnica dos isótopos estáveis do carbono e nitrogênio. **Revista Brasileira de Zootecnia,** v.40, p.2760-2766, 2011.

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

DeNIRO M.J, EPSTEIN S. Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. **Geochimica et Cosmichimica Acta,** v.45, p.341-351, 1981.

DORDEVIC, N.; WEHRENS, R.; POSTMA, G.J.; BUYDENS, L.M.C.; CAMIN, F. Statistical methods for improving verification of claims of origin for Italian wines based on stable isotope ratios. **Analytica Chimica Acta**, v.757, p.19-25, 2012.

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

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.

DUTRA, S.V.; ADAMI, L.; MARCON, A.R.; CARNIELI, G.J.; ROANI, C.A.; SPINELLI, F.R.; LEONARDELLI, S.; DUCATTI, C.; MOREIRA, M.Z.; VANDERLINDE, R. Determination of the geographical origin of Brazilian wines by isotope and mineral analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.401, p.1575-1580, 2011.

FIGUEIRA, R.; NOGUEIRA, A.M.P.; VENTURINI FILHO, W.G.; DUCATTI, C.; MISCHAN, M.M. Análise isotópica ($\delta^{13}C$) e legalidade em suco e polpa de caju. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.14, n.4, p.317-324, 2011a.

FIGUEIRA, R.; VENTURINI FILHO, W.G.; DUCATTI, C.; PARENTE NOGUEIRA, A.M. Isotope analysis ($\delta^{13}C$) of pulpy whole apple juic. **Food Science and Technology** v.31, n.3, p.660-665, 2011b.

FIGUEIRA, R.; VENTURINI FILHO, W.G.; DUCATTI, C. Carbon isotope analysis in apple nectar beverages. **Food Science and Technology**, v.33, n,1, p. 32-37, 2013.

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, n.3, p.725-737, 1998.

GOTTMANN, R. **Detecção de farinha de vísceras nas fases de alimentação em frangos de corte pela técnica dos isótopos estáveis**. 2010. 104 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Câmpus de Botucatu.

GOTTMANN, R.; PEZATTO, A.C.; DUCATTI, C.; DENADAI, J.C.; MÓRI, C.; MITUO, M.A.O.; SARTORI, J.R. Rastreabilidade de subprodutos de origem animal em dietas com levedura e trigo para frangos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.12, p.1641-1647, 2008.

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.

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, 1992a.

HOBSON, K.A.; CLARK, R.G. Assessing avian diets using stable isotopes II: factors influencing diet-tissue fractionation. **The Condor**, v.94, p.189-197, 1992b.

KANAYAMA, J.S.; PEZZATO, A.C.; SARTORI, J.R.; DUCATTI, C.; NOVAES, V.H.C.; FASCINA, V.B.; ARAUJO, P.C.; CARVALHO, F.B. Traceability of animal by product meals in broilers fed sugarcane yeast using stable isotopes. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.14, n.1, p.51-55, 2012.

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.

KOCH, P.L.; FOGEL, M.L.; TURONS, N. **Tracing the Diets of Fossil Animals Using Stable Isotope** in: Lajtha K, Michener RH. editors. Stable in Ecology and Environmental Science. Blackwell Scientific Publication. p.63-92, 1994.

MADEIRA, L.A.; DENADAI, J.C.; DUCATTI, C.; PEZZATO, A.C.; ARAUJO, P.C.; SARTORI, M.M.P.; PIZZOLANTE, C.C.; SARTORI, J.R. Assessment of low amounts of meat and bone meal in the diet of laying hens by using stable isotopes. **Semina: Ciências Agrárias Londrina**, v.36, n.2, p.1155-1168, 2015.

METGES, C.; KEMPE, K.; SCHIMIDT, H.L. Dependence of the carbon isotope contents of breath carbon dioxide, milk, serum and rumen fermentation products on the $\delta^{13}C$ value of food in dairy cows. **British Journal of Nutrition**, v.63, p.187-196, 1990.

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

MÓRI, C.; GARCIA, E.A.; DUCATTI, C.; DENADAI, J.D.; PELICIA, K.; GOTTMANN, R.; MITUO, M.A.O.; BORDINHON, A.M. Traceability of animal byproducts in quail (Coturnix coturnix japonica) tissues using carbon ($^{13}C/^{12}C$) and nitrogen ($^{15}N/^{14}N$) stable isotopes. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.9, p.263-269, 2007.

MÓRI, C.; GARCIA, E.A.; DUCATTI, C.; DENADAI, J.D.; PELICIA, K.; GOTTMANN, R.; MITUO, M.A.O. Poultry offal meal traceability in meat quail tissues using the technique of stable carbon ($^{13}C/^{12}C$) and nitrogen ($^{15}N/^{14}N$) isotopes. **Brazilian Journal of Poultry Science,** v.10, p.45-52, 2008.

MÓRI, C.; DUCATTI, C.; PIZZOLANTE, C.C.; KAKIMOTO, S.K.; DENADAI, J.C. Traceability of animal meals in Japanese quail eggs using the technique of ^{13}C e ^{15}N stable isotopes. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.15, n.1, p.59-64, 2013.

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

NOGUEIRA, A.P.; FIGUEIRA, R.; DUCATTI, C.; VENTURINI FILHO, W.G. Análise isotópica ($\delta^{13}C$) para detecção de adulteração em néctares de pêssego. **Brazilian Journal of Food Technology,** v.14, p.115-124, 2011.

O'LEARY, M.H. Carbon isotope fractionation plants. **Phytochemistry**, v.20, n.4, p.553-567, 1981.

OLIVEIRA, E.J.V.M.; SANT'ANA, L.S.; DUCATTI, C.; DENADAI, J.C.; SOUZA-KRULISKI, C.R. The use of stable isotopes for authentication of gadoid fish species. **European Food Research & Technology**, v.232, p.97-101, 2011.

OLIVEIRA, R.P; DUCATTI, C.; CARRIJO, A.S.; PEZZATO, A.C.; DENADAI, J.C.; SARTORI, J.R.; CRUZ, V.C. Isotopic traceability in body tissues and in different breeding periods of broilers. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, n.5, p.1325-1334, 2012.

OLIVEIRA, R.P; DUCATTI, C.; PEZZATO, A.C.; DENADAI, J.C.; CRUZ, V.C.; SARTORI, J.R.; CARRIJO, A.S.; CALDARA, F.R. Traceability of poultry offal meal in broiler feeding using isotopic analysis ($\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$) of different tissues. **Brazilian Journal of Poultry Science,** v.12, p.13-20, 2010.

ROLAND, A.; SCHNEIDER, R.; LE GUERNEVÉ, C.; RAZUNGLES, A.; CAVELIER, F. Identification and quantification by LC–MS/MS of a new precursor of 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) using stable isotope dilution assay: Elements for understanding the 3MH production in wine. **Food Chemistry**, v.121, p.847-855, 2010.

SCHELLENBERG, A.; CHMIELUS, S.; SCHLICHT, C.; CAMIN, F.; PERINI, M.; BONTEMPO, L. Multielement Stable Isotope Ratios (H, C, N, S) of honey from different European regions. **Food Chemistry**, v.121, p.770–777, 2010.

SERNAGIOTTO, E.R.; DUCATTI, C.; SARTORI, J.R.; STRADIOTTI, A.C.; MARUNO, M.K.; ARAUJO, P.C.; CARVALHO, F.B.; PEZZATO, A.C. The use of carbon and nitrogen stable isotopes for the detection of poultry offal meal in meat-type quail feeds. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.15, n.1, p.65-70, 2013.

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.

SMITH, B.N.; EPSTEIN, S. Two categories of $^{13}C/^{12}C$ ratios of higher plants. **Plant Physiology,** v.47, p.380-384, 1971.

SOUZA-KRULISKI, C.R.; DUCATTI, C.; VENTURINI FILHO, W.G.V.; ORSI, R.O.; SILVA, E.T. Estudo de adulteração em méis brasileiros através de razão isotópica do carbono. **Ciência e Agrotecnologia**, v.34, n.2, p.434-439, 2010.

SUN, Z.; MOU, X.; LI, X.; WANG, L.; SONG, H.; JIANG, H. Application of Stable Isotope in Studies of Carbon and Nitrogen Biogeochemical Cycles of Ecosystem. **Chinese Geographical Science**, v.21, n.2, p.129-148, 2011.

VOGEL, J.C. **Variability of carbon isotope fractionation during photosynthesis**. In: EHLERINGER, J. R.; HALL; A. E.; FAQUHAR, G. D. (ed). Stable isotopes and plant carbon-water relations. San Diego: Academic Press Inc., p.29-46, 1993.

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}N abundances of soils.** In: BOUTTON, T.W.; YAMASAKI, S.I. (Eds.). Mass spectrometry of soils. New York: Marcel Dekker, p.205-224, 1996.

CAPÍTULO 2

RASTREABILIDADE DE SUBPRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL NO MÚSCULO PEITORAL E MUCOSA INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE DE GRANJAS COMERCIAIS POR $\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$

RASTREABILIDADE DE SUBPRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL NO MÚSCULO PEITORAL E MUCOSA INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE DE GRANJAS COMERCIAIS POR $\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$

RESUMO – Objetivou-se rastrear a presença de subprodutos de origem animal na alimentação de frangos de corte de granjas comerciais por meio da metodologia dos isótopos estáveis de carbono e nitrogênio ($\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$), no músculo peitoral e mucosa intestinal, assim como iniciar um banco de dados de valores bromatológicos e isotópicos dos ingredientes da ração de maior interesse na avicultura de corte. Foram amostradas aleatoriamente oito aves (machos) semanalmente de sete granjas de diferentes empresas avícolas dentro do Estado de São Paulo para obtenção das amostras de músculo peitoral e mucosa intestinal. Nos mesmos dias de coletas foram retiradas três amostras aleatórias de ração, adquiridas dos comedouros de cada granja. Para o banco de dados foram amostrados os ingredientes milho, soja, farelo de soja e farinhas de origem animal dos departamentos de recepção e controle de qualidade dos ingredientes das fabricas de ração visitadas. Todas as amostras foram submetidas à análise de espectrometria de massa de razão isotópica, sendo que a ração também foi avaliada quanto à presença de *DNA* de origem animal por *PCR*. Os dados isotópicos das amostras foram submetidos à análise de variância em cada idade de coleta, sendo complementados pelo teste de *Tukey*, e o conjunto de todos os dados foram avaliados pelas análises multivariadas de componentes principais e discriminante linear. Foi possível verificar pela análise de *PCR* na ração que somente as empresas D e F utilizaram ração estritamente vegetal ao longo do período de criação das aves. Houve diferença entre os valores isotópicos da ração, músculo peitoral e mucosa intestinal das aves das empresas D e F em relação às demais, sendo esta mais definida para o $\delta^{15}N$ dos sete aos 42 dias de idade. Esse mesmo resultado foi obtido pelas análises multivariadas. Portanto, foi possível diferenciar as empresas que utilizaram alimentação estritamente vegetal em relação às demais, demonstrando a possibilidade de rastrear a presença de subprodutos de origem animal na alimentação dos frangos de corte de granjas comerciais pela metodologia dos isótopos estáveis.

Palavras-chave: análises multivariadas, isótopos estáveis, *PCR*

TRACEABILITY OF ANIMAL BY-PRODUCTS IN PECTORAL MUSCLE AND INTESTINAL MUCOSA OF COMMERCIAL BROILER FARMS BY $\delta^{13}C$ AND $\delta^{15}N$

ABSTRACT – The aim of this study was to trace the presence of animal by-products in commercial broiler farms feed using the methodology of stable isotope ratios of carbon and nitrogen ($\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$) in the pectoral muscle and intestinal mucosa, and start a database of bromatological and isotopic values of feed ingredients with greatest interest in poultry production. Eight male birds were sampled randomly week-by-week in seven broiler farms of different poultry companies in the São Paulo State to obtain samples of pectoral muscle and intestinal mucosa. Were taken on the same day of sampling three random samples of feed, acquired from feeders of each commercial broiler unit. For the database were sampled corn, soybean, soybean meal and animal by-products obtained from reception and quality control departments of visited feed factories. All samples were analyzed using isotope ratio mass spectrometry, and feed was also evaluated for the presence of animal *DNA* by *PCR* analysis. The isotopic data of the samples were submitted to analysis of variance in each age collection, complemented by *Tukey* test, and the set of all data were analyzed by multivariate analysis of major and linear discriminant components. It was verified by *PCR* analysis in feed that only D and F companies used strictly vegetable diet throughout the period of raising birds. There was difference between isotopic values of feed, pectoral muscle, and intestinal mucosa of birds from D and F companies compared with others, which is most definitely for the $\delta^{15}N$ from seven to 42 days old. The same result was obtained by multivariate analysis. Therefore, it was possible to differentiate the companies that used strictly vegetable diet from the others, demonstrating the ability to trace the presence of animal by-products in commercial broiler farms feed using the methodology of stable isotopes.

Keywords: multivariate analysis, *PCR*, stable isotope

INTRODUÇÃO

As crises alimentares dos anos 90, como a epidemia da Encefalopatia Espongiforme Bovina, puseram em evidência o papel dos subprodutos animais não destinados ao consumo humano na propagação de certas doenças transmissíveis. O regulamento do Parlamento e do Conselho Europeu de 21 de outubro de 2009 (CE) nº 1069/2009 define regras sanitárias relativas a subprodutos animais e produtos derivados não destinados ao consumo humano, a fim de garantir um nível elevado de saúde e segurança, proibindo, nomeadamente, a alimentação de qualquer animal de produção com subprodutos de origem animal derivados de sua própria espécie ou canibalismo.

A tendência dos consumidores em adquirir alimentos saudáveis, que se tenha conhecimento sobre a origem, valor nutricional e qualidade, tem aumentado juntamente com a preocupação acerca da segurança alimentar. Esta mudança na tendência dos consumidores como, por exemplo, interesse por carne de animais que não se alimentem com subprodutos de origem animal, é um dos principais fatores que estimulam a busca de métodos que permitam a certificação dos produtos de origem animal (CRUZ et al., 2012).

Para identificar a presença de subprodutos de origem animal em rações para animais, muitos métodos têm sido propostos que em sua maioria são moleculares como *Polymerase Chain Reaction* (PCR) ou reação em cadeia da polimerase. O método de *PCR* consiste em testar *primers* específicos para o gene do citocromo B do *DNA* mitocondrial de bovinos e suínos e do gene de colágeno para detecção de produto de aves em rações animais (KRCMAR & RENCOVA, 2003; DENADAI et al., 2008).

A metodologia estabelecida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), como padrão oficial para detecção de proteína animal em rações de animais ruminantes é a microscopia. Segundo Sanches et al. (2006) a metodologia é capaz de identificar a presença de farinha de carne e ossos, ossos cozidos no vapor, sangue, farinhas de penas e peixes a partir de 0,05% de inclusão e acima de 0,10% para farinha de vísceras de aves. Entretanto, nenhum destes métodos é realizado com o produto final da produção animal e sim com as rações em si, o que permite adulteração da ração antes ou após análises não fornecendo a garantia de que a ração analisada seja a mesma que foi fornecida ao animal. Portanto, a metodologia dos isótopos estáveis garante segurança ao consumidor, pois é aplicada a carne, leite, ovos,

entre outros possibilitando atestar se a ração analisada é a mesma que foi fornecida ao animal.

Nesse sentido, tornam-se importantes estudos de metodologias que sirvam como ferramentas de garantia da autenticidade das informações constantes no histórico alimentar de lotes de produtos diferenciados, como por exemplo frango alternativo, orgânico e caipira cuja alimentação deve ser isenta de subprodutos de origem animal entre outras requisitos. Outro aspecto relevante e pouco estudado é a variação dos valores isotópicos dos diferentes ingredientes que compõe as rações dos frangos de corte, sendo que estes podem variar de acordo com o solo, adubação, clima e localização geográfica (SUN et al., 2011), tornando de grande valia a obtenção de um banco de dados dos valores isotópicos e bromatológicos dos ingredientes de maior interesse para as rações da avicultura de corte.

Portanto, objetivou-se rastrear a presença de subprodutos de origem animal na alimentação de frangos de corte de granjas comerciais por meio da metodologia dos isótopos estáveis de carbono e nitrogênio ($\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$) no músculo peitoral e mucosa intestinal, assim como iniciar um banco de dados dos valores isotópicos e bromatológicos dos ingredientes da ração de maior interesse na avicultura de corte.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa em questão está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (protocolo nº 16/2013-CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Câmpus de Botucatu.

Foram amostradas sete granjas de frangos de corte escolhidas dentro do Estado de São Paulo de diferentes empresas (denominadas de A, B, C, D, E, F e G), sendo que duas delas sabidamente utilizam ração estritamente vegetal ao longo de todo o período de produção (D e F). Nestes locais foram colhidas informações sobre o sistema de produção utilizado, esquema nutricional, mercado que irá atender, dentre outras.

A coleta das amostras foi realizada semanalmente, ou seja, no alojamento e aos sete, 14, 21, 28, 35 e 42 dias de idade, onde foram retiradas aleatoriamente oito aves (machos) de cada granja amostrada. Estas aves foram pesadas, identificadas

individualmente por anilhas numeradas. Posteriormente, as aves foram eutanasiadas por deslocamento cervical e realizou-se a retirada manual do músculo peitoral (com osso e sem pele) e sua pesagem em balança semi-analítica, assim como a coleta da mucosa intestinal. Ao mesmo tempo foram retiradas de dentro de cada galpão coletado três amostras aleatórias da ração ofertada aos animais.

As amostras do músculo peitoral foram obtidas a partir de corte de uma fatia de 5 cm no sentido transversal do terço médio longitudinal do *Pectoralis major* esquerdo e as amostras de mucosa intestinal foram coletadas da porção do duodeno (a partir do piloro até a porção distal da alça duodenal), o qual foi aberto pela sua borda mesentérica, lavado com água destilada e realizada a raspagem com uma lâmina histológica de vidro. Todas as amostras coletadas foram devidamente identificadas e congeladas a -20ºC até o momento da preparação para as análises isotópicas.

Para o banco de dados foram amostrados os ingredientes de maior interesse para avicultura de corte, como milho, soja e farelo de soja e farinhas de origem animal, dos departamentos de recepção e controle de qualidade dos ingredientes das fabricas de ração das empresas visitadas.

As análises isotópicas foram realizadas no Centro de Isótopos Estáveis do Instituto de Biociências da UNESP, Câmpus de Botucatu. As análises bromatológicas foram realizadas no Laboratório de Bromatologia do Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal da FMVZ - UNESP, Câmpus de Botucatu. As amostras submetidas às análises bromatológicas foram avaliadas em duplicata em relação aos teores de umidade, proteína bruta, extrato etéreo, fibra bruta e matéria mineral, segundo metodologias descritas pela AOAC (1995).

A análise de *PCR* na ração foi realizada pelo laboratório Simbios Biotecnologia® utilizando o gene citocromo B do *DNA* mitocondrial como alvo para detecção de *DNA* de origem bovina e suína (*Bos taurus/Bos indicus; Sus scrofa domesticus,* respectivamente*)* e o gene para colágeno tipo VI (subunidade alfa2) para aves (*Gallus gallus/Meleagris gallopavo).* Os procedimentos utilizados nos testes do laboratório foram desenvolvidos a partir do protocolo validado na Europa (KRCMAR & RENCOVA, 2003), seguindo a mesma proporção de amostra por volume de reagentes e a mesma quantidade de amostra amplificada por reação.

Para realização das análises isotópicas as amostras de ração, ingredientes e músculo peitoral foram descongeladas, lavadas em água destilada (somente músculo peitoral) e secas em estufa de ventilação forçada (Marconi – Ma 035), à temperatura de 56^{o}C por 48 horas. As amostras de mucosa intestinal foram descongeladas e secas à vácuo a -55ºC com pressão em torno de 50 µHg por 48h em liofilizador L108 (LioTop®).

Após a secagem as amostras foram moídas em moinho criogênico modelo Spex Sample, Geno/Grinder 2010, à -196ºC, por meio do seguinte procedimento: aproximadamente 2,0 g de amostra foram acondicionados em frasco de policarbonato juntamente com três esferas de aço inoxidável (modelo 440, sem óleo/graxa), em seguida foi devidamente identificado, fechado e imerso em nitrogênio líquido para congelamento por 3 minutos; após o congelamento os frascos com as amostras foram depositados em suporte de inox e introduzidos no moinho; pelo impacto entre a amostra congelada e as esferas, estas foram pulverizadas em um programa de frequência de 900 rpm, por 10 minutos em média, para obter-se um material homogêneo e de partículas de granulometria menor que 60 µm.

Após serem moídas as amostras foram pesadas, utilizando-se balança analítica de alta sensibilidade (*Mettler* Toledo XP6), em cápsulas de estanho, para determinação das razões isotópicas do carbono e nitrogênio conforme Tabela 1.

Tabela 1. Peso das amostras (µg) para determinação das razões isotópicas do carbono e nitrogênio.

Amostra	Carbono	Nitrogênio
Músculo Peitoral	50-70	500-600
Mucosa Intestinal	50-70	500-600
Ração	50-70	2100-2200
Milho	50-70	5000-5200
Farelo de soja/soja integral	50-70	1200-1500
Farinha de carne/vísceras	50-70	1200-1500
Farinha de penas	50-70	500-600

As cápsulas foram introduzidas por meio de amostrador automático no analisador elementar (*Flash* 2000 *Organic Elemental Analyzer EA for IRMS*), no qual, em presença de oxigênio (O_2) e óxido de cobre (CuO), foram queimadas para a obtenção de CO_2 e NOx; este último foi então reduzido a N_2 na presença de cobre. Os gases formados foram separados em coluna cromatográfica gasosa e analisados no espectrômetro de massas de razões isotópicas (*Delta V Advantage Isotope Ratio MS*, *Thermo Scientific*, Alemanha).

Os resultados das análises foram expressos em per mil (‰), na terminologia isotópica (δ), relativos aos padrões internacionais *Peedee Belemnite* (PDB) para o ^{13}C e nitrogênio do ar atmosférico para ^{15}N, de acordo com a seguinte equação geral:

$$\delta X_{(amostra,\ padrão)} = (r_{amostra} - r_{padrão}) / r_{padrão}$$

Onde:

δ X = enriquecimento do isótopo mais pesado do elemento químico X (C ou N) da amostra em relação ao respectivo padrão internacional (adimensional).

r = razão isotópica entre o isótopo menos e o mais abundante, em particular $^{13}C/^{12}C$ e $^{15}N/^{14}N$ (adimensional).

Os dados isotópicos do músculo peitoral, mucosa intestinal e ração foram avaliados em cada idade de coleta pela análise de variância, sendo complementados pelo teste de *Tukey* a 5% de probabilidade. O conjunto de todos os dados foram avaliados pelas análises multivariadas de componentes principais e discriminante linear, com auxílio do programa computacional Minitab 16 (2010), conforme determinado por Sartori et al. (2012) como análise estatística adequada para a discriminação isotópica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O questionário realizado junto às diferentes empresas avícolas (Tabela 2) veio corroborar a análise de *PCR* na ração (Tabela 3), em que somente as empresas D e F utilizaram ração estritamente vegetal ao longo do período de criação das aves. Também foi possível notar que as demais empresas que utilizaram ração com inclusão de subprodutos de origem animal apresentaram *DNA* das três espécies testadas (bovinos, suínos e aves).

Tabela 2. Informações das diferentes empresas avícolas no estado de São Paulo quanto ao mercado destino, linhagem utilizada e esquema nutricional.

Empresa	Mercado		Linhagem	Fases/ Rações*	Ingredientes alternativos	Subprodutos de Origem Animal		
	Interno	Externo				Ave	Bovino	Suíno
A	Sim	Não	*Cobb*	4	Sim, sorgo	Sim	Sim	Não
B	Sim	Sim	*Cobb*	4	Não	Sim	Sim	Não
C	Sim	Não	*Cobb*	4	Não	Sim	Sim	Não
D	Sim	Não	*Cobb Slow*	5	Não	Não	Não	Não
E	Sim	Sim	*Cobb Slow*	4	Não	Sim	Sim	Não
F	Sim	Não	*Cobb*	4	Não	Não	Não	Não
G	Sim	Não	*Cobb/Ross*	4	Sim, sorgo	Sim	Sim	Não

Informações cedidas pelas próprias empresas; * 4 = pré-inicial, inicial, crescimento e final e 5 = inicial, crescimento, engorda 1 e 2 e final.

Tabela 3. Detecção de *DNA** de origem animal em rações de frangos de corte de diferentes empresas avícolas no estado de São Paulo pela técnica de *PCR***.

Empresas	Dias de coleta da ração/idade em dias dos frangos de corte						
	0	7	14	21	28	35	42
A	+	+	+	+	+	+	+
B	+	+	+	+	+	+	+
C	+	+	+	+	+	+	+
D	-	-	-	-	-	-	-
E	+	+	+	+	+	+	+
F	-	-	-	-	-	-	-
G	+	+	+	+	+	+	+

**Deoxyribonucleic acid*/Ácido desoxirribonucléico; ***Polymerase Chain Reaction*/Reação em Cadeia da Polimerase; Positivo (+) = presença de *DNA* de origem animal de três espécies [bovinos (*Bos taurus/Bos indicus*), suínos (*Sus scrofa domesticus*) e aves (*Gallus gallus/Meleagris gallopavo*); Negativo (-) = ausência de *DNA* de origem animal; n=3.

Fato importante, pois algumas destas empresas atendem a mercados importadores da carne de frango com exigências específicas, como não conter subprodutos de suínos (mercado muçulmano) nas rações dos frangos de corte. Apesar de estas empresas

informarem não utilizar subprodutos de suínos em suas rações, em todas as amostras de ração das empresas A, B, C, E e G foram encontradas presença de *DNA* suíno. Pode-se sugerir que possivelmente existiu contaminação das farinhas de origem bovina e/ou de aves com subprodutos de suínos.

Observando os resultados isotópicos das rações coletadas ($\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$) verificou-se um enriquecimento isotópico tanto para o carbono quanto para o nitrogênio das rações coletadas nas fases inicias de criação em relação às rações coletadas nas fases finais (Tabelas 4 e 5; Figuras 1 e 2). Esse comportamento pode ser devido ao fato das rações finais serem mais energéticas e menos protéicas, em relação às inicias, com maior quantidade de milho e menor quantidade de farelo de soja nas rações finais.

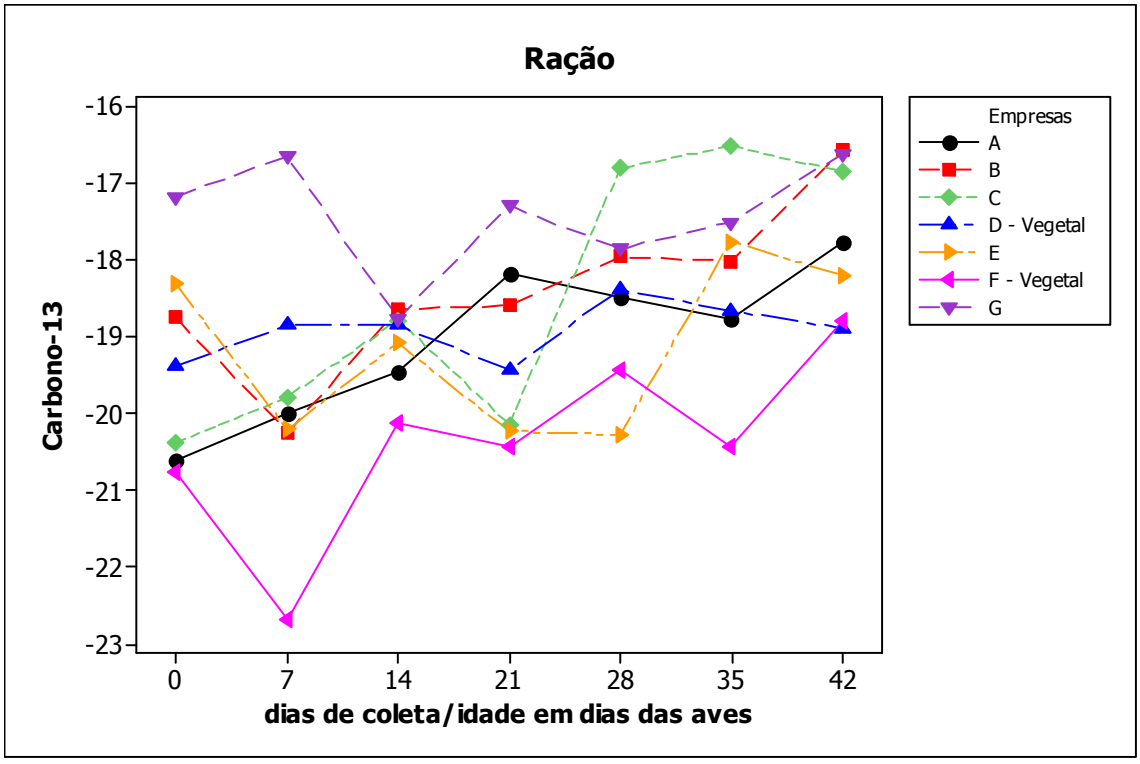


Figura 1. Valores isotópicos médios de carbono ($\delta^{13}C$) da ração coletada ao longo do período de criação (do alojamento aos 42 dias de idade) de diferentes empresas avícolas (empresas A, B, C, E e G utilizam ração com inclusão de subprodutos de origem animal na alimentação dos frangos e as empresas D e F utilizam ração estritamente vegetal).

Em relação ao carbono, esta mudança de composição tornou as dietas finais mais ricas em ^{13}C, pois o milho, uma planta do ciclo fotossintético C_4, é em média 14 per mil

mais ricas em ^{13}C do que as plantas do ciclo fotossintético C_3, como a soja (SMITH & EPSTEIN, 1971; O'LEARY, 1981; KENNEDY & KROUSE, 1990; VOGEL, 1993). Em relação ao nitrogênio, a mudança de composição tornou as dietas finais mais ricas em ^{15}N que as inicias, pois o milho apesar de depender dos compostos nitrogenados do solo, é em média mais rico em ^{15}N que a soja.

A maioria das leguminosas, por exemplo, a soja por realizar simbiose com micorrizas, tem o valor de ^{15}N variando em torno de uma unidade, próximo ao padrão ($^{15}N = 0,0 \pm 1,0‰$) (HANDLEY & RAVEN, 1992; WERNER & SCHIMIDT, 2002). O ^{15}N das plantas que não conseguem fixar o nitrogênio atmosférico, como o milho, é dependente, em grande parte, da abundância isotópica do solo e da variação causada pela adubação (CHOI et al., 2002). Se for absorvido da matéria orgânica decomposta, o valor do $\delta^{15}N$ é mais significativo, ao redor de 5‰ (SHIBUYA et al., 2006).

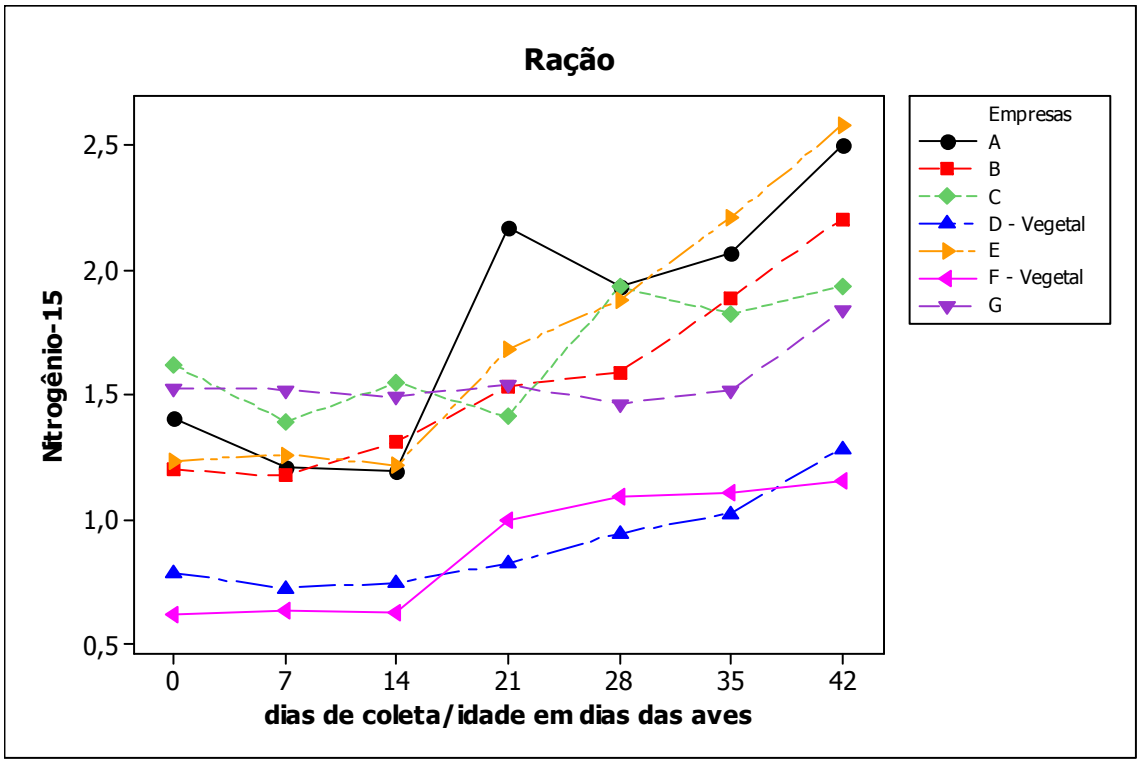


Figura 2. Valores isotópicos médios de nitrogênio ($\delta^{15}N$) da ração coletada ao longo do período de criação (do alojamento aos 42 dias de idade) de diferentes empresas avícolas (empresas A, B, C, E e G utilizam ração com inclusão de subprodutos de origem animal na alimentação dos frangos e as empresas D e F utilizam ração estritamente vegetal).

Tabela 4. Valores médios de $\delta^{13}C$ (média ± desvio padrão) da ração de frangos de corte de diferentes empresas avícolas ao longo do período de criação.

Empresas	Idade em dias						
	0	7	14	21	28	35	42
A	-20,61 D ±0,26	-19,99 C ±0,13	-19,46 BC ±0,18	-18,19 AB ±0,45	-18,49 B ±0,14	-18,76 C ±0,33	-17,78 B ±0,37
B	-18,75BC ±0,29	-20,24 C ±0,46	-18,65 A ±0,50	-18,59 BC ±0,45	-17,96 B ±0,50	-18,02 BC ±0,56	-16,57 A ±0,17
C	-20,39 D ±0,33	-19,79 BC ±0,41	-18,79 AB ±0,14	-20,15 D ±0,49	-16,80 A ±0,25	-16,52 A ±0,24	-16,85 A ±0,35
D	-19,38 C ±0,33	-18,85 B ±0,41	-18,86 AB ±0,36	-19,44 CD ±0,27	-18,39 B ±0,33	-18,67 C ±0,53	-18,90 D ±0,11
E	-18,32 B ±0,22	-20,21 C ±0,40	-19,08 AB ±0,08	-20,23 D ±0,36	-20,28 C ±0,47	-17,76 BC ±0,54	-18,20BC ±0,29
F	-20,77 D ±0,56	-22,70 D ±0,24	-20,14 C ±0,09	-20,42 D ±0,41	-19,44 C ±0,25	-20,44 D ±0,28	-18,79CD ±0,04
G	-17,17 A ±0,06	-16,66 A ±0,12	-18,77 AB ±0,06	-17,29 A ±0,07	-17,86 B ±0,19	-17,51 AB ±0,09	-16,61 A ±0,16

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem pelo teste de *Tukey* ($P<0,05$); probabilidade <0,001 para todas as idades analisadas; empresas A, B, C, E e G utilizam ração com inclusão de farinhas de origem animal na alimentação dos frangos e as empresas D e F utilizam ração alimentação estritamente vegetal.

Além disso, a inclusão de subprodutos de origem animal na dieta das aves das empresas A, B, C, E e G também contribuiu para o enriquecimento significativo em ^{15}N em todas as rações coletadas ao longo do período de criação, se comparada as rações estritamente vegetais das empresas D e F (Tabela 5 e Figura 2). Os subprodutos de origem animal são ricos em ^{15}N, pois são o reflexo da dieta do animal que a deu origem associada ao enriquecimento a cada elevação no nível trófico do organismo animal (DeNIRO & EPSTEIN, 1981). Esse enriquecimento em ^{15}N também foi observado por Carrijo et al. (2006), Oliveira et al. (2010 e 2012) e Cruz et al. (2012) em rações de frangos de corte experimentais que continham subprodutos de origem animal. Para o $\delta^{13}C$ foi possível observar que houve variação dos valores ao longo das coletas e talvez por isso não tenha sido possível verificar diferenças entre as empresas com alimentação estritamente vegetal em relação às demais.

Tabela 5. Valores médios de $\delta^{15}N$ (média ± desvio padrão) da ração de frangos de corte de diferentes empresas avícolas ao longo do período de criação.

Empresas	Idade em dias						
	0	7	14	21	28	35	42
A	1,41 AB ±0,03	1,21 B ±0,03	1,19 B ±0,07	2,17 A ±0,22	1,93 A ±0,18	2,07 AB ±0,19	2,50 A ±0,38
B	1,20 B ±0,09	1,17 B ±0,05	1,31 AB ±0,05	1,53 B ±0,05	1,59 AB ±0,22	1,88ABC ±0,08	2,20 AB ±0,03
C	1,62 A ±0,03	1,39 AB ±0,14	1,55 A ±0,22	1,41 B ±0,13	1,93 A ±0,19	1,82 BC ±0,25	1,93 B ±0,10
D	0,78 C ±0,19	0,72 C ±0,07	0,75 C ±0,07	0,82 C ±0,04	0,94 C ±0,06	1,02 D ±0,06	1,28 C ±0,07
E	1,23 B ±0,07	1,26 B ±0,09	1,22 AB ±0,16	1,68 B ±0,24	1,88 A ±0,07	2,21 A ±0,07	2,58 A ±0,26
F	0,62 C ±0,11	0,63 C ±0,10	0,62 C ±0,10	0,93 C ±0,19	1,02 C ±0,14	1,11 D ±0,06	1,15 C ±0,11
G	1,52 A ±0,03	1,52 A ±0,10	1,49 AB ±0,04	1,54 B ±0,03	1,47 B ±0,08	1,52 C ±0,11	1,84 B ±0,04

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem pelo teste de *Tukey* ($P<0,05$); probabilidade <0,001 para todas as idades analisadas; empresas A, B, C, E e G utilizam ração com inclusão de farinhas de origem animal na alimentação dos frangos e as empresas D e F utilizam ração alimentação estritamente vegetal.

A figura 3 representa a análise multivariada de componentes principais (PCA) da ração de frangos de corte coletada em todo o período de criação (do alojamento aos 42 dias de idade), em que foi possível observar que as empresas D e F (vegetais) formaram grupos diferentes das demais. A PCA tem como objetivo a redução de variáveis a serem analisadas, selecionando as variáveis de maior variabilidade pelo coeficiente determinado de primeira componente (PC1, eixo x), que explica a maior parte da variabilidade original dos dados, e a segunda componente (PC2, eixo y), que explica a segunda maior parte. A PC1 somada a PC2 responderam por 73,6% da variância total dos dados de ração, sendo que desse valor 54,2% foi respondido pela PC1. A variável que mais discriminou os grupos de respostas foi o $\delta^{15}N$ (Tabela 6). Dados que corroboram a análise em cada idade de coleta, onde houve diferença significativa entre as empresas com alimentação estritamente vegetal em relação às demais.

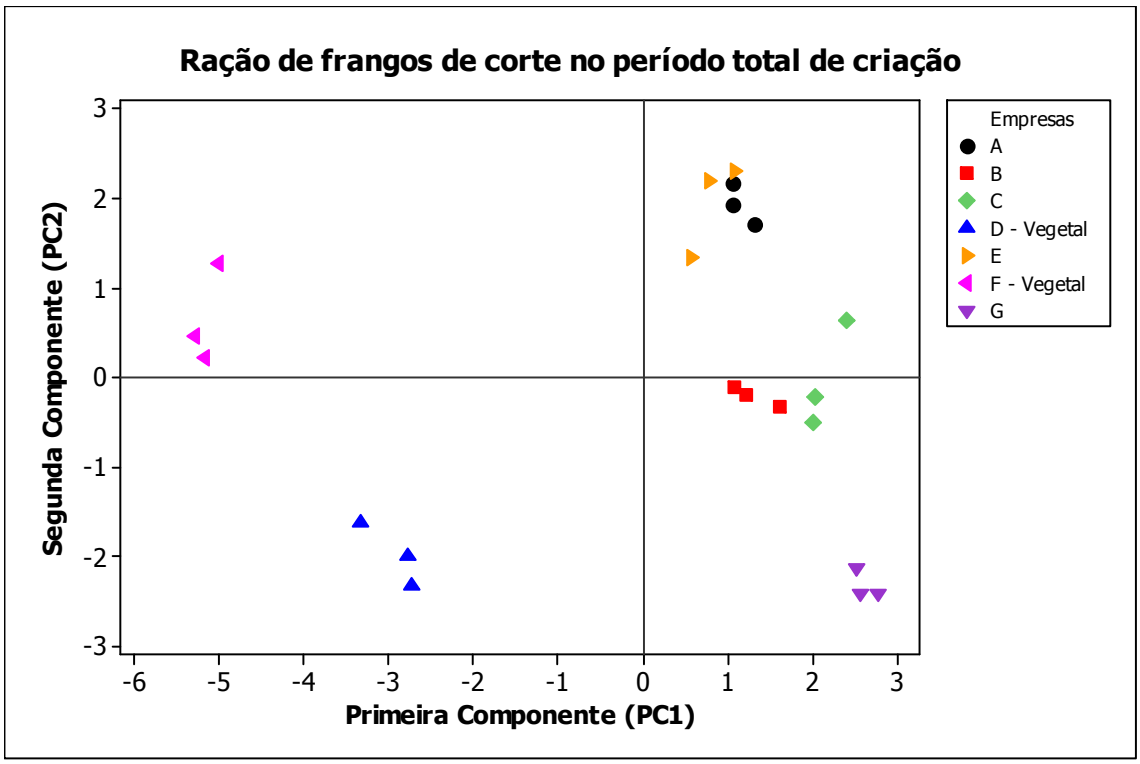


Figura 3. Análise de componentes principais do $\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$ da ração de frangos de corte de diferentes empresas avícolas no período total de criação (do alojamento aos 42 dias de idade; empresas A, B, C, E e G utilizam ração com inclusão de subprodutos de origem animal na alimentação dos frangos e as empresas D e F utilizam ração estritamente vegetal).

Tabela 6. Valores de participação das razões isotópicas de nitrogênio e carbono ($\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$) na primeira (PC1) e segunda (PC2) componentes da análise de componentes principais na ração de frangos de corte de diferentes empresas avícolas.

Idade em dias das aves	Variáveis	PC1	PC2
Dia do alojamento	$\delta^{15}N$	0,341	0,014
	$\delta^{13}C$	0,168	-0,288
7	$\delta^{15}N$	0,341	-0,011
	$\delta^{13}C$	0,219	-0,399
14	$\delta^{15}N$	0,342	-0,010
	$\delta^{13}C$	0,237	-0,277
21	$\delta^{15}N$	0,256	0,330
	$\delta^{13}C$	0,186	-0,251
28	$\delta^{15}N$	0,281	0,331
	$\delta^{13}C$	0,162	-0,316
35	$\delta^{15}N$	0,260	0,390
	$\delta^{13}C$	0,294	-0,111
42	$\delta^{15}N$	0,261	0,348
	$\delta^{13}C$	0,302	-0,118
	Variância (%)	54,2	19,4
	Variância acumulada (%)		73,6

Os resultados isotópicos da ração ($\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$) refletiram diretamente nos resultados isotópicos do músculo peitoral e mucosa intestinal (Tabelas 7 e 8; 9 e 10, respectivamente), observado pelo mesmo comportamento de resposta. Corroborando os pressupostos de DeNiro & Epstein (1978; 1981), que relataram que o animal é aquilo que consome isotopicamente da ordem de ±1,0‰ para $\delta^{13}C$ e ±3,0‰ para $\delta^{15}N$, embora cada tecido possa apresentar assinatura isotópica (HOBSON & CLARK, 1992b) e *turnover* isotópico particulares (HOBSON & CLARK, 1992a).

Quando os valores de $\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$ foram avaliados separadamente foi possível verificar que os valores médios de $\delta^{13}C$ não se mostraram como um bom indicativo da ausência de subprodutos de origem animal na alimentação dos frangos de corte, pois não possibilitaram diferenciar o valor isotópico do músculo peitoral e mucosa intestinal

dos animais das empresas D e F (vegetais) em relação às demais (Tabelas 7 e 9). Por outro lado, os valores médios de $\delta^{15}N$, mostraram-se uma excelente ferramenta, pois possibilitaram diferenciar o valor isotópico do músculo peitoral e mucosa intestinal dos animais das empresas D e F em relação às demais em todas as idades de coleta a partir dos sete dias de idade (Tabela 8 e 10).

Tabela 7. Valores médios de $\delta^{13}C$ (média ± desvio padrão) do músculo peitoral de frangos de corte de diferentes empresas avícolas ao longo do período de criação.

Empresas	Idade em dias						
	0	7	14	21	28	35	42
A	-18,94 ab ±0,16	-19,87 c ±0,24	-19,50 bc ±0,28	-19,57 c ±0,18	-18,92 c ±0,19	-18,56 bc ±0,39	-18,56 c ±0,24
B	-18,81 a ±0,40	-19,22 b ±0,24	-19,36 b ±0,39	-18,81 b ±0,24	-18,47 b ±0,21	-18,34 b ±0,14	-18,11 ab ±0,14
C	-18,43 a ±0,14	-20,03 c ±0,40	-19,65 bcd ±0,41	-19,65 c ±0,39	-19,09 c ±0,36	-18,56 bc ±0,26	-18,41 bc ±0,17
D	-20,51 c ±0,27	-20,07 c ±0,19	-19,91 cd ±0,27	-19,66 c ±0,26	-19,29 cd ±0,24	-18,84 cd ±0,23	-18,36 bc ±0,20
E	-19,37 b ±0,55	-19,62 bc ±0,47	-19,40 b ±0,27	-19,85 cd ±0,42	-19,68 de ±0,39	-19,09 d ±0,39	-18,88 d ±0,26
F	-18,59 a ±0,48	-20,12 c ±0,33	-20,15 d ±0,31	-20,15 d ±0,22	-19,90 e ±0,19	-19,68 e ±0,14	-19,74 e ±0,28
G	-18,57 a ±0,17	-17,59 a ±0,19	-17,64 a ±0,15	-17,77 a ±0,17	-17,81 a ±0,13	-17,88 a ±0,12	-17,83 a ±0,13

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem pelo teste de *Tukey* ($P<0,05$); probabilidade <0,001 para todas as idades analisadas; empresas A, B, C, E e G utilizam ração com inclusão de subprodutos de origem animal na alimentação dos frangos e as empresas D e F utilizam ração estritamente vegetal; n=8, com exceção da empresa F que n=6.

Segundo Kennedy & Krouse (1990), os constituintes corporais encontram-se em estado dinâmico, sendo continuamente formados e utilizados para diferentes propósitos. Esse processo é chamado de *turnover*. As taxas de *turnover* podem variar entre as diferentes espécies, tecidos, frações bioquímicas e são influenciadas pelo estado fisiológico do animal. Ducatti et al. (2014) e Pelícia et al. (2011) verificaram valores de meia-vida (condição onde 50% dos átomos de carbono-13 foram trocados) no músculo peitoral e mucosa intestinal, respectivamente, de acordo com a fase de crescimento e metabolismo dos frangos, onde os valores para as fases pré-inicial e inicial de crescimento foram de 2,5 e 2,8 dias de idade para o músculo peitoral, respectivamente, e os valores para as fases de 0 a 21 dias e de 21 a 42 dias de idade para a mucosa

intestinal foram de 1,06 e 1,81 dias, respectivamente, indicando rápido crescimento do animal, com *turnover* e meias-vidas curtos e semelhantes. Ducatti et al. (2015) encontraram valores de meia-vida para a mucosa intestinal de frangos de 0 a 21 dias de idade de 1,23 dias. Esses tempos de incorporação encontrados na literatura podem explicar a diferença encontrada entre uma alimentação estritamente vegetal de uma com subprodutos de origem animal já na coleta aos sete dias de idade dos animais.

Tabela 8. Valores médios de $\delta^{15}N$ (média ± desvio padrão) do músculo peitoral de frangos de corte de diferentes empresas avícolas ao longo do período de criação.

Empresas	Idade em dias						
	0	7	14	21	28	35	42
A	4,64 a ±0,07	2,38 a ±0,11	2,08 b ±0,09	2,05 bc ±0,18	2,51 a ±0,14	2,42 a ±0,08	2,58 a ±0,10
B	4,70 a ±0,18	2,11 bc ±0,33	2,34 a ±0,09	2,37 a ±0,21	2,21 b ±0,21	2,21 ab ±0,22	2,26 bc ±0,17
C	4,28 bc ±0,29	2,42 a ±0,15	2,15 b ±0,17	2,06 bc ±0,13	2,24 b ±0,32	2,32 a ±0,08	2,46 ab ±0,14
D	4,46 ab ±0,15	1,73 d ±0,12	1,25 e ±0,08	1,45 d ±0,07	1,51 d ±0,10	1,69 c ±0,18	1,94 d ±0,06
E	4,49 ab ±0,32	2,00 c ±0,05	1,80 c ±0,10	1,86 c ±0,07	1,89 c ±0,11	2,10 b ±0,14	2,33 bc ±0,11
F	4,55 ab ±0,06	1,70 d ±0,10	1,57 d ±0,03	1,59 d ±0,07	1,58 d ±0,06	1,78 c ±0,08	1,86 d ±0,21
G	4,03 c ±0,17	2,31 ab ±0,13	2,18 ab ±0,16	2,25 ab ±0,12	2,15 bc ±0,09	2,10 b ±0,05	2,22 c ±0,08

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem pelo teste de *Tukey* ($P<0,05$); probabilidade <0,001 para todas as idades analisadas; empresas A, B, C, E e G utilizam ração com inclusão de subprodutos de origem animal na alimentação dos frangos e as empresas D e F utilizam ração estritamente vegetal; n=8, com exceção da empresa F que n=6.

Na coleta realizada no momento do alojamento, não foi possível verificar diferença no $\delta^{15}N$ entre as empresas que utilizaram alimentação estritamente vegetal e em relação às demais, entretanto como o valor isotópico obtido é o "herdado" da alimentação da matriz que deu origem a ave, não se pode discutir estes resultados, visto que não se tem informações sobre a alimentação das matrizes (Tabelas 8 e 10). Oliveira et al. (2012) também avaliaram o $\delta^{15}N$ do músculo peitoral de frangos de corte experimentais no momento do alojamento e verificaram valor médio mais enriquecido em ^{15}N ($\delta^{15}N = 5,43$) do que o verificado neste estudo ($\delta^{15}N = 4,45$).

Tabela 9. Valores médios de $\delta^{13}C$ (média ± desvio padrão) da mucosa intestinal de frangos de corte de diferentes empresas avícolas ao longo do período de criação.

Empresas	Idade em dias						
	0	7	14	21	28	35	42
A	-19,08 c ±0,12	-20,84 b ±0,08	-20,72 b ±0,14	-20,87 c ±0,16	-19,33 b ±0,13	-19,41 b ±0,10	-19,48 c ±0,09
B	-19,39 d ±0,14	-20,79 b ±0,07	-20,77 b ±0,12	-19,41 a ±0,13	-19,35 b ±0,11	-18,92 a ±0,13	-18,89 a ±0,11
C	-18,88 bc ±0,10	-21,15 c ±0,16	-21,71 d ±0,10	-21,60 d ±0,14	-18,83 a ±0,16	-18,95 a ±0,11	-19,21 b ±0,18
D	-20,66 e ±0,16	-21,40 d ±0,11	-21,53 c ±0,07	-20,66 b ±0,13	-19,88 c ±0,12	-19,38 b ±0,16	-19,30 bc ±0,17
E	-19,43 d ±0,12	-20,85 b ±0,12	-20,79 b ±0,09	-20,62 b ±0,17	-20,82 d ±0,07	-18,82 a ±0,06	-19,19 b ±0,15
F	-18,74 ab ±0,08	-21,64 d ±0,22	-21,62 cd ±0,04	-21,63 d ±0,04	-21,58 e ±0,03	-21,60 c ±0,03	-21,66 d ±0,05
G	-18,59 a ±0,22	-18,46 a ±0,22	-18,70 a ±0,07	-19,27 a ±0,09	-19,35 b ±0,15	-19,27 b ±0,20	-19,18 b ±0,11

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem pelo teste de *Tukey* ($P<0,05$); probabilidade <0,001 para todas as idades analisadas; empresas A, B, C, E e G utilizam ração com inclusão de subprodutos de origem animal na alimentação dos frangos e as empresas D e F utilizam ração estritamente vegetal; n=8, com exceção da empresa F que n=6.

O enriquecimento em $\delta^{15}N$ do músculo peitoral e mucosa intestinal das aves das empresas A, B, C, E e G pode ser explicado pela inclusão de subprodutos de origem animal na alimentação dos frangos de corte dessas empresas (confirmados por *PCR* na ração Tabela 3), o que aumentou o valor isotópico de ^{15}N nas dietas e consequentemente no tecido animal em relação às empresa D e F que utilizaram alimentação estritamente vegetal (também confirmados por *PCR* na ração Tabela 3). Esse enriquecimento em nitrogênio-15 no músculo peitoral de frangos de corte, alimentados com subprodutos de origem animal também foi verificado em experimentos conduzidos em universidades por Carrijo et al. (2006), Oliveira et al. (2010 e 2012) e Cruz et al. (2012) aos 42 dias de idade dos animais. Não foi possível verificar essa mesma diferença para o $\delta^{13}C$, talvez porque o ^{13}C dependa mais de outros fatores como, formulação da dieta, proporção de inclusão de ingredientes C_3 e C_4, principalmente milho e soja e qualidade das matérias primas das dietas, que são passiveis de apresentar variações em escalas de produção comercial se comparado aos estudos desenvolvidos em centros de pesquisa.

Tabela 10. Valores médios de $\delta^{15}N$ (média ± desvio padrão) da mucosa intestinal de frangos de corte de diferentes empresas avícolas ao longo do período de criação.

Empresas	Idade em dias						
	0	7	14	21	28	35	42
A	4,74 a	1,96 b	1,69 b	2,21 a	2,50 a	2,57 a	2,42 a
	±0,13	±0,06	±0,15	±0,14	±0,06	±0,08	±0,14
B	4,37 b	2,04 b	1,64 bc	1,85 b	1,81 b	1,99 c	2,42 a
	±0,14	±0,11	±0,07	±0,14	±0,14	±0,11	±0,03
C	4,15 c	2,27 a	2,07 a	2,08 a	1,70 b	1,88 cd	2,06 b
	±0,08	±0,07	±0,12	±0,06	±0,08	±0,11	±0,11
D	4,20 bc	0,81 e	0,82 d	1,04 d	1,12 c	1,32 e	1,45 d
	±0,05	±0,08	±0,14	±0,18	±0,11	±0,08	±0,08
E	4,14 c	1,57 d	1,50 c	1,63 c	1,68 b	2,42 b	2,53 a
	±0,14	±0,06	±0,04	±0,09	±0,05	±0,04	±0,02
F	4,80 a	0,92 e	0,86 d	0,84 e	1,11 c	1,28 e	1,26 e
	±0,14	±0,12	±0,10	±0,07	±0,07	±0,07	±0,07
G	3,69 d	1,80 c	1,79 b	1,78 bc	1,79 b	1,82 d	1,79 c
	±0,16	±0,03	±0,03	±0,04	±0,04	±0,03	±0,08

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem pelo teste de *Tukey* ($P<0,05$); probabilidade <0,001 para todas as idades analisadas; empresas A, B, C, E e G utilizam ração com inclusão de subprodutos de origem animal na alimentação dos frangos e as empresas D e F utilizam ração estritamente vegetal; n=8, com exceção da empresa F que n=6.

Nas figuras 4 a 10 estão representadas as dispersões dos valores isotópicos de carbono ($\delta^{13}C$) e nitrogênio ($\delta^{15}N$) do músculo peitoral e mucosa intestinal dos frangos de corte, com a finalidade de explorar a variabilidade do par isotópico. No momento do alojamento foi possível observar que os valores de $\delta^{15}N$ do músculo peitoral e principalmente os da mucosa intestinal dos frangos de corte variaram em uma faixa maior do que os valores de $\delta^{13}C$. Isso provavelmente indica que os ingredientes que contribuem para o enriquecimento em ^{15}N nas dietas das matrizes variam mais do que os que contribuem para o enriquecimento em ^{13}C de uma empresa para outra, com exceção da granja D que tem valores de carbono bem diferente das demais (Figura 4).

A partir dos sete dias de idade foi possível observar que a variação dos valores de carbono e nitrogênio foi menor e mais equilibrada, com exceção da diferença clara que existe desde os sete dias até os 42 dias de idade em $\delta^{15}N$ das empresas com alimentação estritamente vegetal (D e F) em relação às demais, como verificado anteriormente (Figuras 5 a 10). Também foi notável que os valores isotópicos da mucosa intestinal possuem menor variação que os do músculo peitoral mostrando diferença mais clara

entre as empresas com alimentação estritamente vegetal em relação às demais. Isso poderia ser explicado pela taxa de renovação ou *turnover* mais ativo da mucosa intestinal, como relatado anteriormente, que estabiliza mais rapidamente as mudanças dos valores isotópicos das rações ao longo das coletas, indicando neste caso ser a fração corporal mais adequada para coletas mais frequentes como, por exemplo, semanais do que o músculo peitoral. Segundo Cruz et al. (2012) e Oliveira et al. (2012) o músculo peitoral pode ter a "assinatura isotópica" da alimentação estabilizada em torno de duas semanas de idade.

Na figura 11 está representada a análise multivariada de componentes principais (PCA) do músculo peitoral e mucosa intestinal de frangos de corte em todo o período de criação (7 a 42 dias de idade), em que foi possível observar que as empresas D e F (vegetais) formam grupos diferentes das demais. A PCA respondeu por 79,9% e 74,9% da variância total dos dados de músculo peitoral e mucosa intestinal, respectivamente, sendo que desses valores 58,8% para o músculo peitoral e 56,0% para a mucosa intestinal foram respondidos pela PC1. As duas variáveis, $\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$, contribuíram de forma homogênea para discriminação dos grupos de resposta (Tabelas 11 e 13).

A análise discriminante linear gerou grupos de respostas para identificar o quanto cada amostra representa o grupo a qual pertence entre as diferentes empresas de frangos de corte em todo o período de criação (7 a 42 dias de idade), sendo seu objetivo a discriminação entre grupos para testar se a diferença de médias dos grupos é significativa. A análise discriminante comprovou que os grupos formados pelo par isotópico diferiram entre si para todas as empresas para a variável mucosa intestinal (Tabela 14). Para o músculo peitoral apenas o grupo da empresa C não diferiu da empresa A, no entanto, as empresas com alimentação estritamente vegetal diferiram das demais empresas (Tabela 12).

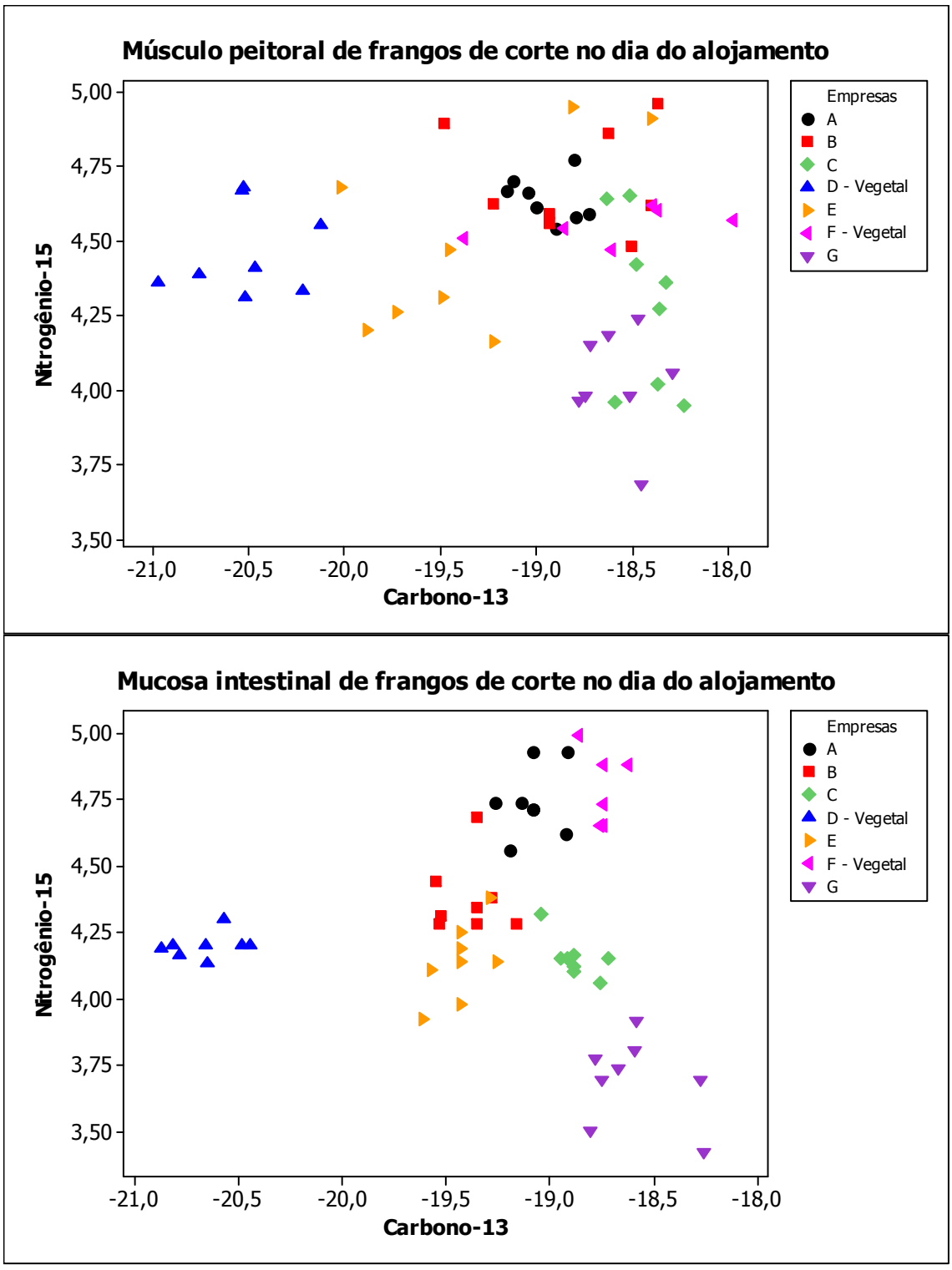


Figura 4. Dispersão dos valores isotópicos de carbono ($\delta^{13}C$) e nitrogênio ($\delta^{15}N$) do músculo peitoral e mucosa intestinal de frangos de corte de diferentes empresas avícolas no dia do alojamento, respectivamente (empresas A, B, C, E e G utilizam ração com inclusão de subprodutos de origem animal na alimentação dos frangos e as empresas D e F utilizam ração estritamente vegetal).

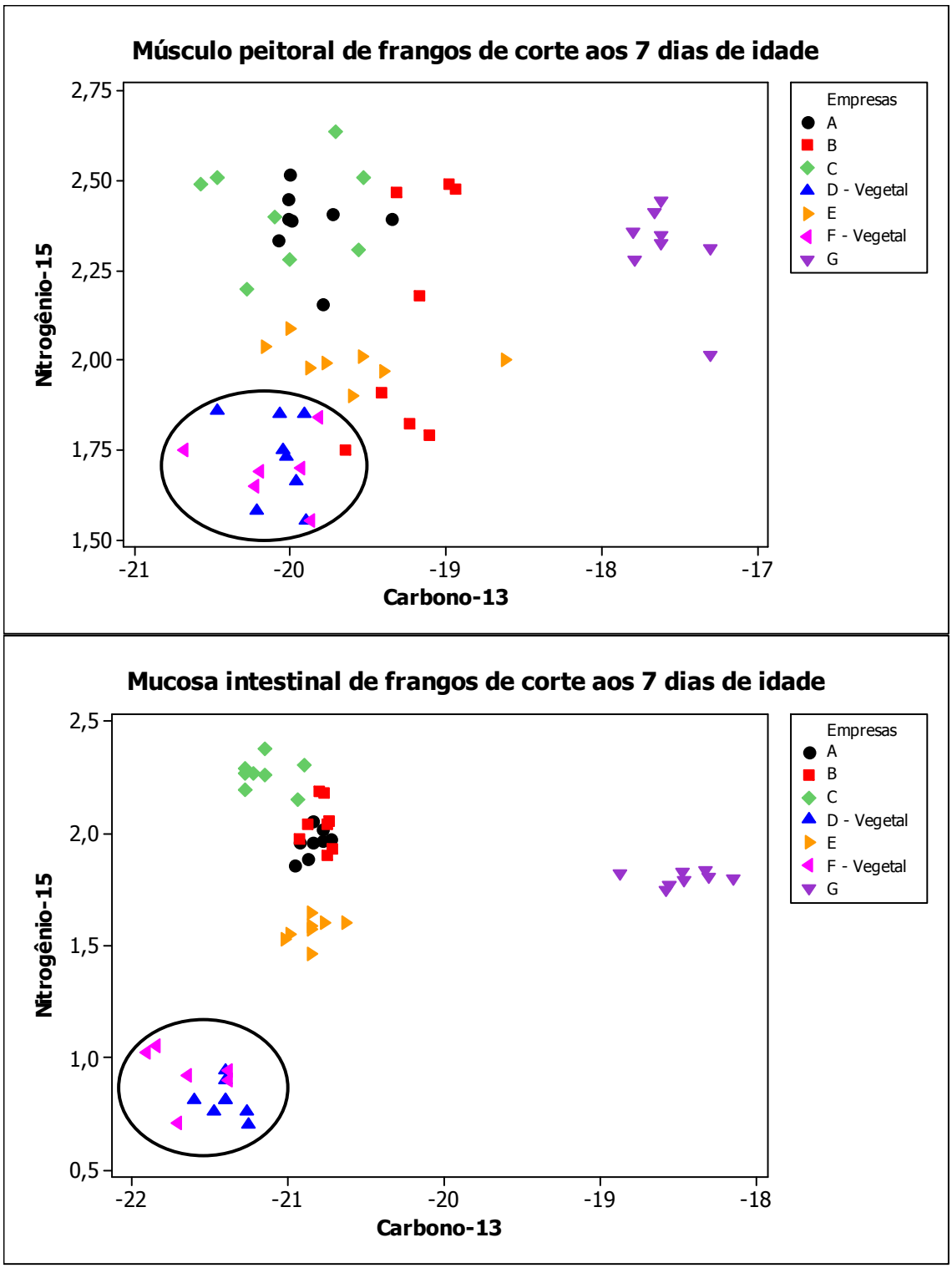


Figura 5. Dispersão dos valores isotópicos de carbono ($\delta^{13}C$) e nitrogênio ($\delta^{15}N$) do músculo peitoral e mucosa intestinal de frangos de corte de diferentes empresas avícolas aos sete dias de idade, respectivamente (empresas A, B, C, E e G utilizam ração com inclusão de subprodutos de origem animal na alimentação dos frangos e as empresas D e F utilizam ração estritamente vegetal).

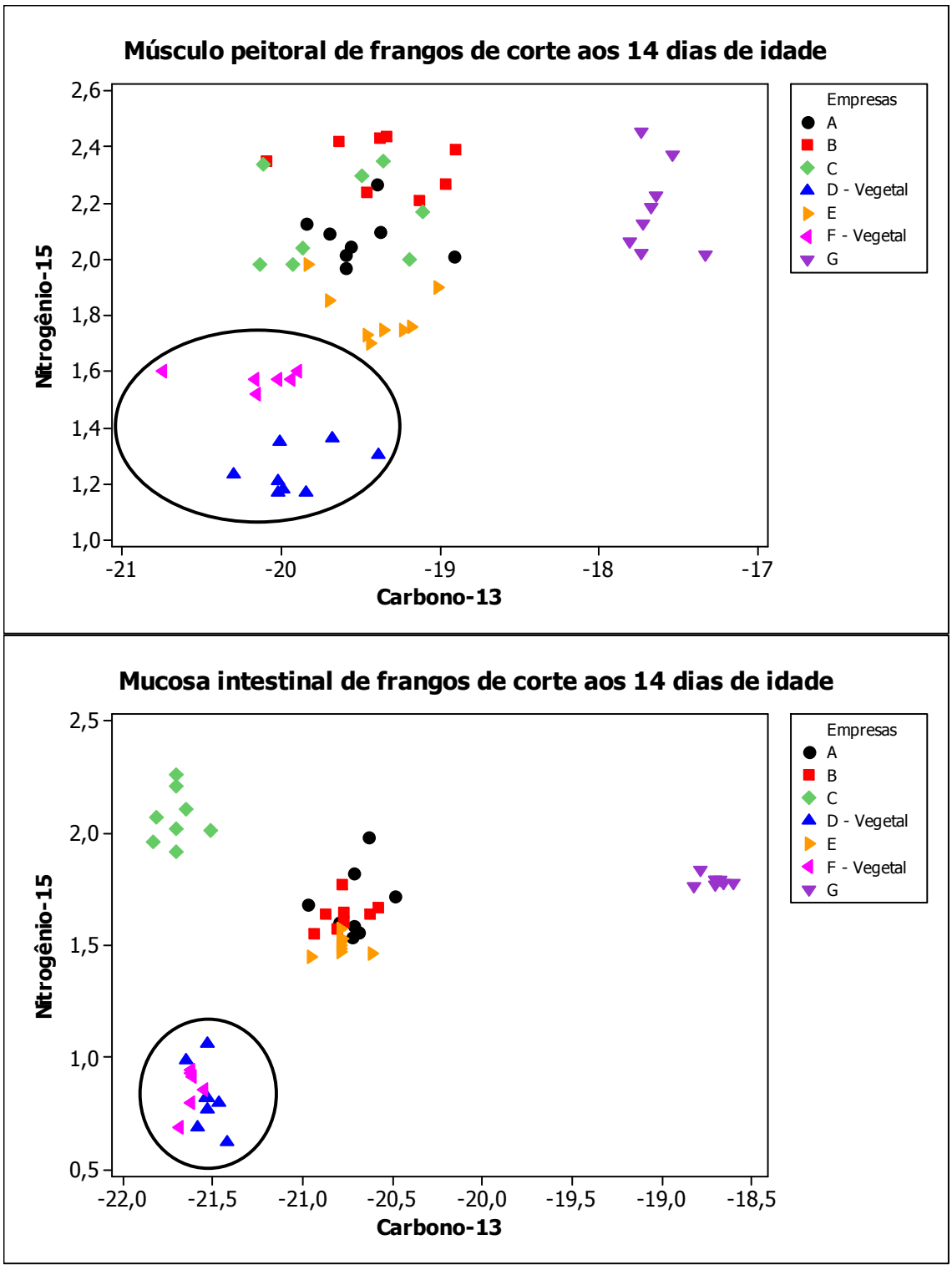


Figura 6. Dispersão dos valores isotópicos de carbono ($\delta^{13}C$) e nitrogênio ($\delta^{15}N$) do músculo peitoral e mucosa intestinal de frangos de corte de diferentes empresas avícolas aos 14 dias de idade, respectivamente (empresas A, B, C, E e G utilizam ração com inclusão de subprodutos de origem animal na alimentação dos frangos e as empresas D e F utilizam ração estritamente vegetal).

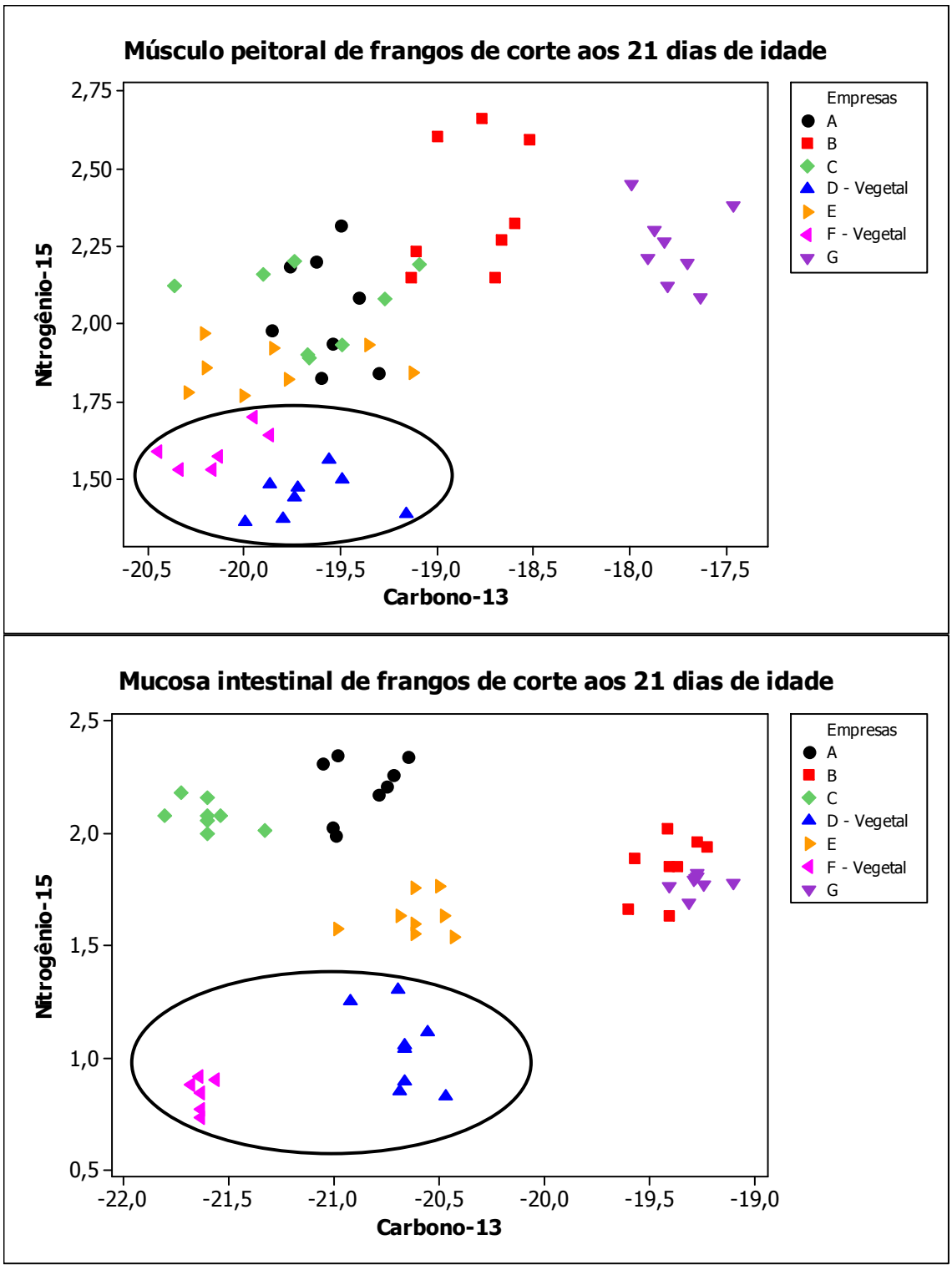


Figura 7. Dispersão dos valores isotópicos de carbono ($\delta^{13}C$) e nitrogênio ($\delta^{15}N$) do músculo peitoral e mucosa intestinal de frangos de corte de diferentes empresas avícolas aos 21 dias de idade, respectivamente (empresas A, B, C, E e G utilizam ração com inclusão de subprodutos de origem animal na alimentação dos frangos e as empresas D e F utilizam ração estritamente vegetal).

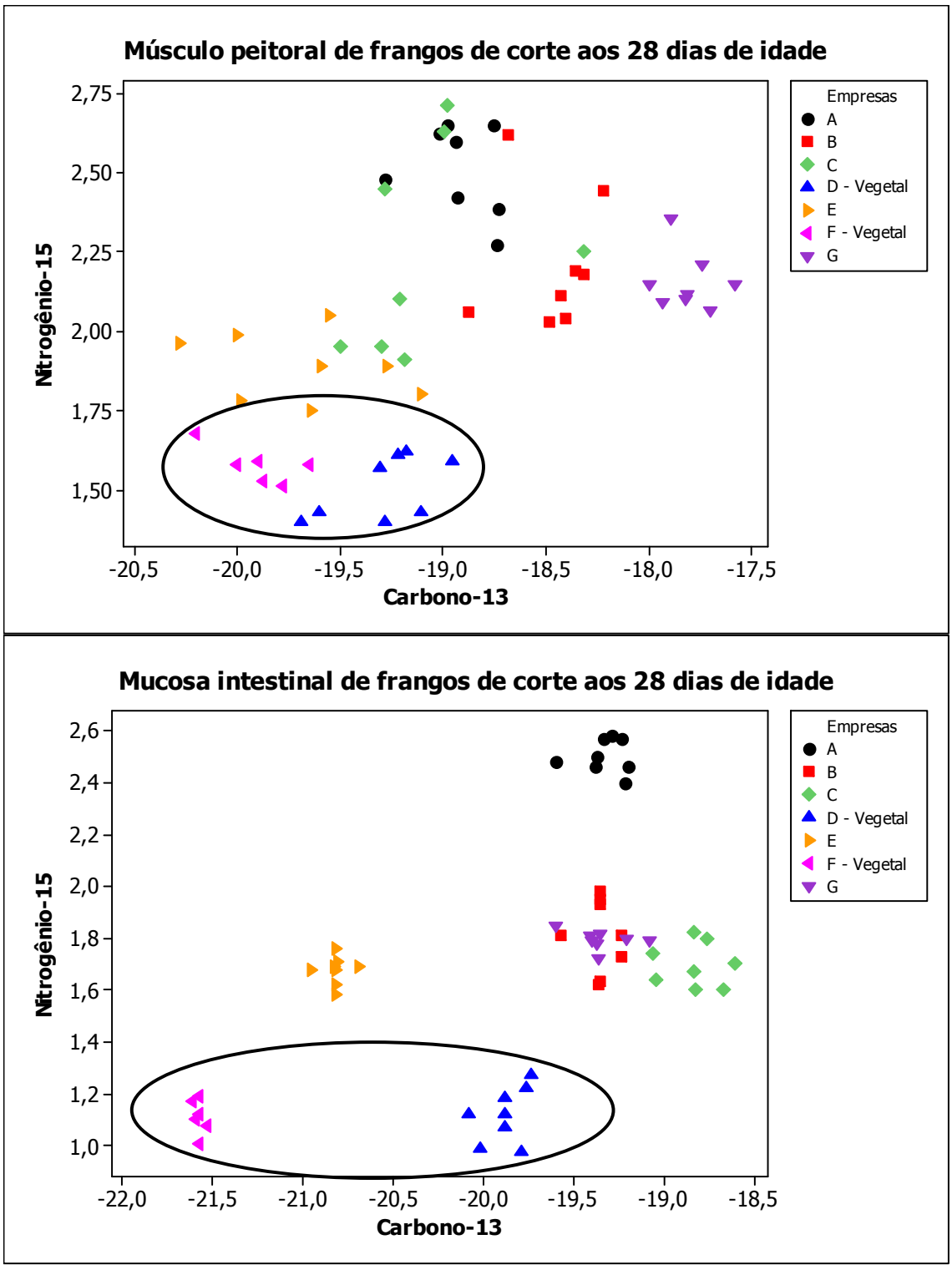


Figura 8. Dispersão dos valores isotópicos de carbono ($\delta^{13}C$) e nitrogênio ($\delta^{15}N$) do músculo peitoral e mucosa intestinal de frangos de corte de diferentes empresas avícolas aos 28 dias de idade, respectivamente (empresas A, B, C, E e G utilizam ração com inclusão de subprodutos de origem animal na alimentação dos frangos e as empresas D e F utilizam ração estritamente vegetal).

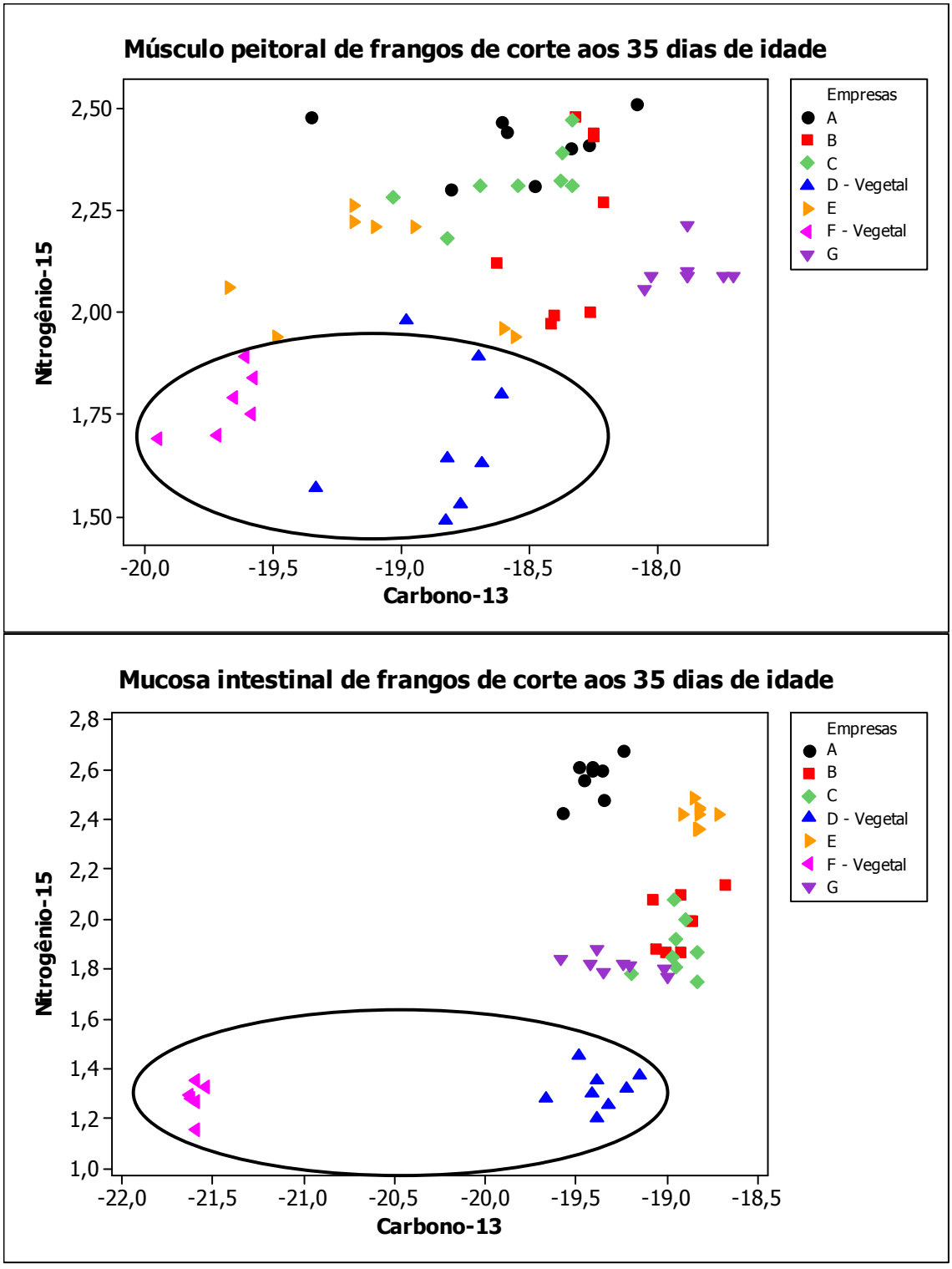


Figura 9. Dispersão dos valores isotópicos de carbono ($\delta^{13}C$) e nitrogênio ($\delta^{15}N$) do músculo peitoral e mucosa intestinal de frangos de corte de diferentes empresas avícolas aos 35 dias de idade, respectivamente (empresas A, B, C, E e G utilizam ração com inclusão de subprodutos de origem animal na alimentação dos frangos e as empresas D e F utilizam ração estritamente vegetal).

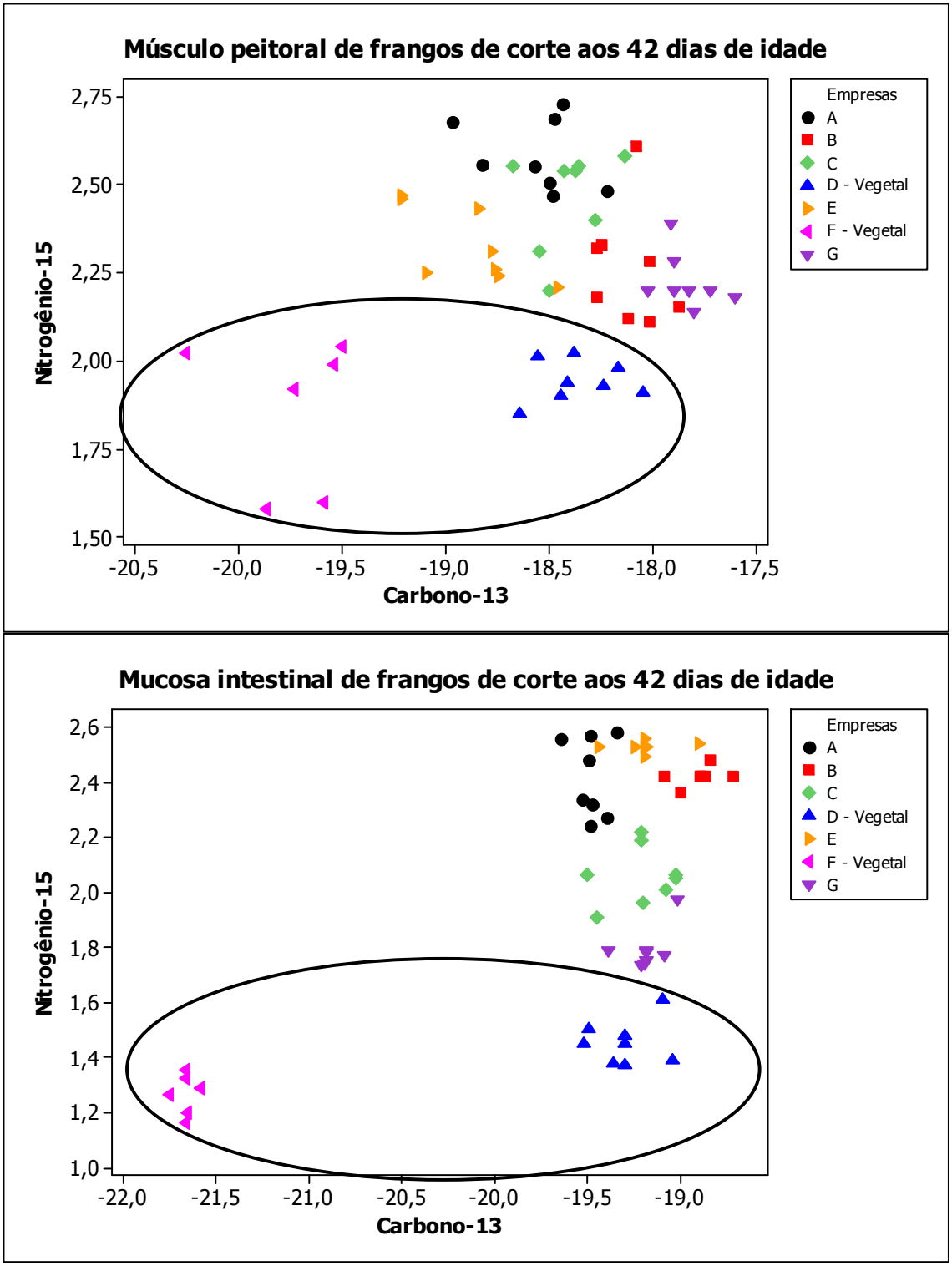


Figura 10. Dispersão dos valores isotópicos de carbono ($\delta^{13}C$) e nitrogênio ($\delta^{15}N$) do músculo peitoral e mucosa intestinal de frangos de corte de diferentes empresas avícolas aos 42 dias de idade, respectivamente (empresas A, B, C, E e G utilizam ração com inclusão de subprodutos de origem animal na alimentação dos frangos e as empresas D e F utilizam ração estritamente vegetal).

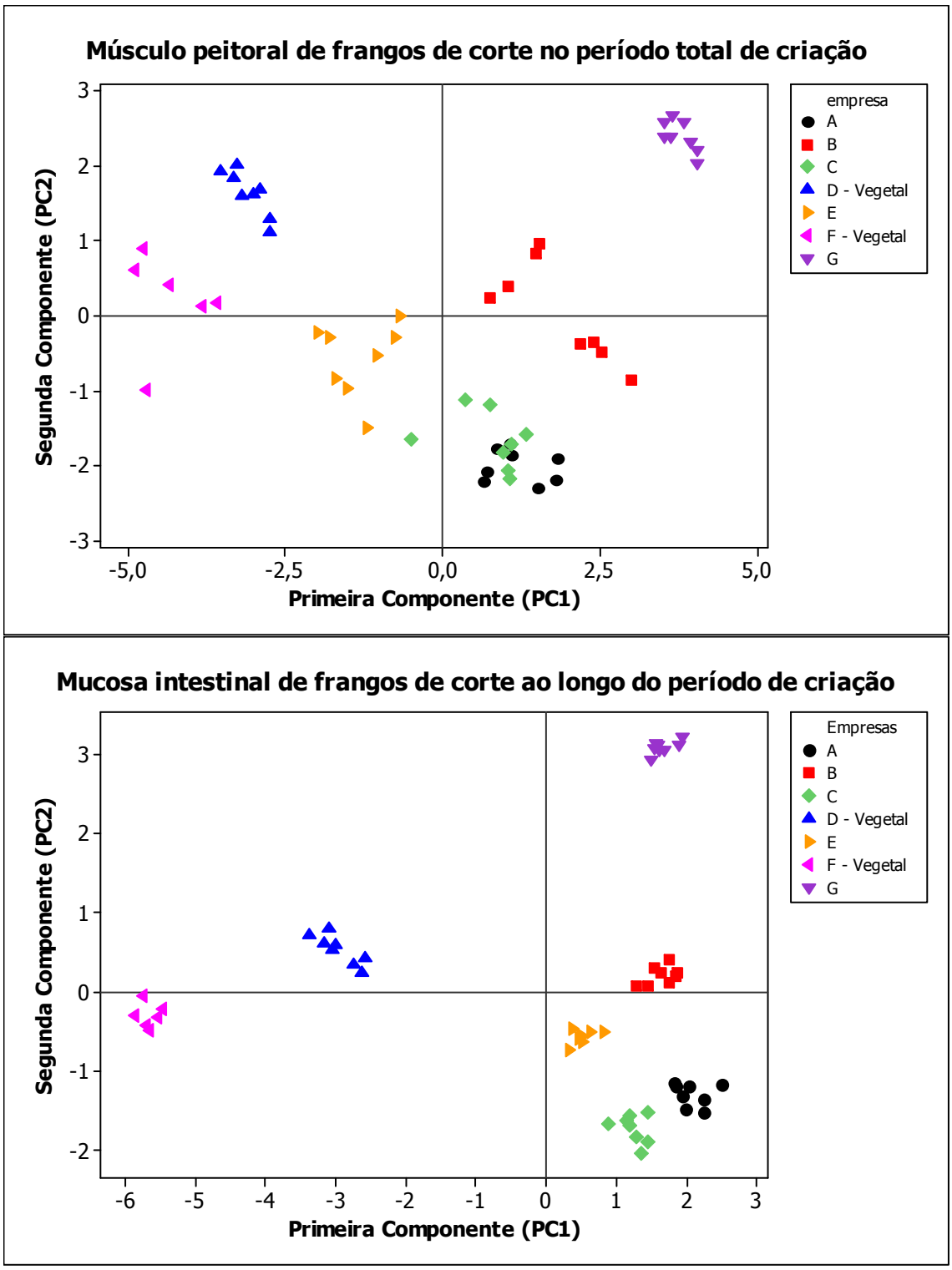


Figura 11. Análise de componentes principais do $\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$ do músculo peitoral e mucosa intestinal de frangos de corte de diferentes empresas avícolas no período total de criação (7 a 42 dias de idade), respectivamente (empresas A, B, C, E e G utilizam ração com inclusão de subprodutos de origem animal na alimentação dos frangos e as empresas D e F utilizam ração estritamente vegetal).

Tabela 11. Valores de participação das razões isotópicas de nitrogênio e carbono ($\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$) na primeira (PC1) e segunda (PC2) componentes da análise de componentes principais no músculo peitoral de frangos de corte de diferentes empresas avícolas.

Idade em dias das aves	Variáveis	PC1	PC2
7	$\delta^{15}N$	0,287	-0,261
	$\delta^{13}C$	0,261	0,366
14	$\delta^{15}N$	0,312	-0,174
	$\delta^{13}C$	0,280	0,304
21	$\delta^{15}N$	0,326	-0,103
	$\delta^{13}C$	0,300	0,322
28	$\delta^{15}N$	0,285	-0,327
	$\delta^{13}C$	0,318	0,231
35	$\delta^{15}N$	0,253	-0,399
	$\delta^{13}C$	0,321	0,130
42	$\delta^{15}N$	0,224	-0,423
	$\delta^{13}C$	0,279	0,214
	Variância (%)	58,8	21,1
	Variância acumulada (%)		79,9

Tabela 12. Classificação das amostras isotópicas ($\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$) de músculo peitoral de frangos de corte de diferentes empresas avícolas ao longo do período de criação*.

Colocado no grupo	Grupo Verdadeiro						
	A	B	C	D	E	F	G
A	8	0	2	0	0	0	0
B	0	8	0	0	0	0	0
C	0	0	6	0	0	0	0
D	0	0	0	8	0	0	0
E	0	0	0	0	8	0	0
F	0	0	0	0	0	6	0
G	0	0	0	0	0	0	8
n total	8	8	8	8	8	6	8
n correto	8	8	6	8	8	6	8
Proporção (%)	100	100	75	100	100	100	100

*7 a 42 dias de idade; somente as empresas D e F utilizam alimentação estritamente vegetal; n=8, com exceção da empresa F que n=6.

Tabela 13. Valores de participação das razões isotópicas de nitrogênio e carbono ($\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$) na primeira (PC1) e segunda (PC2) componentes da análise de componentes principais da mucosa intestinal de frangos de corte de diferentes empresas avícolas.

Idade em dias das aves	Variáveis	PC1	PC2
7	$\delta^{15}N$	0,339	-0,152
	$\delta^{13}C$	0,198	0,525
14	$\delta^{15}N$	0,333	-0,080
	$\delta^{13}C$	0,190	0,528
21	$\delta^{15}N$	0,356	-0,166
	$\delta^{13}C$	0,177	0,506
28	$\delta^{15}N$	0,315	-0,134
	$\delta^{13}C$	0,281	0,008
35	$\delta^{15}N$	0,294	-0,225
	$\delta^{13}C$	0,304	-0,008
42	$\delta^{15}N$	0,307	-0,238
	$\delta^{13}C$	0,299	0,086
	Variância (%)	56,0	18,9
	Variância acumulada (%)		74,9

Tabela 14. Classificação das amostras isotópicas ($\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$) da mucosa intestinal de frangos de corte de diferentes empresas avícolas ao longo do período de criação*.

Colocado no grupo	Grupo Verdadeiro						
	A	B	C	D	E	F	G
A	8	0	0	0	0	0	0
B	0	8	0	0	0	0	0
C	0	0	8	0	0	0	0
D	0	0	0	8	0	0	0
E	0	0	0	0	8	0	0
F	0	0	0	0	0	6	0
G	0	0	0	0	0	0	8
n total	8	8	8	8	8	6	8
n correto	8	8	8	8	8	6	8
Proporção (%)	100	100	100	100	100	100	100

*7 a 42 dias de idade; somente as empresas D e F utilizam com alimentação estritamente vegetal; n=8, com exceção da empresa F que n=6.

As análises bromatológicas e isotópicas dos principais ingredientes, como soja e farelo de soja, milho e farinhas de origem animal, coletados nas diferentes empresas avícolas estão apresentadas nas tabelas 15 a 19, com a finalidade de inicio da formação do banco de dados.

Tabela 15. Valores bromatológicos e isotópicos do ingrediente farelo de soja.

Ingrediente	Empresa	Valores em 100% de Matéria Seca				Valores isotópicos	
		MM	PB	EE	FB	$\delta^{15}N$	$\delta^{13}C$
Farelo de Soja	A	6,60	50,59	1,47	14,65	1,10	-26,48
	A	6,84	50,13	1,93	11,36	1,08	-26,57
	A	6,26	45,25	1,56	13,76	0,06	-26,00
	B	6,98	49,38	2,65	10,02	0,22	-26,55
	B	6,75	48,64	2,23	11,24	0,21	-26,69
	B	6,89	48,95	1,36	9,25	0,27	-26,72
	B	6,68	52,38	0,90	9,70	0,14	-27,21
	B	6,55	45,93	2,59	11,73	0,27	-26,75
	B	6,44	42,68	1,36	16,44	0,17	-26,43
	B	6,44	46,14	1,49	15,89	-0,17	-26,03
	C	6,69	51,98	1,46	9,49	-0,29	-27,01
	C	6,88	49,37	2,90	9,74	0,29	-26,69
	C	7,08	51,27	3,92	7,58	1,38	-26,87
	C	6,50	50,24	2,99	8,76	-0,15	-26,76
	D	6,92	49,03	1,73	12,07	0,32	-26,81
	D	7,28	50,69	2,13	8,84	0,34	-26,42
	D	7,01	49,81	2,67	10,30	0,40	-26,49
	D	7,21	49,69	2,37	12,21	0,25	-26,20
	D	7,03	43,49	7,34	11,00	0,18	-26,57
	D	6,55	44,27	3,66	7,75	0,08	-27,48
	D	6,75	46,97	6,61	10,40	0,07	-27,72
	F	6,96	50,14	2,75	8,98	0,37	-26,48
	F	6,96	49,18	2,21	10,79	0,19	-26,64
	F	6,35	48,79	3,80	9,88	-0,41	-26,39
	F	6,60	48,98	3,83	11,73	0,05	-26,82
	G	6,86	45,82	3,00	7,40	0,17	-27,19
	G	6,82	45,08	4,17	8,40	0,21	-27,48
	G	6,66	46,04	3,06	6,22	0,27	-26,73
	G	7,30	44,44	2,58	9,04	0,32	-27,50
	G	6,71	43,26	4,02	8,34	-0,07	-27,17
	G	6,90	44,43	5,05	5,26	-0,04	-26,68
	G	6,91	44,70	3,89	7,36	0,03	-27,14
Média		6,79	47,74	2,93	10,17	0,23	-26,77
Desvio Padrão		0,25	2,75	1,44	2,52	0,36	0,41

MM = matéria mineral; PB = proteína bruta; EE = extrato etéreo; FB = fibra bruta.

Tabela 16. Valores bromatológicos e isotópicos do ingrediente milho grão.

Ingrediente	Empresa	Valores em 100% de Matéria Seca				Valores isotópicos	
		MM	PB	EE	FB	$\delta^{15}N$	$\delta^{13}C$
Milho (Grão)	A	1,83	8,86	5,90	4,72	3,29	-13,49
	A	1,79	8,68	5,21	6,02	3,36	-13,35
	A	2,22	9,59	5,82	7,61	4,37	-13,27
	A	1,68	9,33	6,30	4,68	2,05	-13,73
	A	2,33	9,74	7,51	5,70	3,86	-13,24
	A	2,49	9,97	9,72	6,73	2,86	-13,84
	B	2,03	8,37	7,03	6,25	2,72	-13,28
	B	2,20	9,80	9,55	6,44	3,09	-13,46
	B	2,61	10,40	7,99	4,84	4,30	-13,82
	B	2,16	9,87	7,67	6,75	3,54	-13,49
	B	2,26	9,25	7,60	5,32	3,22	-13,54
	B	2,23	9,45	7,71	5,16	3,46	-13,49
	B	2,10	9,41	7,45	7,07	3,31	-13,51
	C	2,20	8,71	7,88	3,46	3,90	-13,27
	C	2,39	9,43	8,69	3,83	3,27	-13,47
	C	2,35	10,07	9,69	7,14	3,49	-13,31
	C	2,46	9,78	9,74	5,73	2,72	-13,39
	C	2,23	8,45	10,70	5,77	2,91	-13,29
	C	2,29	8,94	8,44	9,44	4,22	-13,31
	C	2,26	9,31	7,29	3,54	4,18	-13,02
	D	1,73	9,33	5,30	3,63	4,61	-13,30
	D	2,24	9,30	5,94	3,76	3,13	-13,89
	D	1,50	7,46	9,76	3,37	3,69	-13,42
	D	1,43	8,29	11,36	4,30	1,20	-13,41
	D	1,28	7,88	8,58	2,91	4,26	-13,29
	D	1,43	7,48	10,63	3,21	2,70	-13,22
	F	1,43	9,19	4,71	5,10	3,96	-12,29
	F	1,55	9,63	4,30	6,15	4,76	-12,95
	G	1,40	8,30	4,80	3,24	2,92	-13,19
	G	1,23	7,40	5,08	2,79	3,46	-12,85
	G	1,15	8,24	5,62	2,49	3,45	-12,52
	G	1,01	7,36	4,49	2,46	3,20	-12,29
	G	1,01	7,45	5,42	2,42	3,28	-12,39
	G	1,32	7,32	6,13	3,08	3,32	-12,41
	G	1,98	7,24	7,52	2,58	3,34	-12,54
Média		1,88	8,84	7,36	4,79	3,41	-13,21
Desvio Padrão		0,47	0,93	1,97	1,76	0,71	0,44

MM = matéria mineral; PB = proteína bruta; EE = extrato etéreo; FB = fibra bruta.

Tabela 17. Valores bromatológicos e isotópicos do ingrediente soja em grão (integral).

Ingrediente	Empresa	Valores em 100% de Matéria Seca				Valores Isotópicos	
		MM	PB	EE	FB	$\delta^{15}N$	$\delta^{13}C$
Soja em Grão (integral)	A	5,28	38,40	27,31	3,13	0,96	-28,05
	D	5,32	42,87	24,27	3,38	-0,16	-27,85
	D	5,68	41,31	23,05	5,83	0,18	-28,72
	D	5,56	40,31	22,40	6,38	-0,17	-28,50
	D	5,79	41,01	23,95	5,26	0,38	-28,57
	D	5,62	42,51	23,29	4,54	0,03	-27,91
	D	5,31	41,98	22,50	5,03	0,14	-28,36
	D	5,88	41,25	23,68	4,88	0,41	-28,12
	D	5,71	40,25	23,81	4,38	-0,28	-28,43
	D	5,75	41,68	22,63	6,18	1,51	-27,95
	D	5,25	40,88	23,22	6,91	0,02	-28,50
Média		5,56	41,13	23,65	5,08	0,27	-28,27
Desvio Padrão		0,23	1,22	1,36	1,20	0,53	0,30

MM = matéria mineral; PB = proteína bruta; EE = extrato etéreo; FB = fibra bruta.

Tabela 18. Valores bromatológicos e isotópicos das farinhas de origem bovina.

Ingrediente	Empresa	Valores em 100% de Matéria Seca				Valores Isotópicos	
		MM	PB	EE	FB	$\delta^{15}N$	$\delta^{13}C$
Farinha de Carne e Ossos Bovina	A	45,45	40,85	8,38	0,00	8,89	-12,74
	A	36,94	49,59	12,22	0,00	6,57	-14,57
	A	36,14	54,10	13,89	0,00	6,65	-15,13
	A	38,54	52,78	10,40	0,00	6,88	-13,43
	A	38,17	45,40	17,12	0,00	6,90	-14,06
	B	45,36	44,77	7,52	0,00	6,19	-12,64
	B	46,04	44,06	8,14	0,00	5,93	-13,19
	B	44,91	44,19	8,28	0,00	6,32	-14,34
	C	43,99	40,23	12,46	0,00	5,91	-15,12
	C	42,88	47,07	8,67	0,00	6,66	-14,03
	C	42,37	45,56	9,70	0,00	7,13	-14,33
	G	39,93	37,30	18,68	0,00	5,75	-15,25
	G	38,13	43,42	16,03	0,00	6,25	-14,70
	G	41,47	38,14	13,98	0,00	6,43	-16,07
	G	39,40	38,67	15,62	0,00	6,19	-15,38
	G	41,06	39,36	12,84	0,00	6,49	-15,52
	G	40,13	41,99	10,07	0,00	6,29	-14,85
	G	38,09	37,95	11,53	0,00	6,21	-14,99
Média		41,05	43,63	11,97	0,00	6,53	-14,46
Desvio Padrão		3,07	4,81	3,28	0,00	0,67	0,94

MM = matéria mineral; PB = proteína bruta; EE = extrato etéreo; FB = fibra bruta.

Tabela 19. Valores bromatológicos e isotópicos das farinhas de origem avícola.

Ingrediente	Empresa	Valores em 100% de Matéria Seca				Valores Isotópicos	
		MM	PB	EE	FB	$\delta^{15}N$	$\delta^{13}C$
Farinha de Penas de Frango	A	2,24	89,52	7,32	0,00	3,92	-18,46
	A	2,03	90,86	7,37	0,00	4,29	-18,38
	C	1,78	85,25	8,51	0,00	3,26	-19,10
	C	2,07	84,46	8,37	0,00	3,61	-18,54
	G	2,34	74,95	7,93	0,00	3,52	-19,15
	G	2,06	71,64	13,95	0,00	3,37	-19,17
	G	1,76	75,87	10,73	0,00	3,57	-19,11
	G	1,74	75,61	10,73	0,00	3,47	-18,58
	G	1,89	76,96	7,49	0,00	3,69	-18,45
Média		1,99	80,57	9,16	0,00	3,63	-18,77
Desvio Padrão		0,21	7,02	2,23	0,00	0,31	0,35
Ingrediente	Empresa	Valores em 100% de Matéria Seca				Valores Isotópicos	
		MM	PB	EE	FB	$\delta^{15}N$	$\delta^{13}C$
Farinha de Vísceras de Frango	A	12,45	71,41	16,35	0,00	3,13	-18,42
	A	25,01	57,49	13,40	0,00	3,42	-18,39
	A	12,69	69,10	15,54	0,00	3,28	-18,29
	C	14,54	69,42	11,30	0,00	2,89	-18,42
	C	13,12	73,86	10,84	0,00	2,61	-19,17
Média		15,56	68,25	13,49	0,00	3,06	-18,54
Desvio Padrão		5,34	6,31	2,46	0,00	0,32	0,36

MM = matéria mineral; PB = proteína bruta; EE = extrato etéreo; FB = fibra bruta.

CONCLUSÕES

Foi possível diferenciar as empresas que utilizaram alimentação estritamente vegetal em relação às demais, demonstrando a possibilidade de rastrear a presença de subprodutos de origem animal na ração, músculo peitoral e mucosa intestinal dos frangos de corte de granjas comerciais pela metodologia dos isótopos estáveis de carbono e nitrogênio.

REFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**, 15th Edition, Washington D.C., 1298 p., 1995.

CARRIJO, A.S.; PEZZATO, A.C.; DUCATTI, C.; SARTORI, J.R.; TRINCA, L.; SILVA, E.T. Traceability of Bovine Meat and Bone Meal in Poultry by Stable Isotope Analysis. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.8, n.1, p.63-68, 2006.

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

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 ($^{13}C/^{12}C$) and nitrogen ($^{15}N/^{14}N$) stable isotopes. **Poultry Science**, v.91, p.478-486, 2012.

DENADAI, J.C.; DUCATTI, C.; SARTORI, J.R.; PEZZATO, A.C.; MORI, C.; MITUO, M.A.O.; BORDINHON, A.M. The traceability of animal meals in layer diets as detected by stable carbon and nitrogen isotope analyses of eggs. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.10, p.147-152, 2008.

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

DeNIRO M.J, EPSTEIN S. Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. **Geochimica et Cosmichimica Acta,** v.45, p.341-351, 1981.

DUCATTI, C.; MITUO, M.A.O.; DENADAI, J.C.; MARTINS, M.B.; SOUZA-KRULISKI, C.R.; PELÍCIA, V.C.; SARTORI, J.R. *Turnover* de carbono nos tecidos de frangos de corte em diferentes fases de crescimento. **Ciência Rural (Santa Maria),** v.44, n.8, p.1472-1487, 2014.

DUCATTI, C.; SARTORI, M.M.P.; DENADAI, J.C.; COSTA, V.E.; PELICIA, V.C.; MACARI, M. Modelling and determination of metabolic pools by stable carbon isotopes in the avian duodenal mucosa and albumen. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition,** Article first published online: 9 MAY, 2015.

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.

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, 1992a.

HOBSON, K.A.; CLARK, R.G. Assessing avian diets using stable isotopes II: factors influencing diet-tissue fractionation. **The Condor**, v.94, p.189-197, 1992b.

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.

KRCMAR, P.; RENCOVA, E. Identification of Species-Specific DNA in Feedstuffs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.7655-7658, 2003.

MINITAB Statistical Software [computer program], version 16. State College, PA: **Minitab Inc**, 2010.

O'LEARY, M.H. Carbon isotope fractionation plants. **Phytochemistry**, v.20, n.4, p.553-567, 1981.

OLIVEIRA, R.P; DUCATTI, C.; CARRIJO, A.S.; PEZZATO, A.C.; DENADAI, J.C.; SARTORI, J.R.; CRUZ, V.C. Isotopic traceability in body tissues and in different breeding periods of broilers. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, n.5, p.1325-1334, 2012.

OLIVEIRA, R.P; DUCATTI, C.; PEZZATO, A.C.; DENADAI, J.C.; CRUZ, V.C.; SARTORI, J.R.; CARRIJO, A.S.; CALDARA, F.R. Traceability of poultry offal meal in broiler feeding using isotopic analysis ($\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$) of different tissues. **Brazilian Journal of Poultry Science,** v.12, p.13-20, 2010.

PELICIA, V.C.; ZAVARIZE, K.C.; DUCATTI, C.; STRADIOTTI, A.C.; PEZZATO, A.C.; ARAUJO, P.C.; MITUO, M.A.O.; MADEIRA, L.A.; SARTORI, J.R. Nucleotídeos na dieta de frangos de corte e seus efeitos sobre taxa de *turnover* da mucosa intestinal antes e após lesões causadas por coccidiose. **Ciência Rural (Santa Maria)**, v.41, n.9, p.1652-1659, 2011.

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.

SARTORI, M.M.P.; DENADAI, J.C.; GRACIA, A.M.L.; CARRIJO, A.S.; DUCATTI, C. Multivariate analysis of stable isotope data in the traceability process for birds. **Acta Scientiarum**, v.34, n.4, p.437-442, 2012.

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.

SMITH, B.N.; EPSTEIN, S. Two categories of $^{13}C/^{12}C$ ratios of higher plants. **Plant Physiology,** v.47, p.380-384, 1971.

SUN, Z.; MOU, X.; LI, X.; WANG, L.; SONG, H.; JIANG, H. Application of Stable Isotope in Studies of Carbon and Nitrogen Biogeochemical Cycles of Ecosystem. **Chinese Geographical Science,** v.21, n.2, p.129-148, 2011.

VOGEL, J.C. **Variability of carbon isotope fractionation during photosynthesis**. In: EHLERINGER, J. R.; HALL; A. E.; FAQUHAR, G. D. (ed). Stable isotopes and plant carbon-water relations. San Diego: Academic Press Inc., p.29-46, 1993.

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

CAPÍTULO 3

DETECÇÃO DE SUBPRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL POR $\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$ NO SANGUE E PENAS DE FRANGOS DE CORTE DE GRANJAS COMERCIAIS

DETECÇÃO DE SUBPRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL POR $\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$ NO SANGUE E PENAS DE FRANGOS DE CORTE DE GRANJAS COMERCIAIS

RESUMO – A metodologia dos isótopos estáveis tem-se mostrado uma ferramenta analítica promissora na autentificação de alimentos e poderia auxiliar a testar a veracidade das informações constantes no histórico alimentar de lotes de produtos diferenciados, como os frangos com alimentação estritamente vegetal. Entretanto, há necessidade de estudos de campo com animais de granjas comerciais assim como amostragem de tecidos/frações corporais sem necessidade de sacrifícios dos animais. Portanto, objetivou-se rastrear a presença de subprodutos de origem animal na alimentação de frangos de corte de granjas comerciais, por meio da metodologia dos isótopos estáveis de carbono e nitrogênio ($\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$) no sangue e penas. Foram amostradas aleatoriamente oito aves (machos) semanalmente de sete granjas de diferentes empresas avícolas dentro do Estado de São Paulo para obtenção das amostras de sangue e penas. Nos mesmos dias de coletas foram retiradas três amostras aleatórias de ração, adquiridas dos comedouros de cada granja. Todas as amostras foram submetidas à análise de espectrometria de massa de razão isotópica, sendo que a ração também foi avaliada quanto à presença de *DNA* de origem animal por *PCR*. Os dados isotópicos das amostras foram submetidos à análise de variância em cada idade de coleta, e o conjunto de todos os dados foram avaliados pelas análises multivariadas de componentes principais e discriminante linear. Foi possível verificar pela análise de *PCR* na ração que somente as empresas D e F utilizaram ração estritamente vegetal ao longo do período de criação das aves e que houve diferença significativa entre os valores isotópicos da ração, sangue e penas das aves das empresas D e F em relação às demais pela análise de variância para o $\delta^{15}N$ e pelas análises multivariadas testadas dos sete aos 42 dias de idade. Portanto, foi possível diferenciar as empresas que utilizaram alimentação estritamente vegetal em relação às demais, demonstrando a possibilidade de rastrear a presença de subprodutos de origem animal na alimentação dos frangos de corte de granjas comerciais pela metodologia dos isótopos estáveis.

Palavras-chave: análise de componentes principais, carbono-13, nitrogênio-15

DETECTION OF ANIMAL BY-PRODUCTS BY $\delta^{13}C$ AND $\delta^{15}N$ IN BLOOD AND FEATHERS OF COMMERCIAL BROILER FARMS

ABSTRACT – The methodology of stable isotopes has been shown to be a promising analytical tool in authentication of food and could help test the veracity of the information contained in the food history of lots of different products such as chickens strictly vegetable diet. However, there is need for animal studies field of commercial farms as well as sampling tissue/body fractions without sacrifice of the animals. Therefore, the goal of this study was to investigate the presence of animal by-products in commercial broiler farms feed, using the methodology of stable isotope ratios of carbon and nitrogen ($\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$) in blood and feathers. Eight male birds were sampled randomly week-by-week in seven broiler farms of different poultry companies in the São Paulo State to obtain samples of blood and feathers. Were taken on the same day of sampling three random samples of feed, acquired from feeders of each commercial broiler unit. All samples were analyzed using isotope ratio mass spectrometry, and feed was also evaluated for the presence of animal *DNA* by *PCR* analysis. The isotopic data of the samples were submitted to analysis of variance in each age collection, and the set of all data were analyzed by multivariate analysis of major and linear discriminant components. It was verified by *PCR* analysis in feed that only D and F companies used strictly vegetable diet throughout the period of raising birds and that was a significant difference between isotopic values of feed, blood, and feathers of birds from D and F companies compared with others by $\delta^{15}N$ analysis of variance and multivariate analysis tested from seven to 42 days old. Therefore, it was possible to differentiate the companies that used strictly vegetable diet from the others, demonstrating the ability to trace the presence of animal by-products in commercial broiler farms feed using the methodology of stable isotopes.

Keywords: analysis of main components, carbon-13, nitrogen-15

INTRODUÇÃO

Hoje, muitos consumidores estão preocupados com a carne que consomem, e se a rotulagem do produto é correta, pois é importante para informar e ajudar na escolha dos consumidores. A escolha de um produto em detrimento de outro pode refletir aspectos do estilo de vida (como por exemplo o vegetarianismo, alimentos orgânicos e alimentos alternativos – livres dos promotores de crescimento e subprodutos de origem animal na dieta dos animais), religião (ausência de carne/subprodutos de origem suína – produtos *Halal*), preocupações com dieta e saúde (ausência de alérgenos) e preocupações com o bem-estar animal e meio ambiente. Embora os regulamentos consagrados na legislação nacional e internacional apoiem as informações do rótulo correto, infelizmente os regulamentos não são suficientes para evitar fraude alimentar. Para garantir a aderência aos regulamentos, e para aplicar medidas punitivas quando necessário, testes analíticos sólidos são necessários (BALLIN, 2010).

Autenticação de um produto alimentar é o procedimento pelo qual verifica-se que o produto corresponde às declarações do rótulo, e que está em conformidade com o estabelecido pelos regulamentos. Este processo inclui uma análise dos ingredientes, a determinação da origem geográfica, exame dos métodos de produção, entre outros. A utilização de métodos analíticos rápidos, eficazes e confiáveis para verificar a autenticidade e a rastreabilidade do produto representa um instrumento valioso e insubstituível para as autoridades realizarem suas funções de controle. Ferramentas e metodologias de inovação científica e evolução tecnológica podem ajudar a localizar rapidamente as fraudes e adulterações (VINCI et al., 2013).

O regime alimentar de animais de produção sem inclusão de subprodutos de origem animal na dieta, por exemplo, é uma questão muito discutida para a segurança dos alimentos de origem animal, especialmente depois das crises alimentares como os focos de encefalopatia espongiforme bovina, gripe aviária e febre aftosa, mas este regime alimentar é muitas vezes escondido do consumidor, tornando o setor zootécnico mais propenso a práticas fraudulentas (VINCI et al., 2013).

A abordagem com finalidade de rastrear a inclusão de ingredientes de origem animal na dieta de frangos de corte foi desenvolvida por causa da necessidade de encontrar uma tecnologia, num primeiro momento, a fim de certificar o padrão de alimentação vegetal dessas aves e seus produtos, e em seguida, para atender às

demandas dos consumidores que desejam transparência das condições e métodos de produção de alimentos, além de garantir uma concorrência leal entre as empresas avícolas (CRUZ et al., 2012).

Razões isotópicas de carbono e nitrogênio têm sido amplamente utilizadas para inferir fontes de alimentação dos animais (HOPKINS & FERGUSON, 2012; NIELSEN et al., 2015), pois segundo DeNiro & Epstein (1978, 1981) a composição isotópica do carbono e do nitrogênio da alimentação de um animal irá refletir aproximadamente a mesma composição isotópica nos tecidos. Isso porque os isótopos de carbono e nitrogênio mostram relativamente poucas e previsíveis alterações ao passarem através da cadeia alimentar (NEWSOME et al., 2007). A autenticação de alimentos de origem animal por meio da aplicação de análise da razão de isótopos estáveis, tem-se mostrado a metodologia analítica mais promissora nesta área, como relatado por Vinci et al. (2013) em sua revisão de literatura sobre o assunto. Entretanto, os estudos realizados até o momento foram conduzidos dentro de universidades de forma controlada sugerindo a necessidade de estudos de campo com os animais de granjas comerciais.

Também é importante salientar que são necessários mais estudos com estratégias de amostragem sem necessidade de sacrifício das aves, o que é vantajoso por possibilitar a coleta de amostras durante todo o período de criação das aves, sem prejuízo as empresas produtoras. Portanto, objetivou-se rastrear a presença de subprodutos de origem animal na alimentação de frangos de corte de granjas comerciais, por meio da metodologia dos isótopos estáveis de carbono e nitrogênio ($\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$) no sangue e penas.

MATERIAL E MÉTODOS

O projeto de pesquisa em questão está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (protocolo nº 16/2013-CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Câmpus de Botucatu.

Foram amostradas sete granjas de frangos de corte escolhidas dentro do Estado de São Paulo de diferentes empresas (denominadas de A, B, C, D, E, F e G), sendo que duas delas sabidamente utilizam ração estritamente vegetal ao longo de todo o período

de produção (D e F). Nestes locais foram colhidas informações sobre o sistema de produção utilizado, esquema nutricional, mercado que irá atender, dentre outras.

A coleta das amostras foi realizada semanalmente, ou seja, no alojamento e aos sete, 14, 21, 28, 35 e 42 dias de idade, onde foram retiradas aleatoriamente oito aves (machos) de cada granja amostrada. Estas aves foram pesadas, identificadas individualmente por anilhas numeradas.

O sangue foi coletado da veia braquial, da asa esquerda, com seringa e agulha descartáveis (heparinizadas) e armazenado em microtubo plástico identificado. Posteriormente, realizou-se a retirada manual das penas da parte interna da asa esquerda. Ao mesmo tempo foram retiradas de dentro de cada galpão coletado três amostras aleatórias da ração ofertada aos animais.

Todas as amostras coletadas foram devidamente identificadas e congeladas a -20ºC até o momento da preparação para as análises isotópicas. As analises isotópicas foram realizadas no Centro de Isótopos Estáveis do Instituto de Biociências da UNESP, Câmpus de Botucatu. A análise de PCR na ração foi realizada pelo laboratório Simbios Biotecnologia® utilizando o gene citocromo B do DNA mitocondrial como alvo para detecção de DNA de origem bovina e suína (*Bos taurus/Bos indicus; Sus scrofa domesticus,* respectivamente*)* e o gene para colágeno tipo VI (subunidade alfa2) para aves (*Gallus gallus/Meleagris gallopavo)*. Os procedimentos utilizados nos testes do laboratório foram desenvolvidos a partir do protocolo validado na Europa (KRCMAR & RENCOVA, 2003), seguindo a mesma proporção de amostra por volume de reagentes e a mesma quantidade de amostra amplificada por reação.

Para realização das análises isotópicas as amostras de ração e penas foram descongeladas, lavadas em água destilada (somente penas) e secas em estufa de ventilação forçada (Marconi – Ma 035), à temperatura de 56^{o}C por 48 horas. As amostras de sangue foram descongeladas e secas à vácuo a -55ºC com pressão em torno de 50μHg por 48h em liofilizador L108 (LioTop®).

Após a secagem as amostras foram moídas em moinho criogênico modelo Spex Sample, Geno/Grinder 2010, à -196ºC, por meio do seguinte procedimento: aproximadamente 2,0 g de amostra foram acondicionados em frasco de policarbonato juntamente com três esferas de aço inoxidável (modelo 440, sem óleo/graxa), em seguida foi devidamente identificado, fechado e imerso em nitrogênio líquido para

congelamento por 3 minutos; após o congelamento os frascos com as amostras foram depositados em suporte de inox e introduzidos no moinho; pelo impacto entre a amostra congelada e as esferas, estas foram pulverizadas em um programa de frequência de 900 rpm, por 10 minutos em média, para obter-se um material homogêneo e de partículas de granulometria menor que 60 µm.

Após serem moídas as amostras foram pesadas, utilizando-se balança analítica de alta sensibilidade (*Mettler* Toledo XP6), em cápsulas de estanho, para determinação das razões isotópicas do carbono e nitrogênio conforme Tabela 1.

Tabela 1. Peso das amostras (µg) para determinação das razões isotópicas do carbono e nitrogênio.

Amostra	Carbono	Nitrogênio
Sangue	70-90	500-600
Penas	50-70	600-700
Ração	50-70	2100-2200

As cápsulas foram introduzidas por meio de amostrador automático no analisador elementar (*Flash* 2000 *Organic Elemental Analyzer EA for IRMS*), no qual, em presença de oxigênio (O_2) e óxido de cobre (CuO), foram queimadas para a obtenção de CO_2 e NOx; este último foi então reduzido a N_2 na presença de cobre. Os gases formados foram separados em coluna cromatográfica gasosa e analisados no espectrômetro de massas de razões isotópicas (*Delta V Advantage Isotope Ratio MS*, *Thermo Scientific*, Alemanha).

Os resultados das análises foram expressos em per mil (‰), na terminologia isotópica (δ), relativos aos padrões internacionais *Peedee Belemnite* (PDB) para o ^{13}C e nitrogênio do ar atmosférico para ^{15}N, de acordo com a seguinte equação geral:

$$\delta X_{(amostra,\ padrão)} = (r_{amostra} - r_{padrão}) / r_{padrão}$$

Onde:

δ X = enriquecimento do isótopo mais pesado do elemento químico X (C ou N) da amostra em relação ao respectivo padrão internacional (adimensional).

r = razão isotópica entre o isótopo menos e o mais abundante, em particular $^{13}C/^{12}C$ e $^{15}N/^{14}N$ (adimensional).

Os dados isotópicos foram avaliados em cada idade de coleta pela análise de variância, sendo complementados pelo teste de *Tukey* a 5% de probabilidade. O conjunto de todos os dados foi avaliado pelas análises de componentes principais e discriminante linear, com auxilio do programa computacional Minitab 16 (2010), conforme determinado por Sartori et al. (2012) como análise estatística adequada para análise de discriminação isotópica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como foi apresentada e discutida no Capítulo 2, a análise de *PCR* na ração (Tabela 3 Capítulo 2) mostrou que somente as empresas D e F utilizaram ração estritamente vegetal ao longo do período de criação das aves. Além disso, a inclusão de subprodutos de origem animal na dieta das aves das empresas A, B, C, E e G também contribuiu para o enriquecimento significativo em ^{15}N em todas as rações coletadas ao longo do período de criação, se comparada as rações estritamente vegetais das empresas D e F (Tabela 5 e Figura 2 Capítulo 2).

Quando os valores de $\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$ foram avaliados separadamente foi possível verificar que os valores médios de $\delta^{13}C$ não se mostraram como um bom indicativo da ausência de subprodutos de origem animal na alimentação dos frangos de corte, pois não possibilitaram diferenciar o valor isotópico do sangue e penas dos animais das empresas D e F (vegetais) em relação às demais em todas as idades coletadas (Tabelas 2 e 4, respectivamente), talvez porque o ^{13}C dependa mais de outros fatores como, formulação da dieta, proporção de inclusão de ingredientes C_3 e C_4, principalmente milho e soja e qualidade das matérias primas das dietas, que são mais passiveis de apresentar variações em escalas de produção comercial se comparado aos estudos desenvolvidos em centros de pesquisa. Por outro lado, os valores médios de $\delta^{15}N$, mostraram-se uma excelente ferramenta, pois possibilitaram diferenciar o valor isotópico do sangue e penas dos animais das empresas D e F em relação às demais em todas as idades de coleta a partir dos sete dias de idade (Tabela 3 e 5, respectivamente).

Tabela 2. Valores médios de $\delta^{13}C$ (média ± desvio padrão) do sangue de frangos de corte de diferentes empresas avícolas ao longo do período de criação.

Empresas	Idade em dias						
	0	7	14	21	28	35	42
A	-18,31 b ±0,18	-19,31 a ±0,07	-19,55 ab ±0,10	-19,65 b ±0,16	-19,07 b ±0,18	-18,68 a ±0,10	-18,49 a ±0,13
B	-18,26 ab ±0,20	-19,13 a ±0,37	-19,43 a ±0,16	-19,03 a ±0,11	-18,68 a ±0,22	-18,41 a ±0,13	-18,30 a ±0,20
C	-18,01 a ±0,13	-19,28 a ±0,13	-19,66 ab ±0,20	-19,90 b ±0,10	-20,00 cd ±0,11	-19,36 b ±0,16	-18,95 b ±0,17
D	-20,15 d ±0,21	-20,04 b ±0,19	-20,52 d ±0,22	-20,81 d ±0,09	-20,20 d ±0,37	-19,49 b ±0,23	-19,09 b ±0,21
E	-19,71 c ±0,16	-20,26 bc ±0,23	-20,08 c ±0,24	-20,50 c ±0,29	-20,71 e ±0,24	-20,53 d ±0,25	-19,90 c ±0,15
F	-19,56 c ±0,24	-20,44 c ±0,28	-21,10 e ±0,25	-21,22 e ±0,23	-20,91 e ±0,15	-20,93 e ±0,22	-20,75 d ±0,16
G	-20,19 d ±0,09	-19,47 a ±0,19	-19,81 bc ±0,16	-19,85 b ±0,20	-19,82 c ±0,10	-19,87 c ±0,07	-19,91 c ±0,17

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem pelo teste de *Tukey* ($P<0,05$); probabilidade <0,001 para todas as idades analisadas; empresas A, B, C, E e G utilizam ração com inclusão de subprodutos de origem animal na alimentação dos frangos e as empresas D e F utilizam ração estritamente vegetal; n=8, com exceção da empresa F que n=6.

Segundo Kennedy & Krouse (1990), os constituintes corporais encontram-se em estado dinâmico, sendo continuamente formados e utilizados para diferentes propósitos. Esse processo é chamado de *turnover*. As taxas de *turnover* podem variar entre as diferentes espécies, tecidos, frações bioquímicas e são influenciadas pelo estado fisiológico do animal. Frente a isso Pelícia et al. (dados não publicados) verificaram valores de meia-vida (condição onde 50% dos átomos de carbono-13 foram trocados) para o sangue de frangos de corte aos 0 a 21 dias e 21 a 42 dias de idade de 3,63 e 7,76 dias, respectivamente. Já Pimenta et al. (2014) estudando o *turnover* do carbono-13 em sangue de codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*) em crescimento (0 a 42 dias de idade) verificaram valores de meia-vida de em média 4,55 dias. Pacheco et al. (2015) estudando o crescimento tecidual e *turnover* do ^{15}N em frangos de corte de 14 a 42 dias de idade observaram valores de meia-vida de 4,70 dias para as penas das asas. Essas taxas de incorporação encontradas na literatura podem auxiliar no entendimento sobre a diferença encontrada entre uma alimentação estritamente vegetal de uma com subprodutos de origem animal já na coleta aos sete dias de idade dos animais.

O enriquecimento em $\delta^{15}N$ no sangue e penas das aves das empresas A, B, C, E e G pode ser explicada pela inclusão de subprodutos de origem animal na alimentação dos frangos de corte dessas empresas, o que aumenta o valor isotópico de ^{15}N nas dietas e, consequentemente, no tecido animal em relação às empresa D e F que utilizaram alimentação estritamente vegetal. Esse enriquecimento em nitrogênio-15 também foi verificado por Carrijo et al. (2006), Oliveira et al. (2010 e 2012) e Cruz et al. (2012) aos 42 dias de idade no músculo peitoral de frangos de corte, alimentados com subprodutos de origem animal em experimentos conduzidos em universidades.

Tabela 3. Valores médios de $\delta^{15}N$ (média ± desvio padrão) do sangue de frangos de corte de diferentes empresas avícolas ao longo do período de criação.

Empresas	Idade em dias						
	0	7	14	21	28	35	42
A	4,98 ab	3,39 a	2,85 a	2,58 ab	2,84 a	2,93 a	3,00 a
	±0,17	±0,17	±0,08	±0,09	±0,05	±0,04	±0,12
B	5,12 a	3,28 a	2,65 b	2,56 b	2,52 c	2,65 bc	2,78 bc
	±0,12	±0,07	±0,13	±0,07	±0,11	±0,06	±0,08
C	4,69 cd	3,40 a	2,87 a	2,61 ab	2,67 b	2,75 b	2,86 b
	±0,26	±0,16	±0,08	±0,06	±0,09	±0,12	±0,05
D	4,75 bcd	3,02 b	2,04 d	2,04 d	2,09 d	2,19 d	2,40 d
	±0,12	±0,09	±0,09	±0,09	±0,06	±0,10	±0,07
E	4,87 abc	3,26 a	2,48 c	2,36 c	2,51 c	2,57 c	2,72 c
	±0,18	±0,16	±0,12	±0,09	±0,10	±0,12	±0,07
F	5,05 a	3,02 b	2,05 d	1,93 d	2,05 d	2,04 d	2,16 e
	±0,11	±0,10	±0,09	±0,06	±0,13	±0,15	±0,06
G	4,54 d	3,39 a	2,90 a	2,70 a	2,58 bc	2,61 bc	2,76 bc
	±0,13	±0,16	±0,14	±0,11	±0,10	±0,13	±0,11

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem pelo teste de *Tukey* ($P<0,05$); probabilidade <0,001 para todas as idades analisadas; empresas A, B, C, E e G utilizam ração com inclusão de subprodutos de origem animal na alimentação dos frangos e as empresas D e F utilizam ração estritamente vegetal; n=8, com exceção da empresa F que n=6.

Tabela 4. Valores médios de $\delta^{13}C$ (média ±desvio padrão) das penas de frangos de corte de diferentes empresas avícolas ao longo do período de criação.

Empresas	Idade em dias						
	0	7	14	21	28	35	42
A	-18,77 b ±0,26	-19,77 c ±0,34	-19,94 d ±0,28	-20,07 d ±0,34	-19,69 e ±0,23	-19,08 c ±0,24	-18,64 c ±0,30
B	-18,47 b ±0,29	-19,24 b ±0,31	-19,68 cd ±0,28	-19,10 bc ±0,36	-19,37 cde ±0,55	-17,62 a ±0,19	-17,38 a ±0,19
C	-17,14 a ±0,32	-18,89 b ±0,30	-18,73 b ±0,41	-18,89 b ±0,41	-18,75 b ±0,31	-17,71 a ±0,38	-17,91 b ±0,19
D	-19,24 c ±0,29	-19,32 bc ±0,21	-19,41 c ±0,23	-19,09 bc ±0,26	-18,97 bc ±0,31	-18,33 b ±0,34	-17,84 b ±0,29
E	-18,66 b ±0,32	-19,01 b ±0,25	-18,78 b ±0,29	-19,22 bc ±0,38	-19,19 bcd ±0,21	-18,46 b ±0,31	-18,52 c ±0,35
F	-18,60 b ±0,16	-19,32 bc ±0,26	-19,63 cd ±0,18	-19,62 cd ±0,33	-19,50 de ±0,06	-19,14 c ±0,15	-18,93 c ±0,23
G	-18,30 b ±0,38	-18,36 a ±0,36	-17,96 a ±0,23	-18,22 a ±0,19	-17,93 a ±0,25	-17,89 a ±0,14	-18,04 b ±0,14

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem pelo teste de *Tukey* (P<0,05); probabilidade <0,001 para todas as idades analisadas; empresas A, B, C, E e G utilizam ração com inclusão de subprodutos de origem animal na alimentação dos frangos e as empresas D e F utilizam ração estritamente vegetal.

Tabela 5. Valores médios de $\delta^{15}N$ (média ±desvio padrão) das penas de frangos de corte de diferentes empresas avícolas ao longo do período de criação.

Empresas	Idade em dias						
	0	7	14	21	28	35	42
A	5,56 a ±0,17	3,54 a ±0,21	3,10 ab ±0,33	2,86 b ±0,12	3,03 a ±0,15	3,14 a ±0,13	3,31 a ±0,18
B	5,47 ab ±0,13	3,19 b ±0,16	2,68 c ±0,12	2,75 b ±0,10	2,70 bc ±0,21	2,99ab ±0,14	2,98 b ±0,11
C	5,37abc ±0,35	3,17 b ±0,27	2,99 b ±0,08	2,87 b ±0,14	2,99 a ±0,17	3,17 a ±0,18	3,37 a ±0,13
D	5,17 bc ±0,16	2,69 c ±0,11	2,03 d ±0,08	2,10 d ±0,11	2,15 d ±0,14	2,34 c ±0,12	2,57 c ±0,13
E	5,34abc ± 0,26	3,09 b ±0,18	2,50 c ±0,09	2,53 c ±0,09	2,51 c ±0,10	2,83 b ±0,09	3,08 b ±0,08
F	5,58 a ±0,21	2,64 c ±0,16	2,01 d ±0,12	2,02 d ±0,18	2,08 d ±0,13	2,16 c ±0,15	2,39 c ±0,09
G	5,07 c ±0,11	3,28 ab ±0,17	3,26 a ±0,15	3,08 a ±0,14	2,86 ab ±0,11	2,85 b ±0,16	2,92 b ±0,12

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem pelo teste de *Tukey* (P<0,05); probabilidade <0,001 para todas as idades analisadas; empresas A, B, C, E e G utilizam ração com inclusão de subprodutos de origem animal na alimentação dos frangos e as empresas D e F utilizam ração estritamente vegetal.

Nas figuras de 1 a 7 estão contidas as dispersões dos valores isotópicos de carbono ($\delta^{13}C$) e nitrogênio ($\delta^{15}N$) das amostra de sangue e penas dos frangos de corte de diferentes empresas coletadas semanalmente desde o momento do alojamento até o abate. Foram realizadas estas representações com a finalidade de poder explorar melhor os dados e a variabilidade do par isotópico. No momento do alojamento foi possível observar que existe bastante variação tanto para os valores de nitrogênio quanto para os valores de carbono no sangue e penas dos frangos de corte. Isso provavelmente indica que os ingredientes que contribuem para o enriquecimento em ^{13}C e ^{15}N, nas dietas das matrizes que lhes deram origem variam de uma empresa para outra (Figura 1).

A partir dos sete dias de idade foi possível observar que ainda existe bastante variação dos valores de carbono e nitrogênio. Entretanto, apesar de as granjas com alimentação estritamente vegetal (D e F) serem estatisticamente diferentes das demais dos sete aos 42 dias de idade pelo $\delta^{15}N$ essa diferença só fica visível nas figuras de dispersão a partir dos 14 dias de idade (Figuras 2 a 7), tanto para o sangue como para as penas. Também pode-se notar que nas fases iniciais e de crescimento dos animais da empresa E (alimentação com subprodutos de origem animal), apesar de estatisticamente diferente das empresas com alimentação estritamente vegetal pelo $\delta^{15}N$, ficaram com os valores isotópicos próximos aos das empresas D e F, talvez porque a empresa E utilize inclusões mais baixas de subprodutos de origem animal nas fases inicias e de crescimento e inclusões maiores nas fases finais.

Apesar dos valores de $\delta^{13}C$ não terem possibilitado diferenciar as empresas com alimentação estritamente vegetal em relação às demais, observando as figuras de dispersão dos valores isotópicos de carbono e nitrogênio do sangue e penas dos frangos de corte foi possível notar que quando o carbono é analisado juntamente com o nitrogênio ele também contribuiu na diferenciação de uma empresa para outra, mostrando sua importância para rastrear a alimentação de frangos de corte de granjas comerciais (Figuras 2 a 7).

Na figura 8 está representada a análise multivariada de componentes principais (PCA) do sangue e penas de frangos de corte em todo o período de criação (7 a 42 dias de idade), em que foi possível observar que as empresas D e F (vegetais) formaram grupos diferentes em relação às demais. A PCA tem como objetivo a redução de variáveis a serem analisadas, selecionando as variáveis de maior variabilidade pelo

coeficiente determinado de primeira componente (PC1, eixo x), que explica a maior parte da variabilidade original dos dados, e a segunda componente (PC2, eixo y), que explica a segunda maior parte.

A PCA respondeu por 86,2% e 74,0% da variância total dos dados de sangue e penas, respectivamente, sendo que desses valores 72,3% para o sangue e 45,9% para as penas foram respondidos pela PC1. As duas variáveis, $\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$, contribuíram de forma homogênea para discriminação dos grupos de resposta para o sangue (Tabela 6). Já no caso das penas a variável que mais discriminou os grupos de respostas na PC1 foi o $\delta^{15}N$ e na PC2 foi o $\delta^{13}C$ (Tabela 8).

A análise discriminante linear gerou grupos de respostas para identificar o quanto cada amostra representa o grupo a qual pertence entre as diferentes empresas de frangos de corte em todo o período de criação (7 a 42 dias de idade), onde é possível observar que 100% das amostras representaram seu grupo corretamente, pois todas as amostras destas empresas foram alocadas corretamente de acordo com o grupo de resposta as quais pertenciam, comprovando que os grupos formados pelo par isotópico diferiram entre si para todas as empresas tanto para o sangue quanto para as penas dos animais (Tabela 7 e 9, respectivamente).

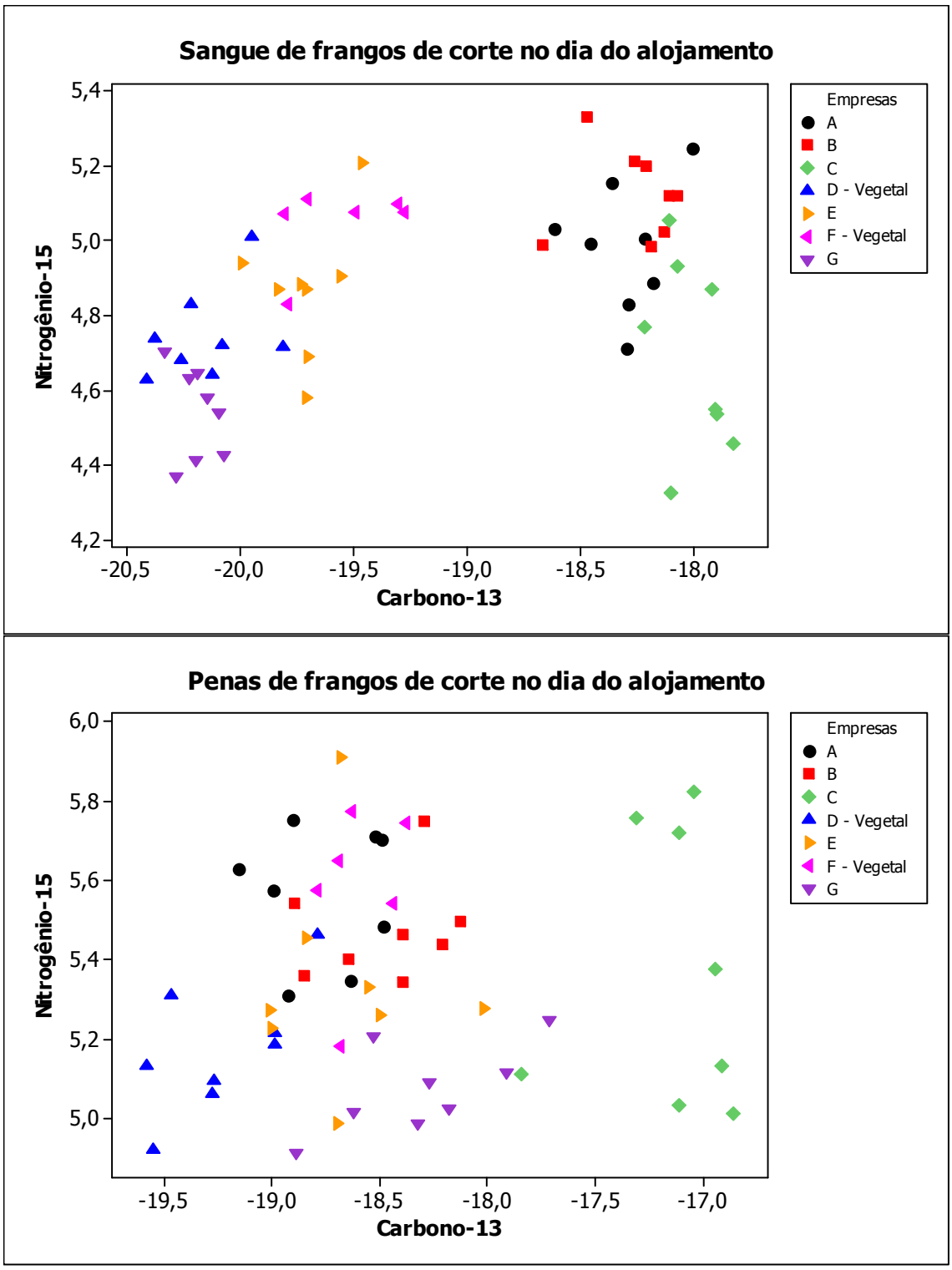


Figura 1. Dispersão dos valores isotópicos de carbono ($\delta^{13}C$) e nitrogênio ($\delta^{15}N$) do sangue e penas de frangos de corte de diferentes empresas avícolas no dia do alojamento, respectivamente (empresas A, B, C, E e G utilizam ração com inclusão de subprodutos de origem animal na alimentação dos frangos e as empresas D e F utilizam ração estritamente vegetal).

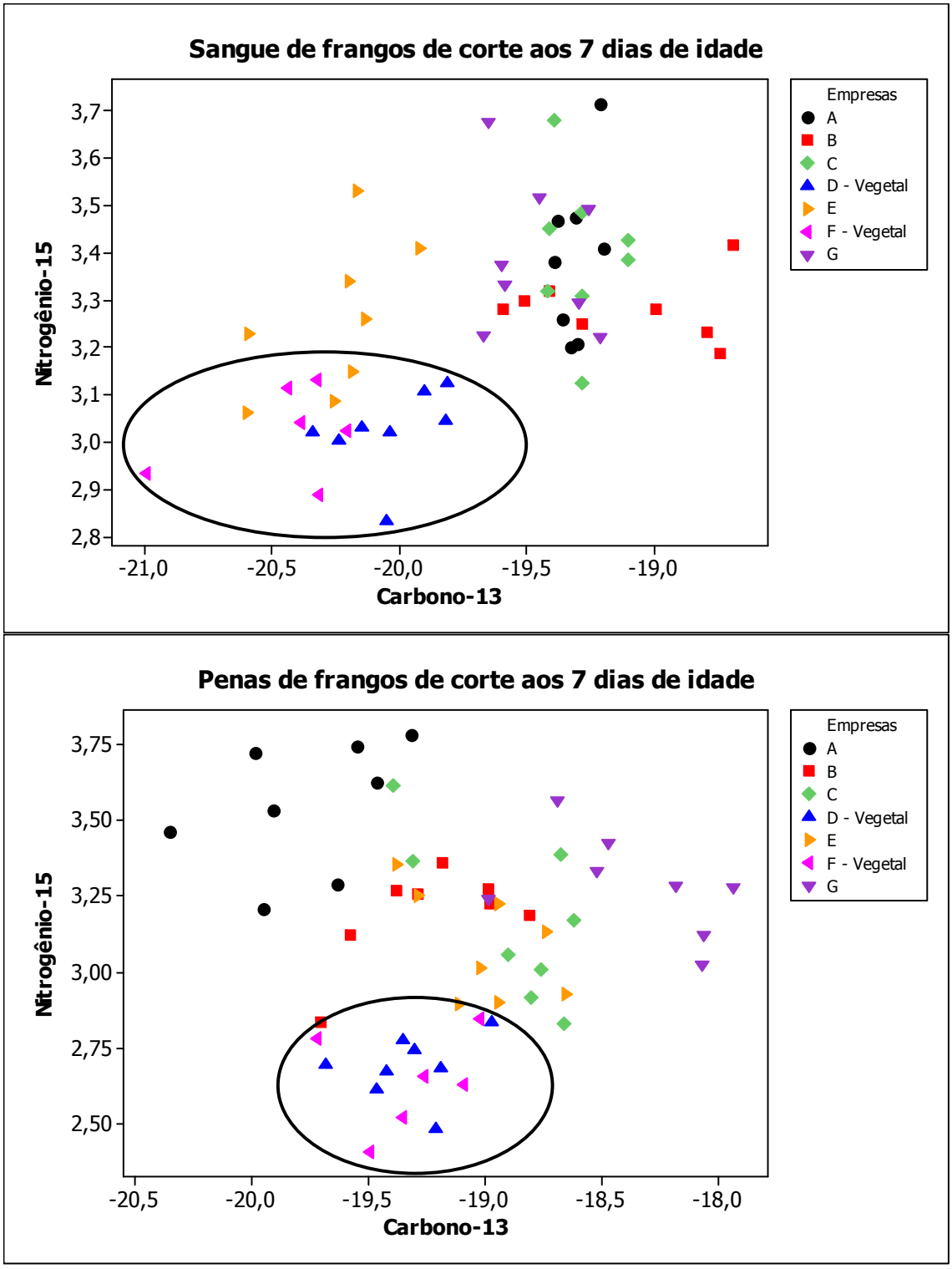


Figura 2. Dispersão dos valores isotópicos de carbono ($\delta^{13}C$) e nitrogênio ($\delta^{15}N$) do sangue e penas de frangos de corte de diferentes empresas avícolas aos sete dias de idade, respectivamente (empresas A, B, C, E e G utilizam ração com inclusão de subprodutos de origem animal na alimentação dos frangos e as empresas D e F utilizam ração estritamente vegetal).

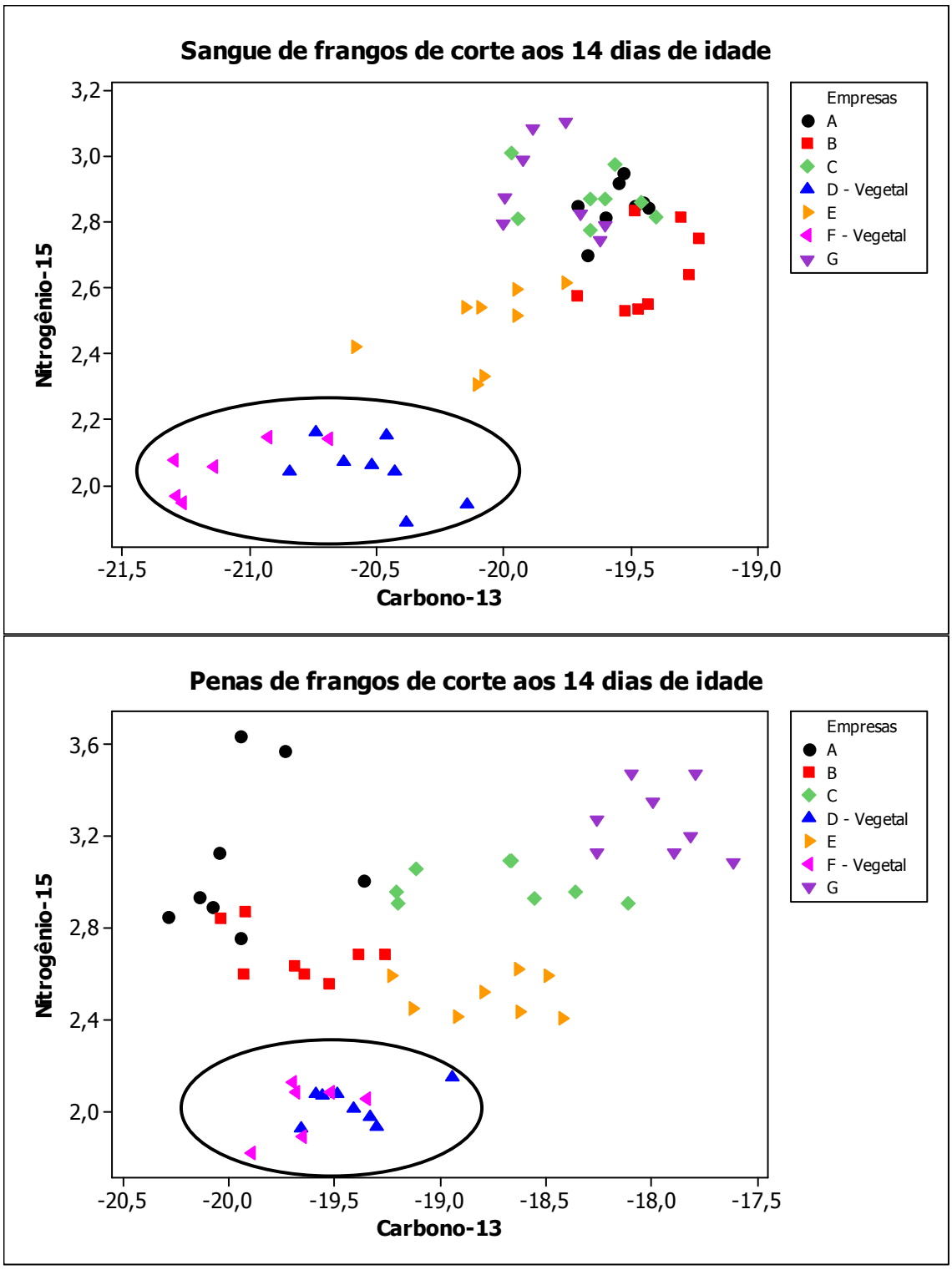


Figura 3. Dispersão dos valores isotópicos de carbono ($\delta^{13}C$) e nitrogênio ($\delta^{15}N$) do sangue e penas de frangos de corte de diferentes empresas avícolas aos 14 dias de idade, respectivamente (empresas A, B, C, E e G utilizam ração com inclusão de subprodutos de origem animal na alimentação dos frangos e as empresas D e F utilizam ração estritamente vegetal).

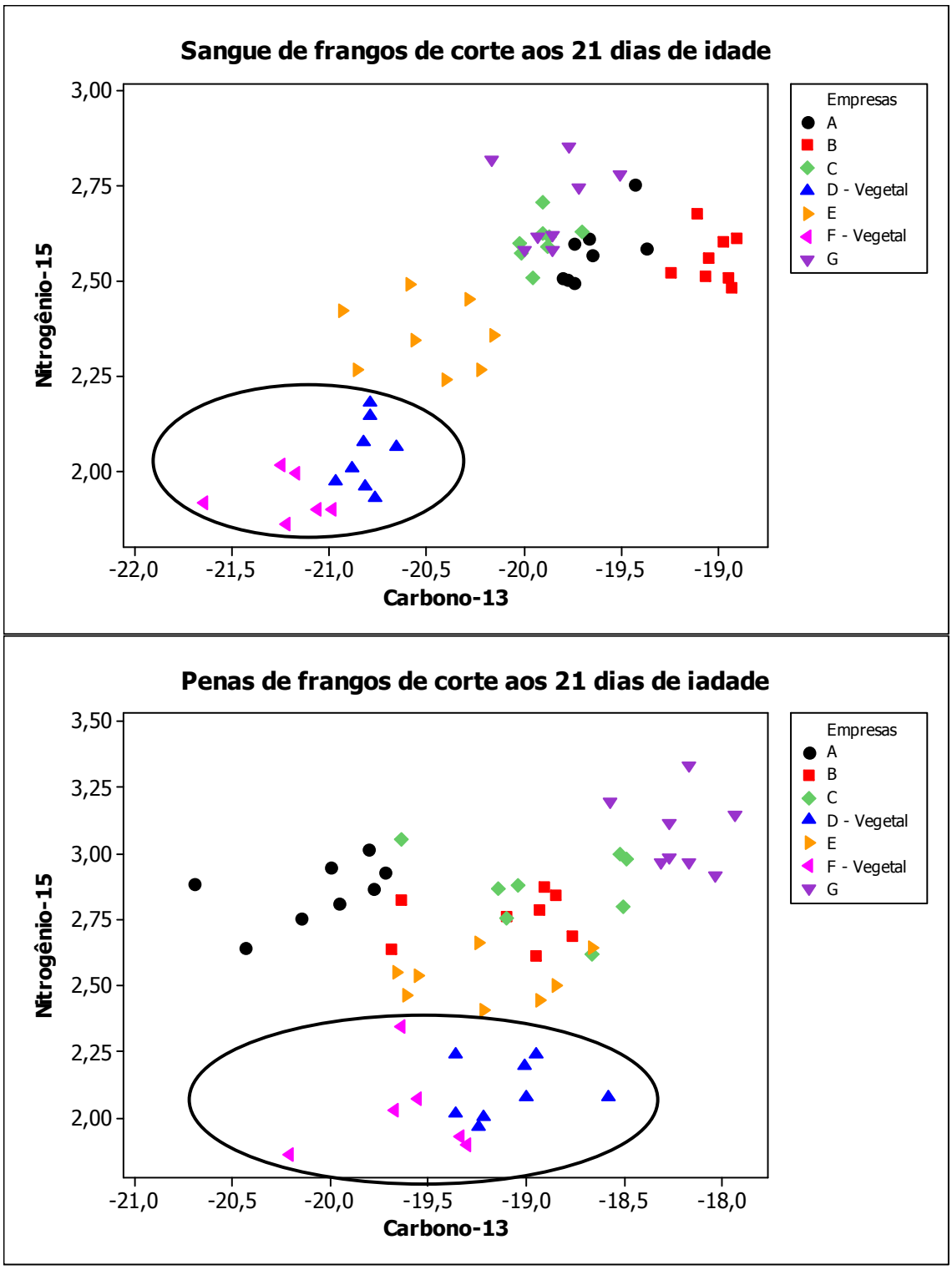


Figura 4. Dispersão dos valores isotópicos de carbono ($\delta^{13}C$) e nitrogênio ($\delta^{15}N$) do sangue e penas de frangos de corte de diferentes empresas avícolas aos 21 dias de idade, respectivamente (empresas A, B, C, E e G utilizam ração com inclusão de subprodutos de origem animal na alimentação dos frangos e as empresas D e F utilizam ração estritamente vegetal).

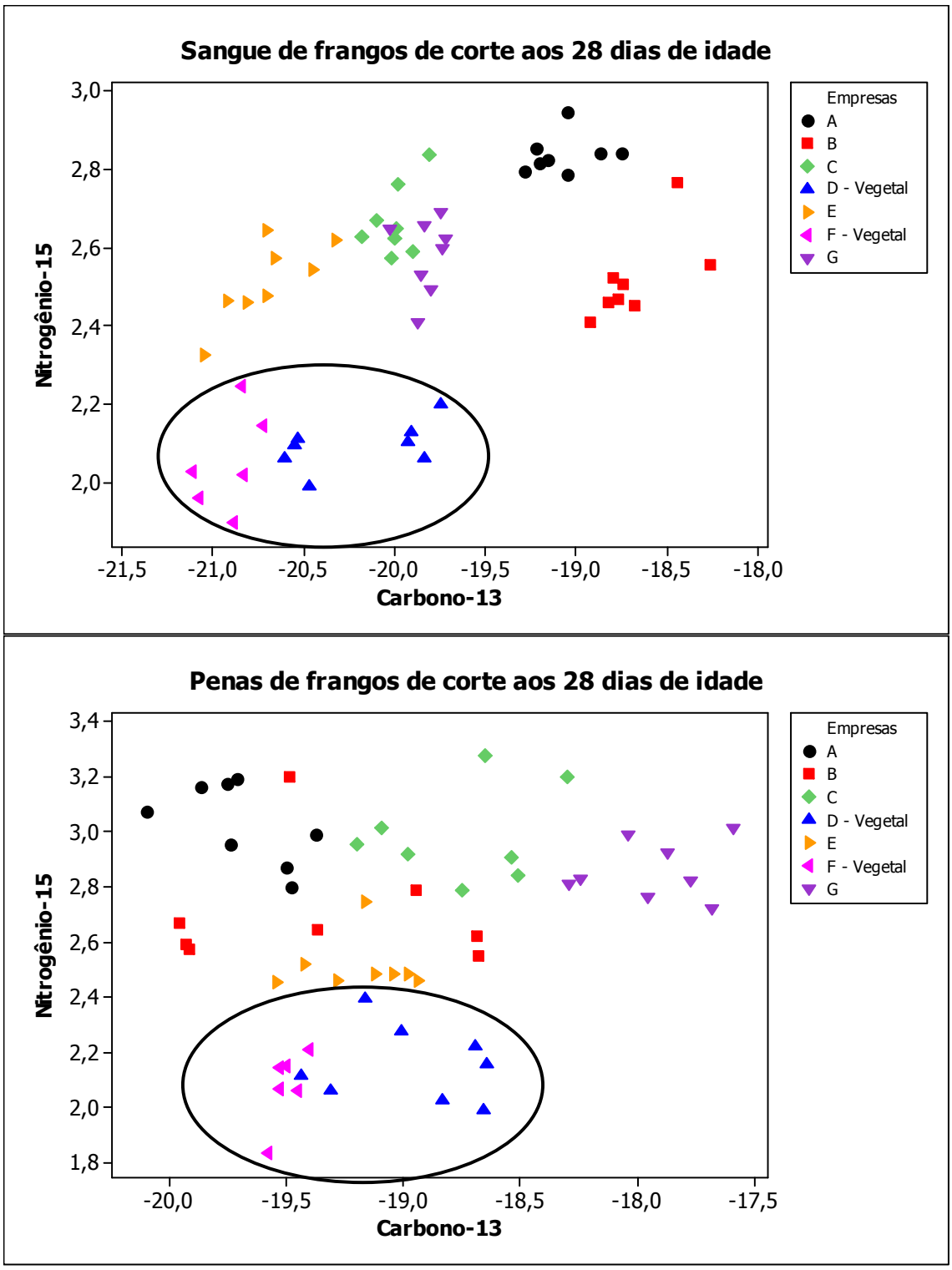


Figura 5. Dispersão dos valores isotópicos de carbono ($\delta^{13}C$) e nitrogênio ($\delta^{15}N$) do sangue e penas de frangos de corte de diferentes empresas avícolas aos 28 dias de idade, respectivamente (empresas A, B, C, E e G utilizam ração com inclusão de subprodutos de origem animal na alimentação dos frangos e as empresas D e F utilizam ração estritamente vegetal).

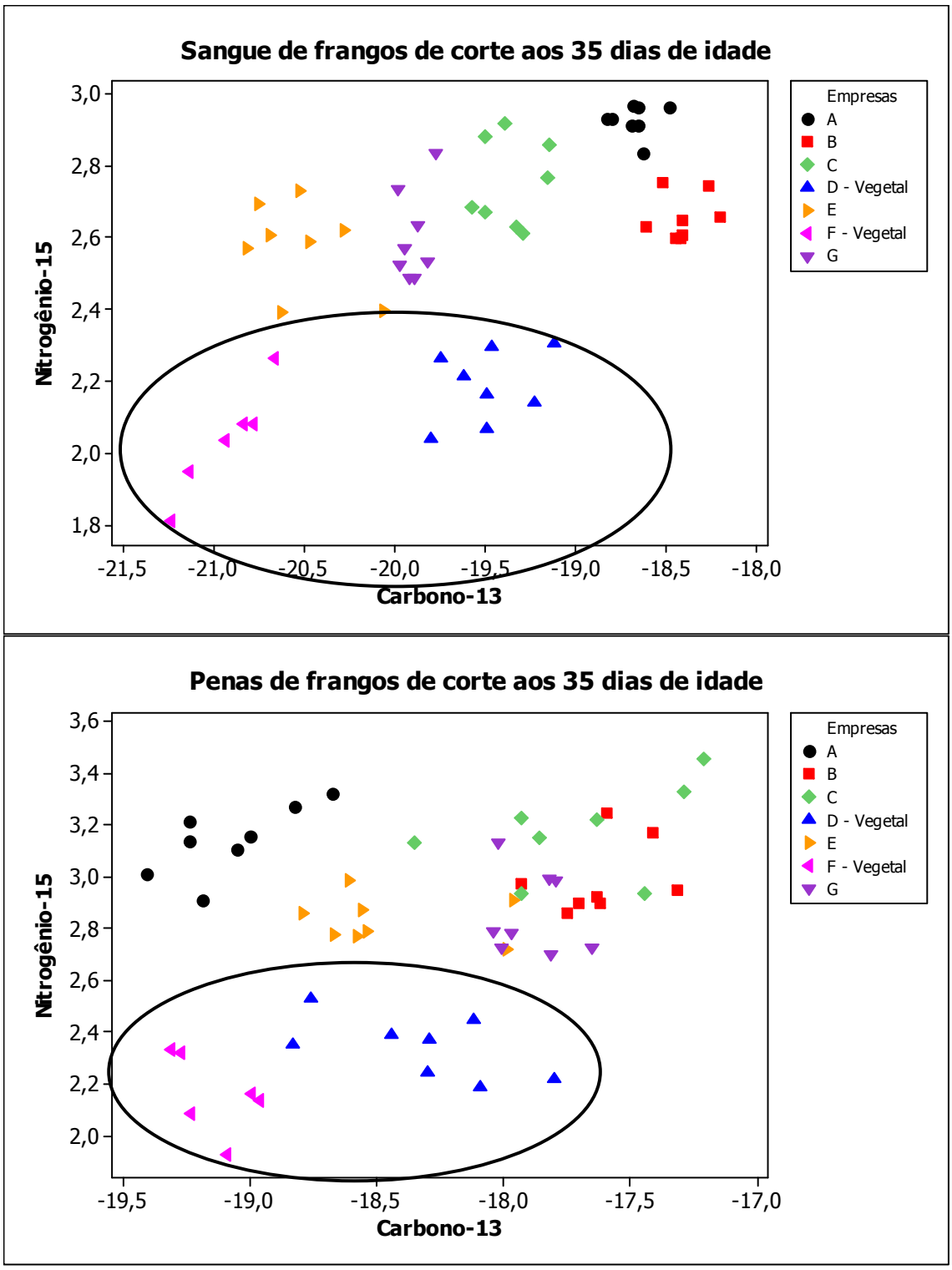


Figura 6. Dispersão dos valores isotópicos de carbono ($\delta^{13}C$) e nitrogênio ($\delta^{15}N$) do sangue e penas de frangos de corte de diferentes empresas avícolas aos 35 dias de idade, respectivamente (empresas A, B, C, E e G utilizam ração com inclusão de subprodutos de origem animal na alimentação dos frangos e as empresas D e F utilizam ração estritamente vegetal).

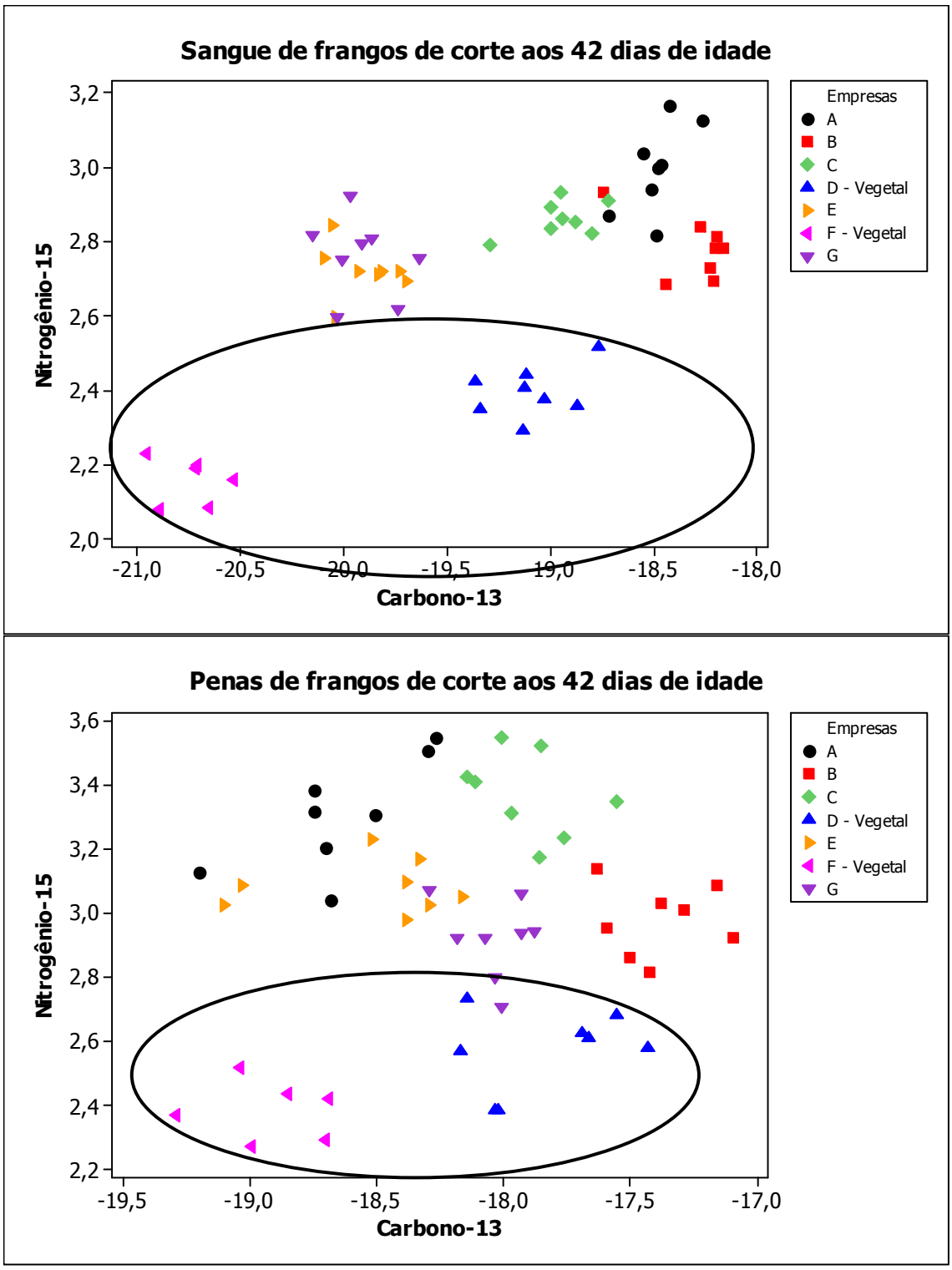


Figura 7. Dispersão dos valores isotópicos de carbono ($\delta^{13}C$) e nitrogênio ($\delta^{15}N$) do sangue e penas de frangos de corte de diferentes empresas avícolas aos 42 dias de idade, respectivamente (empresas A, B, C, E e G utilizam ração com inclusão de subprodutos de origem animal na alimentação dos frangos e as empresas D e F utilizam ração estritamente vegetal).

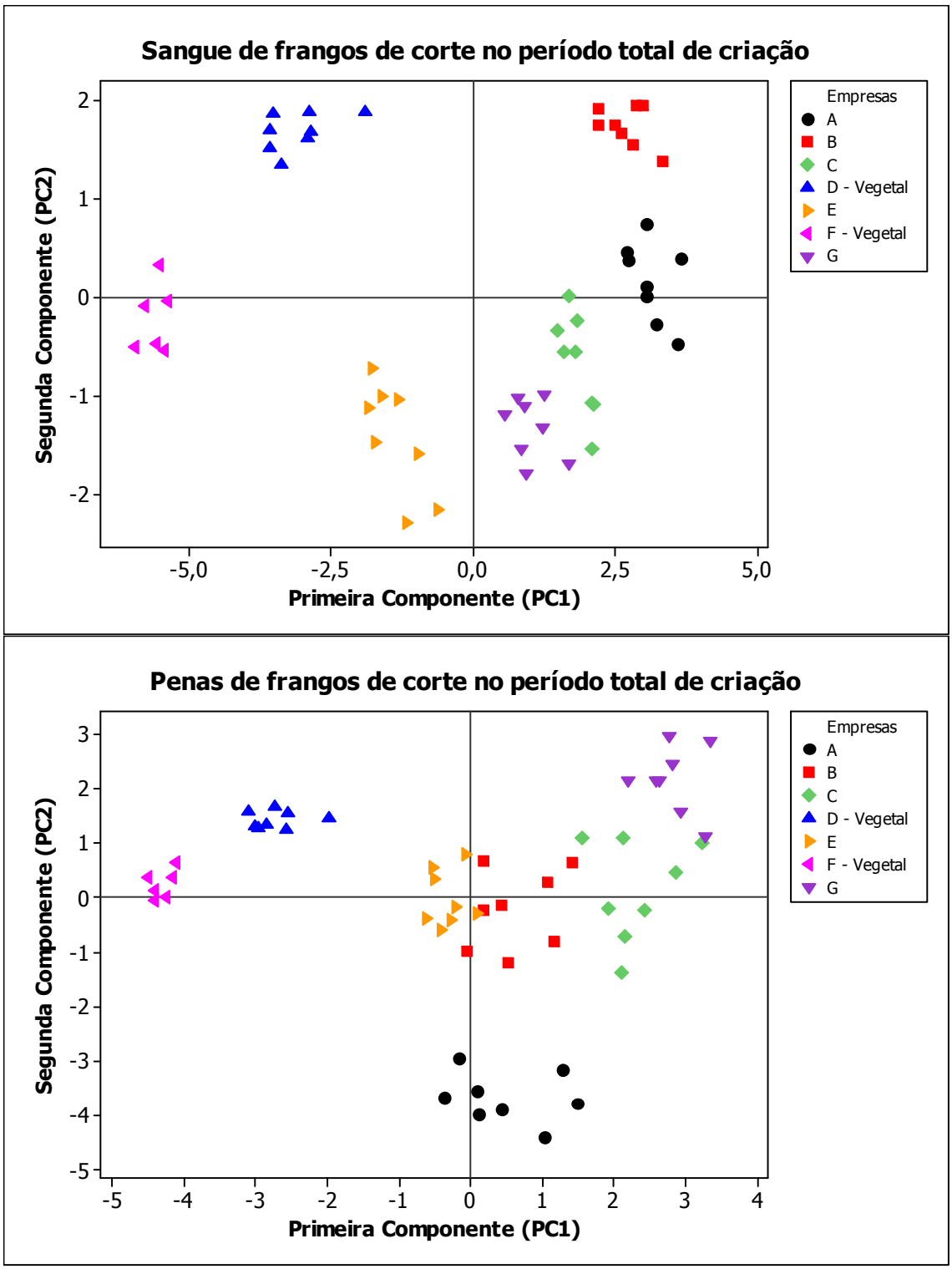


Figura 8. Análise de componentes principais do $\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$ do sangue e penas de frangos de corte de diferentes empresas avícolas no período total de criação (7 a 42 dias de idade), respectivamente (empresas A, B, C, E e G utilizam ração com inclusão de subprodutos de origem animal na alimentação dos frangos e as empresas D e F utilizam ração estritamente vegetal).

Tabela 6. Valores de participação das razões isotópicas de nitrogênio e carbono na primeira (PC1) e segunda (PC2) componentes da análise de componentes principais no sangue de frangos de corte de diferentes empresas avícolas.

Idade em dias das aves	Variáveis	PC1	PC2
7	$\delta^{15}N$	0,239	-0,377
	$\delta^{13}C$	0,297	0,128
14	$\delta^{15}N$	0,295	-0,311
	$\delta^{13}C$	0,315	-0,006
21	$\delta^{15}N$	0,301	-0,222
	$\delta^{13}C$	0,309	0,148
28	$\delta^{15}N$	0,295	-0,264
	$\delta^{13}C$	0,278	0,365
35	$\delta^{15}N$	0,303	-0,155
	$\delta^{13}C$	0,262	0,467
42	$\delta^{15}N$	0,308	-0,148
	$\delta^{13}C$	0,250	0,454
	Variância (%)	72,3	13,9
	Variância acumulada (%)		86,2

Tabela 7. Classificação das amostras isotópicas ($\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$) do sangue de frangos de corte de diferentes empresas avícolas ao longo do período de criação*.

Colocado no grupo	Grupo Verdadeiro						
	A	B	C	D	E	F	G
A	8	0	0	0	0	0	0
B	0	8	0	0	0	0	0
C	0	0	8	0	0	0	0
D	0	0	0	8	0	0	0
E	0	0	0	0	8	0	0
F	0	0	0	0	0	6	0
G	0	0	0	0	0	0	8
n total	8	8	8	8	8	6	8
n correto	8	8	8	8	8	6	8
Proporção (%)	100	100	100	100	100	100	100

*7 a 42 dias de idade; somente as empresas D e F utilizam alimentação estritamente vegetal; n=8, com exceção da empresa F que n=6.

Tabela 8. Valores de participação das razões isotópicas de nitrogênio e carbono na primeira (PC1) e segunda (PC2) componentes da análise de componentes principais nas penas de frangos de corte de diferentes empresas avícolas.

Idade em dias das aves	Variáveis	PC1	PC2
7	$\delta^{15}N$	0,295	-0,299
	$\delta^{13}C$	0,201	0,374
14	$\delta^{15}N$	0,377	-0,134
	$\delta^{13}C$	0,231	0,355
21	$\delta^{15}N$	0,395	-0,087
	$\delta^{13}C$	0,188	0,440
28	$\delta^{15}N$	0,362	-0,201
	$\delta^{13}C$	0,212	0,387
35	$\delta^{15}N$	0,351	-0,236
	$\delta^{13}C$	0,244	0,263
42	$\delta^{15}N$	0,321	-0,272
	$\delta^{13}C$	0,154	0,194
	Variância (%)	45,9	28,1
	Variância acumulada (%)		74,0

Tabela 9. Classificação das amostras isotópicas ($\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$) das penas de frangos de corte de diferentes empresas avícolas ao longo do período de criação*.

Colocado no grupo	Grupo Verdadeiro						
	A	B	C	D	E	F	G
A	8	0	0	0	0	0	0
B	0	8	0	0	0	0	0
C	0	0	8	0	0	0	0
D	0	0	0	8	0	0	0
E	0	0	0	0	8	0	0
F	0	0	0	0	0	6	0
G	0	0	0	0	0	0	8
n total	8	8	8	8	8	6	8
n correto	8	8	8	8	8	6	8
Proporção (%)	100	100	100	100	100	100	100

*7 a 42 dias de idade; somente as empresas D e F utilizam alimentação estritamente vegetal; n=8, com exceção da empresa F que n=6.

CONCLUSÕES

O sangue e penas das aves das empresas que utilizaram alimentação estritamente vegetal apresentaram valores isotópicos diferentes daquelas que utilizaram subprodutos de origem animal nas rações, portanto, a metodologia dos isótopos estáveis de carbono e nitrogênio mostrou-se uma ferramenta promissora para rastrear a presença de subprodutos de origem animal nas rações de frangos de corte de granjas comerciais.

REFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALLIN, N.Z. Authentication of meat and meat products. **Meat Science**, v.86, p.577-587, 2010.

CARRIJO, A.S.; PEZZATO, A.C.; DUCATTI, C.; SARTORI, J.R.; TRINCA, L.; SILVA, E.T. Traceability of Bovine Meat and Bone Meal in Poultry by Stable Isotope Analysis. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.8, n.1, p.63-68, 2006.

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 ($^{13}C/^{12}C$) and nitrogen ($^{15}N/^{14}N$) stable isotopes. **Poultry Science**, v.91, p.478-486, 2012.

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

DeNIRO M.J, EPSTEIN S. Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. **Geochimica et Cosmichimica Acta**, v.45, p.341-351, 1981.

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, 1992a.

HOBSON, K.A.; CLARK, R.G. Assessing avian diets using stable isotopes II: factors influencing diet-tissue fractionation. **The Condor**, v.94, p.189-197, 1992b.

HOPKINS, J.B.; FERGUSON, J.M. Estimating the Diets of Animals Using Stable Isotopes and a Comprehensive Bayesian Mixing Model. **PLoS ONE**, v.7, n.1, p.28478, 2012.

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.

KRCMAR, P.; RENCOVA, E. Identification of Species-Specific DNA in Feedstuffs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.7655-7658, 2003.

MINITAB Statistical Software [computer program], version 16. State College, PA: **Minitab Inc**, 2010.

NEWSOME, S.D.; DEL RIO, C.M.; BEARHOP, S.; PHILLIPS, D.L. A niche for isotopic ecology. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v.5, p.429-443, 2007.

NIELSEN, J.M.; POPP, B.N.; WINDER, M. Meta-analysis of amino acid stable nitrogen isotope ratios for estimating trophic position in marine organisms. **Oecologia**, v.178, p.631-642, 2015.

OLIVEIRA, R.P; DUCATTI, C.; CARRIJO, A.S.; PEZZATO, A.C.; DENADAI, J.C.; SARTORI, J.R.; CRUZ, V.C. Isotopic traceability in body tissues and in different breeding periods of broilers. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, n.5, p.1325-1334, 2012.

OLIVEIRA, R.P; DUCATTI, C.; PEZZATO, A.C.; DENADAI, J.C.; CRUZ, V.C.; SARTORI, J.R.; CARRIJO, A.S.; CALDARA, F.R. Traceability of poultry offal meal in broiler feeding using isotopic analysis ($\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$) of different tissues. **Brazilian Journal of Poultry Science,** v.12, p.13-20, 2010.

PACHECO, L.G.; SAKOMURA, N.K.; TRONI, A.R.; CAMPOS, D.M.B.; SUZUKI, R.M.; DENADAI, J.C.; DORETO, H.S. Tissue growth and turnover of ^{15}N in broiler chickens. **In: 52ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia** (Zootecnia: Otimizando Recursos e Potencialidades). SBZ:Belo Horizonte-MG, v.52, p.1-3, 2015.

PIMENTA, G.E.M.; DENADAI, J.C.; SARTORI, M.M.P.; PEZZATO, A.C.; SARTORI, J.R.; GARCIA, E.A.; ISHIZUKA, A.N.D.; LUIGGI, F.G.; FASANARO, R. PASQUALI, G.A.M.; SILVA, E.T.; DUCATTI, C. *Turnover* do carbono em sangue e plasma, nas fases crescimento e postura, de codornas japonesas (*Coturnix coturnix japônica).* **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** v.66, n.6, p.1847-1854, 2014.

SARTORI, M.M.P.; DENADAI, J.C.; GRACIA, A.M.L.; CARRIJO, A.S.; DUCATTI, C. Multivariate analysis of stable isotope data in the traceability process for birds. **Acta Scientiarum**, v.34, n.4, p.437-442, 2012.

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, n.3, p.439-448, 2013.

CAPÍTULO 4

IMPLICAÇÕES

IMPLICAÇÕES

Consumidores estão cada vez mais exigentes em relação a segurança e qualidade dos alimentos aumentando a procura por produtos diferenciados. Além disso, há influências culturais e religiosas de diferentes mercados importadores da carne de frango brasileira, assim como nichos de mercado interno, que estabelecem critérios distintos em relação a produção e consumo de produtos avícolas como, por exemplo, a demanda por animais que não tenham sido alimentados com subprodutos de origem animal.

A metodologia dos isótopos estáveis apresenta potencial de aplicação prática para detecção do uso de ingredientes de origem animal nas dietas de aves, pois permitiu a detecção destes na alimentação de frangos de corte experimentais. Nesse sentido, a metodologia dos isótopos estáveis garante segurança ao consumidor, pois é aplicada ao produto final e pode atestar se a ração analisada é a mesma que foi fornecida ao animal.

Os estudos realizados até o momento para avaliar a inclusão de subprodutos de origem animal na alimentação de frangos de corte foram conduzidos dentro de universidades. Para dar continuidade aos estudos faz-se necessário estudos de campo com os frangos de corte de granjas comerciais, como o presente, onde também foi possível diferenciar as empresas que utilizaram alimentação estritamente vegetal em relação às demais, nas diferentes idades e tecidos/frações corporais analisados, demonstrando a possibilidade de rastrear a presença de subprodutos de origem animal na alimentação dos frangos de corte de granjas comerciais, pela metodologia dos isótopos estáveis.

Entretanto, sugere-se mais estudos de campo em diferentes condições, como por exemplo, diversas empresas, regiões e épocas do ano, assim como estudar outros tecidos/frações corporais, principalmente aqueles que não demandem o sacrifício das aves, para que o uso das razões isotópicas de carbono ($^{13}C/^{12}C$) e nitrogênio ($^{15}N/^{14}N$) se tornem uma ferramenta consagrada no processo de certificação de frangos de corte alimentados com dietas sem subprodutos de origem animal.