

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

**MAPEAMENTO ISOTÓPICO DO LEITE DE BOVINOS DE PRODUTORES NO  
CENTRO OESTE PAULISTA**

**BEATRIZ PAVONI RIBAS**

Zootecnista

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-graduação em Zootecnia como parte dos  
requisitos para obtenção do título de  
Mestre.

BOTUCATU – SP  
Julho – 2020

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

**MAPEAMENTO ISOTÓPICO DO LEITE DE BOVINOS DE PRODUTORES NO  
CENTRO OESTE PAULISTA**

**BEATRIZ PAVONI RIBAS**  
Zootecnista

**Orientador: Prof. Dr. Ciniro Costa**

**Coorientadores: Prof.<sup>a</sup> Cyntia Ludovico  
Martins**

**Prof.<sup>o</sup> Paulo Roberto de Lima Meirelles**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-graduação em Zootecnia como parte dos  
requisitos para obtenção do título de  
Mestre.

BOTUCATU – SP

Julho – 2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Ribas, Beatriz Pavoni.

Mapeamento isotópico do leite de bovinos de produtores  
no Centro Oeste Paulista / Beatriz Pavoni Ribas. -  
Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista  
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina  
Veterinária e Zootecnia

Orientador: Ciniro Costa

Coorientador: Cyntia Ludovico Martins

Coorientador: Paulo Roberto de Lima Meirelles

Capes: 50403001

1. Leite - Produção. 2. Isótopos estáveis. 3. Carbono -  
Isótopos. 4. Nitrogênio - Isótopos.

Palavras-chave: Carbono; Isótopos estáveis; Leite;  
Nitrogênio; Rastreabilidade.

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Ronaldo Batista Ribas e Carmem Pavoni da Silva Ribas, por todas as demonstrações de amor, e por todo o exemplo de força, coragem e altruísmo que fizeram eu conquistar o meu espaço. Obrigado por demonstrarem tamanha generosidade e por terem me ensinado que a família é o meu bem mais precioso.

A minha irmã, Helena Pavoni Ribas por incentivar a buscar meus sonhos, por estar comigo em tantas recordações felizes e por me ensinar a força da dedicação.

## AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

À Deus, por me permitir encontrar pessoas maravilhosas em meu caminho.

Ao programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Campus de Botucatu, pela oportunidade de estudar em um programa de excelência.

À empresa Laticínios Gege Ltda, por permitir a coleta das amostras de leite de seus fornecedores e aos integrantes do laboratório físico-químico por me auxiliarem.

Ao Prof. Vladimir Eliodoro Costa pela amizade, orientação e paciência. Muito obrigado pelos conselhos e ensinamentos que levarei para a vida toda.

Ao Prof. Dr. Ciniro Costa e Prof. Cyntia Ludovico Martins por me receber e permitir a realização do meu projeto de pesquisa.

A Cibele Regina de Souza Kruliski e Nádia dos Reis Carvalho, pela orientação e suporte para a realização das análises isotópicas.

À minha amiga Angélica que me auxiliou durante o preparo das amostras experimentais. Obrigada pela predisposição, ajuda e companhia.

À todos os integrantes do CIE – Centro de Isótopos Estáveis - pela amizade, aconselhamento e conversas sempre muito produtivas.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP – Botucatu.

Às minhas amigas Analisa, Bárbara, Camilla, Charlene, Danielly, Gabriela, Letícia, a quem eu considero minhas irmãs, por todo apoio e conselhos.

À Christiane, por me incentivar com as palavras certas em momentos de incerteza.

Ao meu noivo Willian, por me mostrar que o segredo é ser simples, sonhar grande e ser grato.

Por fim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, deixo aqui o meu sincero...

**...OBRIGADA!**

## SUMÁRIO

|                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| CAPÍTULO 1 .....                                                                         | 8  |
| CONSIDERAÇÕES INICIAIS .....                                                             | 8  |
| 1. Panorama da Produção de Leite Bovino.....                                             | 9  |
| 2. Consumo de Leite Bovino .....                                                         | 10 |
| 3. Bovinocultura de Leite .....                                                          | 10 |
| 4. Laticínios .....                                                                      | 12 |
| 4.1. Gestão da Qualidade do Leite .....                                                  | 12 |
| 4.2. Fraudes no Leite .....                                                              | 14 |
| 5. Isótopos Estáveis .....                                                               | 15 |
| 5.1. Isótopos de Carbono.....                                                            | 17 |
| 5.2. Isótopos de Nitrogênio .....                                                        | 18 |
| 6. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS .....                                                       | 18 |
| 7. REFERÊNCIAS .....                                                                     | 19 |
| CAPÍTULO 2 .....                                                                         | 27 |
| MAPEAMENTO ISOTÓPICO DO LEITE DE BOVINOS DE PRODUTORES NO<br>CENTRO OESTE PAULISTA ..... | 27 |
| INTRODUÇÃO.....                                                                          | 30 |
| MATERIAL E MÉTODOS.....                                                                  | 31 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                                                             | 34 |
| CONCLUSÃO.....                                                                           | 41 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                                         | 42 |
| CAPITULO 3 .....                                                                         | 45 |
| IMPLICAÇÕES .....                                                                        | 46 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Localização dos Municípios do Centro-Oeste Paulista.....                                                                                                                                         | 31 |
| <b>Figura 2.</b> Comportamento isotópico do $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ ao longo dos meses de coleta (Junho a Dezembro/2018) .....                                                              | 35 |
| <b>Figura 3.</b> Comportamento isotópico de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ das microrregiões ao longo dos meses de coleta (Junho a Dezembro de 2018) .....                                         | 35 |
| <b>Figura 4.</b> Comportamento isotópico de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ da categoria do produtor (pequeno, médio, grande e mega) ao longo dos meses de coleta (Junho a Dezembro de 2018). ..... | 36 |
| <b>Figura 5.</b> Número de produtores das microrregiões e valor isotópico de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ .....                                                                                  | 37 |
| <b>Figura 6.</b> Elipse com 40% dos dados representando cada categoria de produtor.....                                                                                                                           | 38 |
| <b>Figura 7.</b> Elipse com 40% dos dados representando cada microrregião. ....                                                                                                                                   | 39 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.</b> Padrões internacionais de razão isotópica (WERNER & BRAND, 2001).....                                                                     | 16 |
| <b>Tabela 2.</b> Número de produtores por microrregião e produção de leite mensal.....                                                                     | 32 |
| <b>Tabela 3.</b> Valor isotópico $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ das microrregiões e categoria de produtores através do ANOVA e Teste T..... | 36 |



## **CAPÍTULO 1**

### **CONSIDERAÇÕES INICIAIS**

## **1. Panorama da Produção de Leite Bovino**

O leite é uma das commodities do setor agropecuário mais importante do mundo, sendo um dos 5 alimentos mais comercializados em volume e em valor (GDP, 2017). Segundo a Associação Brasileira de Indústria da Alimentação - ABIA (2017) a indústria de laticínios é o segundo seguimento mais influente no setor de alimentos no Brasil, atrás do segmento da carne e derivados.

Atualmente, 816 milhões de toneladas de leite são produzidas por ano no mundo e o Brasil, que ocupava o 10º lugar em 1974, passou a ser o terceiro maior produtor mundial de leite com 33,4 bilhões (kg) de leite produzidos em 2018. O primeiro colocado é a União Europeia com 154,8 bilhões (kg), seguido dos Estados Unidos com produção de 98,6 bilhões (EMBRAPA, 2019).

Segundo a Embrapa (2019), a região Sul foi a que mais contribuiu com a produção em 2018 com 35,7%, seguida do Sudeste, com 34,2%, Centro Oeste com 11,9%, Nordeste com 11,6% e Norte com 6,5%.

A produção em 2018 de leite bovino foi 1,6% maior que o ano de 2017, mostrando mais estabilidade (IBGE, 2018). Esse comportamento pode ser explicado pela menor necessidade de importação de leite e menores custos de produção, tendo em vista que no segundo semestre de 2017 os principais fatores que contribuíram para desacelerar a produção foram aumento nos custos com alimentação, combustível e energia (ABVL, 2018).

No início de 2018, segundo a PPM – Pesquisa da Pecuária Municipal, a produção de leite no Brasil voltou a crescer após três anos consecutivos de queda, sendo alguns dos fatores que contribuíram com a expansão da produção leiteira: o preço do leite pago ao produtor foi mais elevado e a previsão da safra de 2018/2019 foi confirmada. Com o preço do leite mais alto e a economia com os custos na alimentação animal houve melhora na rentabilidade da produção de leite, resultando na expansão para a produção em 2019.

O primeiro semestre de 2019, tendo em vista esse cenário de expansão, apresentou 5,4% de captação de leite em relação ao mesmo período de 2018 (CNA, 2019). Entretanto, como o crescimento da demanda por lácteos é influenciado pela economia, o fraco desenvolvimento econômico do Brasil dificultou o crescimento desse setor a curto prazo (EMBRAPA, 2019).

Outro fator que contribui para o aumento do consumo de leite e derivados é a confiança dos consumidores nesses produtos. Os consumidores que têm o leite e os seus derivados como produtos essenciais de consumo, estão sempre em busca de alimentos de qualidade e preços baixos.

## **2. Consumo de Leite Bovino**

Um novo conceito de Guia Alimentar Americano, o NRF- Nutrient Rich Foods, estabelecido pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) classifica os alimentos de acordo com sua composição nutricional, sendo o leite considerado um alimento de elevada densidade nutritiva, uma vez que apresenta grande concentração de nutrientes em relação ao seu teor calórico (USDA & USDHHS, 2010; DREWNOWSKI, 2010). Diante disso, o consumo de leite pode ser considerado importante, pois o Guia Alimentar Americano (2010) prioriza o consumo de alimentos com alta densidade de nutrientes e com baixa densidade energética como parte de uma alimentação saudável.

Atualmente, 116,5 kg de leite são consumidos em média por habitante/ano e esses números estão em crescimento a cada ano, com taxas anuais de 1,2%, desde 1999 segundo o IFCN-Dairy Research Center (2018). No Brasil as taxas de crescimento anual do consumo de leite nos últimos dez anos são superiores ao crescimento mundial: média 2,7% ao ano (IFCN, 2018).

O leite e seus derivados estão presentes na dieta da maior parte da população e por apresentar alto valor nutricional, é um dos alimentos de origem animal mais produzido e consumido no mundo (HANDFORD et al., 2016). Segundo a FAO (2016) o leite de vaca representa cerca de 82,7% da produção mundial, seguido do leite de búfala (13,3%), leite de cabra (2,3%), leite de ovelha e de camela (0,4%).

## **3. Bovinocultura de Leite**

Nas últimas décadas, a bovinocultura leiteira brasileira apresentou crescimento contínuo resultando em aumento da produção, levando o país a ocupar lugar de destaque mundial nesse setor (ROCHA e CARVALHO, 2018).

O Brasil possui como característica marcante a heterogeneidade, devido à grande extensão de terra, permitindo variados tipos de sistemas de produção leiteira e perfis de produtores (CARVALHO et al., 2007). A diferença de clima e de solo entre as regiões, influenciam diretamente a diversificação do sistema produtivo, permitindo a existência de produtores especializados e produtores familiares (TELLES; TANAKA; PELLINI, 2008).

A produção de leite no Estado de São Paulo apresenta diferentes níveis tecnológicos classificados em pequenos, médios e grandes produtores. Os pequenos produtores geralmente não têm a atividade leiteira como a principal fonte de renda, consequentemente apresentam índice de produtividade baixa. As outras categorias, os médios e grandes produtores, geralmente

apresentam melhores índices de produtividade por animal, consequência de investimento e maior nível tecnológico (EMATER, 2019).

Segundo a Emater (2019), os sistemas de produção são classificados em: produção à base de pasto. Nesse sistema os animais permanecem livres durante o dia, com acesso ao pasto; semiconfinamento, onde os animais têm acesso ao pasto, porém permanecem confinados durante um período. O sistema de confinamento total é quando os animais são mantidos em galpão chamados de free-stall, compost barn, entre outros.

Os sistemas produtivos com base em pastagem são os mais difundidos no país, e geralmente esses produtores possuem resistência em fornecer concentrado aos animais durante todo ano. Nesses casos, o rebanho recebe concentrado, em pequenas quantidades, apenas durante o período seco do ano, momento em que a pastagem reduz a sua capacidade de manutenção. Os sistemas de produção de semiconfinamento e confinamento total apresentam controle maior das dietas dos animais se programadas para garantir alimento para o gado durante o ano todo. (CNA, 2019).

Os alimentos que compõe a dieta dos animais leiteiros são classificados em volumosos e concentrados. Os alimentos volumosos contêm fibra bruta acima de 18% na matéria seca e são as forrageiras secas (feno), pastagens plantadas, pastos nativos, forrageiras verdes e silagens. As silagens frequentemente encontradas são feitas com cana-de-açúcar, capim-elefante, milho ou sorgo (GONÇALVES, BORGES, FERREIRA, 2009).

Os alimentos concentrados são aqueles que possuem menos de 18% de fibra bruta. São subdivididos em concentrados energéticos (menos de 20% de proteína bruta), sendo o milho, sorgo, trigo, aveia, cevada, entre outros, e concentrados proteicos (mais de 20% de proteína bruta), e são o farelo de soja, farelo de amendoim, girassol, algodão, glúten de milho, entre outros (GONÇALVES, BORGES, FERREIRA, 2009).

A raça escolhida para a produção leiteira também é um fator utilizado para classificação tecnológica. As raças europeias puras, são especialmente selecionadas para a produção de leite, como a Holandesa, Parda-suiça ou Jersey. As raças europeias de dupla aptidão para produção de leite e carne, são a Simental, Dinamarquesa e Red pool. As raças Zebu leiteiras especializadas são a Gir, Guzerá e Sindi. E as vacas mestiças, derivadas do cruzamento de raça européia com raça zebu em vários graus de sangue. Desses cruzamentos a raça mais difundida no Brasil é a Girolando (TEIXEIRA et. al., 2001).

#### **4. Laticínios**

Por muito tempo, o leite era apenas consumido por quem o produzia e segundo Souza (1981) no início do século XX, os próprios produtores de leite comercializavam o produto. Nesse seguimento, com o aumento do consumo e demanda, surgiram as cooperativas e empresas de laticínios com o principal objetivo de comercializar o leite de maneira mais segura para a população. A partir da necessidade de conscientização, foram realizadas palestras de higiene em laticínios além de campanhas sobre a importância do leite para a saúde (LEITE et al., 2006).

O avanço das normativas até o cenário atual permitiu o crescimento tecnológico do setor leiteiro, além de equiparação quanto aos padrões de qualidade. A indústria de laticínios é responsável pela produção do leite desde o início da cadeia (IN76 e IN77, 2018), cuja algumas funções são controlar, registrar, capacitar, implantar planos de melhorias, além de possuir programa de autocontrole de todo o processo.

##### **4.1. Gestão da Qualidade do Leite**

De acordo com a Instrução Normativa N°62, de 29 de dezembro de 2011, revogada e substituída pelas Instruções normativas N° 76 e 77, de 26 de novembro de 2018, o leite é um produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, o qual é obtido de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas, sendo que o leite proveniente de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que proceda (BRASIL, 2018).

O constante aperfeiçoamento das ações de controle de alimentos com o objetivo de proteger a saúde da população está sempre em desenvolvimento. Medidas de controle, regulamentação e padronização são adotadas pelas indústrias de laticínios e implantadas ao longo da cadeia produtiva, a partir da obtenção do leite cru, passando pelo beneficiamento do leite e seus derivados, até a distribuição e comercialização. A qualidade dos produtos lácteos passa a ser uma exigência legal por ser consumido por todas as faixas etárias e principalmente por lactentes, crianças e idosos (ALVES, 2007).

O controle de qualidade é realizado a partir da implementação de procedimentos ao longo do processo de produção, onde é possível visualizar o grau de segurança ou de risco no consumo de tais alimentos (MARTINS et al., 2009).

O termo segurança do alimento significa garantia de produtos livres de contaminantes que podem ser de origem química, biológica, física ou qualquer outra substância que possa colocar em risco a saúde do consumidor (FERREIRA et al., 2010). A contaminação pode ocorrer em qualquer estágio da produção do alimento desde a sua produção, acondicionamento

e distribuição (ISARA et al., 2010). Além disso, a manipulação inadequada, utilização de matérias primas cruas e contaminadas, contaminação bacteriana, uso inadequado de aditivos químicos são fatores responsáveis por tornar um alimento inapropriado para o consumo (FERREIRA et al., 2010).

A partir desse cenário, as indústrias brasileiras contam com gestão de qualidade responsável pela implantação de procedimentos, entre eles estão o APPCC – Análise de perigo e pontos críticos de controle, BPF – Boas práticas de fabricação e o PPHO – Procedimentos Padrões de Higiene Operacionais (BRASIL, 1997; 2003).

O sistema de Controle APPCC se baseia na identificação e avaliação de possíveis perigos que possam surgir desde a obtenção da matéria prima até o consumo do alimento e, desta forma, implementar medidas de controle visando a prevenção para garantir a segurança do alimento (CODEX ALIMENTARUS, 2009).

As BPF's são compostas de procedimentos para a produção dos alimentos beneficiados pela indústria, a fim de assegurar que os produtos atinjam a qualidade exigida (BRASIL, 1997).

Os Procedimentos padrões de higiene operacionais tem como objetivo evitar a contaminação direta ou cruzada e a adulteração do produto por meio da higiene antes, durante e depois do beneficiamento da matéria prima, tornando-se atividades rotineiras da empresa (BRASIL, 2003).

Além das medidas de controle de qualidade, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) possui alguns programas que visam melhorias na produção do leite, sendo o Programa Mais Leite Saudável e o Plano de Qualificação dos Fornecedores de Leite. Além disso, para o beneficiamento do leite cru, os estabelecimentos apresentaram uma série de procedimentos que compõe o controle de qualidade.

O Programa Mais Leite Saudável é realizado pelos laticínios ou cooperativas, onde são elaborados projetos cujo objetivo é a melhoria na qualidade do leite fornecidos à indústria, assim como produtividade e rentabilidade da atividade dos produtores rurais. Essa prática permite aos laticínios e cooperativas, o retorno de créditos presumidos do PIS/Pasep e da COFINS, de leite cru utilizado para beneficiamento (BRASIL, 2015).

O Plano de Qualificação dos Fornecedores de Leite (PQFL) foi instituído pela Instrução Normativa nº 77, de 26 de novembro de 2018, e deve ser implantada nos laticínios e cooperativas como parte do programa de controle de qualidade da empresa. No PQFL é definido a política do estabelecimento em relação aos seus fornecedores de leite, onde o plano deve contemplar a assistência técnica e gerencial, bem como a capacitação de todos os produtores,

com foco em gestão da propriedade e implementação das boas práticas agropecuária (BRASIL, 2018).

#### **4.2. Fraudes no Leite**

A crescente procura por leite e derivados faz com que seja um produto sujeito a sofrer fraudes que podem acontecer em qualquer etapa da cadeia, sendo possível desde a sua produção até a indústria (FAGNANI, 2016).

Sendo assim, o interesse dos consumidores em conhecer a origem do leite e ter a garantia de segurança aumentou, devido a alguns casos de contaminação ocorridos nesse alimento. Em 2008, na China, milhares de crianças consumiram produtos derivados do leite que continham melamina, um composto nitrogenado utilizado como aditivo na fabricação de plásticos, e sofreram sérias consequências (XIU & KLEIN, 2010). Centenas de produtos provenientes da adulteração do leite foram retirados de 47 países, aproximadamente. (EVERSTINE et al., 2013; HANDFORD et al., 2016).

Em 2012, foram detectados produtos lácteos contaminados por bactérias patogênicas na Nova Zelândia (HON & LUNG, 2014). No Brasil, em 2007, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) interditou cooperativas em Minas Gerais por constatar fraude no leite com o uso de soda cáustica e água oxigenada. Entre os anos de 2012 e 2014, foram encontrados, por meio de análises e fiscalizações realizadas pelo MAPA peróxido de hidrogênio, soda cáustica e álcool etílico como adulterantes no leite (BRASIL, 2014). Após o exercício de rastreabilidade, foram detectados os lotes fraudados nos Estados de São Paulo, Paraná, Rio de Janeiro e Espírito Santo (BRASIL, 2014).

Portanto, a fim de garantir qualidade e segurança de produtos de origem animal, a demanda por certificação de origem está cada vez maior, assim como o avanço de pesquisas em técnicas para a garantia da autenticidade dos produtos (PRIMROSE et al., 2010).

Segundo Santos et al. (2013), para que o produto transmita confiança para o consumidor, o mesmo deve atender algumas exigências específicas que, no caso do leite, é o processo pelo qual é submetido, além de apresentar características sensoriais e visuais dentro do padrão.

Diante disso, para atingir o padrão esperado, técnicas de autenticidade que garantam a segurança alimentar estão em crescente expansão para produtos manufaturados em larga escala, sendo a técnica de isótopos estáveis uma alternativa promissora para identificar a origem e qualidade de produtos de origem animal e vegetal (CARRIJO et al., 2006).

## 5. Isótopos Estáveis

Os isótopos são definidos como átomos do mesmo elemento químico. O termo isótopo vem do grego ISO (mesmo ou igual) e TOPOS (lugar), sendo aqueles que ocupam o mesmo lugar na tabela periódica. Possuem o mesmo número de prótons (Z) e diferentes números de nêutrons (N) e, conseqüentemente, diferentes números de massas (A), sendo  $A=Z+N$  (DUCATTI, 2011). Apesar dos isótopos apresentarem as mesmas propriedades químicas por representarem átomos do mesmo elemento, possuem diferentes propriedades físicas devido ao diferente número de massa. São definidos como estáveis aqueles isótopos que não emitem radiação apresentando propriedades nucleares estáveis, ou seja, seus Z e N não são alterados ao longo do tempo, diferentemente dos isótopos radioisótopos, instáveis, que emitem energia radiações e sofrem decaimentos (MARTINELLI et al., 2009).

Os isótopos estáveis ocorrem de maneira comum na natureza, podendo ser utilizados sem riscos à saúde e ao ambiente. São elementos que apresentam as mesmas propriedades químicas (eletrosfera) e diferentes propriedades físicas (massa do núcleo) o que permite a discriminação isotópica por espectrometria de massa de razão isotópica, que separa os isótopos ou moléculas de acordo com suas massas e movimentos em campos magnéticos (HOEFS, 2009). A composição isotópica é expressa pela razão entre o isótopo menos abundante e o isótopo mais abundante. Ex:  $R=^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  (DUCATTI, 2011).

A razão isotópica de uma amostra em relação a uma razão padrão é denominada diferença relativa da razão isotópica, e pode ser determinada no animal como um todo, ou individualmente pelos seus tecidos e compostos bioquímicos. A diferença relativa da razão isotópica dos elementos é expressa em notação  $\delta$  (‰ ou ‰) e calculada pela equação a seguir (COPLEN, 2011):

$$\delta X = [(R_{\text{amostra}}/R_{\text{padrão}}) - 1]$$

Em que:

- $\delta x$  (amostra, padrão): é a razão isotópica do elemento de uma amostra em relação ao padrão internacional desse elemento, em partes per mil (‰).
- R: razão isotópica dos isótopos estáveis ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ,  $^2\text{H}/^1\text{H}$ ) da amostra e do padrão, respectivamente.



Os elementos de interesse das pesquisas são o carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio e enxofre (CHON'S), e seus padrões estão descritas na Tabela 1. São encontrados em grande quantidade em compostos biológicos como os carboidratos, lipídeos, proteínas, aminoácidos e ácidos nucleicos (DUCATTI et al., 2011).

**Tabela 1. Padrões internacionais de razão isotópica (WERNER & BRAND, 2001)**

| Isótopo         | Razão Isotópica               | Padrão Internacional                       | Valor do padrão |
|-----------------|-------------------------------|--------------------------------------------|-----------------|
| $^1\text{H}$    | $^2\text{H}/^1\text{H}$ (D/H) | Vienna Santandard Mean Ocean Water (VSMOW) | 0,00015575      |
| $^{13}\text{C}$ | $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ | Vienna Pee Dee Belemnite (VPDB)            | 0,0111802       |
| $^{15}\text{N}$ | $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ | Ar Atmosferico (AIR)                       | 0,0036782       |
| $^{18}\text{O}$ | $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ | Vienna Santandard Mean Ocean Water (VSMOW) | 0,0020052       |
|                 |                               | Vienna Pee Dee Belemnite (VPDB)            | 0,0020672       |
| $^{34}\text{S}$ | $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ | Vienna Canyon Diablo Troilite (VCDT)       | 0,0451509       |

Dentre as diversas linhas de aplicação da análise de isótopos estáveis – AIE, na zootecnia, esta pode ser utilizada para a identificação na mudança de dieta dos animais (OSORIO et al., 2011), origem geográfica do leite (LIU et al., 2019), leite convencional *versus* leite orgânico (CHUNG et al., 2018) e variação isotópica por meio do processo de beneficiamento do leite (BOSTIC et al., 2018), e certificação de origem geográfica do leite de produtos lácteos (CAMIN et al., 2012).

Liu et al. (2019) encontraram correlação positiva entre  $\delta^{13}\text{C}$  e a caseína do leite e proporção do uso de plantas  $\text{C}_4$  na dieta de cabras. Além disso, o valor de  $\delta^{15}\text{N}$  também foi influenciado pela quantidade de plantas fixadoras de nitrogênio ( $\text{C}_3$ ) inclusas na dieta desses animais. Como resultado os leites das cabras foram caracterizados de acordo com a dieta fornecida provindas de províncias diferentes na China.

Em estudo sobre variação isotópica por meio do processamento do leite, Chung et al. (2018) obtiveram diferentes valores de carbono para o leite orgânico durante as estações do ano, diferentemente do leite convencional que apresentou valores considerados constantes. Além disso, o leite orgânico apresentou  $\delta^{13}\text{C}$  menores no verão e maiores no inverno.

Neste contexto, a AIE possibilita que sejam realizadas muitas pesquisas voltadas para a agropecuária, em que mais de 90% de todos os tecidos vivos compostos por bioelementos como o CHON'S permita a utilização desse tipo de análise na rastreabilidade e autenticação de

produtos, pois a razão isotópica dos tecidos de animais depende principalmente da alimentação, água ingerida e dos gases inalados (KENNEDY & KROUSE, 1990).

A AIE de oxigênio e hidrogênio provenientes dos tecidos e dos produtos dos animais tem origem da água de bebida, dieta e também do ar (HOBSON & KOEHLER, 2015). O valor isotópico de  $\delta^{18}\text{O}$  e  $\delta^2\text{H}$  na água varia de acordo com a origem geográfica, sendo dependente da temperatura, altitude, latitude e distância da costa (WEST et al., 2010).

De acordo com Krivachy (2015) a relação entre os valores isotópicos de  $\delta^{18}\text{O}$  da água presente no tecido animal e água de bebida depende da espécie animal, consumo e taxa de respiração. Além disso, a estação do ano, o ambiente em que o animal vive e a sua condição fisiológica também estão relacionados ao valor isotópico (ABENI, 2015).

Atualmente, pesquisas voltadas para a identificação da origem geográfica do leite e outros produtos de origem animal por meio da análise de isótopos estáveis de carbono e nitrogênio vem sendo realizadas por serem excelentes traçadores potenciais do leite (PRACHE et al., 2005), e possuírem grande potencial para distinguir as dietas fornecidas ao gado leiteiro, sendo considerados ótimos indicadores para correlacionar os produtos de origem animal com o seu ambiente de criação (SUN et al., 2012).

### 5.1. Isótopos de Carbono

Na natureza há dois isótopos estáveis do Carbono  $^{12}\text{C}$  com abundância de 98,89% e o  $^{13}\text{C}$  com 1,11%, correspondendo a composição total. A principal fonte de Carbono para as plantas é o  $\text{CO}_2$  atmosférico, cujo o valor isotópico de  $\delta^{13}\text{C} = -7,7\text{mUr}$  (KENNEDY & KROUSE, 1990). O ciclo do Carbono é a troca de  $\text{CO}_2$  que ocorre na atmosfera, superfícies dos oceanos e ecossistema terrestre, e a principal diferenciação isotópica do  $\delta^{13}\text{C}$  é por meio dos diferentes processos de fotossíntese das plantas  $\text{C}_3$  e  $\text{C}_4$  (DUCATTI et al., 2011).

Plantas de ciclo fotossintético  $\text{C}_3$  (arroz, aveia, cevada, hortaliças, beterraba, mandioca, soja, alfafa, frutíferas em geral, trigo, leguminosas, gramíneas de clima temperado, entre outros) utilizam o ciclo Calvin-Benson para fixar o  $\text{CO}_2$  durante o processo fotossintético e tendem a apresentar o valor isotópico  $\delta^{13}\text{C}$  entre  $-20\text{mUr}$  e  $-30\text{mUr}$ . Entretanto, as plantas de ciclo  $\text{C}_4$  (milho, cana-de-açúcar e gramíneas tropicais, entre outras) apresentam os valores isotópicos entre  $-9\text{mUr}$  a  $-17\text{mUr}$  e fixam o  $\text{HCO}_3^-$  por meio do ciclo Hatch-Slack (SUN et al., 2011).

O resultado obtido entre a razão isotópica  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  das plantas de diferentes ciclos fotossintéticos ( $\text{C}_3$  e  $\text{C}_4$ ) possibilita pesquisas voltadas para a nutrição animal devido ao fato das plantas serem a principal fonte de alimento dos animais, criando perfis que são refletidos nos tecidos e produtos de origem animal (DENIRO & EPSTEIN, 1978; GANNES et al., 1998). Isto

possibilita diferenciar as dietas a partir da análise isotópica nos tecidos e produtos (DUCATTI, 2007).

## 5.2. Isótopos de Nitrogênio

O Nitrogênio está presente de forma natural no ar atmosférico e é transformado constantemente em diversas formas e estados por processos físicos e ação de microrganismos, que metabolizam compostos nitrogenados em material inorgânico (nitrato e amoníaco) e orgânico (proteínas). A diferenciação da razão isotópica do Nitrogênio nas plantas depende do modo de fixação do mesmo, portanto não há interação com o ciclo fotossintético como acontece com o Carbono (DUCATTI et al., 2011). Esse elemento apresenta apenas dois isótopos estáveis:  $^{14}\text{N}$  (93,63%) e  $^{15}\text{N}$  (0,3665%) de abundância. O padrão utilizado como referência é oriundo do Nitrogênio molecular do ar, apresentando aproximadamente valor isotópico  $\delta^{15}\text{N} = 0 \text{ mUr}$ .

Valores isotópicos de  $\delta^{15}\text{N}$  nos tecidos dos animais e em produtos de origem animal, refletem a composição das suas dietas. As plantas que possuem bactérias fixadoras de Nitrogênio em suas raízes conseguem capturar o  $\text{N}_2$  atmosférico sendo a razão isotópica  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  muito próximo ao padrão (DUCATTI et al., 2011). Assim, como o valor isotópico do  $\delta^{15}\text{N}$  com origem de plantas fixadoras é próximo ao padrão, o valor isotópico do Nitrogênio proveniente de plantas que não são fixadoras, como as gramíneas, é mais significativo, dependente da abundância isotópica do solo e da variação consequente da adubação. (CHOI et al., 2002).

O valor de  $\delta^{15}\text{N}$  é mais significativo se o solo sofrer adubação de matéria orgânica decomposta, podendo atingir valores isotópicos de  $10 \text{ mUr}$  (SHIBUYA et al., 2006). Entretanto, em solos mais arenosos e secos, onde há pouca presença de matéria orgânica, ou quando são utilizados fertilizantes químicos, é observado valores baixos para  $^{15}\text{N}$ . Isto se deve ao fato dos fertilizantes possuírem valor de  $^{15}\text{N}$  próximo a  $0 \text{ mUr}$ , uma vez que a fonte de Nitrogênio utilizado na fabricação desse tipo de adubo é o Nitrogênio atmosférico (YONEYAMA, 1996).

## 6. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Dentro desse contexto, visto que o leite é consumido e produzido em larga escala, o objetivo foi verificar se composições isotópicas podem ser usadas como “impressões digitais” para caracterizar o leite do Centro-Oeste Paulista durante o período de Junho/2018 a Dezembro/2018.

Os valores dos isótopos estáveis de Carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) e Nitrogênio ( $\delta^{15}\text{N}$ ) no leite cru, foram correlacionados com municípios, meses de coleta e a categoria dos produtores, a fim de determinar a relação entre eles.

Os resultados obtidos servirão para auxílio de futuros estudos sobre origem geográfica, além de estimular o uso de isótopos estáveis como ferramenta tanto para pesquisa como para autenticação da origem do leite e derivados.

## 7. REFERÊNCIAS

ABENI, F.; PETRERA, F.; CAPELLETTI, M.; DAL PRA, A.; BONTEMPO, L.; TONON, A.; CAMIN, F. Hydrogen and oxygen stable isotope fractionation in body fluid compartments of dairy cattle according to season, farm, breed, and physiological stage. **Plos One**, 10(5):e0127391, 2015.

ABIA – Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação. Números do setor: Faturamento 2017. Disponível em: <https://www.abia.org.br/vsn/ane-xos/>. Acesso em 25 abr. 2019.

ALVES, A.E.S. **A organização do trabalho na indústria de laticínios**. In: ENCONTRO DE ESTUDOS E PESQUISA EM HISTÓRIA, TRABALHO E EDUCAÇÃO, São Paulo. Campinas, SP.13 p. 2007. Disponível em: <http://www.estudosdotrabalho.org/anais6seminariodotrabalho/anaelizabethsantosavp..pdf>. Acesso em: 08 Maio 2019.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE LÁCTEOS LONGA VIDA. Relatório administrativo anual ABVL: 2018.

BOSTIC, J.N., HAGOPIAN, W.M., & JAHREN, A.H. Carbon and nitrogen stable isotopes in U.S. milk: Insight into production process. **Rapid Commun Mass Spectrom**, 32(7), 561-566, 2018

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 326, de 30 de julho de 1997. Aprova o regulamento técnico Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 1 ago. 1997. Seção I, p.16560-3.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa dos métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal água. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 18 de setembro de 2003.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa no 62 de 29 de dezembro de 2011. Aprovar o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Nota Oficial de 09 de maio de 2014. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/noticias/2014/05/laboratorio-de-referencia-da-oie-reforca-o-posicionamento-das-autoridades-brasileiras-que-o-caso-de-eeb-e-atipico>. Acesso em: 01/03/2019.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 8.533, de 30 de setembro de 2015, regulamentado pela Instrução Normativa nº8 de 11 de maio de 2017 e pela Instrução Normativa RFB Nº 1590, de 05 de novembro de 2015. O crédito presumido da Contribuição para os Programas de Integração Social e de Formação do Patrimônio do Servidor Público - PIS/Pasep e da Contribuição para o Financiamento da Seguridade Social - Cofins relativo à aquisição de leite in natura, e institui o Programa Mais Leite Saudável. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2015.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº76 e 77 de 26 de novembro de 2018. Aprovar o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado, o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel e o Plano de Qualificação dos Fornecedores de leite. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2018.

CAMIN, F.; WEHRENS, R.; BERTOLDI, D.; BONTEMPO, L.; ZILLER, L.; PERINI, M.; NICOLINI, G.; NOCETTI, M.; LARCHER, R. H, C, N and S stable isotopes and mineral profiles to objectively guarantee the authenticity of grated hard cheeses. **Analytica Chimica Acta**, v. 711, p. 54-59, 2012.

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.

CARVALHO, M.P.; MARTINS, P.C.; WRIGHT, J.T.C.; SPERS, R.G. (Ed.). Cenários para o leite no Brasil em 2020. Juiz de Fora: **Embrapa Gado de Leite**, 2007.

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

CHUNG, I.M., KIM, J.K., LEE, K.J., SON, N.Y., AN, M.J., LEE, J.H., KIM, S.H. Discrimination of organic milk by stable isotope ratio, vitamin E, and 405 fatty acid profiling combined with multivariate analysis: A case study of 406 monthly and seasonal variations in Korea for 2016–2017. **Food Chemistry**, 261, 407 112-123, 2018.

CODEX ALIMENTARIUS. **Food hygiene** – basics texts. World health organization, food and agriculture organization of the united nations. Rome, 2009.

CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL. Boletim técnico: Cenário econômico Outubro 2019. Disponível em <<https://www.cnabrazil.org.br/assets/arquivos/boletinstecnicos/pdf>>. Acesso em: 27 mar. 2020.

CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL. Boletim técnico: Custo de Produção contribui para a definição da quantidade de leite a se produzir Janeiro 2020.

COPLEN, T.B. Guidelines and recommended terms for expression of stable- isotope- ratio and gas- ratio measurement results. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v.25, p. 2538-2560, 2011.

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

DREWNOWSKI, A. The nutrient rich foods index helps to identify healthy, affordable foods. **The American Journal Clinical Nutrition**, v.91, n. 4, p. 1095S-1101S, 2010.

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

DUCATTI, C. **Isótopos estáveis ambientais**. Curso de Pós-Graduação. Disciplina: Aplicação de Isótopos Estáveis Ambientais. Programa de Pós-graduação em Zootecnia. FMVZ/UNESP. 2007. 204P. (Apostila).

DUCATTI, C.; MARTINS, C.L.; ARRIGONI, M.D.B.; MARTINS, M.B.; JUNIOR, L.C.V.; DENADAI, J.C. Utilização de isótopos estáveis em ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p. 68-75, 2011. Suplemento especial.

EMATER. Rio Grande do Sul/ASCAR. Relatório socioeconômico da cadeia produtiva do leite no Rio Grande do Sul: 2019. Porto Alegre, RS: Emater/RS-Ascar, 2019.

EMBRAPA. **Anuário Leite :2019**. Juiz de Fora, 2019.

EVERSTINE, K., SPINK, J., KENNEDY, S. Economically Motivated Adulteration (EMA) of Food: Common Characteristics of EMA Incidents. **Journal of Food Protection**, v. 76, n. 4, p. 723-735, 2013.

FAGNANI, R., BATTAGLINI, A.P., BELOTI, V., ARAÚJO, J.P.A. Estabilidade do leite ao álcool: ainda pode ser um indicador confiável? **Ciência Animal Brasileira**, v. 17, n. 3, p. 386-394, 2016.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAOSTAT, 2013. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QL/E>>. Acesso em: 15/11/2018.

FERREIRA, A.A.; JORVINO, R.J.; SANTOS, R.A.; SILVA, T.R.P. Dificuldades de implantação do sistema da qualidade em pequenas e médias empresas alimentícias. **Centro Universitário de Lins – UNILINS**, Lins – SP, 2010. Disponível em: <<http://revista.unilins.edu.br/index.php/cognitio/article/view/7>>. Acesso em: 19 fevereiro 2019.

GANNES, L.Z.; DEL-RIO, C.M.; KOCH, P. Natural abundance variations in stable isotopes and their potential uses in animal physiological ecology. **Comparative Biochemistry Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 119, n. 3, p. 725-737, 1998.

GDP – Global Dairy Platform. Annual Review 2016. Rosemont, IL, [2017]. Disponível em:<<https://www.globaldairyplatform.com/wp-content/>>. Acesso em: 20 abril. 2020.

GONÇALVES, L.C., BORGES, I., FERREIRA, P.D., Alimentação de gado de leite. FEPMVZ, Belo Horizonte, p. 412, 2009.

HANDFORD, C.E., CAMPBELL, K., ELLIOTT, C.T. Impacts of milk fraud on food safety and nutrition with special emphasis on developing countries. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 1, p. 130-142, 2016.

HOBSON, K. A; KOEHLER, G. On the use of stable oxygen isotope ( $\delta^{18}\text{O}$ ) measurements for tracking avian movements in North America. **Ecology and Evolution**, v. 5, n. 3, p. 799–806, 2015.

HOEFS, J. **Stable isotope geochemistry**. 6th ed. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 285 p., 2009.

HON, K.L.; LEUNG, T.F. Issues associated with formula milk: the Hong Kong's experience. **World Journal of Pediatrics**, v. 10, n. 1, p. 5-6, 2014.

IFCN –DAIRY RESEARCH CENTER. **Dairy report**: 2018. IFCN,2018



INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA APLICADA. Pesquisa Pecuária Municipal. IBGEa, 2018. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=series-historicas>. Acesso em: 20 abril. 2019.

ISARA, A.R.; ISAH, E.C.; LOFOR, P.V.O.; OJIDE, C.K. Food contamination in fast food restaurants in Benin City, Edo State, Nigeria: Implications for food hygiene and safety. **Public Health**, v. 124, n. 8, p. 467 - 471, 2010.

KENNEDY, B.V.; KROUSE, H.R. Isotope fractionation by plants and animals: implications for nutrition research. **Canadian Journal Physiology and Pharmacology**, v. 68, n. 7, p. 960-972, 1990.

KRIVACHY (TANZ), N.; ROSSMANN, A.; SCHMIDT, H.L. Potentials and caveats with oxygen and sulfur stable isotope analyses in authenticity and origin checks of food and food commodities. **Food Control**, v. 48, p. 143-50, 2015.

LEITE, Z.T.C.; VAITSMAN, D.S.; DUTRA, P.B.; GUEDES, A. Leite e alguns de seus derivados: da antiguidade à atualidade. **Química Nova**, v.29, n.4, p.876-880, 2006.

LIU, H.Y.; ZHAO, Q.Y.; GUO, X.Q.; TANG, C.H.; YU, X.N.; ZHAN, T.F.; QIN, Y.C.; ZHANG, J.M. Application of isotopic and elemental fingerprints in identifying the geographical origin of goat milk in China. **Food Chem.**, 277, 448–454, 2019

MARTINELLI, L.A.; OMETTO, J.P.; FERRAZ, E.S.; VICTORIA, R.L.; CAMARGO P.B.; MOREIRA, M.Z. **Desvendando questões ambientais com isótopos estáveis**. São Paulo: Oficina de Textos, v. 1, 144 p., 2009.

MARTINS, C.G.P.; VILELA, K.M.P.; MUNIZ, R.S. **Controle de qualidade em fábrica de laticínio**. Trabalho de Conclusão de Curso (HIPOA) - Universidade Castelo Branco, Goiânia, GO, mai. 2009. 33p.

PRACHE, S.; CORNU, A.; BERDAGUÉ, J.L.; PRIOLO, A. Traceability of animal feeding diet in the meat and milk of small ruminants. **Small Ruminant Research**, v. 59, n. 2-3, p.157-168, 2005.

PRIMROSE, S.; WOOLFE, M.; ROLLINSON, S. Food forensics: Methods for determining the authenticity of foodstuffs. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 12, p. 582-590, 2010.

ROCHA, D.T., CARVALHO, G.R. **Produção brasileira de leite: uma análise conjuntural**. p. 6-8. 2018. IN: Anuário leiteiro 2018. Brasília: EMBRAPA. 116p. 2018.

SANTOS, P.M; PEREIRA- FILHO, E.R; RODRIGUEZ- SAONA, L.E. Rapid detection and quantification of milk adulteration using infrared microspectroscopy and chemometrics analysis. **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p. 19-24, 2013.

SHIBUYA, E.K.; SARKIS, J.E.E; NETO, O.N.; MOREIRA, M.Z.; VICTORIA, R.L. Souring Brazilian Marijuana by applying IRMS analysis to seized samples. **Forensic Science International**, v. 160, n. 1, p. 35-43, 2006.

SOUZA, F.A.S., O Estado e o Cartel do Leite no Brasil.**Horizonte Editora Ltda**, 1981.

SUN, Z.; MOU, X.; LI, X.; WANG, L.; SONG, H.; JIANG, H. Application of stable isotope techniques in studies of carbon and nitrogen biogeochemical cycles of ecosystem. **Chinese Geographical Science**, v. 21, n. 2, p. 129-148, 2011.

SUN, S.; GUO, B.; WEI, Y.; FAN, M. Classification of geographical origins and prediction of  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  values of lamb meat by near infrared reflectance spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 135, n. 2, p. 508-514, 2012.

TEIXEIRA, N.M. Raças e tipos In: VALENTE, J.; DURÃES, M.C.; MARTINEZ, M.L.; TEIXEIRA, N.M. (Ed.) **Melhoramento genético de bovinos de leite**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2001. p. 71-78.

TELLES, T.S.; TANAKA, J.M.U.; PELLINI, T. Agricultura familiar: pecuária leiteira como locus das políticas públicas paranaenses. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n.3, p. 579-590, 2008.

US DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA) AND US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. Dietary Guidelines for Americans, 2010. [Internet]. [Acesso em 10 de Agosto de 2019]. 7th Edition, Washington, DC: U.S. Government Printing Office, December; 2010. Disponível em: <http://health.gov/dietaryguidelines/2010/>.

US DEPARTMENT OF AGRICULTURE – USDA. NATIONAL NUTRIENT DATABASE FOR STANDARD REFERENCE [internet]. [acesso 22 de Agosto de 2019]. Disponível em: <http://ndb.nal.usda.gov/.US>.

WERNER, R.A.; BRAND, W.A. Brand. Referencing strategies and techniques in stable isotope ratio analysis. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 15, n. 7, p. 501-519, 2001.

WEST, J.B, BOWEN, G.J, DAWSON, T.E., TU, K. **Isoscapes: Understanding movement, pattern, and process on earth through isotope mapping**. 2010.

XIU, C.; KLEIN. K.K. Melamine in milk products in China: Examining the factors that led to deliberate use of the contaminant. **Food Policy**, v. 35, n. 5, p. 463-470, 2010.

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

**CAPÍTULO 2**  
**MAPEAMENTO ISOTÓPICO DO LEITE DE BOVINOS DE PRODUTORES NO**  
**CENTRO OESTE PAULISTA**

## MAPEAMENTO ISOTÓPICO DO LEITE DE BOVINOS DE PRODUTORES NO CENTRO OESTE PAULISTA

**Resumo:** A análise de isótopos estáveis constitui uma alternativa promissora para identificar a procedência e qualidade dos produtos de origem animal e vegetal.  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  são traçadores em potencial no leite, não apenas para determinar o que foi consumido pelas vacas leiteiras, mas também para a análise isotópica de leite e derivados. Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi determinar se as composições isotópicas podem ser usadas como "impressões digitais" para identificar, pelas características do leite cru, as diferenças entre os tipos de manejo em bovinos leiteiros no Centro-Oeste do Estado de São Paulo. Os resultados das análises isotópicas foram processados no SIBER sendo possível obter as elipses e métricas de Laymann, permitindo a comparação entre as categorias de produtores e as regiões. Foi observado que valor de  $\delta^{13}\text{C}$  para os maiores produtores foi mais marcante em comparação aos menores ( $p < 0,05$ ), revelando maior uso de plantas de ciclo fotossintético  $\text{C}_3$  nas dietas durante o período do estudo e para os pequenos produtores foi predominante o uso de pastagens de forrageiras de ciclo fotossintético  $\text{C}_4$ . Além disso, o leite proveniente das categorias de pequenos e médios produtores apresentaram o valor isotópico de  $\delta^{15}\text{N}$  maior ( $p < 0,05$ ), aumentando no período de escassez de forragem. O uso de fertilizantes orgânicos pelos pequenos e médios produtores é mais comum em relação aos fertilizantes químicos, enquanto que é mais utilizado por grandes produtores, pela praticidade em adubar grandes áreas. Concluiu-se que a técnica de isótopos estáveis possibilita identificar diferença isotópica no  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  do leite proveniente de categoria de produtores e época do ano.

**Palavras chaves:** isótopos estáveis, leite cru, bovinos, rastreabilidade, carbono, nitrogênio.

## ISOTOPIC MAPPING OF PRODUCERS OF BOVINE MILK IN THE MIDWEST OF STATE OF SAO PAULO

**Abstract:** A stable isotope analyses is a promising alternative for identifying the procedure and quality of products of animal and plant origin.  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  are potential tracers in milk, not only to determine what was consumed by dairy cows, but also for an isotopic analysis of milk and dairy products. Based on that, the objective of the present study was to determine if isotopic compositions can be used as "fingerprints" to identify, by the characteristics of raw milk, the differences between management types in dairy cattle in the Midwest of São Paulo. The results of the isotopic analyzes were processed in SIBER, it was possible to obtain as ellipses and Laymann metrics, allowing a comparison between the categories of producers and also the microregion. It was observed that the value of  $^{13}\text{C}$  for the biggest producers was more remarkable in comparison to the smaller ones ( $p < 0,05$ ), showing a great tendency to use plants of photosynthetic cycle  $\text{C}_3$  in the diets during the study period and for the small producers predominant in the use of forage of photosynthetic cycle  $\text{C}_4$ . In addition, the milk from the categories of small and medium showed the isotopic value of  $\delta^{15}\text{N}$  higher ( $p < 0,05$ ), which is degraded in the period of forage scarcity. The use of organic fertilizers by small and medium producers is more common in relation to chemical fertilizers, while it is more used by big producers, due to its practicality in large areas. It was concluded that an isotope technique is available to identify isotopic difference in the  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  of the milk proved by the category of producers and time of year.

**Key words:** Stable isotope, raw milk, traceability, carbon, nitrogen.

## INTRODUÇÃO

O setor leiteiro no Brasil é o segundo mais influente na indústria de alimentos com aproximadamente 33,4 bilhões de kg de leite produzidos em 2018 (EMBRAPA, 2019). Sendo um dos produtos presentes na dieta da maioria da população, o leite e seus derivados apresentam grande peso nos gastos com a alimentação, consumido em média 116,5 kg de leite por habitante/ano (IFCN, 2018).

Diante desse cenário, além dos laticínios e cooperativas desempenharem papel importante no abastecimento de alimentos e na geração de emprego e renda para a população, são responsáveis pela produção e beneficiamento do leite desde o início da cadeia (IN76 e IN77, 2018). Portanto, a demanda por certificação, a fim de garantir qualidade e segurança aos produtos de origem animal, está cada vez maior, assim como o avanço de pesquisas em técnicas para garantia da autenticidade dos produtos (PRIMROSE et al., 2010).

Neste contexto, a análise dos Isótopos Estáveis pode ser utilizada como uma ferramenta alternativa para identificar a origem e qualidade de produtos de origem animal e vegetal (CARRIJO et al., 2006).

Os CHON'S (carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio e enxofre) são os isótopos mais utilizados na área de pesquisas zootécnicas, sendo utilizados em análise de rastreabilidade e autenticação de produtos, pois a razão isotópica dos tecidos de animais depende principalmente da alimentação, água ingerida e dos gases inalados (KENNEDY & KROUSE, 1990).

O principal elemento utilizado para determinar a composição alimentar é o Carbono. Entretanto, o Nitrogênio é outro isótopo que complementa a interpretação dos resultados obtidos de acordo com as possíveis fontes alimentares.

Há necessidade de mais pesquisas de aperfeiçoamento dessa ferramenta, por apresentar os isótopos como excelentes traçadores potenciais do leite (PRACHE et al., 2005; ZHAO et al., 2019; POTOCHNIK et al., 2020; CHUNG et al., 2019) e possuírem grande potencial para distinguir as dietas fornecidas ao gado leiteiro.

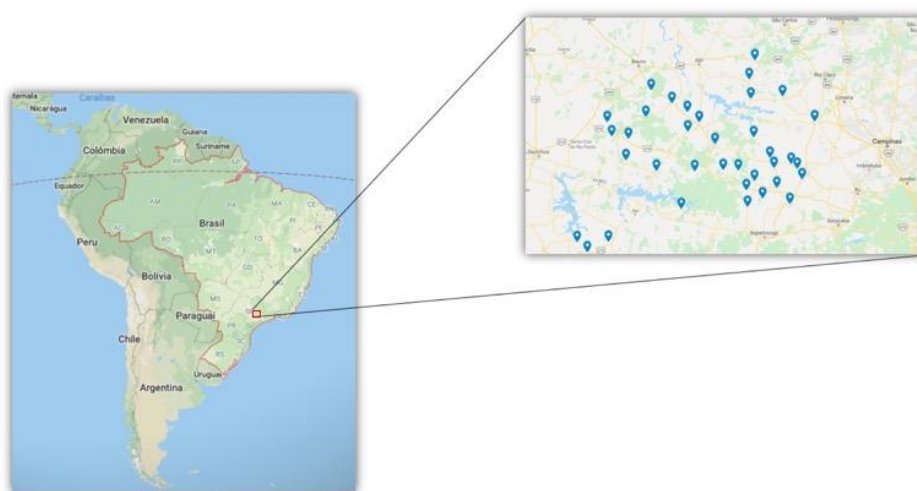
Considerando que os isótopos de Carbono e Nitrogênio são excelentes indicadores para correlacionar os produtos de origem animal com o seu ambiente de criação, o objetivo desse trabalho foi determinar se as composições isotópicas podem ser usadas como “impressões digitais” para caracterizar o leite no Centro-Oeste Paulista durante o período de Junho/2018 a Dezembro/2018.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos utilizados nesta pesquisa foram aprovados conforme as normas de Comissão de ética no Uso de Animais (CEUA), sob protocolo nº0181/2018 (anexo 1).

### Local Experimental

O experimento foi conduzido por meio do recebimento do leite oriundo de propriedades leiteiras localizadas na região Centro-Oeste do Estado de São Paulo (Figura 1). Cento e quarenta e quatro propriedades leiteiras foram selecionadas em um total de 648 (Tabela 1).



**Figura 1. Localização dos Municípios do Centro-Oeste Paulista**

A região Centro-Oeste do Estado de São Paulo compreende 35,21% do território, localizado entre o Rio Tietê e o Rio Paranapanema. O clima predominante na região é o Tropical de Altitude, apresentando verões quentes e úmidos e invernos frios ou ameno e com baixa precipitação na maioria de sua área. Apresenta altitude desde 474 a 890m. Os municípios os quais tiveram amostras de leite coletadas se encontram entre Itaporanga ( 23° 42' 28" S e 49° 29' 23" W ) e Brotas ( 22° 17' 03" S e 48° 07' 36" W), em que apresentam 211,29km de distância em linha reta, e entre Barão de Antonina (23° 37' 37" S e 49° 33' 41" W) e Jumirim (23° 05' 12" S e 47° 47' 03" W), com distância em linha reta entre os pontos de 196,61km.

Os municípios foram agrupados em quatro microrregiões : Botucatu (Pardinho, Botucatu, Anhembi, Bofete, Conchas, Agudos, Lençóis Paulista, Borebi, Pratânia, Areiópolis e São Manoel), Avaré (Avaré, Águas de Santa Bárbara, Domélia, Iaras, Cerqueira César, Itatinga, Paranapanema, Itaporanga, Coronel Macedo e Barão de Antonina), Piracicaba (Brotas,



Jumirim, Piracicaba, São Pedro, Santa Maria da Serra, Tiête e Torrinha) e Tatuí (Cesário Lange, Cerquilho, Guareí, Laranjal Paulista, Pereiras, Porangaba, Quadra, Tatuí e Torre de Pedra).

As amostras de leite foram coletadas na plataforma de recebimento da empresa Laticínios Gege Ltda, localizada no município de Pardinho-SP. A empresa realiza as Boas Práticas de Fabricação, atendendo a Portaria nº368, de 04 de setembro de 1997 – Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e tem o programa de Procedimento Padrão de Higiene Operacional (PPHO) – Resolução DIPOA nº10, de 22 de maio de 2003 e APPCC implantado.

Rotineiramente, o leite refrigerado recebido em caminhões tanques pela indústria segue as normas da Instrução Normativa nº76/2018. Todas as amostras de leite dos produtores são coletadas em frascos plásticos identificados, armazenados em caixas isotérmicas. Os dados de temperatura e demais análises de cada produtor são registrados em planilha de controle.

As amostras de leite para o experimento, correspondendo a 2 mL em duplicata, foram colhidas de acordo com a chegada dos caminhões isotérmicos na plataforma de recebimento do laticínio. As colheitas das amostras foram realizadas durante 6 meses, no período de Junho/2018 a Dezembro/2018, para acompanhamento do perfil isotópico em função da mudança de estação do ano. As amostras foram congeladas a -18°C para posterior mensuração isotópica no Centro de Isótopos Estáveis do Instituto de Biociências da UNESP, Campus de Botucatu. De acordo com o perfil da empresa que é de pequeno a médio porte, a maioria das amostras colhidas foram de pequenos produtores (Tabela 2).

**Tabela 2. Número de produtores por microrregião e produção de leite mensal.**

| Microrregião | Número de produtores | Categoria de produtores (litros/mês*) |                      |                       |                         |
|--------------|----------------------|---------------------------------------|----------------------|-----------------------|-------------------------|
|              |                      | p<br>(até 4.500)                      | m<br>(4.501 a 8.000) | g<br>(8.001 a 30.000) | M<br>(30.001 a 200.000) |
| Avaré        | 41                   | 18                                    | 15                   | 6                     | 2                       |
| Botucatu     | 54                   | 26                                    | 8                    | 15                    | 5                       |
| Piracicaba   | 25                   | 6                                     | 9                    | 6                     | 4                       |
| Tatuí        | 24                   | 11                                    | 4                    | 9                     | 0                       |
| <b>Total</b> | <b>144</b>           | <b>61</b>                             | <b>36</b>            | <b>36</b>             | <b>11</b>               |

p- pequenos produtores, m- médios produtores, g- grandes produtores, M- mega produtores

\*A categorias dos produtores foram determinadas de acordo com o volume mensal de leite entregue ao laticínio.

O Censo agropecuário de 2017 realizou levantamento em mais de 5 milhões de propriedades rurais do Brasil, sendo que 77% dos estabelecimentos agrícolas do país foram classificados como da agricultura familiar. Foram produzidos no Estado de São Paulo 741.325

mil litros de leite de vaca provenientes da agricultura familiar, ou seja, contribuição de aproximadamente 50% do volume total produzido em São Paulo. (IBGE, 2017)

A maioria dos pequenos produtores apresentam perfil em que famílias exercem várias atividades da agricultura e pecuária, sendo a produção de leite como a principal tarefa, vacas com baixo material genético, sistema produtivo à pasto e mecanização deficiente (ZOCCAL; SOUZA & GOMES, 2005).

### Análise de Isótopos Estáveis

Para a avaliação do perfil de isótopos estáveis, as amostras congeladas foram imersas em Nitrogênio líquido durante três minutos, as mesmas foram liofilizadas a vácuo (Liotop L108, Liobras, São Carlos, Brazil) a -55 °C e pressão de 50 µHg por 72 h, em aparelho Micromodulyo-115 (Edwardsvacuun®). Após a etapa de liofilização as amostras foram pesadas em balança analítica (MX5, Mettler Toledo Suíça) e acondicionadas em cápsulas de estanho para análise de Carbono e Nitrogênio. Os intervalos de massas utilizados para o leite cru liofilizado foram de 35 a 65µg e 2000 a 3000µg para os elementos de Carbono e Nitrogênio, respectivamente.

Em seguida, as cápsulas foram inseridas no analisador elementar (Flash 200 Organic EA; Thermo Fisher Scientific Inc., Bremen Alemanha). Os gases resultantes formados após a queima de oxigênio (O<sub>2</sub>) e óxido de cobre (CuO) foram CO<sub>2</sub> e NO<sub>x</sub>, sendo este último reduzido em N<sub>2</sub>. Os gases formados foram separados em coluna cromatográfica gasosa e analisados no espectrômetro de massa de razão isotópica (IRMS) (DELTA-V; Advantage, Thermo Fisher Scientific Inc, Bremen, Alemanha), no Centro de Isótopos Estáveis Prof. Dr. Carlos Ducatti do Instituto de Biociências da UNESP, Campus de Botucatu.

No IRMS as amostras em fase gasosa foram analisadas e os resultados foram expressos em notação  $\delta$ , em relação aos padrões de cada elemento e calculado pela equação abaixo (COPLIN, 2011):

$$\delta X = [(R_{\text{amostra}}/R_{\text{padrão}}) - 1]$$

Em que:

- X = valor isotópico para o <sup>13</sup>C ou <sup>15</sup>N.

- $\delta X$  (amostra, padrão) = enriquecimento relativo da amostra em relação ao padrão internacional desse elemento. Adimensional.
- $R_{(amostra)}$  = é a razão isotópica do isótopo pesado em relação ao leve ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ,  $^2\text{H}/^1\text{H}$ ) da amostra e do padrão, respectivamente. Adimensional

Os resultados das análises foram expressos na terminologia  $\delta(mUr)$  utilizando os padrões internacionais Peedee Belemnite para o  $^{13}\text{C}$  e o  $\text{N}_2$  do ar atmosférico para o  $^{15}\text{N}$ .

### Análise Estatística

Realizou-se análise das variâncias amostrais (ANOVA) e teste T student para avaliar a possibilidade de diferenciação dos resultados das categorias dos produtores, meses de coleta e microrregião. Além disso, o pacote SIBER (*Stable Isotope Bayesian Ellipses in R*) desenvolvido por Jackson *et al.* (2011), disponível no pacote Stable Isotope Analysis no programa R (SIAR- Parnell e Jackson, 2013) (R Development Core Team 2014), foi utilizado para eliminar os efeitos da amostra, comparar as diferentes categorias de produtores e suas razões isotópicas, no caso  $^{13}\text{C}$  ou  $^{15}\text{N}$ , e foram analisados pelas cinco métricas descritas por Layman *et al.* (2007).

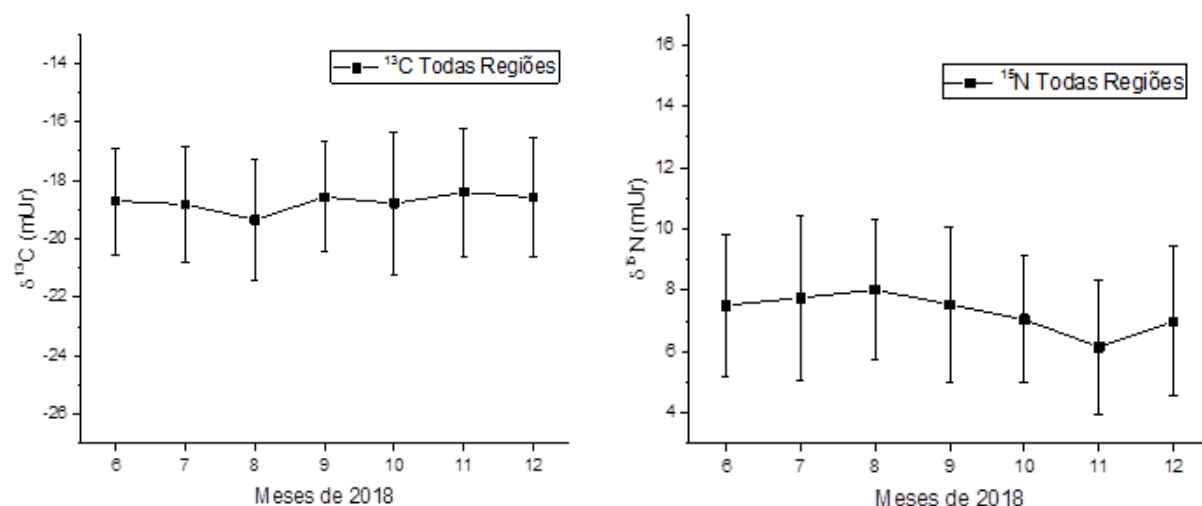
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O valor isotópico médio de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  ao longo dos meses pode ser observado na figura 3. Constata-se que o leite referente ao mês de agosto exibiu o menor valor isotópico de  $\delta^{13}\text{C}$ , com  $-19,35 mUr \pm 2,07$  e, o maior valor isotópico de  $\delta^{15}\text{N}$ , com  $8,0 mUr$ , enquanto que o mês de novembro apontou o maior valor isotópico de  $\delta^{13}\text{C}$  e o menor de  $\delta^{15}\text{N}$ , respectivamente  $-18,41 mUr$  e  $6,1 mUr$ . Esse comportamento foi similar para todas as microrregiões.

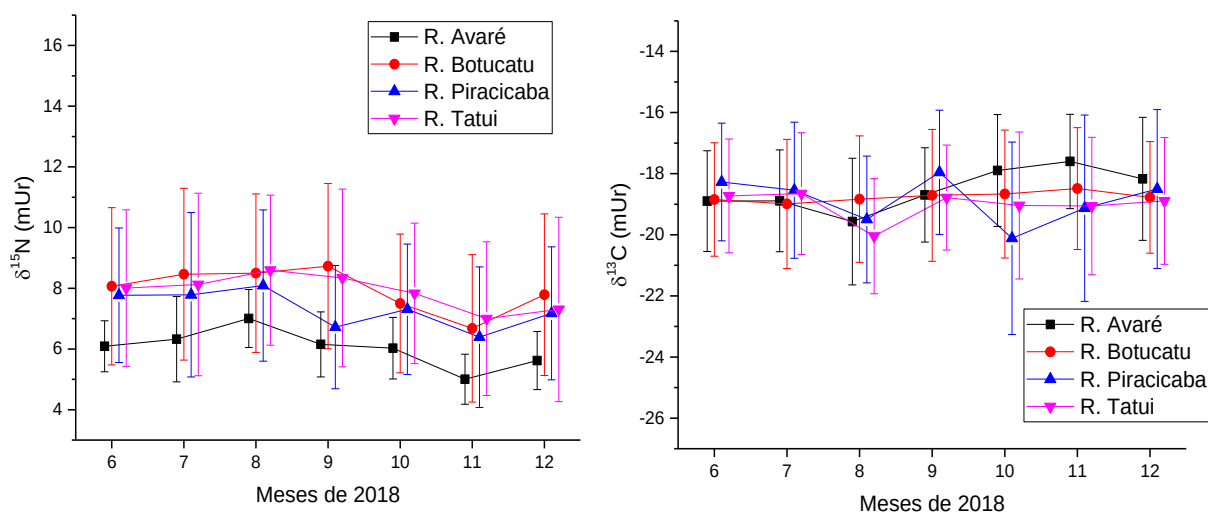
De acordo com a Figura 4, nota-se o comportamento isotópico de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  das microrregiões isoladamente, com destaque para a microrregião de Avaré para  $\delta^{15}\text{N}$ . Os produtores desta região onde o leite foi colhido, em sua maioria, possuem majoritariamente bovinos de leite e de corte, não utilizando da prática do uso de adubação orgânica na propriedade. Além disso, a pecuária da região vem perdendo espaço para o cultivo da cana-de-açúcar e laranja (IPEADATA).

Ao relacionar a categoria de produtor durante os meses de coleta, observa-se comportamento similar de  $\delta^{13}\text{C}$ , não variando ao longo do tempo para todas as categorias de

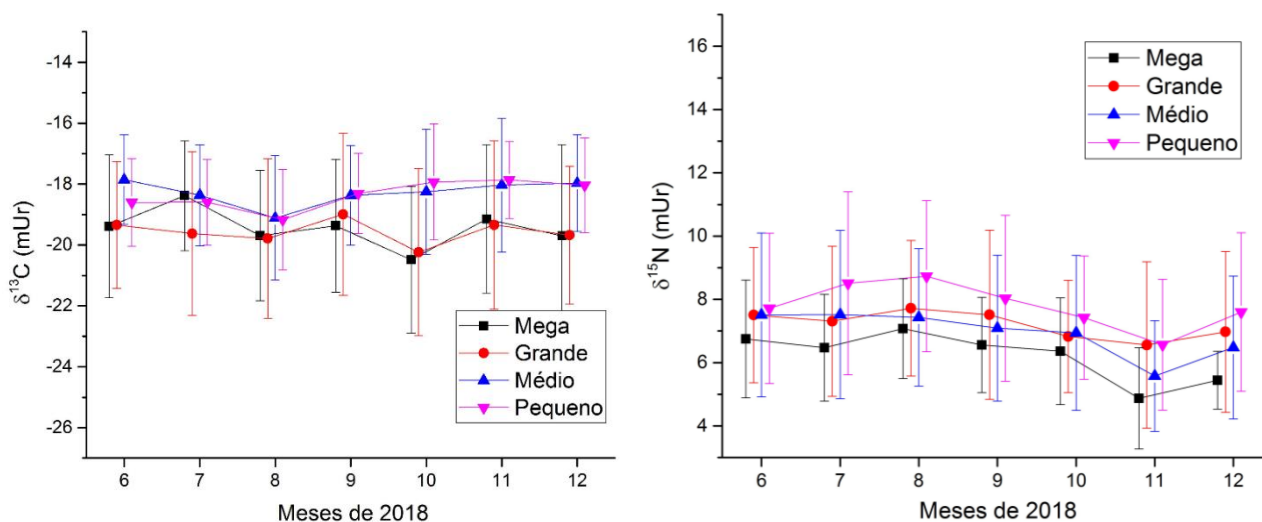
produtores (Figura 5). Comparando as razões isotópica do nitrogênio, nota-se que a o leite da categoria de pequenos produtores apresentam valores mais altos em relação aos mega produtores durante todos os meses, revelando diferença no manejo alimentar.



**Figura 2. Comportamento isotópico do  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  ao longo dos meses de coleta (Junho a Dezembro/2018)**



**Figura 3. Comportamento isotópico de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  das microrregiões ao longo dos meses de coleta (Junho a Dezembro de 2018)**



**Figura 4.** Comportamento isotópico de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  da categoria do produtor (pequeno, médio, grande e mega) ao longo dos meses de coleta (Junho a Dezembro de 2018).

**Tabela 3.** Valor isotópico  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  das microrregiões e categoria de produtores através do ANOVA e Teste T.

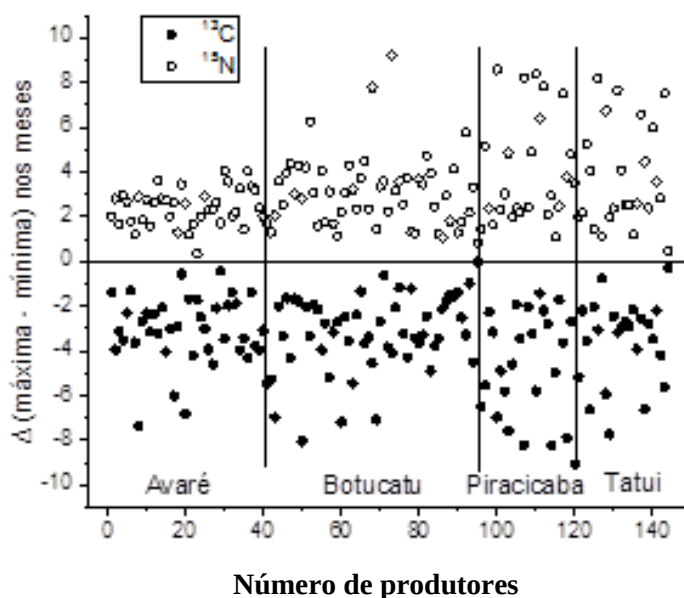
| Grupo                     | N          | $\delta^{13}\text{C}(mUr)$          | p-value     | N          | $\delta^{15}\text{N} (mUr)$         | p-value     |
|---------------------------|------------|-------------------------------------|-------------|------------|-------------------------------------|-------------|
| MICRORREGIÃO              |            |                                     |             |            |                                     |             |
| Avaré                     | 242        | $-18,506 \pm 1,86^a$                | < 0,05      | 247        | $+6,025 \pm 1,16^c$                 | < 0,001     |
| Botucatu                  | 304        | $-18,766 \pm 2,00^{ab}$             |             | 316        | $+7,985 \pm 2,69^a$                 |             |
| Piracicaba                | 162        | $-18,864 \pm 2,50^b$                |             | 162        | $+7,350 \pm 3,32^b$                 |             |
| Tatuí                     | 147        | $-19,112 \pm 2,25^b$                |             | 149        | $+7,904 \pm 2,69^{ab}$              |             |
| CATEGORIA                 |            |                                     |             |            |                                     |             |
| Pequeno                   | 348        | $18,595 \pm 1,87^a$                 | < 0,001     | 356        | $+7,718 \pm 2,47^a$                 | < 0,001     |
| Médio                     | 213        | $18,325 \pm 1,97^a$                 |             | 218        | $+6,878 \pm 2,37^b$                 |             |
| Grande                    | 221        | $-19,250 \pm 2,41^b$                |             | 226        | $+7,394 \pm 2,49^{ab}$              |             |
| Mega                      | 73         | $-19,454 \pm 2,31^b$                |             | 74         | $+6,241 \pm 1,65^c$                 |             |
| <b>Total</b>              | <b>855</b> | <b><math>18,737 \pm 2,33</math></b> |             | <b>874</b> | <b><math>+7,300 \pm 2,43</math></b> |             |
| <b>Região x Categoria</b> |            | <b><math>-18,77 \pm 4,52</math></b> | <b>0,99</b> |            | <b><math>+7,30 \pm 5,95</math></b>  | <b>0,97</b> |

Com um nível de significância de 95%, são considerados significativos valores de  $p < 0,05$ ; N - número de amostras;  $\delta$  - razão isotópica de  $^{13}\text{C}$  e  $^{15}\text{N}$  (mUr); letras iguais indicam que não há diferença significativa, letras diferentes indicam que há diferença significativa na coluna

Na tabela 3, encontram-se os dados referentes aos valores isotópicos do leite das microrregiões e categoria de produtores. Consta-se diferença ( $p < 0,05$ ) para a razão isotópica de  $\delta^{13}\text{C}$ , entre Tatuí e as demais microrregiões. Quanto a razão isotópica de  $\delta^{15}\text{N}$ , houve

diferença ( $p < 0,05$ ) entre Avaré e as demais regiões, e entre Botucatu e Piracicaba. Este resultado observado está relacionado as características das atividades agrárias da microrregião de Avaré, onde predomina a agricultura em relação à pecuária, além da distribuição desigual de categorias de produtores (Figura 5), com maior frequência de pequenos produtores.

Quando as categorias dos produtores foram comparadas, todas apresentaram diferença exceto a comparação entre grande e mega para o valor isotópico de  $\delta^{13}\text{C}$ , e entre pequeno e médio e pequeno e grande, para o valor isotópico de  $\delta^{15}\text{N}$ . Entretanto não houve ocorrência de interação entre o grupo categoria e microrregião ( $p > 0,05$ ) demonstrando que as categorias dos produtores podem ser determinadas, independente da região em que o mesmo se encontra.

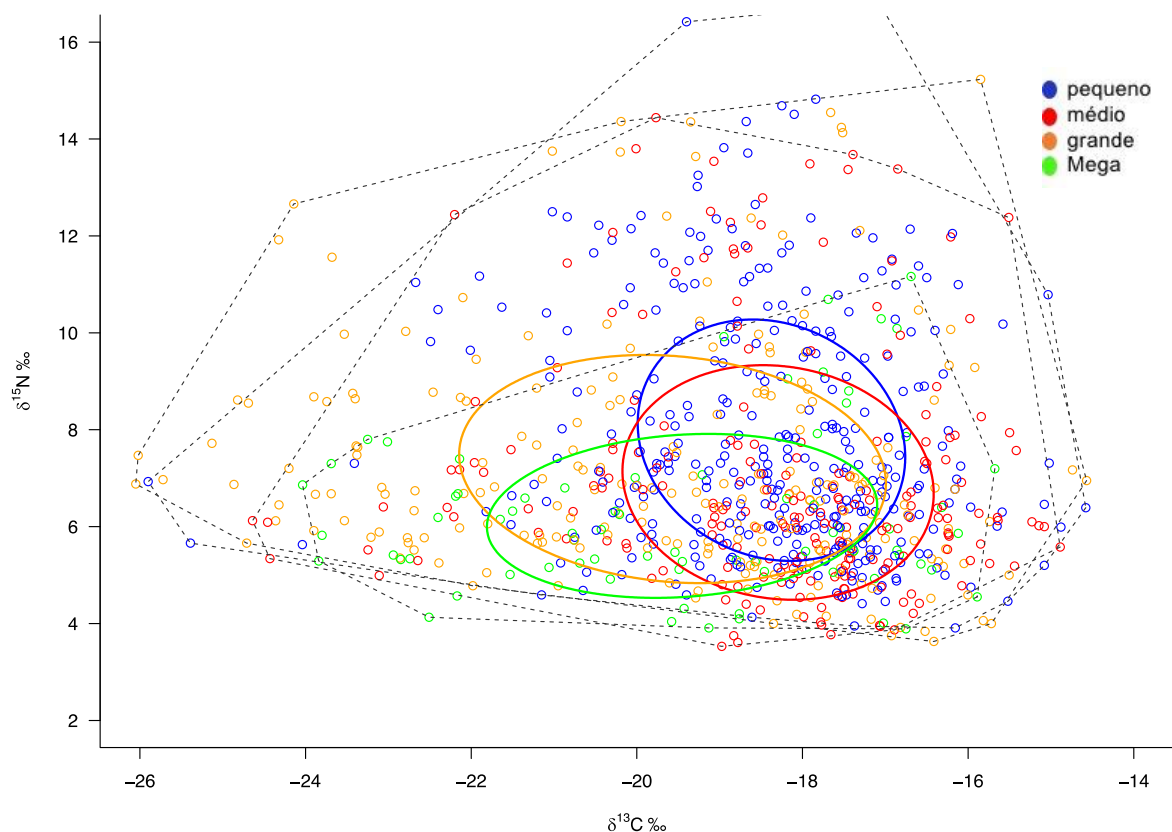


Divisão dos produtores/ microrregião: Avaré – 1 a 41; Botucatu – 42 a 96; Piracicaba – 97 a 122; Tatui – 123 a 147.

**Figura 5. Número de produtores das microrregiões e valor isotópico de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$**

Esses resultados são melhores explicados pelo modelo Bayesian elaborado por meio do SIBER para cada categoria de produtor (Figura 7). Por meio do SIBER as análises foram realizadas através da formação de grupos que, no caso, foram quatro, sendo: pequenos, médios, grande e mega produtores. Feito isso, foi determinado que os grupos faziam parte de uma comunidade, pois há apenas coletas da região Centro Oeste Paulista. Cada indivíduo dos grupos, deve ter definido as razões isotópicas dos elementos escolhidos, no caso  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$ .

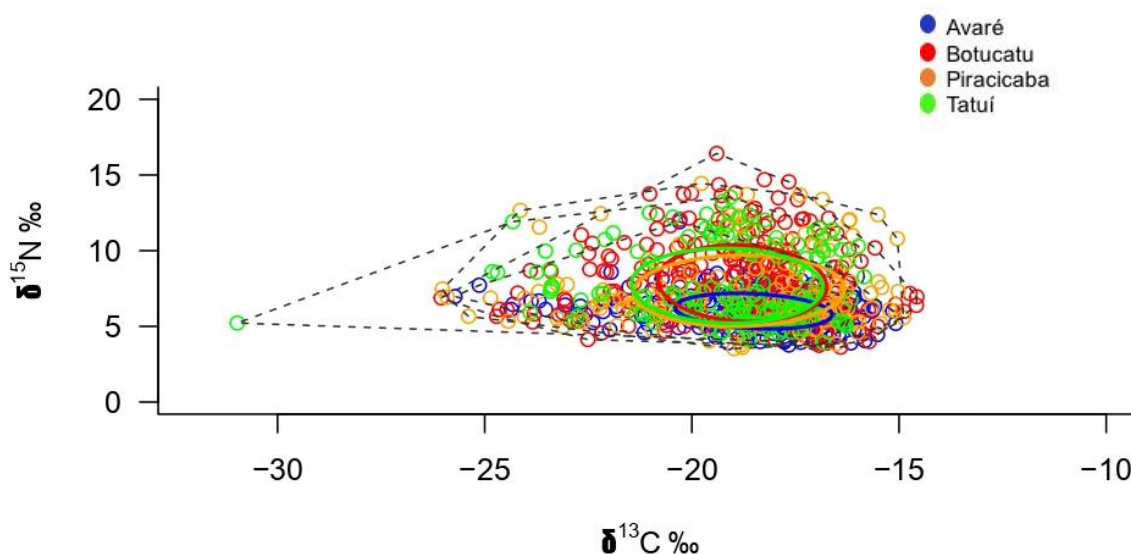
O objetivo do pacote SIBER, portanto foi determinar relações baseadas em métodos bayesianos para comparar estatisticamente magnitudes que são obtidas através de estimativas pontuais de dispersão, dentro e entre comunidades e grupos.



**Figura 6. Elipse com 40% dos dados representando cada categoria de produtor.**

As elipses foram desenhadas para cada grupo de produtores, sendo separadas por cores, onde os pequenos produtores estão representados pela cor azul, os médios pela cor vermelha, os grandes pela cor laranja e os megas pela cor verde. As elipses foram formadas com 40% dos dados e o número indivíduos de cada grupo determinou quantos pontos foram utilizados para a produção de cada elipse e sua amplitude. Com isso, foi possível comparar os grupos.

Os menores produtores (pequeno e médio), apresentaram maior amplitude de  $\delta^{15}\text{N}$  ( $\delta^{15}\text{N}$  range), quando comparados aos maiores produtores (grande e mega), os quais apresentaram maior amplitude de  $\delta^{13}\text{C}$  ( $\delta^{13}\text{C}$  range).



**Figura 7. Elipse com 40% dos dados representando cada microrregião.**

As elipses formadas representando as microrregiões são identificadas por cores, sendo: azul, a microrregião de Avaré, vermelho, a microrregião de Botucatu, laranja, a microrregião de Piracicaba e verde a microrregião de Tatuí. De acordo com a figura 7, as elipses apresentaram comportamento semelhante, havendo sobreposição das mesmas. Isso significa que independente da quantidade de coletas de leite cru, a amplitude de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  não diferiu.

A explicação para o comportamento isotópico do elemento Carbono está relacionada com a dieta das vacas durante os meses de coleta. Este fato pode estar relacionado com a inclusão de plantas do ciclo fotossintético  $\text{C}_3$  (trigo, arroz, alfafa, cevada, outros), que possuem valores isotópicos -20 e -30  $mUr$ . Knobbe et al. (2006) verificaram que as razões isotópicas encontradas no leite e na urina de vacas sob diferentes regimes alimentares apresentaram valores estáveis do  $\delta^{13}\text{C}$  do leite e da urina 10 dias após o início da mudança de dieta de  $\text{C}_4/\text{C}_3$  para  $\text{C}_3$ . Quando a dieta foi trocada novamente de  $\text{C}_3$  para  $\text{C}_4/\text{C}_3$ , e os valores obtidos de  $\delta^{13}\text{C}$  sofreram mudanças em 6 dias. Em estudo sobre rastreabilidade, Vieira Júnior (2013), observou que os sistemas de produção de bovinos de corte podem ser diferenciados pelos bioelementos da carne, com o uso da análise dos isótopos estáveis de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$ .

Em estudo sobre rastreabilidade do leite realizado em quatro províncias da China, Zhao et al., (2019), encontraram aumento no  $\delta^{13}\text{C}$  no período de julho a novembro. O mês de julho é caracterizado por chuvas abundantes e temperaturas altas e esse cenário permitiu a disponibilidade de alimento  $\text{C}_3$  nessa região, sendo este a principal fonte alimento volumoso.



Entretanto, em novembro, o principal alimento volumoso é a silagem de milho, classificado como planta  $C_4$ , justificando o aumento do valor isotópico de  $\delta^{13}C$ . As outras províncias foram diferenciadas pelos valores isotópicos  $\delta^{13}C$  mais altos, pelo fato de ser regiões onde a agricultura de grãos, ex. Milho, é bem desenvolvida, facilitando para o produtor a inclusão de plantas  $C_4$  na dieta dos animais.

O mês de agosto foi marcado por precipitações abaixo da média, mesma característica presente no trimestre anterior (Maio, Junho e Julho de 2018) (INMET, 2018). Este fato pode ter contribuído com os resultados isotópicos obtidos, caracterizando o mês de agosto como de transição entre a época da seca e época das águas. É um período de escassez de alimento volumoso, uma vez que a principal fonte desse alimento no Brasil são as pastagens exclusivas de gramíneas tropicais ( $C_4$ ). Assim, é comum a inclusão de outros alimentos, geralmente  $C_3$ , para atender com as exigências nutricionais dos animais.

Outro mês de destaque foi novembro/2018, onde houve aumento no valor isotópico de  $\delta^{13}C$  sendo Avaré com  $-18,36\text{ mUr}$ , Botucatu com  $-18,86\text{ mUr}$ , Piracicaba com  $-18,67\text{ mUr}$  e Tatuí com  $-18,64\text{ mUr}$ . Esses valores médios atingidos podem estar relacionados com a inclusão de plantas  $C_4$  e/ou exclusão de plantas  $C_3$  da dieta.

Na época das águas, animais mantidos exclusivamente em pastagens bem manejadas, geralmente  $C_4$ , têm seu potencial de produção de leite limitado em 8 a 14 kg/vaca/dia, porém dificilmente as vacas conseguem ingerir a quantidade suficiente de forragem para suprir as exigências nutricionais e esse quadro muda na época da seca, onde a manutenção da pastagem se torna difícil. Portanto, a prática de inclusão de alimentos à dieta para suprir as exigências nutricionais dos animais principalmente em época de escassez de pastagens é uma alternativa e os tipos de alimentos mais utilizados são farelo de arroz, farelo de trigo, alfafa, farelo de soja, casca de soja, poupa citrica, entre outros, que são plantas de ciclo fotossintético  $C_3$ . E as plantas  $C_4$  mais utilizadas para compor as dietas são o milho, sorgo, entre outros, além das pastagens de clima tropical.

A estação primavera que compreende o período de 23 de setembro à 21 de dezembro foi marcado por precipitações acima da média climatológica em grande parte da região Sul, Sudeste e estado de Mato Grosso do Sul (INMET, 2018). Com o aumento das chuvas, há maior disponibilidade de forragem de plantas de ciclo fotossintético  $C_4$  (gramíneas tropicais) o que pode explicar o sinal isotópico de  $\delta^{13}C$  das microrregiões.

Para o elemento Nitrogênio, o sinal isotópico está relacionado com a inclusão/exclusão de plantas leguminosas na dieta, além do tipo de solo, tipo de fertilizantes utilizados (industriais ou orgânicos). Em estudo realizado por Piasentier et al. (2003), os resultados de  $\delta^{15}N$  podem

ter sofrido interferência em função do tipo de solo e fornecimento de leguminosas na dieta de cordeiros. Em estudo sobre rastreabilidade de leite cru, Zhao et al. (2019), além de utilizarem os valores isotópicos de  $\delta^{13}\text{C}$ , já citados, verificaram também que os valores isotópicos de  $\delta^{15}\text{N}$  apresentaram aumento de julho a novembro, que foi justificado com a grande utilização de leguminosas (fixadoras de nitrogênio), além disso, o fato de algumas regiões apresentarem sistema de bovinos leiteiros a pasto, há a presença de esterco, o que aumenta o valor isotópico de  $\delta^{15}\text{N}$  das plantas ali presentes. Em bovinos de corte, Factori (2014) avaliando bovinos criados em pastos com diferentes níveis de adubação nitrogenada.

No caso da diferenciação dos sinais isotópicos entre a categoria de produtores, verifica-se que o leite dos pequenos fornecedores apresenta valores isotópicos mais elevados em relação as outras categorias, fato pode estar ligado à prática de adubação utilizada, sendo a orgânica a mais comum. Os adubos orgânicos mais comuns são esterco de animais, compostagem, cinzas, entre outros.

### CONCLUSÃO

A técnica de isótopos estáveis de carbono e nitrogênio possibilita identificar o leite de bovinos por categoria de produtor e manejo alimentar dos animais durante o ano.

Na região Centro-Oeste Paulista, o mês de agosto pode ser considerado de transição entre seca e água pela inclusão de plantas de ciclo fotossintético C3, revelado pelo menor valor isotópico de  $\delta^{13}\text{C}$ .

Quanto menor o produtor, maior o valor isotópico de  $\delta^{15}\text{N}$ , influenciado pelo manejo alimentar dos animais, tanto pela inclusão de alimentos proteicos na dieta, quanto pelo uso de fertilizante orgânico nas pastagens.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 368, de 4 de setembro de 1997. O Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 8 set. 1997. Seção 1, p. 19697.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução DIPOA nº 10, de 22 de maio de 2003. Instituir o Programa Genérico de PROCEDIMENTOS - PADRÃO DE HIGIENE OPERACIONAL - PPHO, a ser utilizado nos Estabelecimentos de Leite e Derivados que funcionam sob o regime de Inspeção Federal, como etapa preliminar e essencial dos Programas de Segurança Alimentar do tipo APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle). **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 28 mai. 2003. Seção 1, p. 4.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº76 e 77 de 26 de novembro de 2018. Aprovar o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado, o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel e o Plano de Qualificação dos Fornecedores de leite. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2018.

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.

COPLEN, T.B. Guidelines and recommended terms for expression of stable- isotope- ratio and gas- ratio measurement results. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v.25, p. 2538-2560, 2011.

CHUNG I. M., KIM, J. K., YANG Y. J., A N Y. J., KIM S. Y., KWON C. & KIM S. H. A case study for geographical indication of organic milk in Korea using stable isotope ratios-based chemometric analysis. **Food Control**, v.107, 2019.

EMBRAPA. **Anuário Leite :2019**. Juiz de Fora, 2019.

FACTORI, M. A. Potencial dos isótopos estáveis de carbono e nitrogênio como método de rastreabilidade de bovinos Nelore a pasto. 2014. Projeto de Pós-Doutorado vinculado ao Projeto Temático Isótopos Estáveis Ambientais em Zootecnia da FAPESP processo 08/57411-4

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA APLICADA. Censo Agropecuário, 2017. Disponível em:  
[https://censoagro2017.ibge.gov.br/templates/censo\\_agro/resultadosagro/pdf/agricultura\\_familiar.pdf](https://censoagro2017.ibge.gov.br/templates/censo_agro/resultadosagro/pdf/agricultura_familiar.pdf) Acesso em: 20 junho. 2020.

IFCN –DAIRY RESEARCH CENTER. **Dairy report**: 2018. IFCN,2018.

INMET –**Prognóstico climático do CPTEC/INMET/FUNCME**. 2018. Disponível em:  
 <<http://www.inmet.gov.br/portal/>>. Acesso 01/12/2019.

IPEADATA – Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada. [internet]. [acesso 18 de Abril de 2020]. Disponível em <http://www.ipeadata.gov.br/>.

JACKSON, Andrew L. Introduction to SIBER. [S. l.], 22 fev. 2019. Disponível em: <https://cran.r-project.org/web/packages/SIBER/vignettes/Introduction-to-SIBER.html>. Acesso em: 10 mai. 2020.

KENNEDY, B.V.; KROUSE, H.R. Isotope fractionation by plants and animals: implications for nutrition research. **Canadian Journal Physiology and Pharmacology**, v. 68, n. 7, p. 960-972, 1990.

KNOBBE, N.; VOGL, J.; PRITZKOW, W.; PANNE, U.; FRY, H.; LOCHOTZKE, H.M.; PREISS-WEIGERT, A. C and N stable isotope variation in urine and milk of cattle depending on the diet. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 386, N. 1, p. 104-108, 2006.

LAYMAN C. A., ARRINGTON A.D. Can Stable Isotope ratios provide for community-wide measures of trophic structure? **Ecological Society of America**, v. 88, n. 1, p. 42–48, 2007.

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

PIASSENTIER, E.; VALUSSO, R.; CAMIN, F.; VERSINI, G. Stable isotope ratio analysis for authentication of lamb meat. **Meat Science**, v. 64, n. 3, p. 239-247, 2003.

PRACHE, S.; CORNU, A.; BERDAGUÉ, J.L.; PRIOLO, A. Traceability of animal feeding diet in the meat and milk of small ruminants. **Small Ruminant Research**, v. 59, n. 2-3, p. 157-168, 2005.

POTOCNIK D., NECEMER M., PERISIC I., JAGODIC M., MAZEJ D., CAMIN F., EFTIMOV T., STRONJNIK L., OGRINC N. Geographical verification of Slovenian milk using stable isotope ratio, multi-element and multivariate modeling approaches. **Food Chemistry**, v.326, 2020.

PRIMROSE, S.; WOOLFE, M.; ROLLINSON, S. Food forensics: Methods for determining the authenticity of foodstuffs. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 12, p. 582-590, 2010.

VIEIRA JÚNIOR, L. C. Potencial da técnica dos Isótopos Estáveis para caracterização de diferentes sistemas de produção de bovinos de corte em condições tropicais. 2013. 54 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.

ZHAO S., ZHAO Y., ROGERS K. M., CHEN G., CHEN A., YANG S. Application of multi-element (C, N, H, O) stable isotope ratio analysis for traceability of milk samples from China. **Food Chemistry**, v.325, 2019.

ZOCCAL, R.Z; SOUZA, A.D; GOMES, A.T. Produção de leite na agricultura familiar. Juiz de Fora-MG, 2005.

### **CAPITULO 3**

### **IMPLICAÇÕES**

## IMPLICAÇÕES

A necessidade de garantia de segurança alimentar e qualidade está ganhando espaço como pré-requisito dos consumidores ao adquirir um produto e, análises como a de isótopos estáveis apresentam um grande potencial e aplicabilidade na área zootécnica, especialmente em leite e derivados devido ao fato de que são utilizadas na rastreabilidade e certificação de alimentos.

Além disso para a indústria de laticínios, se aplicado, a AIE é uma ferramenta de grande importância para mapear o leite coletado da região, permitindo a categorização de produtores por meio do manejo alimentar e, conseqüentemente traçar o perfil de cada produtor, o que para a indústria é importante para detecção de fraudes, levantamento nutricional da região e certificação de matéria prima.

Até o momento, estudos para avaliar a categoria de produtor através do leite não foram realizados, sendo de extrema importância para a rastreabilidade e determinação de origem geográfica.

No presente estudo, houve distribuição desigual entre as microrregiões, uma vez que a microrregião de Botucatu apresentou mais produtores em relação às outras, pelo fato do laticínio ser localizado na região e as quantidades de produtores por categoria foram diferentes umas das outras. Sugere-se mais estudos em outras regiões, para testar a aplicabilidade da ferramenta para este fim, não havendo necessidade de ser por um longo período, assim como grande quantidade de coletas.

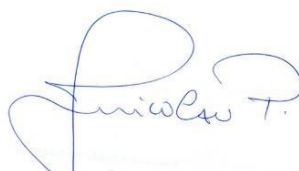
Além disso, sugere-se o uso dessa ferramenta aliado de análise elementar para maior apuração dos dados.

## ATESTADO

**Atesto** que o Projeto "MAPEAMENTO ISOTÓPICO DO LEITE DE BOVINOS NO ESTADO DE SÃO PAULO CONFORME AS ESTAÇÕES DO ANO " **Protocolo CEUA 0181/2018** , a ser conduzido por BEATRIZ PAVONI RIBAS, responsável/orientador Ciniro Costa, para fins de pesquisa científica/ensino - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

|                                              |                                |
|----------------------------------------------|--------------------------------|
| <b>Finalidade</b>                            | PESQUISA CIENTÍFICA            |
| <b>Vigência do projeto</b>                   | 21/08/2018 a 21/06/2019        |
| <b>Nome Comum / Espécie / Linhagem</b>       | //                             |
| <b>Raça</b>                                  |                                |
| <b>Nº de animais machos</b>                  | 0                              |
| <b>Nº de animais fêmeas</b>                  | 0                              |
| <b>Nº de animais sexo indefinido</b>         | 0                              |
| <b>Peso médio de animais machos</b>          | 0                              |
| <b>Peso médio de animais fêmeas</b>          | 0                              |
| <b>Peso médio de animais sexo indefinido</b> | 0                              |
| <b>Idade</b>                                 | ano(s) e 0 mes(es) e 0 dia(s). |
| <b>Procedência</b>                           | Laticínio Gege                 |

**Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 15/08/2018**



**JOSÉ NICOLAU PRÓSPERO PUOLI FILHO**  
Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu