

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

**Rastreabilidade de Farinhas de Origem Animal em Tecidos de
Codornas de Corte pela Técnica dos Isótopos Estáveis de
Carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) e Nitrogênio ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$)**

CLEUSA MÓRI

Tese Apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Zootecnia como Parte das Exigências para o
Exame Geral de Qualificação

BOTUCATU – SP
MARÇO DE 2007

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

**Rastreabilidade de Farinhas de Origem Animal em Tecidos de
Codornas de Corte pela Técnica dos Isótopos Estáveis de
Carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) e Nitrogênio ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$)**

CLEUSA MÓRI
Zootecnista

Orientador: Prof. Dr. Edivaldo Antônio Garcia

Tese Apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Zootecnia como parte das
Exigências para o Exame Geral de Qualificação

BOTUCATU – SP
MARÇO DE 2007

Á **Deus** por ter me acompanhado e auxiliado no processo de amadurecimento, me guiando pelo caminho do bem proporcionando tantas conquistas.

Ao meu pai e minha madrastra **José Vinício Móri** e **Cantionila Maria Alves Ferreira** (*in memorian*) pela presença e amor dedicados a mim.
E a minha mãe **Onofra Antônia de Moraes Móri** (*in memorian*) por ter me dado à vida

DEDICO

Eu aprendi...

Que não importa quanta seriedade à vida exija de você,
Cada um de nós precisa de um amigo brincalhão para se divertir juntos;
Que debaixo da "casca grossa" existe uma pessoa
Que deseja ser apreciada, compreendida e amada;
Que o AMOR, e não o TEMPO, é que cura todas as feridas;
Que ninguém é perfeito até que você se apaixone por essa pessoa;
Que a vida é dura, mas eu sou mais ainda;
Que um sorriso é a maneira mais barata de melhorar sua aparência;
Que não posso escolher como me sinto,
Mas posso escolher o que fazer a respeito;
Que todos querem viver no topo da montanha,
Mas toda felicidade e crescimento ocorre quando você esta escalando-a;

William Shaskeapeare

AGRADECIMENTOS (mais que especiais)

Meus sinceros agradecimentos

Ao Prof. Dr. Edivaldo Antônio Garcia, por abrir as portas para a minha ascensão profissional, ensinamentos, pela infinita paciência e compreensão.

Ao Prof. Dr. Carlos Ducatti por sua co-orientação.

A amiga Juliana Célia Denadai pela sua generosidade, paciência e disposição, pois a execução deste trabalho deveu-se em grande parte a ela.

Ao amigo André Moreira Bordinhon pela amizade e bom humor.

A amiga Rosana Gottman pelo auxílio nas análises estatísticas.

A amiga Ana Cláudia Pavan que mesmo de longe achava que tudo o que eu fazia era o máximo.

A amiga de todos os momentos Cristiana Andrighetto que sempre esteve disposta a me ouvir e contribuir para minha permanência em Botucatu.

Ao amigo Kleber Pelícia pela ajuda na execução do experimento.

Aos funcionários do Centro de Isótopos Estáveis Ambientais Cibele, Evandro e Silvia pelo auxílio e amizade.

As amigas, Adriana Piccinin, Sirlei Aparecida Maestá, Sabrina Endo Takahashi e Cláudia Marie Komiyama que me auxiliaram nas idas ao galpão de aves por amizade e amor.

A amiga Sarita Bonagurio Gallo pela amizade e simplicidade

A funcionária Solange Aparecida Ferreira por sempre estar disposta a realizar qualquer pedido.

A Empresa Nutron pela doação dos Suplementos vitamínico e mineral.

Ao Prof. Celso Pezzato e Prof. Sartori por disponibilizarem o Setor de Nutrição de Aves.

Ao Prof. Francisco Estefano Weschler pelos ensinamentos estatísticos e pela descontração com suas “piadas” um tanto peculiares.

A Carmem e a Seila por sempre estarem dispostas a colaborar com a parte burocrática da PG

Ao Amigo Gilberto Teixeira da Rosa (*In memoriam*) que em sua breve passagem pelo plano terrestre me ensinou que o importante não é só Doutorado ou uma Tese e sim a companhia de amigos sinceros, a simplicidade e o lazer, mesmo que seja com uma cervejinha barata e só lingüiça na churrasqueira.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

A FUNDUNESP pelo auxílio financeiro à pesquisa.

E a pessoa que me deu o maior incentivo através do amor e carinho dispensados para realização dessa empreitada Edson Shigueaki Nomura.

Namastê

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	01
Justificativas e Objetivos.....	10
Referências Bibliográficas	12
CAPÍTULO 2: Rastreabilidade de Farinha de Vísceras de Aves em Tecidos de Codornas de Corte pela Técnica dos Isótopos Estáveis de Carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) e Nitrogênio ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$)	
Resumo:	20
Abstract:	21
Introdução:	22
Material e Métodos:	25
Resultados e Discussão:	33
Referências Bibliográficas:	39
CAPÍTULO 3: Rastreabilidade de Misturas de Subprodutos de Origem Animal em Tecidos de Codornas de Corte pela Técnica de Isótopos Estáveis de Carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) e Nitrogênio ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$)	
Resumo:	45
Abstract:	46
Introdução:	47
Material e Métodos:	50
Resultados e Discussão:	57
Referências Bibliográficas:	64
CAPÍTULO 4: Considerações Finais.....	68
Apêndice:	71

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1: CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Tabela 1. Abundância natural dos isótopos estáveis em átomos %	06
--	----

CAPÍTULO 2: Rastreabilidade de Farinha de Vísceras de Aves em Tecidos de Codornas de Corte pela Técnica dos Isótopos Estáveis de Carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) e Nitrogênio ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$)

Tabela 1. Identificação dos tratamentos experimentais	26
---	----

Tabela 2. Análise bromatológica e valores isotópicos médios do milho, farelo de soja, farinha de vísceras de aves, farinha de penas de aves e farinha de carne e ossos bovina	28
---	----

Tabela 3. Composição percentual dos ingredientes, níveis nutricionais calculados e valores isotópicos médios para dietas experimentais iniciais (um a 21 dias de idade).	29
---	----

Tabela 4. Composição percentual dos ingredientes, níveis nutricionais calculados e valores isotópicos médios para dietas experimentais finais (22 a 42 dias de idade).	30
---	----

Tabela 4. Valores isotópicos médios de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ com seus respectivos desvios-padrão no músculo peitoral, quilha e tíbia de codornas de corte aos 42 dias de idade para as diferentes inclusões de farinhas de vísceras de aves.	34
---	----

CAPÍTULO 3: Rastreabilidade de Subprodutos de Origem Animal em Tecidos de Codornas de Corte pela Técnica de Isótopos Estáveis de ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) e Nitrogênio ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$)

Tabela 1. Identificação dos tratamentos experimentais	51
Tabela 2. Composição percentual dos ingredientes, níveis nutricionais calculados e valores isotópicos médios para dietas experimentais iniciais (um a 21 dias de idade)	52
Tabela 3. Composição percentual dos ingredientes, níveis nutricionais calculados e valores isotópicos médios para dietas experimentais finais (22 a 42 dias de idade).....	53
Tabela 4. Valores isotópicos médios de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ com seus respectivos desvios-padrão no músculo peitoral, quilha e tíbia de codornas de corte aos 42 dias de idade para as diferentes fontes protéicas	54

CAPÍTULO 4

Tabela 1. Nível de inclusão de farinha de vísceras de aves encontrado por meio do sistema de equações nos diferentes tecidos de codornas de corte com 42 dias de idade	73
--	----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

Figura 1. Regiões de confiança para os valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ do músculo peitoral de codornas de corte aos 42 dias de idade nos tratamentos T2, T3, T4, T5, T6 e T7.....	35
Figura 2. Regiões de confiança para os valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ de quilha de codornas de corte aos 42 dias de idade nos tratamentos T2, T3, T4, T5, T6 e T7	36
Figura 3. Regiões de confiança para os valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ de tíbia de codornas de corte aos 42 dias de idade nos tratamentos T2, T3, T4, T5, T6 e T7	36

CAPÍTULO 3

Figura 1. Regiões de confiança para os valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ do músculo peitoral de codornas de corte aos 42 dias de idade nos tratamentos R2, R3 e R8	58
Figura 2. Regiões de confiança para os valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ de quilha de codornas de corte aos 42 dias de idade nos tratamentos R2, R3 e R8.....	59
Figura 3. Regiões de confiança para os valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ de tíbia de codornas de corte aos 42 dias de idade nos tratamentos R2, R3 e R8.....	59
Figura 4. Regiões de confiança para os valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ do músculo peitoral de codornas de corte aos 42 dias de idade nos tratamentos R4, R5, R6 e R7.....	61
Figura 5. Regiões de confiança para os valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ de quilha de codornas de corte aos 42 dias de idade nos tratamentos R4, R5, R6 e R7	62

Figura 6. Regiões de confiança para os valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ de tíbia de codornas de corte aos 42 dias de idade nos tratamentos R4, R5, R6 e R7	62
--	----

Considerações Iniciais

A crescente demanda do mercado consumidor por sabores diferenciados nas fontes de proteína de origem animal tem levado pesquisadores, produtores e agroindústrias avícolas a avaliarem e adotarem espécies alternativas para produção em escala comercial.

Nesse contexto, a coturnicultura tem-se caracterizado como uma atividade interessante, pois, demanda baixos investimentos iniciais, uso de pequenas áreas e pouca mão-de-obra. Essas características justificam o aumento da produção nacional, onde dados do IBGE (2003) mostram que o plantel de codornas no Brasil no ano de 2002 correspondeu a 6.045 mil de aves, entre 1999 e 2000 houve um aumento de 17% no número de aves, sendo considerado expressivo para cultura, visto que outros rebanhos não obtiveram o mesmo crescimento no mesmo período.

Assim, as codornas estão se tornando rapidamente uma espécie de grande interesse econômico, pois possuem grande habilidade de converter alimentos primários em fonte de proteína de alta qualidade para o consumo humano (BAUMGARTNER, 1994). No exterior há grande aceitabilidade dos consumidores pela carne e ovos de codornas (JONES *et al.*, 1979; YANNAPOULOS & TSERVENI-GOUSHI, 1986; PANDA & SINGH, 1990; GUSHIN *et al.*, 1992; BAUMGARTNER, 1994).

Atentas a essa demanda de consumo, empresas do setor privado passaram a investir no aumento e melhoria de seus plantéis. Em 1996 foi feita a primeira importação oficial de matrizes de codornas da França aptas para produção de carne pela agroindústria Perdigão®, pois até então os animais destinados ao abate eram advindos do descarte de matrizes de postura em final de produção ou de machos classificados

erroneamente durante o processo de sexagem, ou seja, animais não especializados para produção de carne (ALMEIDA, 2001).

Com respostas aos seus investimentos, entre os anos de 1991 e 1996, a Perdigão®¹ registrou aumento de 35% ao ano nas vendas de sua linha de carne “in natura” denominada “*Avis Rara*”, que engloba carne de perdizes e codornas, esta última sendo responsável por 60% do aumento na produção no ano de 2002, atendendo assim os mercados externo e interno.

Nos últimos quatro anos, o volume entregue da linha *Avis Rara* dobrou. A demanda é baixa comparada ao frango e peru, mas a rentabilidade faz com que a empresa mantenha o empenho na continuidade da produção, garantia de que a linha é comercializada com uma compensação diferenciada e superior aos produtos avícolas tradicionais (MOREIRA, 2005).

Esforços relativos à produção de alimentos diferenciados são uma constante no agronegócio brasileiro. No entanto, nas últimas décadas, conversão alimentar, peso ao abate entre outros parâmetros fazem parte de processo mais amplo. Desenvolvimento sustentável, condições favoráveis para o bem estar animal e origem do alimento a ser consumido tornaram-se preocupação não somente do setor produtivo, mas principalmente de consumidores.

Incidentes mundiais como a BSE (Bovine Spongiform Encefalopathy) ou “mal da vaca louca”, dioxina, substâncias alergênicas, organismos geneticamente modificados, pesticidas, metais pesados e gripe aviária amedrontam os consumidores e incentivam o desejo pelo consumo de alimentos seguros. Os problemas referentes ao mal da “vaca louca” são decorrentes do consumo de rações à base de proteína animal (farinha de carne e ossos bovina) pelos bovinos, que eventualmente, poderia transmitir aos seres

humanos, consumidores da carne dessa espécie, uma variação do mal de Creutzfeldt-Jacob (vCJD).

Estados Unidos, Europa, Japão, Israel e Canadá apresentaram problemas em seus rebanhos relativos à BSE. No Reino Unido, além de perdas diretas pelo sacrifício de mais de 172 mil cabeças de gado, os custos associados às medidas para controlar a doença e suportar os prejuízos no mercado de carne ficaram na ordem de 2,408 bilhões de dólares no período de 1996-1997 e foi estimado, em 1998, prejuízo de 3,083 bilhões de dólares para o período de 1997-2000 (COSTA & BORGES, 2005).

Diante disso, medidas emergenciais foram tomadas, como por exemplo, a mudança na legislação europeia em seu regulamento CE nº 1774/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho da União Europeia, Texto Consolidado (CONSLEG, 2004), capítulo 1, artigo 22º, afirmando que fica proibida a alimentação de uma espécie animal com proteínas de animais transformadas, derivadas dos corpos, ou partes de corpos, de animais da mesma espécie.

As reações das autoridades europeias e agentes do setor à crise provocada por essa zoonose apontam para o tema crucial: a necessidade de estabelecer um enfoque integrado entre os elos das cadeias produtoras de carne, de modo a recuperar a confiança dos consumidores (RESENDE & LOPES, 2006). Esses episódios exigiram mais controle, definições claras de pontos críticos de controle, responsabilidade técnica e rastreabilidade na cadeia produtiva e na comercialização (CERUTTI, 2002).

Nos últimos anos a rastreabilidade tornou-se importante ferramenta para certificação de carne entre outros produtos agropecuários. Alimentos rastreados possuem diferencial no mercado, tornando-se mais competitivos e menos sujeitos as instabilidades do mundo globalizado. O *CODEX ALIMENTARIUS* (1999) define

rastreabilidade como a habilidade de traçar o histórico, aplicação ou localização de um item por meio de informações previamente registradas.

De acordo com SMITH *et al* (2005), muitos analistas do setor industrial relataram que indústrias alimentares que não aplicam algum tipo de sistema de rastreabilidade terão dificuldades em manter-se no ramo por pressões de consumidores e agências governamentais reguladoras.

A ausência de um programa de rastreabilidade impede a devida responsabilização e tomada de ações preditivas, preventivas e corretivas, nos casos de contaminação alimentar. Os programas de rastreabilidade são as únicas ferramentas eficazes para perfeita identificação da fonte causadora do problema (LIRANI, 2001).

Rastreabilidade está intimamente ligada à identidade do produto, como também diz respeito à origem de materiais utilizados e suas partes, histórico do processamento do produto, sua distribuição e localização após expedição (BERTOLINI, 2006). Apresenta-se como mecanismo que permite identificar a origem do produto desde o campo até o consumidor, podendo ter sido ou não, transformado ou processado. É um conjunto de medidas que possibilitam controlar ou monitorar todo o processo de produção, objetivando a qualidade com origem garantida (IBA *et al.*, 2003).

Muitas tecnologias estão disponíveis para o aprimoramento e detecção de características ou elementos em gêneros alimentícios derivados de tecidos animais (SCHWÄGELE, 2005). Algumas tecnologias podem ser utilizadas para fazer inferências definitivas a respeito da origem ou históricos dos alimentos destacando-se DNA-PCR, espectroscopia infravermelha e os isótopos estáveis de carbono e nitrogênio.

A técnica de isótopos estáveis foi usada inicialmente em estudos geológicos e arqueológicos. Nas últimas décadas tem sido aplicada de forma crescente em pesquisas agrícolas, ecológicas e fisiológicas, apresentando-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 utilização da técnica dos isótopos estáveis encurtaria o tempo medido entre uma possível “ocorrência” do problema e a identificação da fonte geradora, diminuindo a probabilidade de episódios desastrosos, levando em consideração o princípio da precaução.

Isótopos estáveis em estudos animais

Os isótopos estáveis dos elementos químicos carbono (C), hidrogênio (H), oxigênio (O) e nitrogênio (N) ocorrem naturalmente na atmosfera, hidrosfera, litosfera e biosfera. A palavra isótopo tem sua origem no grego (*ISO* mesmo ou igual, e *TOPOS* lugar), referindo-se ao fato de que ocupam o mesmo lugar na tabela periódica. A expressão *estável* significa que não emite radiação. Os isótopos são átomos do mesmo elemento químico, mas que diferem em número de nêutrons e números de massas. Cada elemento apresenta um isótopo estável leve dominante: carbono-12 (^{12}C), hidrogênio-1 (^1H), oxigênio-16 (^{16}O) e nitrogênio-14 (^{14}N), e um ou dois isótopos pesados: carbono-13 (^{13}C), hidrogênio-2 (^2H), oxigênio-18 (^{18}O) e nitrogênio-15 (^{15}N), com abundância ou concentração natural expressas em *átomos %* (DUCATTI, 2004).

De acordo com os valores apresentados na Tabela 1, 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). Assim, como o carbono, isótopos estáveis de outros elementos químicos podem ser utilizados no estudo com tecidos animais. O nitrogênio possui dois isótopos estáveis, ^{14}N e ^{15}N cujas abundâncias naturais são 99,63 e 0,37 átomos %, respectivamente (DUCATTI, 2004).

Tabela 1. Abundância natural dos isótopos estáveis em átomos %

Isótopo leve		Isótopo pesado		Gás analisado
^{12}C	98,892	^{13}C	1,108	*CO ₂
^1H	99,985	^2H	0,015	**H ₂
^{16}O	99,759	^{17}O	0,037	CO ₂
		^{18}O	0,203	CO ₂
^{14}N	99,633	^{15}N	0,366	***N ₂

Adaptado de DUCATTI (2004). *dióxido de carbono; ** hidrogênio; ***nitrogênio.

Na terminologia dos isótopos estáveis, os valores do delta do carbono-13 ($\delta^{13}\text{C}$) são expressos em *delta per mil da razão isotópica* $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ da amostra em relação ao padrão internacional definido, *PeeDee Belemnite* (PDB). De acordo com FRIEDMAN & O'NEILL (1977), citados por DUCATTI *et al.* (1979), o padrão PDB é aceito universalmente na comparação das composições isotópicas do carbono. Trata-se de um fóssil carbonatado sólido da era Cretáceo, denominado Belemnitela americana, da formação *PeeDee* da Carolina do Sul, Estados Unidos, o qual foi empregado inicialmente como padrão por CRAIG (1957).

Em relação ao nitrogênio, o padrão internacional aceito é o nitrogênio atmosférico, que é considerado uma mistura isotópica homogênea na superfície terrestre. Os valores do delta do nitrogênio-15 ($\delta^{15}\text{N}$) são expressos, na terminologia dos isótopos estáveis, em *delta per mil da razão isotópica* $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ da amostra em relação ao padrão internacional (DUCATTI, 2004).

O CO₂ é o principal composto químico para formação das plantas terrestres, que possui valor de $\delta^{13}\text{C}$ de aproximadamente -7,7‰ (KENNEDY & KROUSE, 1990). Em função do seu ciclo fotossintético, as plantas podem ser divididas em dois grupos distintos: as plantas do ciclo fotossintético C₃ e as do ciclo fotossintético C₄. As primeiras são denominadas plantas do ciclo C₃ porque em sua rota bioquímica o primeiro composto orgânico sintetizado contém três átomos de carbono. Por outro lado, as plantas onde o primeiro composto orgânico formado possui quatro átomos de carbono são denominadas plantas do ciclo C₄ (DUCATTI, 2004).

Durante a assimilação fotossintética, as plantas do ciclo fotossintético C₃ fixam o CO₂ atmosférico através do ciclo de *Calvin-Benson* e apresentam para si e seus subprodutos valores de $\delta^{13}\text{C}$ entre -22 e -34‰ (valor modal = -26,7‰). A fixação do CO₂ pelas plantas C₄ é realizada por meio do ciclo de *Hatch-Slack* e seus valores estão compreendidos entre -9 e -16‰ (valor modal = -12,6‰). Pelo fato das plantas C₃ e C₄ possuírem menor concentração que o padrão internacional (PDB) seus valores são sempre negativos. Portanto, as plantas C₃ e C₄ possuem assinaturas isotópicas distintas, devido ao fracionamento que ocorre durante a fixação fotossintética do carbono (SMITH & EPSTEIN, 1971; O'LEARY, 1981; KENEDY & KROUSE, 1990; VOGEL, 1993; DUCATTI, 2004). As diferenças naturais na razão isotópica de carbono entre espécies de plantas possibilitam a utilização de partes dessas plantas como traçadores em animais, não havendo a necessidade de sintetizar compostos especificamente marcados, evitando-se assim, riscos relativos à saúde humana e ao meio ambiente como no caso da utilização de isótopos radioativos (TYRREL *et al.*, 1984).

Diferentemente do carbono, a razão isotópica $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ nas plantas independe do ciclo fotossintético realizado. No caso das leguminosas que utilizam o ar atmosférico com fonte de fixação de nitrogênio, esta razão isotópica aproxima-se do padrão

internacional (N_2 atm); e no caso das gramíneas, esta razão varia em função da razão isotópica da fonte de nitrogênio específica de cada solo (adubação e clima, por exemplo). Em função da ocorrência natural desses traçadores, estão disponíveis grandes quantidades de substrato marcado, de fácil obtenção e bem mais barato que os traçadores enriquecidos.

A razão isotópica para o elemento químico carbono tem sido usada com sucesso para testar a autenticidade, a qualidade e a origem geográfica de vários produtos tais como sucos de frutas (BRICOUT & KOZIET, 1987; KOZIET *et al.*, 1993), vinhos (MARTIN *et al.*, 1988), méis (BROOKES *et al.*, 1991; RENIERO *et al.*, 1997; WHITE, *et al.*, 1998), produtos lácteos (ROSSMANN *et al.*, 1998; ROSSMANN *et al.*, 2000; MANCA *et al.*, 2001), óleos vegetais (KELLY *et al.*, 1997) e a caracterização e diferenciação de suínos Ibéricos, possibilitando a classificação dos animais de acordo com o tipo de alimentação recebida durante o período de engorda (GONZALES-MARTIN *et al.*, 1999). Em associação com a razão isotópica do elemento químico nitrogênio ($^{15}N/^{14}N$), a técnica permitiu a certificação de origem geográfica e tipos de alimentação de ovinos (PIASENTIER *et al.*, 2003).

DOMI *et al.* (2005) encontraram evidências que as análises conjuntas de $\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$ em músculo de tubarões fornecem informações importantes sobre a ecologia alimentar desses animais. A técnica tem auxiliado na detecção de áreas impactadas por efluentes e sua contribuição nutricional para diferentes tecidos de espécies como ostras (PIOLA *et al.* 2005) e peixes da espécie *planktivorous* (GASTON & SHUTHERS, 2004).

Pesquisadores brasileiros vêm utilizando a técnica dos isótopos estáveis com sucesso na identificação de subprodutos de origem animal em tecidos de aves. CARRIJO *et al.* (2006) avaliando a inclusão de diferentes subprodutos de origem

animal na ração de frangos de corte, afirmam que a análise de músculo peitoral pela técnica de isótopos estáveis do carbono-13 e nitrogênio-15 pode ser adequada para o sistema de rastreabilidade na detecção de farinha de carne e ossos bovina.

Por sua vez, OLIVEIRA (2005) relata que a utilização da razão isotópica dos isótopos estáveis de carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) e nitrogênio ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) apresenta-se como alternativa em potencial para o processo de certificação, sendo possível a detecção de farinha de vísceras de aves em tecidos de frangos de corte.

Justificativas e Objetivos

A utilização da técnica dos isótopos estáveis de carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) e nitrogênio ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) mostrou ser uma importante ferramenta para identificação de subprodutos de origem animal em diferentes tecidos de frangos de corte e perus, sendo de relevante importância para que nossos produtos adquiram credibilidade e estejam enquadrados nas regras internacionais.

Com intuito de colaborar com o desenvolvimento da técnica, vislumbrando sua utilização em todo segmento avícola, houve a necessidade de avaliar se outra espécie animal, como as codornas de corte, apresentaria informações adicionais.

No Capítulo 2 é apresentado o estudo denominado “Rastreabilidade de Farinha de Visceras de Aves em Tecidos de Codornas de Corte pela Técnica dos Isótopos Estáveis de Carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) e Nitrogênio ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$)”. O artigo foi redigido de acordo com as normas para publicação na *Revista Brasileira de Ciência Avícola – Brazilian Journal of Poultry Science* publicada pela Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas.

O presente trabalho teve por objetivo a detecção de farinha de vísceras de aves em dietas de codornas de corte, por meio da análise do músculo peitoral, quilha e tíbia pela técnica dos isótopos estáveis de carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) e nitrogênio ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$).

No capítulo 3, é apresentado o estudo denominado “Rastreabilidade de Subprodutos de origem Animal em Tecidos de Codornas de Corte pela Técnica dos Isótopos Estáveis de Carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) e Nitrogênio ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$)”. O trabalho foi redigido sob as normas para publicação na *Revista Brasileira de Ciência Avícola – Brazilian Journal of Poultry Science* publicada pela Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas. O estudo teve como objetivo verificar a presença de misturas de subprodutos

avícolas na dieta de codornas de corte no músculo peitoral, quilha e tíbia utilizando a técnica dos isótopos estáveis de carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) e nitrogênio ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$).

Referências Bibliográficas

- ALMEIDA, M. I. M. Efeito de linhagem e de nível protéico sobre o desempenho e características de carcaça de codornas (*Coturnix sp*) criadas para corte. Botucatu, SP: Instituto de Biociências – IB, 2001, 96p. Tese (Doutorado em Melhoramento Genético) - Universidade Estadual Paulista, 2001.
- BAUMGARTNER, J. Japanese quail production, breeding and genetics. **World's Poultry Science**, v. 50, n. 3, p. 227-235, 1994,
- BERTOLINI, M.; BEVILACQUA, M.; MASSINI, R. FMECA approach to product traceability in the food industry. **Food Control**, v. 17, p. 137-145, 2006.
- BRICOUT, J.; KOZIET, J. Control of authenticity of orange juice by isotopic analysis. **Journal of agricultural Food Chemistry**; v.35, p. 758-760, 1987.
- BROOKES, S.T.; BARRIE, A.; DAVES, J.E. A rapid ¹³C/¹²C test for determination of corn-syrups in honey. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**; v.74, p. 627-629, 1991.
- CARRIJO, A. S; PEZZATO, A. C; DUCATTI, C; SARTORI, J. R; TRINCA, L; SILVA, E. T; Traceability of Bovine Meat Bone Meal in Poultry by Stable Isotope Analysis. *Revista Brasileira de Ciência Avícola* 2006; 8: 37-42.
- CERUTTI, M. Aplicação de um programa de rastreabilidade na cadeia de frangos de corte. Anais do Simpósio sobre Manejo de Aves e Suínos e Tecnologia da Produção de Rações. **Colégio Brasileiro de Nutrição Animal**, Campinas, 253-264, 2002:
- CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Codex Alimentarius Food and Agriculture organization of the United Nations**, Word Health Organization, 1999.

CONSLEG – Serviço das Publicações Oficiais das Comunidades Europeias. **Texto Consolidado – Regulamento nº 1774/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho da União Europeia**, 154p. 2004. Disponível em: <http://defra.gov.uk/animalh/by-prods/publicate/em_2002R1774_do_001.pdf> Acesso em: 27 de janeiro de 2007.

COSTA, L.M.C.; BORGES, J.R.J. Encefalopatia Espongiforme Bovina – “Doença da Vaca Louca” 2005. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/vacalouca/caderno_tecnico/pdf/caderno_tecnico.pdf Acesso em: 27 de janeiro de 2007.

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

DOMI, N.; BOUQUEGNEAU, K.; DAS, K. Feeding ecology of five commercial shark species of the Celtic Sea through stable isotope and trace metal analysis. **Marine Environmental Research**, v. 60, p. 551-569, 2005.

DUCATTI, C.; SALATI, E.; MATSUI, E. Método de análise de razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ em carbonatos. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 51, p. 275-286, 1979.

DUCATTI, C. Isótopos estáveis ambientais. [Apostila]. Botucatu (SP): Universidade Estadual Paulista; 2004; 183 p.

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. 199A, p. 725-737, 1998.

- GASTON, T.F.; SUTHERS, I.M. Spatial variation in $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ of liver, muscle and bone in rocky reef planktivorous fish: the relative contribution of sewage. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 304, p. 17-33, 2004.
- GONZALES-MARTIN, I.; GONZÁLES-PÉREZ, C.; HERNÁNDEZ MENDÉZ, J.; MARQUES-MÁCIAS, E.; POVEDA, F.S. Use of isotope analysis to characterize meat from Iberian-breed swine. **Meat Science**; v. 52, p. 437-441, 1999.
- GUSHIN, W.W.; KROIK, L.I.; NANOS, W.R. CIS quail industry is developing successfully. **World's Poultry Science**, v.8, p. 43, 1992.
- IBA, S. K.; BRABET, C.; OLIVEIRA, I. J.; PALLET, D. Um panorama da rastreabilidade dos produtos agropecuários do Brasil destinados à exportação – carnes, soja e frutas. 2003. Disponível em <http://www.endotec.org.br/proper/publicacoes/rastreab.pdf> Acesso em 09 de fevereiro, 2007.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA ESTATÍSTICA, **Sistema IBGE de recuperação Automática**, 2003. Disponível em <http://www.ibge.br/sidra> Acesso em 10 de janeiro, 2007.
- JONES, J.E.; HUGHES, B.L.; HALE, K.K. Coturnix D1 carcass yield. **Poultry Science**, v. 58, p.1647-1648, 1979,
- KELLY, S., PARKER, I., SHARMAN, M., DENNIS, J., GOODALL, I. Assessing the authenticity of single seed vegetable oils using fatty acid stable carbon isotope ratios ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$). **Food Chemistry**; v. 59, p. 181-186, 1997.

- 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.
- KOZIET, J., ROSSMANN, A., MARTIN, G.J., ASHURST, P.R. Determination of carbon-13 content of sugars of fruit and vegetable juices. **Analytical Chemical Acta**, v. 271, p. 31-38, 1993.
- LIRANI, A.C. Rastreabilidade da carne bovina: Uma proposta de implementação.2001. Disponível em:<<http://www.sbagro.org.br/vol4n2/artigo%2005%20v4%20n2.pdf>>. Acesso em: 27 de janeiro de 2007.
- MANCA, G.; CAMIN, F.; COLORU, G., DEL CARO, A., DETENTORI, D., FRANCO, M.A., VERSINI, G. Characterization of the geographical origin of *Pecorino Sardo* cheese by casein stable isotope ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) ratios and free amino acid ratios. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 1404-1409, 2001.
- MARTIN, G.J.; GUILLOU, C.; ARTIN, M.L.; CABANIS, M.T.; TEP, X.; AERNY, J. Natural factors of isotope fractionation and the characterization of wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.36, p. 316-322, 1988.
- MOREIRA, E. Expansão à vista. Novas tendências em cena no mercado consumidor e o avanço tecnológico nas granjas estimulam o setor. *Revista Safra*, Ano 6, nº 67, 2005.
- O'LEARY, M.H. Carbon isotope fractionation in plants. **Phytochemistry**, v.20, n.4, p.553-567, 1981.

- OLIVEIRA, R. P. **Rastreabilidade da farinha de vísceras de aves na alimentação de frangos de corte pela técnica dos isótopos estáveis ($\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$)**. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; Botucatu, 109p, 2005.
- PANDA, B.; SINGH, R. P. Developments in processing of quail meat and eggs. **World's Poultry Science**, v. 46, n. 11, p. 219-234, 1990.
- PIASSENTIER, E.; VALUSSO, R.; CAMIN, F.; VERSINI, G. Stable isotope ratio analysis for authentication of lamb meat. **Meat Science**, v. 64, p. 239-247, 2003.
- PIOLA, R.F., MOORE, S.K., SUTHERS, I.M. Carbon and nitrogen stable isotope analysis of three types of oyster tissue in an impacted estuary. **Estuarine Coastal and Shelf Science**, p. 1-12, 2005.
- RENIERO, F.; ZILLER, L.; FRANCO, M.A.; DEL CARO, A.; VACCA, V. Caratterizzazione dei miele italiani di diversa provenienza (Trentino Alto-Adige e Sardegna) mediante il rapporto ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$). **Rivista di Merceologia**, v. 31: p. 39-48, 1997.
- REZENDE, E.H.S.; LOPES, M.A. Identificação, certificação e rastreabilidade na cadeia de carne bovina e bubalina. Conferência Internacional sobre rastreabilidade e produtos agropecuários, Brasília, 2006. Disponível em http://conferencia.agricultura.gov.br/apresentacoes/Eduardo%20%Henrique%Souza%Rezende_arquivos/frame.htm. Acesso em: 27 de janeiro de 2007.
- ROSSMANN, A.; HABERHAUER, G.; HOLZL, S.; HORN, P.; PICHLMAYER, F.; VOERKELIUS, S. The potential of multielement stable isotope analysis for regional

- origin assignment of butter. **European Food Research & Technology**, v. 211, p. 32-40, 2000.
- ROSSMANN A, KORNEHL BE, VERSINI G, PICHLMAYER F, LAMPRECHT G. Origin assignment of milk from alpine regions multielement stable isotope ratio analysis (SIRA). *Journal of Food Science & Nutrition* 1998; 1:9-21.
- SMITH, B.M.; EPSTEIN, S. Two categories of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios of higher plants. **Plant Physiology**, v.47, p.380-384, 1971.
- SMITH, G.C.; TATUM, K.E.; BEKK, K.E.; SACANGA, J.A.; GRANDIN, T.; SOFOS, J.N. Traceability from a US perspective. **Meat Science**, v. 71, p. 174-193, 2005.
- SCHWÄGELE, F. Traceability from a European perspective. **Meat Science**, v. 71, p. 164-173, 2005.
- YANNKOPOULOS, A.L.; TSERVENI-GOUDI, A.S. Quality characteristics of quail eggs. **British Poultry Science**, v. 27, p. 171-176, 1986.
- TYRREL, H.F.; PELLETIER, G.; CHEVALIER, R.; HILLAIRES-MARCELL, C.; GAGNON, M. Use of carbon 13 as tracer in metabolism studies. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, suppl., p. 127-129, 1984.
- VOGEL, J.C. Variability of carbon isotope fractionation during photosynthesis. In: EHLERINGER, J.R., HALL, A.E., FARQUHAR, G.D. (ed). Stable isotopes and plant carbon-water relations. **San Diego: Academic Press Inc.**, p. 29-46, 1993.
- WHITE, J.W.; WINTERS, K.; MARTIN, P.; ROSSMANN, A. Stable carbon isotope ratio analysis of honey: validation of internal standard procedure for worldwide

application. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**; v. 81, p.610-619, 1998.

Rastreabilidade de Farinha de Vísceras de Aves em Tecidos de Codornas de Corte pela Técnica dos Isótopos Estáveis de Carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) e Nitrogênio ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$)

Resumo – Estudos para detecção de subprodutos de origem animal em carne de aves são escassos e, em se tratando de codornas são inexistentes. O trabalho teve por objetivo a detecção de farinha de vísceras de aves (FVA) em dietas de codornas de corte no músculo peitoral quilha e tíbia pela técnica dos isótopos estáveis de carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) e nitrogênio ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$). Foram utilizadas 64 codornas de corte macho de um dia de idade advindas de granja comercial. As aves foram divididas em sete grupos distintos distribuídos aleatoriamente em relação às dietas experimentais que continham diferentes percentagens de FVA: 0; 1,5; 3,0; 4,5; 6,0; 7,5 e 15. As dietas foram formuladas de forma a serem isoenergéticas, isoprotéicas e isoaminoacídicas. Quatro aves de cada tratamento foram abatidas aos 42 dias de idade para colheita do músculo peitoral (*Pectoralis major*), quilha e tíbia para posteriormente serem analisadas. Observou-se enriquecimento isotópico de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ nos três tecidos analisados. Em codornas de corte com 42 dias de idade, o nível de inclusão de farinha de vísceras de aves detectado compreende o intervalo de 3,0 a 4,5%.

Unitermos: codornas, dietas, isótopos estáveis.

Poultry Visceral Meal Traceability in Tissues Quail by Carbon ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) and Nitrogen ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) Stable Isotopes Technique

Abstract – Detection of animal origin by-products studies in poultry meat are rare and inexistent when related to quail meat. This paper aims the detection of increasing levels of poultry visceral meal (FVA) in quail meat, using carbon ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) and nitrogen ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) stable isotopes technique. Sixty four male quails aging one day originally from a commercial producer were divided in seven different groups in a random distribution. Those groups received different experimental diets containing 0; 1,5; 3,0; 4,5; 6,0; 7,5 e 15% of FVA. Those diets were formulated to be isoenergetic, isoproteic and to have the same level of amino-acids. Four individuals per treatment were sacrificed at the 42nd day for breast muscle (*Pectoralis major*), keel and tibia collection to later analysis. Isotopic enrichment of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ were observed in all analyzed tissues. In 42 day old quail were detect a 3,0 and 4,5% poultry visceral meal inclusion in its diet.

Key-words: quail, diets, stable isotopes

Introdução

As exigências cada vez maiores por produtos de qualidade, principalmente em relação à segurança alimentar, mobilizam produtores e agroindústrias a adequarem seus sistemas de produção, com o objetivo de oferecerem aos seus clientes produto comprovadamente seguro, transmitindo confiança aos mesmos, principalmente depois dos problemas relacionados à Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB) ou “mal da vaca louca”.

Os problemas apresentados por essa zoonose, na Europa, Japão e Canadá, despertaram o interesse dos consumidores nos aspectos relacionados à origem do produto que vão consumir e quais condições de produção, implicando no desenvolvimento de um novo conceito de rastreabilidade, integrando todos os passos da cadeia produtiva, do produtor primário ao varejo.

A adoção de mecanismos capazes de garantir a qualidade do produto final por meio da identificação e conhecimento minucioso dos diferentes processos de produção passa a ser visto como pré-requisito básico, ou melhor, como condição inerente ao processo produtivo (Antunes, 2003). Além disso, sistemas de rastreabilidade representam a mais apropriada ferramenta para circulação de informações sobre a qualidade do produto para os consumidores finais, proporcionando maior transparência a diferentes cadeias de produção (Bertolini *et al.* 2006).

Alguns sistemas têm auxiliado na identificação de subprodutos de origem animal, tais como microchips, código de barras, etiquetas, brincos, etc., contudo, esses sistemas são dependentes da honestidade do produtor e se fundamentam em informações registradas. No entanto, dados de registros não são suficientes para assegurar as qualidades intrínsecas do produto. De acordo com Ilbery *et al.* (2000), existe a

necessidade de se desenvolver uma tecnologia independente para autenticação de carnes para satisfazer as necessidades dos consumidores.

Neste sentido, a análise da razão isotópica para o elemento químico carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) por espectrometria de massas tem sido usada com sucesso para testar a autenticidade, a qualidade e origem geográfica de vários produtos como suco de frutas (Bricout & Koziat, 1987), vinhos (Martin *et al.*, 1988), produtos lácteos (Rossmann *et al.*, 2000; Manca *et al.*, 2001), cervejas (Sleiman, 2006) e bebidas de laranja (Queiroz, 2005).

As diferenças naturais na razão isotópica de carbono entre espécies de plantas oferecem a possibilidade de utilizar partes das mesmas como traçadores em animais, sem alterar o seu estado natural, sem a necessidade de sintetizar compostos especificamente marcados, além de evitar problemas de saúde humana e segurança ambiental associado ao uso de isótopos radioativos (Jones *et al.*, 1979; Tieszen, 1978; Tyrrell *et al.*, 1984; Boutton *et al.*, 1988; Metges *et al.*, 1990).

Diferentemente do carbono, a razão isotópica $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ nas plantas não depende do ciclo fotossintético realizado. No caso das leguminosas que utilizam o ar atmosférico como fonte de fixação de nitrogênio, essa razão isotópica aproxima-se do padrão internacional (N_2atm), e no caso de outras categorias de plantas como, por exemplo, as gramíneas, esta razão varia em função da razão isotópica da fonte de nitrogênio específica de cada solo, além de depender de inúmeros fatores como clima e adubação. Assim como o carbono, a abundância natural de ^{15}N pode ser utilizada como traçador em estudos de nutrição animal.

A abundância de substratos marcados naturalmente sem restrições a sua utilização no que se refere à contaminação ambiental, indica que esses traçadores podem ser usados em estudos com organismos aquáticos (Schroeder, 1983), em aves de postura

(Carrijo *et al* 2000), em frangos de corte (Oliveira, 2005; Carrijo *et al.*, 2006; Cruz, 2002), peixes (Zuanon *et al*, 2006), ovinos (Silva, 2003), tubarões (Domi *et al.*, 2005), ostras (Piola *et al.*, 2005) e focas (Zhao *et al.*, 2006).

Tendo em vista a amplitude da utilização da técnica dos isótopos estáveis, levando em consideração a necessidade dos produtos avícolas brasileiros serem um diferencial no mercado globalizado, o presente estudo teve por objetivo detectar a inclusão de farinha de vísceras de aves (FVA), no músculo peitoral, quilha e tíbia de codornas de corte aos 42 dias de idade, através das análises das razões de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ dos tecidos.

Material e Métodos

O experimento foi realizado nas instalações do setor de Avicultura, localizado na Fazenda Experimental Edgárdia, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, *campus* de Botucatu.

Foram utilizadas 56 codornas italianas macho de corte de um dia de idade advindas de granja comercial. As aves foram alojadas de um a 42 dias de idade em um galpão de cria com dimensões de 15 m de comprimento por quatro metros de largura, coberto com telhas de cimento amianto e provido de cortinas plásticas em suas laterais. Foram utilizadas sete gaiolas metálicas contendo oito codornas em cada uma, medindo 100 cm x 80 cm x 35 cm, utilizadas na criação de pintainhas de postura. Cada gaiola teve seu piso revestido com folhas de jornal e sobre estas foi colocada tela plástica preta de malha de um centímetro para evitar fuga das aves e possíveis traumatismos nas pernas das mesmas. O piso abaixo de cada gaiola foi coberto com cinco centímetros de maravalha para absorção dos dejetos das aves. Cada gaiola possuía em sua parte superior uma campânula elétrica com lâmpada infravermelha de 250 watts de potência para aquecimento das aves até os 16 dias de idade. Foi utilizado um bebedouro tipo copo de pressão infantil por gaiola com capacidade de meio litro, cuja água era trocada duas vezes ao dia. Aos 14 dias, os bebedouros tipo copo de pressão infantil foram substituídos pelo bebedouro tipo calha instalado na parte posterior das gaiolas.

Nos primeiros dez dias, as codorninhas foram alimentadas em comedouro tipo bandeja, sobre a qual se colocou uma tela plástica com malha de um centímetro, tendo como objetivo a redução do desperdício de ração. A partir do 11º dia, a ração foi fornecida através de comedouros lineares situados frontalmente às gaiolas. Durante o período experimental as aves receberam ração e água *ad libitum*.

O programa de luz adotado foi de 24 horas diárias até a terceira semana de vida das aves, utilizando lâmpadas incandescentes de 100 watts. Após esse período as codornas receberam somente iluminação natural.

Os tratamentos experimentais são identificados na Tabela 1. As aves foram submetidas às dietas experimentais durante todo o período de criação (um a 42 dias de idade). As rações foram formuladas de modo a atender as exigências nutricionais das aves. Optou-se por seguir o mesmo plano nutricional de uma empresa comercial de um a 21 dias (ração inicial) e de 22 a 42 dias de idade (ração final). Os níveis nutricionais de ambas as dietas experimentais foram isoenergéticos, isoprotéicos, isofosfóricos e isoaminoácídicos (para metionina).

Tabela 1. Identificação dos tratamentos experimentais.

Tratamentos	Inclusão de Farinha de Vísceras de Aves, (%)
T1	0*
T2	1,5
T3	3,0
T4	4,5
T5	6,0
T6	7,5
T7	15,0

*Tratamento controle

Nas Tabelas 2 e 3 são apresentadas as composições percentuais, níveis nutricionais calculados e valores isotópicos das rações utilizadas. Cada ingrediente usado na confecção da ração foi proveniente de um mesmo lote. A farinha de vísceras de aves (FVA) utilizada foi recebida como doação da empresa Frangoeste® localizada no município de Tietê/SP. Por meio da análise bromatológica a farinha de vísceras de aves apresentou 96,14% de matéria seca (MS), 65,54% de proteína bruta (PB), 12,47% de extrato etéreo (EE), 14,49% de matéria mineral (MM) e valores isotópicos médios de $\delta^{13}\text{C} = -16,28 \pm 0,07\text{‰}$ e $\delta^{15}\text{N} = 4,30 \pm 0,03 \text{‰}$.

Todos os ingredientes utilizados para confecção das rações foram analisados isotopicamente para carbono e nitrogênio. Em especial, pode-se observar que farelo de soja e milho apresentaram valores isotópicos médios de $\delta^{13}\text{C} = -26,58\text{‰}$ e $\delta^{13}\text{C} = -13,07\text{‰}$, respectivamente, os quais concordam com a literatura onde as plantas do ciclo fotossintético C_3 (ex.: soja, arroz, trigo) possuem um valor modal de $\delta^{13}\text{C} = -27,6\text{‰}$ em relação ao padrão *PDB*, e nas plantas do ciclo fotossintético C_4 (ex.: milho, sorgo, cana-de-açúcar) o valor modal fica em torno de $\delta^{13}\text{C} = -12,6\text{‰}$.

Tabela 2. Composição percentual dos ingredientes, níveis nutricionais calculados e valores isotópicos médios para as dietas experimentais iniciais (um a 21 dias de idade)

Ingredientes (%)	Dietas experimentais						
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Milho moído	44,81	46,00	47,21	48,50	49,50	50,34	53,32
Farelo de soja	48,60	46,45	44,35	42,20	40,10	38,05	27,98
Farinha de vísceras de aves	-	1,50	3,00	4,50	6,00	7,50	15,00
Óleo de soja	2,93	2,52	2,10	1,66	1,32	1,03	-
Calcário calcítico	1,03	0,98	0,98	0,94	0,90	0,90	0,61
Fosfato bicálcico	1,79	1,60	1,38	1,18	1,00	0,77	-
DL – Metionina	0,05	0,05	0,04	0,04	0,03	0,03	-
L – Lisina	-	-	-	-	-	-	-
Caulim	-	0,15	0,19	0,23	0,40	0,63	2,34
Sal comum	0,39	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35
Suplemento vitamínico-mineral ¹	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
Total	100	100	100	100	100	100	100
Níveis Nutricionais Calculados							
Energia metabolizável (kcal/kg)	2900	2900	2900	2900	2900	2900	2900
Proteína bruta (%)	26,00	26,00	26,00	26,00	26,00	26,00	26,00
Fibra bruta (%)	3,94	3,84	3,75	3,65	3,56	3,46	2,97
Cálcio (%)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Fósforo disponível (%)	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,49
Metionina (%)	0,44	0,45	0,44	0,45	0,44	0,45	0,44
Metionina + Cistina (%)	0,86	0,86	0,86	0,86	0,86	0,86	0,86
Lisina (%)	1,50	1,49	1,48	1,47	1,46	1,45	1,41
Valores Isotópicos Médios ²							
$\delta^{13}\text{C}$	-21,11	-20,58	-20,12	-19,90	-19,80	-18,71	-17,41
$\delta^{15}\text{N}$	0,73	0,83	1,20	1,30	1,39	1,57	2,28

¹Composição dos Suplementos Vitamínico e Mineral Nutron®/kg de ração.-Ácido fólico 200 mg; Ácido Pantotênico 3.120 mg; Colina 75.500 mg; Biotina 10.000 mcg; Niacina 8.400 mg; Vit. A 1.680 UI; Vit. B1 436,50 mg; Vit. B12 2.400 mcg; Vit B2 1.200 mg; Vit. B6 624 mg; Vit. D3 400.000 UI; Vit. E 3.500 mg; Vit. K3 360 mg; Cu 2.000 ppm; Fe.12.500 ppm; I. 187,50 ppm; Mn.18.750 ppm; Zn. 17.500 ppm; Se 75,00 ppm

²Valores Isotópicos Médios expressos em $\delta^{13}\text{C}$ relativos ao padrão *Peedee Belemnite (PDB)* e $\delta^{15}\text{N}$ relativos ao padrão N_2 atmosférico.

Tabela 3. Composição percentual dos ingredientes, níveis nutricionais calculados e valores isotópicos médios para as dietas experimentais finais (22 a 42 dias de idade)

Ingredientes (%)	Dietas experimentais						
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Milho moído	50,42	52,38	53,45	54,19	54,50	55,19	60,70
Farelo de soja,	40,91	38,63	36,52	34,50	32,53	30,50	19,83
Farinha de vísceras de aves	0	1,50	3,00	4,50	6,00	7,50	15,00
Óleo de soja	4,99	4,32	3,95	3,70	3,59	3,35	1,46
Calcário calcítico	0,90	0,86	0,87	0,82	0,82	0,79	0,78
Fosfato bicálcico	1,67	1,47	1,26	1,08	0,85	0,65	0,01
DL – Metionina	0,10	0,09	0,09	0,08	0,08	0,07	0,05
L – Lisina	-	-	-	-	-	-	0,07
Caulim	0,26	-	0,11	0,38	0,88	1,20	1,35
Sal comum	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35
Suplemento vitamínico-mineral ¹	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
Total	100	100	100	100	100	100	100
Níveis Nutricionais Calculados							
Energia metabolizável (kcal/kg)	3100	3100	3100	3100	3100	3100	3100
Proteína bruta (%)	23,00	23,00	23,00	23,00	23,00	23,00	23,00
Fibra bruta (%)	3,54	3,45	3,35	3,26	3,16	3,06	2,55
Cálcio (%)	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	1,03
Fósforo disponível (%)	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42	0,48
Metionina (%)	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45
Metionina + Cistina (%)	0,82	0,82	0,82	0,82	0,82	0,82	0,82
Lisina (%)	1,29	1,28	1,27	1,26	1,25	1,25	1,25
Valores Isotópicos Médios ²							
$\delta^{13}\text{C}$	-20,25	-19,80	-19,40	-19,15	-18,42	-18,15	-16,77
$\delta^{15}\text{N}$	0,96	1,19	1,28	1,36	1,60	1,80	2,47

¹Composição dos Suplementos Vitamínico e Mineral Nutron®/kg de ração.-Ácido fólico 162,50 mg; Ácido Pantotênico 2.600 mg; Colina 65.250; Niacina 7.000 mg; Se 75,00 ppm; Vit. A 1.400 UI; Vit. B1 388,00 mg; Vit. B12 2.000 mcg; Vit B2 1.000 mg; Vit. B6 520 mg; Vit. D3 300.000 UI; Vit. E 2.500 mg; Vit. K3 300 mg; Cu 2.000 ppm; Fe.12.500 ppm; I. 187,50 ppm; Mn.18.750 ppm; Zn. 17.500 ppm.

²Valores Isotópicos Médios expressos em $\delta^{13}\text{C}$ relativos ao padrão *Peedee Belemnite (PDB)* e $\delta^{15}\text{N}$ relativos ao padrão N_2 atmosférico.

No 42º dia de experimento, foram retiradas aleatoriamente quatro aves por tratamento (n = 4) e sacrificadas por meio de deslocamento cervical para colheita de amostras do músculo peitoral, quilha e tíbia para realização das análises isotópicas.

As amostras de músculo peitoral foram colhidas retirando-se uma fatia de aproximadamente 20 g no sentido transversal do terço médio longitudinal. Para obtenção das amostras de quilha, o prolongamento cartilaginoso do esterno foi dissecado e teve a inserção com o osso aparado por um corte transversal formando um ângulo reto com a sua superfície dorsal. As amostras ósseas foram obtidas coletando-se o terço médio longitudinal da tíbia direita, as quais tiveram o conteúdo medular retirado por meio de lavagem com água destilada. Todas as amostras dos diferentes tecidos foram devidamente identificadas e congeladas a – 20°C.

No momento da execução das análises, as amostras de tecidos foram descongeladas, lavadas em água destilada, colocadas em placas de Petri e secas em estufa de ventilação forçada (Marconi – modelo MA 035) a 55°C por um período de 48 horas. Depois de secas, todas as amostras foram moídas em moinho criogênico (Spex – modelo 6700 *freezer/mill*) à – 196°C em frequência máxima durante três minutos, a fim de se obter um material homogêneo de finíssima granulometria, com aspecto de talco (Licatti, 1997; Ducatti, 2004). As rações foram moídas seguindo os mesmos procedimentos acima, porém o tempo de moagem foi de dez minutos.

As análises isotópicas dos ingredientes, rações e dos tecidos foram realizadas no Centro de Isótopos Estáveis Ambientais do Instituto de Biociências (CIE/IB), UNESP, *campus* de Botucatu. Para determinação das razões isotópicas de carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) e nitrogênio ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) foi utilizado o espectrômetro de massas de razão isotópica (IRMS) tipo DELTA – S (Finnigan Mat) acoplado ao Analisador Elementar (EA 1108 CHN), de acordo com método descrito por Ducatti (2004). Para todas as amostras, ambas as

análises para os elementos carbono e nitrogênio foram feitas em duplicata separadamente.

Os resultados das análises foram expressos em *delta per mil* da razão isotópica da amostra em relação aos padrões internacionais *PeeDee Belemnite* (PDB) e nitrogênio atmosférico (N₂), para os elementos carbono e nitrogênio, respectivamente, de acordo com a expressão:

$$\delta\text{‰}_{(\text{amostra, padrão})} = [(R_{\text{amostra}} - R_{\text{padrão}}) / R_{\text{padrão}}] \times 10^3$$

Onde R representa a razão entre o isótopo mais pesado e o mais leve, em particular ¹³C/¹²C e ¹⁵N/¹⁴N, da amostra e do padrão.

Para determinar o percentual de inclusão de farinha de vísceras de aves (FVA) estimado na composição do músculo peitoral, quilha e tibia foi empregado o modelo de diluição isotópica, de duas fontes e dois isótopos na formação de um produto (Ducatti, 2004). Os detalhes matemáticos do modelo estão explícitos no apêndice. Esse modelo permite mensurar o índice participativo de cada fonte a partir das análises do músculo peitoral, quilha ou tibia de codornas que receberam dietas exclusivamente de ingredientes vegetais (fonte 1) e dos diferentes tecidos das aves alimentadas com níveis crescentes de FVA (fonte 2). As aves alimentadas com os diferentes percentuais de FVA forneceram amostras de músculo peitoral, quilha e tibia (produto), para as análises isotópicas, as quais constituíram os diferentes tratamentos deste experimento.

Os resultados isotópicos obtidos foram submetidos à análise multivariada de variância (MANOVA) com auxílio do procedimento GLM (General Linear Model) do programa estatístico SAS (1999). Foram gerados dados pelas matrizes de erros para cada tecido, e posteriormente distribuídos graficamente em regiões (elipses) com 95%

de confiança para observar possíveis diferenças entre médias dos tratamentos experimentais e as médias do tratamento controle.

Este programa permite verificar se os valores do par isotópico ($\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$) do tratamento controle (ração vegetal), diferem estatisticamente dos valores do par isotópico do tratamento com a inclusão da proteína de origem animal.

Resultados e Discussão

Os resultados das análises isotópicas ($\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$) das dietas iniciais e finais utilizadas nesse estudo são apresentados nas Tabelas 2 e 3, respectivamente. Com aumento na percentagem de inclusão de FVA nas dietas experimentais, observou-se enriquecimento nos valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$. Este enriquecimento pode ter ocorrido em função das composições das rações variarem, já que as mesmas foram formuladas para serem isocalóricas e isoprotéicas em ambas as fases de criação das codornas de corte, pois com o aumento de FVA nas dietas as quantidades em percentagem de farelo e óleo de soja foram reduzidas e as de milho aumentadas.

As médias de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ para os diferentes tecidos estudados de codornas de corte aos 42 dias de idade são apresentados na Tabela 4. Os valores médios revelam enriquecimento isotópico do músculo peitoral, quilha e tíbia das aves nos tratamentos onde houve inclusão crescente de FVA em comparação com a dieta sem inclusão desse ingrediente (tratamento controle). Apesar de cada tecido apresentar valor isotópico próprio, fator de fracionamento e *turnover* isotópico (Hobson & Clark, 1992b; 1992a), o animal é aquilo que consome isotopicamente $\pm 1\text{‰}$ para ^{13}C e $\pm 3\text{‰}$ para ^{15}N (DeNiro & Epstein, 1976; 1978). Este comportamento pode ser melhor visualizado por meio das Figuras 2 e 3 onde se observa que a inclusão crescente de FVA nas dietas por meio das elipses de confiança estão dispostas de forma linear e crescente. Essa percepção só é possível quando as dietas são formuladas e analisadas minuciosamente, viabilizando uma possível certificação.

Tabela 4. Valores isotópicos médios de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ com seus respectivos desvios-padrão no músculo peitoral, quilha e tíbia de codornas aos 42 dias de idade para diferentes inclusões de farinha de vísceras de aves

Inclusão de FVA na dieta, %	Tecido amostrado					
	Músculo peitoral		Quilha		Tíbia	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$
0,0	-21,70 $\pm$ 0,25	2,53 $\pm$ 0,07	-19,35 $\pm$ 0,31	3,57 $\pm$ 0,22	-18,61 $\pm$ 0,06	2,71 $\pm$ 0,07
1,5	-21,41 $\pm$ 0,13	2,70 $\pm$ 0,09	-18,82 $\pm$ 0,15	3,68 $\pm$ 0,03	-18,16 $\pm$ 0,40	2,90 $\pm$ 0,16
3,0	-20,99 $\pm$ 0,44	2,81 $\pm$ 0,08	-18,35 $\pm$ 0,65	3,80 $\pm$ 0,14	-17,91 $\pm$ 0,23	3,00 $\pm$ 0,10
4,5	-20,72 $\pm$ 0,38	3,04 $\pm$ 0,08	-18,17 $\pm$ 0,27	3,96 $\pm$ 0,13	-17,62 $\pm$ 0,40	3,20 $\pm$ 0,13
6,0	-20,52 $\pm$ 0,51	3,17 $\pm$ 0,15	-17,46 $\pm$ 0,44	4,13 $\pm$ 0,11	-17,12 $\pm$ 0,15	3,31 $\pm$ 0,18
7,5	-19,86 $\pm$ 0,50	3,21 $\pm$ 0,22	-16,59 $\pm$ 0,46	4,25 $\pm$ 0,20	-16,25 $\pm$ 0,50	3,52 $\pm$ 0,16
15,0	-18,27 $\pm$ 0,46	3,87 $\pm$ 0,15	-15,56 $\pm$ 0,42	4,9 0 $\pm$ 0,23	-14,84 $\pm$ 0,28	4,16 $\pm$ 0,18

Para o músculo peitoral, pode-se observar que a partir da inclusão de 4,5% de FVA (tratamentos T4, T5, T6 e T7) houve distanciamento das elipses de confiança em relação aos eixos do gráfico, já que os mesmos representam o tratamento controle (Figura 1). Houve sobreposição das regiões de confiança para os tratamentos T4, T5 e T6 (inclusões de 4,5; 6,0 e 7,5% de FVA), demonstrando que possivelmente os mesmos não diferiram entre si, reforçando a idéia de que qualquer nível de inclusão situado nesse intervalo possa ser detectado isotopicamente.

No tratamento T2 verificou-se ligeiro deslocamento da região de confiança para o eixo do carbono. Esse comportamento provavelmente denota a baixa eficiência do músculo peitoral de codornas de corte na detecção de inclusões inferiores a 3% de FVA (T3) na dieta.

As diferenças entre médias para $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ (Figuras 1, 2 e 3) dadas pelas matrizes de erro são negativas, fazendo com que as figuras apresentadas nesse estudo estejam situadas no terceiro quadrante. Regiões de confiança que se sobreponham sobre

algum eixo do gráfico possivelmente apresentem alguns valores positivos, não sendo adequadas para a detecção de FVA em diferentes tecidos de codornas de corte.

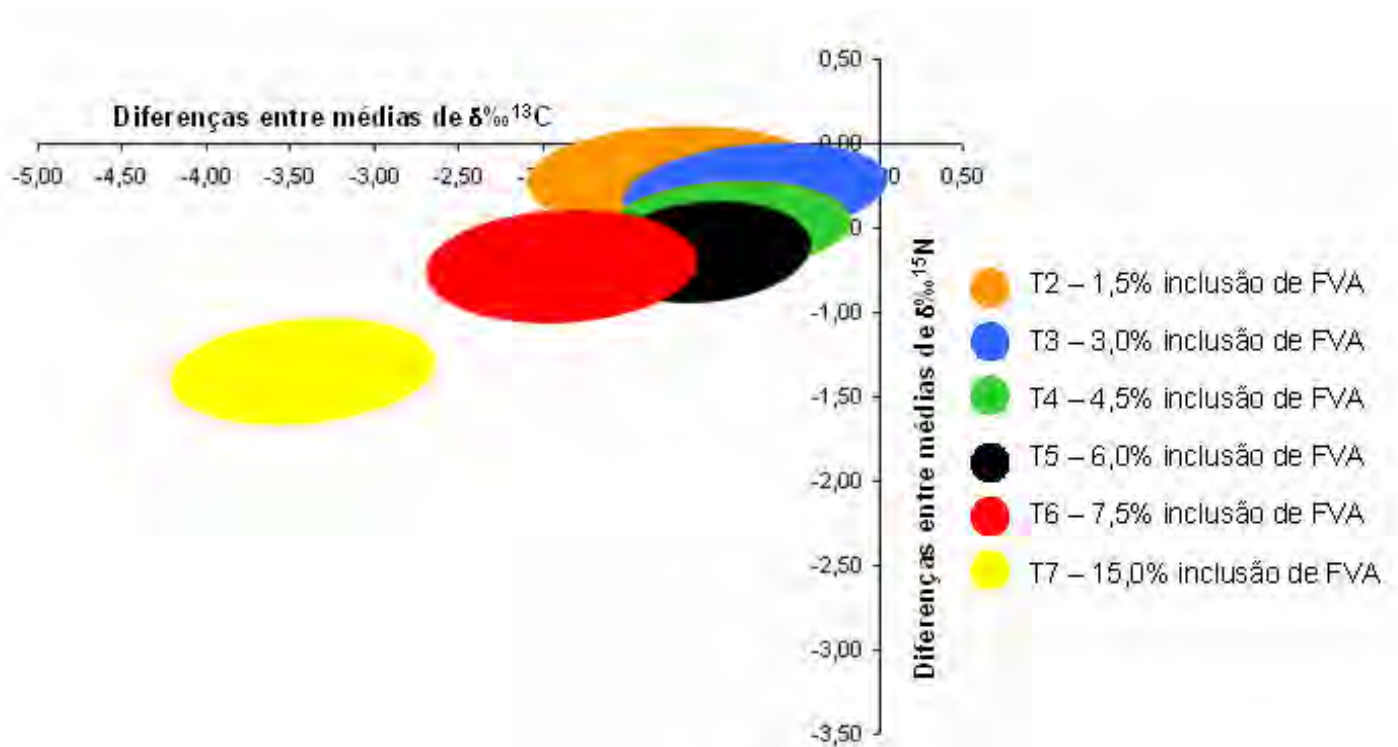


Figura 1 – Regiões de confiança para os valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ do músculo peitoral de codornas de corte aos 42 dias de idade nos tratamentos T2, T3, T4, T5, T6 e T7.

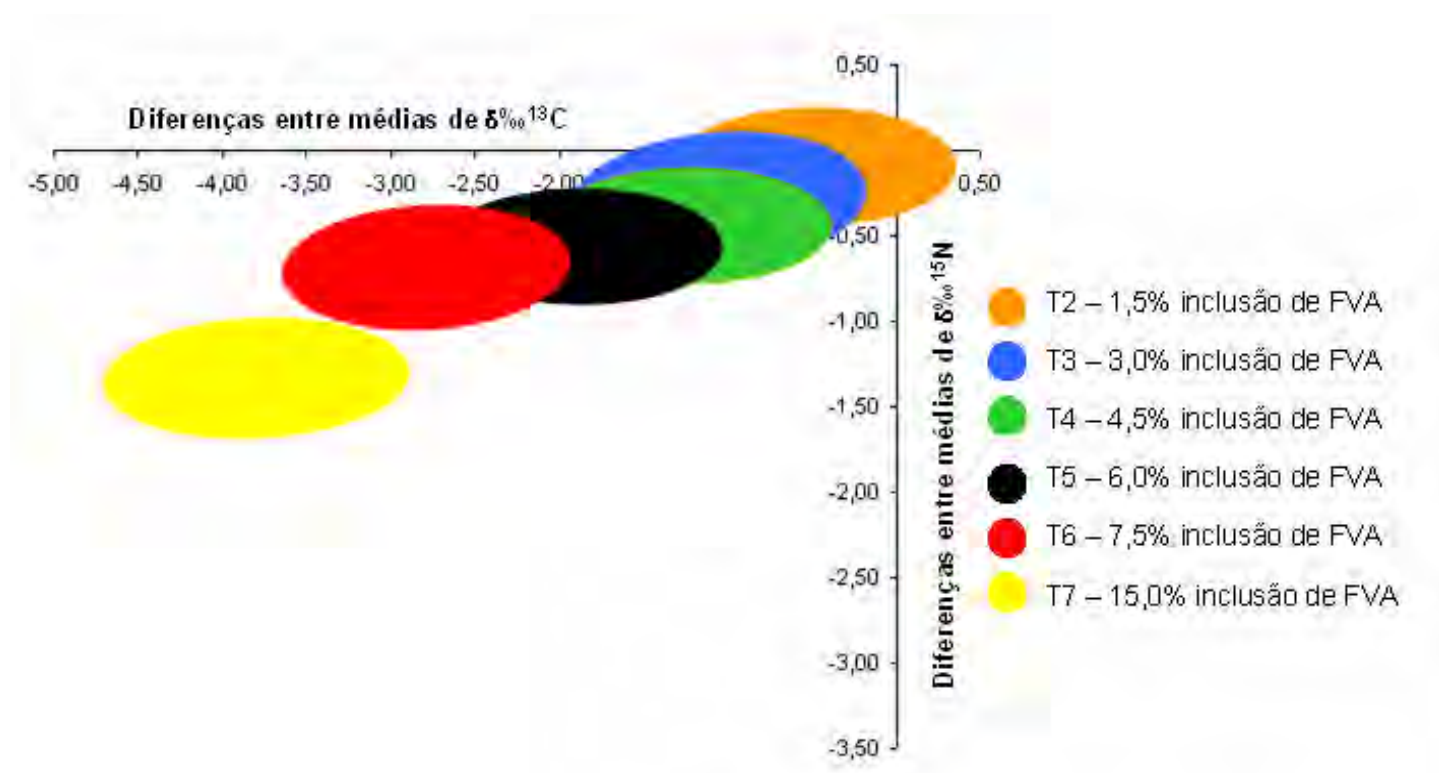


Figura 2 – Regiões de confiança para os valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ de quilha de codornas de corte aos 42 dias de idade nos tratamentos T2, T3, T4, T5, T6 e T7.

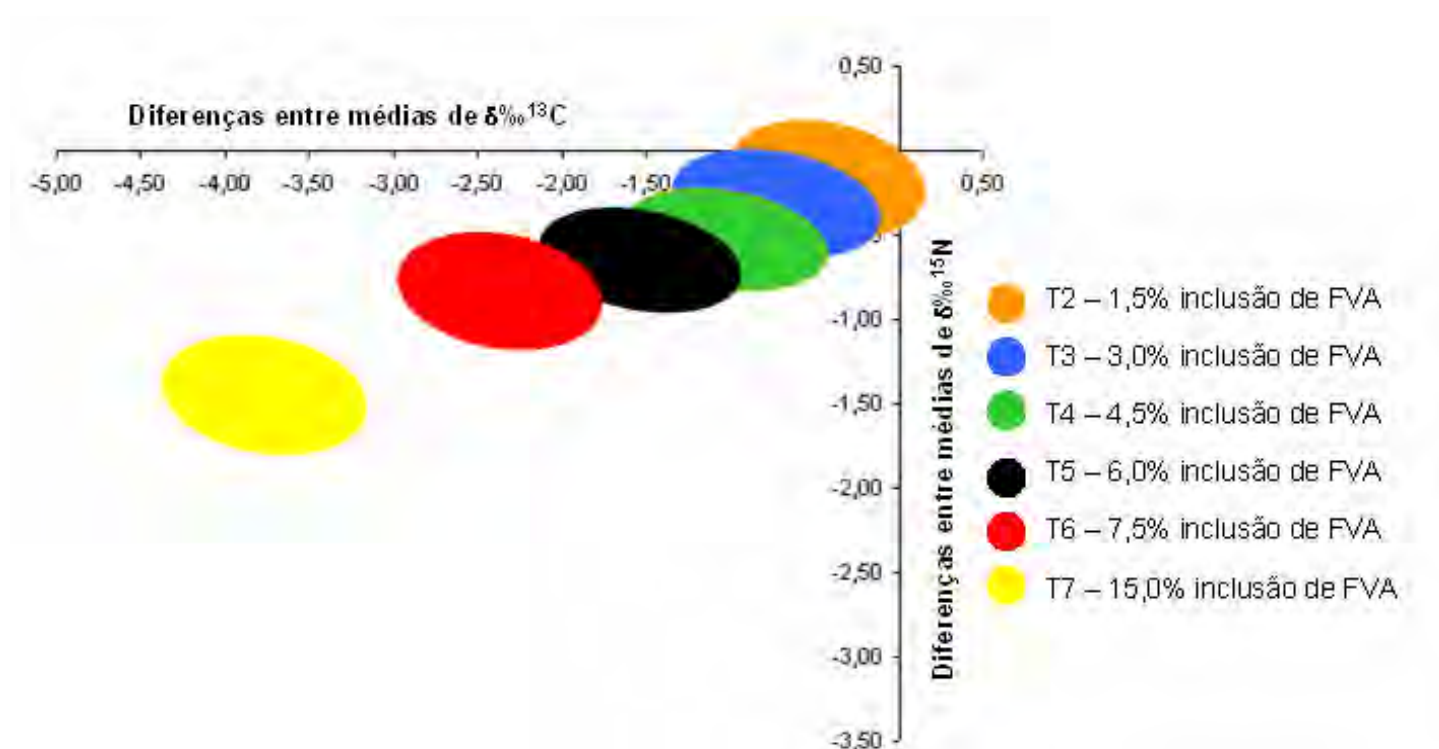


Figura 3 – Regiões de confiança para os valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ de tíbia de codornas de corte aos 42 dias de idade nos tratamentos T2, T3, T4, T5, T6 e T7.

Para a quilha de codornas de corte aos 42 dias de idade, a inclusão de 4,5% de FVA também diferiu do tratamento controle (Figura 2). As regiões de confiança para este tecido mostraram-se mais distintas, contrariamente ao músculo peitoral. As elipses de confiança apresentaram-se mais “achatadas”, apresentando maior amplitude dos pontos gerados pela matriz de erro, situação esta possivelmente definida pelos desvios-padrão maiores observados. Desvios-padrão acima do esperado são comuns para codornas de corte, pois esses animais ainda não sofreram melhoramento genético suficiente.

O nível de detecção de farinha de vísceras de aves para tíbia foi o mesmo encontrado nos tecidos citados anteriormente. Foi possível a detecção de FVA ao nível de inclusão de 4,5%, porém uma provável detecção de farinhas de vísceras de aves em tíbia de codornas de corte adultas pode estar situada um pouco acima da inclusão de 3,0% de FVA. Para este tecido notou-se distanciamento visível e comportamento mais linear entre as elipses. (Figura 3).

Notou-se enriquecimento isotópico tanto em ^{13}C quanto para ^{15}N nos três tecidos estudados em relação às médias do tratamento controle e os tratamentos com inclusões crescentes de FVA. Esse enriquecimento semelhante dos dois isótopos no músculo peitoral, quilha e tíbia de codornas se deu provavelmente, pelo fato dessas aves possuírem altas taxas de metabolismo basal (Hobson & Clark, 1992a), já que essas aves possuem maior atividade e conseqüentemente maior taxa de *turnover*.

Embora o enriquecimento isotópico tenha sido semelhante para os tecidos estudados, a quilha de codornas de corte aos 42 dias de idade apresentou enriquecimento mais acentuado em ^{15}N . Esse fato pode estar relacionado às diferenças nas composições dos tecidos em aminoácidos essenciais e não-essenciais. Segundo Moran Jr. (1999) a maior parte da composição de aminoácidos do músculo peitoral é de

aminoácidos essenciais, quando incorporados nos tecidos, exibem pouca mudança em relação a sua razão isotópica (Pinnegar & Polunin, 1999). No entanto, o colágeno tipo I, que constitui aproximadamente cerca de 95% da matriz óssea orgânica (Pizauro Jr., 2002) e, portanto, maior fonte de nitrogênio do osso, tem maior quantidade de aminoácido não-essenciais em sua composição. Nesse sentido, as dietas constituídas de FVA fornecem maior quantidade de ^{15}N para a síntese endógena de seus aminoácidos não-essenciais, além de poder fornecê-los intactos por meio da proteína da dieta. Alguns autores relatam que as fontes primárias responsáveis pelo fracionamento isotópico de nitrogênio sejam as reações metabólicas envolvidas no processo de desaminação e transaminação de aminoácidos (Gaelber *et al.*, 1996; Minagawa & Wada, 1984).

As variações encontradas entre tecidos não são bem compreendidas. Para Tiezen *et al.* (1983), as principais frações bioquímicas diferem isotopicamente entre si, e as diferenças isotópicas do organismo podem ser o reflexo de suas diferentes composições bioquímicas. Tecidos que possuem em sua composição menor quantidade em lipídeos, provavelmente teriam um valor de $\delta^{13}\text{C}$ maior do que um tecido que apresente maior quantidade em lipídeos, sendo relativamente pobre em carbono-13 (Tiezen *et al.*, 1983; Piasentier *et al.*, 2003).

No presente estudo, o menor nível de inclusão de farinha de vísceras de aves detectado está próximo e é inferior ao utilizado na indústria coturnícula brasileira que varia de 5 a 6% de inclusão de farinhas de origem animal na formulação de dietas. Observando essas informações pode-se concluir que, nessas condições experimentais, a técnica dos isótopos estáveis foi capaz de detectar a inclusão de farinha de vísceras de aves no músculo peitoral, quilha e tíbia de codornas de corte aos 42 dias de idade.

Referências Bibliográficas

Antunes R. Da granja à mesa. Avicultura Industrial 24, 2003.

Bertolini M., Bevilacqua M., Massini R. FMECA approach to product traceability in the food industry. Food Control 2006; 17: 137-145.

Boutton TW, Tyrrell HF, Patterson BW. Carbon kinetics of milk formation in Holstein cows in late lactation. Journal of Animal Science 1988; 66: 2636-2645.

Bricout J, Koziat J. Control of authenticity of orange juice by isotopic analysis. Journal of agricultural Food Chemistry 1987; 35:758-760.

Carrijo AS, Pezzato AC, Ducatti, C. Avaliação do metabolismo nutricional em poedeiras pela técnica dos isótopos estáveis do carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$). Revista Brasileira de Ciência Avícola 2000; 3: 209-218.

Carrijo AS, Pezzato AC, Ducatti C, Sartori JR, Trinca L, Silva ET. Traceability of Bovine Meat Bone Meal in Poultry by Stable Isotope Analysis. Revista Brasileira de Ciência Avícola 2006; 8: 37-42.

Cruz VC. Livre escolha de alimentos dos ciclos fotossintéticos C_3 e C_4 , fracionamento e turnover dos isótopos estáveis do carbono nos tecidos de frangos de corte. [Dissertação]. Botucatu (SP): Universidade Estadual Paulista; 2002.

DeNiro MJ, Epstein S. You are what you eat (plus a few) the carbon isotope cycle in food chains. Geological Society of America 1976; 6:834.

DeNiro MJ, Epstein S. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. Geochimica et Cosmochimica Acta 1978; 42:495-506.

Domi N, Bouquegneau K, Das K. Feeding ecology of five commercial shark species of the Celtic Sea through stable isotope and trace metal analysis. *Marine Environmental Research* 2005; 60:551-569.

Ducatti C. Isótopos estáveis ambientais. [Apostila]. Botucatu (SP): Universidade Estadual Paulista; 2004; 183 p.

Gaelber OH, Vitt TG, Vukmirovich R. Isotope effects in metabolism in ^{15}N and ^{14}N from unlabeled dietary. *Journal Biochemistry* 1966; 44:1249-1257.

Hobson KA, Clark RG. Assessing avian diets using stable isotopes I: Turnover of ^{13}C in tissues. *The Condor* 1992a; 94:181-188.

Hobson, K.A., Clark, R.G. Assessing avian diets using stable isotopes II: Factors influencing diet-tissue fractionation. *The Condor*, 1992b. 94:189-197.

Ilbery B, Kneafsey M, Bamford M. Protecting and promoting regional specialty food and drink products in the European Union. *Outlook on Agriculture* 2000; 29:31-37.

Jones R, Ludlow M, Troughton J. Estimation of the proportion of C_3 and C_4 plant species in diet of animals from the ratio of natural ^{12}C and ^{13}C isotopes in the faeces. *Journal of Agricultural Science* 1979; 92: 91-100.

Licatti F. Isótopos estáveis do carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) em plantas do ciclo bioquímico C_3 e C_4 . [Monografia]. Botucatu (SP). Universidade Estadual Paulista; 1997.

Manca G, Camin F, Coloru G, Del Caro A, Detentori D, Franco MA, Versini G. Characterization of the geographical origin of *Pecorino Sardo* cheese by casein stable isotope ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) ration and free amino acid ratios. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2001; 49: 1404-1409.

Martin GJ, Guillou C, Martin ML, Cabanis MT, Tep X, Aerny J. Natural factors of isotope fractionation and the characterization of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1988; 36: 316-322.

Metges C, Kempe K, Schmidt HL. Dependence of the carbon isotope contents of breath carbon dioxide, milk, serum and rumen fermentation products on the $\delta^{13}\text{C}$ value of food in dairy cows. *British Journal of Nutrition* 1990; 63: 187-196.

Minagawa M, Wada E. Stepwise enrichment of ^{15}N along food chains: Further evidence and relation between ^{15}N and animal age. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 1984; 48:1135-1140.

Moran Jr. ET. Live production factors influencing yield and quality of poultry meat. In: Richardson, R.I., Mead, G.C., editors. *Poultry Meat Science*. Wallingford (OX): CABI Publishing; 1999, p.175-195.

Oliveira RP. Rastreabilidade da Farinha de Vísceras de aves na alimentação de frangos de corte pela técnica dos isótopos estáveis ($\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$). [Tese]. Botucatu (SP): Universidade Estadual Paulista, 2005.

Piasentier E, Valusso R, Camin F, Versini G. Stable isotope ratio analysis for authentication of lamb meat. *Meat Science* 2003; 64: 239-247.

Pinnegar JK, Polunin VC. Differential fractionation of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ among fish tissue: Implications for the study of trophic interactions. *Functional Ecology* 1999; 13: 225-231.

Piola RF, Moore SK, Suthers IM. Carbon and nitrogen stable isotope analysis of three types of oyster tissue in an impacted estuary. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 2005, 1-12.

Pizauro Jr. JM. Estrutura e função do tecido ósseo. Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte. In: Macari, M. editor. *Fisiologia Aviária Aplicada à Frangos de Corte*. Jaboticabal: FUNEP-UNESP; 2002. p. 375.

Queiroz CE. Utilização dos isótopos estáveis de carbono e nitrogênio na detecção de adulteração e avaliação energética de bebidas de laranja. [Tese]. Botucatu (SP): Universidade Estadual Paulista, 2005.

Rossmann A, Haberhauer G, Holz S, Horn P, Pichlmayer F, Voerkelius S. The potential of multielement stable isotope analysis for regional origin assignment of butter. *European Food Research & Technology* 2000; 211:32-40.

Sleiman M. Determinação do percentual de malte e cevada em cervejas tipo pilsen utilizando os isótopos estáveis de carbono e nitrogênio na detecção de adulteração e avaliação energética de bebidas de laranja. [Tese]. Botucatu (SP): Universidade Estadual Paulista, 2006.

SAS Institute Inc. SAS/STATTM. SAS user's guide for windows environment. 8.0 ed. Cary (NC): SAS Institute Inc.; 1999.

Schroeder GL. Stable isotope ratios as naturally occurring tracers in the aquaculture food web *Aquaculture* 1983; 203-210.

Silva JJ. Determinação da fase lactente – ruminante em cordeiros pelas técnicas do

$\delta^{13}\text{C}$ e micro –histologia fecal. [Dissertação]. Botucatu (SP) Universidade Estadual Paulista; 2003.

Tieszen LL, Boutton TW, Tesdahl KG, Slade NA. Fractionation and turnover of stable carbon isotopes in animal tissues: implications for $\delta^{13}\text{C}$ analysis of diet. *Oecologia* 1983; 57:32-37.

Tieszen LL. Carbon isotope fractionation in biological material *Nature* 1978; 276:97-98.

Tyrrel HF; Pelletier G, Chevalier R, Hillaire-Marcell C, Gagnon M. Use of carbon 13 as tracer in metabolism studies. *Canadian Journal of Animal Science* 1984, 129 (.suppl): 127-129.

Zhao L, Schell DM, Castellini MA. Dietary macronutrients influence ^{13}C e ^{15}N signatures of pinnipeds: Captive feeding studies with harbor seals (*Phoca vitulina*) Part A. *Comparative Biochemistry and Physiology* 2006; 143:469-478.

Zuanon JAS, Pezzato AC, Pezzato LE, Passos JRS, Barros MM, Ducatti C. Muscle $\delta^{13}\text{C}$ change in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) Effects of growth and carbon turnover Part B. *Comparative Biochemistry and Physiology* 2006; 145: 101-107.

Rastreabilidade de Subprodutos de Origem Animal em Tecidos de Codornas de Corte pela Técnica dos Isótopos Estáveis de Carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) e Nitrogênio ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$)

Resumo: Informações consistentes sobre a qualidade dos produtos cárneos consumidos pela população são imprescindíveis. A técnica dos isótopos estáveis pode ser grande aliada para o resgate da confiança dos consumidores, já que existe a possibilidade de detecção de subprodutos de origem animal em tecidos de aves, especialmente em codornas. O estudo teve como objetivo verificar a presença de misturas de subprodutos avícolas na dieta de codornas de corte, utilizando a técnica dos isótopos estáveis de carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) e nitrogênio ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) no músculo peitoral, quilha e tíbia desses animais. Foram utilizadas 64 codornas de corte macho de um dia de idade advindas de granja comercial. As aves foram alojadas de um a 42 dias de idade em um galpão experimental, divididas em oito grupos distintos distribuídos aleatoriamente em relação às dietas experimentais que continham farinha de vísceras de aves (FVA), farinha de carne e ossos bovina (FCO) e farinha de penas de aves (FPA) somente e suas possíveis misturas. Quatro aves de cada tratamento foram abatidas aos 42 dias de idade para colheita do músculo peitoral (*Pectoralis major*), quilha e tíbia para posterior análise. Foi detectada a inclusão dos diferentes subprodutos utilizados nas dietas de codornas de corte por meio da análise de ^{13}C e ^{15}N possibilitando a certificação da carne das mesmas pela utilização da técnica já mencionada, uma vez que o nível mínimo mensurado foi de 3,16%.

Unitermos: certificação, codornas, isótopos estáveis, subprodutos de origem animal.

Animal Origin By-Products Mixtures Traceability in Tissues Quail by Carbon ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) and Nitrogen ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) Stable Isotopes Technique

Abstract – Consistent information about meat products quality consumed by people are essential. Stable isotopes technique can be an important tool to conquer consumers' confidence since through it the possibility of animal origin by-product detection exists, especially in quails. This study aimed to verify the presence of animal origin by-products in meat quail diets using carbon ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) and nitrogen ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) stable isotopes in the chest muscle, keel and tibia of those birds. Sixty-four male meat quail aging one day originally from a commercial producer were divided in eight groups in a randomized distribution. Those groups received different diets containing only poultry visceral meal (FVA), bovine bone and meat meal (FCO) and feather meal (FPA) and its possible combinations. Four individuals per treatment were sacrificed at the 42nd day for breast muscle (*Pectoralis major*), keel and tibia for later analysis. The inclusion of those by-products was detected through ^{13}C and ^{15}N analysis making possible quail meat certification using this technique.

Key-words: certification, quail, stable isotopes, animal origin by-products.

Introdução

O marco principal para mudanças relativas ao conhecimento da alimentação dos animais destinados ao consumo humano foi o surgimento da Encefalopatia Espongiforme Bovina ou “mal da vaca louca” nos EUA, Comunidade Européia, Japão e Canadá. Consumidores desses países adquiriram nova postura de consumo, que está baseada na necessidade de terem a sua disposição proteínas de origem animal que apresentem qualidade superior, ou melhor, produto de segurança sanitária comprovada.

De acordo com Peupert (2003) qualidade e segurança são fatores influenciados por toda a cadeia de alimentos. Atualmente, a melhoria no processo de rastreabilidade nos produtos agropecuários é elemento fundamental na gestão de sistemas de qualidade do setor alimentício. Essas tendências podem ser observadas em muitos setores do agronegócio, porém mais visível no setor de carnes, onde incidentes relativos à zoonoses diminuíram a confiança dos consumidores na qualidade e segurança dos alimentos.

A sobrevivência e o sucesso das empresas num mercado globalizado competitivo e exigente estão na dependência da escolha voluntária na utilização de mecanismos ou técnicas que propiciem pleno êxito de seus programas de rastreabilidade, evitando possíveis sanções por parte dos importadores, principalmente europeus.

A legislação européia em seu regulamento CE nº 1774/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho da União Européia, Texto Consolidado (Consleg, 2004), capítulo 1, artigo 22º, afirma que fica proibida a alimentação de uma espécie animal com proteínas animais transformadas, derivadas dos corpos, ou partes de corpos, de animais da mesma espécie.

Sob esse cenário, pesquisadores vêm aprimorando tecnologias que possam detectar alimentos derivados de tecidos animais. Algumas dessas tecnologias podem fazer inferências definitivas concernentes ao histórico desses alimentos, enquanto outras podem ser usadas para confirmar a presença de componentes específicos (Schwägele, 2005). Uma das técnicas que tem trazido bons resultados, mostrando-se efetiva na detecção de fraudes na cadeia alimentícia é a técnica dos isótopos estáveis de carbono-13 e nitrogênio-15.

A técnica 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 apresentando-se como alternativa viável para estudos relacionados à digestão, absorção e metabolismo de nutrientes em humanos e animais, assim como na identificação e procedência de produtos de origem vegetal e animal (Gannes *et al.*, 1998).

A razão isotópica do elemento químico carbono tem sido usada como sucesso para testar a autenticidade, a qualidade e a origem geográfica de vários produtos tais como sucos de frutas (Bricout & Koziat, 1987; Koziat *et al.*, 1993), vinhos (Martin *et al.*, 1988), méis (Brookes *et al.*, 1991; Reniero *et al.*, 1997; White *et al.*, 1998), produtos lácteos (Rossmann *et al.*, 1998; Rossmann *et al.*, 2000; Manca *et al.*, 2001), óleos vegetais (Kelly *et al.*, 1997) e a caracterização e diferenciação de suínos Ibéricos, possibilitando a classificação dos animais de acordo com o tipo de alimentação recebida durante o período de engorda (González-Martin *et al.*, 1999).

A razão isotópica do elemento químico nitrogênio ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$), permitiu a certificação da origem geográfica e tipos de alimentação de ovinos (Piasentier *et al.*, 2003), como também na ecologia alimentar de tubarões (Domi *et al.*, 2005), em criações

de ostras em áreas impactadas (Piola *et al.*, 2005) e estudos alimentares com focas em cativeiro (Zhao *et al.*, 2006).

De acordo com Oliveira (2005), a técnica dos isótopos estáveis de carbono e nitrogênio pode ser utilizada como ferramenta para rastrear a inclusão de subprodutos de origem animal em dietas de frangos de corte por meio da análise da razão isotópica do músculo peitoral, quilha e tíbia.

Na intenção de aprimorar a técnica e disponibilizar mais informações concernentes a outras espécies, o presente estudo teve por objetivo detectar a inclusão de farinha de vísceras de aves (FVA), farinha de carne e ossos bovina (FCO) e farinha de penas de aves (FPA) e/ou suas possíveis misturas no músculo peitoral, quilha e tíbia de codornas de corte aos 42 dias de idade pela técnica dos isótopos estáveis de carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) e nitrogênio ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$).

Material e Métodos

O experimento foi realizado nas instalações do setor de Avicultura, localizado na Fazenda Experimental Edgárdia, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, *campus* de Botucatu.

Foram utilizadas 64 codornas de corte macho de um dia de idade advindas de granja comercial. As aves foram alojadas de um a 42 dias de idade em galpão de criação medindo 15 m de comprimento por 4 m de largura, coberto com telhas de cimento amianto e provido de cortinas plásticas em suas laterais. Foram alojadas oito aves por gaiola medindo 100 cm x 80 cm x 35 cm, utilizadas na criação de pintainhas de postura. Cada gaiola teve seu piso revestido com folhas de jornal e sobre este foi colocada tela plástica preta de malha de um centímetro para evitar fuga das aves e possíveis traumatismos nas pernas das mesmas. O piso abaixo de cada gaiola foi coberto com 5 cm de maravalha para absorção dos dejetos das codornas. Cada gaiola possuía em sua parte superior uma campânula elétrica com lâmpada infravermelha de 250 watts de potência para aquecimento das aves até os 16 dias de idade. Foi utilizado um bebedouro tipo copo de pressão infantil por gaiola com capacidade de 0,5 litros cuja água era trocada duas vezes ao dia. Aos 14 dias os bebedouros tipo copo de pressão infantil foram substituídos pelo bebedouro tipo calha instalado na parte posterior das gaiolas.

Nos primeiros sete dias as codorninhas foram alimentadas em comedouro tipo bandeja, sobre a qual se colocou tela plástica com malha de 1 cm, tendo como objetivo a redução do desperdício de ração. A partir do 10º dia, a ração foi fornecida através de comedouros lineares situados frontalmente à gaiola. Durante o período experimental as aves receberam ração e água *ad libitum*.

O programa de luz adotado foi de 24 horas diárias até a terceira semana de vida das aves, utilizando lâmpadas incandescentes de 100 watts. Após esse período as codornas receberam somente iluminação natural.

Os tratamentos experimentais estão identificados na Tabela 1. As aves foram submetidas às dietas experimentais durante todo o período de criação (um a 42 dias de idade). As rações foram formuladas de modo a atender as exigências nutricionais das aves. Optou-se por seguir o mesmo plano nutricional de uma empresa comercial de um a 21 dias (ração inicial) e de 22 a 42 dias de idade (ração final). Os níveis nutricionais de ambas as dietas foram isoenergéticos, isoprotéicos, isofosfóricos e isoaminoácídicos para metionina. As inclusões de subprodutos de origem animal nas dietas experimentais foram baseadas na inclusão máxima de farinha de carne e ossos bovina (FCO), já que esse ingrediente possui alto teor de fósforo, limitando sua livre utilização. A partir do limite máximo de FCO, pode-se observar a contribuição de 2,61% em proteína bruta desse ingrediente na dieta e fixá-la para as demais rações que continham somente adição de um subproduto de origem animal e suas possíveis misturas.

Tabela 1. Identificação dos tratamentos experimentais.

Tratamentos	Identificação dos tratamentos
R1	Dieta à base de milho e farelo de soja*
R2	Dieta com inclusão de FVA
R3	Dieta com inclusão de FCO
R4	Dieta com inclusão de FVA + FPA
R5	Dieta com inclusão de FVA+FPA+FCO
R6	Dieta com inclusão de FVA+FCO
R7	Dieta com inclusão de FCO+FPA
R8	Dieta com inclusão de FPA

*Tratamento controle

Nas Tabelas 2 e 3 são encontradas as composições percentuais, níveis nutricionais calculados e valores isotópicos médios das rações utilizadas. Cada ingrediente usado na confecção da ração foi proveniente do mesmo lote. Os subprodutos de origem animal

utilizados neste experimento foram recebidos como doação da empresa Frangoeste® localizada no município de Tietê/SP. Na tabela 2 são apresentados os valores em percentagem de matéria seca (MS%), proteína bruta (PB%), extrato etéreo (EE%), matéria mineral (MM%) e valores isotópicos médios do milho, farelo de soja, farinha de vísceras de aves, farinha de penas e farinha de carne e ossos bovina.

Tabela 2. Análise bromatológica e valores isotópicos médios do milho, farelo de soja (FS), farinha de vísceras de aves (FVA), farinha de penas de aves (FPA) e farinha de carne e ossos bovina (FCO).

Ingredientes	MS%	PB%	EE%	MM%	Valores isotópicos médios	
					$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$
Milho	87,11	8,26	3,61	1,27	-13,07	3,57
FS	92,10	41,00	1,00	4,00	-26,58	0,43
FVA	96,14	65,54	12,47	14,49	-16,28	4,30
FPA	93,26	88,18	7,92	2,25	-16,98	4,44
FCO	93,75	45,75	8,43	48,17	12,82	7,43

Tabela 3. Composição percentual dos ingredientes, níveis nutricionais calculados e valores isotópicos médios para as dietas experimentais iniciais (um a 21 dias de idade)

Ingredientes (%)	Dietas experimentais							
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
Milho moído	44,81	48,42	48,10	49,87	50,58	48,28	48,60	49,14
Farelo de soja	48,60	43,05	43,08	40,58	39,48	43,07	42,51	41,73
Farinha de vísceras de aves	-	3,83	-	2,51	1,60	1,91	-	-
Farinha penas de aves	-	-	-	2,10	2,40	-	1,58	3,16
Farinha carne e ossos bovina	-	-	5,50	-	1,38	2,75	2,75	-
Óleo de soja,	2,93	1,69	2,01	1,69	1,58	1,84	2,10	2,24
Calcário calcítico	1,03	0,98	0,45	1,02	0,90	0,70	0,74	1,09
Fosfato bicálcico	1,79	1,24	0,05	1,42	1,10	0,65	0,91	1,72
DL – Metionina	0,05	0,04	0,06	0,05	0,06	0,05	0,06	0,07
L – Lisina	-	-	-	-	0,16	-	-	0,10
Caulim	-	-	-	-	-	-	-	-
Sal comum	0,39	0,35	0,35	0,36	0,36	0,35	0,35	0,35
Suplemento vitamínico e mineral ¹	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
Total	100	100	100	100	100	100	100	100
Níveis Nutricionais Calculados								
Energia metabolizável (kcal/kg)	2900	2900	2900	2900	2900	2900	2900	2900
Proteína bruta (%)	26,00	26,00	26,00	26,00	26,00	26,00	26,00	26,00
Fibra bruta (%)	3,94	3,70	3,72	3,57	3,56	3,71	3,67	3,60
Cálcio (%)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Fósforo disponível (%)	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45
Metionina (%)	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44
Metionina + Cistina (%)	0,86	0,86	0,85	0,90	0,90	0,85	0,88	0,92
Lisina (%)	1,50	1,47	1,44	1,40	1,49	1,46	1,41	1,44
Valores Isotópicos Médios ²								
$\delta^{13}\text{C}$	-21,11	-20,07	-19,53	-19,54	-19,56	-19,59	-19,76	-19,72
$\delta^{15}\text{N}$	0,73	1,23	1,46	1,41	1,58	1,40	1,38	1,26

¹Composição dos Suplementos Vitamínico e Mineral Nutron®/kg de ração.-Ácido fólico 200 mg; Ácido Pantotênico 3.120 mg; Colina 75.500 mg; Biotina 10.000 mcg; Niacina 8.400 mg; Vit. A 1.680 UI; Vit. B1 436,50 mg; Vit. B12 2.400 mcg; Vit B2 1.200 mg; Vit. B6 624 mg; Vit. D3 400.000 UI; Vit. E 3.500 mg; Vit. K3 360 mg; Cu 2.000 ppm; Fe.12.500 ppm; I. 187,50 ppm; Mn.18.750 ppm; Zn. 17.500 ppm; Se 75,00 ppm

²Valores Isotópicos Médios expressos em $\delta^{13}\text{C}$ relativos ao padrão *Peedee Belemnite (PDB)* e $\delta^{15}\text{N}$ relativos ao padrão N_2 atmosférico.

Tabela 4. Composição percentual dos ingredientes, níveis nutricionais calculados e valores isotópicos médios para as dietas experimentais finais (22 a 42 dias de idade)

Ingredientes (%)	Dietas experimentais							
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
Milho moído	50,42	54,45	54,23	54,23	53,94	53,25	54,30	54,30
Farelo de soja	40,91	35,30	35,23	34,74	34,05	35,50	34,67	34,06
Farinha de vísceras de aves	-	3,83	-	2,51	1,60	1,91	-	-
Farinha penas de aves	-	-	-	2,10	2,40	-	1,58	3,16
Farinha carne e ossos bovina	-	-	5,50	-	1,38	2,75	2,75	-
Óleo de soja	4,99	3,61	3,90	4,06	4,04	4,13	4,14	4,41
Calcário calcítico	0,90	0,84	0,27	0,88	0,62	0,58	0,62	0,98
Fosfato bicálcico	1,67	1,14	-	1,40	0,59	0,56	0,80	1,60
DL – Metionina	0,10	0,09	0,11	0,10	0,11	0,10	0,11	0,12
L – Lisina	-	-	0,03	0,05	0,05	-	0,07	0,12
Caulim	0,26	-	-	0,30	0,47	0,47	0,21	0,50
Sal comum	0,35	0,34	0,33	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35
Suplemento vitamínico e mineral ¹	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
Total	100	100	100	100	100	100	100	100
Níveis Nutricionais Calculados								
Energia metabolizável (kcal/kg)	3100	3100	3100	3100	3100	3100	3100	3100
Proteína bruta (%)	23,00	23,00	23,00	23,00	23,00	23,00	23,00	23,00
Fibra bruta (%)	3,54	3,30	3,32	3,25	3,24	3,31	3,26	3,20
Cálcio (%)	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90
Fósforo disponível (%)	0,42	0,42	0,43	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42
Metionina (%)	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45
Metionina + Cistina (%)	0,82	0,83	0,81	0,85	0,84	0,82	0,85	0,89
Lisina (%)	1,29	1,26	1,26	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25
Valores Isotópicos Médios ²								
$\delta^{13}\text{C}$	-20,25	-19,03	-19,04	-18,82	-18,79	-19,27	-18,96	-19,23
$\delta^{15}\text{N}$	0,96	1,42	1,80	1,86	1,95	1,53	1,63	1,59

¹Composição dos Suplementos Vitamínico e Mineral Nutron®/ kg de ração. Ácido fólico 162,50 mg; Ácido Pantotênico 2.600 mg; Colina 65.250; Niacina 7.000 mg; Se 75,00 ppm; Vit. A 1.400 UI; Vit. B1 388,00 mg; Vit. B12 2.000 mcg; Vit B2 1.000 mg; Vit. B6 520 mg; Vit. D3 300.000 UI; Vit. E 2.500 mg; Vit. K3 300 mg; Cu 2.000 ppm; Fe.12.500 ppm; I. 187,50 ppm; Mn.18.750 ppm; Zn. 17.500 ppm.

²Valores Isotópicos Médios expressos em $\delta^{13}\text{C}$ relativos ao padrão *Peedee Belemnite (PDB)* e $\delta^{15}\text{N}$ relativos ao padrão N_2 atmosférico.

No 42º dia de experimento, foram retiradas aleatoriamente quatro aves por tratamento (n = 4) e sacrificadas por meio de deslocamento cervical para colheita de amostras do músculo peitoral (*Pectoralis major*), quilha e tíbia para realização das análises isotópicas.

As amostras de músculo peitoral foram colhidas retirando-se uma fatia de aproximadamente 20 g no sentido transversal do terço médio longitudinal do *Pectoralis major* direito. Para obtenção das amostras de quilha, o prolongamento cartilaginoso do esterno foi dissecado e teve sua inserção com o osso aparada por um corte transversal formando um ângulo reto com a sua superfície dorsal. As amostras ósseas foram obtidas coletando-se o terço médio longitudinal da tíbia direita, as quais tiveram o conteúdo medular retirado por meio de lavagem com água destilada. Todas as amostras dos diferentes tecidos foram devidamente identificadas e congeladas à – 20°C.

No momento da execução das análises, as amostras de tecidos foram descongeladas, lavadas em água destilada, colocadas em placas de Petri e secas em estufa de ventilação forçada (Marconi – modelo MA 035) a 55°C por um período de 48 horas. Depois de secas, todas as amostras foram moídas em moinho criogênico (Spex – modelo 6700 *freezer/mill*) à – 196°C em frequência máxima durante três minutos, no intuito de obter um material homogêneo de finíssima granulometria, com aspecto de talco (Licatti, 1997; Ducatti, 2004). As rações foram moídas seguindo os procedimentos citados acima, porém o tempo de moagem foi de aproximadamente dez minutos.

As análises isotópicas dos ingredientes, rações e tecidos foram realizadas no Centro de Isótopos Estáveis Ambientais do Instituto de Biociências (CIE/IB), UNESP, campus de Botucatu. Para determinação das razões isotópicas de carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) e nitrogênio ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) foi utilizado o espectrômetro de massas de razão isotópica (IRMS)

tipo DELTA – S (Finnigan Mat) acoplado ao Analisador Elemental (EA 1108 CHN), de acordo com método descrito por Ducatti (2004). Para todas as amostras, ambas as análises para os elementos carbono e nitrogênio foram feitas em duplicata separadamente.

Os resultados das análises foram expressos em *delta per mil* da razão isotópica da amostra em relação aos padrões internacionais *Peedee Belemnite* (PDB) e nitrogênio atmosférico (N₂), para os elementos carbono e nitrogênio, respectivamente, de acordo com a expressão:

$$\delta\text{‰}_{\text{(amostra, padrão)}} = [(R_{\text{amostra}} - R_{\text{padrão}}) / R_{\text{padrão}}] \times 10^3$$

Onde R representa a razão entre o isótopo mais pesado e o mais leve, em particular ¹³C/¹²C e ¹⁵N/¹⁴N, da amostra e do padrão.

Os resultados isotópicos obtidos foram submetidos à análise multivariada de variância (MANOVA) e com auxílio do procedimento GLM (General Linear Model) do programa estatístico SAS (1999), foram gerados dados pelas matrizes de erros para cada tecido, e posteriormente distribuídos graficamente em regiões (elipses) com 95% de confiança para observar possíveis diferenças entre médias dos tratamentos experimentais e as médias do tratamento controle.

Este programa permite verificar se os valores do par isotópico (δ¹³C e δ¹⁵N) do tratamento controle (ração vegetal), diferem estatisticamente dos valores do par isotópico do tratamento com inclusão de proteínas de origem animal.

Resultados e Discussão

Os valores isotópicos médios de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ obtidos para os diferentes tecidos de codornas de corte aos 42 dias de idade, submetidas às dietas contendo diferentes fontes protéicas são apresentados na Tabela 4.

Tabela 5. Valores isotópicos médios de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ com seus respectivos desvios-padrão no músculo peitoral, quilha e tibia de codornas aos 42 dias de idade para as diferentes fontes protéicas.

Tratamentos	Tecido amostrado					
	Músculo peitoral		Quilha		Tibia	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$
R1	-21,70 ± 0,25	2,53 ± 0,07	-19,35 ± 0,21	3,57 ± 0,22	-18,61 ± 0,06	2,71 ± 0,07
R2	-20,74 ± 0,20	2,97 ± 0,10	-18,36 ± 0,21	3,91 ± 0,01	-17,42 ± 0,29	3,30 ± 0,06
R3	-20,78 ± 0,29	3,01 ± 0,12	-18,65 ± 0,20	3,99 ± 0,00	-17,04 ± 0,15	3,40 ± 0,15
R4	-20,58 ± 0,10	3,00 ± 0,17	-18,50 ± 0,10	4,05 ± 0,14	-17,73 ± 0,15	4,06 ± 0,13
R5	-20,65 ± 0,18	2,92 ± 0,15	-18,14 ± 0,20	3,88 ± 0,05	-17,58 ± 0,19	4,03 ± 0,15
R6	-20,62 ± 0,18	2,92 ± 0,06	-18,11 ± 0,23	3,95 ± 0,14	-17,86 ± 0,18	3,93 ± 0,10
R7	-20,84 ± 0,33	2,99 ± 0,15	-18,04 ± 0,19	4,10 ± 0,15	-17,78 ± 0,13	4,05 ± 0,07
R8	-20,54 ± 0,09	2,94 ± 0,15	-17,98 ± 0,13	3,91 ± 0,15	-17,38 ± 0,25	3,78 ± 0,05

Pode-se observar que as aves alimentadas com dieta contendo fonte protéica à base de milho e farelo de soja (tratamento R1) apresentaram valores mais negativos em todo os tecidos, apresentando mais ^{13}C em relação aos demais tratamentos. Este comportamento é semelhante ao obtidos por Móri (dados não publicados) que observou enriquecimento relativo de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ em codornas de corte adultas alimentadas com dietas compostas por farinha de vísceras de aves.

As variações na participação percentual dos ingredientes na composição das rações são diretamente responsáveis pelo enriquecimento isotópico do carbono-13 e nitrogênio-15. A partir dessa observação, a análise dos ingredientes e da ração produzida torna-se importante no processo de certificação de produtos cárneos, pois segundo DeNiro & Epstein (1978) a composição isotópica dos tecidos animais é reflexo da composição da dieta consumida pelos mesmos.

Nas Figuras 1, 2 e 3 são apresentadas regiões de confiança (elipses) para verificação das diferenças entre as médias dos pares isotópicos de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ dos tratamentos R2, R3 e R8 no músculo peitoral, quilha e tibia de codornas de corte aos 42 dias de idade, comparadas ao tratamento controle (dieta à base de milho e farelo de soja). Para todos os tecidos foi observado enriquecimento de ^{13}C e ^{15}N , pois as elipses de confiança não se aproximaram de nenhum dos eixos do gráfico que são considerados como tratamento controle.

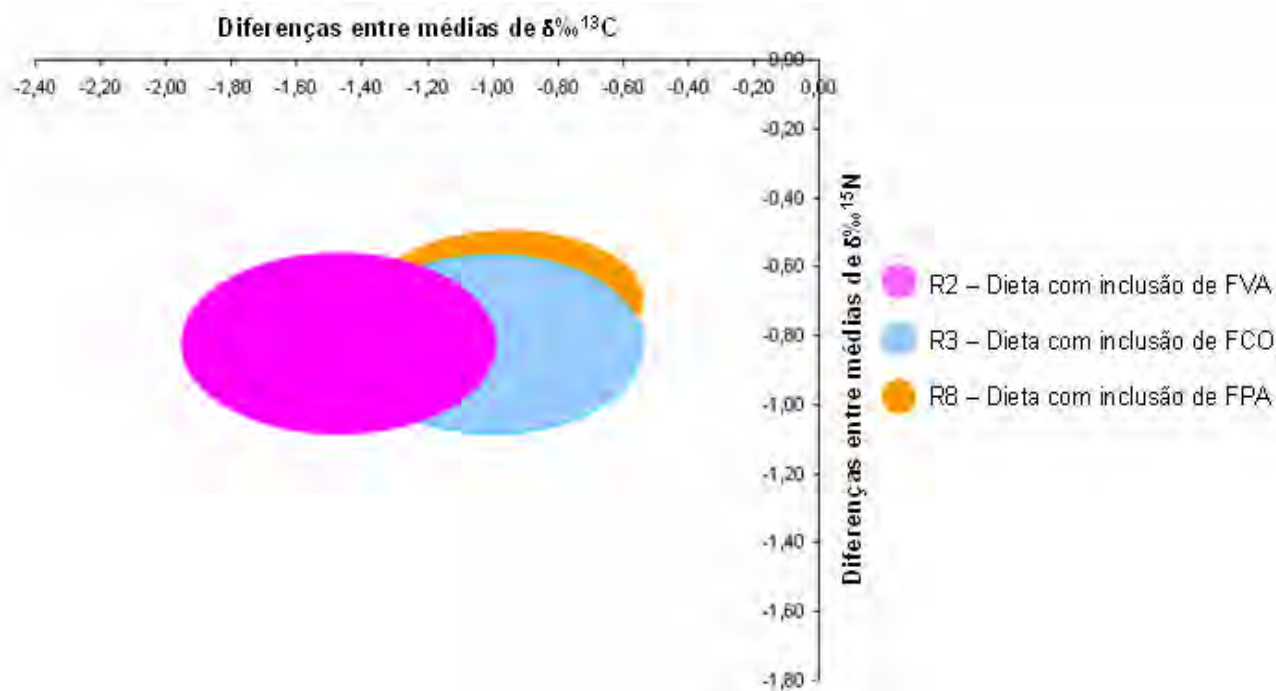


Figura 1 – Regiões de confiança para os valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ do músculo peitoral de codornas de corte aos 42 dias de idade nos tratamentos R2, R3 e R8.

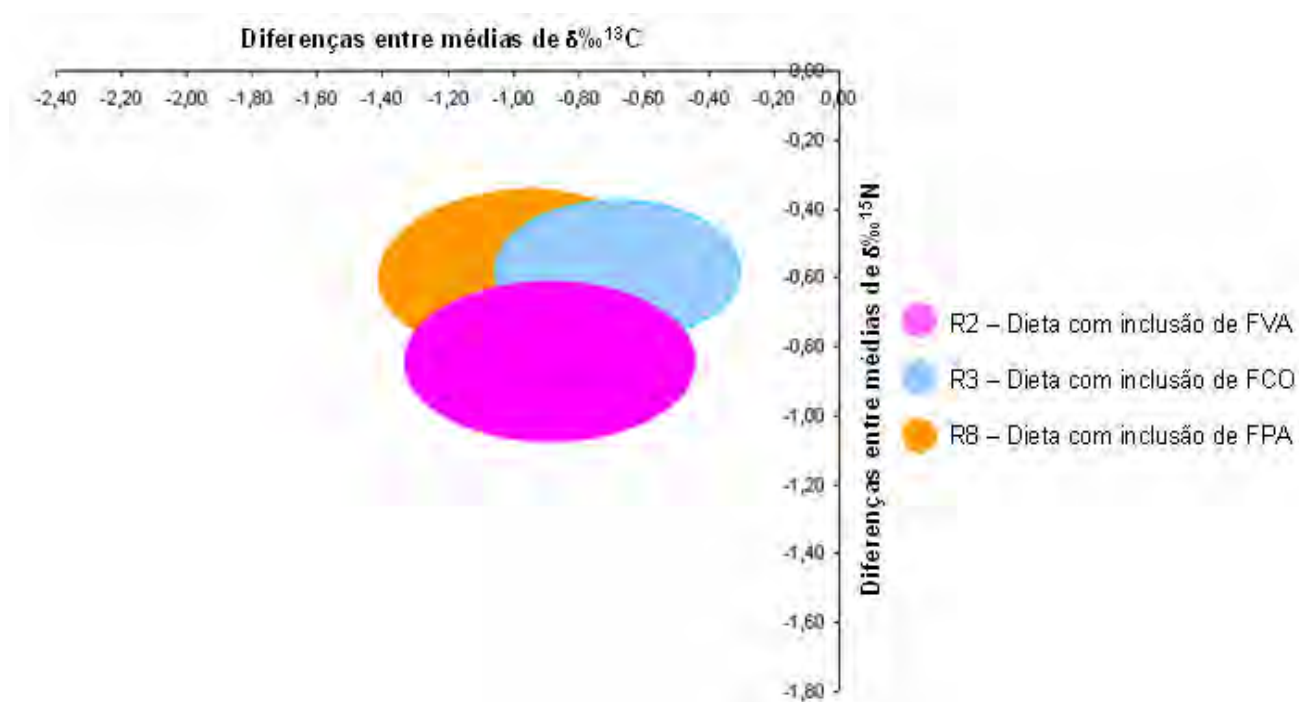


Figura 2 – Regiões de confiança para os valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ de quilha de codornas de corte aos 42 dias de idade nos tratamentos R2, R3 e R8.

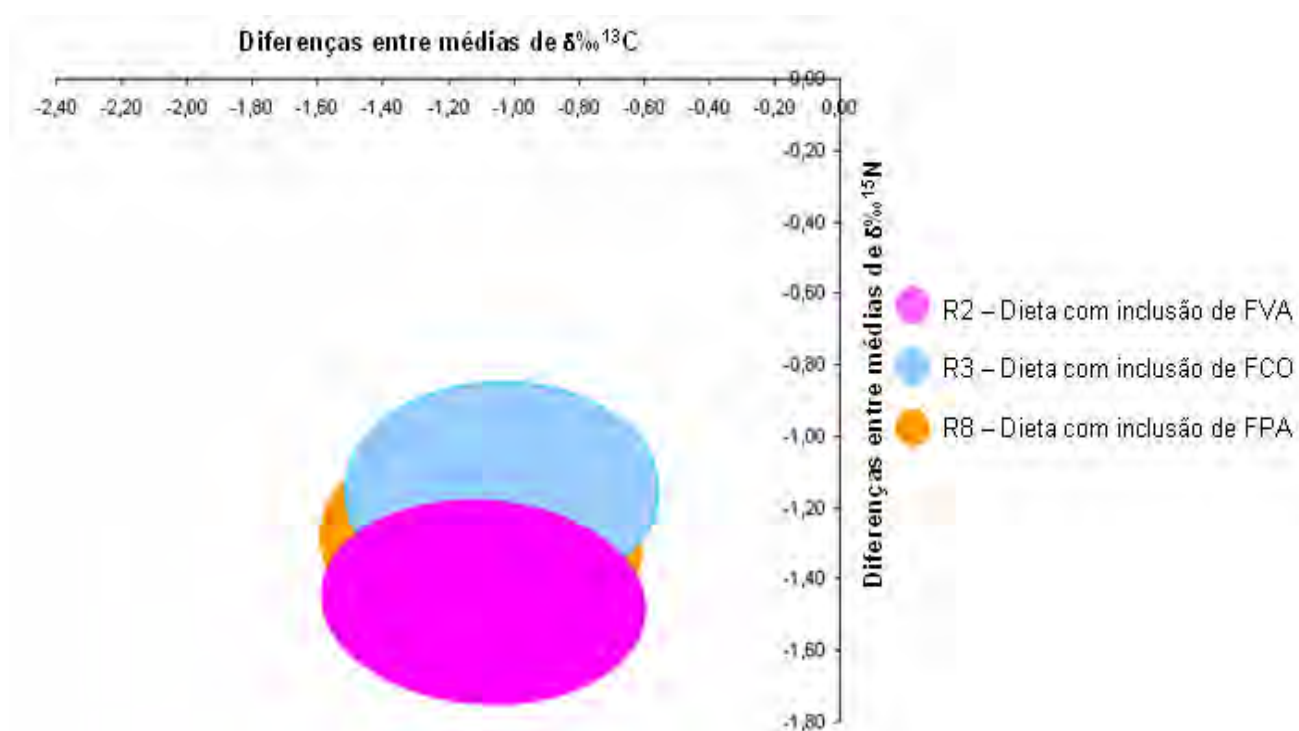


Figura 3 – Regiões de confiança para os valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ de tibia de codornas de corte aos 42 dias de idade nos tratamentos R2, R3 e R8.

Ainda observando as figuras citadas acima, notou-se que as diferenças entre as médias dos tratamentos R2, R3 e R8 e as médias do tratamento controle (R1) para ^{15}N foram inferiores às médias de ^{13}C , fazendo com que as regiões de confiança se deslocassem mais para o eixo do carbono do que para o eixo do nitrogênio. Essa distribuição espacial evidencia que o ^{15}N é o elemento químico importante na detecção de subprodutos de origem animal em carne de codornas, já que os mesmos possuem maior quantidade de nitrogênio em sua composição.

As diferenças encontradas nos tecidos avaliados provavelmente podem estar ligadas às diferenças na composição e formação dos tecidos em aminoácidos essenciais e não-essenciais. Segundo Moran Jr. (1999) a maior parte da composição de aminoácidos do músculo peitoral é de aminoácidos essenciais, e quando incorporados nos tecidos, exibem pouca mudança em relação a sua razão isotópica (Pinnegar & Polunin, 1999). No entanto, o colágeno tipo I, que constitui aproximadamente cerca de 95% da matriz óssea orgânica (Pizauro Jr., 2002) e, portanto, a maior fonte de nitrogênio do osso, e possivelmente, as proteínas da cartilagem da quilha também sejam formadas, na sua maioria, por aminoácidos não-essenciais, demonstrando diferenças no enriquecimento.

As variações encontradas entre tecidos não são bem compreendidas. Para Tiezen *et al.* (1983), as principais frações bioquímicas diferem isotopicamente entre si, e as diferenças isotópicas do organismo podem ser o reflexo de suas diferentes composições bioquímicas. Tecidos que possuem em sua composição maior quantidade em lipídeos, provavelmente teriam valor de $\delta^{13}\text{C}$ menor do que o tecido que apresente menor quantidade de lipídeos, sendo relativamente mais pobre em carbono-13 (Tiezen *et al.*, 1983; Piasentier *et al.*, 2003).

Comportamento semelhante foi observado para os tratamentos R4, R5, R6 e R7 que continham dietas com misturas de diversas fontes de proteínas de origem animal em relação ao tratamento controle (Figuras 4, 5 e 6) para os três tecidos estudados.

As sobreposições das regiões de confiança indicam que não há diferença entre os tratamentos (Figuras 1, 2, 3, 4, 5 e 6). Verificou-se um distanciamento das elipses de confiança em relação aos eixos do gráfico em relação à tíbia (Figura 3 e 6). Este comportamento pode ser explicado por esse tecido apresentar um enriquecimento isotópico em ^{13}C maior que o músculo peitoral e a quilha (Tabela 4). Para Hobson & Clark (1992a e b) cada tecido do mesmo animal apresenta particular assinatura isotópica, fator de fracionamento e *turnover* isotópico.

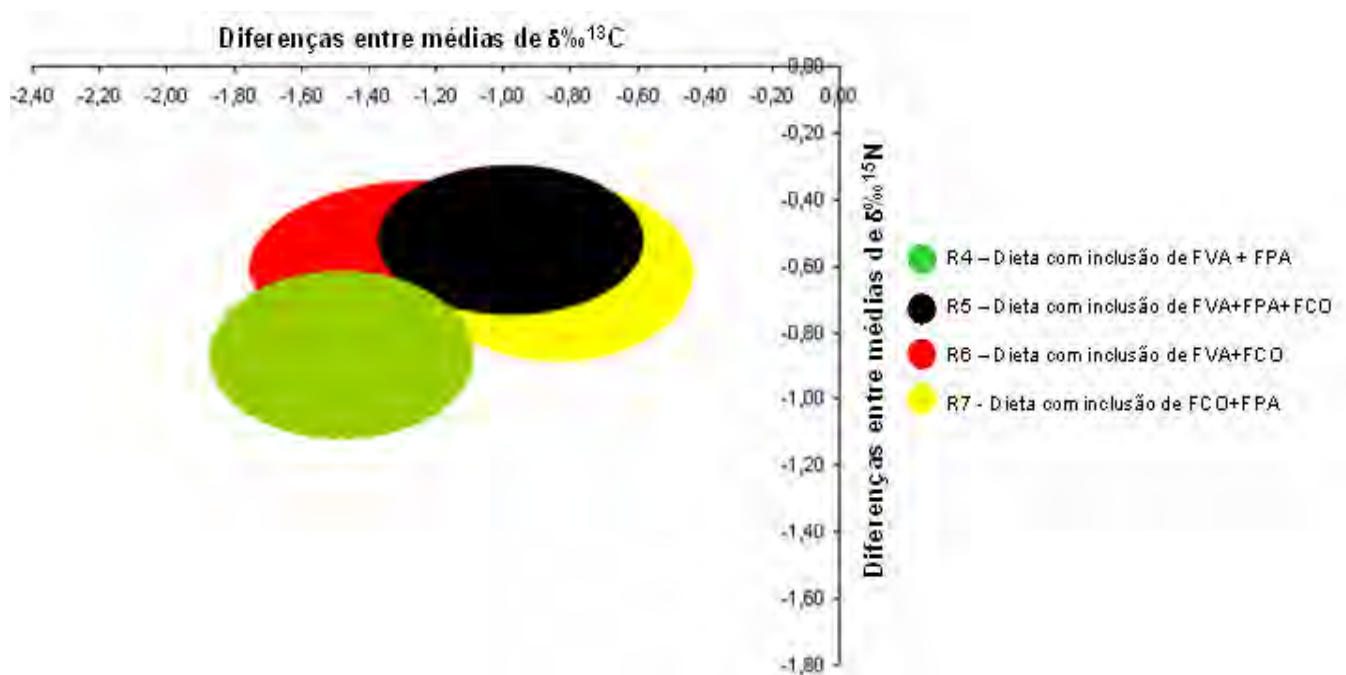


Figura 4 – Regiões de confiança para os valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ do músculo peitoral de codornas de corte aos 42 dias de idade nos tratamentos R4, R5, R6 e R7.

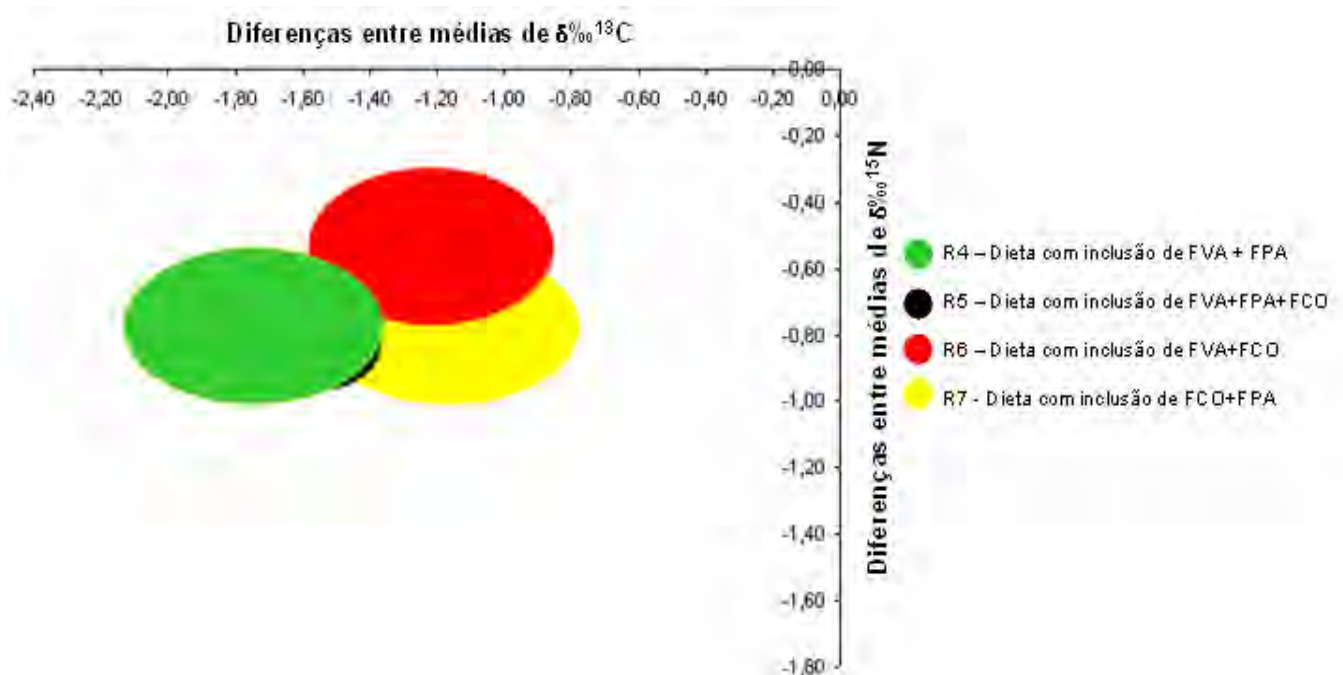


Figura 5 – Regiões de confiança para os valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ de quilha de codornas de corte aos 42 dias de idade nos tratamentos R4, R5, R6 e R7.

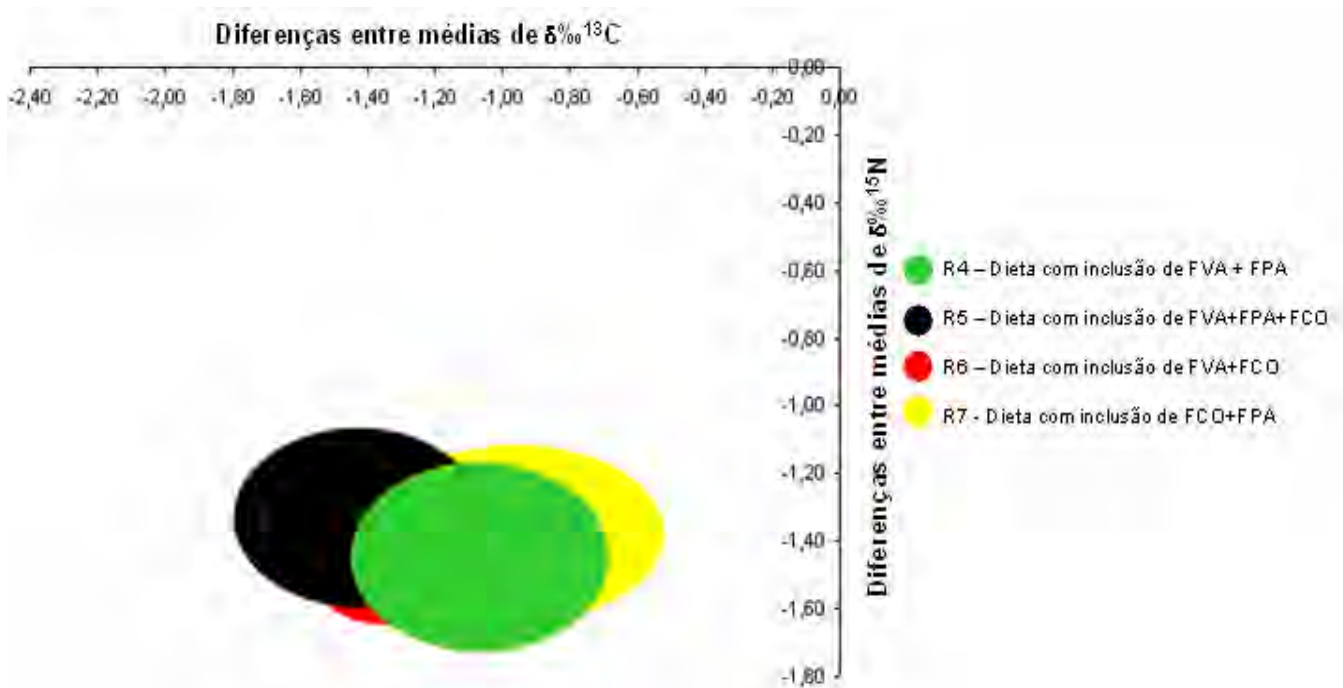


Figura 6 – Regiões de confiança para os valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ de túbia de codornas de corte aos 42 dias de idade nos tratamentos R4, R5, R6 e R7.

Por meio das informações obtidas nesse estudo, conclui-se que a técnica de isótopos estáveis é eficaz na detecção de subprodutos de origem animal no músculo peitoral, quilha e tíbia de codornas adultas. Essa constatação é de extrema importância, pois os diferentes mercados atendidos pelo Brasil exigem alimentos comprovadamente certificados, o que faz da técnica utilizada uma ferramenta auxiliar na rastreabilidade avícola.

Referências Bibliográficas

Bricout J, Koziat J. Control of authenticity of orange juice by isotopic analysis. *Journal of agricultural Food Chemistry* 1987; 35:758-760.

Brookes ST, Barrie A, Daves JE. A rapid $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ test for determination of corn-syrups in honey. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 1991; 74: 627-629.

Consleg – Serviço das Publicações Oficiais das Comunidades Européias. Texto Consolidado – Regulamento nº 1774/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho da União Européia, 154p 2004. Disponível em: <http://defra.gov.uk/animalh/by-prods/publicate/em_2002R1774_do_001.pdf> Acesso em: 27 de janeiro de 2007.

DeNiro M.J, Epstein S. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 1978; 42: 495-506.

Domi N, Bouquegneau K, Das K. Feeding ecology of five commercial shark species of the Celtic Sea through stable isotope and trace metal analysis. *Marine Environmental Research* 2005; 60:551-569.

Ducatti C. Isótopos estáveis ambientais. [Apostila]. Botucatu (SP): Universidade Estadual Paulista; 2004; 183 p.

Gannes LZ, Del-Rio CM, Koch P. Natural abundance variations in stable isotopes and their potential uses in animal physiological ecology. *Comparative Biochemistry and Physiology* 1998; 199A:725-737.

Gonzales-Martin I, Gonzáles-Pérez C, Hernández Mendéz J, Marques-Mácias E, Poveda FS. Use of isotope analysis to characterize meat from Iberian-breed swine. *Meat Science* 1999; 52: 437-441.

Hobson KA, Clark RG. Assessing avian diets using stable isotopes I: Turnover of ^{13}C in tissues. *The Condor* 1992a; 94:181-188.

Hobson, K.A., Clark, R.G. Assessing avian diets using stable isotopes II: Factors influencing diet-tissue fractionation. *The Condor*, 1992b. 94:189-197.

Kelly S, Parker I, Sharman M, Dennis J, Goodall I. Assessing the authenticity of single seed vegetable oils using fatty acid stable carbon isotope ratios ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$). *Food Chemistry* 1997; 59: 181-186.

Koziet J, Rossmann A, Martin GJ, Ashurst PR. Determination of carbon-13 content of sugars of fruit and vegetable juices. *Analytica Chimica Acta* 1993; 271:31-38.

Licatti F. Isótopos estáveis do carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) em plantas do ciclo bioquímico C_3 e C_4 . [Monografia]. Botucatu (SP). Universidade Estadual Paulista; 1997.

Manca G, Camin F, Coloru G, Del Caro A, Detentori D, Franco MA, Versini G. Characterization of the geographical origin of *Pecorino Sardo* cheese by casein stable isotope ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) ration and free amino acid ratios. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2001; 49: 1404-1409.

Martin GJ, Guillou C, Martin ML, Cabanis MT, Tep X, Aerny J. Natural factors of isotope fractionation and the characterization of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1988; 36: 316-322.

Moran Jr. ET. Live production fators influencing yield and quality of poultry meta. In: Richardson, R.I., Mead, G.C., editors. *Poultry Meat Science*. Wallingford (OX): CABI Publishing; 1999, p.175-195.

Oliveira RP. Rastreabilidade da Farinha de Vísceras de aves na alimentação de frangos de corte pela técnica dos isótopos estáveis ($\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$). [Tese]. Botucatu (SP): Universidade Estadual Paulista, 2005.

Peupert M, Theuvsen L. Tracking and tracing meat products – The role of modern information technologies. In: EFITA 2003 Conference; 2003; Hungary. p. 588-593.

Piasentier E, Valusso R, Camin F, Versini G. Stable isotope ratio analysis for authentication of lamb meat Meat Science 2003; 64: 239-247.

Pinnegar JK, Polunin VC. Differential fractionation of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ among fish tissue: Implications for the study of trophic interactions. Functional Ecology 1999; 13: 225-231.

Piola RF, Moore SK, Suthers IM. Carbon and nitrogen stable isotope analysis of three types of oyster tissue in an impacted estuary. Estuarine Coastal and Shelf Science 2005, 1-12.

Pizauro Jr. JM. Estrutura e função do tecido ósseo. Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte. In: Macari, M. editor. Fisiologia Aviária Aplicada à Frangos de Corte. Jaboticabal: FUNEP-UNESP; 2002. p. 375.

Reniero F, Ziller L, Franco MA, Del Caro A, Vacca V. Caratterizzazione dei miele italiani di diversa provenienza (Trentino Alto-Adige e Sardegna) mediante il rapporto ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$). Rivista di Merceologia 1997; 31: 39-48.

Rossmann A, Kornexl BE, Versini G, Pichlmayer F, Lamprecht G. Origin assignment of milk from alpine regions multielement stable isotope ratio analysis (SIRA). Journal of Food Science & Nutrition 1998; 1:9-21.

Rossmann A, Haberhauer G, Holzl S, Horn P, Pichlmayer F, Voerkelius S. The potential of multielement stable isotope analysis for regional origin assignment of butter. *European Food Research & Technology* 2000; 211:32-40.

SAS Institute Inc. SAS/STATTM. SAS user's guide for windows environment. 8.0 ed. Cary (NC): SAS Institute Inc.; 1999.

Schwägele F. Traceability from a European perspective. *Meat Science* 2005, 71:164-173.

Tieszen LL, Boutton TW, Tesdahl KG, Slade NA. Fractionation and turnover of stable carbon isotopes in animal tissues: implications for $\delta^{13}\text{C}$ analysis of diet. *Oecologia* 1983; 57:32-37.

White JW, Winters K, Martin P, Rossmann A. Stable carbon isotope ratio analysis of honey: validation of internal standard procedure for worldwide application. *Journal of the Association of official Analytical Chemists International* 1998; 81: 610-619.

Zhao L, Schell DM, Castellini MA. Dietary macronutrients influence ^{13}C e ^{15}N signatures of pinnipeds: Captive feeding studies with harbor seals (*Phoca vitulina*) A. *Comparative Biochemistry and Physiology* 2006; 143:469-478.

Considerações Finais

A carne de codornas possui atributos que são apreciados por consumidores de todo o mundo, entre eles sabor, maciez e baixo conteúdo em gordura, caracterizando-a como iguaria, sendo uma alternativa viável de proteína animal para a indústria avícola brasileira.

Em virtude do crescimento das exportações em nosso país, surge a necessidade de adequação de produtos agroindustriais às especificações dos possíveis importadores. Questões religiosas, culturais e sanitárias são as principais motivações para restrições à entrada de produtos alimentícios no mercado globalizado.

Informações detalhadas a respeito dos produtos cárneos é exigência não só ligada a questões legais, mas também é conferida aos consumidores que estão conscientes do perigo que algumas zoonoses podem causar à saúde. A partir disso busca-se incessantemente maneiras de assegurar a qualidade sanitária dos alimentos de origem animal e, no caso deste estudo, carne de codornas.

A linha de pesquisa do Centro de Isótopos Estáveis Ambientais em parceria com os Departamentos de Nutrição/Melhoramento Animal e Departamento de Produção Animal, UNESP/campus de Botucatu, visa à certificação de produtos avícolas evitando possíveis sanções dos principais importadores de carne brasileira.

A idéia de envolver codornas de corte com a técnica de isótopos estáveis surgiu da necessidade de abrir novas informações sobre uma espécie até então não utilizada em estudos de rastreabilidade. O presente estudo obteve resultados importantes, porém mais estudos esclareceriam alguns pontos não elucidados.

Experimentos fisiológicos que utilizam a técnica dos isótopos estáveis, como por exemplo, o tempo de troca de dieta por outra (*turnover*), a fim de determinar qual o

período em que ocorre mudança de 50% do sinal isotópico, para posteriormente realizar estudos com retirada de ingredientes em diferentes fases de criação dos animais.

Nesse experimento não foi possível adquirir animais utilizados por agroindústrias de grande porte. Possivelmente o fator “melhoramento genético” influenciou nos resultados finais, já que codornas para produção de carne ainda apresentam grande variabilidade individual, com conseqüente aumento no desvio-padrão quando comparado à outra espécie. Talvez a utilização de um número maior de animais minimizaria tal fator.

O plano alimentar utilizado no presente estudo foi baseado nas informações obtidas por agroindústria produtora de codornas de corte, pois no possível processo de certificação, a padronização de dietas torna-se imprescindível. A indústria avícola utiliza o milho e o farelo de soja como principais ingredientes de suas rações, porém em determinadas épocas do ano, os ingredientes podem ser modificados em função de sua disponibilidade e preço.

Essa situação pode dificultar a obtenção de resultados, sendo necessária “varredura” completa de todos os possíveis ingredientes utilizados na formulação de dietas não só para codornas, mas em todos os segmentos agroindustriais produtores de carne.

Apêndice

1. Sistema de equações:

No presente estudo (Capítulo 2) foi utilizado o sistema de equações que é um método quantitativo em função do balanço de massa isotópico, que possibilita verificar a contribuição isotópica de duas fontes, como também suas quantidades relativas, na geração de um produto (Ducatti, 2004).

Duas fontes e dois isótopos:

Admita a existência de duas fontes participativas F_1 e F_2 na formação do produto (P).

O sistema de equações utilizadas será:

$$\text{Produto} = \text{Fonte 1} + \text{Fonte 2}$$

$$\delta^{13}\text{C} = a\delta F_1 + b\delta F_2 \quad (1)$$

$$\delta^{15}\text{N} = a\delta'F_1 + b\delta'F_2 \quad (2)$$

Para as quais:

$\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ = valor do enriquecimento isotópico relativo do produto (músculo peitoral, quilha ou tíbia), para carbono-13 e nitrogênio-15, respectivamente.

δF_1 e δF_2 = valor do enriquecimento isotópico relativo do carbono da fonte 1 (vegetal) e fonte 2 (animal), respectivamente.

$\delta'F_1$ e $\delta'F_2$ = valor do enriquecimento isotópico relativo do nitrogênio da fonte 1 (vegetal) e fonte 2 (animal), respectivamente.

Isolando o valor (b) da equação (1) e da equação (2) e igualando entre si, obtém-se o valor de (a), ou seja, o índice participativo da fonte vegetal.

$$\frac{\delta^{13}C - a\delta F_1}{\delta F_2} = \frac{\delta^{15}N - a\delta' F_1}{\delta' F_2}$$

$$a = \frac{\delta^{13}C\delta' F_2 - \delta^{15}N\delta F_2}{\delta F_1\delta' F_2 - \delta' F_1\delta F_2} \quad (3)$$

Substituindo o valor de (a) na equação (1) ou equação (2) obtém-se o valor de (b), ou seja, o índice participativo da fonte animal.

$$b = \frac{\delta^{15}N\delta F_1 - \delta^{13}C\delta' F_1}{\delta F_1\delta' F_2 - \delta' F_1\delta F_2} \quad (4)$$

Somando a equação (3) com a equação (4) e igualando a um, obtém-se:

$$\frac{\delta^{13}C\delta' F_2 - \delta^{15}N\delta F_2}{\delta F_1\delta' F_2 - \delta' F_1\delta F_2} + \frac{\delta^{15}N\delta F_1 - \delta^{13}C\delta' F_1}{\delta F_1\delta' F_2 - \delta' F_1\delta F_2} = 1$$

$$(\delta^{13}C\delta' F_2 - \delta^{15}N\delta F_2) + (\delta^{15}N\delta F_1 - \delta^{13}C\delta' F_1) = (\delta F_1\delta' F_2 - \delta' F_1\delta F_2)$$

ou:

$$a(\delta F_1\delta' F_2 - \delta' F_1\delta F_2) + b(\delta F_1\delta' F_2 - \delta' F_1\delta F_2) = (\delta F_1\delta' F_2 - \delta' F_1\delta F_2)$$

Obtendo $a + b = 1$ uma vez que existem somente duas fontes participativas e um produto.

Para que seja evitado um possível fator de fracionamento entre a dieta (fonte) e o tecido estudado (produto) e relações de carbono/nitrogênio diferentes, tem sido utilizado o mesmo tecido na aplicação do sistema de equações (fonte: tibia/produto: tibia).

Para fonte 2, foram utilizados os valores isotópicos de músculo peitoral, quilha e tíbia advindos da inclusão 15% (inclusão máxima utilizada), onde os valores de b foram corrigidos multiplicando-se os valores obtidos por 0,15.

Como mencionado acima, foi aplicado o sistema de equações para duas fontes [tecido com dieta sem inclusão de FVA (fonte 1) e tecido com 15% de inclusão de FVA (fonte 2)] e dois isótopos ($\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$) os quais apresentaram os resultados encontrados na Tabela 1.

Tabela 1. Nível de inclusão de farinha de vísceras de aves encontrado por meio do sistema de equações nos diferentes tecidos de codornas de corte com 42 dias de idade.

Nível de inclusão de FVA na dieta (%)	Nível de inclusão (sistema de equações)		
	Tecidos amostrados		
	Peito	Quilha	Tíbia
0	0,0	0,0	0,0
1,5	1,7	1,5	1,9
3,0	3,1	3,0	2,9
4,5	5,4	4,5	4,6
6,0	6,7	6,5	6,1
7,5	7,7	8,7	8,8
15,0	15,0	15,0	15,0

Pode-se observar ainda que os resultados obtidos na Tabela acima, sinalizam que o erro cometido na comparação entre os valores experimentais (utilizados na dieta) e os calculados (sistema de equações) são inferiores a 1%.