

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CAMPUS DE JABOTICABAL

EFICIÊNCIA DA UTILIZAÇÃO E TURNOVER DO NITROGÊNIO DA L-(<sup>15</sup>N)

TREONINA EM TECIDOS DE FRANGO DE CORTE

Rafael Massami Suzuki

Médico Veterinário

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CAMPUS DE JABOTICABAL

EFICIÊNCIA DA UTILIZAÇÃO E TURNOVER DO NITROGÊNIO DA L-(<sup>15</sup>N)

TREONINA EM TECIDOS DE FRANGO DE CORTE

Rafael Massami Suzuki

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nilva Kazue Sakomura

Co-orientadores: Prof. Dr. José Albertino Bendassolli

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana Célia Denadai

Trabalho de defesa apresentado à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2016

Suzuki, Rafael Massami  
S968e Eficiência da utilização e *turnover* do nitrogênio da L-(<sup>15</sup>N) treonina em tecidos de frango de corte / Rafael Massami Suzuki. -- Jaboticabal, 2016  
xiv, 57 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016  
Orientadora: Nilva Kazue Sakomura  
Banca examinadora: Adibe Luiz Abdalla, Edney Pereira da Silva  
Bibliografia

1. Metabolismo. 2. Isótopo estável. 3. Aminoácido marcado. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.084.5:636.5



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: EFICIÊNCIA DA UTILIZAÇÃO E TURNOVER DO NITROGÊNIO DA  
L- (<sup>15</sup>N) TREONINA EM TECIDOS DE FRANGO DE CORTE


**AUTOR: RAFAEL MASSAMI SUZUKI****ORIENTADORA: NILVA KAZUE SAKOMURA**

COORIENTADOR: JOSE ALBERTINO BENDASSOLLI

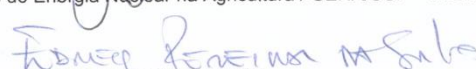
COORIENTADORA: JULIANA CÉLIA DENADAI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em ZOOTECNIA, pela

Comissão Examinadora:

  
Prof. Dra. NILVA KAZUE SAKOMURA  
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

  
Prof. Dr. ADIBE LUIZ ABDALLA  
Centro de Energia Nuclear na Agricultura / CENA/USP - Piracicaba/SP

  
Prof. Dr. EDNEY PEREIRA DA SILVA  
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 25 de fevereiro de 2016.

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Rafael Massami Suzuki, filho de Edson Coiti Suzuki e Marisa Tobace Suzuki, nascido no dia 6 de fevereiro de 1990 em Barretos, São Paulo. Ingressou no curso de Medicina Veterinária em 2009 na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista - campus de Jaboticabal, São Paulo – finalizando em 2014. Neste período, foi bolsista de iniciação científica pelo CNPq no período de 1 de novembro de 2011 a 31 de julho de 2012, sob orientação da prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nilva Kazue Sakomura. Durante o período de 1 de setembro de 2012 a 31 de agosto de 2013, foi bolsista de iniciação científica pela FAPESP sob orientação do prof. Dr. Luciano Hauschild. Iniciou o curso de Mestrado em Zootecnia no dia 10 de março de 2014 na mesma instituição e sob a orientação da prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nilva Kazue Sakomura, defendendo sua dissertação no dia 25 de fevereiro de 2016.

“A maior recompensa para o trabalho  
do homem não é o que ele ganha com  
isso, mas o que ele se torna com isso”

John Ruskin

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus pais, não só por todos os ensinamentos, conselhos e apoio durante a minha vida toda, mas principalmente por serem meus heróis, fontes de inspiração e exemplos a serem seguidos.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Faculdade de Ciências Veterinárias e Agrárias (FCAV), Campus de Jaboticabal, por ter me acolhido desde a graduação.

À Coordenadoria de Apoio à Pesquisa e Ensino Superior (CAPES), pela bolsa cedida.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo financiamento da pesquisa.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Nilva Kazue Sakomura pela orientação e confiança.

Ao Prof. Dr. José Albertino Bendassolli, do Laboratório de Isótopos Estáveis (CENA/USP) e à Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Juliana Célia Denadai, do Centro de Isótopos Estáveis (IBB/UNESP), pela co-orientação e também pelos ensinamentos, apoio, paciência e confiança.

Ao Prof. Dr. Carlos Ducatti, do Centro de Isótopos Estáveis (IBB/UNESP), pelos preciosos ensinamentos e apoio a nossa pesquisa.

Aos membros das bancas de qualificação (Dr. Daniel Mendes Borges Campos e prof. Dr. José Nelson Peruzzi) e defesa (prof. Dr. Adibe Luiz Abdalla e prof. Dr. Edney Pereira Silva), pelos ensinamentos e contribuições ao presente trabalho.

Aos amigos do aviário: Melina, Daniela, Miryelle, Hilda, Gabriel, Juliano, Letícia, Camila, Nayara, Marcos, Daniel, Katiane, Renata, Joyce, Giuliana, Paulo, Danilo, Maria, Bruno, Francisca, Guilherme, Larissa, Mirela e Felipe, por toda a ajuda, descontrações e ensinamentos. Em especial ao Atomic Broilers: Allan (sensei e irmão), Daniel, Hannay e a Letícia Pacheco (jovem Padawan), aos quais tive o prazer de trabalhar e aprender.

Aos funcionários do aviário: Robson, Vicente e Izildo, pela ajuda cedida durante os experimentos e pela amizade.



Aos moradores e ex-moradores da República Amoribunda: Paulo (Cookie-kh), Bruno (K-banha), Rafael (Chupeta), Gabriel (Covi-Flor), Fernando, Patric, Adriano (Seu Jorge), Júlio (Cho chó), Rafael (Passivo), Henrique (Aki-dau-ânus) e Gustavo (Vurto), pelos momentos de alegria, ajuda durante o experimento, pelo crescimento pessoal, ou que seja somente pela parceria!

Aos amigos da República Carga Pesada de Botucatu: Matheus (Bolha), Johan (Covas), João Pedro (Bauer), Luiz (Tonelada), Henrique (Pula), Gustavo (Ampulheta) e Bino, por me acolherem e pelos momentos de descontrações.

Aos amigos de Rio Preto: Renato, Maurício, Vinicius, João, Micael, Rodrigo, Isabela e Paula, pela amizade desde o ensino fundamental.

À família da minha namorada: Renato, Nustaz, José Renato, João Paulo, Cinthia e Talita, por me acolherem e por todos os momentos de felicidades.

À toda minha família, principalmente aos meus pais e irmãos: Edson Coiti Suzuki e Marisa Tobace Suzuki; Ane Caroline Yuri Suzuki Nishi e Tiago Keiti Suzuki, por todo o amor, carinho e incentivo. Amo vocês!

À Ana Letícia Daher Aprígio da Silva, que está ao meu lado por mais de 7 anos. Além de namorada é minha melhor amiga acima de tudo. Por mais difícil que tenha sido, sempre estive ao meu lado lutando e me apoiando, seja nos momentos de felicidade ou de tristeza. Encontramos muitos obstáculos por eu ter escolhido este caminho para nossas vidas, principalmente a distância, mas não desistimos e acreditamos em um futuro melhor. Obrigado por tudo!

Por fim, a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho! MUITO OBRIGADO!!!

## Sumário

<b>CAPÍTULO 1.....</b>	<b>XII</b>
<b>Eficiência da utilização e <i>turnover</i> do nitrogênio da L-(<sup>15</sup>N) treonina em tecidos de frango de corte</b>	
CONSIDERAÇÕES INICIAIS .....	1
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	2
2.1 ELEMENTOS QUÍMICOS E DEFINIÇÃO DE ISÓTOPOS.....	2
2.2 A DETERMINAÇÃO DOS ISÓTOPOS ESTÁVEIS.....	3
2.3 APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE ISÓTOPOS ESTÁVEIS.....	6
2.4 TREONINA NA NUTRIÇÃO ANIMAL.....	7
2.5 COMPOSTOS ENRIQUECIDOS.....	8
2.6 UTILIZAÇÃO DA TREONINA.....	8
3. BIBLIOGRAFIA.....	9
 <b>CAPÍTULO 2.....</b>	 <b>15</b>
<b>Eficiência de utilização da L-(<sup>15</sup>N) treonina em diferentes tecidos de frangos de corte</b>	
RESUMO .....	16
ABSTRACT .....	17
1. INTRODUÇÃO .....	18
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	19
2.1. Definição da dose.....	19
2.2. Animais, manejo e rações experimentais.....	20
2.3. Enriquecimento da dieta e coletas de amostras.....	21
2.4. Processamento das amostras .....	22
2.5. Análises isotópicas.....	23
2.6. Determinação da deposição de <sup>15</sup> N nos tecidos (balanço de massas) .....	23
2.7. Determinação da eficiência de utilização .....	24
2.8. Aplicação das eficiências de utilização .....	25
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	26
3.1. Recuperação e eficiência de utilização.....	26
3.2. Simulação .....	33
4. CONCLUSÃO .....	34
5. BIBLIOGRAFIA.....	34

<b>CAPÍTULO 3.....</b>	<b>37</b>
<b><i>Turnover</i> da L-(<sup>15</sup>N) treonina em diferentes tecidos de frangos de corte</b>	
RESUMO .....	38
ABSTRACT .....	39
1. INTRODUÇÃO .....	40
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	41
2.1. Definição da dose.....	41
2.2. Animais, manejo e rações experimentais.....	42
2.3. Enriquecimento da dieta e coletas de amostras.....	43
2.4. Processamento das amostras .....	44
2.5. Análises isotópicas.....	45
2.6. <i>Turnover</i> da L-( <sup>15</sup> N) treonina.....	46
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	46
4. CONCLUSÃO .....	53
5. BIBLIOGRAFIA.....	53



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Jaboticabal



## CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 9999/14 do trabalho de pesquisa intitulado **“Modelagem da produção e das exigências nutricionais de aves e peixes - Metodologia para determinar a eficiência de utilização da proteína e de aminoácidos essenciais com uso do nitrogênio <sup>15</sup>N”**, sob a responsabilidade da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Nilva Kazue Sakomura está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 07 de julho de 2014.

Jaboticabal, 07 de julho de 2014.

**Prof.ª Dr.ª Paola Castro Moraes**  
Coordenadora – CEUA

## **CAPÍTULO 1**

## EFICIÊNCIA DA UTILIZAÇÃO E *TURNOVER* DO NITROGÊNIO DA L-(<sup>15</sup>N) TREONINA EM TECIDOS DE FRANGO DE CORTE

**RESUMO:** Estudos relacionados a utilização de um determinado nutriente são importantes para se obter conhecimentos a respeito do aproveitamento deste nutriente pelo animal, uma vez que há nem tudo o que é fornecido, é aproveitado pelo mesmo. Dessa forma, o que foi de fato utilizado para o animal pode ser convertido em produção animal, como um acréscimo proteico nos frangos de corte, ou então a utilização de nutrientes para a produção de ovos em poedeiras. A utilização de aminoácidos marcados nos permite avaliar processos metabólicos em diferentes estudos nutricionais, tanto no processo de incorporação refletido no processo de *turnover*, quanto na deposição do aminoácido nos diferentes tecidos. Deste modo, o trabalho teve como enfoque a utilização da L-(<sup>15</sup>N) treonina que foi explorada por meio de três abordagens diferentes: verificar a distribuição deste aminoácido marcado em diferentes tecidos de frangos de corte por meio de um balanço de massas (Capítulo 2); calcular a eficiência de utilização nestes tecidos, ou seja, calcular qual foi o aproveitamento da L-(<sup>15</sup>N) treonina ingerida que foi depositada/incorporada a esses tecidos (Capítulo 2); e por fim, analisar o *turnover* da L-(<sup>15</sup>N) treonina para se analisar a incorporação do aminoácido no tecido (Capítulo 3).

**Palavras-chave:** metabolismo, isótopo estável, aminoácido marcado.

**EFFICIENCY OF UTILIZATION AND *TURNOVER* OF THE NITROGEN FROM  
L-(<sup>15</sup>N) THREONINE IN TISSUES OF BROILER CHICKENS**

**ABSTRACT:** Studies related to the utilization of a particular nutrient are important to obtain knowledge regarding the utilization of this nutrient by the animal, because only a part of the nutrient will be used. Thus, what was in fact used for the animal can be converted to livestock as an increase in protein broilers, or the use of nutrients to egg production of laying hens. The use of labeled amino acids allows us to evaluate metabolic processes in different nutritional studies, both in the incorporation process reflected in the turnover process, as the amino acid deposition in different tissues. Thus, the aim of the work was to focus the utilization of L-(<sup>15</sup>N) threonine, which was explored by three different approaches: verify the distribution of labelled amino acid in different tissues of broiler chickens through a mass balance (Chapter 2 ); calculate the utilization efficiency of these tissues or the L-(<sup>15</sup>N) threonine intake which has been deposited / incorporated into these tissues (Chapter 2); and finally, to analyze the turnover of L-(<sup>15</sup>N) for threonine analyzing the amino acid incorporation into the tissue (Chapter 3).

**Key-words:** metabolism, stable isotope, labelled amino acid.

## CONSIDERAÇÕES INICIAIS

### 1. INTRODUÇÃO

A evolução do frango de corte moderno, destacando o crescimento acelerado e alta taxa de deposição proteica, é bastante notável ao longo do tempo. Este avanço foi atingido devido a um conjunto de fatores que inclui: nutrição; manejo; sanidade; ambiência e principalmente à genética (Havenstein, Ferket & Qureshi, 2003).

Apesar de todo este avanço, o conhecimento em certas áreas da fisiologia aviária, muitas vezes não recebe tanta ênfase, como o metabolismo dos aminoácidos. O conhecimento dos processos, atividades e fenômenos fisiológicos das aves, pode contribuir para a compreensão dos mecanismos das aves e conseqüentemente resultar em melhores desempenhos produtivos.

Os isótopos estáveis são eficientes traçadores biológicos (Green & Green 1990; Cobelli & Foster, 1998) e as principais abordagens de seu uso tem sido: balanço proteico, *turnover* tecidual e alocação de nutrientes (Gannes, Del-rio & Koch, 1998). Com a utilização de isótopos marcados é possível avaliar processos metabólicos de um determinado nutriente (Muramatsu *et al.*, 1987; Stradiotti *et al.*, 2013a).

A treonina é o terceiro aminoácido limitante para frangos de corte alimentados com uma dieta a base de milho e soja e sua deficiência pode prejudicar os sistemas imunológico e digestivo, além da redução da síntese muscular (Kidd, 1999). Parte da treonina dietética não é recuperada pelo sistema porta sendo destinada a produção de mucina ou catabolizada pelos enterócitos (Stoll *et al.*, 1998).

O presente estudo tem por finalidade determinar as eficiências de utilização de diferentes tecidos de frangos de corte e aplicar essas eficiências para predição da exigência de treonina, além de analisar o *turnover* da L-(<sup>15</sup>N) treonina nos diferentes tecidos de frango de corte. Deste modo, este trabalho não contribui somente para a área de nutrição, mas também permite uma abordagem fisiológica que pode colaborar para a expansão dos conhecimentos a respeito do metabolismo da treonina.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ELEMENTOS QUÍMICOS E DEFINIÇÃO DE ISÓTOPOS

Os átomos são as unidades básicas de qualquer matéria no planeta Terra. O modelo atômico considera que os átomos são constituídos de subunidades denominadas prótons (carga positiva), nêutrons (carga neutra) e elétrons (carga negativa). Um determinado átomo pode ser dividido em duas partes: núcleo e eletrosfera. O núcleo, local onde é concentrado quase que a totalidade de seu peso, é formado por prótons e nêutrons que possuem aproximadamente 1850 vezes o peso de um elétron e, portanto, ambas partículas definem suas propriedades físicas. A eletrosfera constituída por elétrons distribuídos ao redor do seu núcleo é formada de acordo com a disposição e formato do núcleo, portanto as características químicas também são influenciadas pelo núcleo do átomo (Jones & Atkins, 2000).

Um elemento químico é determinado pelo seu número atômico ( $Z$ ) que representa a quantidade de prótons do elemento e seu número de massa ( $A$ ), determinado pela soma de prótons e nêutrons contidas em seu núcleo e pode variar para um mesmo elemento químico. Deste modo, átomos com o mesmo número atômico, mas com diferentes números de massa são ditos isótopos e sua diferença está no número de nêutrons presentes no núcleo atômico (Patterson *et al.*, 1967).

A etimologia da palavra isótopo é originada do grego ( $ISO$  = mesmo ou igual;  $TOPOS$  = lugar) e refere-se a tabela periódica em que os nuclídeos se encaixam “no mesmo lugar”, pois se trata do mesmo elemento químico. Nuclídeos são átomos com número atômico e número de massa definidos.

Considerando suas propriedades, um isótopo pode ser classificado como estável ou instável. O núcleo de um átomo quando instável pode emitir partículas radioativas como as emissões alfa e beta ou energia gama, e são denominados radioisótopos. Por outro lado, se o núcleo de um determinado nuclídeo permanecer estável, este é classificado como um isótopo estável (Snyder, 1966). Além disso, as características físicas e químicas de um determinado elemento químico serão praticamente idênticas (Ducatti *et al.*, 2011), uma vez que a diferença entre os isótopos será de  $n$  nêutrons que apresentam um peso de

$1,675 \times 10^{-24}$  g. Atualmente são conhecidos mais de 2500 núclídeos, sendo que 264 são estáveis e representados por 110 elementos químicos diferentes (Criss, 1999).

## 2.2. A DETERMINAÇÃO DOS ISÓTOPOS ESTÁVEIS

Os isótopos estáveis do carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio e enxofre, também conhecidos como bioelementos, são encontrados na natureza e sua abundância varia de acordo com o elemento e com o isótopo. Cada um desses elementos possui um isótopo leve ( $^{12}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ ,  $^{16}\text{O}$ ,  $^{14}\text{N}$ ,  $^{32}\text{S}$ ,  $^{36}\text{S}$ ), além de um ou mais isótopos pesados ( $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{33}\text{S}$ ,  $^{34}\text{S}$ ), sendo que a forma predominante encontrada naturalmente é o isótopo leve. A tabela 1 apresenta os valores das abundâncias naturais dos isótopos estáveis de cada bioelemento encontradas na natureza.

A razão isotópica de uma determinada amostra pode ser mensurada em espectrômetros de massas de razão isotópica (IRMS) acoplados a cromatógrafos. As etapas para a análise são: 1) Unidade de admissão ou de entrada para amostras gasosas; 2) Fonte de ionização; 3) Unidade aceleradora de íons; 4) Analisador magnético de íons e 5) Detector.

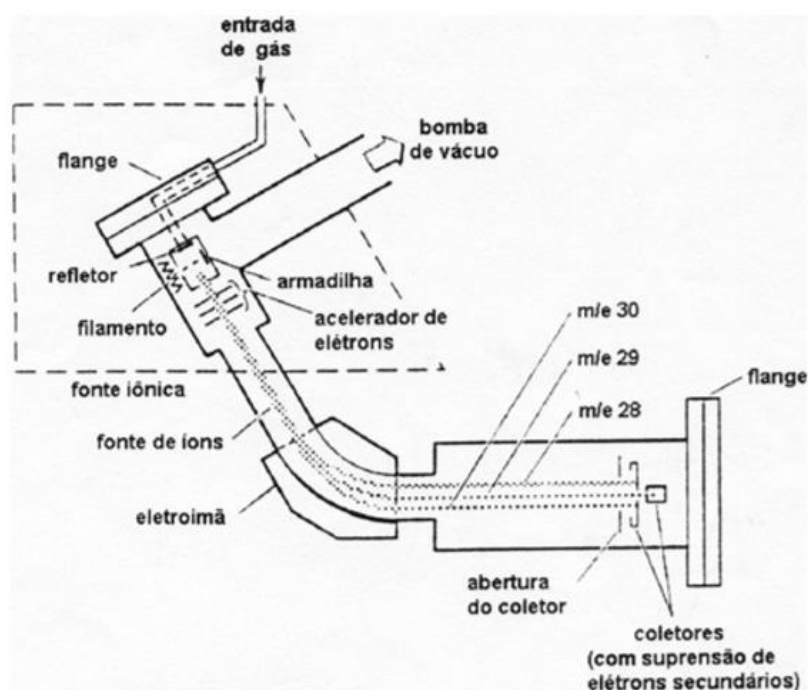
**Tabela 1.** Abundância natural (atm%) dos isótopos de H, C, N, O e S.

Isótopo estável	Abundância (atm%)	Isótopo estável	Abundância (atm%)
$^1\text{H}$	99,9844	$^{16}\text{O}$	99,7628
$^2\text{H}$	0,0156	$^{17}\text{O}$	0,0372
$^{12}\text{C}$	98,8890	$^{18}\text{O}$	0,2000
$^{13}\text{C}$	1,1110	$^{32}\text{S}$	95,0180
$^{14}\text{N}$	99,6340	$^{33}\text{S}$	0,7500
$^{15}\text{N}$	0,3660	$^{34}\text{S}$	4,2150
		$^{35}\text{S}$	0,0170

**Fonte:** Adaptado de Ducatti (2007a).

O processo inicia-se com a combustão completa da amostra geralmente contida em uma cápsula (o material da cápsula dependerá do isótopo de

interesse a ser analisado) e então são gerados diversos gases ( $N_2$ ,  $CO_2$ ,  $NO_x$ ,  $SO_2$ ,  $H_2O$ ). No caso do nitrogênio, o gás de interesse mensurado é o  $N_2$  e os demais são filtrados em uma série de *traps*. Os gases são impulsionados pelo gás hélio de alta pureza, passando por processo de purificação do  $N_2$ . Na fonte de ionização, uma pequena parte das moléculas de  $N_2$  são ionizadas. No sistema analisador há um campo magnético e os íons ( $^{14}N^{14}N^+$ ,  $^{14}N^{15}N^+$ , e  $^{15}N^{15}N^+$ ) são separados de acordo com suas relações massa/carga. Como os isótopos apresentam massas diferentes, estes serão separados e então mensurados. A esquematização do processo de separação dos íons está representada pela figura 1.



**Figura 1.** Separação de íons  $N_2^+$  em um espectrômetro de massas. **Fonte:** MULVANEY, 1993.

Os resultados da abundância isotópica podem ser expressos em termos absoluto ou relativo. Quando se utiliza compostos enriquecidos, predomina a abundância absoluta que é expressa em átomos %. Essa abundância é obtida a partir das relações das intensidades dos feixes de íons 28 e 29. A precisão analítica é da ordem de 0,1%.

A terminologia delta ( $\delta$ ) é comumente utilizada quando se utiliza compostos com abundâncias isotópicas naturais e é determinada de acordo com a comparação da abundância da amostra em relação a de padrões internacionais que variam de acordo com o elemento de interesse. Na tabela 2 seguem as formas gasosas e padrões internacionais empregados na determinação isotópica relativa.

**Tabela 2.** Gases de interesses e seus padrões internacionais de cada elemento.

Elemento	Gás	Padrão internacional
Hidrogênio	H <sub>2</sub>	Vienna standard mean ocean water (V-SMOW)
Carbono	CO <sub>2</sub>	Peedee Belemnite (V-PDB)
Nitrogênio	N <sub>2</sub>	Nitrogênio atmosférico (N <sub>2</sub> atm)
Oxigênio	CO <sub>2</sub>	Vienna standard mean ocean water (V-SMOW)
Enxofre	SO <sub>2</sub>	Cañon Diablo Meteorite Troilite (CDT)

**Fonte:** Adaptado de Ducatti (2007a).

Para se calcular essa medida relativa expressada na terminologia delta *per mil*, é utilizada a seguinte expressão adimensional:

$$\delta (amostra, padrão) = \left( \frac{r_{amostra} - r_{padrão}}{r_{padrão}} \right) * 1000$$

### Equação 1

Onde:  $r_{amostra}$  e  $r_{padrão}$  são as razões do isótopo pesado sobre o leve da amostra e do padrão respectivamente. A expressão per mil é utilizada para se elevar a dimensão da mensuração e para isso, o valor obtido é multiplicado por 1000 e acrescentado a expressão per mil a terminologia delta.

O valor da razão isotópica absoluta ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) do nitrogênio atmosférico que é adotado como padrão para análises de nitrogênio é de 0,0036765 no qual é adotado como 0‰ quando realizado a análise isotópica relativa. Assim, amostras expressas na terminologia delta apresentarão valores positivos quando

apresentarem maior concentração de  $^{15}\text{N}$  que o padrão e valores negativos, quando menor.

### 2.3. APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE ISÓTOPOS ESTÁVEIS

Inicialmente na década de 50, os isótopos estáveis foram utilizados por geoquímicos e paleo-oceanógrafos para integrar os isótopos estáveis como uma ferramenta aos estudos dos ciclos globais dos elementos (Lajtha & Michener, 1994). Posteriormente, a ferramenta foi aplicada em outros campos das ciências como agronomia (Devlin & Barker 1971; Araújo *et al.*, 2004), ecologia (Peterson & Fry, 1987; Gannes, Del-rio & Koch, 1998), medicina (Filho & Marchini, 2004), nutrição e fisiologia (Ducatti, 2007b; Ducatti *et al.*, 2011).

Uma vez que as propriedades químicas e físicas dos isótopos são semelhantes, o comportamento de um isótopo e seu análogo é considerado o mesmo no processo seletivo de uma membrana vegetal ou animal e, portanto, atuam como excelentes traçadores biológicos (Ducatti *et al.*, 2011). Segundo Wolf (1969), os isótopos podem ser utilizados para três diferentes finalidades:

- I) Obter evidências da síntese e relações precursor-produto entre compostos conhecidos;
- II) Isolamento, purificação e identificação de intermediários desconhecidos numa cadeia de reações; ou
- III) Ferramenta analítica no acompanhamento de uma reação de compostos conhecidos.

Vários estudos comprovaram que a composição isotópica tecidual passa a ser incorporada de acordo com a composição isotópica da dieta ingerida (Deniro & Epstein, 1976, 1978; Hobson & Clark, 1992a, 1992b) e assim, os traçadores (principalmente de carbono e nitrogênio) têm sido utilizados em diferentes espécies de animais como frangos de corte (Gottmann *et al.*, 2008), poedeiras (Carrijo *et al.*, 2000), peixes (Ducatti, 2007b), codornas (Móri *et al.*, 2007) e ruminantes (Ducatti *et al.*, 2011) e com objetivos variados como analisar o *turnover* dos tecidos (Mituo, 2008; Stradiotti, 2013b), identificar preferência alimentar (Ducatti, 2007b), rastrear a alimentação animal (Denadai *et al.*, 2011)

ou discriminar a origem geográfica do animal (Crittendem *et al.*, 2007; Nakashita *et al.*, 2008).

#### 2.4. TREONINA NA NUTRIÇÃO ANIMAL

As aves necessitam da suplementação da treonina via dieta, pois ela não pode ser sintetizada a partir de outros aminoácidos diferentemente da glicina e da serina que podem ser sintetizadas a partir da treonina. Baker *et al.* (1972) comprovaram que uma dieta livre de glicina e serina pode ser suprida com excesso de treonina. Sua forma isômera L-treonina é a única que pode ser utilizada pelas aves (Baker 1986, 1994; Kidd & Kerr, 1996).

O metabolismo da treonina envolve: 1) Síntese e degradação proteica; 2) Incorporação do nitrogênio do aminoácido no ácido úrico; 3) Conversão do esqueleto carbônico em glicose, gordura, energia ou CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O; e 4) Formação de derivados não-proteicos (Kidd & Kerr, 1996). As enzimas treonina desidratase, treonina desidrogenase e treonina aldolase participam do metabolismo da treonina dependendo da sua rota metabólica (Bernadino *et al.*, 2011). O catabolismo da L-treonina produz piruvato e propionato, produtos glicogênicos que podem ser utilizados para a produção de energia, além de glicina para as necessidades metabólicas (síntese de proteína, creatinina, serina, ácido úrico, sais biliares e glutatona).

A treonina é o terceiro aminoácido limitante para aves alimentadas a base de milho e farelo de soja sendo que sua exigência varia de 0,654 a 0,816% de treonina digestível para o desempenho de frangos de corte machos de alta produção (Rostagno *et al.*, 2011).

Uma peculiaridade da treonina é que a sua exigência para a manutenção é alta em relação aos outros aminoácidos que ocorre devido à sua alta taxa para manutenção do *turnover* proteico e à sua contribuição nas perdas endógenas intestinais (Corzo *et al.*, 2007), realizadas por meio de secreções. Em relação as secreções, 5 a 11% dos resíduos de aminoácidos em enzimas digestivas e 16 a 30% da proteína constituinte da mucina intestinal é constituída de treonina (Dozier *et al.*, 2001; Corzo *et al.*, 2007; Faure *et al.*, 2005).

A mucina é uma glicoproteína composta por treonina, serina e prolina e compõe parte do muco (95% de água e 5% de mucina) que atua como barreira

de proteção contra a ação de enzimas digestivas e a dano físico da digesta por patógenos (Faure *et al.*, 2007; Carvalho, 2009). A importância de cada tipo de mucina ainda não é bem definida, porém aparentemente a mucina ácida atua como barreira bacteriana, enquanto a mucina neutra é mais resistente as proteases endógenas (Campos, 2006). Fatores como alimento, taxa de migração das células da mucosa intestinal e população microbiana influenciam nos tipos e quantidade de mucinas (Uni *et al.*, 2003). A deficiência de treonina pode comprometer os sistemas imunológico e digestivo, além da redução da síntese muscular (Kidd, 1999).

## 2.5. COMPOSTOS ENRIQUECIDOS

A técnica isotópica que adota o  $^{15}\text{N}$  como traçador biológico consiste no fornecimento de um composto químico de razão isotópica ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) diferente da natural para que a seguir, seja avaliado a distribuição do isótopo dentro do organismo ou do sistema em estudo (Knowles & Blackburn, 1993). Desta forma, também é possível abordagem de avaliações de processos metabólicos em diferentes estudos nutricionais (Muramatsu *et al.*, 1987; Stradiotti *et al.*, 2013)

A treonina altamente enriquecida em  $^{15}\text{N}$  (98%) apresenta massa molecular  $120,1192 \text{ g.mol}^{-1}$  ( $\text{C}_4\text{H}_9[\text{N}^{15}]\text{O}_3$ ) e o nitrogênio representa cerca de 12,49 % da molécula. Os compostos enriquecidos isotopicamente são produzidos por meio de cromatografia de troca iônica e destilação. Essa tecnologia de separação e produção de compostos enriquecidos em  $^{15}\text{N}$  é mantida em sigilo por outros países devido a fatores econômicos e/ou estratégicos. No Brasil, há alguns trabalhos focando a produção de compostos enriquecidos em  $^{15}\text{N}$ , destacando o sulfato de amônio (Bendassolli, Trivelin & Ignoto, 2002; Maximo *et al.*, 2000)

## 2.6. UTILIZAÇÃO DA TREONINA

O *turnover* é o processo dinâmico de síntese e degradação dos componentes corporais, em outras palavras, de renovação e todas as substâncias sejam elas orgânicas ou inorgânicos estão sujeitas ao *turnover* (Waterlow, 2006). Este processo dinâmico é dependente de fatores ambientais

e de fatores intrínsecos referentes ao animal (Zuanon, 2003). Quando uma dieta com certa abundância isotópica é substituída por outra distinta ou quando há a ingestão de composto enriquecido isotopicamente, o *turnover* é evidenciado devido a alteração da composição isotópica tecidual (Gannes *et al.*, 1998).

Outro aspecto a se considerar é que o *turnover* é diferenciado para cada tecido. De maneira geral, fígado, pâncreas e tecido adiposo são mais ativos metabolicamente e apresentam alto *turnover*, refletindo as mudanças das dietas mais rapidamente. Em contrapartida, os tecidos menos ativos como o colágeno e os ossos, apresentam baixo *turnover* (Hobson & Clark, 1992a) refletindo lentamente as mudanças das dietas.

A eficiência de utilização representa a absorção de um nutriente, pois considera a relação do nutriente ingerido e que foi depositado pelo organismo (Donato, 2003). A eficiência de utilização pode ser estimada a partir da técnica de abate comparativo quando se faz análises das carcaças das aves para se calcular a retenção do nutriente ou a técnica de balanço de nitrogênio quando se mensura as excretas pressupondo que o que foi ingerido será depositado ou excretado e, finalmente, calcula-se a retenção.

Considerando a importância da treonina na alimentação de frangos de corte e devido a necessidade de estudos para melhor compreensão do metabolismo da treonina, o presente trabalho teve como objetivo geral abordar a utilização da L-(<sup>15</sup>N) treonina em diferentes tecidos de frangos de corte.

### 3. BIBLIOGRAFIA

ARAÚJO, E. D. S.; MEDEIROS, A. F. A.; DIAS, F. D. C.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M.; ALVES, B. J. R. *Quantificação do N do solo derivado das raízes da soja utilizando o isótopo <sup>15</sup>N*. **Revista Universidade Rural**, Série Ciência da Vida, v.24, n.1, p.7-12, 2004.

BAKER, D. H.; HILL, T. M.; KLELSS, A. J. *Nutritional evidence concerning formation of glycine from threonine in the chick*. **Journal of Animal Science**, v.34, p.582-586, 1972.

BAKER, D. H. *Utilization of isomers and analogs of amino acids*. In: **Progress in Food and Nutrition Science**, [CANDRA R. K., ed.], Pergamon Press, p.137-178, 1986.



BAKER, D. H. *Utilization of precursors for L-amino acids. In: Amino acids in farm animal nutrition* [D'MELLO, J. P. F., ed.], CAB Internacional., p.37-63, 1994.

BENDASSOLLI, A. J.; TRIVELIN, P. C. O.; IGNOTO, R. de F. Produção de amônia anidra e aquamônia enriquecida em  $^{15}\text{N}$  a partir de  $(^{15}\text{NH}_2)_2\text{SO}_4$ . **Scientia Agricola**, v.59, n.3, 2002.

BERNADINO, V. M. P.; ALBINO, L. F.; ROSTAGNO, H. S.; OLIVEIRA, M. G. de A.; MENDES, F. Q.; PEREIRA, C. M. C.; FERREIRA, I. M.; MAIA, R. C. *Efeito de diferentes relações treonina:lisina digestíveis, suplementadas ou não com glicina, sobre a atividade enzimática em pintos de corte.* **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.12, p.2732-2738, 2011.

KNOWLES, R.; BLACKBURN, T. H. **Nitroge isotope techniques**. San Diego: Academic Press, p.311, 1993.

CAMPOS, D. M. B. Efeito do sorgo sobre o desempenho zootécnico, características da carcaça e o desenvolvimento da mucosa intestinal de frangos. 2006. 50p. **Dissertação (Mestrado)** – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

CARRIJO, A. S.; PEZZATO, A. C.; 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**, v.2, n.3, 2000.

CARVALHO, T. A. *Avaliação de dietas com glutamina e glicina para pintos de corte contendo diferentes relações treonina:lisina.* **Dissertação (Mestrado)** - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 105p., 2009.

COBELLI, C.; FOSTER, D.M. Compartmental models: Theory and practice using the SAAM II software system. In: CLIFFORD & MÜLLER (Eds.) **Mathematical modeling in experimental nutrition**. New York, Plenum Press, p.79-101, 1998.

CORZO, A.; KIDD, A. T.; DOZIER, W. A. *Dietary threonine needs for growth and immunity of broilers raised under different litter conditions.* **Journal of Applied Poultry Research**, v.16, p.574-582, 2007.

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

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

DENADAI, J. C.; DUCATTI, C.; SARTORI, J. R.; PEZZATO, A. C.; GOTTMANN, R. *Rastreabilidade da farinha de carne e ossos bovinos em ovos de poedeiras comerciais pela técnica dos isótopos estáveis do carbono e nitrogênio*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.12, p.2760-2766, 2011.

DENIRO, M.J.; EPSTEIN, S. *You are what you eat (plus a few ‰) the carbono isotope cycle in food chains*. **Geochimical Society of America**, v.6, p.834, 1976.

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

DEVLIN, R.M.; BARKER, A.V. **Photosynthesis**. Van Nostrand Reinhold Company: New York. 304p, 1971.

DONATO, D. C. Z. Respostas de frangos de corte às ingestões de metionina+cistina e treonina: desempenho, impacto ambiental e econômico. 2013, 88p. **Tese (Doutorado)** – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

DOZIER, W. A.; MORAN JR, E. T.; KIDD, M. T. *Male and female broiler responses to low and adequate dietary threonine on nitrogen and energy balance*. **Poultry Science**, v.80, p.926-930, 2001.

DUCATTI, C. *Isótopos Estáveis Ambientais*. Centro de Isótopos Estáveis Ambientais Depto. De Física e Biofísica - IB, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brasil, **Apostila**, pg. 205, 2007a.

DUCATTI, C. *Aplicação dos isótopos estáveis em aquicultura*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, suplemento especial, p.1-10, 2007b.

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

FAURE, M.; MOENNOZ, D.; MONTIGON, F.; METTRAUX, C.; BREUILLÉ, D.; BALLÈVE, O. *Dietary threonine restriction specifically reduces intestinal mucin synthesis in rats*. **Journal of Nutrition**, v.135, p.486-491, 2005.

FAURE, M.; CHONÉ, F.; METTRAUX, C.; GODIN, J. P.; BÊCHEREAU, F.; VUICHOUD, J.; PAPET, L.; BREUILLÉ, D.; OBLÉD, C. *Threonine utilization for synthesis of acute phase proteins, intestinal proteins and mucins is increased during sepsis in rats*. **Journal of Nutrition**, v.137, p.1802-1807, 2007.

FILHO, A. B.; MARCHINI, J. S. *Stable isotopes use on protein turnover in intensive care medicine*. **Revista brasileira terapia intensiva**, v.16, n.3, p.192-196, 2004.

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

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

GREEN M. G.; GREEN J. B. *The application of compartmental analysis to research in nutrition. Annual Review of Nutrition*. Annual Reviews Inc, JO:41-fi1, 1990.

HAVENSTEIN, G. B.; FERKET, P. R.; QURESHI, M. A. Carcass composition and yield of 1957 versus 2001 broilers when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. **Poultry Science**, Champaign, v.82, p.1509-1518, 2003.

HOBSON, K. A.; CLARK, R. B. *Assessing avian diets using stable isotopes I: Turnover of <sup>13</sup>C in tissues. The Condor*, v.94, p.181-188, 1992a.

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

JONES, L.; ATKINS, P. **Chemistry: molecules, matter, and change**, W. H. Freeman and company: New York, 4<sup>th</sup> ed., p. 1-47, 2000.

KIDD, M. T.; KERR, B. J. *L-Threonine for poultry: a review. Journal Applied Poultry Research*, v.5, p.358-367, 1996.

KIDD, M. T. *Threonine needs of finishing broilers: growth, carcass, and economic responses. Journal Applied Poultry Research*, v.8, pp.160-169, 1999.

LAJTHA, K.; MICHENER, R.H. **Stable isotopes in ecology and environmental science**. Blackwell Scientific Publications: Oxford, 316p., 1994.

MAXIMO, E.; BENDASSOLLI, J.A.; TRIVELIN, P.C.O. Enrichment of <sup>15</sup>N by coupling three systems of ion-exchange chromatography columns. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON ISOTOPE, 3., Vancouver, 2000. **Isotope production and applications in the 21<sup>st</sup> century**. Singapore: World Scientific Printers, p.137-139, 2000.

MITUO, M. A. O. *Turnover do carbono-13 nos diferentes tecidos de frangos de corte em diferentes fases de crescimento. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 59p, 2008.*

MÓRI, C.; GARCIA, E. A.; DUCATTI, C.; DENADAI, J. C.; PELÍCIA, K.; GOTTMANN, R.; MITUO, M. A. O.; BORDINHON, A. M. *Traceability of animal byproducts in quail (*Coturnix coturnix japonica*) tissues using carbon ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) and nitrogen ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) stable isotopes*. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.9, n.4, p.263-269, 2007.

MURAMATSU, T.; HIRAMOTO, K.; TASAKI, I.; OKUMURA, J. Effect of protein starvation on protein turnover in liver, oviduct and whole body of laying hens. **Comparative Biochemistry and Physiology, Japan**, v. 87(2), n. 2, p. 227-232, 1987.

NAKASHITA, R.; SUZUKI, Y.; AKAMATSU, F.; IIZUMI, Y.; KORENAGA, T.; CHIKARAISHI, Y. *Stable carbon, nitrogen, and oxygen isotope analysis as a potential tool for verifying geographical origin of beef*. **Analytica Chimica Acta**, v.617, p.148-152, 2008.

PETERSON, B. J.; FRY B. *Stable isotopes in ecosystem studies*. **Annual review of ecology and systematics**, v. 18, p.293-320, 1987.

PATTERSON, C. S.; KUPER, H. S.; NANNEY, T. R. **Principles of chemistry**, New York: Meredith publishing company, p.56-83, 1967.

ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; DONZELE, J. L.; GOMES, P. C.; OLIVEIRA, R. F. de; LOPES, D. C.; FERREIRA, A. S.; BARRETO, S. L. de T.; EUCLIDES, R. F. **Tabelas brasileiras para aves e suínos – Composição de alimentos e exigências nutricionais**, 3ª ed., Viçosa, 2011.

SNYDER, M. K. **Chemistry: structure and reactions**. Holt, Rinehart and Winston, Inc.: Bel Air, p.83-119, 1966.

STOLL B.; HENRY J.; REEDS P. J.; YU H.; JAHOR F.; BURRIN D. G. *Catabolism dominates the first-pass intestinal metabolism of dietary essential amino acids in milk protein-fed piglets*. **Journal Nutrition**, v.128, pp.606–614, 1998.

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

UNI, Z., SMIRNOV, A., SKALAN, D. Pre and Posthatch of Development of Goblet Cells in the Broiler Small Intestine: Effect of Delayed Access to Feed. **Poultry Science**, v.82, p. 320-327, 2003.

WATERLOW, J. C. **Protein turnover**. CAB Internacional: Kings Lynn, 2006

WOLF, G. **Isotopes in biology**. New York: Academic Press, 1969. 173p.

ZUANON, J.A.S. *Turnover de carbono em tecido muscular de alevinos de tilápias do Nilo (Oreochromis niloticus, cichlidae)*. **Tese (Doutorado em Aquicultura)** – Centro de Aquicultura da UNESP, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 65p., 2003.

## **CAPÍTULO 2**

## EFICIÊNCIA DE UTILIZAÇÃO DA L-(<sup>15</sup>N) TREONINA EM DIFERENTES TECIDOS DE FRANGOS DE CORTE

**RESUMO:** Modelos de predição de exigências nutricionais podem adotar uma única eficiência de utilização para o corpo todo, porém a compartimentalização dos diferentes tecidos de frangos de corte é necessária, uma vez que os tecidos possuem comportamentos biológicos diferenciados, assim como a utilização dos nutrientes. Deste modo, o presente estudo teve como objetivo determinar as eficiências de utilização da L-(<sup>15</sup>N) treonina em diferentes tecidos de frangos de corte de 4 a 9 dias de idade e utilizar estes valores em um modelo mecanicista para se determinar a exigência de treonina para frangos de corte no período de 1 a 7 dias. Os tecidos avaliados foram: corpo depenado; penas; peito; fígado; jejuno; plasma; sartório; e rins. Foram utilizados 70 pintos machos da linhagem Cobb alojados em gaiolas metabólicas individuais. A dosagem do aminoácido enriquecido (98 % em átomos de <sup>15</sup>N) foi de 69,6 mmol.kg<sup>-1</sup> ave e o composto foi diluído em água destilada e homogeneizada com a dieta natural a base de milho e soja. Foram cinco dias de fornecimento da dieta enriquecida. Os abate e coleta dos tecidos ocorreram nos tempos 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 126, 132, 144, 168, 192, 216, 240, 264 e 288 horas após a início do fornecimento da dieta enriquecida. Foram realizadas análises de determinação isotópica de nitrogênio (% átomos de <sup>15</sup>N) em um espectrômetro de massa de razão isotópica (ANCA-GSL), além das análises de matéria seca e proteína dos tecidos coletados. Posteriormente, foi realizado o balanço de massas da L-(<sup>15</sup>N) treonina para verificar a distribuição do aminoácido nos diferentes tecidos da ave e calculadas as suas respectivas eficiências. As eficiências de utilização da L-(<sup>15</sup>N) treonina foram: peito (78,27%); penas (73,02%); corpo depenado (59,48%); fígado (49,47%); sartório (49,17%); rins (47,79%); jejuno (43,55%); e plasma (17,89%) e a exigência de treonina determinada pelo modelo foi de 247mg/ave/dia.

**Palavras-chave:** isótopo estável, aminoácido marcado, balanço de massa.

## EFFICIENCY OF UTILIZATION OF L-(<sup>15</sup>N) THREONINE IN DIFFERENT TISSUES OF BROILER CHICKENS

**ABSTRACT:** Nutritional requirements models may adopt a single efficiency of utilization for the whole body, but different compartmentalization of tissues of broiler chickens is required, due to the different biologicals of tissues, as well as its utilization of nutrients. Thus, this study aimed to determine the efficiencies of utilization of L-(<sup>15</sup>N) threonine in different tissues of broiler chickens 4-9 days old and use these values in a mechanistic model to determine the threonine requirement for broilers in the period from 1 to 7 days. The tissues evaluated were: free-feathers body; feathers; breast; liver; jejunum; plasma; sartorius; and kidney. Seventy male broilers from Cobb were housed in individual metabolic cages. The dosage of the amino acid-enriched (98%, <sup>15</sup>N atoms%) was 69.6 mmol.kg bird<sup>-1</sup> and the labelled amino acid was diluted in distilled water and homogenized with a natural diet based on corn and soybean. There were five days of L-(<sup>15</sup>N) threonine supply in the diet. The slaughter and collection of tissues occurred at 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 126, 132, 144, 168, 192, 216, 240, 264 and 288 hours after the start of supply of enriched diet. Isotopic concentrations of nitrogen analysis (<sup>15</sup>N atoms%) were determined in a mass spectrometer of isotopic ratio (ANCA-GSL), in addition to analyzes of dry matter and protein of the collected tissues. Subsequently, it was performed the mass balance of L-(<sup>15</sup>N) threonine to verify the amino acid distribution in different tissues of the bird and then, calculate their respective efficiencies. The efficiencies of utilization of L-(<sup>15</sup>N) threonine were: breast (78,27%); feathers (73.02%); free-feathrs body (59,48%); liver (49,47%); Sartorius (49,17%); kidneys (47,79%); jejunum (43,55%); and plasma (17,89%) and threonine requirement determined by the model was 247mg/bird/day.

**Key-words:** Stable isotope, labeled amino acid, mass balance.



## 1. INTRODUÇÃO

A treonina é um aminoácido estritamente essencial e não possui via conhecida de síntese endógena para sua produção. A sua exigência para manutenção é relativamente alta em relação aos outros aminoácidos, pois parte da treonina dietética não é recuperada pelo sistema porta sendo destinada a produção de mucina ou catabolizada pelos enterócitos (Stoll *et al.*, 1998). A deficiência da treonina pode trazer prejuízos aos sistemas imunológico e digestivo e conseqüentemente, redução do desempenho do animal (Atencio *et al.*, 2004).

Deste modo, é essencial o atendimento das exigências nutricionais das aves para que possam expressar todo seu potencial de crescimento. A modelagem matemática permite estimar a ingestão ideal de um aminoácido para uma população (Sakomura *et al.*, 2014), entretanto, para a elaboração destes modelos é necessária a determinação da eficiência de utilização dos aminoácidos. Tradicionalmente, a eficiência de utilização tem sido calculada pela relação entre a deposição e ingestão do aminoácido ingerido, desse modo, considera que proporção do aminoácido ingerido que foi efetivamente depositada como tecido proteico (Silva *et al.*, 2014).

De acordo com Emmans (1989) as taxas de crescimento do corpo e da pena diferem e a maturidade desses tecidos serão atingidos em idades diferentes. Uma vez que os modelos matemáticos utilizados atualmente adotam uma única eficiência de utilização para todo o corpo (Donato, 2013), há a necessidade da separação da eficiência entre compartimentos.

Neste sentido, os isótopos estáveis permitem fracionar a deposição do isótopo para diferentes tecidos, uma vez que atuam como eficientes traçadores biológicos (Green & Green 1990; Cobelli & Foster, 1998).

Deste modo, o presente estudo teve como objetivo determinar as eficiências de utilização do nitrogênio proveniente da L-(<sup>15</sup>N) treonina em diferentes tecidos em frangos de corte no período de 4 a 9 dias de idade e a determinação da exigência de treonina utilizando as eficiências de utilização determinadas para corpo depenado e penas em um modelo mecanicista desenvolvido pela UNESP.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Definição da dose

Foi realizado um ensaio piloto para a determinação da dose da L-(<sup>15</sup>N) treonina sendo que há uma escassez de dados relacionados a dose necessária para ter um enriquecimento adequado para a quantificação isotópica. Foram avaliadas cinco doses calculadas de acordo com o peso vivo da ave: D1) 17,4 μmol/kg ave; D2) 26,1 μmol/kg ave; D3) 34,8 μmol/kg ave (valor adaptado segundo Muramatsu *et al.*, 1987); D4) 52,2 μmol/kg ave; e D5) 69,6 μmol/kg ave. A L-(<sup>15</sup>N) treonina foi diluída em água destilada dentro de um frasco reagente graduado e posteriormente conservada. Para se quantificar a dose em μL/kg de cada tratamento foram realizados os seguintes cálculos (equações 1, 2 e 3):

$$QtdAA1 = D \times P \times Desp$$

#### Equação 1

Onde *QtdAA1* é a quantidade de aminoácido enriquecido (μmol); *D* é a dose de aminoácido enriquecido referente a adição de aminoácido <sup>15</sup>N (μmol); *P* é o peso em Kg do animal; *Desp* é um percentual de 3% que foi adicionado a mais devido aos desperdícios pelo animal (dados não publicados).

$$QtdAA2 = (QtdAA1 \times 120,11) \div 1000$$

#### Equação 2

Onde *QtdAA2* é a quantidade de aminoácido enriquecido (mg); *QtdAA1* é a quantidade de aminoácido enriquecido (μmol); O valor 120,11 é o peso molecular da treonina enriquecida (fornecido por Cambridge Isotope Laboratories®); O valor 1000 é usado como fator de conversão de microgramas para miligramas.

$$QtdAA3 = QtdAA2 \div C$$

#### Equação 3

Onde *QtdAA3* é a quantidade de aminoácido enriquecido em (mL); *QtdAA2* é a quantidade de aminoácido enriquecido em (mg); *C* é a concentração do aminoácido enriquecido (mg/mL). Após esse cálculo é possível transformar mL em μL multiplicando o valor de *QtdAA3* por 1000 e determinando assim a dose em μL/kg.

Com base nos resultados deste ensaio piloto, a dose de L-(<sup>15</sup>N) treonina (Cambridge Isotope Laboratories®) escolhida para o experimento foi de 69,6

mmol de L-(<sup>15</sup>N) treonina/kg ave, referente ao D5, o qual apresentou um enriquecimento bastante expressivo nos tecidos estudados e com uma diferença grande provocada pelo enriquecimento natural da dieta.

## 2.2. Animais, manejo e rações experimentais

O experimento foi conduzido no Laboratório de Ciências Avícolas do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Campus de Jaboticabal/SP. Os procedimentos que estão descritos foram aprovados pelo Comitê de Ética sob protocolo 9999/14 (CEUA). Foram utilizados 70 pintos de corte machos com um dia de idade da linhagem Cobb® 500.

As aves foram alojadas individualmente em gaiolas metabólicas sob dimensões 50 x 50 x 50 cm, com comedouros do tipo calha e bebedouros do tipo *nipple*. O experimento foi realizado em um galpão que conta com o sistema de cortinas para o controle da temperatura ambiente. Ao longo dos galpões foram distribuídos termohigrometros para o registro diário de temperatura e umidade. O programa de luz utilizado durante o período experimental foi de 24 horas de luz. A pesagem e o consumo dos animais foram registrados diariamente. As excretas foram coletadas e mensuradas diariamente através de uma bandeja metálica colocada sob as gaiolas.

A composição da ração experimental foi analisada (matéria seca, energia bruta, proteína bruta, extrato etéreo e cinzas) no Laboratório de Análise de Nutrição Animal da FCAV, segundo a metodologia da AOAC (1995) e seu valor isotópico foi analisado no Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA/USP) em Piracicaba/SP. A dieta foi formulada de acordo com as recomendações de Rostagno *et al.* (2011) para frangos de corte machos de desempenho superior (tabela 1).

Durante o período de enriquecimento da dieta, a quantidade de ração fornecida diariamente foi controlada para garantir que não houvessem desperdícios e mensurada por meio do manejo denominado *pair-feeding* (Sartori *et al.*, 2003). Para isso, o consumo médio de dez aves alimentadas *ad libitum* foi mensurado para determinar a quantidade de ração que seria fornecida para as aves em experimento no dia seguinte.

### 2.3. Enriquecimento da dieta e coletas de amostras

O experimento compreendeu 12 dias, sendo que apenas nos cinco primeiros dias houve o enriquecimento da dieta com L-( $^{15}\text{N}$ ) treonina. Antes do enriquecimento da dieta experimental, as aves foram pesadas para calcular o volume do composto enriquecido diluído para cada ave. A quantidade calculada foi adicionada à ração em vários pontos utilizando micropipetas de volume variável (10 a 100  $\mu\text{L}$  e 100 a 1000  $\mu\text{L}$ ) e misturada homogeneamente.

As coletas de amostras ocorreram às 0 (abate referencial, dieta sem enriquecimento), 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 126, 132, 144, 168, 182, 206, 240, 264, 288 horas após o início do enriquecimento da dieta. O encerramento do enriquecimento da dieta ocorreu nos abates posteriores ao das 120 horas e as aves passaram a ser alimentadas *ad libitum*.

Para cada amostragem, três aves foram sacrificadas e então coletados os tecidos de interesse. As amostragens dos tecidos seguiram os seguintes critérios: as penas foram retiradas de regiões aleatórias da ave; do fígado foi retirado um seguimento lateral do lado direito do órgão; do músculo peitoral as amostras foram obtidas a partir do terço médio longitudinal do peitoral maior esquerdo; das vísceras foi coletado uma amostra de 10 cm da parte medial do jejuno e lavada com uma pisseta com água destilada para a retirada da digesta; o plasma sanguíneo foi coletado por punção cardíaca; os rins e o músculo sartório foram retirados de ambos os lados; além da coleta total de excretas.

Para quantificar o  $^{15}\text{N}$  do corpo depenado foram realizadas três coletas adicionais: uma no início (0h), meio (72h) e fim (120h) do período de enriquecimento da dieta, também com três repetições, com a finalidade de se mensurar a quantidade de  $^{15}\text{N}$  total presente no corpo depenado. Para isso, as aves foram sacrificadas, depenadas, pesadas, congeladas e processadas para análise.

**Tabela 1.** Composição nutricional e calculada das rações experimentais

<b>Ingredientes (%)</b>	<b>Fase inicial (4 a 16 dias)</b>
Milho (7,88%)	57,942
Soja farelo (45%)	35,674
Óleo de soja	2,395
Fosfato bicálcico	1,780
Calcário	0,696
Sal comum	0,428
DL-Metionina (99%)	0,345
L-Lisina HCL (54,6%)	0,434
*Suplemento vitamínico-mineral (0,2%)	0,200
L-Treonina (98,5%)	0,106
<b>Total</b>	<b>100,000</b>
<b>Composição nutricional calculada</b>	<b>Exigências nutricionais</b>
Energ. met. (Kcal/Kg)	3010,625
Proteína bruta (%)	21,725
Cálcio (%)	0,876
Sódio (%)	0,214
Fósforo disponível (%)	0,431
Cloro (%)	0,308
Metionina dig. (%)	0,628
Lisina dig. (%)	1,264
Treonina dig. (%)	0,822
Valor isotópico médio ( $\delta^{15}\text{N}$ , em ‰)	1,909

\*Ac. Fólico 437,50 mg/kg; ac. Pantotênico 6250 mg/kg; biotina 44mg/kg; cobre 6250mg/kg; ferro 31,25 mg/kg; iodo 625 mg/kg; manganês 44g/kg; niacina 18,75 g/kg; selênio 187,5 mg/kg; vit. A 4687500 UI/kg; vit. B 1250 mg/kg; vit B12 7500 mcg/kg; vit B2 3125 mg/kg; vit B6 1750 mg/kg; vit. D3 1187500 UI/kg; vit. E 17500 UI/kg; vit. K3 940 mg/kg; zinco 40,65 g/kg

#### 2.4. Processamento das amostras

Todas as amostras foram acondicionadas em recipientes identificados e imediatamente congeladas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para posterior secagem realizada em um liofilizador (Edwards 501, Thermo) por 72 horas a 800 mbar de pressão.

Após a liofilização, as amostras de peito, fígado, jejuno e excretas foram pré-móidas em um micromoinho (A11 Basic, IKA). Posteriormente, todas as amostras foram móidas em moinho criogênico (SPEX SamplePrep 2010 Geno/Grinder 2010) à temperatura em torno de  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A amostra foi acondicionada em frascos de policarbonato juntamente com esferas magnéticas e os frascos são imergidos em nitrogênio líquido durante alguns minutos. Deste modo, há um congelamento da amostra contida no frasco que então é

pulverizada pelo impacto entre a amostra e as esferas magnéticas compreendendo três a dez minutos para os tecidos e cinco minutos para as dietas experimentais, resultando em um material homogêneo de finíssima granulometria com aspecto de talco (Licatti, 1997; Ducatti, 2007).

## 2.5. Análises isotópicas

Para a realização das análises isotópicas, cerca de 500 a 1200 µg de matéria seca da amostra foram pesadas em uma balança analítica eletrônica (Mettler Toledo XP6) e acondicionadas em cápsulas de estanho. Em seguida, as amostras foram queimadas em forno de combustão do analisador elementar acoplado ao espectrômetro de massas (ANCA-SL) obtendo-se os gases de combustão (N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O). Em seguida, os gases foram arrastados por um fluxo de hélio para as etapas de purificação do N<sub>2</sub>. Essas incluem-se: forno de redução (retenção do excesso de O<sub>2</sub> da combustão e transformação de possíveis NO<sub>x</sub> em N<sub>2</sub>); coluna de retenção de água (perclorato de magnésio); coluna de retenção de CO<sub>2</sub> (carbosorb); e cromatógrafo gasoso. As moléculas de N<sub>2</sub>, assim purificadas, foram analisadas em um espectrômetro de massas de razão isotópica (ANCA-SL) do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA/USP), *Campus* de Piracicaba.

Os resultados de incorporação do nitrogênio enriquecido nos tecidos foram expressos em % de átomos de <sup>15</sup>N, com erro de análise da ordem de 0,1%.

## 2.6. Determinação da deposição de <sup>15</sup>N nos tecidos (balanço de massas)

A dieta a base de milho e soja apresentaram uma concentração natural de 0,367 atm%. Apesar de sua incorporação tender a esse valor nos diferentes tecidos do animal, essa incorporação inicial pode conter pequenas diferenças referentes ao fracionamento isotópico entre cada tecido. Levando essa consideração, o valor do <sup>15</sup>N incorporado proveniente da L-(<sup>15</sup>N) treonina nos tecidos foi calculado de acordo com a equação 4. Essa equação considera que todo o enriquecimento acima do inicial é proveniente do composto enriquecido.

$$Dep^{15}N = Mt \times (Nt/100) \times (atm\% - atm\%_0)/100$$

**Equação 4**

Onde  $Dep^{15N}$  é a massa ( $\mu\text{g}$ ) de  $^{15}\text{N}$  depositado no tecido;  $Mt$  é a massa seca total ( $\mu\text{g}$ ) do tecido;  $Nt$  é o percentual de nitrogênio total no tecido;  $atm\%$  é o valor da abundância de  $^{15}\text{N}$  em percentual da amostra enriquecida;  $atm\%_0$  representa o enriquecimento inicial do tecido específico.

A recuperação da L-( $^{15}\text{N}$ ) treonina em cada tecido foi determinada pela deposição de  $^{15}\text{N}$  tecidual calculada de acordo com a equação 4, dividido pela ingestão total de  $^{15}\text{N}$ . Logo, esse valor representa qual a porcentagem da dieta ingerida que foi incorporada naquele tecido.

## 2.7. Determinação da eficiência de utilização

A eficiência de utilização nos diferentes tecidos de frango de corte foi calculada de acordo com a equação 5.

$$Ef = [(Dep^{15N} \div \text{tecido}(MN)) / (Ing^{15N} \div \text{ração}(MN))] \times 100$$

### Equação 5

Onde  $Ef$  é o valor da eficiência de utilização da L-( $^{15}\text{N}$ ) treonina;  $Dep^{15N}$  é o valor de deposição (mg) do  $^{15}\text{N}$  proveniente da L-( $^{15}\text{N}$ ) treonina tecidual;  $\text{tecido}(MN)$  é o peso do tecido em gramas na matéria natural;  $Ing^{15N}$  é a quantidade ingerida (mg) de  $^{15}\text{N}$  proveniente da L-( $^{15}\text{N}$ ) treonina; e  $\text{ração}(MN)$  é a quantidade ingerida, em gramas, de ração na matéria natural.

## 2.8. Aplicação das eficiências de utilização

Foi realizado uma simulação para avaliar as eficiências de utilização determinadas no modelo desenvolvidos nos estudos realizados na UNESP para calcular a exigência de treonina conforme a equação 6:

$$Exig = ((Thr_{corpo} \times GPP_{corpo}) \div Ef_{corpo}) + ((Thr_{penas} \times GPP_{penas}) \div Ef_{penas}) + (((PPM)/1000)^{0,73}) * (PP/1000/PPM)) * 75,5 + (TPPN * PPN * Treo_{Protpenas})) * 1000$$

### Equação 6

Onde:  $Exig$  = exigência de treonina (mg/dia)

$Thr_{corpo}$  = quantidade de treonina em cada grama de proteína corporal (mg/g)

$GPP_{corpo}$  = ganho de peso proteico depositado no corpo por dia (g/dia)

$Ef_{corpo}$  = Eficiência de utilização da treonina para corpo depenado

$Thr_{penas}$  = quantidade de treonina em cada grama de proteína nas penas (mg/g)

$GPP_{penas}$  = ganho de peso proteico depositado nas penas por dia (g/dia)

$Ef_{penas}$  = eficiência de utilização da treonina para penas

$PPM$  = peso proteico à maturidade (kg)

$PP$  = peso proteico da ave (g)

$TPPN$  = taxa de perda de penas

$PPN$  = peso proteico da pena (g)



### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Recuperação e eficiência de utilização

Na tabela 2 estão presentes as recuperações do  $^{14}\text{N}$  e do  $^{15}\text{N}$  total ingeridos que foram depositados em diferentes tecidos, mensuradas no período de 4 a 9 dias. A recuperação representa a porcentagem da quantidade ingerida que foi depositada em cada tecido.

**Tabela 2.** Recuperações do  $^{14}\text{N}$  e  $^{15}\text{N}$  totais em diferentes tecidos de frango de corte

Tecido	Deposição (%)	
	$^{14}\text{N}$ total	$^{15}\text{N}$ total
Corpo depenado	67,025	67,358
Excreta	25,387	24,799
Pena	7,855	7,624
Peito	14,814	14,812
Plasma	1,240	1,284
Fígado	1,787	1,914
Intestino	1,160	1,144
Rim	0,476	0,482

O valor utilizado do  $^{15}\text{N}$  total é a soma do  $^{15}\text{N}$  proveniente da ração e do composto sintético (L- $^{15}\text{N}$ ) treonina). Estes resultados comprovam que o comportamento do  $^{14}\text{N}$  e  $^{15}\text{N}$  são semelhantes no organismo, não havendo uma distinção pelo organismo entre eles.

As deposições e as recuperações (em  $\mu\text{g}$  e % da ingestão total) da L- $^{15}\text{N}$ ) treonina nos tecidos de frango de corte durante os períodos de 4 a 9 e 9 a 16 dias estão descritas nas tabelas 3 e 4. A seguir, a figura 1 ilustra a deposição da L- $^{15}\text{N}$ ) treonina nos diferentes tecidos de frangos de corte no período de 4 a 16 dias.

**Tabela 3.** Deposições da L-(<sup>15</sup>N) treonina (expressa em µg e % do total ingerido) de diferentes tecidos de frangos de corte de 4 a 9 dias

Tempo (h)	<sup>15</sup> N ingerido (µg)	Recuperação (µg) do <sup>15</sup> N									
		Corpo depenado	Penas	Excreta	Peito	Fígado	Jejuno	Plasma	Rim	Sartório	<sup>b</sup> Total
6	75,262	-	0,562 (0,746%)	1,314 (1,745%)	1,277 (1,697%)	0,512 (0,680%)	0,351 (0,466%)	1,318 (1,751%)	0,185 (0,246%)	0,103 (0,137%)	5,622 (7,469%)
12	82,405	-	1,320 (1,601%)	4,769 (5,787%)	4,876 (5,917%)	1,008 (1,223%)	1,483 (1,800%)	2,916 (3,539%)	0,806 <b><sup>a</sup>(0,978%)</b>	0,426 (0,517%)	17,604 (21,362%)
24	88,165	-	1,281 (1,452%)	10,891 (12,353%)	5,796 (6,574%)	1,630 (1,849%)	2,029 <b><sup>a</sup>(2,301%)</b>	3,455 <b><sup>a</sup>(3,919%)</b>	0,702 (0,796%)	0,300 (0,340%)	26,084 (29,585%)
48	190,969	-	2,228 (1,166%)	24,213 (12,679%)	22,453 (11,757%)	3,885 (2,034%)	3,579 (1,874%)	6,915 (3,621%)	1,185 (0,621%)	0,654 (0,342%)	65,112 (34,144%)
72	318,408	239,072 <b><sup>a</sup>(75,823%)</b>	3,142 (0,986%)	37,041 (11,633%)	35,408 (11,120%)	7,768 (2,440%)	4,923 (1,546%)	8,511 (2,673%)	2,075 (0,652%)	0,720 (0,226%)	99,588 (31,276%)
96	474,358	-	17,480 <b><sup>a</sup>(3,684%)</b>	52,539 (11,076%)	64,159 (13,525%)	11,087 (2,337%)	7,613 (1,605%)	12,256 (2,584%)	2,889 (0,609%)	1,134 (0,239%)	169,157 (35,660%)
120	660,104	490,414 (74,293%)	7,939 (1,202%)	67,542 (10,232%)	98,763 <b><sup>a</sup>(14,962%)</b>	15,632 (2,368%)	8,998 (1,363%)	12,466 (1,888%)	3,772 (0,571%)	1,436 (0,218%)	261,548 (32,805%)

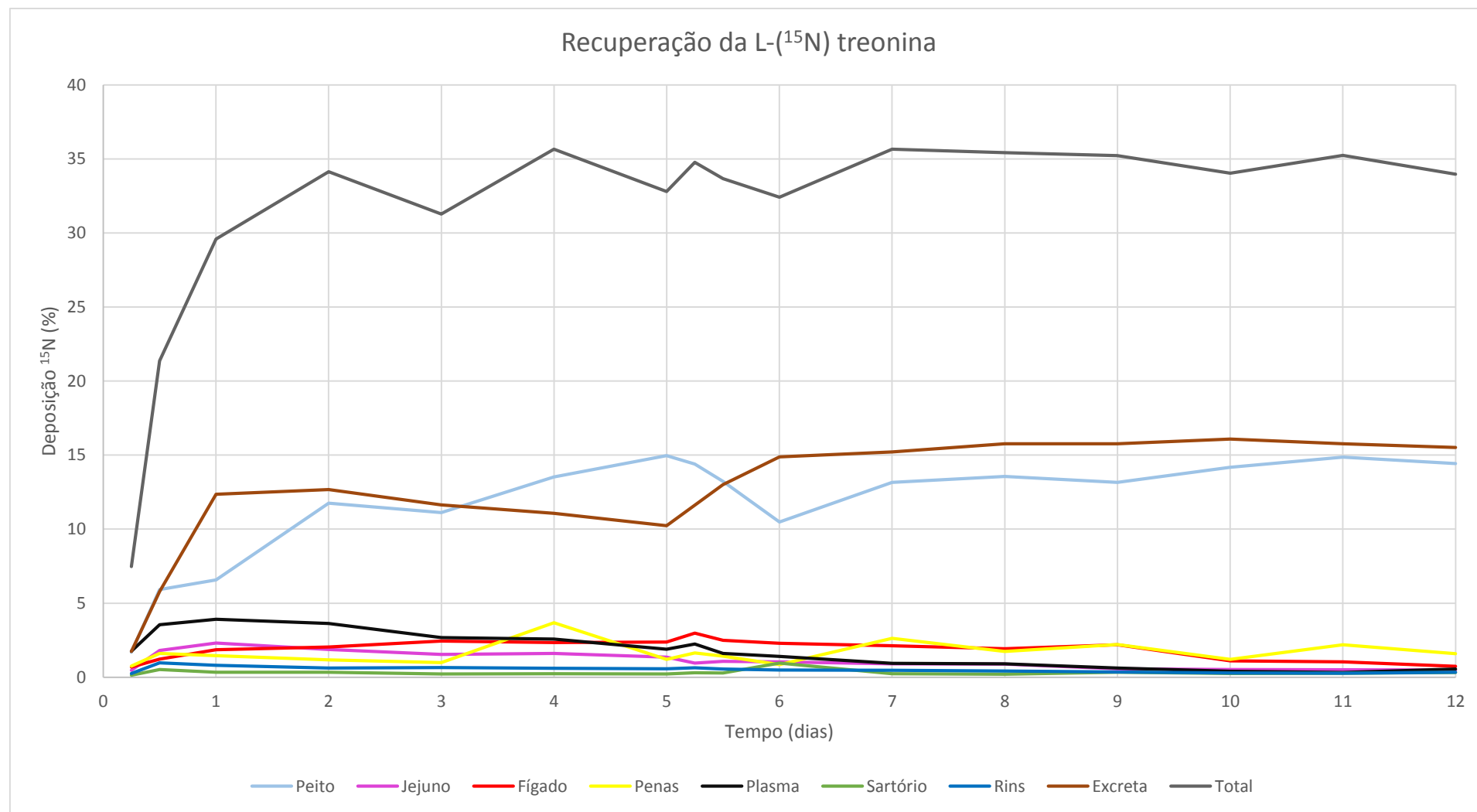
<sup>a</sup>Valores de recuperação máxima de L-(<sup>15</sup>N) treonina

<sup>b</sup>As deposições de corpo depenado não foram incluídas na soma da recuperação total

**Tabela 4.** Deposição e recuperação da L-(<sup>15</sup>N) treonina (expressa em µg e % do total ingerido) em diferentes tecidos de frangos de corte de 9 a 16 dias

Tempo (h)	<sup>15</sup> N ingerido (µg)	Recuperação (µg) do <sup>15</sup> N								
		Penas	Excreta	Peito	Fígado	Jejuno	Plasma	Rim	Sartório	<sup>b</sup> Total
126	660,104	10,865 (1,645%)	76,676 (11,616%)	95,009 (14,393%)	19,616 <b><sup>a</sup>(2,972%)</b>	6,348 (0,962%)	14,789 (2,240%)	4,230 (0,641%)	2,046 (0,310%)	229,579 (34,779%)
132	660,104	9,439 (1,429%)	85,913 (13,015%)	87,262 (13,219%)	16,490 (2,498%)	7,040 (1,066%)	10,636 (1,611%)	3,643 (0,552%)	1,884 (0,285%)	222,307 (33,677%)
144	660,104	5,634 (0,853%)	98,200 (14,876%)	69,189 (10,482%)	15,123 (2,291%)	6,901 (1,045%)	9,317 (1,411%)	3,257 (0,493%)	6,322 <b><sup>a</sup>(0,958%)</b>	213,943 (32,410%)
168	660,104	17,299 (2,620%)	100,458 (15,219%)	86,869 (13,160%)	14,007 (2,122%)	6,014 (0,911%)	6,137 (0,930%)	3,081 (0,467%)	1,561 (0,236%)	235,426 <b><sup>a</sup>(35,664%)</b>
192	660,104	11,510 (1,743%)	104,110 (15,772%)	89,540 (13,565%)	12,717 (1,927%)	5,833 (0,884%)	6,019 (0,912%)	2,756 (0,418%)	1,388 (0,210%)	233,873 (35,429%)
216	660,104	14,564 (2,206%)	104,110 (15,772%)	86,892 (13,163%)	14,470 (2,192%)	3,799 (0,576%)	4,127 (0,625%)	2,337 (0,354%)	2,203 (0,334%)	232,502 (35,222%)
240	660,104	7,953 (1,204%)	106,152 <b><sup>a</sup>(16,081%)</b>	93,637 (14,185%)	7,278 (1,103%)	3,443 (0,522%)	2,706 (0,410%)	1,889 (0,286%)	1,680 (0,255%)	224,738 (34,045%)
264	660,104	14,419 (2,184%)	104,127 (15,774%)	98,095 (14,861%)	6,895 (1,045%)	3,364 (0,510%)	2,099 (0,318%)	1,828 (0,277%)	1,796 (0,272%)	232,623 (35,240%)
288	660,104	10,494 (1,589%)	102,466 (15,523%)	95,254 (14,430%)	4,909 (0,744%)	3,202 (0,485%)	3,651 (0,553%)	2,264 (0,343%)	2,051 (0,311%)	224,291 (33,978%)

\*Recuperação máxima de L-(<sup>15</sup>N) treonina



**Figura 1.** Recuperação do total ingerido da L-(<sup>15</sup>N) treonina em diferentes tecidos (em %) de frangos de corte, no período de 9 a 16 dias de vida

**Tabela 5.** Deposição e ingestão de  $^{15}\text{N}$ , pesos teciduais e consumo de ração

<b>Deposição</b>	<b><math>^{15}\text{N}</math> depositado (<math>\mu\text{g}</math>)</b>	<b>Peso tecido MN (g)</b>
<b>Corpo depenado</b>	0,4904 $\pm$ 0,024	199,52 $\pm$ 1,125
<b>Penas</b>	0,0175 $\pm$ 0,006	5,79 $\pm$ 0,848
<b>Peito</b>	0,0988 $\pm$ 0,009	30,54 $\pm$ 2,148
<b>Jejuno</b>	0,0090 $\pm$ 0,001	5,00 $\pm$ 0,900
<b>Fígado</b>	0,0156 $\pm$ 0,001	7,65 $\pm$ 0,531
<b>Sartório</b>	0,0014 $\pm$ 0,000	0,71 $\pm$ 0,197
<b>Rins</b>	0,0038 $\pm$ 0,000	1,91 $\pm$ 0,173
<b>Plasma</b>	0,0125 $\pm$ 0,002	16,86 $\pm$ 0,895
<b>Ingestão</b>	<b><math>^{15}\text{N}</math> ingerido (<math>\mu\text{g}</math>)</b>	<b>Consumo ração (g)</b>
	0,660 $\pm$ 0,02	159,756 $\pm$ 0,47

Os dados da tabela 5 foram utilizadas para se calcular as eficiências de utilização da L-( $^{15}\text{N}$ ) treonina em diferentes tecidos de frangos de corte que foram calculadas e incluídas na tabela 6.

**Tabela 6.** Eficiência de utilização da L-( $^{15}\text{N}$ ) treonina de diferentes tecidos de frangos de corte no período de 4 a 9 dias

<b>Tecidos</b>	<b>Eficiência de utilização (%)</b>
Peito	78,27 $\pm$ 2,87
Penas	73,02 $\pm$ 2,36
Corpo depenado	59,48 $\pm$ 2,60
Sartório	49,17 $\pm$ 5,07
Rins	47,79 $\pm$ 2,03
Fígado	47,47 $\pm$ 3,00
Jejuno	43,55 $\pm$ 1,87
Plasma	17,89 $\pm$ 2,39

O período experimental para se mensurar a recuperação do  $^{15}\text{N}$  provinda da L-( $^{15}\text{N}$ ) treonina teve início ao quarto dia de idade do frango de corte para evitar problemas na coleta de excreta e desperdícios no consumo de ração.

Podemos notar na tabela 3 que seis horas após o início do fornecimento da ração enriquecida houve uma recuperação total de 7,469% sendo que o plasma apresentou a maior recuperação dentro os tecidos. Hobson & Clark (1992) afirmam que o plasma sanguíneo responde rapidamente às alterações nutricionais e possuem elevadas taxas de trocas isotópicas. Após 48 horas, todas as recuperações se tornaram praticamente constantes pois parte do  $^{15}\text{N}$  depositado nos tecidos após ser metabolizado, é recuperado nas excretas.

As recuperações máximas dos tecidos foram as seguintes: penas (3,684%); excretas (16,081%); peito (14,962%); fígado (2,972%); jejuno (2,301%); plasma (3,919%); rins (0,978%); e sartório (0,958%). De maneira geral, os tecidos que participam mais ativamente no metabolismo da treonina apresentaram picos de enriquecimento próximo ao início do fornecimento da dieta enriquecida (rins após 12 horas; e jejuno e plasma após 24 horas), enquanto que os tecidos de deposição atingiram suas recuperações máximas mais tardiamente devido ao acúmulo de  $^{15}\text{N}$  que é depositado com a ingestão da dieta enriquecida (penas após 96 horas; peito após 120 horas; fígado após 126 horas e sartório após 144 horas). As recuperações de L-( $^{13}\text{C}_1$ ) metionina obtidas por Stradiotti (2013) foram similares no período de 8 a 14 dias.

Considerando o corpo depenado foi calculado um valor de eficiência de 59,48%. Donato (2013) estimou uma eficiência de utilização da treonina de 73% para o corpo depenado utilizando frangos de corte, aplicando a metodologia de abate comparativo. A diferença das eficiências pode ser explicada pela diferença de unidades adotadas para a deposição e ingestão no cálculo da eficiência. Esses cálculos foram adotados para que a diferença de pesos entre os tecidos não influenciasse diretamente sobre os valores de eficiência, uma vez que foi adotado um único valor para ingestão. Além disso, se for considerado apenas a deposição da L-( $^{15}\text{N}$ ) treonina pela ingestão, neste trabalho é calculado uma eficiência de 74%.

A recuperação máxima da L-( $^{15}\text{N}$ ) treonina para o músculo peitoral foi de 14,962%. Se considerarmos os dados do tempo 24 horas em comparação com 120 horas, o peso do tecido aumentou em média 12,62 vezes sendo que a deposição aumentou 17,03 vezes a mais. Além disso, a sua eficiência foi de 78,27%, sendo o tecido de maior utilização do aminoácido neste período. Isso

sugere que há um direcionamento considerável da treonina para a deposição proteica nesta fase, mesmo sendo o tecido de maior peso dentre os tecidos coletados.

O músculo sartório, apesar de também ser um tecido de deposição, apresentou uma recuperação que reduziu ao longo do tempo e uma eficiência em torno de 30% a menos que o músculo peitoral. No sartório, há a predominância de fibras oxidativas que possuem uma maior concentração de mitocôndrias (Warriss, 2000) indicando que são músculos atuantes nas movimentações das pernas e não como um tecido primariamente de deposição, como o músculo do peito. Além disso, o músculo peitoral foi desenvolvido por seleções genéticas com a finalidade de um maior desenvolvimento desse tecido (Gonzales & Sartori, 2002).

Os tecidos metabólicos como fígado, jejuno, plasma e rins apresentaram eficiência de utilização de 49,47; 43,55%; 17,89%; e 47,79%, respectivamente. Quanto as suas recuperações foram os que mais decresceram durante a fase de desaparecimento reduzindo cerca de 4; 2; 4 e 2 vezes a menos respectivamente de sua recuperação inicial. Este fato se justifica com o encerramento da ingestão de L-(<sup>15</sup>N) treonina que ao contrário dos tecidos predominantemente de deposição, direcionam grande parte dos nutrientes que chegam ao tecido. Por outro lado, o <sup>15</sup>N que foi incorporado nos tecidos de deposição como peito, penas e sartório foi lentamente degradado demonstrado pelo menor declínio após o encerramento da ingestão de dieta enriquecida e permanecem praticamente com a mesma deposição por um certo tempo onde verifica-se conforme a figura 1.

Nas penas foi observado uma eficiência de 73,02% da L-(<sup>15</sup>N) treonina. A variação da porcentagem de recuperação para penas se deve ao crescimento diferenciado para cada região do corpo da ave (Yu *et al.*, 2004) e a coleta aleatória realizada para a análise das penas. Segundo Fisher *et al.* (1981), a composição aminoacídica da pena altera pouco conforme a idade, sendo que em frangos de corte na primeira semana, a pena apresenta 4,21% de treonina aumentando até 5,16% na sexta semana de idade.

As excretas totalizaram 16% da treonina dietética em sua recuperação máxima. Parte dessa excreção é proveniente da mucina intestinal sendo que na

literatura é relatada que cerca de 16 a 30% da proteína constituinte da mucina intestinal é constituída de treonina (Dozier *et al.*, 2001; Corzo *et al.*, 2007; Faure *et al.*, 2005). É possível notar que após o quinto dia, quando é cessado o enriquecimento da dieta, há um aumento de excreção de  $^{15}\text{N}$  justificado pela metabolização do  $^{15}\text{N}$  que estava incorporado nos tecidos.

### 3.2. Simulação

As eficiências de utilização determinadas anteriormente (corpo depenado = 59,48% e penas = 73,02%) foram simuladas em um modelo mecanicista desenvolvido pelo grupo LAVINESP/UNESP para a determinação da exigência de treonina diária em frangos de corte no período de 1 a 7 dias de idade. Acredita-se que a predição da exigência de treonina seja mais coerente utilizando diferentes eficiências de utilização para compartimentos diferentes, uma vez que os tecidos possuem taxas de crescimento distintos.

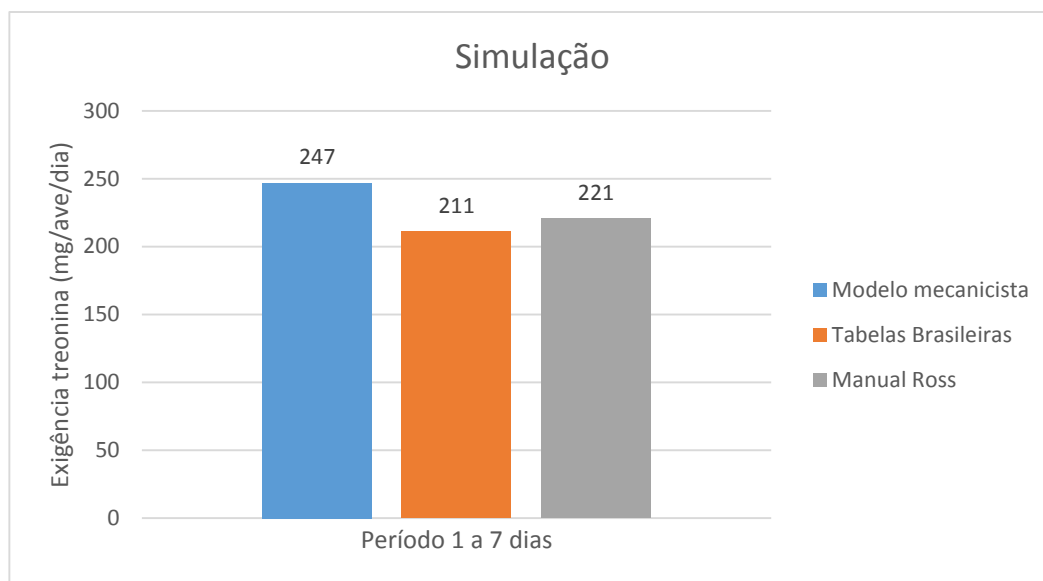
A tabela 7 demonstra os valores obtidos para exigência de treonina para frangos de corte determinados pelo modelo mecanicista da UNESP utilizando eficiências de utilização para corpo depenado e penas ou então a partir de uma única eficiência média para o corpo todo (74%).

**Tabela 7.** Valores de exigências de treonina determinadas de 1 a 7 dias para frangos de corte utilizando o modelo mecanicista

Dias	1	2	3	4	5	6	7	Média (1-7 d)
Eficiência corpo e penas (mg/dia)	157	183	211	242	276	312	351	247
Eficiência única (mg/dia)	130	152	175	201	229	259	292	205

A exigência média calculada com as eficiências de utilização determinadas no período de 1 a 7 dias foi de 247 mg de treonina/ave/dia, sendo que no mesmo período as Tabelas Brasileiras (Rostagno *et al.*, 2011) preconizam 211 mg de treonina/ave/dia e o manual da linhagem Ross<sup>®</sup>, uma exigência de 221 mg de treonina/ave/dia. A figura 2 ilustra as comparações de exigências.





**Figura 2.** Simulação das eficiências de utilização em modelo mecanicista

#### 4. CONCLUSÃO

As eficiências de utilização da L-(<sup>15</sup>N) treonina para frangos de corte de 4 a 9 dias de idade no seu pico de enriquecimento foram: peito (78,27%); penas (73,02%); corpo depenado (59,48%); sartório (49,17%); fígado (49,47%); rins (47,79%); jejuno (43,55%); e plasma (17,89%) e utilizando as eficiências de corpo depenado e de penas foi calculado uma exigência de 247 mg/ave/dia de treonina.

#### 5. BIBLIOGRAFIA

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists**. 16 ed. Washington, 1995.

ATENCIO, A.; ALBINO, L. F. T.; ROSTAGNO, H. S.; OLIVEIRA, J. E. de; VIEITES, F. M.; DONZELE, J. L. Exigências de treonina para frangos de corte machos nas fases de 1 a 20, 24 a 38 e 44 a 56 dias de idade. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.33, n.4, p.880-893, 2004.

AZEVEDO, A. R. E. G. de. Resposta de pintainhos de corte desafiados com *Salmonella enteritidis* e alimentados com dois níveis de treonina. **Trabalho de conclusão de curso** apresentado ao Colegiado do Curso de Zootecnia no

Centro de Ciências Agrárias de Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de graduação em Zootecnia. Areia - PB, 2013.

COBELLI, C.; FOSTER, D.M. Compartmental models: Theory and practice using the SAAM II software system. In: CLIFFORD & MÜLLER (Eds.) **Mathematical modeling in experimental nutrition**. New York, Plenum Press, p.79-101, 1998.

CORZO, A.; KIDD, A. T.; DOZIER, W. A. *Dietary threonine needs for growth and immunity of broilers raised under different litter conditions*. **Journal of Applied Poultry Research**, v.16, p.574-582, 2007.

DONATO, D. C. Z. Respostas de frangos de corte às ingestões de metionina+cistina e treonina: desempenho, impacto ambiental e econômico. 2013, 88p. **Tese (Doutorado)** – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

DUCATTI, C. Isótopos Estáveis Ambientais. Centro de Isótopos Estáveis Ambientais Depto. De Física e Biofísica - IB, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brasil, **Apostila**, pg. 205, 2007.

FAURE, M.; MOENNOZ, D.; MONTIGON, F.; METTRAUX, C.; BREUILLÉ, D.; BALLÈVE, O. *Dietary threonine restriction specifically reduces intestinal mucin synthesis in rats*. **Journal of Nutrition**, .v135, p.486-491, 2005.

SILVA, E. P.; SAKOMURA, N. K.; BONATO, M. A.; DONATO, D. C. Z.; PERUZZI, N. J.; FERNANDES, J. B. K. Descrição do potencial de retenção de nitrogênio em frangas de postura por diferentes metodologias: mínima retenção. **Ciência Rural**, v.44, n.2, 2014.

EMMANS, G. C. The growth of turkeys. In: NIXEY, C.; GREY, T. C. (Ed.). **Recent advances in turkey science**. Butterworths: Poultry Science Symposium, v.21, n.1-3, p.119-129, p.135-166, 1989.

FISHER, M. L.; LESSON, S.; MORRISON, W. D.; SUMMERS, J. D. Feather growth and feather composition of broiler chickens. **Canadian Journal of Animal Science**, n.61, p.769-773, 1981.

GONZALES, E.; SARTORI, J.R. Crescimento e metabolismo muscular. In: MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte, cap.21. p.279-297, 2002.

GREEN M. G.; GREEN J. B. *The application of compartmental analysis to research in nutrition*. **Annual Review of Nutrition**. Annual Reviews Inc, JO:41-fi1, 1990.

HOBSON, K. A.; & CLARK, R. G. Assessing avian diets using stable isotopes I: Turnover of <sup>13</sup>C in tissues. **The Condor**, n.94, p.181–188, 1992.

LICATTI F. Isótopos estáveis do carbono ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) em plantas do ciclo bioquímico  $\text{C}_3$  e  $\text{C}_4$  [monografia]. Botucatu (SP): Universidade Estadual Paulista; 1997.

MURAMATSU, T.; HIRAMOTO, K.; TASAKI, I.; OKUMURA, J. Effect of protein starvation on protein turnover in liver, oviduct and whole body of laying hens. **Comparative Biochemistry and Physiology, Japan**, v. 87(2), n. 2, p. 227-232, 1987.

ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; DONZELE, J. L.; GOMES, P. C.; OLIVEIRA, R. F. de; LOPES, D. C.; FERREIRA, A. S.; BARRETO, S. L. de T.; EUCLIDES, R. F. **Tabelas brasileiras para aves e suínos – Composição de alimentos e exigências nutricionais**, 3 ed., Viçosa, 2011.

SAKOMURA, N. K.; SILVA, J. H. V. da; COSTA, F. G. P.; FERNANDES, J. B. K.; HAUSCHILD, L. **Nutrição de não ruminantes**. Jaboticabal: Funep, p.220, 2014.

SARTORI, J. R.; GONZALES, E.; MACARI, M.; DAL PAI, V.; OLIVEIRA, H. N. de. Tipos de Fibras no músculo flexor longo do Hálux de frangos de corte submetidos ao estresse pelo calor e frio alimentados em "Pair-feeding". **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.4, p.918-925, 2003.

STOLL, B.; HENRY, J.; REEDS, P. J.; YU, H.; JAHOOOR, F.; BURRIN, D. G. Catabolism dominates the first-pass intestinal metabolism of dietary essential-amino acids in milk protein fed piglets. **Journal of Nutrition**, v.128, p.606-614, 1998.

STRADIOTTI, A. C.; DUCATTI, C.; BENDASSOLLI, J. A.; SARTORI, J. R.; PELÍCIA, V. C.; ARAÚJO, P. C.; MIRANDA, C. C.; GIRÃO, L. V. C.; LUIGGI, F. G.; SOUZA, I. M. G. P.; PACHECO, P. D. G.; AOYAGI, M. M.; DENADAI, J. C.; SARTORI, M. M. P.; PEZZATO, A. C. Methionine incorporation into the blood plasma of broiler chickens at the last week of age. In: 2013 POULTRY SCIENCE ASSOCIATION ANNUAL MEETING, Proceeding: San Diego. Poultry Science 92 (E-Suppl. 1), p. 112, 2013.

WARRIS, P. D. **Meat Science. An introductory text**. CAB Internacional: Wallingford, 2000.

YU, M.; YUE, Z.; WU, P.; WU, D.; MAYER, J.; MEDINA, M.; WIDELITZ, R.; JIANG, T.; CHOUNG, C. The developmental biology of feather follicles. **International Journal of Developmental Biology**, n.48, v.0, p.181-191, 2004.

## **CAPÍTULO 3**

## **TURNOVER DA L-(<sup>15</sup>N) TREONINA EM DIFERENTES TECIDOS DE FRANGOS DE CORTE**

**RESUMO:** O *turnover* é o processo biológico dinâmico que inclui reações de síntese e degradação, em outras palavras, representa a renovação do nutriente. Deste modo, o estudo do *turnover* nos diferentes tecidos nos fornece dados para compreender diferenças entre os papéis metabólicos e a utilização dos nutrientes pelos tecidos. O objetivo do presente estudo foi analisar o *turnover* do nitrogênio proveniente da L-(<sup>15</sup>N) treonina em diferentes tecidos de frangos de corte de 9 a 16 dias de idade. Os tecidos avaliados foram: peito, fígado, intestino, plasma, sartório, excretas e rins. Foram utilizados 70 pintos machos da linhagem Cobb alojados em gaiolas metabólicas individuais. A dosagem do aminoácido enriquecido foi de 69,6 mmol/kg ave e o composto foi diluído em água destilada e homogeneizada com a dieta natural a base de milho e soja. Durante os cinco dias iniciais (de 4 a 9 dias de idade) houve o fornecimento da dieta enriquecida e após o quinto dia experimental foi ofertada a ração experimental *ad libitum* sem o acréscimo do composto enriquecido. Os abates e coletas dos tecidos foram realizados nas seguintes horas: 0; 6; 12; 24; 48; 72; 96; 120; 144; e 168 horas após o encerramento do enriquecimento da dieta. Foram realizadas análises de determinação da abundância isotópica em espectrômetro de massa de razão isotópica (ANCA-GSL). Os gráficos de *turnover* foram ajustados utilizando a função exponencial do programa Origin Pro 8.0. A seguir, foram calculados os coeficientes de troca isotópica (*k*); a fração de átomos trocados (*F*); e os valores de tempo para 50% e 99% de troca isotópica. O *turnover* da L-(<sup>15</sup>N) treonina varia conforme o tecido principalmente de acordo com sua função, sendo que há tecidos que predominam a deposição, como o músculo peitoral e sartório; e outros que atuam ativamente no metabolismo da L-(<sup>15</sup>N) treonina como plasma, rins e jejuno.

**Palavras-chave:** isótopo estável, aminoácido marcado, *turnover*.

## TURNOVER OF L-(<sup>15</sup>N) THREONINE IN DIFFERENT TISSUES OF BROILER CHICKENS

**ABSTRACT:** The turnover is a biological dynamic process that includes synthesis and degradation reactions, in other words, is the renewal of a nutrient. Thus, the study of turnover in different tissues provides the data to understand the differences between the metabolic roles and nutrient utilization by the tissues. The aim of this study was to analyze the dilution of nitrogen of L-(<sup>15</sup>N) threonine in different tissues of broiler at 9 to 16 days old. The tissues evaluated were: breast, liver, jejunum, plasma, sartorium, excreta and kidneys. Seventy male broiler chickens were housed in individual metabolic cages. The dosage of enriched amino acid was 69.6 mmol/kg bird and the compound was diluted in distilled water and homogenized with the natural diet based on corn and soybean. The initial five days (4 to 9 days old) was supply of enriched diet and after the fifth day, the diet were offered ad libitum without the addition of enriched compound. Slaughters and collects of tissues were carried out in the following hours: 0; 6; 12; 24; 48; 72; 96; 120; 144; and 168 hours after the end of dietary enrichment. The isotopic enrichments were determined in an Isotopic Ratio Mass Spectrometer (ANCA-GSL). Isotopic dilution graphs were fitted using the exponential function of the Origin Pro 8.0 software. The isotopic exchange coefficients were calculated (k); the fraction of exchanged atoms (F); and time values for 50% and 99% isotopic exchange. The dilution of the L- (<sup>15</sup>N) threonine varies according to the tissue, mainly according to the function of each tissue and there are predominant deposition tissues, as the breast muscle and the sartorium and others metabolic tissues, such as plasma, kidneys and jejunum.

**Keywords:** Stable isotope, labeled amino acid, *turnover*.

## 1. INTRODUÇÃO

Inicialmente na década de 50, os isótopos estáveis foram utilizados por geoquímicos e paleo-oceanógrafos para integrar os isótopos estáveis como uma ferramenta aos estudos dos ciclos globais dos elementos (Lajtha & Michener, 1994). Durante as três últimas décadas, ganhou importância em outros campos das ciências como agronomia (Devlin & Barker 1971; Araújo *et al.*, 2004), ecologia (Peterson & Fry, 1987; Gannes, Del-rio & Koch, 1998), medicina (Filho & Marchini, 2004), nutrição e fisiologia (Ducatti, 2007b; Ducatti *et al.*, 2011).

Vários estudos comprovaram que a composição isotópica tecidual passa a ser incorporada de acordo com a composição isotópica da dieta ingerida (Deniro & Epstein, 1976, 1978; Hobson & Clark, 1992a, 1992b) e assim, os traçadores (principalmente de carbono e nitrogênio) têm sido utilizados em diferentes espécies de animais como frangos de corte (Gottmann *et al.*, 2008), poedeiras (Carrijo *et al.*, 2000), peixes (Ducatti, 2007b), codornas (Móri *et al.*, 2007) e ruminantes (Ducatti *et al.*, 2011) com objetivos variados como analisar o *turnover* dos tecidos (Mituo, 2008; Stradiotti, 2013), identificar uma preferência alimentar (Ducatti, 2007b), rastrear a alimentação animal (Denadai *et al.*, 2011) ou discriminar a origem geográfica do animal (Crittendem *et al.*, 2007; Nakashita *et al.*, 2008). Segundo Gannes, Del-Rio e Koch (1998), estudos relacionados a balanço proteico, alocação de nutriente e *turnover* tecidual são temas que ganham importância e que são possíveis de serem estudadas com a técnica de isótopos estáveis.

O *turnover* é o processo dinâmico de síntese e degradação dos componentes corporais, em outras palavras, de renovação e todas as substâncias sejam elas orgânicas ou inorgânicos estão sujeitas ao *turnover* (Waterlow, 2006). Este processo dinâmico é dependente de fatores ambientais e de fatores intrínsecos referentes ao animal (Zuanon, 2003). Deste modo, pode ser fornecida uma dieta com uma abundância distinta da que o animal ingere ou então utilizar compostos enriquecidos isotopicamente para que ocorra esta mudança da composição isotópica. A utilização dos compostos enriquecidos permite um maior enriquecimento que o natural e além disso, viabiliza os estudos para se rastrear as rotas metabólicas de um determinado nutriente de interesse (Muramatsu *et al.*, 1987).

Por fim, o trabalho proposto teve como objetivo avaliar o *turnover* da L-(<sup>15</sup>N) treonina em diferentes tecidos de frangos de corte no período de 9 a 16 dias de idade.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Definição da dose

Inicialmente foi realizado um ensaio piloto devido à escassez de dados relacionados a determinação da dose de L-(<sup>15</sup>N) treonina necessária para que apresentasse um enriquecimento adequado para a quantificação isotópica. Foram avaliadas cinco doses calculadas de acordo com o peso vivo da ave: D1) 17,4 μmol/kg ave; D2) 26,1 μmol/kg ave; D3) 34,8 μmol/kg ave (valor adaptado segundo Muramatsu, 1987); D4) 52,2 μmol/kg ave; e D5) 69,6 μmol/kg ave. A L-(<sup>15</sup>N) treonina foi diluída em água destilada dentro de um frasco reagente graduado e posteriormente conservada. Para se quantificar a dose em μL/kg de cada tratamento foram realizados os seguintes cálculos (equações 1, 2 e 3):

$$QtdAA1 = D \times P \times Desp$$

#### Equação 1

Onde *QtdAA1* é a quantidade de aminoácido enriquecido (μmol); *D* é a dose de aminoácido enriquecido referente a adição de aminoácido <sup>15</sup>N (μmol); *P* é o peso em Kg do animal; *Desp* é um percentual de 3% que foi adicionado a mais devido aos desperdícios pelo animal (dados não publicados).

$$QtdAA2 = (QtdAA1 \times 120,11) \div 1000$$

#### Equação 2

Onde *QtdAA2* é a quantidade de aminoácido enriquecido (mg); *QtdAA1* é a quantidade de aminoácido enriquecido (μmol); O valor 120,11 é o peso molecular da treonina enriquecida (fornecido por Cambridge Isotope Laboratories®); O valor 1000 é usado como fator de conversão de microgramas para miligramas.

$$QtdAA3 = QtdAA2 \div C$$

#### Equação 3

Onde *QtdAA3* é a quantidade de aminoácido enriquecido em (mL); *QtdAA2* é a quantidade de aminoácido enriquecido em (mg); *C* é a concentração do



aminoácido enriquecido (mg/mL). Após esse cálculo é possível transformar mL em  $\mu\text{L}$  multiplicando o valor de  $QtdAA3$  por 1000 e determinando assim a dose em  $\mu\text{L}/\text{kg}$ .

Com base nos resultados deste ensaio piloto, a dose de L-( $^{15}\text{N}$ ) treonina (Cambridge Isotope Laboratories<sup>®</sup>) escolhida para o experimento foi de 69,6 mmol de L-( $^{15}\text{N}$ ) treonina/kg ave, referente ao D5, o qual apresentou um enriquecimento bastante expressivo nos tecidos estudados.

## 2.2. Animais, manejo e rações experimentais

O experimento foi conduzido no Laboratório de Ciências Avícolas do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Campus de Jaboticabal/SP. Os procedimentos que estão descritos foram aprovados pelo Comitê de Ética sob protocolo 9999/14 (CEUA). Foram utilizados 70 pintos de corte machos com um dia de idade da linhagem Cobb<sup>®</sup> 500.

As aves foram alojadas individualmente em gaiolas metabólicas sob dimensões 50 x 50 x 50 cm, com comedouros do tipo calha e bebedouros do tipo *nipple*. O experimento foi realizado em um galpão que conta com o sistema de cortinas para o controle da temperatura ambiente. Ao longo dos galpões foram distribuídos termohigrometros para o registro diário de temperatura e umidade. O programa de luz utilizado durante o período experimental foi de 24 horas de luz. A pesagem e o consumo dos animais foram registrados diariamente. As excretas foram coletadas e mensuradas diariamente através de uma placa metálica colocada sob as gaiolas.

A composição da ração experimental foi analisada (matéria seca, energia, proteína, extrato etéreo e cinzas) no Laboratório de Análise de Nutrição Animal da FCAV, segundo a metodologia da AOAC (1995) e seu valor isotópico foi analisado no Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA/USP) em Piracicaba/SP. A dieta foi formulada de acordo com as recomendações de Rostagno *et al.* (2011) para frangos de corte machos de desempenho superior (tabela 1).

Durante o período de enriquecimento da dieta, a quantidade de ração fornecida diariamente foi controlada para garantir que não houvessem

desperdícios e mensurada por meio do manejo denominado *pair-feeding* (Sartori *et al.*, 2003). Para isso, o consumo médio de dez aves alimentadas *ad libitum* foi mensurado para determinar a quantidade de ração que seria fornecida para as aves em experimento no dia seguinte.

### 2.3. Enriquecimento da dieta e coletas de amostras

O experimento compreendeu 12 dias, sendo que apenas nos cinco primeiros dias houve o enriquecimento da dieta com L-(<sup>15</sup>N) treonina (4 a 9 dias). Antes do enriquecimento da dieta experimental, as aves eram pesadas para que fosse calculado o volume do composto enriquecido diluído para cada ave. A quantidade calculada foi adicionada a ração em vários pontos utilizando micropipetas de volume variável (10 a 100 µL e 100 a 1000 µL) e misturada posteriormente com uma colher plástica.

As coletas de amostras ocorreram durante 9 aos 16 dias, às 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após o encerramento do enriquecimento da dieta. O encerramento do enriquecimento da dieta ocorreu nos abates posteriores ao das 120 horas e as aves passaram a ser alimentadas *ad libitum*.

Para cada amostragem, três aves foram sacrificadas e então coletados os tecidos de interesse. As amostragens dos tecidos seguiram os seguintes critérios: do fígado foi retirado um seguimento lateral do lado direito do órgão; do músculo peitoral as amostras foram obtidas a partir do terço médio longitudinal do peitoral maior esquerdo; das vísceras foi coletado uma amostra de 10 cm da parte medial do jejuno e lavada com uma pisseta com água destilada para a retirada da digesta; o plasma sanguíneo foi coletado por punção cardíaca; os rins e o músculo sartório foram retirados de ambos os lados; além da coleta total de excretas.

Para quantificar o <sup>15</sup>N do corpo depenado foram realizadas três coletas adicionais: uma no início (0h), meio (72h) e fim (120h) do período de enriquecimento da dieta, também com três repetições, com a finalidade de se mensurar a quantidade de <sup>15</sup>N total presente no corpo depenado. Para isso, as aves foram sacrificadas, depenadas, pesadas, congeladas e processadas para análise.

**Tabela 1.** Composição nutricional e calculada das rações experimentais

<b>Ingredientes (%)</b>	<b>Fase inicial (4 a 16 dias)</b>
Milho (7,88%)	57,942
Soja farelo (45%)	35,674
Óleo de soja	2,395
Fosfato bicálcico	1,780
Calcário	0,696
Sal comum	0,428
DL-Metionina (99%)	0,345
L-Lisina HCL (54,6%)	0,434
*Suplemento vitamínico-mineral (0,2%)	0,200
L-Treonina (98,5%)	0,106
Total	100,000
<b>Composição nutricional calculada</b>	<b>Exigências nutricionais</b>
Energ. met. (Kcal/Kg)	3010,625
Proteína bruta (%)	21,725
Cálcio (%)	0,876
Sódio (%)	0,214
Fósforo disponível (%)	0,431
Cloro (%)	0,308
Metionina dig. (%)	0,628
Lisina dig. (%)	1,264
Treonina dig. (%)	0,822
Valor isotópico médio ( $\delta^{15}\text{N}$ , em ‰)	1,909

\*Ac. Fólico 437,50 mg/kg; ac. Pantotênico 6250 mg/kg; biotina 44mg/kg; cobre 6250mg/kg; ferro 31,25 mg/kg; iodo 625 mg/kg; manganês 44g/kg; niacina 18,75 g/kg; selênio 187,5 mg/kg; vit. A 4687500 UI/kg; vit. B 1250 mg/kg; vit B12 7500 mcg/kg; vit B2 3125 mg/kg; vit B6 1750 mg/kg; vit. D3 1187500 UI/kg; vit. E 17500 UI/kg; vit. K3 940 mg/kg; zinco 40,65 g/kg

#### 2.4. Processamento das amostras

Todas as amostras foram acondicionadas em potes plásticos devidamente identificados e imediatamente congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior secagem realizada em um liofilizador (Edwards 501, Thermo) por 72 horas a 800 mbar de pressão.

Após a liofilização, as amostras de peito, fígado, jejuno e excretas foram pré-móidas em um micromoinho (A11 Basic, IKA). Posteriormente, todas as amostras foram móidas em moinho criogênico (SPEX SamplePrep 2010 Geno/Grinder 2010) à temperatura em torno de  $-196^{\circ}\text{C}$ . A amostra é

aconditionada em frascos de policarbonato juntamente com esferas magnéticas e os frascos são imergidos em nitrogênio líquido durante alguns minutos. Deste modo, há um congelamento da amostra contida no frasco que então é pulverizada pelo impacto entre a amostra e as esferas magnéticas compreendendo três a dez minutos para os tecidos e cinco minutos para as dietas experimentais, resultando em um material homogêneo de finíssima granulometria com aspecto de talco (Licatti, 1997; Ducatti, 2007).

## 2.5. Análises isotópicas

Para a realização das análises isotópicas, cerca de 500 a 1200 µg de matéria seca da amostra foram pesadas em uma balança analítica eletrônica (Mettler Toledo XP6) e acondicionadas em cápsulas de estanho. Em seguida, as amostras foram queimadas em forno de combustão do analisador elementar acoplado ao espectrômetro de massas (ANCA-SL) obtendo-se os gases de combustão (N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O). Em seguida, os gases foram arrastados por um fluxo de hélio para as etapas de purificação do N<sub>2</sub>. Essas incluem-se: forno de redução (retenção do excesso de O<sub>2</sub> da combustão e transformação de possíveis NO<sub>x</sub> em N<sub>2</sub>); coluna de retenção de água (perclorato de magnésio); coluna de retenção de CO<sub>2</sub> (carbosorb); e cromatógrafo gasoso. As moléculas de N<sub>2</sub>, assim purificadas, foram analisadas em um espectrômetro de massas de razão isotópica (ANCA-SL) do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA/USP), *Campus* de Piracicaba.

Os resultados de incorporação do nitrogênio enriquecido no tecido foram expressos em notação δ<sup>15</sup>N, em relação ao padrão nitrogênio atmosférico (N<sub>2</sub>atm), com erro de análise da ordem de 0,2‰ e calculado pela equação 4 descrita abaixo:

$$\delta^{15}\text{N} (\text{amostra/padrão}) = \left[ \left( R_{\text{amostra}} / R_{\text{padrão}} \right) - 1 \right] \times 10^3$$

### Equação 4

Onde δ<sup>15</sup>N é o enriquecimento relativo da razão <sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N da amostra em relação ao padrão Nitrogênio Atmosférico (N<sub>2</sub>atm), em partes per mil (‰), adimensional; *R<sub>amostra</sub>* e *R<sub>padrão</sub>* = razão isotópica (<sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N) da amostra e do padrão, adimensional.

## 2.6. Turnover da L-(<sup>15</sup>N) treonina

Para mensurar a taxa de substituição do nitrogênio nos tecidos das aves foi empregado a função exponencial do tempo do software Origin Pro 8.0, segundo a equação 5:

$$\delta^{15}N(t) = \delta^{15}N(f) + [\delta^{15}N(i) - \delta^{15}N(f)] \times e^{-t \times k}$$

### Equação 5

Onde  $\delta^{15}N(t)$  é o enriquecimento isotópico relativo no tecido no tempo (t), expresso em ‰, adimensional;  $\delta^{15}N(f)$  é o enriquecimento isotópico relativo no tecido no patamar de equilíbrio, ou condição final, expresso em ‰, adimensional;  $\delta^{15}N(i)$  é o enriquecimento isotópico relativo no tecido, na condição inicial, expresso em ‰, adimensional;  $t$  é o tempo (em dias) a partir do final da ingestão do aminoácido enriquecido;  $k$  é a constante de troca (*turnover*) em unidades de tempo em dias<sup>-1</sup>.

A equação 6 determina o tempo em função da troca de nutrientes (Ducatti, 2007a):

$$t = (-1 \div k) \ln(1 - F)$$

### Equação 6

Onde  $t$  é o tempo expresso em dias;  $k$  é a constante de troca (*turnover*) em unidades de tempo em dias<sup>-1</sup>;  $F$  representa a fração de átomos trocados. Quando  $F=0,5$  o valor de  $t$  representará o tempo de meia-vida e quando  $F=0,99$  resulta no valor de  $t$  no tempo em que 99% do <sup>15</sup>N foi substituído.

A determinação da porcentagem de troca total de átomos trocados (F) foi determinada pela equação 7:

$$F = 1 - e^{-kt}$$

### Equação 7

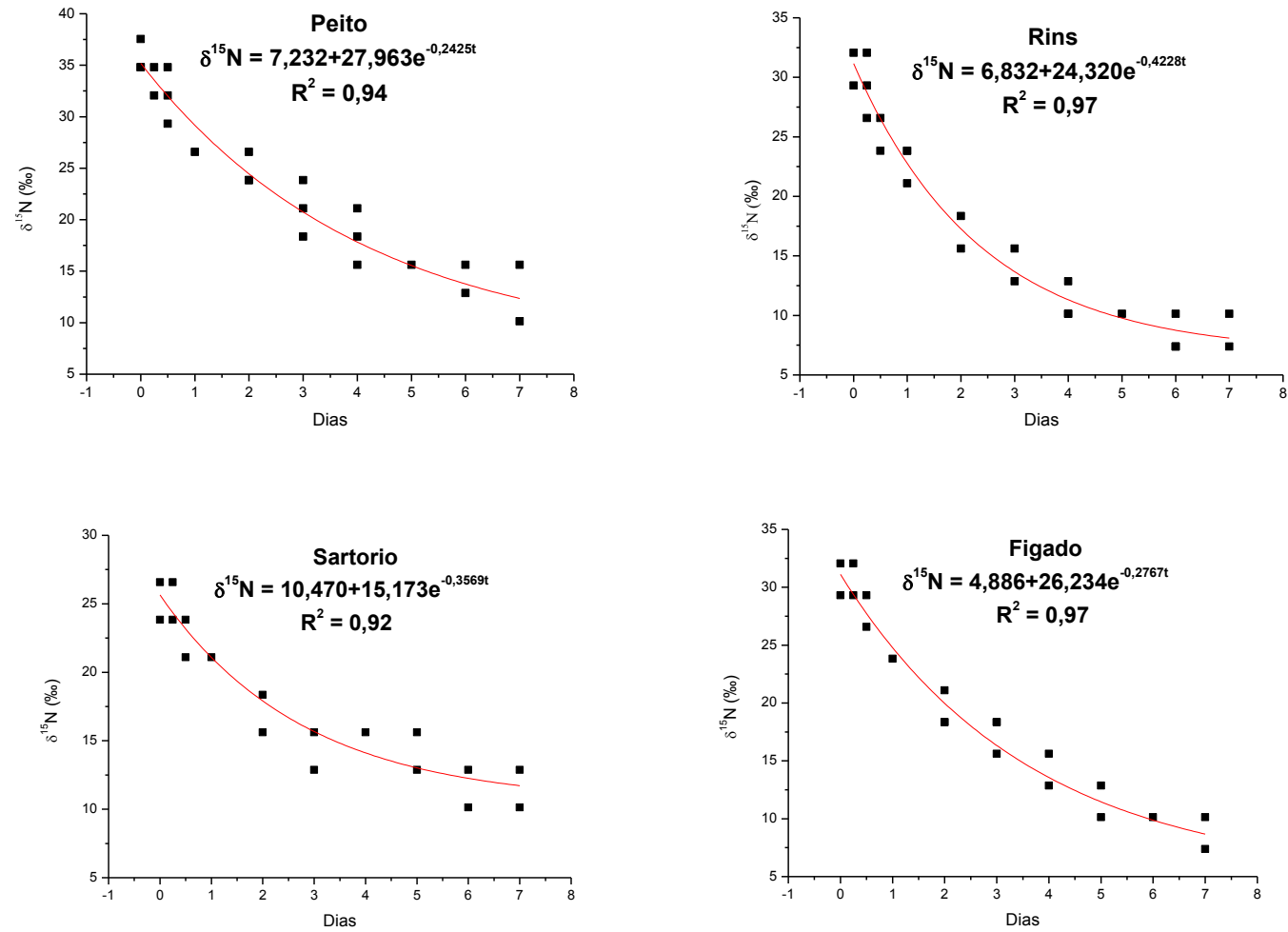
Sendo que  $F$  é a fração de átomos trocados;  $k$  representa a é a constante de troca (*turnover*) em unidades de tempo em dias<sup>-1</sup>;  $t$  é o valor do tempo do período experimental expresso em dias.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

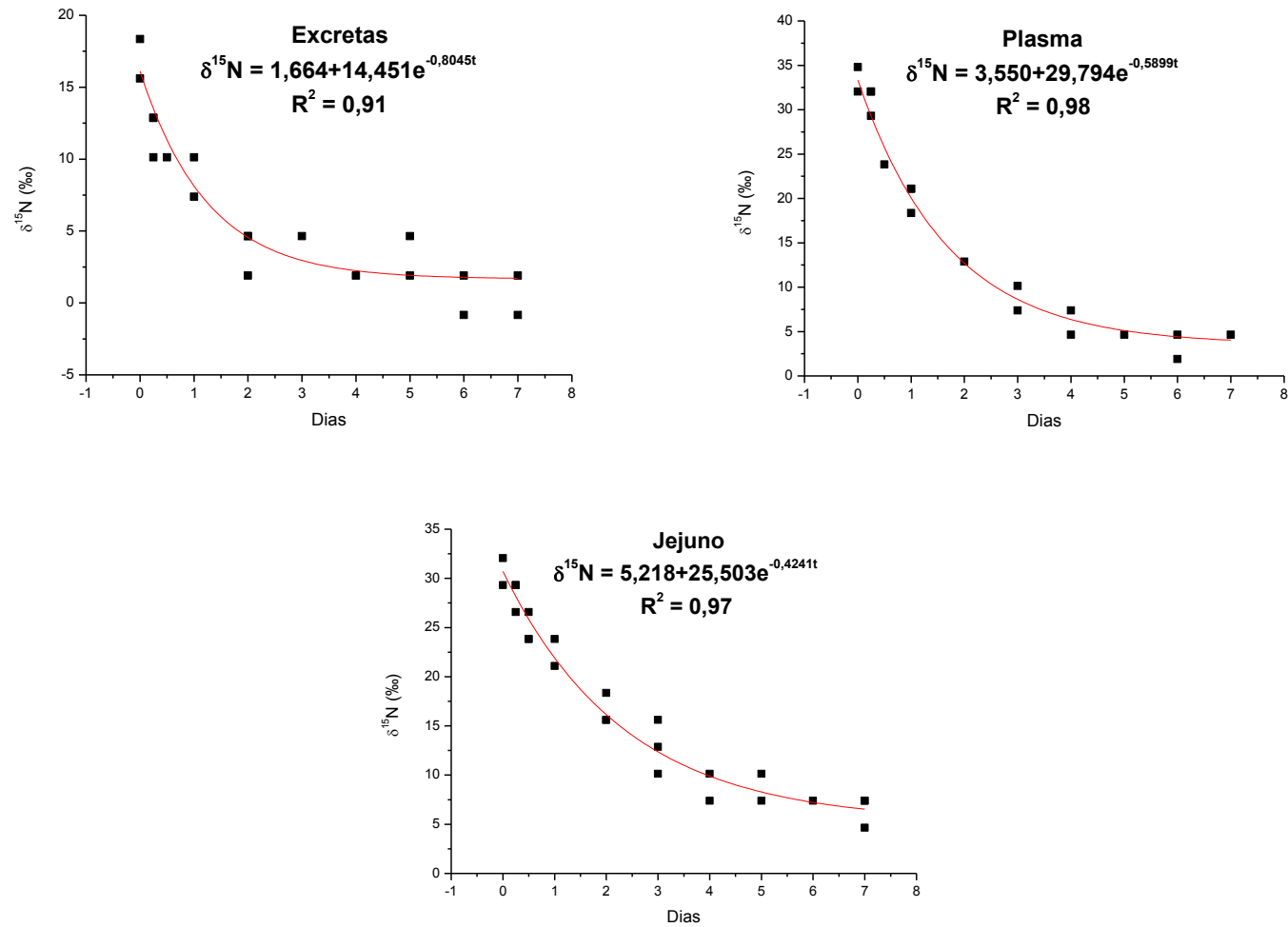
As figuras 1 e 2 ilustram as curvas de *turnover* da L-(<sup>15</sup>N) treonina do peito, sartório, rins e fígado; e das excretas, jejuno e plasma em frangos de corte no período de 9 a 16 dias. Este declínio no início do período se deve ao

encerramento do consumo da dieta enriquecida e também a incorporação de  $^{14}\text{N}$  (crescimento tecidual) que resulta em uma maior diluição do  $^{15}\text{N}$  (Zuanon, 2003).

O espaçamento do tempo de coletas das amostras foi de um dia com exceção das três primeiras coletas (0, 6 e 12 horas) que foram concentradas inicialmente devido ao declínio mais acentuado na curva de incorporação isotópica logo após o encerramento da ingestão do composto enriquecido, como pode ser observado nas figuras 1 e 2 (Riedijk *et al.*, 2007; Hobson e Clark, 1992a, 1992b; Muramatsu *et al.*, 1987).



**Figura 1.** Incorporação da L-( $^{15}\text{N}$ ) treonina do peito, sartório, rins e fígado de frangos de corte no período de 9 a 16 dias de idade



**Figura 2.** Incorporação da L-( $^{15}\text{N}$ ) treonina das excretas, jejuno e plasma de frangos de corte no período de 9 a 16 dias de idade



As porcentagens de átomos trocados ao final do período (F), as constantes de troca isotópica (k) e os tempos para 50% e 99% de troca estão representados na tabela 2.

**Tabela 2.** Porcentagem de átomos trocados, coeficientes de troca isotópicas e trocas de 50% e 99% de diferentes tecidos de frangos de corte no período de 9 a 16 dias

<b>Tecidos</b>	<b>k</b>	<b>F (%)</b>	<b>Troca 50% (horas)</b>	<b>Troca 99% (horas)</b>
Peito	0,2425	82	68,6	455,7
Fígado	0,2767	86	60,2	399,6
Sartório	0,3569	92	46,6	309,8
Rins	0,4228	95	39,4	261,3
Jejuno	0,4241	95	39,1	260,6
Plasma	0,5899	98	28,1	187,4
Excretas	0,8045	100	20,6	137,5

As equações exponenciais corroboram com o modelo proposto por Ducatti *et al.* (2002) e com Zuanon *et al.* (2006) que afirmam que o modelo também pode ser aplicado para animais em crescimento.

Os tecidos apresentam valores diferentes para os parâmetros de constante de troca (k) e trocas de 50% e 90% observados na tabela 2 e sugerem como o tecido participa no metabolismo da L-(<sup>15</sup>N) treonina.

Os tecidos como músculo peitoral e sartório direcionam grande parte dos nutrientes para deposição proteica e devido a isso, suas constantes de trocas (k = 0,2425; e 0,3569, respectivamente) são menores comparados aos de tecidos metabólicos. Isso será refletido em maiores tempos de 50% e 99% de troca (68,6 e 46,6 horas; 455,7 e 309,8 horas, respectivamente), uma vez que a velocidade de troca é mais baixa que os demais tecidos. As abundâncias isotópicas finais estimadas pelo modelo exponencial também tendem a ser maiores ( $\delta^{15}\text{N} = 7,232\text{‰}$  para o músculo peitoral; e  $\delta^{15}\text{N} = 10,470\text{‰}$  para o músculo sartório) em

relação aos tecidos metabólicos, pois a retenção de  $^{15}\text{N}$  tende a ser mais duradoura nestes tecidos.

Contudo, apesar de ambos serem tecidos musculares, estes possuem funções peculiares. O músculo do peito foi desenvolvido por seleções genéticas com a finalidade de um maior crescimento desse tecido de valor econômico (Gonzales & Sartori, 2002) e assim sua deposição é notavelmente superior em relação ao músculo sartório. Já o sartório, há a predominância de fibras oxidativas que possuem uma maior concentração de mitocôndrias (Warriss, 2000) indicando que são músculos atuantes nas movimentações das pernas e não como um tecido primariamente de deposição. As proteínas depositadas nos tecidos musculares são constantemente degradadas e resintetizadas em para formação de outras proteínas. Como a treonina é um aminoácido essencial, o organismo priva a utilização da treonina como fonte energética que resultaria em produtos glicogênicos, como piruvato e propionato (Kidd & Kerr, 1996).

O fígado participa da maior parte da produção das proteínas plasmáticas e também atua na regulação e transporte da maioria dos metabólitos, particularmente glicose e aminoácidos, para outros tecidos através do sangue (Lana *et al.*, 2000; Zuanon, 2003). O ácido úrico é sintetizado predominantemente no fígado como mecanismo de excreção nitrogenada (Cappitelli & Costa, 2013) e portanto, o  $^{15}\text{N}$  incorporado ao fígado não é utilizado necessariamente para a deposição proteica. Apesar da sua alta taxa metabólica, o fígado apresentou um tempo de meia-vida de 60,2 horas. Stradiotti (2013) utilizando a L-( $^{13}\text{C}_1$ ) metionina, determina um tempo de meia-vida maior do fígado em relação aos outros tecidos coletados para frangos de corte no período de 1 a 7 dias de idade.

Durante os primeiros 7 a 10 dias, o intestino de frangos de corte ainda se encontra em desenvolvimento e grandes alterações morfológicas e fisiológicas como proliferação, diferenciação e maturação celular ocorrem na estrutura da mucosa do intestino delgado (Maiorka *et al.*, 2002; Dibner & Richards, 2004). O jejuno apresentou alto *turnover* ( $k = 0,4241$ ; meia-vida = 39,1 horas) em relação aos outros tecidos corroborando com os resultados de Stradiotti (2013), apesar de ter sido utilizado a L-( $^{13}\text{C}_1$ ) metionina. Estes resultados sugerem que há um

grande direcionamento de aminoácidos para o desenvolvimento deste tecido neste período.

Os rins possuem a função primária de eliminar os resíduos e o excesso de água e solutos do organismo, através da filtração sanguínea (Whittow, 1999). Considerando a treonina, o nitrogênio proveniente da L-(<sup>15</sup>N) treonina pode ser metabolizado e excretado na forma de ácido úrico, sendo que 80 a 90% é secretado de forma ativa nos túbulos contornados proximais (Kidd & Kerr, 1996; Cappitelli & Costa, 2013). Deste modo, parte do <sup>15</sup>N incorporado aos rins é desviado para a excreção de produtos nitrogenados, além da deposição proteica. Apesar de função bem distinta do jejuno, os resultados de ambos são bastante semelhantes ( $k = 0,4228$ ; meia-vida = 39,4 horas).

O sangue que recebe os nutrientes absorvidos pelo intestino, se torna responsável pela distribuição dos nutrientes para o restante do corpo (Macari & Luquetti, 2002) sendo que o nitrogênio da L-(<sup>15</sup>N) treonina ingerida pode estar ligada ou não a treonina. Devido a sua função, há uma intensa troca de nutrientes ( $k = 0,5899$ ; meia-vida = 28,1 horas) seja para o direcionamento a um tecido ou para transporte de nutrientes para os tecidos ou então para a excreção de metabólitos. Esta demanda deve ser ainda maior na fase inicial, período em que há uma alta demanda por aminoácidos para o desenvolvimento corporal. Hobson & Clark (1992) ressaltam que o plasma sanguíneo possui elevada taxa de troca e que responde rapidamente as alterações nutricionais.

Resumidamente, os tecidos mais ativamente metabólicos, exemplificados pelo plasma, jejuno e rins, apresentam altos valores de  $k$ , pois são tecidos que possuem alto metabolismo e direcionam o <sup>15</sup>N a outros tecidos e isso se reflete em um menor tempo de troca isotópica em relação aos tecidos de deposição. Devido a esse direcionamento e menor retenção de <sup>15</sup>N, suas abundâncias isotópicas no final do período (3,550‰; 5,218‰; e 6,832‰, em  $\delta^{15}\text{N}$ ) tendem a ser menor em relação a tecidos de deposição.

A abundância isotópica final das excretas ( $\delta^{15}\text{N}=1,664\text{‰}$ ) e a assíntota inferior atingida sugerem que com aproximadamente 3 dias a maior parte da L-(<sup>15</sup>N) treonina já foi excretada e o restante se encontra depositada principalmente nos tecidos de deposição. A troca isotópica de 99% para as excretas foi de 5,73

dias. Além do mais, a sua abundância isotópica inicial de 16,115‰ em  $\delta^{15}\text{N}$  foi a menor de todos os tecidos, o que é esperado, pois a maior parte da L-( $^{15}\text{N}$ ) treonina é direcionada para diferentes tecidos antes de ser excretada. Os dados corroboram com Kock *et al.* (1994) que afirmam que há um enriquecimento tecidual de 2 a 5‰ aproximadamente para  $\delta^{15}\text{N}$  devido à elevação do nível trófico.

Durante a fase inicial, a taxa de síntese proteica excede a de degradação, resultando em um rápido desenvolvimento corporal e ganho de peso para frangos de corte (Zuidhoft, 2005).

#### 4. CONCLUSÃO

O *turnover* da L-( $^{15}\text{N}$ ) treonina varia conforme o tecido principalmente de acordo com sua função, sendo que há tecidos que predominam a deposição, como o músculo peitoral e sartório; e outros que atuam ativamente no metabolismo da L-( $^{15}\text{N}$ ) treonina como plasma, rins e jejuno.

#### 5. BIBLIOGRAFIA

ARAÚJO, E. D. S.; MEDEIROS, A. F. A.; DIAS, F. D. C.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M.; ALVES, B. J. R. *Quantificação do N do solo derivado das raízes da soja utilizando o isótopo  $^{15}\text{N}$* . **Revista Universidade Rural**, Série Ciência da Vida, v.24, n.1, p.7-12, 2004.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists**. 16 ed. Washington, 1995.

CAPITELLI, R.; CROSTA, L. Overview of psittacine blood analysis and comparative retrospective study of clinical diagnosis, hematology and blood chemistry in selected psittacine species. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, Texas, v. 16, n. 1, p. 71–120, 2013.

CARRIJO, A. S.; PEZZATO, A. C.; 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**, v.2, n.3, 2000.

CRITTENDEN, R. G.; ANDREW, A. S.; LEFOURNOUR, M.; YOUNG, M. D.; MIDDLETON, H.; STOCKMANN, R. *Determining the geographic origin of milk in*

*Australasia using multi-element stable isotope ratio analysis. International Dairy Journal*, v.17, p.421-428, 2007.

DEVLIN, R.M.; BARKER, A.V. **Photosynthesis**. Van Nostrand Reinhold Company: New York. 304p, 1971.

DIBNER, J. J.; RICHARDS, J. D. The Digestive System: Challenges and Opportunities. **Journal of Applied Poultry Research**, v.13, p.86–93, 2004.

FILHO, A. B.; MARCHINI, J. S. *Stable isotopes use on protein turnover in intensive care medicine. Revista brasileira terapia intensiva*, v.16, n.3, p.192-196, 2004.

DENADAI, J. C.; DUCATTI, C.; SARTORI, J. R.; PEZZATO, A. C.; GOTTMANN, R. *Rastreabilidade da farinha de carne e ossos bovinos em ovos de poedeiras comerciais pela técnica dos isótopos estáveis do carbono e nitrogênio. Revista Brasileira de Zootecnia*, v.40, n.12, p.2760-2766, 2011.

DENIRO, M.J.; EPSTEIN, S. *You are what you eat (plus a few ‰) the carbono isotope cycle in food chains. Geochimical Society of America*, v.6, p.834, 1976.

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

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

DUCATTI, C. Isótopos Estáveis Ambientais. Centro de Isótopos Estáveis Ambientais Depto. De Física e Biofísica - IB, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brasil, **Apostila**, pg. 205, 2007a.

DUCATTI, C. *Aplicação dos isótopos estáveis em aquicultura. Revista Brasileira de Zootecnia*, v.36, suplemento especial, p.1-10, 2007b.

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

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

GONZALES, E.; SARTORI, J.R. Crescimento e metabolismo muscular. In: MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte, cap.21. p.279-297, 2002.

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

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

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

KIDD, M. T.; KERR, B. J. *L-Threonine for poultry: a review*. **Journal Applied Poultry Research**, v.5, p.358-367, 1996.

KOCK, P.L.; FOGEL, M.L.; TUROSS, N. Tracing the diets of fossil animals using stable isotopes. In: LAJTHA, K.; MICHENER, R.H. (Ed). **Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, p.63-92, 1994.

LAJTHA, K.; MICHENER, R.H. **Stable isotopes in ecology and environmental science**. Blackwell Scientific Publications: Oxford, p.316, 1994.

LANA, G. R. Q.; ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; LANA, A. M. Q. Efeito da temperatura ambiente e da restrição alimentar sobre o desempenho e a composição da carcaça de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.4, p.1117-1123, 2000.

LICATTI F. Isótopos estáveis do carbono ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) em plantas do ciclo bioquímico  $\text{C}_3$  e  $\text{C}_4$  **[monografia]**. Botucatu (SP): Universidade Estadual Paulista; 1997.

MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. Fisiologia aplicada a frangos de corte. Jaboticabal: Funep, UNESP, p.375, 2002.

MACARI, M.; LUQUETTI, B. C. Fisiologia Cardiovascular. In: MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. Fisiologia Aviária Aplicada a Frangos de corte. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, p.17-35, 2002.

MAIORKA, A.; BOLELI, I. C.; & M. MACARI. Desenvolvimento e reparo da mucosa intestinal. In: Macari, M., R. L. Furlan, and E. Gonzalez, Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte. ed. FUNEP/UNESP, Jaboticabal, SP. p. 113–123, 2002.

MITUO, M. A. O. *Turnover do carbono-13 nos diferentes tecidos de frangos de corte em diferentes fases de crescimento. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 59p, 2008.*

MÓRI, C.; GARCIA, E. A.; DUCATTI, C.; DENADAI, J. C.; PELÍCIA, K.; GOTTMANN, R.; MITUO, M. A. O.; BORDINHON, A. M. *Traceability of animal byproducts in quail (*Coturnix coturnix japônica*) tissues using carbon ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) and nitrogen ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) stable isotopes. Revista Brasileira de Ciência Avícola, v.9, n.4, p.263-269, 2007.*

MURAMATSU, T.; HIRAMOTO, K.; TASAKI, I.; OKUMURA, J. Effect of protein starvation on protein turnover in liver, oviduct and whole body of laying hens. **Comparative Biochemistry and Physiology, Japan**, v. 87, n. 2, p. 227-232, 1987.

NAKASHITA, R.; SUZUKI, Y.; AKAMATSU, F.; IIZUMI, Y.; KORENAGA, T.; CHIKARAISHI, Y. *Stable carbon, nitrogen, and oxygen isotope analysis as a potential tool for verifying geographical origin of beef. Analytica Chimica Acta, v.617, p.148-152, 2008.*

PETERSON, B. J.; FRY B. *Stable isotopes in ecosystem studies. Annual review of ecology and systematics*, v. 18, p.293-320, 1987.

RIEDIJK, M. A.; STOLL, B.; CHACKO, S.; SCHIERBEEK, H.; SUNEHAG, A. L.; VAN GOUDOEVER, J. B.; BURRIN, D. G. Methionine transmethylation and transsulfuration in the piglet gastrointestinal tract. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Illinois, v.104, n.9, p.3408-3413, 2007.

ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; DONZELE, J. L.; GOMES, P. C.; OLIVEIRA, R. F. de; LOPES, D. C.; FERREIRA, A. S.; BARRETO, S. L. de T.; EUCLIDES, R. F. **Tabelas brasileiras para aves e suínos – Composição de alimentos e exigências nutricionais**, 3 ed., Viçosa, 2011.

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

WATERLOW, J. C. **Protein turnover**. CAB Internacional: Kings Lynn, 2006

WARRIS, P. D. **Meat Science. An introductory text**. CAB Internacional: Wallingford, 2000.

WHITTOW, G. C. **Sturkie's Avian Physiology**. Academic Press: London, 5<sup>th</sup> edition, 1999.

ZUANON, J. A. S. *Turnover de carbono em tecido muscular de alevinos de tilápias do Nilo (Oreochromis niloticus, cichlidae)*. **Tese (Doutorado em Aquicultura)** – Centro de Aquicultura da UNESP, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 65p., 2003.

ZUANON, J. A. S.; PEZZATO, A. C.; PEZZATO, L. E.; PASSOS, J. R. S.; BARROS, M. M.; DUCATTI, C. Muscle  $\delta$  <sup>13</sup>C change in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Effects of growth and carbono turnover. **Comparative Biochemistry and Physiology**, n. 145, p. 1001-1107, 2006.

ZUIDHOFT, M. J. Mathematical characterization of broiler carcass yield dynamics. **Poultry Science**, n.84, p.1108–1122, 2005.