

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

TURNOVER ISOTÓPICO DO ^{13}C EM AVES POEDEIRAS

ADRIELE NAYARA DIAS ISHIZUKA

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Zootecnia, como parte das
exigências para obtenção do título de Mestre

BOTUCATU - SP
JUNHO - 2014

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

TURNOVER ISOTÓPICO DO ¹³C EM AVES POEDEIRAS

ADRIELE NAYARA DIAS ISHIZUKA
MÉDICA VETERINÁRIA

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

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Zootecnia, como parte das
exigências para obtenção do título de Mestre

BOTUCATU - SP
JUNHO - 2014

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

Ishizuka, Adriele Nayara Dias.

Turnover isotópico do ^{13}C em aves poedeiras / Adriele Nayara Dias Ishizuka.
- Botucatu, 2014

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Carlos Ducatti

Coorientador: Juliana Célia denadai

Capes: 50405004

1. Ave poedeira. 2. Análise por diluição isotópica. 3. Isótopos estáveis. 4.
Sangue - Análise e química. 5. Carbono 13.

Palavras-chave: Aves; Carbono-13; Diluição isotópica; Isótopos estáveis; Sangue.

DEDICATÓRIA

À DEUS, por todas benções recebidas, principalmente por este mestrado.

À NOSSA SENHORA DA APARECIDA, por todas as graças concedidas.

AOS MEUS PAIS, Lindalva Dias e Jorge Ishizuka por tudo que fizeram por mim, por me apoiarem e estarem sempre comigo.

AO MEU IRMÃO, José Guilherme Ishizuka por ser meu companheiro e amigo.

À MINHA VÓ, Terezinha Soares Rosa por ser um exemplo de luta.

AO MEU NAMORADO, Marco Antônio Gonzales de Carvalho por ter deixado tudo para vir fazer parte deste sonho e por você ser tão especial para mim.

À DÓRIS, pelo seu amor incondicional e puro!

AGRADECIMENTOS

À FAPESP, pela bolsa de Mestrado (processo n° 2012/09422-2) e auxílio financeiro (projeto temático n° 2008/57411-4) concedidos para execução do projeto.

À CAPES, pela bolsa de estudo concedida, anteriormente à FAPESP.

Ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/UNESP-Botucatu, pela oportunidade e por acreditarem em mim.

Ao Prof. Dr. Carlos Ducatti, pela amizade, orientação, confiança e conselhos.

Ao Prof. Dr. Antonio Celso Pezzato e Prof. Dr. José Roberto Sartori pelo apoio, incentivo e instruções quando procurei a Pós-graduação no início de tudo.

À Profa. Dra. Juliana Célia Denadai, por ser mais do que minha co-orientadora, ser minha amiga, dividir seus conhecimentos e acreditar em mim.

À Profa. Dra. Maria Márcia Pereira Sartori, pela amizade, carinho, conselhos, análises estatísticas, enfim, por toda atenção, apoio e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Edivaldo Antônio Garcia, pela parceria, instalações do experimento, estágio docência e ensinamentos.

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

Aos meus grandes amigos do Centro de Isótopos Estáveis Ambientais IBB/UNESP, Evandro Tadeu Silva, Cibele Regina de Souza-Kruliski, Silvia Américo Maschette e Mariana Sasso Andreasi por me acolherem, pela grande amizade construída ao longo destes anos, pela paciência e por me ajudarem de coração em tudo.

À Tânia Maria Santarém Gonzales e Carlos Augusto Rosa pelo acolhimento, amor e paciência.

Aos meus amigos isotópicos, que fazem parte do Centro de Isótopos Estáveis Ambientais IBB/UNESP, Marco Antônio Gonzales de Carvalho, Bárbara Cristina da Silva Fernandes, Vanessa Cristina Pelícia, Priscila Cavalca de Araujo, Luciene Seraphim, Vânia Fornou, Ana Cristina Stradiotti, Michelle Ravelli, Marcela Buosi Martins, Rhani Ducatti, Guilherme Emygdio Mendes Pimenta e Jéssica Conteçote Russo.

E a todos que me ajudaram a tornar este sonho em realidade.

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	1
1. Revisão de literatura.....	2
1.1. O ovo como alimento.....	2
1.2. Formação dos ovos	4
1.3. Isótopos estáveis	5
1.4. Plantas.....	6
1.5. Isótopos estáveis em avicultura	7
1.6. Turnover.....	8
1.7. Justificativas e objetivos	10
2. Referências bibliográficas.....	11
CAPÍTULO 2 <i>TURNOVER</i> ISOTÓPICO DO ¹³ C EM SANGUE DE GALINHAS POEDEIRAS NA FASE DE PRÉ-POSTURA E FASE INICIAL DE POSTURA	18
Resumo.....	19
Abstract	20
Introdução	21
Material e Métodos	22
Resultados e Discussão	28
Conclusão.....	36
Agradecimentos	37
Referências.....	37
Tabelas	42
CAPÍTULO 3 VARIAÇÃO ISOTÓPICA DO ¹³ C EM OVOS DE GALINHAS POEDEIRAS NA FASE INICIAL DE POSTURA.....	44
Resumo.....	45
Abstract	46
Introdução	47
Material e Métodos	48
Resultados e Discussão	54
Conclusão.....	63
Agradecimentos	64

Referências.....	64
Tabelas	68
CAPÍTULO 4 IMPLICAÇÕES	70
1. Implicações	71

LISTA DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO 2	
Tabela 1. Composição percentual dos ingredientes, níveis nutricionais calculados e valor isotópico das dietas experimentais da fase de pré-postura e postura inicial.....	42
Tabela 2. Valores isotópicos do $\delta^{13}\text{C}$, expressos em ‰, dos tecidos amostrados no início e no fim dos períodos experimentais, a partir da substituição das dietas e os valores calculados de meia-vida ($t_{(50\%)}$) e troca total dos átomos de carbono ($t_{(99\%)}$), em unidade de dias.....	43
CAPÍTULO 3	
Tabela 1. Composição percentual dos ingredientes, níveis nutricionais calculados e valor isotópico das dietas experimentais na fase inicial da postura.....	68
Tabela 2. Valores isotópicos do $\delta^{13}\text{C}$, expressos em ‰, do ovo e suas frações amostrados no início e no fim do período experimental, a partir da substituição das dietas e os valores calculados de meia-vida ($t_{(50\%)}$), e troca total dos átomos de carbono ($t_{(99\%)}$), em unidade de dias.....	69
Tabela 3. Fator de fracionamento isotópico, expresso em ‰, do ovo e suas frações no fim do período experimental ($\Delta = \delta \text{ tecido} - \delta \text{ dieta}$).....	69

LISTA DE FIGURAS

Página

CAPÍTULO 2

- Figura 1. Curvas de *turnover* dos isótopos estáveis de carbono-13 em função do tempo de coleta no sangue das poedeiras na fase de pré-postura, alimentadas com dietas à base de quirera de arroz e farelo de soja, contendo fosfato bicálcico (ASFB) ou farinha de carne e ossos bovinos (ASFCO).29
- Figura 2. Curvas de *turnover* dos isótopos estáveis de carbono-13 em função do tempo de coleta no sangue das poedeiras no início da postura, alimentadas na pré-postura com dietas à base de quirera de arroz e farelo de soja, contendo fosfato bicálcico (ASFB) ou farinha de carne e ossos bovinos (ASFCO), alternando para dietas à base de milho moído e farelo de soja, contendo fosfato bicálcico (MSFB) ou farinha de carne e ossos bovinos (MSFCO)..... 30
- Figura 3. Curvas de *turnover* dos isótopos estáveis de carbono-13 em função do tempo de coleta no plasma das poedeiras na fase de pré-postura, alimentadas com dietas à base de quirera de arroz e farelo de soja, contendo fosfato bicálcico (ASFB) ou farinha de carne e ossos bovinos (ASFCO).33
- Figura 4. Curvas de *turnover* dos isótopos estáveis de carbono-13 em função do tempo de coleta no plasma das poedeiras no início da postura. alimentadas na pré-postura com dietas à base de quirera de arroz e farelo de soja, contendo fosfato bicálcico (ASFB) ou farinha de carne e ossos bovinos (ASFCO), alternando para dietas à base de milho moído e farelo de soja, contendo fosfato bicálcico (MSFB) ou farinha de carne e ossos bovinos (MSFCO)..... 34

CAPÍTULO 3

- Figura 1. Curvas de *turnover* dos isótopos estáveis de carbono-13 em função do tempo de coleta no ovo das poedeiras no início da postura, alimentadas no período pré-experimental com dietas à base de quirera de arroz e farelo de soja, contendo fosfato bicálcico (ASFB) ou farinha de carne e ossos bovinos (ASFCO), alternadas para dietas à base de milho moído e farelo de soja, contendo fosfato bicálcico (MSFB) ou farinha de carne e ossos bovinos (MSFCO) no período experimental. 56
- Figura 2. Curvas de *turnover* dos isótopos estáveis de carbono-13 em função do tempo de coleta no albúmen dos ovos das poedeiras no início da postura, alimentadas no período pré-experimental com dietas à base de quirera de arroz e farelo de soja, contendo fosfato bicálcico (ASFB) ou farinha de carne e ossos bovinos (ASFCO), alternadas para dietas à base de milho moído e farelo de soja, contendo fosfato bicálcico (MSFB) ou farinha de carne e ossos bovinos (MSFCO) no período experimental..... 57
- Figura 3. Curvas de *turnover* dos isótopos estáveis de carbono-13 em função do tempo de coleta na gema dos ovos das poedeiras no início da postura, alimentadas no período pré-experimental com dietas à base de quirera de arroz e farelo de soja, contendo fosfato bicálcico (ASFB) ou farinha de carne e ossos bovinos (ASFCO), alternadas para dietas à base de milho moído e farelo de soja, contendo fosfato bicálcico (MSFB) ou farinha de carne e ossos bovinos (MSFCO) no período experimental..... 58
- Figura 4. Representação visual do *turnover* isotópico do carbono-13 na gema do ovo de galinha coletado e cozido nos dias 0, 7, 10 e 14 após a troca da dieta C₃ para C₄, com os valores isotópicos médios. 61

CAPÍTULO 1
CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. Revisão de literatura

1.1. O ovo como alimento

O ovo é considerado um alimento nutricionalmente completo e ideal para o consumo, pois reúne mais de 14 vitaminas e minerais, tais como vitaminas B₁₂ e A, ácido fólico, riboflavina, selênio, colina, e os carotenóides luteína e zeaxantina que lhe confere propriedades antioxidantes. Além de ser uma das poucas fontes exógenas de vitaminas K e D (AGUIAR; ZAFFARI; HÜBSCHER, 2009; HERRON; FERNANDEZ, 2004).

Para demonstrar seu incontestável valor biológico, o ovo pode ser comparado ao leite materno. Também se destaca como fonte proteica de origem animal de alta qualidade e baixo valor calórico, que fornece aos mamíferos os aminoácidos essenciais cujo organismo é incapaz de sintetizar. Até mesmo o colesterol presente em sua gema apresenta propriedades fisiológicas importantes, por ser integrante da estrutura das membranas celulares e estar relacionado à síntese de hormônios esteróides, ácido biliar e vitamina D (NOVELLO et al., 2006).

Sua excelente qualidade nutricional é elucidada pelo seu papel original de câmara embrionária provedora de componentes necessários para o desenvolvimento da ave, ou seja, da vida. Estes componentes tornam o ovo fonte de princípios ativos utilizáveis por médicos, farmacêuticos e pelas indústrias de cosméticos e biotecnologia (ANTON; NAU; NYS, 2006).

O ovo também é considerado ingrediente polifuncional devido seu potencial de gelificação, emulsificação, formador de espuma, corantes, aromatizantes e outras especialidades que contribuem para a textura e as características organolépticas dos alimentos (ROSSI et al., 2010). Outra característica deste alimento é que seu sistema de produção gera uma proteína de origem animal mais sustentável do que outras produções de alimentos ricos em proteínas, como a carne bovina (ROCK, 2012).

Por se tratar de alimento tradicional, de fácil acesso, baixo custo e versátil na culinária, o ovo apresenta ascensão em sua popularidade. Ao longo da última década, a produção mundial aumentou 25% (FAO, 2011) e até 2015 é esperada taxa de

crescimento anual de aproximadamente 2%. Este crescimento pode ser atribuído aos países asiáticos, produtores tradicionais, que representam mais de 60% da produção mundial (PASCALE, 2010).

Dentre os principais produtores mundiais, destaca-se a China, por abranger 60% do crescimento mundial da produção de ovos, nos últimos 10 anos (PASCALE, 2010). A China é seguida pelos Estados Unidos e Índia, enquanto o Brasil segue em sétimo lugar com produção de 2,03 milhões de toneladas de ovos (FAO, 2011).

Segundo dados da União Brasileira de Avicultura (UBABEF), em 2012 as exportações brasileiras de ovos somaram 26,8 mil toneladas, tendo como principais regiões de destino a África com 14,1 mil toneladas e o Oriente Médio com 10,7 mil toneladas. O mercado interno brasileiro foi responsável pelo consumo de 99% da produção total de ovos, sendo a média de 161 ovos per capita (UBABEF, 2013).

O aumento no consumo de ovos nos últimos dez anos foi resultado da desmistificação dos riscos à saúde que poderiam ser causados pelo colesterol do ovo, já que vários estudos não obtiveram relação entre o risco de cardiopatias em pessoas saudáveis com o consumo de ovos (NOVELLO et al., 2006), e da maior disponibilidade deste alimento em churrascarias, restaurantes, bares, lanchonetes e em supermercados, onde existem ovos beneficiados descascados ou em conservas, prontos para o consumo a preços acessíveis (COSTA et al., 2007; MÓRI et al., 2005).

Contudo, em decorrência das consecutivas crises sanitárias que assolaram a Europa, como a crise da salmonela, crise da Encefalopatia Espongiforme Bovina – EEB, contaminações por dioxina, febre aftosa e a gripe aviária, nos dias de hoje, tanto os consumidores internos como os externos estão mais atentos e exigentes em relação à procedência dos alimentos que adquirem (CARFANTAN; BRUM, 2006).

Apesar desta apreensão relacionada à ingestão de alimentos contaminados ter se desencadeado nos anos 90 (COSTA; EUCLIDES FILHO, 2005; MALUF; MENEZES; VALENTE, 1996) a mudança no perfil dos consumidores iniciou-se desde meados da década de 1970 onde surgiu a necessidade da implementação das boas práticas e monitoramento da produção de alimentos durante todas as etapas de produção e também a preocupação com o meio ambiente e o bem-estar animal (COSTA; EUCLIDES FILHO, 2005).

A qualidade e a segurança alimentar são de fato preocupação mundial crescente, visto que a ocorrência de fraudes neste cenário também é muito frequente. Na China, só na primeira metade de 2012, foram registrados 15 mil casos de violação das leis de segurança alimentar. Inclusive este país vivencia epidemia de alimentos falsificados e adulterados, como o golpe lucrativo envolvendo a venda de ovos falsos e mortíferos a partir da mistura de gelatina, resina, parafina, gesso, corante e outras substâncias perigosas como óxido de alumínio que pode causar danos mentais (SILVEIRA, 2013). Deste modo, ferramentas que possibilitem sustentar a confiança dos consumidores, como a técnica dos isótopos estáveis são muito importantes.

1.2. Formação dos ovos

Quando a ave atinge a maturidade sexual, quatro a seis oócitos aumentam de diâmetro e é estabelecida a hierarquia folicular designada “Categorias F.Folículos” em função da hierarquia, ou posição de desenvolvimento (F1, F2, F3, F4, etc), sendo F1 o folículo de maior diâmetro e o próximo a ovular, F2 ovulará no dia seguinte e assim sucessivamente (SESTI, 2003).

Os folículos hierárquicos são selecionados a partir de pequeno grupo de pequenos folículos em desenvolvimento ou folículos não hierárquicos: Folículos Brancos Pequenos (FPB), Folículos Brancos Grandes (FBG), e Folículos Amarelos Pequenos (FAP). Estas denominações são derivadas do acúmulo em camadas concêntricas de vitelo branco ou amarelo produzido pelo fígado e transportado no sangue para serem incorporados aos folículos no ovário (JOHNSON, 2006; SESTI, 2003).

A vitelogênese ou formação da gema consiste em processo longo que começa no momento da eclosão com a fase de crescimento lento, seguida por fase de crescimento intermediário e por fim pela fase de grande crescimento, sendo que esta última etapa tem duração de 8 a 10 dias antes da ovulação e o peso passa de 200 mg para cerca de 17g (COTTA, 1997).

Nas galinhas o ciclo ovulatório é determinado principalmente pelo fotoperíodo. Quando a percepção de luz pelas aves é superior a 12 horas ocorre a estimulação dos fotorreceptores hipotalâmicos que ativam seus neurônios para secretar o hormônio de

liberação de gonadotropina (GnRH). O GnRH é então transportado para a hipófise, a qual em resposta secreta o hormônio folículo estimulante (FSH), que atua aumentando o tamanho dos folículos e o hormônio luteinizante (LH), que estimula a saída do oócito de seu folículo (JOHNSON, 2006).

O ovo inicia sua formação no ovário e vai se completando à medida que caminha nos diferentes compartimentos do oviduto, sendo necessárias aproximadamente 25 a 26 horas entre a liberação do oócito e a expulsão do ovo completo. O oviduto esquerdo é um tubo convoluto dividido em cinco regiões anatomicamente distinguíveis: infundíbulo, magno, istmo, útero e vagina. O infundíbulo consiste de um funil seguido por uma porção tubular e tem a função de captar o oócito e servir de sede para a fecundação, nesta porção o ovo em formação fica por volta de 18 minutos. No magno ocorre a formação de 80% do albúmen do ovo, neste segmento o ovo permanece 3 horas. O istmo é responsável por formar as duas membranas do ovo durante 90 minutos. No útero ocorre a finalização do albúmen e a formação da casca do ovo, o tempo de permanência nesta porção do oviduto pode variar entre 18 a 22 horas e por último a vagina, que serve de passagem do ovo para o meio externo (GÜRTLER et al., 1984; JOHNSON, 2006; SESTI, 2003).

1.3. Isótopos estáveis

O termo isótopo vem do grego *ISO* (mesmo ou igual) e *TOPOS* (lugar), referindo-se ao fato de que ocupam o mesmo lugar na tabela periódica. Os isótopos são espécies atômicas do mesmo elemento químico (mesmo número de prótons), mas que diferem em número de nêutrons, apresentando diferentes massas.

A utilização dos isótopos deve-se por estes terem características químicas semelhantes, ou seja, mesma eletrosfera, e propriedades físicas diferentes, por terem núcleos diferentes. Essa condição confere-lhes papel de traçadores naturais, pois possibilita sua passagem pelas membranas celulares de plantas e animais (DUCATTI, 2013). Por serem estáveis, ou seja, não emitirem radiações, são totalmente seguros e inofensivos para os humanos, animais e o meio-ambiente (DUCATTI, 2013; GANNES; DEL RIO; KOCH, 1998).

Os isótopos podem ser explorados a partir de duas vertentes: substratos enriquecidos artificialmente, expresso em átomos % e variação na abundância natural isotópica, denotada em partes por mil (per mil, ‰) (DUCATTI, 2013; GANNES; DEL RIO; KOCH, 1998). Os compostos enriquecidos, assim como a abundância isotópica, são aplicados a diversas áreas da ciência, porém sua utilização requer altos custos (GANNES; DEL RIO; KOCH, 1998).

Os isótopos estáveis do carbono (C), hidrogênio (H), oxigênio (O), nitrogênio (N) e enxofre (S) ocorrem naturalmente na atmosfera, hidrosfera, litosfera e biosfera. Cada elemento químico apresenta um isótopo estável *leve*, dominante: carbono-12 (^{12}C), hidrogênio-1 (^1H), oxigênio-16 (^{16}O), nitrogênio-14 (^{14}N) e enxofre-32 (^{32}S) e um ou dois isótopos *pesados*, menos abundantes: carbono-13 (^{13}C), hidrogênio-2 (^2H), oxigênio-17 (^{17}O), oxigênio-18 (^{18}O), nitrogênio-15 (^{15}N), enxofre-33 (^{33}S) e enxofre-34 (^{34}S) (DUCATTI, 2013).

A mensuração da relação entre os isótopos estáveis do mesmo elemento químico do carbono é determinada através da espectrometria de massas, sob a forma de análise relativa, onde o enriquecimento relativo é expresso em delta (δ). O resultado da razão isotópica do produto (δ) é comparado a um padrão internacional, sendo que para os isótopos do carbono o padrão adotado é o *Peedee Belemnite* (PDB) (DUCATTI, 2013).

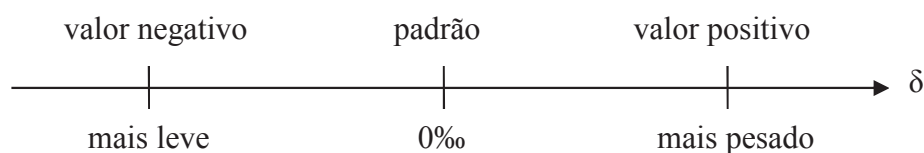
1.4. Plantas

De acordo com o ciclo fotossintético as plantas terrestres podem ser classificadas em dois principais grupos: plantas C_3 e C_4 , onde o primeiro composto orgânico a ser sintetizado é o ácido carboxílico, com três e quatro átomos de carbono, respectivamente. Segundo Ehleringer et al. (1991) aproximadamente 85% de todas as espécies de plantas utilizam a via C_3 . Dentre as plantas deste grupo estão a maioria das árvores e arbustos, a soja, o arroz, o trigo, a cevada, as frutas, as hortaliças e o algodão, entre outros. O grupo C_4 engloba o milho, sorgo, cana-de-açúcar, as forrageiras e outras gramíneas tropicais ou subtropicais.

As plantas com ciclo C_4 discriminam menos $^{13}\text{CO}_2$ ao longo da fotossíntese e, portanto, tem valores de $\delta^{13}\text{C}$ PDB maiores do que plantas C_3 . No geral, as plantas C_3 apresentam $\delta^{13}\text{C}$ em torno de -28‰, embora haja uma variação entre -20‰ a -35‰, e as

plantas C_4 têm o $\delta^{13}C$ por volta de -12‰ com variação por volta de -9‰ a -16‰ (DUCATTI, 2013; O’LEARY, 1988; RUNDEL; EHLERINGER; NAGY, 1989; SMITH; EPSTEIN, 1971).

Para fins ilustrativos existe ainda a interpretação genérica de uma régua isotópica com escala em δ , onde o termo leve indica que a amostra analisada possui menos isótopo pesado em relação ao padrão internacional e o termo pesado sugere que a amostra apresenta mais isótopo pesado em relação ao padrão.



A técnica dos isótopos estáveis tem sido muito utilizada nas áreas de fisiologia vegetal (EVANS, 2001; GLEIXNER et al., 1993), paleontologia (AMBROSE, 1990; BOCHERENS; CERLING, 2002; COLTRAIN et al., 2004; FIZET; MARIOTTI, 1994; FOGEL; HARE, 1988; HARE et al., 1991; KOHN; TUROSS;) e ecologia (FOX; FISHER, 2001; LONČARIĆ et al., 2006; PETERSON; FRY, 1987) para traçar processos biológicos, químicos e físicos.

Em situações onde há duas fontes alimentares isotopicamente distintas disponíveis para os animais, a análise isotópica dos tecidos dos mesmos pode fornecer informações quantitativas sobre as contribuições relativas de cada fonte para a dieta (HOBSON; CLARK, 1992), permitindo, por exemplo, comparar a participação relativa entre leguminosas e não leguminosas, ou entre organismos aquáticos e terrestres como fontes de alimento para animais ou até mesmo a reconstrução das dietas através de fósseis (DENIRO; EPSTEIN, 1978).

1.5. Isótopos estáveis em avicultura

Na avicultura de postura a autenticação dos diferentes sistemas de produção tem sido validado a partir das assinaturas isotópicas dos componentes dos ovos (CAPUANO et al., 2013), conforme verificado por Van Ruth et al. (2012) que conseguiram diferenciar ovos orgânicos de ovos de celeiros e ovos de galinhas soltas e Rogers (2009) que distinguiu ovos de gaiolas e celeiros de ovos de galinhas soltas e criadas no sistema orgânico.

As análises isotópicas dos ovos e suas frações possibilitaram identificar e rastrear os ovos postos por poedeiras que consumiram apenas ração vegetal, diferenciando-os de ovos provenientes de aves cuja alimentação continha produtos de origem animal (DENADAI et al., 2005, 2011). Assim como possibilitou a detecção em ovos de codornas e suas frações a inclusão de até 1% de farinhas de origem animal na dieta dessas aves (MÓRI et al., 2013) e de diferentes farinhas de origem animal na alimentação de poedeiras comerciais pela análise do produto final (DENADAI et al., 2008, 2009).

Nos últimos 30 anos a técnica dos isótopos estáveis vem sendo aplicada em diversas áreas, como na medicina humana para mensurar a atividade da tripsina pancreática no intestino delgado por meio do teste do ^{13}C da expiração. Este teste pode ser baseado na variação isotópica natural de substratos ricos em proteínas como a caseína, algas, ovo inteiro (gema + albúmen), gema e albúmen, ou enriquecidos isotopicamente (WETZEL; FISCHER, 2005).

No entanto, além de estudos de caracterização das cinéticas metabólicas (FISCHER; WETZEL, 2002), absorção e metabolização das proteínas (WETZEL; FISCHER, 2005), os isótopos estáveis também têm se mostrado muito promissores em nutrição e fisiologia animal (CARRIJO; PEZZATO; DUCATTI, 2000; GANNES; DEL RIO; KOCH, 1998; TIESZEN et al., 1983), em especial na área de avicultura, onde o atrelamento destes conhecimentos é aplicado em estudos de ovos marcados, origem geográfica das aves e certificação de sistemas de criação.

1.6. Turnover

Os constituintes corporais se encontram em total estado dinâmico, sendo alterados constantemente nos tecidos do animal, processo denominado de *turnover*. Todas as substâncias do corpo, sejam elas metabólitos orgânicos ou inorgânicos, estão sujeitas ao *turnover*, que pode ocorrer por meio de renovação tecidual resultante do processo de síntese e degradação em tecidos adultos e/ou pelo próprio crescimento nos tecidos em formação (diluição isotópica).

O *turnover* de componentes corporais e órgãos de animais podem ser mensurados a partir de dietas com assinaturas isotópicas contrastantes (GANNES; DEL

RIO; KOCH, 1998), baseado no conceito de que o animal é o que ele come, ou seja, que a assinatura isotópica do animal é reflexo da composição isotópica da sua dieta (DENIRO; EPSTEIN, 1978). Neste sentido, estudos experimentais com galinhas poedeiras foram conduzidos a fim de investigar as taxas de *turnover* do $\delta^{13}\text{C}$ do fígado e em ovos (gema + albúmen) (CARRIJO; PEZZATO; DUCATTI, 2000) e do sangue e ovos inteiros (gema + albúmen) e de seus componentes albúmen e gema separadamente (DENADAI et al., 2006), assim como no Embora as fezes e produtos de origem animal como os ovos e o leite não sejam considerados tecidos, e por isto, não possuem renovação tecidual, o *turnover* nestes casos fornece indicativos da taxa de renovação dos nutrientes para a sua formação (DENADAI et al., 2006; MARTINS, 2010), sem que haja a necessidade de sacrificar os animais (HOBSON; CLARK, 1992).

Nos estudos com *turnover* a escolha do tecido animal a ser analisado deve ser levada em consideração, devido os tecidos apresentarem diferentes taxas de substituição do carbono-13 provenientes da dieta. Tecidos metabolicamente mais ativos apresentam taxas de *turnover* isotópico mais rápido, logo irão indicar a dieta assimilada recentemente, enquanto os tecidos menos ativos refletem a dieta consumida em médio a longo prazo (HOBSON; CLARK, 1992; TIESZEN et al., 1983). A taxa de *turnover* do ^{13}C de diferentes tecidos para codornas foram classificadas em fígado > sangue > músculo > colágeno (HOBSON; CLARK, 1992) e semelhantemente para gerbil: fígado > gordura > músculo > cérebro > cabelo (TIESZEN et al., 1983).

De acordo com DeNiro e Epstein (1978) a distribuição dos isótopos de carbono através dos vários tecidos do animal não é uniforme, recomendando para pequenos organismos a utilização do animal inteiro para estimar o carbono da dieta. Alternativamente, Tieszen et al. (1983) sugerem a utilização de vários tecidos com taxa de renovação e fracionamento isotópico conhecido.

Após a mudança da dieta, a alteração da composição isotópica no tecido ou corpo depende da velocidade com que esses constituintes são substituídos. A alta taxa de *turnover* de tecidos moles pode obscurecer a importância relativa de plantas C_3 e C_4 presentes em dietas distintas que variam através do tempo (TIESZEN et al., 1983).

Ducatti et al. (2002), fundamentados em resultados da literatura, propuseram o modelo teórico capaz de exprimir os resultados do enriquecimento relativo do carbono ($\delta^{13}\text{C}$) em função do tempo de alimentação, fornecendo à animais adultos dietas

contrastantes em $\delta^{13}\text{C}$, formuladas com grãos de plantas dos ciclos fotossintéticos C_3 e C_4 .

Partindo do pressuposto que o metabolismo de determinado tecido animal depende da taxa de entrada de compostos de carbono provenientes da dieta e da taxa de substituição dos compostos pré-existentes, os autores chegaram à seguinte equação:

$$\delta^{13}\text{C}(t) = \delta^{13}\text{C}(f) + [\delta^{13}\text{C}(i) - \delta^{13}\text{C}(f)]e^{-kt} \quad (1)$$

Onde:

$\delta^{13}\text{C}(t)$ = enriquecimento isotópico do tecido em qualquer tempo (t). Adimensional.

$\delta^{13}\text{C}(f)$ = enriquecimento isotópico do tecido no patamar de equilíbrio, ou condição final. Adimensional.

$\delta^{13}\text{C}(i)$ = enriquecimento isotópico do tecido, na condição inicial. Adimensional.

k = constante de troca (*turnover*) em unidades de tempo⁻¹ e

t = tempo (em dias) desde a substituição da ração

1.7. Justificativas e objetivos

Os dados obtidos neste estudo servirão de fundamentos para futuros experimentos de rastreabilidade de subprodutos de origem animal utilizados na composição de dietas de galinhas poedeiras, através da análise dos ovos.

A taxa de *turnover* avaliará a velocidade que o isótopo do carbono-13 corporal será substituído e incorporado analisando sangue, plasma e ovos (gema e albúmen).

A substituição avaliará também o tempo mínimo necessário para que haja a troca total do carbono (99% dos átomos trocados).

O presente estudo tem por objetivo avaliar o *turnover* do carbono-13 pela substituição de dietas C_4 por C_3 e C_3 por C_4 , em sangue e plasma de poedeiras comerciais durante a fase de pré-postura e sangue, plasma e ovos ao longo da fase inicial da postura utilizando a técnica de isótopos estáveis de carbono.

O **Capítulo 2**, denominado “**Turnover isotópico do ^{13}C em sangue de galinhas poedeiras na fase de pré-postura e fase inicial de postura**” apresenta-se de acordo com as normas para publicação na **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. O objetivo deste

estudo foi avaliar o *turnover* do carbono-13 em sangue e plasma de poedeiras comerciais na fase de pré-postura pela substituição de dietas C₄ por C₃ e na fase inicial de postura pela troca de dietas C₃ por C₄ utilizando a técnica de isótopos estáveis de carbono.

O **Capítulo 3**, denominado “**Variação isotópica do ¹³C em ovos de galinhas poedeiras na fase inicial de postura**” apresenta-se de acordo com as normas para publicação na **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. O objetivo deste estudo foi avaliar o *turnover* do carbono-13 pela substituição de dietas C₃ por C₄, em ovos inteiros (gema + albúmen) e suas frações de poedeiras comerciais durante a fase inicial da postura utilizando a técnica de isótopos estáveis de carbono.

2. Referências bibliográficas

AMBROSE, S. H. Preparation and characterization of bone and tooth collagen for isotopic analysis. **Journal of Archaeological Science**, v. 17, n. 4, p. 431-451, 1990.

AGUIAR, M. S.; ZAFFARI, S.; HÜBSCHER, G. H. O ovo e sua contribuição na saúde humana, **Revista Saúde e Ambiente**, v. 10, n. 1, p. 47-55, 2009.

ANTON, M.; NAU, F.; NYS, Y. Bioactive egg components and their potential uses. **World's Poultry Science Journal**, v. 62, n. 3, p. 429-438, 2006.

BOCHERENS, H.; FIZET, M.; MARIOTTI, A. Diet, physiology and ecology of fossil mammals as inferred from stable carbon and nitrogen isotope biogeochemistry: implications for Pleistocene bears. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v. 107, n. 3, p. 213-225, 1994.

CAPUANO, E.; BOERRIGTER-EENLING, R.; VEER, G., RUTH, S. M. Analytical authentication of organic products: an overview of markers. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 1, p. 12-28, 2013.

CARFANTAN, J. Y.; BRUM, A. L. O agronegócio brasileiro e as novas regras de acesso ao mercado da União Européia. **Desenvolvimento em questão**, v. 4, n. 8, p. 119-157, 2006.

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, p. 209-218, 2000.

COLTRAIN, J. B.; HARRIS, J. M.; CERLING, T. E.; EHLERINGER, J. R.; DEARING, M. D.; WARD, J.; ALLEN, J. Rancho La Brea stable isotope biogeochemistry and its implications for the palaeoecology of late Pleistocene, coastal southern California. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v. 205, n. 3, p. 199-219, 2004.

COSTA, C. N.; EUCLIDES FILHO, K. Identificação Animal e Rastreamento da Produção de Bovinos de Corte e de Leite. **Agrosoft Brazil**, 2005. Disponível em: <<http://www.agrosoft.org.br/agropag/59.htm>>. Acesso em 08 jan. 2014.

COSTA, C. H. R.; BARRETO, S. L. T.; MOURA, W. C. O.; REIS, R. S.; LEITE, C. D. S.; MAIA, G. V. C. Níveis de fósforo e cálcio em dietas para codornas japonesas em postura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 6, p. 2037-2046, 2007.

COTTA, T. **Reprodução da Galinha e Produção de Ovos**. 1. ed. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. cap. 4.

DENADAI, J. C.; DUCATTI, C.; CALDARA, F. R.; OLIVEIRA, R. P.; SILVA, E. T. Certificação de ovos de poedeiras comerciais pela técnica dos isótopos estáveis. In: III

Congresso de Produção e Consumo de Ovos – APA, 2005, Indaiatuba. **Anais...** Indaiatuba: APA, 2005. p. 16-17.

DENADAI, J. C.; DUCATTI, C.; PEZZATO, A. C.; CARRIJO, A. S.; CALDARA, F. R.; OLIVEIRA, R. P. Studies on carbon-13 turnover in eggs and blood of commercial layers. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 8, n. 4, p. 251-256, 2006.

DENADAI, J. C.; DUCATTI, C.; SARTORI, J. R.; PEZZATO, A. C.; MÓRI, C.; GOTTMANN, R.; MITUO, M. A. O.; BORDINHON, A.M. The traceability of animal meals in layer diets as detected by stable carbon and nitrogen isotope analyses of eggs. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 10, n. 3, p. 189-194, 2008.

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

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. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 42, n. 5, 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**, Piracicaba, v. 59, n. 1, p. 29-33, 2002.

DUCATTI, C. **Isótopos estáveis ambientais** [Apostila]. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013. 105 p.

EHLERINGER, J. R.; SAGE, R. F.; FLANAGAN, L. B.; PEARCY, R. W. Climate change and the evolution of C₄ photosynthesis. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 6, n. 3, p. 95-99, 1991.

EVANS, R. D. Physiological mechanisms influencing plant nitrogen isotope composition. **Trends in Plant Science**, v. 6, n. 3, p. 121-126, 2001.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Production of livestock primary: egg, hens, in shell**. FAOSTAT, 2011. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QL/E>>. Acesso em: 27/03/2013.

FISCHER, H.; WETZEL, K. The future of ¹³C-breath tests. **Food and nutrition bulletin**, v. 23, n. 3, p. 53-56, 2002.

FOX, D. L.; FISHER, D. C. Stable isotope ecology of a late Miocene population of *Gomphotherium productus* (Mammalia, Proboscidea) from Port of Entry Pit, Oklahoma, USA. **Palaios**, v. 16, n. 3, p. 279-293, 2001.

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

GLEIXNER, G.; DANIER, H. J.; WERNER, R. A.; SCHMIDT, H. L. Correlations between the ¹³C content of primary and secondary plant products in different cell compartments and that in decomposing basidiomycetes. **Plant Physiology**, v. 102, n. 4, p. 1287-1290, 1993.

GÜRTLER, H.; KETZ, H.; KOLB, E.; SCHRÖDER, L.; SEIDEL, H. **Fisiologia Veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1984. cap. 16.

JOHNSON, P. A. Reprodução de aves. In: DUKES, H. H. **Fisiologia dos Animais Domésticos**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2006. p. 691-701.

KOHN, M. J.; CERLING, T. E. Stable isotope compositions of biological apatite. **Reviews in mineralogy and geochemistry**, v. 48, n. 1, p. 455-488, 2002.

LONČARIĆ, N.; PEETERS, F. J. C.; KROON, D.; BRUMMER, G. J. A. Oxygen isotope ecology of recent planktic foraminifera at the central Walvis Ridge (SE Atlantic). **Paleoceanography**, v. 21, n. 3, p. 1-18, 2006.

HARE, P. E.; FOGEL, M. L.; STAFFORD JR., T. W.; MITCHELL, A. D.; HOERING T. C. The isotopic composition of carbon and nitrogen in individual amino acids isolated from modern and fossil proteins. **Journal of Archaeological Science**, v. 18, n. 3, p. 277-292, 1991.

HERRON, K. L.; FERNANDEZ, M. L. Are the current dietary guidelines regarding egg consumption appropriate? **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 1, p. 187-190, 2004.

HOBSON, K. A.; CLARK, R. G. Assessing avian diets using stable isotopes I: turnover of ^{13}C in tissues. **The Condor**, v. 94, n. 1, p. 181-188, 1992.

MALUF, R. S.; MENEZES, F.; VALENTE, F. L. Contribuição ao tema da segurança alimentar no Brasil. **Revista Cadernos de Debate**, v. 4, p. 66-88, 1996.

MARTINS, M. B. **Turnover de carbono e a preferência alimentar de ovelhas por isótopos estáveis**, 2010. 68 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

MÓRI, C.; GARCIA, E. A.; PAVAN, A. C.; PICCININ, A.; SCHERER, M. R.; PIZZOLANTE, C. C. Desempenho e qualidade dos ovos de codornas de quatro grupos genéticos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 3, p. 864-869, 2005.

MÓRI, C.; DUCATTI, C.; PIZZOLANTE, C. C.; KAKIMOTO, S. K.; DENADAI, J. C. Traceability of animal meals in japanese quail eggs using the technique of ^{13}C e ^{15}N * stable isotopes. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 15, n. 1, p. 59-64, 2013.

NOVELLO, D.; FRANCESCHINI, P.; QUINTILIANO, D. A.; OST, P. R. Ovo: Conceitos, análises e controvérsias na saúde humana. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 56, n. 4, p. 315-320, 2006.

O'LEARY, M. H. Carbon isotopes in photosynthesis: Fractionation techniques may reveal new aspects of carbon dynamics in plants. **Bioscience**, v. 38, n. 5, p. 328-336, 1988.

PASCALE, M. **Future prospects for the European egg industry**. World Poultry, 2010. Disponível em: < <http://www.worldpoultry.net/Home/General/2010/7/Future-prospects-for-the-European-egg-industry-WP007678W/>>. Acesso em: 08 jan. 2014.

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

ROCK, L. The use of stable isotope techniques in egg authentication schemes: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 28, n. 2, p. 62-68, 2012.

ROGERS, K. M. Stable isotopes as a tool to differentiate eggs laid by caged, barn, free range, and organic hens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 10, p. 4236–4242, 2009.

ROSSI, M.; CASIRAGHI, E.; PRIMAVESI, L.; POMPEI, C.; HIDALGO, A. Functional properties of pasteurised liquid whole egg products as affected by the hygienic quality of the raw eggs. **LWT-Food Science and Technology**, v. 43, n. 3, p. 436-441, 2010.

RUNDEL, P. W.; EHLERINGER, J. R.; NAGY, K. A. **Stable isotopes in ecological research**. New York: Springer-Verlag, 1989. 525 p.

SESTI, L. A. C. Órgãos reprodutivos e reprodução das aves domésticas. In: MACARI, M.; GONZALES, E (Ed.). **Manejo da Incubação**. 2. ed. Jaboticabal: FACTA, 2003. p. 5-33.

SILVEIRA, J. Ovo made in China. **Revista Superinteressante**, v. 317, 2013.

SMITH, B. N.; EPSTEIN, S. Two categories of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios of higher plants. **Plant Physiology**, v. 47, n. 3, p. 380-384, 1971.

TIESZEN, L. L.; BOUTTON, T. W.; TESDAHL, K. G.; SLADE, N. A. Fractionation and turnover of stable carbon isotopes in animal tissues: implications for $\delta^{13}\text{C}$ analysis of diet. **Oecologia**, v. 57, n. 1-2, p. 32-37, 1983.

TUROSS, N.; FOGEL, M. L.; HARE, P. E. Variability in the preservation of the isotopic composition of collagen from fossil bone. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 52, n. 4, p. 929-935, 1988.

UBABEF, União Brasileira de Avicultura. **Relatório anual 2013**. UBABEF, 2013. Disponível em <<http://www.ubabef.com.br/files/publicacoes/732e67e684103de4a2117dda9ddd280a.pdf>>. Acesso em: 08 jan. 2014.

VAN RUTH, S.; ROGERS, K. ; NEWTON-SMITH, L. ; KOOT, A. ; ALEWIJN, M. **Authentication of organic eggs by LC fingerprinting and isotope ratio analysis**. Wageningen : RIKILT - Institute of Food Safety, 2012. Disponível em: <http://edepot.wur.nl/262780>. Acesso em: 10 jan. 2014.

WETZEL, K.; FISCHER, H. **^{13}C -breath tests in medical research and clinical diagnosis**. 4. ed. Leipzig: Fischer Analysen Instrumente GmbH, 2005.

CAPÍTULO 2

***TURNOVER* ISOTÓPICO DO ^{13}C EM SANGUE DE GALINHAS POEDEIRAS NA FASE DE PRÉ-POSTURA E FASE INICIAL DE POSTURA**

**Turnover isotópico do ^{13}C em sangue de poedeiras nas fases de pré-postura e
postura inicial**

Resumo

Este estudo avaliou o *turnover* do carbono-13 em sangue e plasma de poedeiras na fase de pré-postura e inicial da postura, pela substituição de dietas C_4 por C_3 e C_3 por C_4 , utilizando a técnica de isótopos estáveis de carbono. Foram utilizadas 144 aves divididas ao acaso em 2 tratamentos na pré-postura que receberam por 42 dias dietas à base de quireta de arroz e farelo de soja, fosfato bicálcico ou farinha de carne e ossos bovinos. Na fase inicial da postura, as aves dos dois tratamentos da fase de pré postura, foram divididas em quatro tratamentos, consituídos de dietas à base de milho moído e farelo de soja, fosfato bicálcico ou farinha de carne e ossos bovinos. Aos 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14, 19, 25, 32 e 42 de cada fase foram coletados sangue e plasma de 6 aves por tratamento. Os valores de meia-vida do sangue e plasma dos tratamentos ASFB e ASFCO da pré-postura foram maiores (17;4 e 15;5 dias respectivamente) do que os tratamentos ASFB-MSFB; ASFB-MSFCO; ASFCO-MSFB e MSFCO-MSFCO da postura inicial (meias-vidas de 11;10;11 e 9 para o sangue e 2;2;2 e 2 dias para o plasma). Deste modo, pode-se concluir que houve diferença da idade, mas não houve diferença em relação a dieta no turnover do sangue e plasma das aves.

Termos para indexação: aves, carbono-13, diluição isotópica, *Gallus gallus*, isótopos estáveis, plasma

Isotopic turnover of ^{13}C on blood of laying hens during the pre-laying and laying period

Abstract

This study aimed to assess the turnover of carbon-13 on blood and plasma of laying hens by replacing C_4 by C_3 diets and C_3 by C_4 diets during the pre-laying period and initial laying period using the technique of stable carbon isotopes. We used 144 laying hens randomly divided into two treatments of which were fed by 42 days in the pre-posture period with diets based on rice grits and soybean meal, containing dicalcium phosphate or bovine meat and bone meal. On the beginning of laying period the diets were changed and the poultry of the pre-laying period were divided into four treatments whose diets contained ground corn, soybean meal and dicalcium phosphate; or ground corn, soybean meal and bovine meat and bone meal. On days 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14, 19, 25, 32, and 42 of each period the blood and plasma from six birds per treatment were randomly collected. The half-life of blood and plasma of ASFB and ASFCO from pre-laying period were greater (17;4 and 15;5 days, respectively) than the treatments from initial laying period: ASFB-MSFB; ASFB-MSFCO; ASFCO-MSFB e MSFCO-MSFCO (half-life of 11;10;11 and 9 for blood, and 2;2;2 and 2 days for plasma. We concluded that the age of hens influenced the blood and plasma turnover whereas the diets did not influenced them.

Index terms: carbon-13, *Gallus gallus*, isotopic dilution, plasma, poultry, stable isotopes

Introdução

A técnica dos isótopos estáveis baseia-se na premissa de que o animal é o que ele consome, pois a assinatura isotópica do animal é reflexo da composição isotópica da sua dieta (DeNiro & Epstein, 1978). Deste modo, dietas com assinaturas isotópicas distintas podem ser utilizadas para mensurar o *turnover* de componentes corporais e órgãos de animais (Gannes et al., 1998).

De acordo com Hobson (2011) o *turnover* isotópico determina o período de integração no qual as dietas contribuem para a síntese de tecidos, constituído por efeitos associados ao crescimento e catabolismo. Em estudos isotópicos utilizando aves em cativeiros, este autor notou que as taxas de *turnover* dos tecidos de interesse acompanharam as mudanças de dietas isotopicamente diferentes.

Materiais biológicos podem apresentar diferentes assinaturas isotópicas em função de processos físico-químicos aptos a criar fracionamento isotópico. De acordo com Reich et al. (2008) pode ainda ter influência de outros fatores específicos, como o fracionamento metabólico entre dieta-tecido, *turnover* catabólico referente ao tipo de tecido, tamanho e a taxa de crescimento do animal.

De acordo com Zuanon et al. (2006), a relação entre *turnover* e crescimento mensurado pela síntese e degradação de proteína do tecido e/ou corporal pode ser fornecida satisfatoriamente pela variação natural dos isótopos estáveis de carbono e/ou nitrogênio, sendo os resultados observados semelhantes a outras metodologias que utilizam isótopos radioativos ou enriquecidos.

Carrijo et al. (2000) em seu experimento de alimentação controlada, usando duas dietas com valores de $\delta^{13}\text{C}$ distintos para investigar a taxa de *turnover* do carbono-13

em ovos e fígado de galinhas poedeiras, utilizaram aves de postura adultas para evitar as possíveis influências do metabolismo de crescimento.

Em experimento semelhante Denadai et al. (2006) também avaliaram a influência das dietas à base de plantas do ciclo fotossintético C_3 e/ou C_4 nas taxas de *turnover* do carbono-13 da gema, albúmen, ovo (gema + albúmen) e sangue de galinhas poedeiras no final da vida produtiva.

Compreendendo que o *turnover* pode ser influenciado pela idade do animal e que os trabalhos de Carrijo et al. (2000) e Denadai et al. (2006) avaliaram o *turnover* de tecidos de galinhas poedeiras no final da fase de postura, tornam-se necessários novos estudos utilizando dietas balanceadas nutricionalmente para investigar o *turnover* do sangue e plasma de poedeiras na fase de pré-postura e no início da fase de postura.

Sendo assim, este estudo tem por objetivo avaliar o *turnover* do carbono-13 em sangue e plasma de poedeiras comerciais na fase de pré-postura pela substituição de dietas C_4 por C_3 e na fase inicial de postura pela troca de dietas C_3 por C_4 utilizando a técnica de isótopos estáveis de carbono.

Material e Métodos

O experimento foi realizado na UNESP, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - *Campus* de Botucatu/SP, no setor de Avicultura da Fazenda Experimental Edgárdia. Por estar em acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, o projeto experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta Universidade e recebeu o protocolo experimental nº 182/2012.

Foram utilizadas 144 fêmeas, da linhagem LOHMANN LSL, alojadas em 24 gaiolas metálicas, medindo 100 cm de comprimento, 40 cm de altura e 45 cm de profundidade, dispostas em duas salas climatizadas. Cada gaiola era dividida em dois compartimentos de 50 cm, contendo três aves por compartimento, e eram providas individualmente de comedouros metálicos e bebedouros tipo niple. A alimentação e a água foram fornecidas à vontade.

O programa de luz adotado no início até a segunda semana de experimento foi de 13 horas de iluminação artificial, pois as aves vieram recebendo esta quantidade de luz da granja de origem. Quando as aves estavam com 18 semanas de idade foi aumentada progressivamente mais uma hora de luz, atendendo às 14 horas recomendadas pelo programa padrão de horas de luz do guia de manejo da linhagem LOHMANN LSL (Lohmann do Brasil, 2011).

As aves obtidas com 16 semanas de idade no início do experimento estavam recebendo dietas compostas predominantemente por grãos de plantas do ciclo fotossintético C₄ (aproximadamente 70% de milho e 30% de farelo de soja), portanto seus tecidos corporais apresentavam valores isotópicos semelhantes ao destas dietas. No período anterior ao experimento também houve a desvermifugação e imunização contra Pneumovirose, Doença de Newcastle, Bronquite Infecciosa, Gumboro, *Escherichia coli*, Coriza, Micoplasmose, Bóvia Aviária, Encefalomielite Aviária e Síndrome da Queda de Postura ou EDS-76.

Os ingredientes utilizados no preparo das dietas experimentais tiveram seus valores de proteína, cálcio, fósforo, energia metabolizável e aminoácidos estimados por Rostagno et al. (2011). As dietas foram formuladas de modo a atender às exigências nutricionais das aves estabelecidas pelo guia de manejo da linhagem LOHMANN LSL

(Lohmann do Brasil, 2011) e balanceadas para que os teores fossem isoenergéticos, isoprotéicos, isocálcicos, isofosfóricos e isoaminoacídicos para metionina + cistina e lisina (Tabela 1).

Para a fixação da porcentagem de inclusão da farinha de carne e ossos bovinos foi levado em consideração o atendimento das exigências na fase inicial de postura para não houvesse desbalanceamento das dietas. Sendo que na fase de pré-postura foi utilizada metade da quantidade de farinha de carne e ossos bovinos usada na fase inicial da postura.

Considerou-se neste estudo a fase de pré-postura como o período experimental de 42 dias, que teve início em 18 de dezembro de 2012 e término em 28 de janeiro de 2013. Nesta etapa as aves foram alojadas em delineamento experimental inteiramente casualizado, constituindo dois tratamentos de 72 aves, as quais receberam dietas de plantas do ciclo fotossintético C_3 à base de quirera de arroz, farelo de soja e fosfato bicálcico (ASFB) e quirera de arroz, farelo de soja e farinha de carne e ossos bovinos (ASFCO).

Após o período experimental descrito acima, as aves foram novamente rearranjadas em delineamento experimental inteiramente casualizado e tiveram as dietas C_3 substituídas pelas dietas C_4 , subdivididas em quatro tratamentos em que o tratamento da pré postura ASFB foi subdividido em milho, farelo de soja e fosfato bicálcico (ASFB-MSFB) e milho farelo de soja e farinha de carne e ossos bovino (ASFB-MSFCO), e o tratamento ASFCO foi subdividido em milho, farelo de soja e fosfato bicálcico (ASFCO-MSFB) e milho, farelo de soja e farinha de carne e ossos (ASFCO-MSFCO) da fase designada “inicial da postura”, porque abrangeu apenas 42 dias da fase

da postura (29 de janeiro até 11 de março de 2013). Cada tratamento foi composto por 36 aves alojadas em seis gaiolas com seis aves cada.

Foram amostrados aleatoriamente sangue e plasma de seis aves por tratamento, aos 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14, 19, 25, 32 e 42 dias após as trocas das dietas na pré-postura e no início da postura. O número de coletas das amostras foi mais concentrado nos primeiros dias de cada início dos tratamentos, devido à maior velocidade na diluição isotópica do carbono no tecido durante essa fase (Hobson & Clark, 1992). Também foram coletadas amostras das dietas experimentais e da farinha de carne e ossos bovinos, as quais foram acondicionadas em sacos plásticos identificados e congeladas a -18°C .

A coleta de sangue foi realizada na veia braquial, da asa esquerda, com seringa, agulha descartável e anticoagulante heparina, sendo colhidos aproximadamente 2,5 mL de sangue de cada ave, dos quais 1 mL foi acondicionado em microtubo plástico identificado e o restante (1,5 mL) foi colocado em tubo de vidro e centrifugado a 5000 rpm por 5 min para a obtenção do plasma, o qual foi pipetado e acondicionado em microtubo plástico identificado. Posteriormente as amostras identificadas foram congeladas a -18°C e armazenadas para posteriores análises isotópicas realizadas na UNESP, *Campus* de Botucatu, no Centro de Isótopos Estáveis Ambientais do Instituto de Biociências de Botucatu (CIE/IBB).

As amostras de sangue e plasma foram descongeladas e liofilizadas a vácuo (Liotop® Model L108; Liobras, São Carlos, SP, Brazil) a -55°C e pressão de 50 μHg por 48 horas. Depois de secas, foram colocadas em frascos de policarbonato individuais com três esferas de aço inoxidável, que foram fechados e congelados em nitrogênio líquido a -196°C , para serem moídas no moinho criogênico (Model Geno/Grinder 2010; Spex SamplePrep LLC, Metuchen, NJ, EUA) em frequência de 700 rpm durante 2 min.

As amostras das dietas e da farinha foram moídas semelhantemente ao sangue e o plasma, porém para obtenção da granulometria ideal foram necessárias três moagens de 5 min cada.

Posteriormente, massas de 70 a 90 μg para sangue e plasma e de 50 a 70 μg para as dietas e a farinha de carne e ossos bovinos foram pesadas em cápsulas de estanho através de balança analítica de alta sensibilidade (Modelo MX5; Mettler Toledo, Suíça) para as medidas das razões isotópicas de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$.

As cápsulas de estanho com as amostras foram introduzidas por meio de amostrador automático no analisador elementar (Flash 2000 Organic Elemental Analyzer EA for IRMS; Thermo Fisher Scientific Inc., Bremen, Alemanha), no qual as amostras sofreram individualmente o processo de combustão para a obtenção de CO_2 . Os gases formados foram separados em coluna cromatográfica gasosa e analisados no espectrômetro de massas de razões isotópicas (Delta V Advantage IRMS Model Finnigan DELTA-V; Thermo Fisher Scientific Inc., Bremen, Alemanha).

Os resultados foram expressos em notação $\delta^{13}\text{C}$, em relação ao padrão *PeedeeBelemnite* (PDB), com erro de análise da ordem de 0,2‰ e calculado pela equação 1:

$$\delta^{13}\text{C}_{(\text{amostra, padrão})} = [(R_{\text{amostra}}/R_{\text{padrão}}) - 1] \times 10^3 \quad (1)$$

Onde:

$\delta^{13}\text{C}$ = enriquecimento relativo da razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ da amostra em relação ao padrão PDB, em partes per mil (‰). Adimensional.

R = razão isotópica ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) da amostra e do padrão. Adimensional.

Para mensurar o *turnover* isotópico do carbono (diluição isotópica) em determinado intervalo de tempo, foi empregada a função exponencial do tempo expressa pela equação 2 (Ducatti et al., 2002):

$$\delta^{13}\text{C}(t) = \delta^{13}\text{C}(f) + [\delta^{13}\text{C}(i) - \delta^{13}\text{C}(f)]e^{-kt} \quad (2)$$

Onde:

$\delta^{13}\text{C}(t)$ = enriquecimento isotópico do tecido em qualquer tempo (t). Adimensional.

$\delta^{13}\text{C}(f)$ = enriquecimento isotópico do tecido no patamar de equilíbrio, ou condição final. Adimensional.

$\delta^{13}\text{C}(i)$ = enriquecimento isotópico do tecido, na condição inicial. Adimensional.

k = constante de troca (*turnover*). Expresso em dia^{-1} .

t = tempo (em dias) a partir da substituição da dieta.

A constante k engloba os processos de *turnover* metabólico de carbono e o acréscimo de compostos de carbono, ambos para o processo de diluição isotópica do carbono.

Para determinar o tempo de troca dos átomos de carbono e a porcentagem de átomos de carbono trocados, foi utilizada a equação 3:

$$t = -(1/k) \ln(1-F) \quad (3)$$

Onde:

t = tempo de troca do carbono. Expresso em dias.

k = constante de troca (*turnover*) em unidades de tempo^{-1} .

F = fração de átomos trocados, (F = 0,50, para meia vida e F = 0,99, para troca total).

Os dados obtidos pela análise isotópica foram analisados pelo programa MINITAB® 16 (2010).

Resultados e Discussão

Os valores isotópicos médios das dietas experimentais derivadas de plantas C₃ e C₄ (Tabela 1) foram de $\delta^{13}\text{C} = -27,76\text{‰}$, $-27,82\text{‰}$, $-17,39\text{‰}$ e $-15,17\text{‰}$ para as seguintes dietas à base de quirera de arroz, farelo de soja e fosfato bicálcico (ASFB), quirera de arroz, farelo de soja e farinha de carne e ossos bovinos (ASFCO), milho moído, farelo de soja e fosfato bicálcico (MSFB) e milho moído, farelo de soja e farinha de carne e ossos bovinos (MSFCO).

As dietas C₃ apresentaram diferença isotópica de apenas 0,06‰, pois estas, assim como as dietas C₄, foram formuladas para serem isoenergéticas, isoprotéicas, isocálcicos, isofosfóricos e isoaminoácidos. Contudo, entre as dietas C₄ a variação foi mais acentuada, apontando na dieta de MSFCO um enriquecimento isotópico de 2,22‰, atribuído à maior inclusão e contribuição isotópica da farinha de carne e ossos bovinos. A avaliação isotópica deste ingrediente foi de $\delta^{13}\text{C} = -14,14\text{‰}$, que refletiu segundo Deniro & Epstein (1978) a composição isotópica da alimentação dos animais que lhe deram origem (bovinos à pasto C₄), para o carbono-13.

O sangue das aves no início do período da pré-postura comprovou que estas consumiam anteriormente na granja de origem dietas derivadas predominantemente das plantas C₄, pois os valores isotópicos ajustados foram de $\delta^{13}\text{C} = -19,87\text{‰}$ e $-19,68\text{‰}$ para as aves que receberam ASFB e ASFCO, respectivamente. Ao longo do tempo estes valores foram se alterando gradativamente, de modo que aos 42 dias de coleta, este tecido apresentou valores isotópicos ajustados típicos das plantas C₃, $\delta^{13}\text{C} = -28,10\text{‰}$ e $-27,76\text{‰}$ para as aves que se alimentaram de ASFB e ASFCO (Figura 1).

As substituições das dietas C₃ por C₄ na fase da postura inicial foi acompanhada pelo sangue, que no primeiro dia desta etapa apresentava valores ajustados de $\delta^{13}\text{C} =$

-26,32‰, -25,80‰, -25,87‰ e -25,61‰ e no fim de $\delta^{13}\text{C} = -17,98\text{‰}$, -20,53‰, -18,02‰ e -20,49‰ para as poedeiras que consumiram ASFB-MSFB, ASFB-MSFCO, ASFCO-MSFB e ASFCO-MSFCO, respectivamente (Figura 2).

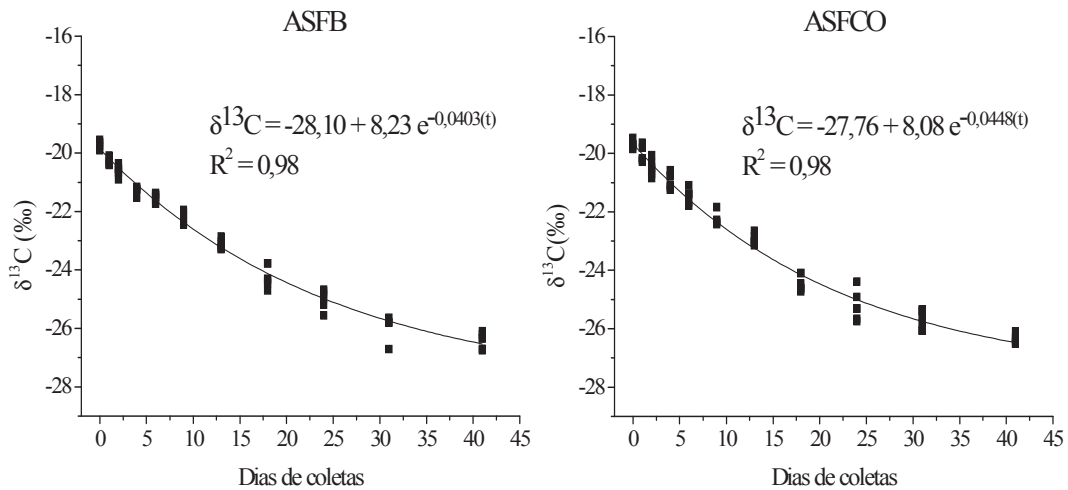


Figura 1. Curvas de *turnover* dos isótopos estáveis de carbono-13 em função do tempo de coleta no sangue das poedeiras na fase de pré-postura, alimentadas com dietas à base de quirera de arroz e farelo de soja, contendo fosfato bicálcico (ASFB) ou farinha de carne e ossos bovinos (ASFCO).

De acordo com as trajetórias das curvas de *turnover* dos tratamentos do sangue das fases experimentais estudadas, constatou-se que este tecido não conseguiu atingir o patamar de equilíbrio isotópico no último dia de coleta, pois não existe tendência de platô nas curvas ajustadas para este tecido (Figuras 1 e 2).

A fração de átomos trocados (F) até o 42º dia experimental (t) (equação 3) foi de 82% dos átomos para as poedeiras que consumiram ASFB e 85% dos átomos para as aves que se alimentaram de ASFCO durante a pré-postura. Na postura inicial os valores foram de 93%, 94%, 92% e 96% para os tratamentos ASFB-MSFB, ASFB-MSFCO, ASFCO-MSFB e ASFCO-MSFCO, respectivamente.

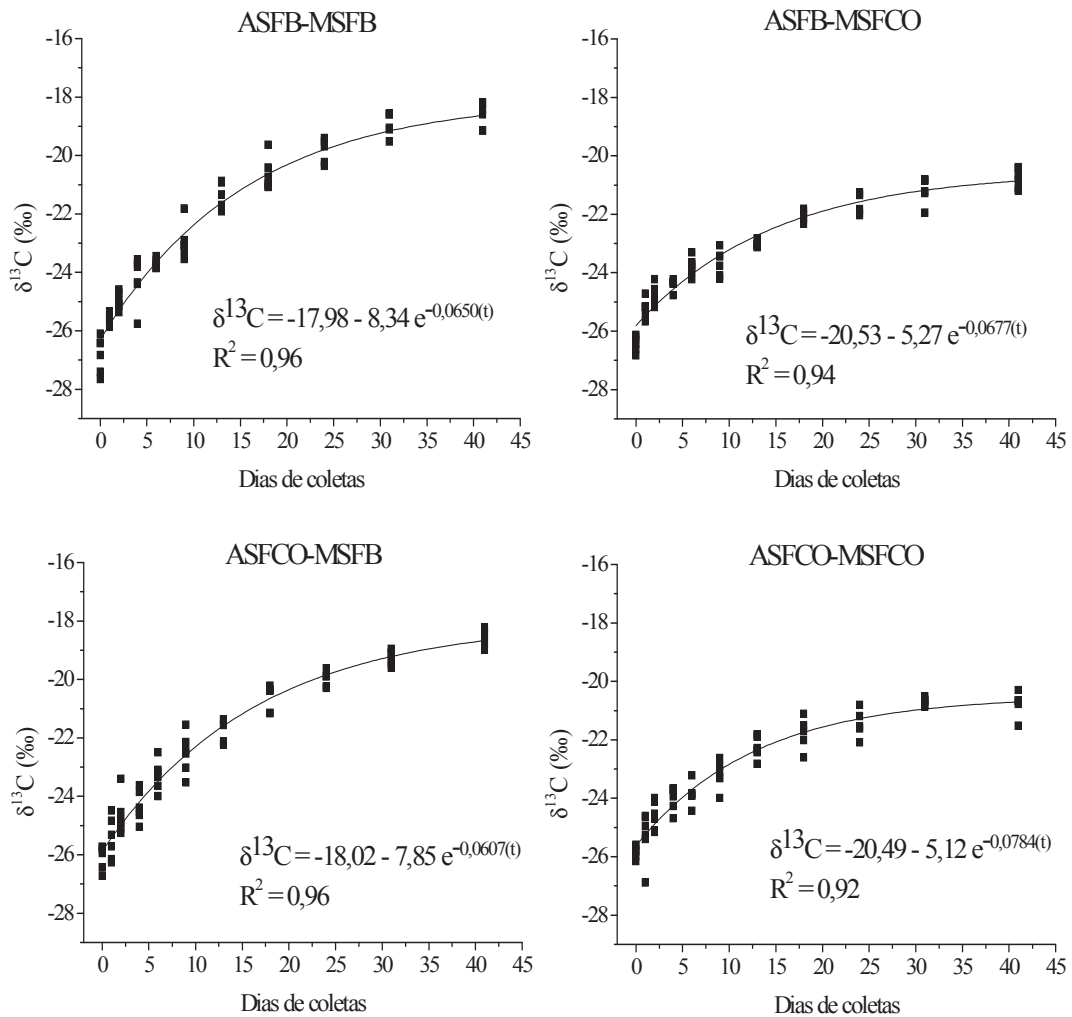


Figura 2. Curvas de *turnover* dos isótopos estáveis de carbono-13 em função do tempo de coleta no sangue das poedeiras no início da postura, alimentadas na pré-postura com dietas à base de quirera de arroz e farelo de soja, contendo fosfato bicálcico (ASFB) ou farinha de carne e ossos bovinos (ASFCO), alternando para dietas à base de milho moído e farelo de soja, contendo fosfato bicálcico (MSFB) ou farinha de carne e ossos bovinos (MSFCO).

O *turnover* do carbono-13 no sangue das aves foi mais lento na pré-postura ($t_{50\%} = 17$ e 15 dias) quando comparado com poedeiras na postura inicial ($t_{50\%} = 11, 10,$

11, e 9 dias), mostrando que houve diferença na taxa de substituição dos carbonos do sangue pelos da nova dieta.

Os valores de meia-vida e troca total dos átomos de carbono do sangue das aves na postura inicial foram semelhantes aos obtidos por Denadai et al. (2006) em poedeiras na fase final de postura. Nesta fase os valores de meia-vida e troca total ($t_{99\%}$) dos átomos foram de 11 e 74 dias quando houve a permuta da dieta predominantemente C_3 para C_4 e de 9 e 64 dias quando a substituição da dieta foi de C_4 para C_3 respectivamente.

Acredita-se que não houve diferença dos dados deste estudo aos achados da literatura (Carrijo et al., 2000; Denadai et al., 2006) porque com 16 semanas de idade as aves no início da fase de pré-postura já tinham passado pelo desenvolvimento corpóreo e estavam fisiologicamente na fase de amadurecimento do trato reprodutor feminino, pois as poedeiras possuem um padrão de crescimento multifásico, onde na 1ª até a 6ª semana há o desenvolvimento dos órgãos do trato digestivo e do sistema imune, durante a 6ª até a 12ª semana ocorre o crescimento rápido dos componentes estruturais (músculos e ossos), nesta etapa 95% do esqueleto se desenvolve no final da 12ª semana. Por fim, da 12ª até a 18ª semana a proporção de crescimento e peso diminui e o trato reprodutor amadurece e se prepara para a produção de ovos. O esqueleto completa seu desenvolvimento na 13ª semana (Kwakkel et al., 1997).

Porém, a diferença no *turnover* entre a fase de pré-postura e postura inicial pode ser atribuída às modificações na fisiologia reprodutiva que requerem do organismo da ave suportes endócrinos específicos, maior aporte de nutrientes e um rico suprimento de sangue para fornecer ao embrião os componentes necessários para o seu desenvolvimento (Froman et al., 2004; Johnson, 2006).

Na postura o controle da ovulação e da formação do ovo ocorre por interação neuro-hormonal, onde os hormônios secretados pelos folículos ovarianos em maturação coordenam vários efeitos fisiológicos através de uma série de eventos metabólicos. Os estrógenos, hormônios sexuais femininos, estão entre os principais hormônios produzidos, atuando na dilatação e vascularização do oviduto, mobilizando gordura para a síntese da gema e aumentando o metabolismo hepático, além de mobilizarem o cálcio ósseo para a formação da casca do ovo e atuarem na dilatação dos ossos púbicos e da cloaca, necessária para a oviposição (Moreng & Avens, 1990; Proudman, 1994).

Tipicamente, a produção de ovos inicia-se na fase de pré-postura, entre 18 a 20 semanas de idade, após a fêmea alcançar a maturidade sexual pela exposição subsequente a um fotoperíodo crescente. Entretanto, a forma como isto acontece não é efetiva, pois os ovos são postos esporadicamente, por isto não ocorre a mesma influência no metabolismo das aves, como observado na fase inicial da postura. Além disso, a formação do ovo envolve o transporte pelo sangue não apenas de hormônios das glândulas endócrinas para as células alvo, mas também de grandes quantidades de nutrientes do lúmen intestinal para o fígado e demais tecidos para a síntese de substâncias como proteínas e lipídios (Moreng & Avens, 1990; Macari & Luquetti, 2002). Sendo assim, a ração da postura inicial destinada a suprir o aumento das exigências nutricionais ao longo do período de produção de ovos deve ser rica em energia, nutrientes e conter 85% a mais de cálcio do que a ração da pré-postura (Lohmann do Brasil, 2011).

Quanto ao plasma, os valores isotópicos ajustados no início das coletas foram de $\delta^{13}\text{C} = -18,90\text{‰}$ e $-18,84\text{‰}$ para as aves que consumiram na pré-postura ASFB e ASFCO, respectivamente. No último dia de amostragem, esse tecido apresentava

valores de $\delta^{13}\text{C} = -26,63\text{‰}$ para o tratamento de ASFB e $\delta^{13}\text{C} = -27,19\text{‰}$ para ASFCO (Figura 3).

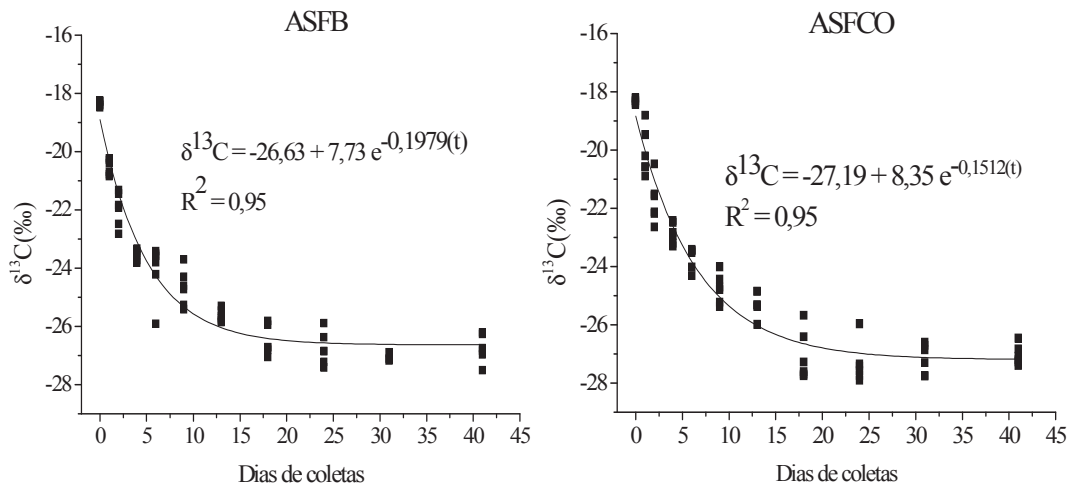


Figura 3. Curvas de *turnover* dos isótopos estáveis de carbono-13 em função do tempo de coleta no plasma das poedeiras na fase de pré-postura, alimentadas com dietas à base de quirera de arroz e farelo de soja, contendo fosfato bicálcico (ASFB) ou farinha de carne e ossos bovinos (ASFCO).

As poedeiras dos grupos ASFB-MSFB, ASFB-MSFCO, ASFCO-MSFB e ASFCO-MSFCO da postura inicial tiveram valores isotópicos do plasma ajustados de $\delta^{13}\text{C} = -26,79\text{‰}$, $-27,00\text{‰}$, $-26,60\text{‰}$ e $-26,93\text{‰}$. Com o passar dos dias os valores próximos das plantas C_3 foram se modificando gradualmente, de modo que ao final da fase de postura os valores isotópicos médios refletiram a assinatura isotópica das plantas C_4 , sendo de $\delta^{13}\text{C} = -18,20\text{‰}$, $-20,32\text{‰}$, $-17,87\text{‰}$ e $-20,59\text{‰}$ para os tratamentos citados acima (Figura 4).

As poedeiras da pré-postura que consumiram ASFB apresentaram para o plasma meia-vida ($t_{50\%}$) de 4 dias e troca total dos átomos ($t_{99\%}$) de 22 dias, enquanto as aves que receberam ASFCO tiveram meia-vida ($t_{50\%}$) de 5 dias e troca total ($t_{99\%}$) de 30 dias.

As meia-vidas ($t_{50\%}$) de todos os tratamentos do plasma na fase da postura inicial foram de 2 dias, e as trocas totais dos átomos ($t_{99\%}$) foram de 12, 11, 14 e 15 dias para os tratamentos ASFB-MSFB, ASFB-MSFCO, ASFCO-MSFB e ASFCO-MSFCO, respectivamente (Tabela 2).

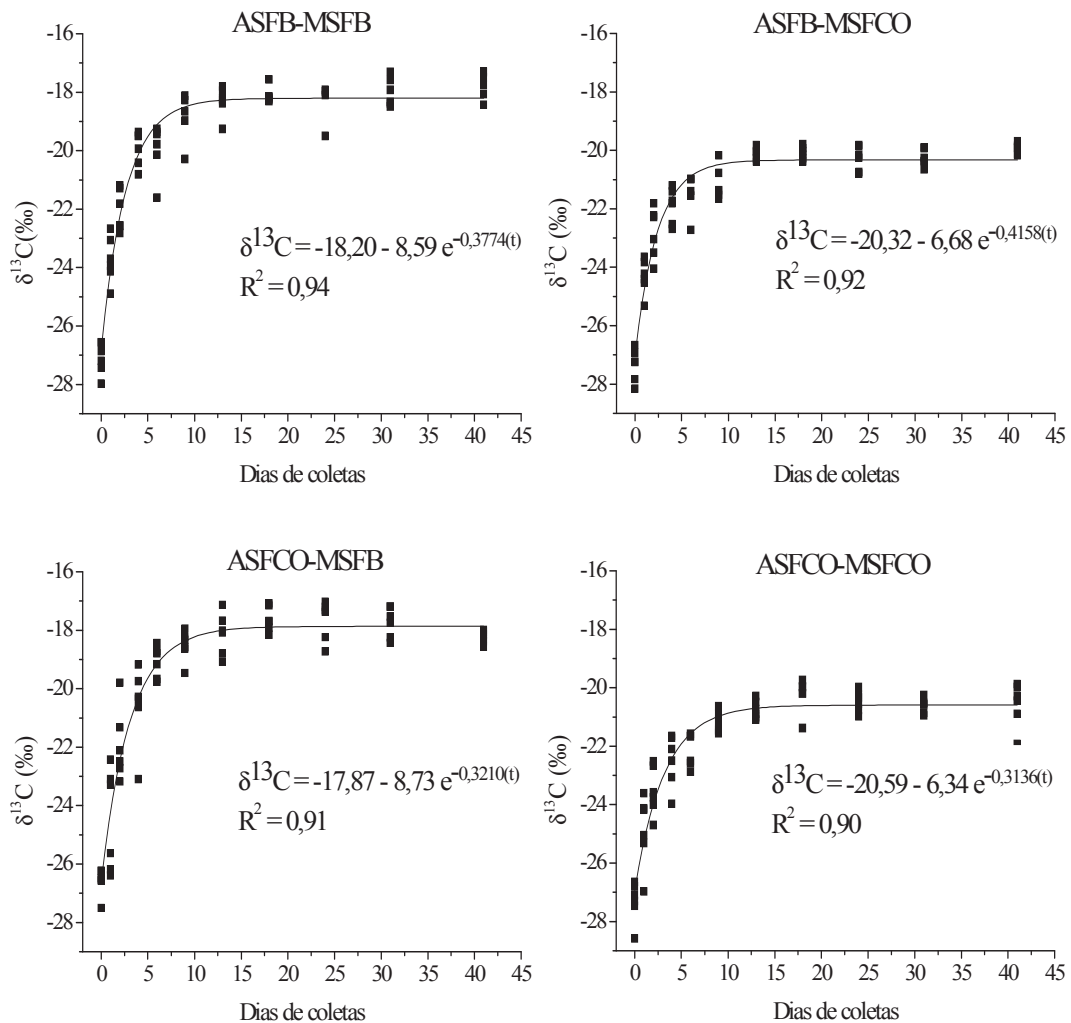


Figura 4. Curvas de *turnover* dos isótopos estáveis de carbono-13 em função do tempo de coleta no plasma das poedeiras no início da postura, alimentadas na pré-postura com dietas à base de quirera de arroz e farelo de soja, contendo fosfato bicálcico (ASFB) ou farinha de carne e ossos bovinos (ASFCO), alternando para dietas à base de milho moído e farelo de soja, contendo fosfato bicálcico (MSFB) ou farinha de carne e ossos bovinos (MSFCO).

O plasma das aves da pré-postura e postura inicial tiveram as meia-vidas ($t_{50\%}$) semelhantes às encontradas por Hobson & Clark (1993), quando avaliaram o *turnover* do carbono no plasma de corvos que tiveram a dieta C_3 substituída por C_4 . Estes autores encontraram meia-vida de 3 dias e verificaram que o tempo experimental de 60 dias foi satisfatório para que houvesse a substituição e incorporação da assinatura isotópica da nova dieta no plasma, pois assim como as galinhas poedeiras, com 42 dias de experimento, este tecido de troca isotópica rápida, já tinha atingido o patamar de equilíbrio isotópico.

Os resultados de meia-vida ($t_{50\%}$) e troca total dos átomos de carbono-13 ($t_{99\%}$) do plasma também apontaram que as aves da postura inicial possuem o *turnover* mais rápido do que as aves da pré-postura. A elucidação para isto fundamenta-se nos mesmos esclarecimentos descritos anteriormente para o sangue, pois o plasma é a fração líquida do sangue, com sais e proteínas dissolvidos (Macari & Luquetti, 2002).

Comparando os resultados isotópicos obtidos para o sangue e o plasma fica evidente que o plasma teve o *turnover* mais acelerado tanto na fase de pré-postura como na fase de postura inicial. Estas diferenças nas taxas de *turnover* entre o sangue e o plasma deve-se à velocidade de troca dos componentes destes tecidos, visto que o sangue total apresenta ritmo lento na taxa de *turnover* devido às células terem maior longevidade do que os constituintes do plasma, por este motivo fornecem informações de longo prazo, enquanto o plasma possui ritmo acelerado na taxa de *turnover*, fornecendo informações de curto prazo (Pearson et al., 2003). Em termos de velocidade na taxa de *turnover* o plasma pode ser equiparado até mesmo com o metabolicamente ativo fígado (Hobson & Clark, 1993) uma vez que as proteínas deste tecido são sintetizadas principalmente neste órgão (Michalopoulos & DeFrances, 1997).

No entanto, o sangue segundo Hobson & Clark (1992), por apresentar taxa de *turnover* do carbono semelhante ao do musculo peitoral, que é intermediário aos tecidos de troca rápida como o fígado e aos de troca lenta (Tieszen et al., 1983), como a queratina, pode ser classificado como tecido de troca isotópica intermediária. Neste sentido, a taxa de *turnover* do carbono-13 de diferentes tecidos estabelecida por Hobson & Clark (1992, 1993) em uma sequência decrescente de: plasma > sangue > fração celular do sangue, atestou o conceito de que o *turnover* dos elementos realmente podem variar entre os diferentes componentes do corpo (Kennedy & Krouse, 1990).

Em relação à utilização da farinha de carne e ossos bovinos nas dietas experimentais foi verificado que não houve influência deste ingrediente na taxa de *turnover* nos tecidos analisados na fase de pré-postura e postura inicial, provavelmente porque as dietas foram formuladas para suprirem igualmente as exigências das poedeiras durante as respectivas fases.

As análises isotópicas do sangue e plasma ao longo do período experimental proporcionaram nova perspectiva para a interpretação da fisiologia animal, comprovando o potencial da técnica dos isótopos estáveis como ferramenta para esclarecer as influências do metabolismo das aves nas diferentes fases de produção.

Conclusão

De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que o *turnover* isotópico do carbono-13 no sangue e plasma foi mais rápido nas poedeiras da fase inicial da postura quando comparado com as aves da fase de pré-postura. O plasma teve o *turnover* mais acelerado tanto na fase de pré-postura como na fase de postura inicial.

No entanto não houve diferença dentro da fase produtiva e em relação as dietas experimentais no *turnover* do sangue e plasma na fase de pré e inicial de postura.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo financiamento da pesquisa através do projeto temático nº 2008/57411-4 e pela bolsa de mestrado do projeto nº 2012/09422-2.

Referências

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, p.209-218, 2000.

DENADAI, J.C.; DUCATTI, C.; PEZZATO, A.C.; CARRIJO, A.S.; CALDARA, F.R.; OLIVEIRA, R.P. Studies on carbon-13 turnover in eggs and blood of commercial layers. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.8, n.4, p.251-256, 2006.

DENIRO, M.J.; EPSTEIN, S. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v.42, n.5, 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**, Piracicaba, v.59, n.1, p.29-33, 2002.

FROMAN, D.P.; KIRBY, J.D.; PROUDMAN, J.A. Reprodução em Aves: Macho e Fêmea. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. (Ed.) **Reprodução Animal**. 7. ed. Barueri: Manole Ltda, 2004. cap. 16.

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

HOBSON, K.A.; CLARK, R.G. Assessing avian diets using stable isotopes I: turnover of ^{13}C in tissues. **The Condor**, v.94, n.1, p.181-188, 1992.

HOBSON, K.A.; CLARK, R.G. Turnover of ^{13}C in cellular and plasma fractions of blood: implications for nondestructive sampling in avian dietary studies. **The Auk**, v.110, n.3, p.638-641, 1993.

HOBSON, K.A. Isotopic ornithology: a perspective. **Journal of Ornithology**, v.152, n.1, p.S49-S66, 2011.

JOHNSON, P.A. Reprodução de aves. In: DUKES, H.H. (Ed.). **Fisiologia dos Animais Domésticos**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2006. p. 691-701.

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

KWAKKEL, R.P.; ZANDSTRA, T.; KOOPS, W.J. Pubertal growth spurt in layer pullets predicts point of lay. **World Poultry**, v.13, n.6, p.39-42, 1997.

LOHMANN DO BRASIL. **Guia de manejo Lohmann LSL**. São José do Rio Preto, SP: Lohmann do Brasil, 2011. 30p.

MACARI, M.; LUQUETTI, B.C. Fisiologia Cardiovascular. In: MACARI, M.; FURLAN, R.L; GONZALES, E. (Ed.). **Fisiologia Aviária Aplicada a Frangos de Corte**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2002. cap. 2.

MICHALOPOULOS, G.K.; DEFRANCES, M.C. Liver regeneration. **Science**, v.276, n.5309, p.60-66, 1997.

MINITAB®16. Version 16.1.1. State College, PA: Minitab Inc., 2010. Software.

MORENG, E.; AVEN, J.S. **Ciência e Produção de Aves**. 1. ed. São Paulo: Roca, 1990. cap. 3.

PEARSON, S.F.; LEVEY, D.J.; GREENBERG, C.H.; DEL RIO, C.M. Effects of elemental composition on the incorporation of dietary nitrogen and carbon isotopic signatures in an omnivorous songbird. **Oecologia**, v.135, n.4, p.516-523, 2003.

PROUDMAN, J. A. Hormônios Reprodutivos das Aves. In: FACTA. **Fisiologia da Reprodução de Aves**. 1. ed. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 1994. p. 31-46.

REICH, K.J.; BJORN DAL, K.A.; DEL RIO, C.M. Effects of growth and tissue type on the kinetics of ^{13}C and ^{15}N incorporation in a rapidly growing ectotherm. **Oecologia**, v.155, n.4, p.651-663, 2008.

ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L.; GOMES, P.C.; OLIVEIRA, R.F.; LOPES, D.C.; FERREIRA, A.S.; BARRETO, S.L.T.; EUCLIDES, R.F. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, DZO, 2011. 252p.

TIESZEN, L.L.; BOUTTON, T.W.; TESDAHL, K.G.; SLADE, N.A. Fractionation and turnover of stable carbon isotopes in animal tissues: implications for $\delta^{13}\text{C}$ analysis of diet. **Oecologia**, v.57, n.1-2, p.32-37, 1983.

ZUANON, J.A.S.; PEZZATO, A.C.; PEZZATO, L.E.; PASSOS, J.R.S.; BARROS, M.M.; DUCATTI, C. Muscle $\delta^{13}\text{C}$ change in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*):

Effects of growth and carbon turnover. **Comparative Biochemistry and Physiology**

Part B: Biochemistry and Molecular Biology, v.145, n.1, p.101-107, 2006.

Tabelas

Tabela 1. Composição percentual dos ingredientes, níveis nutricionais calculados e valor isotópico das dietas experimentais da fase de pré-postura e postura inicial.

Ingredientes (%)	Dietas experimentais ⁽¹⁾			
	Pré-postura		Postura inicial	
	ASFB	ASFCO	MSFB	MSFCO
Quirera de arroz	67,45	67,43	-	-
Milho moído	-	-	57,36	62,59
Farelo de soja (45%)	25,95	22,67	29,64	22,37
Farinha de carne e ossos bovinos	-	3,40	-	6,60
Calcário calcítico	3,60	3,15	8,34	7,48
Fosfato bicálcico	2,07	1,10	1,92	-
DL-Metionina	0,06	0,07	2,11	0,33
Sal comum	0,35	0,35	0,13	0,13
Suplemento vitamínico ⁽²⁾	0,10	0,10	0,35	0,35
Suplemento mineral ⁽³⁾	0,05	0,05	0,10	0,10
Inerte (caulim)	0,37	1,68	0,05	0,05
Total	100,00	100,00	100,00	100,00
Níveis Nutricionais Calculados				
Energia metabolizável (kcal/kg)	2800	2800	2800	2800
Proteína bruta (%)	17,50	17,50	18,00	18,00
Cálcio (%)	2,00	2,00	3,70	3,70
Fósforo disponível (%)	0,45	0,45	0,45	0,45
Fibra bruta (%)	1,71	1,54	2,56	2,27
Metionina (%)	0,37	0,37	0,40	0,40
Aminoácidos sulfurados (%)	0,66	0,65	0,70	0,68
Lisina (%)	0,92	0,90	0,96	0,91
$\delta^{13}\text{C}$ (‰) (Média±DP, n=6)	-27,76±0,24	-27,82±0,20	-17,39 ± 0,43	-15,17 ± 0,28

⁽¹⁾ASFB: quirera de arroz, farelo de soja e fosfato bicálcico; ASFCO: quirera de arroz, farelo de soja e farinha de carne e ossos bovinos; MSFB: milho moído, farelo de soja e fosfato bicálcico; MSFCO: milho moído, farelo de soja e farinha de carne e ossos bovinos. ⁽²⁾Suplemento vitamínico: níveis mínimos de garantia/kg de produto: ácido fólico, 100mg; ácido pantotênico, 6.000mg; BHT, 1.000mg; biotina, 5mg; niacina, 20g; vitamina A, 7.000.000 UI; vitamina B1, 250mg; vitamina B12, 6.000mg; vitamina B2, 3.000mg/kg; vitamina B6, 150mg; vitamina D3, 2.500.000 UI; E, 8.000mg; K3, 1.200mg. ⁽³⁾Suplemento mineral: níveis mínimos de garantia/kg de produto: manganês, 50g; zinco, 40g; ferro, 30g; cobre, 6g; iodo 400mg; selênio, 180mg.

Tabela 2. Valores isotópicos do $\delta^{13}\text{C}$, expressos em ‰, dos tecidos amostrados no início e no fim dos períodos experimentais, a partir da substituição das dietas e os valores calculados de meia-vida ($t_{(50\%)}$) e troca total dos átomos de carbono ($t_{(99\%)}$), em unidade de dias.

Fase da postura	Tratamentos ⁽¹⁾	Sangue				Plasma			
		$\delta^{13}\text{C}$		$t_{(50\%)}$	$t_{(99\%)}$	$\delta^{13}\text{C}$		$t_{(50\%)}$	$t_{(99\%)}$
		Início	fim			Início	Fim		
Pré	ASFB	-19,87	-28,10	17	114	-18,90	-26,63	4	23
	ASFCO	-19,68	-27,76	15	103	-18,84	-27,19	5	30
Início	ASFB-MSFB	-26,32	-17,98	11	71	-26,79	-18,20	2	12
	ASFB-MSFCO	-25,80	-20,53	10	68	-27,00	-20,32	2	11
	ASFCO-MSFB	-25,87	-18,02	11	76	-26,60	-17,87	2	14
	ASFCO-MSFCO	-25,61	-20,49	9	59	-26,93	-20,59	2	15

⁽¹⁾ASFB: quirera de arroz, farelo de soja e fosfato bicálcico; ASFCO: quirera de arroz, farelo de soja e farinha de carne e ossos bovinos; MSFB: milho moído, farelo de soja e fosfato bicálcico; MSFCO: milho moído, farelo de soja e farinha de carne e ossos bovinos.

CAPÍTULO 3
VARIAÇÃO ISOTÓPICA DO ^{13}C EM OVOS DE GALINHAS
POEDEIRAS NA FASE INICIAL DE POSTURA

Variação isotópica do ^{13}C em ovos de galinhas poedeiras na fase inicial de postura

Resumo

Avaliou-se o *turnover* do carbono-13 pela substituição de dietas C_3 por C_4 , em ovos inteiros e suas frações, utilizando a técnica de isótopos estáveis. Foram utilizadas 144 poedeiras que consumiram quirera de arroz e farelo de soja, e fosfato bicálcico ou farinha de carne e ossos bovinos, para marcar isotopicamente seus tecidos. Na fase inicial de postura, as aves foram distribuídas em quatro grupos que passaram a consumir por 42 dias milho moído e farelo de soja, e fosfato bicálcico ou farinha de carne e ossos bovinos. Aos 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14, 19, 25, 32 e 42 dias foram coletados aleatoriamente 12 ovos por tratamento para amostragem de ovo inteiro, albúmen e gema. As meia-vidas variaram de 3 a 4 dias para o ovo, de 2 a 3 dias para o albúmen e de 6 dias para a gema sendo condizentes com o processo fisiológico de síntese do ovo. O *turnover* do carbono-13 foi mais rápido no albúmen, seguido pelo ovo inteiro e gema. Conclui-se que o *turnover* do ovo inteiro foi de 3 a 4 dias, da gema em torno de 6 dias e do albúmen de 2-3 dias, independentemente da fase produtiva da ave e da dieta.

Termos para indexação: albúmen, carbono-13, diluição isotópica, gema, isótopos estáveis, *turnover*

Isotopic turnover of ^{13}C on eggs of laying hens during the laying period

Abstract

This study evaluated the carbon-13 turnover by replacing C_3 by C_4 diets, in whole eggs and its fractions using the stable isotope technique. Were used 144 laying hens fed by 42 days at the pre-experimental period diets based on rice grits and soybean meal containing dicalcium phosphate or bovine meat and bone meal to mark their tissues isotopically. In the laying period the hens were redistributed into four groups that consumed by 42 days diets based on ground corn and soybean meal containing dicalcium phosphate or bovine meat and bone meal. On days 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14, 19, 25, 32, and 42, twelve eggs were randomly collected by treatment for sampling of whole egg, albumen and yolk. The half-lives ranged between 3 to 4 days for eggs, 2 to 3 days for albumen, and 6 days for yolk. The results obtained were consistent with the process of egg formation. The turnover of carbon-13 was faster in albumen, followed by whole egg and yolk. We concluded that the turnover of whole egg (3 to 4 days), yolk (6 days), and albumen (2 to 3 days) were not impacted by the production period or the diets used.

Index terms: albumen, carbon-13, *Gallus gallus*, isotopic dilution, stable isotope, yolk

Introdução

O ovo por ser alimento altamente consumido no mundo, também está relacionado à crescente preocupação com as questões de segurança alimentar, que é resultante da crescente globalização da cadeia alimentar, combinada com os recentes surtos de doenças transmitidas por alimentos (Thompson et al., 2005), como os casos de contaminação da carne de frango por dioxinas, surtos de febre aftosa, encefalopatia espongiforme bovina (EEB) ou doença-da-vaca-louca, alimentos geneticamente modificados, com resíduos químicos, pesticidas e hormônios (Morris & Young, 2000; Northen, 2001; Bailey et al., 2002; Opara, 2003).

Nesse contexto, é indispensável a busca por ferramentas como os isótopos estáveis que proporcionam a rastreabilidade e autenticidade dos ovos, possibilitando a certificação de origem por agências governamentais reguladoras (Rock et al., 2013). No entanto, para isto são essenciais estudos experimentais de *turnover* isotópico dos constituintes corporais, para avaliar o impacto da troca das dietas em sistemas de produção de ovos sobre a composição isotópica destes (Rock, 2012).

O *turnover* pode ser entendido como a taxa que cada isótopo é incorporado e eliminado de um compartimento biológico sob a condição de equilíbrio (Kennedy & Krouse, 1990). O período em que a assinatura isotópica da dieta será refletida no tecido dependerá, em parte, da taxa de *turnover* do tecido, se este for rápido a dieta refletida será a recente, agora se for lento indicará a dieta consumida de médio a longo prazo (Hobson & Clark, 1992).

Estudos experimentais de *turnover* do carbono-13 em ovos de galinhas poedeiras foram realizados por Carrijo et al. (2000) e Denadai et al. (2006), que investigaram a taxa de *turnover* em sangue, ovo inteiro, gema e albúmen de poedeiras. Em ambos

estudos foram utilizadas aves no final da vida produtiva com 82 e 120 semanas de idade, respectivamente, e com as dietas experimentais simplificadas e isentas de subprodutos de origem animal.

Carrijo et al. (2000) recomendaram a utilização de ovos para estudos futuros que tivessem como objetivo investigar o *turnover* do carbono-13 em poedeiras, devido este possuir taxa de substituição do carbono semelhante à do fígado, tecido de troca rápida, e fornecer informações da dieta das aves sem a necessidade de sacrificá-las.

Embora as fezes e produtos de origem animal como os ovos e o leite não serem considerados tecidos e portanto não possuem renovação tecidual, o *turnover* nesses casos fornece indicativos da taxa de renovação dos nutrientes para a sua formação (Denadai et al., 2006). Sendo assim, o presente estudo tem por objetivo avaliar o *turnover* do carbono-13 pela substituição de dietas C₃ por C₄, em ovos inteiros (gema + albúmen) e suas frações, de poedeiras comerciais durante a fase inicial da postura utilizando a técnica de isótopos estáveis de carbono.

Material e Métodos

O experimento foi realizado na UNESP, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - *Campus* de Botucatu/SP, no setor de Avicultura da Fazenda Experimental Edgárdia. Foi gerado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta Universidade o protocolo nº 182/2012, aprovando o experimento por estar de acordo com os princípios éticos na experimentação animal.

Foram utilizadas 144 fêmeas da linhagem LOHMANN LSL com 22 semanas de idade, no início do período experimental designado “fase inicial de postura”, visto que foi avaliado apenas a fase inicial de produção de ovos. As aves foram alojadas em 24

gaiolas metálicas, medindo 100 cm de comprimento, 40 cm de altura e 45 cm de profundidade, que ocupavam duas salas. As gaiolas eram divididas em dois compartimentos de 50 cm que alojavam três aves cada e eram providas individualmente de comedouros metálicos e bebedouros tipo niple. A alimentação e água foram fornecidas à vontade.

Foi utilizado o programa de 14 horas de luz artificial e 10 horas de escuro, sendo este necessário para o descanso das aves. Para o estabelecimento de zona de conforto térmico, a temperatura e a ventilação foram controladas por meio de ar condicionado e exaustores, sendo mantida entre 22 e 24°C.

As aves foram adquiridas com 16 semanas de idade e recebiam dietas compostas predominantemente por grãos de plantas do ciclo fotossintético C₄. No momento do alojamento as aves foram divididas em dois grupos de 72 aves cada (fase pré-experimental), que receberam dietas à base de plantas C₃: quirera de arroz e farelo de soja, contendo fosfato bicálcico (ASFB) ou farinha de carne e ossos bovinos (ASFCO), a fim de marcar isotopicamente os tecidos das aves com valor isotópico distinto das dietas experimentais.

O período experimental compreendeu 42 dias (de 29 de janeiro até 11 de março de 2013). As aves foram distribuídas em delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro tratamentos contendo seis repetições de seis aves cada. As aves do período pré experimental que recebiam dieta contendo quirera de arroz, farelo de soja e fosfato bicálcico, foram divididas em dois tratamentos na fase experimental, com milho moído e farelo de soja, contendo fosfato bicálcico (ASFB-MSFB) ou farinha de carne e ossos bovinos (ASFB-MSFCO). Os animais que consumiam dieta à base de quirera de arroz, farelo de soja e farinha de carne e ossos bovinos na fase pré-

experimental, foram divididos em dois tratamentos, passando para dietas à base milho moído e farelo de soja, com inclusão de fostato bicálcico (ASFCO-MSFB) ou farinha de carne e ossos bovinos (ASFCO-MSFCO) na fase experimental.

Os ingredientes utilizados no preparo das dietas experimentais tiveram seus teores de proteína, cálcio, fósforo, energia metabolizável e aminoácidos, estimados por Rostagno et al. (2011) e as dietas foram formuladas de modo a atender às exigências nutricionais das aves, estabelecidas pelo guia de manejo da linhagem LOHMANN LSL (Lohmann do Brasil, 2011) e balanceadas para que fossem isoenergéticas, isoprotéicas, isocálcicas, isofosfóricas e isoaminoácidas para metionina + cistina e lisina (Tabela 1).

Para a fixação da porcentagem de inclusão da farinha de carne e ossos bovinos foi levado em consideração o atendimento das exigências na fase inicial de postura para não houvesse desbalanceamento das dietas.

Foram tomados aleatoriamente 12 ovos por tratamento, para a coleta das amostras de gema, albúmen e ovo (gema + albúmen) nos dias 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14, 19, 25, 32 e 42 após a troca das dietas. Seis ovos foram utilizados para a amostragem de gema e albúmen separadamente e os outros seis homogeneizados em liquidificador para amostragem de ovo (gema + albúmen). As amostras foram colocadas em tubos plásticos identificados e congeladas a -18°C para armazenagem. Também foram coletadas amostras das rações experimentais e da farinha de carne e ossos bovinos, que foram identificadas, congeladas a -18°C e armazenadas para a futura obtenção dos valores isotópicos.

O número de coletas das amostras foi concentrado nos primeiros dias de coleta devido à maior velocidade na diluição isotópica do carbono no tecido durante essa fase (Hobson & Clark, 1992).

Para realização das análises isotópicas no Centro de Isótopos Estáveis Ambientais do Instituto de Biociências de Botucatu (CIE/IBB), da UNESP, *Campus* de Botucatu, todas as amostras foram retiradas do freezer e liofilizadas a vácuo (Liotop® Modelo L108; Liobras, São Carlos, SP, Brazil) a -55°C e pressão de $50\ \mu\text{Hg}$ por 48 horas.

Após serem desidratadas, as amostras de ovo (gema + albúmen) e gema foram acondicionadas individualmente em papel filtro indentificado e desengorduradas no Soxhlet (Modelo MA491; Marconi, Piracicaba, SP, Brasil). Neste aparelho as amostras foram imersas em éter etílico por 4 horas sob temperatura de 55 a 65°C e suspensas por 1 hora para lavagem final com o éter evaporado. Após isto, foram mantidas por 1 hora em estufa de ventilação forçada (Modelo MA035; Marconi, Piracicaba, SP, Brasil) para uma completa volatilização do éter remanescente. A extração lipídica foi necessária porque os lipídios são empobrecidos em ^{13}C (Ehrich et al., 2011).

A próxima etapa constituiu-se da moagem e homogeneização das amostras por meio de moinho criogênico (Modelo Geno/Grinder 2010; Spex Sample Prep LLC, Metuchen, NJ, EUA) a -196°C . Para isto, estas foram acondicionadas individualmente em frascos de policarbonato, juntamente com três esferas de aço inoxidável, os frascos foram fechados e congelados por 1 min em nitrogênio líquido. Após o congelamento, os frascos foram encaminhados ao aparelho de moagem, que ao oscilar em movimentos para cima e para baixo em frequência de 700 rpm foi responsável por impactar as esferas e a amostra, culminando assim em amostras uniformes e com granulometria fina (μm). O tempo estimado de moagem foi de 3 min para o ovo inteiro (gema + albúmen) e suas frações. As rações e a farinha de carne e ossos bovinos foram submetidas da mesma forma ao congelamento e moagem em moinho criogênico, contudo, para

obtenção da granulometria ideal, estes processos foram repetidos três vezes durante 5 min cada moagem.

Depois de moídas, todas as amostras foram pesadas em balança analítica de alta sensibilidade (Modelo MX5; Mettler Toledo, Suíça) utilizando a massa de 50 a 70 μg e acondicionadas em cápsulas de estanho.

Para a determinação da composição isotópica das amostras as cápsulas foram introduzidas por meio de amostrador automático no analisador elementar (Flash 2000 Organic Elemental Analyzer EA for IRMS; Thermo Fisher Scientific Inc., Bremen, Alemanha), no qual as amostras foram queimadas para a formação de CO_2 . Os gases formados foram separados em coluna cromatográfica gasosa e analisados no espectrômetro de massas de razões isotópicas (Delta V Advantage IRMS Model Finnigan DELTA-V; Thermo Fisher Scientific Inc., Bremen, Alemanha).

Os resultados foram expressos em notação $\delta^{13}\text{C}$, em relação ao padrão *PeedeeBelemnite* (PDB), com erro de análise da ordem de 0,2‰ e calculado pela equação 1:

$$\delta^{13}\text{C}_{(\text{amostra, padrão})} = [(R_{\text{amostra}}/R_{\text{padrão}}) - 1] \times 10^3 \quad (1)$$

Onde:

$\delta^{13}\text{C}$ = enriquecimento relativo da razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ da amostra em relação ao padrão PDB, em partes per mil (‰). Adimensional.

R = razão isotópica ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) da amostra e do padrão. Adimensional.

Para mensurar o *turnover* isotópico do carbono (diluição isotópica) em determinado intervalo de tempo, foi empregada a função exponencial do tempo expressa pela equação 2, (Ducatti et al., 2002) ou o modelo sigmoidal de regressão de Boltzman segundo a equação 3, atribuindo-se a terminologia isotópica:

$$\delta^{13}\text{C}(t) = \delta^{13}\text{C}(f) + [\delta^{13}\text{C}(i) - \delta^{13}\text{C}(f)]e^{-kt} \quad (2)$$

Onde:

$\delta^{13}\text{C}(t)$ = enriquecimento isotópico do tecido em qualquer tempo (t). Adimensional.

$\delta^{13}\text{C}(f)$ = enriquecimento isotópico do tecido no patamar de equilíbrio, ou condição final. Adimensional.

$\delta^{13}\text{C}(i)$ = enriquecimento isotópico do tecido, na condição inicial. Adimensional.

k = constante de troca (*turnover*). Expresso em dia^{-1} .

t = tempo (em dias) a partir da substituição da dieta.

$$\delta^{13}\text{C}(t) = \delta^{13}\text{C}(f) + \frac{\delta^{13}\text{C}(i) - \delta^{13}\text{C}(f)}{1 + e^{\frac{(t-\chi_0)}{dx}}} \quad (3)$$

Onde:

$\delta^{13}\text{C}(t)$: enriquecimento isotópico do tecido em qualquer tempo (t). Adimensional.

$\delta^{13}\text{C}(f)$: enriquecimento isotópico do tecido no patamar de equilíbrio, ou condição final. Adimensional.

$\delta^{13}\text{C}(i)$: enriquecimento isotópico do tecido, na condição inicial. Adimensional.

χ_0 : ponto de inflexão da sigmóide. Representa a meia vida do carbono. Expresso em dias.

dx: constante de tempo. Expresso em dias.

t: tempo experimental. Expresso em dias.

A constante k engloba os processos de *turnover* metabólico de carbono e o acréscimo de compostos de carbono, ambos para o processo de diluição isotópica do carbono.

Para determinar o tempo de troca dos átomos de carbono e a porcentagem de átomos de carbono trocados, foi utilizada a equação 4:

$$t = -(1/k) \ln(1-F) \quad (4)$$

Onde:

t = tempo de troca do carbono. Expresso em dias.

k = constante de troca (*turnover*) em unidades de tempo⁻¹.

F = fração de átomos trocados, (F = 0,50, para meia vida e F = 0,99, para troca total).

Para calcular o fracionamento isotópico, que pode ser resumido como um enriquecimento ou deplecionamento do isótopo, entre o δ do tecido e da dieta, foi empregada a equação 5:

$$\Delta = \delta \text{ tecido} - \delta \text{ dieta} \quad (5)$$

Os dados obtidos pela análise isotópica foram analisados pelo programa MINITAB[®]16 (2010).

Resultados e Discussão

As análises isotópicas das dietas experimentais (Tabela 1) mostraram que houve enriquecimento de 2,22‰ da dieta de milho moído, farelo de soja e farinha de carne e ossos bovinos (MSFCO) com valor de $\delta^{13}\text{C} = -15,17\text{‰}$ comparada à dieta de milho moído, farelo de soja e fosfato bicálcico (MSFB) com valor de $\delta^{13}\text{C} = -17,39\text{‰}$. Isto pode ser justificado pela influência do valor isotópico de $\delta^{13}\text{C} = -14,14\text{‰}$ da farinha de carne e ossos bovinos, a qual é reflexo direto da dieta consumida pelos animais que lhe deram origem (bovinos criados em pasto C₄, em condições brasileiras), acrescido de $\pm 2,0\text{‰}$ para o carbono-13 (DeNiro & Epstein, 1978).

Os valores isotópicos ajustados do primeiro dia de coleta do ovo inteiro (gema + albúmen) das poedeiras que se alimentaram de quirera de arroz, farelo de soja e fosfato bicálcico (ASFB) foram de $\delta^{13}\text{C} = -27,05\text{‰}$ e $\delta^{13}\text{C} = -26,73\text{‰}$ e passaram a apresentar

valores de $\delta^{13}\text{C} = -18,83\text{‰}$ e $\delta^{13}\text{C} = -20,18\text{‰}$, para MSFB e MSFCO, respectivamente. Para as aves que receberam quirera de arroz, farelo de soja e farinha de carne e ossos bovinos (ASFCO) e depois MSFB e MSFCO os valores ajustados foram de $\delta^{13}\text{C} = -25,86\text{‰}$ e $\delta^{13}\text{C} = -26,31\text{‰}$ no início e de $\delta^{13}\text{C} = -17,96\text{‰}$ e $\delta^{13}\text{C} = -19,97\text{‰}$ no fim (Figura 1).

As razões isotópicas ajustadas do albúmen durante a fase inicial da postura foram de $\delta^{13}\text{C} = -26,75\text{‰}$, $-26,45\text{‰}$, $-26,23\text{‰}$ e $-25,96\text{‰}$ e passaram para $\delta^{13}\text{C} = -18,36\text{‰}$, $-19,58\text{‰}$, $-18,39\text{‰}$ e $-19,89\text{‰}$ para os animais que consumiram ASFB-MSFB, ASFB-MSFCO, ASFCO-MSFB e ASFCO-MSFCO, respectivamente (Figura 2).

Para a gema os valores isotópicos iniciais ajustados foram de $\delta^{13}\text{C} = -27,40\text{‰}$, $-27,20\text{‰}$, $-28,05\text{‰}$ e $-27,04\text{‰}$. Na última amostragem estes valores passaram para $\delta^{13}\text{C} = -18,72\text{‰}$, $-20,77\text{‰}$, $-19,07\text{‰}$ e $-20,61\text{‰}$ para os animais que receberam ASFB-MSFB, ASFB-MSFCO, ASFCO-MSFB e ASFCO-MSFCO, respectivamente (Figura 3).

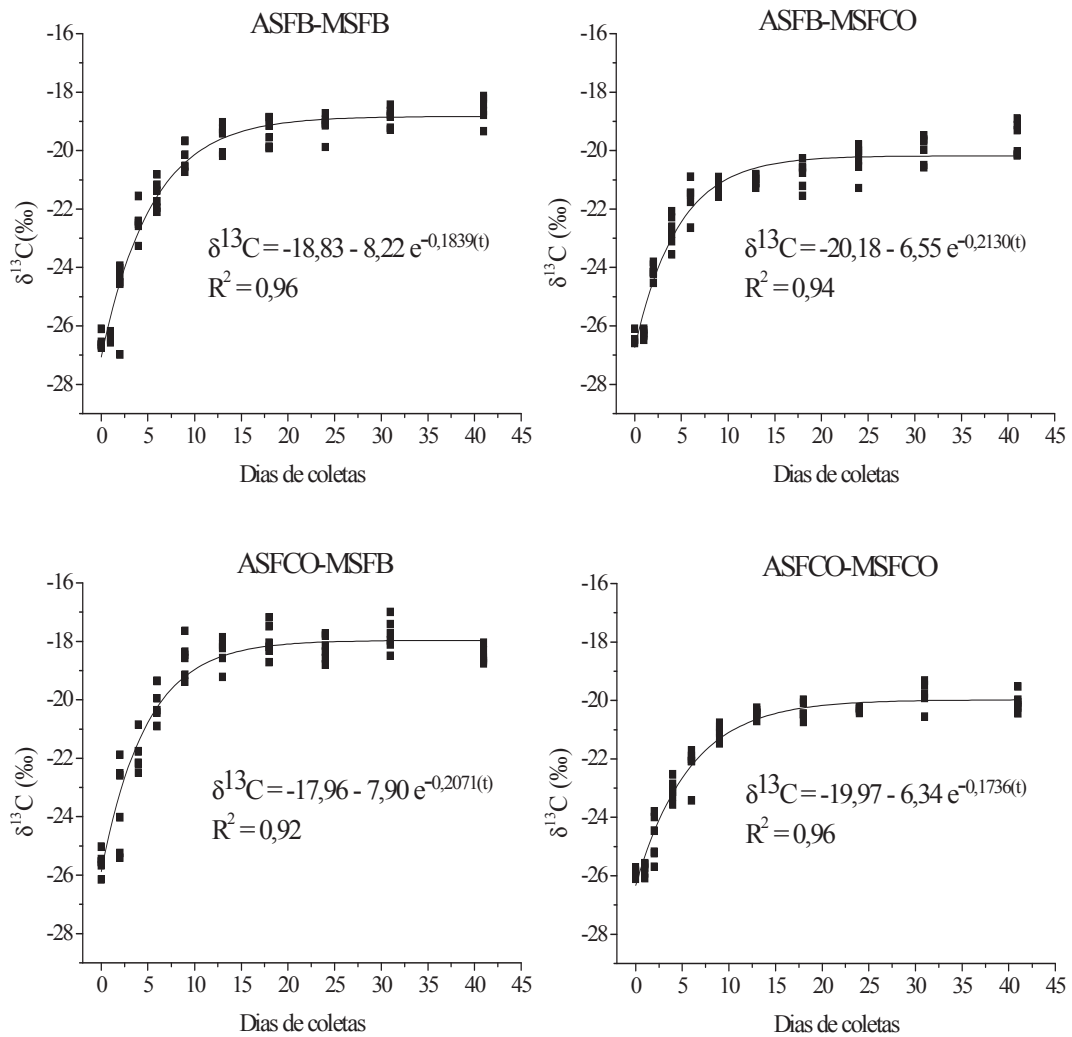


Figura 1. Curvas de *turnover* dos isótopos estáveis de carbono-13 em função do tempo de coleta no ovo das poedeiras no início da postura, alimentadas no período pré-experimental com dietas à base de quirera de arroz e farelo de soja, contendo fosfato bicálcico (ASFB) ou farinha de carne e ossos bovinos (ASFCO), alternadas para dietas à base de milho moído e farelo de soja, contendo fosfato bicálcico (MSFB) ou farinha de carne e ossos bovinos (MSFCO) no período experimental.

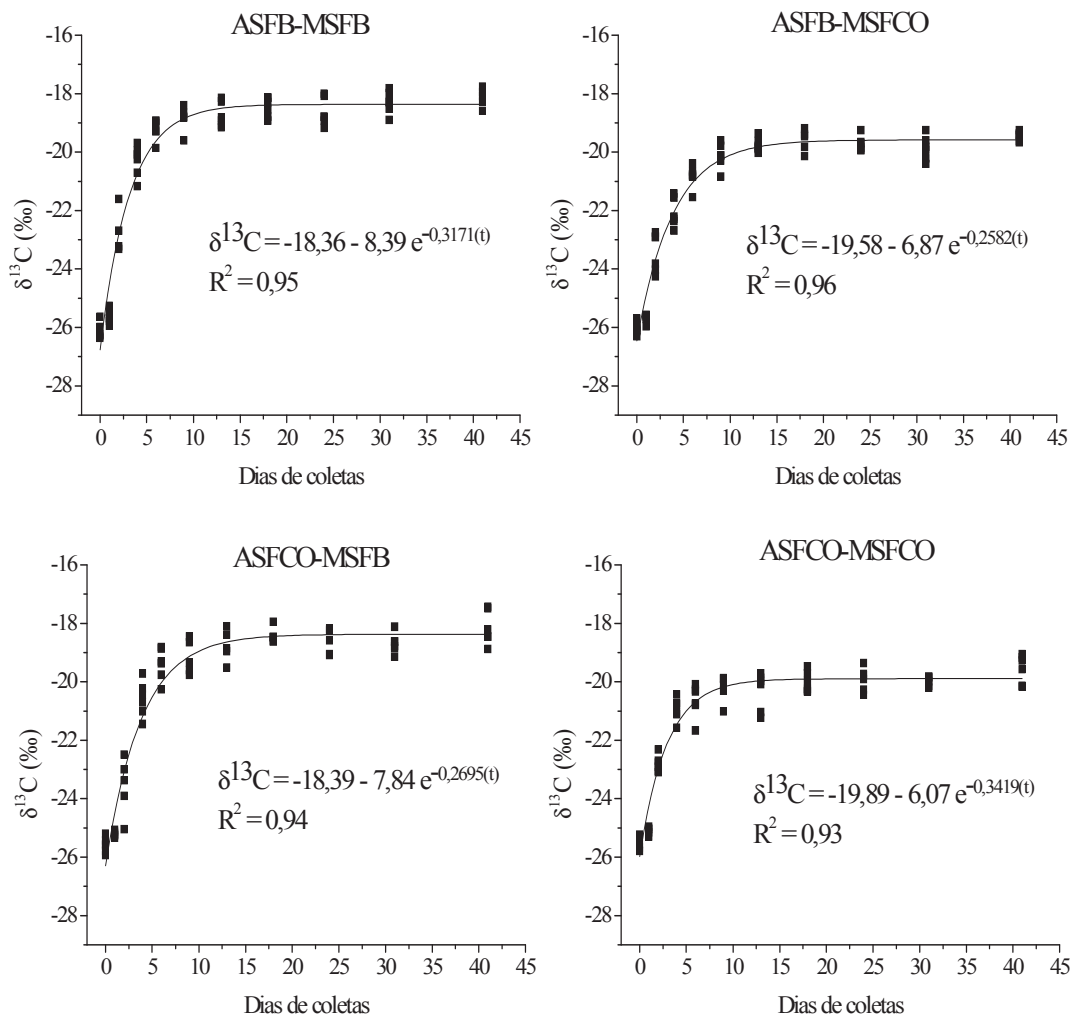


Figura 2. Curvas de *turnover* dos isótopos estáveis de carbono-13 em função do tempo de coleta no albúmen dos ovos das poedeiras no início da postura, alimentadas no período pré-experimental com dietas à base de quirera de arroz e farelo de soja, contendo fosfato bicálcico (ASFB) ou farinha de carne e ossos bovinos (ASFCO), alternadas para dietas à base de milho moído e farelo de soja, contendo fosfato bicálcico (MSFB) ou farinha de carne e ossos bovinos (MSFCO) no período experimental.

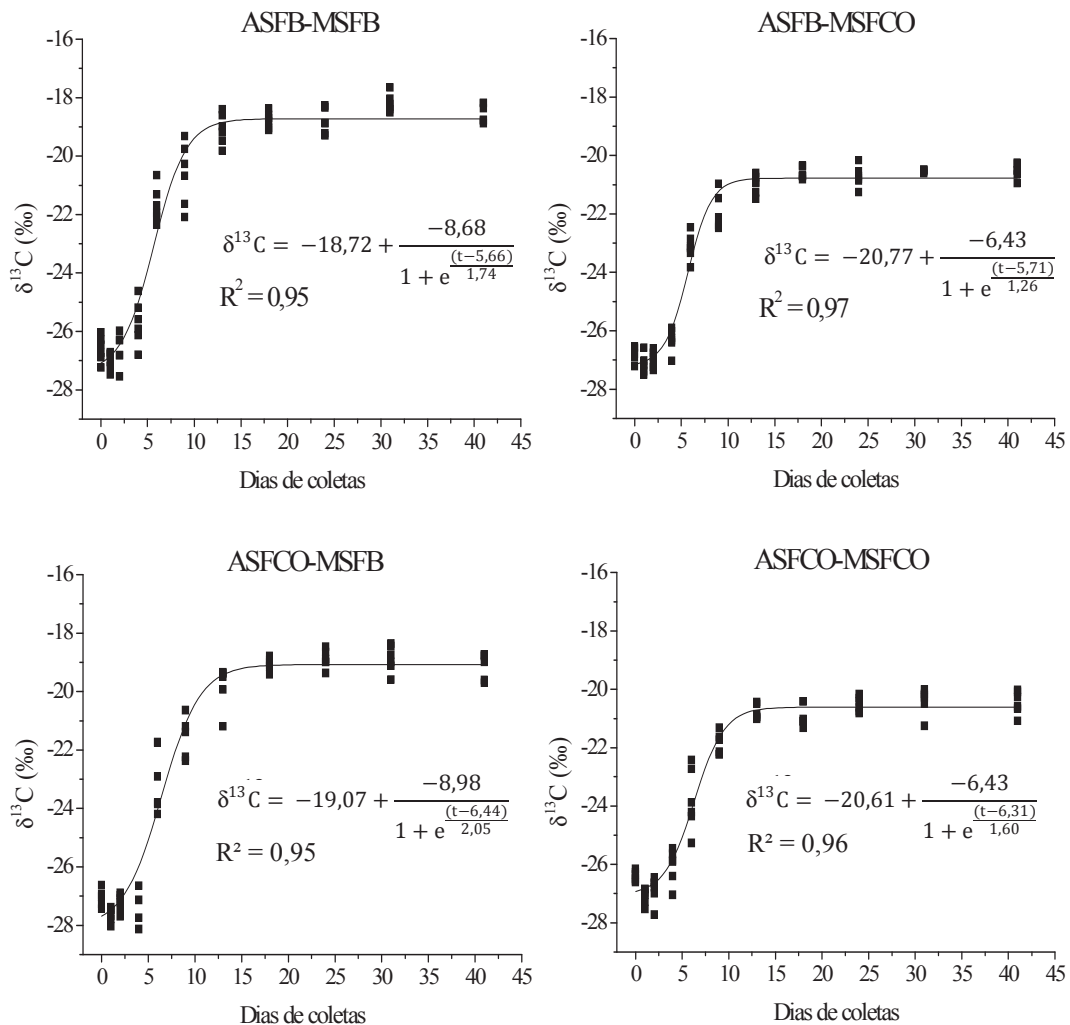


Figura 3. Curvas de *turnover* dos isótopos estáveis de carbono-13 em função do tempo de coleta na gema dos ovos das poedeiras no início da postura, alimentadas no período pré-experimental com dietas à base de quirera de arroz e farelo de soja, contendo fosfato bicálcico (ASFB) ou farinha de carne e ossos bovinos (ASFCO), alternadas para dietas à base de milho moído e farelo de soja, contendo fosfato bicálcico (MSFB) ou farinha de carne e ossos bovinos (MSFCO) no período experimental.

As diluições isotópicas do $\delta^{13}\text{C}$ ao longo do período experimental (Figuras 1, 2 e 3) mostraram que tanto no ovo inteiro quanto em suas frações, o tempo experimental de 42 foi satisfatório para que ocorresse a total substituição e incorporação dos carbonos-

13 oriundos da nova alimentação. Também pode ser notado que os valores iniciais próximos das dietas C₃ anteriormente consumidas foram modificados gradativamente com o passar dos dias até se tornarem, no final semelhantes aos das dietas com planta C₄.

O tempo de troca de 50% dos átomos de carbono (meia-vida) para o ovo inteiro foi de 4; 3; 3 e 4 dias e a troca total (t_{99%}) de 25; 22; 22 e 27 dias, para os tratamentos ASFB-MSFB, ASFB-MSFCO, ASFCO-MSFB e ASFCO-MSFCO, respectivamente (Tabela 2). Estes resultados estão de acordo com Denadai et al. (2006) que obtiveram a meia-vida de 4 dias e 27 dias para substituição de 99% dos carbonos dos ovos das aves que consumiram dietas C₃ e C₄ com porcentagem próximas às das plantas utilizadas neste experimento. A meia-vida (t_{50%}) de 4 dias e a troca total dos átomos (t_{99%}) de 26 dias encontradas por Carrijo et al. (2000) no ovo de poedeiras que tiveram a dieta C₃ trocada pela dieta C₄ também foram parecidas com as verificadas deste estudo.

Os valores de meia-vida (t_{50%}) de 2; 3; 3 e 2 dias e troca total dos átomos (t_{99%}) de 15; 18; 17 e 13 dias foram obtidos para o albúmen das poedeiras que consumiram ASFB-MSFB, ASFB-MSFCO, ASFCO-MSFB e ASFCO-MSFCO, respectivamente (Tabela 2). Denadai et al. (2006) também verificaram para o albúmen meia-vida de 3 dias e a troca de 99% dos átomos de carbono de 22 dias quando houve a alteração de dieta composta de 67% C₃ + 33% C₄ para outra com 67% C₄ + 33% C₃.

Para mensurar o *turnover* isotópico do carbono da gema no período experimental foi utilizado o modelo sigmoideal de regressão de Boltzman. Segundo esta equação a meia-vida (t_{50%}) foi de 6 dias para todos os tratamentos e levaram 38; 38; 42 e 42 dias para a troca total (t_{99%}) dos átomos dos respectivos tratamentos ASFB-MSFB, ASFB-MSFCO, ASFCO-MSFB e ASFCO-MSFCO (Tabela 2). Estes resultados

concordam com os obtidos por Denadai et al. (2006), que encontraram 5 dias para a meia-vida e 34 dias para troca total quando houve a mudança de dieta C_3 para C_4 .

Os resultados obtidos neste estudo foram condizentes com o processo fisiológico de síntese de todas as frações do ovo. A gema começa sua formação logo após a eclosão da ave e termina aproximadamente oito dias antes da ovulação, sendo que neste período final ocorre a maior fase do crescimento, com o peso da gema passando de 200 mg para cerca de 17g (Cotta, 1997). Foi confirmado através do *turnover* do carbono-13 que os valores isotópicos das gemas dos ovos coletados no início do experimento realmente são indicativos da dieta consumida anteriormente, quando a gema começou a ser formada, uma vez que os valores isotópicos permaneceram semelhantes até o quinto dia após a troca da dieta C_3 para C_4 , explicando deste modo, a necessidade de empregar o modelo de Boltzman para esta fração do ovo.

O *turnover* da gema também confirmou que a contribuição isotópica da nova dieta ocorreu a partir do sétimo dia, sendo proporcional à massa adicional da gema formada (Hobson, 1995) e que morfologicamente esta gema recém-formada é depositada em camadas concêntricas no sentido de fora (região próxima ao albúmen) para dentro (centro da gema), como pode ser observado na Figura 4, que ilustra de modo prático e visual o *turnover* isotópico do carbono-13 em função do tempo de coleta pela troca de dietas à base de quireira de arroz (C_3) pelo milho moído moído (C_4) rico em xantofilas, que é um pigmento natural dos carotenos presente neste e outros alimentos (Garcia et al., 2002).

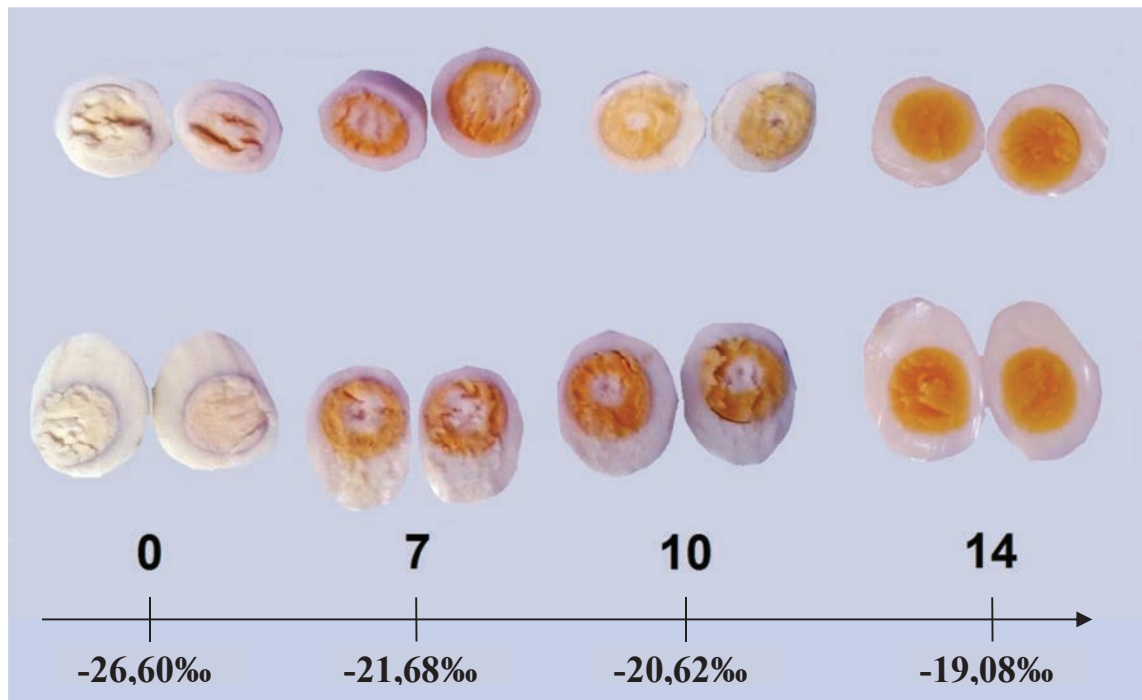


Figura 4. Representação visual do *turnover* isotópico do carbono-13 na gema do ovo de galinha coletado e cozido nos dias 0, 7, 10 e 14 após a troca da dieta C₃ para C₄, com os valores isotópicos médios.

Através do *turnover* isotópico do carbono-13 foi verificado que entre as frações do ovo, a maior velocidade de troca e incorporação dos átomos da nova dieta ocorreu no albúmen, pois fisiologicamente sua síntese é mais rápida que a dos outros componentes do ovo, visto que é formado no magno em aproximadamente três horas, a partir de aminoácidos retirados diretamente do plasma sanguíneo (Hobson, 1995). Deste modo, entende-se que há íntima relação entre as meia-vida do albúmen e do plasma. Esta relação pode ser comprovada pela comparação da meia-vida do plasma das poedeiras dos tratamentos ASFB-MSFB, ASFB-MSFCO, ASFCO-MSFB e ASFCO-MSFCO (CAPÍTULO 2), que foi de 2 dias para todos os tratamentos e as meias-vidas de 2; 3; 3 e 2 para o albúmen dos respectivos tratamentos.

A taxa de *turnover* da gema, ou seja, a velocidade com que a nova dieta passou a ser refletida, foi mais lento do que do albúmen e do ovo inteiro. Em ovos as variações do $\delta^{13}\text{C}$ foram descritas por Rogers (2009) que estudou os componentes dos ovos de poedeiras de diferentes regimes de produção e por Sakamoto et al. (2002) que notaram que os valores de $\delta^{13}\text{C}$ da membrana do ovo diferia do albúmen e da gema. Estas diferenças no *turnover* isotópico do mesmo elemento químico são naturais e ocorrem pelas variações nos valores do $\delta^{13}\text{C}$ entre os diversos tecidos do mesmo animal, inclusive entre as frações bioquímicas do mesmo tecido, podendo chegar em até 3‰ em relação a sua dieta (DeNiro & Epstein, 1978). De acordo com Kennedy & Krouse (1990) as diferenças isotópicas entre as frações do ovo podem ser atribuídas aos constituintes orgânicos da gema e do albúmen (proteínas, lipídeos e carboidratos) e a composição inorgânica da casca do ovo.

Quanto ao ovo inteiro, seu *turnover* foi intermediário a outras frações do ovo, pois este é resultado das somas das contribuições isotópicas do albúmen e da gema (Denadai et al., 2006).

Em estudos isotópicos deve ser considerada a possível interferência da remoção dos lipídios nos resultados do ovo inteiro e da gema, porque os lipídeos são empobrecidos em ^{13}C (Tieszen et al., 1983; Ehrich et al., 2011) e como demonstrado por Hobson (1995), ao comparar os valores de $\delta^{13}\text{C}$ da gema com e sem lipídeos extraídos, o teor de lipídios influenciou os valores de isótopos estáveis de carbono.

Embora existam controvérsias sobre a extração dos lipídeos da gema e do ovo inteiro, visto que o não desengorduramento fornecerá valores de $\delta^{13}\text{C}$ mais negativos que a dieta fornecida, o *turnover* do ovo segundo Carrijo et al. (2000) também pode ser utilizado para estimar o *turnover* do fígado de poedeiras, por terem a velocidade de

troca dos carbonos semelhantes, extinguindo assim a necessidade de sacrificar as aves durante as sucessivas coletas, além de possibilitar a avaliação do metabolismo das aves por elucidar resultados fisiológicos, esclarecer alterações na composição das dietas isotopicamente distintas e assim rastrear subprodutos de origem animal utilizados na composição de dietas, possibilitando também a certificação dos sistemas de criação.

Foi calculado o fracionamento isotópico (Tabela 3) para o ovo inteiro, que foi de $\Delta(\delta_{\text{tecido}} - \delta_{\text{dieta}}) = -1,44\text{‰}$, $-5,01\text{‰}$, $-0,57\text{‰}$ e $-4,80\text{‰}$, para o albúmen esses valores foram de $\Delta(\delta_{\text{tecido}} - \delta_{\text{dieta}}) = -0,97\text{‰}$, $-4,41\text{‰}$, $-1,00\text{‰}$ e $-4,72\text{‰}$ e na gema obteve valores de $\Delta(\delta_{\text{tecido}} - \delta_{\text{dieta}}) = -1,33\text{‰}$, $-5,60\text{‰}$, $-1,68\text{‰}$ e $-5,44\text{‰}$ para os tratamentos ASFB-MSFB, ASFB-MSFCO, ASFCO-MSFB e ASFCO-MSFCO, respectivamente.

Estes resultados mostraram que o ovo inteiro e suas frações das poedeiras que receberam MSFB apresentavam no final do período experimental valores isotópicos próximos aos da dieta consumida, passando a possuir assinatura isotópica da nova dieta, isto porque o fator de fracionamento foi baixo. Por outro lado, as aves que consumiram a dieta MSFCO tiveram maior fracionamento isotópico entre as frações do ovo e a dieta. A diferença no fator de fracionamento atribuída à contribuição isotópica da farinha de carne e ossos bovinos não interferiu no *turnover* do carbono-13 no ovo e suas frações.

Conclusão

De acordo com os resultados obtidos pode se concluir que o *turnover* isotópico do carbono-13 do ovo inteiro foi de 3 a 4 dias, da gema em torno de 6 dias e do albúmem de 2-3 dias, independentemente da fase produtiva da ave e da dieta.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo financiamento da pesquisa através do projeto temático nº 2008/57411-4 e pela bolsa de mestrado processo nº 2012/09422-2.

Referências

BAILEY, D.; JONES, E.; DICKINSON, D. L. Knowledge management and comparative international strategies on vertical information flow in the global food system. **American Journal of Agricultural Economics**, v.84, n.5, p.1337-1344, 2002.

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, p.209-218, 2000.

COTTA, T. **Reprodução da Galinha e Produção de Ovos**. 1.ed. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. cap.4.

DENADAI, J.C.; DUCATTI, C.; PEZZATO, A.C.; CARRIJO, A.S.; CALDARA, F.R.; OLIVEIRA, R.P. Studies on carbon-13 turnover in eggs and blood of commercial layers. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 8, n. 4, p. 251-256, 2006.

DENIRO, M.J.; EPSTEIN, S. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v.42, n.5, 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**, Piracicaba, v.59, n.1, p.29-33, 2002.

EHRICH, D.; TARROUX, A.; STIEN, J.; LECOMTE, N.; KILLENGREEN, S.; BERTEAUX, D.; YOCCOZ, N.G. Stable isotope analysis: modelling lipid normalization for muscle and eggs from arctic mammals and birds. **Methods in Ecology and Evolution**, v.2, n.1, p.66-76, 2011.

GARCIA, E.A.; MENDES, A.A.; PIZZOLANTE, C.C.; GONÇALVES, H.C.; OLIVEIRA, R.P.; SILVA, M.A. Efeitos dos níveis de cantaxantina na dieta sobre o desempenho e qualidade dos ovos de poedeiras comerciais. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.4, n.1, p.1-7, 2002.

HOBSON, K.A. Reconstructing avian using stable-carbon and nitrogen isotope analysis of egg components: patterns of isotopic fraction and turnover. **The Condor**, v.97, n.3, p.752-762, 1995.

HOBSON, K.A.; CLARK, R.G. Assessing avian diets using stable isotopes I: turnover of ¹³C in tissues. **The Condor**, v.94, n.1, p.181-188, 1992.

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

LOHMANN DO BRASIL. **Guia de manejo Lohmann LSL**. São José do Rio Preto, SP: Lohmann do Brasil, 2011. 30p.

MINITAB®16. Version 16.1.1. State College, PA: Minitab Inc., 2010. Software.

MORRIS, C.; YOUNG, C. 'Seed to shelf', 'teat to table', 'barley to beer' and 'womb to tomb': discourses of food quality and quality assurance schemes in the UK. **Journal of Rural Studies**, v.16, n.1, p.103-115, 2000.

NORTHEN, J.R. Using farm assurance schemes to signal food safety to multiple food retailers in the UK. **The International Food and Agribusiness Management Review**, v.4, n.1, p.37-50, 2001.

OPARA, L.U. Traceability in agriculture and food supply chain: a review of basic concepts, technological implications, and future prospects. **Journal of Food Agriculture and Environment**, v.1, p.101-106, 2003.

ROCK, L. The use of stable isotope techniques in egg authentication schemes: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v.28, n.2, p.62-68, 2012.

ROCK, L.; ROWE, S.; CZERWIEC, A.; RICHMOND, H. Isotopic analysis of eggs: Evaluating sample collection and preparation. **Food chemistry**, v.136, n.3, p.1551-1556, 2013.

ROGERS, K.M. Stable isotopes as a tool to differentiate eggs laid by caged, barn, free range, and organic hens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, n.10, p.4236–4242, 2009.

ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L.; GOMES, P.C.; OLIVEIRA, R.F.; LOPES, D.C.; FERREIRA, A.S.; BARRETO, S.L.T.; EUCLIDES, R.F. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, DZO, 2011. 252p.

SAKAMOTO, N.; ISHIDA, T.; ARIMA, T.; IDEMITSU, K.; INAGAKI, Y.; FURUYA, H.; KAWAMURA, H.; MATSUOKA, N.; TAWAKI, S. Concentrations of radiocarbon and isotope compositions of stable carbon in food. **Journal of Nuclear Science and Technology**, v.39, n.4, p.323-328, 2002.

THOMPSON, M.; SYLVIA, G.; MORRISSEY, M.T. Seafood traceability in the United States: Current trends, system design, and potential applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.4, n.1, p.1-7, 2005.

TIESZEN, L.L.; BOUTTON, T.W.; TESDAHL, K.G.; SLADE, N.A. Fractionation and turnover of stable carbon isotopes in animal tissues: implications for $\delta^{13}\text{C}$ analysis of diet. **Oecologia**, v.57, n.1-2, p.32-37, 1983.

Tabelas

Tabela 1. Composição percentual dos ingredientes, níveis nutricionais calculados e valor isotópico das dietas experimentais na fase inicial da postura.

Ingredientes (%)	Dietas experimentais ⁽¹⁾	
	MSFB	MSFCO
Milho moído	57,36	62,59
Farelo de soja (45%)	29,64	22,37
Farinha de carne e ossos bovinos	-	6,60
Calcário calcítico	8,34	7,48
Fosfato bicálcico	1,92	-
Óleo de soja	2,11	0,33
DL-Metionina	0,13	0,13
Sal comum	0,35	0,35
Suplemento vitamínico ⁽²⁾	0,10	0,10
Suplemento mineral ⁽³⁾	0,05	0,05
Total	100,00	100,00
Níveis Nutricionais Calculados		
Energia metabolizável (kcal/kg)	2800,06	2800,56
Proteína bruta (%)	18,00	18,00
Cálcio (%)	3,70	3,70
Fósforo disponível (%)	0,45	0,45
Fibra bruta (%)	2,56	2,27
Metionina (%)	0,40	0,40
Aminoácidos sulfurados (%)	0,70	0,68
Lisina (%)	0,96	0,91
$\delta^{13}\text{C}$ (Média±DP, n=6)	-17,39± 0,43	-15,17 ± 0,28

⁽¹⁾ASFB: quirera de arroz, farelo de soja e fosfato bicálcico; ASFCO: quirera de arroz, farelo de soja e farinha de carne e ossos bovinos; MSFB: milho moído, farelo de soja e fosfato bicálcico; MSFCO: milho moído, farelo de soja e farinha de carne e ossos bovinos. ⁽²⁾Suplemento vitamínico: níveis mínimos de garantia/kg de produto: ácido fólico, 100mg; ácido pantotênico, 6.000mg; BHT, 1.000mg; biotina, 5mg; niacina, 20g; vitamina A, 7.000.000 UI; vitamina B1, 250mg; vitamina B12, 6.000mg; vitamina B2, 3.000mg/kg; vitamina B6, 150mg; vitamina D3, 2.500.000 UI; E, 8.000mg; K3, 1.200mg. ⁽³⁾Suplemento mineral: níveis mínimos de garantia/kg de produto: manganês, 50g; zinco, 40g; ferro, 30g; cobre, 6g; iodo 400mg; selênio, 180mg.

Tabela 2. Valores isotópicos do $\delta^{13}\text{C}$, expressos em ‰, do ovo e suas frações amostrados no início e no fim do período experimental, a partir da substituição das dietas e os valores calculados de meia-vida ($t_{(50\%)}$), e troca total dos átomos de carbono ($t_{(99\%)}$), em unidade de dias.

Tratamentos ⁽¹⁾	Ovo				Albúmen				Gema			
	$\delta^{13}\text{C}$		$t_{(50\%)}$	$t_{(99\%)}$	$\delta^{13}\text{C}$		$t_{(50\%)}$	$t_{(99\%)}$	$\delta^{13}\text{C}$		$t_{(50\%)}$	$t_{(99\%)}$
	Início	fim			Início	Fim			Início	Fim		
ASFB-MSFB	-27,05	-18,83	4	25	-26,75	-18,36	2	15	-27,40	-18,72	6	38
ASFB-MSFCO	-26,73	-20,18	3	22	-26,45	-19,58	3	18	-27,20	-20,77	6	38
ASFCO-MSFB	-25,86	-17,96	3	22	-26,23	-18,39	3	17	-28,05	-19,07	6	42
ASFCO-MSFCO	-26,31	-19,97	4	27	-25,96	-19,89	2	13	-27,04	-20,61	6	42

⁽¹⁾ASFB: quirera de arroz, farelo de soja e fosfato bicálcico; ASFCO: quirera de arroz, farelo de soja e farinha de carne e ossos bovinos; MSFB: milho moído, farelo de soja e fosfato bicálcico; MSFCO: milho moído, farelo de soja e farinha de carne e ossos bovinos.

Tabela 3. Fator de fracionamento isotópico, expresso em ‰, do ovo e suas frações no fim do período experimental ($\Delta = \delta \text{ tecido} - \delta \text{ dieta}$).

Tratamentos ⁽¹⁾	Fracionamento isotópico		
	Ovo	Albúmen	Gema
ASFB-MSFB	-1,44	-0,97	-1,33
ASFB-MSFCO	-5,01	-4,41	-5,60
ASFCO-MSFB	-0,57	-1,00	-1,68
ASFCO-MSFCO	-4,80	-4,72	-5,44

⁽¹⁾ASFB: quirera de arroz, farelo de soja e fosfato bicálcico; ASFCO: quirera de arroz, farelo de soja e farinha de carne e ossos bovinos; MSFB: milho moído, farelo de soja e fosfato bicálcico; MSFCO: milho moído, farelo de soja e farinha de carne e ossos bovinos.

CAPÍTULO 4

IMPLICAÇÕES

1. Implicações

Devido à importância que o ovo exerce na alimentação da população mundial, cresce a demanda por ferramentas como os isótopos estáveis, que além de amparar a confiança do consumidor também agrega valor ao produto final por torná-lo diferenciado no competitivo mercado global. Neste sentido, a técnica dos isótopos estáveis tem se destacado cada vez mais nas atividades de rastreabilidade, autenticidade e certificação de origem por agências governamentais reguladoras. Contudo são imprescindíveis estudos experimentais de *turnover* isotópico dos constituintes corporais, para avaliar o impacto da troca das dietas em sistemas de produção de ovos sobre a composição isotópica destes, visto que, este mostra a velocidade de conversão da dieta consumida em ovo. Além do que, estudos de *turnover* proporcionam o entendimento do metabolismo e fisiologia animal através de tecidos como o sangue e produtos como o ovo que não requerem os sucessivos sacrifícios das poedeiras.

Os resultados isotópicos obtidos foram condizentes com o processo fisiológico de síntese da gema e do albúmen, comprovando a prévia formação da gema antes da ovulação pela incorporação da massa adicional de gema a partir do sétimo dia experimental. Os valores de meia-vida do albúmen demonstraram relação direta com a meia-vida do local onde são retirados os aminoácidos para sua síntese, ou seja, o plasma sanguíneo. Esta fração do ovo também é a indicada para estudos de turnover por eliminar a etapa de desengorduramento.

Não houve diferença na taxa de *turnover* do carbono-13 nos tecidos analisados em função da dieta ser vegetal com fosfato bicálcico ou conter subprodutos de origem animal, como a farinha de carne e ossos bovinos. No entanto, para auxiliar futuros experimentos de rastreabilidade de subprodutos de origem animal utilizados na composição de dietas de galinhas poedeiras, através da análise de seus tecidos e ovos, sugere-se a inclusão de uma porcentagem maior de farinha de carne e ossos bovinos do que a utilizada neste experimento para avaliação deste ingrediente na taxa de *turnover* isotópico do carbono-13.

Outro ponto relevante é a necessidade do processo de extração de lipídeos das amostras de gema e ovo inteiro, uma vez que estes são empobrecidos em ^{13}C , podendo

subestimar os valores de $\delta^{13}\text{C}$ encontrados. Desta maneira, recomenda-se para as análises isotópicas a utilização de amostras com e sem os lipídeos removidos.

Também sugere-se o prolongamento dos 42 dias de coleta do sangue para que este consiga atingir o patamar de equilíbrio isotópico.