

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

TURNOVER DO CARBONO NOS TECIDOS DE SUÍNOS EM
DIFERENTES FASES DE CRESCIMENTO

Vivian Lo Tierzo

Tese apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Zootecnia como parte
das exigências para obtenção do título
de Doutor

BOTUCATU - SP
Dezembro – 2012

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

*TURNOVER DO CARBONO NOS TECIDOS DE SUÍNOS EM
DIFERENTES FASES DE CRESCIMENTO*

VIVIAN LO TIERZO

Zootecnista

ORIENTADOR: Prof. Dr. CARLOS DUCATTI

Co- ORIENTADORA: FABIANA RIBEIRO CALDARA

Tese apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Zootecnia como parte
das exigências para obtenção do título
de Doutor

BOTUCATU – SP
Dezembro– 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Lo Tierzo, Vivian.

Turnover do carbono nos tecidos de suínos em diferentes fases de crescimento / Vivian Lo Tierzo. – Botucatu : [s.n.], 2012

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu

Orientador: Carlos Ducatti

Coorientador: Fabiana Ribeiro Caldara

Capes: 50403001

1. Suíno – Estudos experimentais. 2. Carbono – Isótopos. 3. Isótopos estáveis. 4. Análise por diluição isotópica. 5. Isótopos – Separação.

Palavras-chave: Diluição isotópica; Delta de carbono 13; Fracionamento isotópico; Isótopos estáveis; Suíno.

Ofereço

A Deus, por me acompanhar em toda trajetória da minha vida e me iluminar sempre;

Dedico

Às pessoas que me são mais importantes na minha vida, e me possibilitaram alcançar mais essa vitória:

Aos meus pais, Pascoal Lo Tierzo Neto e Shirley Davico Lo Tierzo pelo exemplo de bondade e honestidade, pelo eterno amor e incentivo, permitindo que eu chegasse até aqui;

A minha irmã Natalia Lo Tierzo e minha querida sobrinha Ingryd Lo Tierzo pelo apoio, amor, carinho e companheirismo;

Ao meu namorado e amigo João Paulo Franco da Silveira, pelo amor incondicional, companheirismo, ensinamentos, dedicação e por todos os anos de convívio;

Aos meus familiares, em especial minha prima Bianca Davico Canatto, pelo amor e por estarem ao meu lado em todas as etapas da minha vida;

Ao meu cunhado Thiago Franco da Silveira que é uma pessoa muito importante e especial, companheiro para todas as horas.

Aos meus amigos, pela amizade e ajuda em todos os momentos.

Com carinho e gratidão,

Agradecimentos

Ao Programa de Pós Graduação em Zootecnia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP/Botucatu, pela oportunidade de realização deste curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de estudos.

A Professora Juliana Célia Denadai pela imprescindível ajuda durante todas as etapas do meu doutorado.

A Professora Maria Márcia Pereira Sartori, pela disponibilidade na realização das análises estatísticas.

Ao Professor Carlos Ducatti pela oportunidade e orientação.

Ao Professor Dirlei Antonio Berto pela colaboração e auxílio no planejamento e condução dos experimentos.

À Professora Margarida Maria Barros, pela preciosa ajuda com minhas amostras óssea.

Aos secretários da Seção de Pós-Graduação em Zootecnia, Seila Cristina Cassinelli Vieira e Carlos Pazini Junior pela atenção e auxílios prestados.

Aos funcionários do Centro de Isótopos Estáveis, Cibele, Silvia e Evandro, pela ajuda nas análises laboratoriais e pela verdadeira amizade.

Aos funcionários do Setor de Suinocultura da FMVZ – UNESP, Marcão em especial, Franco e Adriano pela amizade e ajuda na condução dos experimentos.

Aos funcionários da fábrica de ração pela ajuda no preparo das dietas experimentais, Wilson (Boca) em especial para meu grande amigo Sérgio que sempre esteve prontamente disponível em ajudar durante todo experimento. E por ser uma pessoa muito especial e companheiro.

A funcionária do Laboratório de Bromatologia da FMVZ – UNESP, Gisele pela ajuda na secagem e desengorduramento das amostras.

A minha grande amiga e companheira Regina Maria Nascimento Augusto, pela ajuda na condução do experimento e por estar sempre presente, minha verdadeira amiga.

Aos queridos amigos, Samira Baldin e Pedro Persichetti Júnior, pela amizade sincera, apoio e companheirismo durante esses anos.

Ao estagiário do laboratório do Centro de Isótopos Estáveis, em especial Danilo Vanciz pela imprescindível ajuda no laboratório do Centro de Isótopos Estáveis.

E a todos que de algum modo contribuíram para a realização deste trabalho.

Meu muito obrigada!!

SUMÁRIO

	Páginas
CAPITULO 1	2
1. Introdução.....	3
2. Isótopos Estáveis e <i>Turnover</i>	5
3. Referências	10
CAPITULO 2	13
<i>TURNOVER</i> DO CARBONO NOS TECIDOS DE SUÍNOS EM DIFERENTES FASES DE CRESCIMENTO.....	14
Resumo.....	14
Abstract	15
Introdução.....	16
Material e Métodos.....	17
Resultados e Discussão	23
Conclusão	30
Referências	30
CAPITULO 3	33
UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DOS ISÓTOPOS ESTÁVEIS PARA DETERMINAR O <i>TURNOVER</i> DO CARBONO NOS MÚSCULOS DE SUÍNOS.....	34
Resumo.....	34
Abstract	35
Introdução.....	36
Material e Métodos.....	37
Resultados e Discussão	42
Conclusão	47
Referencias	47
CAPITULO 4	50
IMPLICAÇÕES	51

LISTA DE TABELAS

	Páginas
CAPITULO 2	13
Tabela 1. Descrição dos tratamentos experimentais e dias de coletas do sangue e tecidos.	18
Tabela 2: Composições percentuais, níveis nutricionais e valores isotópicos médios das dietas experimentais.	19
Tabela 3: Valores isotópicos finais ($\delta^{13}\text{C}$) das dietas e tecidos analisados.	29
Tabela 4: Fator de fracionamento isotópico (Δ) entre tecido e dieta dos suínos submetidos a diferentes dietas experimentais	29
CAPITULO 3	33
Tabela 1. Descrição dos tratamentos experimentais e dias de tecidos.	38
Tabela 2: Composições percentuais, níveis nutricionais e valores isotópicos médios das dietas experimentais	39
Tabela 3: Valores isotópicos finais ($\delta^{13}\text{C}$) das dietas e tecidos analisados.	46
Tabela 4: Fator de fracionamento isotópico (Δ) entre tecido e dieta dos suínos submetidos a diferentes dietas experimentais	46

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
CAPITULO 2	13
Figura 1: Representação exponencial do <i>turnover</i> dos isótopos estáveis do carbono e valores de meias-vidas em dias do sangue. a) substituição aos 21 dias, b) substituição aos 42 dias, c) substituição aos 63 dias, d) substituição aos 110 dias.....	24
Figura 2: Representação exponencial do <i>turnover</i> dos isótopos estáveis do carbono e valores de meias-vidas em dias do pâncreas. a) substituição aos 21 dias, b) substituição aos 42 dias, c) substituição aos 63dias, d) substituição aos 110 dias.....	26
Figura 3: Representação exponencial do <i>turnover</i> dos isótopos estáveis do carbono e valores de meias-vidas em dias da tíbia com medula. a) substituição aos 21 dias, b) substituição aos 42 dias, c) substituição aos 63 dias, d) substituição aos 110 dias.	27
CAPITULO 3	33
Figura 1: Representação exponencial do <i>turnover</i> dos isótopos estáveis do carbono e valores de meias-vidas em dias do músculo <i>Psoas Major</i> . a) substituição aos 21 dias, b) substituição aos 42 dias, c) substituição aos 63 dias, d) substituição aos 110 dias.....	43
Figura 2: Representação exponencial do <i>turnover</i> dos isótopos estáveis do carbono e valores de meias-vidas (T) em dias do músculo Masseter. a) substituição aos 21 dias, b) substituição aos 42 dias, c) substituição aos 63 dias, d) substituição aos 110 dias.....	44

CAPITULO 1

1. INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se como o quarto produtor e o quarto maior exportador de carne suína do mundo, produzindo 3,227 milhões de toneladas no ano 2011, das quais 18% foram exportadas (ABIPECS, 2012). Com o aumento de exportações, o Brasil teria condições de se tornar o maior exportação de carne suína, situação que já ocorreu com as carnes bovinas e de frango.

O mercado importador tem se mostrado cada vez mais exigente em relação à rastreabilidade de subprodutos de origem animal na alimentação de frangos e suínos, dessa forma, a técnica dos isótopos estáveis apresenta potencial aplicação prática para detecção destes subprodutos por meio da análise dos tecidos animais (CARRIJO et al. 2006; GOTTMANN 2007; OLIVEIRA et al. 2010).

Para o desenvolvimento da linha de pesquisa sobre rastreabilidade de subprodutos de origem animal na alimentação de suínos e aves, Oliveira (2005) evidenciou a necessidade de realização de estudos que contribuam para o conhecimento da assimilação isotópica do carbono em diferentes tecidos.

Os constituintes corporais encontram-se em estado dinâmico, sendo continuamente formados e utilizados para diferentes propósitos. Esse processo é geralmente chamado de *turnover*. Todas as substâncias do corpo sejam elas orgânica ou inorgânica, estão sujeitas ao *turnover* (HETENYI et al. 1983). As taxas de *turnover* podem variar entre as diferentes espécies, tecidos, e são influenciadas pelo estado fisiológico do animal (KENNEDY & KROUSE, 1990), dessa forma, a taxa de incorporação do carbono da dieta no tecido pode sofrer influência do crescimento em animais jovens.

A maioria dos estudos para determinação de taxas de *turnover* isotópico têm utilizado animais adultos, provavelmente a fim de evitar erros de interpretações causadas pelo fator crescimento. Zuanon et al. (2006), avaliando o *turnover* do carbono muscular de Tilápias do

Nilo em crescimento, verificaram que o modelo matemático proposto por Ducatti et al. (2002) também se mostra adequado para animais em crescimento e concluíram que, neste caso, o acréscimo de massa tecidual é o principal fator na velocidade de diluição isotópica do carbono tecidual (*turnover* isotópico) em relação ao *turnover* metabólico, além disso, sugerem que uma maneira para avaliar a atividade metabólica tecidual pode ser por comparação dos valores de meia-vida ($T = \ln 2/k$) do carbono entre diferentes tecidos da mesma espécie ou o mesmo tecido entre diferentes espécies.

Segundo Gannes et al. (1998), dietas com assinaturas isotópicas distintas podem ser utilizadas para mensurar o *turnover* de componentes corporais e órgãos de animais. Após a mudança da dieta, a alteração da composição isotópica no tecido depende da velocidade com que os constituintes da nova dieta serão incorporados. A escolha do tecido é importante, pois tecidos que são ativos metabolicamente no organismo apresentarão *turnover* mais rápido, como o fígado, músculo e sangue, e tecidos menos ativos apresentarão taxas menores, como o colágeno e o osso (HOBSON & CLARK, 1992a).

A maioria dos estudos de *turnover* utilizando as variações naturais do $\delta^{13}\text{C}$ dos alimentos se baseou na velocidade de troca do carbono tecidual a partir da ingestão de alimentos com assinaturas isotópicas distintas, portanto, a técnica dos isótopos estáveis pode ser útil em estudos de fisiologia e nutrição animal, uma vez que as taxas de substituição do carbono tecidual podem ser influenciadas por fatores ambientais, nutricionais e sanitários (CARRIJO et al. 2000).

No processo de rastreabilidade busca-se tecidos que possam refletir a dieta antiga com a finalidade de poder detectar a inclusão de farinhas de origem animal, mesmo que fornecidas apenas nas fases iniciais da vida do suíno; para isto, necessita-se identificar um tecido de metabolismo lento que conserve o sinal isotópico por mais tempo, além disso, busca-se também

um tecido que substitua rapidamente os seus átomos de carbono, de forma que possa indicar a mudança da alimentação na fase final da produção dos suínos.

Existem poucos dados na literatura sobre trabalhos que avaliaram a taxa de *turnover* de tecidos em suínos. O conhecimento do tempo de substituição do carbono nos tecidos em função das fases de crescimento dos suínos é de extrema importância, visando futuros estudos sobre rastreabilidade de subprodutos de origem animal.

2. Isótopos Estáveis e *Turnover*

O termo isótopo vem do grego *ISO* (mesmo ou igual) e *TOPOS* (lugar), referindo-se ao fato de que são elementos que ocupam o mesmo lugar na tabela periódica. Os isótopos são átomos do mesmo elemento químico, que possuem o mesmo número de prótons, mas que diferem em seu número de nêutrons, conseqüentemente, apresentando diferentes massas. Por possuírem sua camada eletrônica igual, ou seja, com o mesmo número de elétrons, pode-se dizer que os isótopos são elementos que apresentam as mesmas propriedades químicas e pequenas diferenças nas propriedades físicas, que causam fracionamento isotópico permitindo assim, a utilização como traçadores naturais em pesquisas.

Os diferentes números de massas dos isótopos possibilitam a sua identificação, através da espectrometria de massas, e sua utilização em estudos geológicos, ambientais, ou seja, é possível quantificar os diferentes isótopos de um mesmo elemento. Os isótopos podem ter núcleos instáveis ou estáveis. Os isótopos de núcleos instáveis, também chamados de radioisótopos, sofrem desintegração espontânea, por emissão de partículas nucleares ou radiação eletromagnética, e geram os isótopos radiogênicos. Os isótopos de núcleos estáveis não se desintegram espontaneamente e correspondem a aproximadamente 270 nuclídeos. Os isótopos ambientais são elementos em abundância e de ocorrência natural no nosso planeta,

como o H, C, N, O e S, pois são os principais elementos dos ciclos hidrológico, geológico e biológico.

Os isótopos do carbono (C), hidrogênio (H), oxigênio (O), nitrogênio (N) ocorrem naturalmente na biosfera. Cada elemento apresenta um isótopo estável leve dominante: carbono-12 (^{12}C), hidrogênio-1 (^1H), oxigênio-16 (^{16}O) e nitrogênio-14 (^{14}N) e um ou dois isótopos estáveis pesados: carbono-13 (^{13}C), hidrogênio-2 (^2H), oxigênio-17 (^{17}O), oxigênio-18 (^{18}O) e nitrogênio-15 (^{15}N), com abundância ou concentração natural expressa em átomos % (DUCATTI, 2004). No caso dos isótopos estáveis de carbono (^{12}C e ^{13}C), as abundâncias naturais são de 98,89 e 1,11 átomos %, respectivamente (KENNEDY & KROUSE, 1990).

Em função desta diferença na abundância natural dos isótopos estáveis do carbono, a mensuração da relação entre eles na maioria das amostras gera valores muito pequenos. Para converter esta relação a uma magnitude mensurável, os valores do carbono-13 são expressos na terminologia dos isótopos estáveis em delta per mil da razão isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ($\delta^{13}\text{C}$) do produto, em relação a um padrão internacional definido, *Peedee Belemnite* (PDB), com erro de análise da ordem de 0,2%. Segundo Friedman & O'Neill (1977) citados por Ducatti et al. (1979), o padrão PDB é aceito universalmente na comparação das composições isotópicas do carbono. Trata-se do fóssil carbonatado sólido da era *cretácea*, denominado *Belemnitela americana*, da formação *PeeDee* da Carolina do Sul, Estados Unidos, o qual foi empregado inicialmente como padrão por Craig (1957).

A medida da relação entre isótopos estáveis é realizada por espectrometria de massas, que detecta a concentração dos diferentes isótopos do elemento. O enriquecimento isotópico relativo é obtido pela expressão δi (amostra, padrão) = $[(R \text{ amostra} / R \text{ padrão}) - 1] \times 10^3$.

A simbologia da expressão indica que (*i*) refere-se ao isótopo pesado do elemento químico em consideração; (R) refere-se a razão entre o isótopo pesado e o leve, tanto para a amostra quanto para seu padrão internacional. A terminologia δ reflete o enriquecimento

relativo da razão isotópica da amostra, comparativamente a razão isotópica do padrão internacional, e é utilizada na análise de mensuração das variações isotópicas naturais.

A fonte primária do carbono para as plantas terrestres é o gás carbônico atmosférico, o qual possui valor de $\delta^{13}\text{C}$ de aproximadamente $-7,7\text{‰}$ (KENNEDY & KROUSE, 1990). De acordo com seu ciclo fotossintético, as plantas podem ser classificadas, na sua maioria, em dois grupos principais: plantas C_3 e C_4 , onde o primeiro composto orgânico a ser sintetizado é um ácido carboxílico, com três e quatro átomos de carbono, respectivamente. As plantas C_3 e C_4 possuem assinaturas isotópicas distintas ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$), devido ao fracionamento que ocorre durante a fixação fotossintética do carbono (SMITH & EPSTEIN, 1971; O' LEARY 1981; KENNEDY & KROUSE, 1990; VOGEL, 1993; DUCATTI, 2004).

Durante a assimilação fotossintética, as plantas do ciclo fotossintético C_3 fixam o CO_2 atmosférico através do ciclo de *Calvin-Benson* e apresentam valores $\delta^{13}\text{C}$ entre -22 e -34‰ . As plantas C_4 fixam o CO_2 através do ciclo de *Hatch-Slack* e apresentam valores entre -9 e -16‰ . O sinal negativo indica que as plantas apresentam menor concentração de ^{13}C que o padrão internacional.

Essa diferença natural na razão isotópica de carbono entre espécies de plantas torna possível utilizá-las como traçadores em animais, sem a necessidade de sintetizar compostos especificamente marcados, além de evitar problemas de saúde humana e segurança ambiental associado ao uso de isótopos radioativos (JONES et al. 1979; TIESZEN et al. 1983; TYRRELL et al. 1984; BOUTTON et al. 1988; METGES et al. 1990).

Segundo DeNiro & Epstein (1978) a integração da composição isotópica do carbono incorporado no corpo do animal e o que foi perdido na respiração e excreção deve ser igual à composição isotópica de carbono da dieta. Esta afirmação tornou-se a base da maioria dos pressupostos dos experimentos que utilizam os isótopos estáveis do carbono.

Estas investigações têm demonstrado que as composições isotópicas dos tecidos de animais geralmente assemelham-se às suas dietas (MINSON & LUDLOW, 1975; DENIRO & EPSTEIN, 1976, 1978; HOBSON & CLARK, 1992a, 1992b) e esses traçadores vêm sendo utilizados com eficácia em estudos com aves de postura (CARRIJO et al. 2000; DENADAI et al. 2006), frangos de corte (CRUZ et al. 2012; CARRIJO et al. 2006), codornas de corte (MÓRI et al. 2007), peixes (ZUANON et al. 2007), ovinos (SILVA, 2003) e outras espécies animais.

Os alimentos são a principal fonte de carbono e nitrogênio nos consumidores, assim suas composições isotópicas são essencialmente determinadas por aquelas presentes nas suas dietas (PETERSON & FRY 1987, KELLY 2000). Desta forma, para interpretar a composição isotópica em tecidos animais é necessário entender o papel de três fontes principais de variação isotópica: a composição isotópica da dieta; os fracionamentos entre a dieta e os tecidos do consumidor; e o tempo que o valor isotópico das fontes demora em se refletir nos tecidos do consumidor (taxa de reposição ou *turnover*) (NEWSOME et al. 2010).

Após a mudança da dieta, a alteração da composição isotópica no tecido ou corpo depende da velocidade que os constituintes da nova dieta serão incorporados. Ducatti et al. (2002), fundamentados em resultados da literatura, propuseram um modelo teórico capaz de expressar os resultados do enriquecimento relativo de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) em função do tempo de alimentação, fornecendo dietas contrastantes em $\delta^{13}\text{C}$ (formuladas com grãos de plantas dos ciclos fotossintéticos C_3 e C_4) a animais adultos.

Partindo do pressuposto que o metabolismo de determinado tecido animal depende da taxa de entrada de compostos pré-existent, os autores chegaram à equação $\delta^{13}\text{C}(t) = \delta^{13}\text{C}(f) + [\delta^{13}\text{C}(i) - \delta^{13}\text{C}(f)]e^{-kt}$, onde a simbologia empregada significa $\delta^{13}\text{C}(t)$ = 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;

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

O modelo proposto por Ducatti et al. (2002) é adequado para determinar o tempo de substituição total ou parcial (meia-vida) de carbono nos tecidos em estudos com animais de pequeno e grande porte.

A taxa de movimentação ou reposição é conhecida como *turnover*. O *turnover* isotópico é definido como a mudança isotópica, devida ao crescimento e ao repasse metabólico aos tecidos, associados com a mudança na dieta. Sua determinação é importante para o entendimento da taxa de renovação nos tecidos e servirá de base para futuros estudos com rastreabilidade de produtos de origem animal, autenticação de produtos. Não existe na literatura referências que reportem a taxa de *turnover* em suínos.

O Capítulo 2 intitulado “**TURNOVER DO CARBONO NOS TECIDOS DE SUÍNOS EM DIFERENTES FASES DE CRESCIMENTO**” encontra-se redigido de acordo com as normas editoriais da Revista PAB – Pesquisa Agropecuária Brasileira. O presente trabalho teve por objetivo avaliar o *turnover* do sangue, pâncreas e tíbia de suínos em diferentes fases de crescimento através da análise dos isótopos estáveis de carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) por espectrometria de massas.

O Capítulo 3 intitulado “**UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DOS ISÓTOPOS ESTÁVEIS PARA DETERMINAR O TURNOVER DO CARBONO NOS MÚSCULOS DE SUÍNOS**” encontra-se redigido de acordo com as normas editoriais da Revista PAB – Pesquisa Agropecuária Brasileira. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a taxa de *turnover* de músculos de suínos em diferentes fases de crescimento através da análise dos isótopos estáveis de carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) por espectrometria de massas.

3. REFERENCIAS

- ABICEPS (Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de carne suína). Disponível em: <[http:// http://www.abipecs.com.br/](http://www.abipecs.com.br/)>. Acesso em: 2 junho 2012, 13:20:15.
- BOUTTON, T.W.; TYRRELL, H.F.; PATTERSON, B.W. Carbon kinetics of Milk formation in holstein cows in late lactation. **Journal of Animal Science**, v.66, p.2636-2645, 1988.
- 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, p.209-218, 2000.
- CARRIJO, A.S.; PEZZATO, A.C.; DUCATTI, C.; SARTORI, J.R.; TRINCA, L.; SILVA, E.T. Traceability of Bovine Meat and Bone Meal in Poultry by Stable Isotope Analysis. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.8, p.37-42, 2006.
- CRAIG, H. Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass spectrometric analysis of carbon dioxide. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v.12, p.133-149, 1957.
- CRUZ, V. C.; ARAUJO, P. C.; SARTORI, J. R.; PEZZATO, A. C.; DENADAI, J. C.; Polycarpo, G. V.; ZANETTI, L. H.; DUCATTI, C. Poultry offal meal in chicken: Traceability using the technique of carbon ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$)- and nitrogen ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$)-stable isotopes. **Poultry Science**, v. 91, p. 478-486, 2012.
- 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, 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, p.495-506, 1978.
- DeNIRO, M.J.; EPSTEIN, S. You are what you eat (plus a few ‰) the carbon isotope cycle in food chains. **Geological Society of America**, v.6, p.834, 1976.
- DUCATTI, C.; SALATI, E.; MATSUI, E. Método de análise da razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ em carbonatos. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 51, n. 2, p. 275-286, 1979.
- DUCATTI, C. **Isótopos estáveis ambientais**. 2004 [Apostila]. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, p.184, 2004.
- DUCATTI, C.; CARRIJO, A.S.; PEZZATO, A.C.; MANCERA, P.F.A. Modelo teórico e experimental da reciclagem do carbono-13 em tecidos de mamíferos e aves. **Scientia Agrícola**, v.59, n.1, p.29-33, 2002.

- GANNES, L.Z.; DEL-RIO, C.M.; KOCH, P. Natural abundance variations in stable isotopes and their potential uses in animal physiological ecology. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.119A, n.3, p.725-737, 1998.
- GOTTMANN, R. **Influência da composição das rações na rastreabilidade de farinhas de origem animal pela técnica dos isótopos estáveis em frangos de corte**. 2007. 39 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.
- HETENYI, G.J.R.; PEREZ G.; VRANIC M. Turnover and precursor-product relationships of nonlipid metabolites. **Physiological Reviews** 1983; 63(2): 606-67.
- HOBSON, K.A.; CLARK, R.G. Assessing avian diets using stable isotopes I: Turnover of ^{13}C in tissues. **The Condor**, v.94, p.181-188, 1992a.
- HOBSON, K.A.; CLARK, R.G. Assessing avian diets using stable isotopes II: Factors influencing diet-tissue fractionation. **The Condor**, v.94, p.189-197, 1992b.
- JONES, R.; LUDLOW, M.; TROUGHTON, J. Estimation of the proportion of C_3 and C_4 plant species in diet of animals from the ratio of natural ^{12}C and ^{13}C isotopes in the faeces. **Journal of Agricultural Science**, v.92, p.91-100, 1979.
- KELLY, J.F.; (2000) Stable isotopes of nitrogen and carbon in the study of avian and mammalian trophic ecology. *Canadian Journal of Zoology* 78:1–27.
- METGES, C.; KEMPE, K.; SCHIMIDT, H.L. Dependence of the carbon isotope contents of breath carbon dioxide, milk, serum and rumen fermentation products on the delta ^{13}C value of food in dairy cows. **British Journal of Nutrition**, v.63, p.187-196, 1990.
- MINSON, D.J.; LUDLOW, M.M. Differences in natural carbon isotope ratios of milk and hair from cattle grazing tropical and temperate pastures. **Nature**, v.256, p.602, 1975.
- MÓRI, C. GARCIA E.A.; DUCATTI C.; DENADAI, J.C.; PELÍCIA, K.; GOTTMANN, R.; MITUO, M.A.O; BORDINHON, A.M. Traceability of animal byproducts in quail (*Coturnix coturnix japonica*) tissues using carbon ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) and nitrogen ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) stable isotopes. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.9, n.4, p.263-269, 2007.
- NEWSOME, S.D, CLEMENTZ, M.T, KOCH, P.L. Using stable isotope biogeochemistry to study marine mammal ecology. *Marine Mammal Science* v.26, p.509-572, 2010.
- OLIVEIRA, R. P.; DUCATTI, C.; PEZZATO, A. C.; DENADAI, J. C.; CRUZ, V. C.; SARTORI, J. R.; CARRIJO, A. S.; CALDARA, F. R. Traceability of poultry offal meal in broiler feeding using isotopic analysis ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) of different tissues. **Revista Brasileira de Ciência Avícola / Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 12, p. 13-20, 2010.
- OLIVEIRA, R.P. **Rastreabilidade da farinha de vísceras na alimentação de frangos de corte pela técnica dos isótopos estáveis ($\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$)**. 2005. 109f. Tese (Doutorado em

Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.

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

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

SILVA, J.J. **Determinação da fase lactente – ruminante em cordeiros pelas técnicas de $\delta^{13}\text{C}$ e micro – histologia fecal**. 2003. 43 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

SMITH, B.N.; EPSTEIN, S. Two categories of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios of higher plants. **Plant Physiology**, v.47, 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, p.32-37, 1983.

TYRRELL, H.F.; PELLETIER, G.; CHEVALIER, R.; HILLAIRE-MARCELL, C.; GAGNON, M. Use of carbon-13 as tracer in metabolism studies. **Canadian Journal of Animal Science**, p.127-129, 1984.

VOGEL, J.C. Variability of carbon isotope fractionation during photosynthesis. In: EHLERINGER, J.R.; HALL, A.E.; FARQUHAR, G.D. **Stable isotopes and plant carbon-water relations**, p.29-46, 1993.

ZUANON, J. A. S.; PEZZATO, A. C.; DUCATTI, C.; BARROS, M. M.; PEZZATO, L. E. ; PASSOS, J. R. S. Muscle $\delta^{13}\text{C}$ change in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings fed on C_3 or C_4 cycle plants grain-base diets. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 147, p. 761-765, 2007.

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, v.145, p.1001-107, 2006.

CAPITULO 2

***Turnover* do carbono nos tecidos de suínos em diferentes fases de crescimento**

Resumo- Este trabalho objetivou determinar o *turnover* do carbono no sangue, pâncreas e tíbia de suínos em diferentes períodos de crescimento, utilizando a técnica de isótopos estáveis. Foram utilizados 132 machos castrados e fêmeos, distribuídos ao acaso em quatro tratamentos que consistiam da substituição da dieta a base de milho (planta de ciclo fotossintético C₄) por dieta a base de arroz (plantas do ciclo fotossintético C₃) em dias distintos: 21; 42; 63; 110 dias de idade, respectivamente para os tratamentos 1, 2, 3 e 4. Para mensurar o *turnover* do carbono (diluição isotópica) nos tecidos em determinado intervalo de tempo, foram utilizados o modelo de equações de função exponencial do tempo ou modelo sigmoidal de regressão de Boltzmann. Os valores de meias-vidas foram: 15,9; 19,0 e 16,8 dias para o sangue; 14,1; 9,68 e 10,4 dias para o pâncreas; 14,3; 8,0 e 15,1 dias para tíbia com medula nos tratamentos com substituição aos 21, 42 e 63 de idade respectivamente. O pâncreas de acordo com valores de meia vida apresentou um rápido *turnover*, o sangue e a tíbia com medula apresentaram maiores valores de meia vida.

Termos para indexação: isótopos estáveis; delta de carbono 13; diluição isotópica.

Turnover of carbon in swine tissues in different growth phases

Abstract - This study aimed to determine the turnover of carbon in the blood, tibia and pancreas of pigs at different growth periods, using the technique of stable isotopes. We used 132 barrows and females were randomly assigned into four groups consisting of replacing the corn-based diet (plant C4 photosynthetic cycle) by diet of rice (C3 photosynthetic cycle plants) on different days: 21; 42, 63; 110 days of age, respectively for treatments 1, 2, 3 and 4. To measure the turnover of carbon (isotope dilution) in tissues given time interval, we used the model equations exponential function of time or template Boltzmann sigmoidal regression. Values of half-lives were 15.9, 19.0 and 16.8 days for the blood; 14.1, 9.68 and 10.4 days for the pancreas, 14.3, 8.0 and 15, one day to the tibia with bone replacement treatments at 21, 42 and 63 of age respectively. The pancreas according to half-life values showed a rapid turnover, blood and tibia with bone showed higher half-life.

Index terms: stable isotopes; of carbon delta 13; isotope dilution.

Introdução

Os isótopos estáveis inicialmente foram utilizados em estudos geológicos e arqueológicos servindo como técnica para a reconstrução de dieta prévia de animais (Van der Merve, 1982; De Niro, 1987). Ultimamente sua utilização vem crescendo em pesquisas agrícola, ecológicas e fisiológicas (Gannes et al., 1998), mostrando-se como uma alternativa promissora para estudos de processos relacionados à digestão, absorção e metabolismo de nutrientes em humanos e animais e em estudos para identificar a procedência e qualidade de produtos de origem animal e vegetal.

A técnica dos isótopos estáveis apresenta potencial de aplicação prática para a rastreabilidade de subprodutos de origem animal na alimentação de frangos de corte, postura, por meio da análise de seus tecidos (Carrijo et al., 2006; Gottmann, 2007; Oliveira et al., 2010). Entretanto, para o desenvolvimento dessa linha de pesquisa, há a necessidade de realização de estudos que contribuam para o conhecimento da assimilação isotópica da matéria orgânica nos tecidos dos animais (*turnover*). Através do conhecimento da taxa de *turnover*, pode-se revelar o período necessário no qual cada espécie assimila os nutrientes da nova dieta nos tecidos.

No processo de rastreabilidade busca-se um tecido que possa refletir a dieta antiga com a finalidade de poder detectar a inclusão de farinhas de origem animal, mesmo que estas sejam dadas apenas nas fases iniciais da vida dos suínos e para isto, necessita-se encontrar um tecido de metabolismo lento que conserve o sinal isotópico por mais tempo. Além disso, busca-se também um tecido que substitua rapidamente os seus carbonos, de forma que possa indicar a mudança da alimentação apenas na fase final da produção dos suínos. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a taxa de *turnover* do sangue, pâncreas e tibia dos suínos em diferentes fases de crescimento.

Material e Métodos

O experimento foi realizado na Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), área de Suinocultura, Botucatu, SP, Brasil, durante o período de 9 de abril a 5 de setembro de 2011. A realização do experimento está de acordo com os princípios éticos da experimentação animal sendo aprovado pela câmara de ética em experimentação animal da FMVZ sob protocolo nº 14/2010-CEEA.

Foram utilizados 132 animais de linhagem comercial, machos castrados e fêmeas desmamados com média de 21 dias de idade e peso inicial de $6,87 \pm 0,65$ kg. Os animais foram alojados em salas de creche contendo baias metálicas suspensas com piso ripado equipadas com bebedouros tipo chupeta, comedouros e campânula para aquecimento. Quando alcançaram em média 63 dias de idades, os animais foram transferidos para a unidade de recria e terminação e confinados em baias com piso parcialmente ripado contendo comedouros automáticos e bebedouros do tipo chupeta.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, consistindo de quatro tratamentos com a substituição das dietas em dias distintos.

Os tratamentos experimentais consistiram da substituição do milho (plantas do ciclo fotossintético C₄) pelo arroz (plantas do ciclo fotossintético C₃) em dias distintos. Sendo T1: substituição da dieta aos 21 dias de idades; T2: substituição da dieta aos 42 dias de idades; T3: substituição da dieta aos 63 dias de idades; T4: substituição da dieta aos 110 dias de idade.

Antes da substituição das dietas, os animais receberam ração predominantemente composta por grãos de plantas do ciclo fotossintético C₄, possuindo valor isotópico de carbono-13 semelhante ao das rações fornecidas às matrizes que deram origem aos animais experimentais. A partir do dia da substituição, os animais passaram a receber dieta composta por grãos de plantas do ciclo fotossintético C₃, com valor isotópico distinto das dietas que vinham consumindo.

Adotou-se o programa de alimentação por fases na creche, sendo ração pré-inicial dos 21 a 42 dias de idade, ração inicial dos 42 aos 63 dias de idade, ração de recria dos 63 a 110 dias de idade e ração de terminação dos 110 aos 175 dias de idade. A descrição dos tratamentos experimentais e dias de coletas de sangue e tecidos estão na Tabela 1.

Tabela 1. Descrição dos tratamentos (T) e dias de coletas do sangue e tecidos de suínos.

Idade de substituição das dietas ¹ (T)	Período avaliado (dias) ²	Dia de coleta das amostras de sangue (após a troca da dieta)	Dia de coleta das amostras do pâncreas e tecido ósseo após a substituição
21 dias	21 a 150	1; 2; 3; 4; 5; 6; 8; 11; 15; 20; 27; 37	1; 3; 6; 13; 18; 25; 35; 45; 60; 80; 100; 129
42 dias	42 a 150	1; 2; 3; 4; 5; 6; 8; 11; 15; 20; 27; 37	1; 3; 6; 13; 18; 25; 35; 45; 60; 80; 100; 108
63 dias	63 a 150	1; 2; 3; 4; 5; 6; 8; 11; 15; 20; 27; 37	1; 3; 6; 13; 18; 25; 35; 45; 60; 80; 87
110 dias	110 a 175	1; 2; 3; 4; 5; 6; 8; 11; 15; 20; 27; 37	1; 3; 6; 13; 18; 25; 35; 50; 65

¹Substituição do milho pelo arroz das dietas

²Dias após a substituição do milho pelo arroz das dietas

As rações foram formuladas para atenderem as exigências nutricionais propostas por Rostagno et al. (2005) e foram fornecidas à vontade. (Tabela 2).

Tabela 2: Composições percentuais, níveis nutricionais e valores isotópicos médios das dietas experimentais.

Ingredientes	P. Inicial		P. Inicial		Inicial C ₃	Inicial C ₄	Cresc. C ₃	Cresc. C ₄	Term. C ₃
	C ₃	C ₄	C ₃	C ₄					
Concentrado ou									
Núcleo	40	40	16	16	3	3	3	3	3
Milho	-	40	-	54	-	70	-	70	-
Quirera de Arroz	40	-	54	-	70	-	-	-	73
Farelo de Soja	20	20	25	25	27	27	27	27	24
Açúcar	-	-	5	5	-	-	-	-	-
Total	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Níveis Nutricionais									
PB (%)	18,72	19,00	19,04	19,27	18,18	19,39	18,18	19,39	16,64
EM (KCAL/KG)	3.408	3.320	3.385	3.360	3.289	3.267	3.289	3.267	3.296
Calcio (%)	0,78	0,74	0,64	0,64	0,709	0,75	0,709	0,75	0,735
Fósf. Disp. (%)	0,61	0,62	0,58	0,65	0,43	0,53	0,43	0,53	0,39
Lisina Disp. (%)	1,32	1,32	1,07	1,07	0,85	0,85	0,85	0,85	0,77
Met Disp. (%)	0,48	0,48	0,37	0,37	0,28	0,28	0,28	0,28	0,26
Treo Disp. (%)	0,80	0,80	0,63	0,63	0,57	0,57	0,57	0,57	0,53
Trip Disp. (%)	0,19	0,19	0,20	0,20	0,22	0,22	0,22	0,22	0,20
Na (%)	0,45	0,43	0,32	0,31	0,24	0,23	0,24	0,23	0,22
Cobre (ppm)	100,33	100,33	-	-	-	-	-	-	-
Zinco (ppm)	2.764,63	2.764,63	-	-	-	-	-	-	-
Valores isotópicos médios analisados $\delta^{13}C$									
	-26,72±1,2	-19,58±1,9	-28,11±1,1	-16,97±0,09	-28,79±0,80	-17,30±0,98	-28,79±0,80	-17,30±0,98	-28,50±0,75

A cada dia de coleta, foram tomadas amostras de três animais. As amostras de sangue foram coletadas pela veia cava anterior dos animais ($\pm 5\text{mL}$) e colocado em tubos contendo 14,3 UI de heparina sódica e posteriormente congeladas até a sua preparação para as análises isotópicas.

Os animais foram abatidos após insensibilização elétrica seguida de sangria. Imediatamente após o abate, o abdome dos animais foi aberto e com o auxílio de pinças e tesoura cirúrgica, foram colhidas amostras do pâncreas e osso. As amostras ósseas foram obtidas coletando-se o terço médio longitudinal da tíbia direita. Todas as amostras foram devidamente identificadas e congeladas (-18°C) até a sua preparação para as análises isotópicas.

As amostras foram descongeladas e secas em estufa de ventilação forçada a 50°C , por um período de 48h. Após a secagem foram desengorduradas com éter etílico em aparelho de Soxhlet, à temperatura de 65°C , durante 4 horas. Posteriormente, as amostras foram secas em estufa de ventilação forçada a 50°C durante meia hora, para que houvesse evaporação do éter.

Todas as amostras foram moídas em moinho criogênico Spex Sample Prep, modelo Geno/Grinder 2010, à -196°C . Foram utilizadas aproximadamente 2,0 g de amostra colocadas em frasco de policarbonato juntamente com duas esferas de aço inoxidável (modelo 440, sem óleo/graxa), o qual foi devidamente fechado e imerso em nitrogênio líquido durante três minutos para congelamento das amostras, para posterior moagem.

Cada amostra foi colocada em um tubo diferente, o pâncreas e as dietas experimentais foram moídas por um período de 5 minutos e a tíbia por 10 minutos, com rotação de 920 rpm em alta frequência, para obtenção de material homogêneo, com aspecto microscópico.

As amostras de sangue foram liofilizadas em aparelho Micromodulyo-115 (Edwardsvacuun®). Primeiramente as amostras foram congeladas em freezer -80°C , por 15 minutos, posteriormente foram acomodadas nas bandejas do equipamento, após a

acomodação foi efetuado o início da descompressão por 15 minutos. A duração do processo de liofilização foi de 24 horas e as amostras foram secas á vácuo a -55°C e pressão de em torno $30\ \mu\text{Hg}$.

Para a realização das análises isotópicas, o material moído e o sangue liofilizado foram colocados em cápsulas de estanho e pesados ($50\text{-}70\ \mu\text{g}$) em balança analítica de alta sensibilidade, com precisão de seis casas decimais. Após a pesagem as cápsulas foram introduzidas, por meio de um amostrador automático no analisador elemental, *Flash 2000 Organic Elemental Analyzer EA for IRMS*, no qual, em presença de oxigênio (O_2) e óxido de cobre (CuO), foram queimadas quantitativamente para CO_2 . Os gases formados foram separados em coluna cromatográfica gasosa e analisado no espectrômetro de massa de razões isotópicas (*Delta V Advantage Isotope Ratio MS, Thermo Scientific, Alemanha*) do Centro de Isótopos Estáveis Ambientais, do Instituto de Biociências da Unesp, *Campus* de Botucatu.

Os resultados foram expressos em *delta per mil* da razão isotópica em relação ao padrão internacional *Peedee Belemnite* (PDB) para o elemento carbono, de acordo com a

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

Em que, $\delta^{13}\text{C}$ = enriquecimento da razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ da amostra em relação ao padrão e R = razão isotópica ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) da amostra e do padrão.

No tratamento com substituição do milho pelo arroz aos 21 dias de idades (T1) para avaliação da velocidade de substituição do carbono das dietas no sangue dos leitões, foi empregado o modelo sigmoidal de regressão de Boltzmann de acordo com Caldara et al. (2007) equação 4:

$$\delta^{13}\text{C}(t) = \delta^{13}\text{C}(f) + [\delta^{13}\text{C}(i) - \delta^{13}\text{C}(f)/(1 + e^{(\alpha - \alpha_0)/dx})] \quad (4)$$

Onde:

$\delta^{13}\text{C}(i)$ = enriquecimento relativo inicial no tecido. Adimensional;

$\delta^{13}\text{C}(f)$ = enriquecimento relativo final no tecido. Adimensional;

$\delta^{13}\text{C}(t)$ = enriquecimento relativo no tecido em qualquer tempo. Adimensional;

x_0 = ponto de inflexão da sigmóide (meia-vida), em dias;

dx = constante de tempo, em dias;

$x = t$ = tempo em dias

Para avaliar a velocidade de substituição do carbono nos tecidos dos animais após determinado intervalo de tempo, foi empregada a função exponencial do tempo expressa pela

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

Em que, $\delta^{13}\text{C}(t)$ = enriquecimento isotópico do tecido em qualquer tempo (t); $\delta^{13}\text{C}(f)$ = enriquecimento isotópico do tecido no patamar de equilíbrio, ou condição final; $\delta^{13}\text{C}(i)$ = enriquecimento isotópico do tecido, na condição inicial; k = constante de troca (*turnover*) em unidades de tempo⁻¹ e t = tempo (em dias) desde a substituição da ração (Ducatti et al. 2002).

A meia-vida do carbono para os tecidos envolvidos nos tratamentos foi calculada pela Equação 3:

$$T = \ln 2/k \quad (3)$$

Em que, T = meia-vida, unidade: tempo (dias); \ln = logaritmo neperiano; k = constante de *turnover*, unidade: dia⁻¹, sugerindo uma ideia da “velocidade” no processo de troca dos isótopos estáveis nos tecidos (Ducatti et al. 2002).

Os dados obtidos para a análise isotópica foram analisados pelo método de equações exponenciais de primeira ordem do software Origin® 6.0 Professional (Microcal Software Origin, 1999).

Os valores do fracionamento isotópico dos tecidos ao final do período experimental em relação à dieta foram calculados de acordo com DeNiro & Epstein (1978) pela equação (5):

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

Onde: Δ = fator de fracionamento entre o tecido e a dieta, em parte per mil (‰);

δ_{tecido} = enriquecimento relativo do tecido em questão, em parte per mil (‰);

δ_{dieta} = enriquecimento relativo médio da respectiva dieta, em parte per mil (‰);

Para o cálculo do fracionamento, foram utilizados para todos os tratamentos os valores finais da dieta de terminação.

Resultados e Discussão

A mudança no valor do $\delta^{13}\text{C}$ dos tecidos ao longo do tempo ocorreu gradativamente durante o crescimento dos suínos. As Figuras 1, 2 e 3 ilustram o comportamento da diluição isotópica, equações exponenciais e valores de meia vida do carbono no sangue, pâncreas e tibia com medula respectivamente. Os valores isotópicos das dietas e tecidos se encontram na Tabela 3. Os fatores de fracionamento isotópico calculados para os tecidos em função dos tratamentos experimentais estão contidos na Tabela 4. Os valores de meia vida, equações exponenciais para o tratamento com substituição aos 110 dias não foram ilustrados porque estes não atingiram o patamar de equilíbrio isotópico que foi considerado como substituição de 95% dos átomos, calculados através da fórmula $t_{95\%} = (-1/k) \ln(1-F)$, onde: t = tempo de troca do carbono, k = constante de troca (*turnover*) em unidades de tempo⁻¹, F = fração de átomos trocados, em que, F (átomos trocados) pode variar de zero 0 a 0,9999. O tempo necessário para que o pâncreas, tibia e sangue atingissem o patamar de equilíbrio isotópico seria de 108, 107 e 42 dias respectivamente.

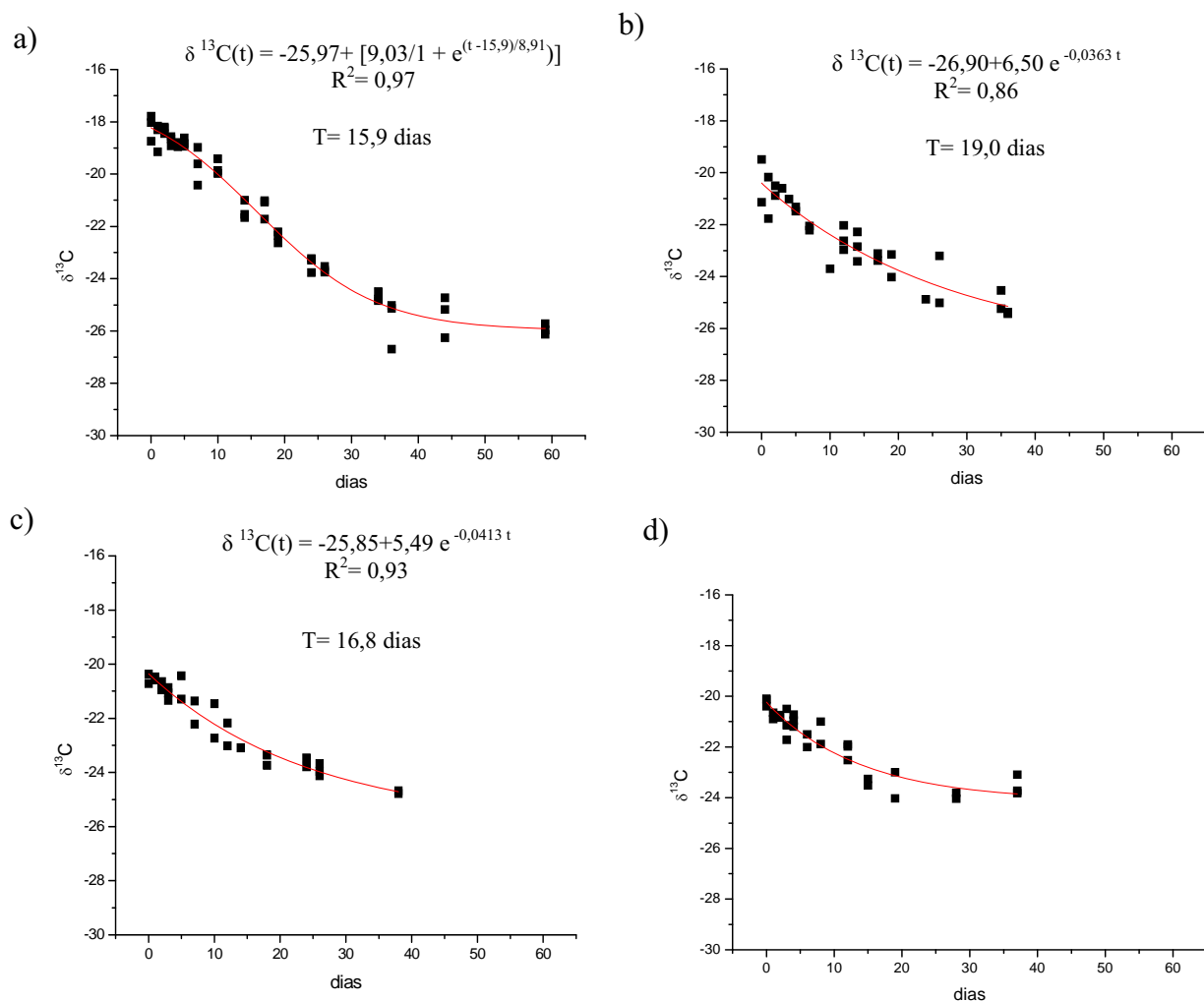


Figura 1: Representação exponencial do *turnover* dos isótopos estáveis do carbono e valores de meias-vidas em dias do sangue. a) substituição aos 21 dias, b) substituição aos 42 dias, c) substituição aos 63 dias, d) substituição aos 110 dias.

A taxa de *turnover* para o sangue variou com os tratamentos, os valores de meia vida do carbono no sangue dos animais foram 15,9; 19,0 e 16,8 dias para os tratamentos com substituição aos 21, 42 e 63 dias de idade.

Logo após o desmame os animais passam por muitos fatores estressantes como: troca de ambiente, mistura de lotes, separação da mãe, troca de dieta e permanecem por longos períodos sem se alimentar (até 72 horas), o que justifica nos primeiros 5 dias a conservação do valor isotópico da dieta que haviam consumido.

A taxa de *turnover* é importante para determinar como a assinatura isotópica da dieta de um animal é incorporada em seus tecidos, pois observaram que o plasma sanguíneo

fornece informações de curto prazo (cerca de 1-4 dias), enquanto o sangue total fornece informações intermediárias (cerca de 8- 12 dias) porque suas células têm maior longevidade do que os constituintes do plasma, tendo um ritmo mais lento na taxa de *turnover*. (Pearson et al. 2003)

Estudo realizado por Ayliffe et al. (2004), possibilitou avaliar a taxa de “*turnover*” do $\delta^{13}\text{C}$ do sangue e pêlo de cavalos, com dieta inicial a partir de plantas do tipo fotossintético C_3 , que posteriormente foi substituída por uma dieta com plantas do tipo C_4 , os resultados indicaram a troca total do sinal isotópico do sangue de 53 dias e um tempo de 120 dias para a troca total do sinal isotópico no pêlo. O tempo de *turnover* depende do tecido e da espécie animal avaliada, pois, cada espécie tem uma taxa de *turnover* distinta.

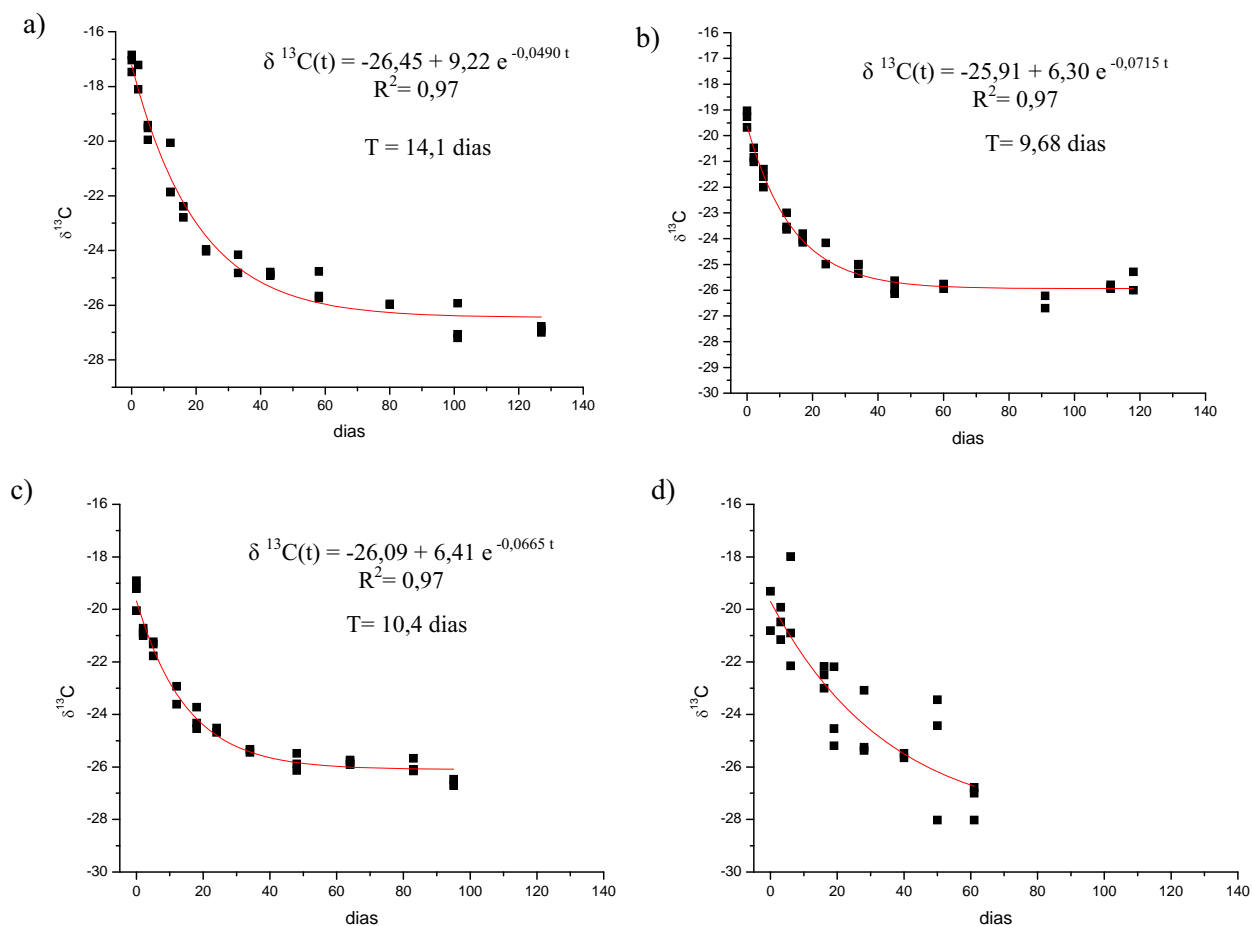


Figura 2: Representação exponencial do *turnover* dos isótopos estáveis do carbono e valores de meias-vidas em dias do pâncreas. a) substituição aos 21 dias, b) substituição aos 42 dias, c) substituição aos 63 dias, d) substituição aos 110 dias.

O pâncreas dos animais com substituição da dieta aos 21 dias de idade apresentou valor de meia vida de 14,1 dias, superior aos tratamentos com substituição aos 42 dias de idades e 63 dias de idade, que apresentaram meia vida de 9,68 e 10,4 dias. Provavelmente essa maior taxa de *turnover* no tratamento com substituição aos 21 dias de idade em relação aos tratamentos com substituição aos 42 e 63 dias de idades se deve a imaturidade fisiológica do sistema digestório dos animais.

Nos leitões, a função pancreática aumenta na terceira semana de idade, porém ainda não é satisfatória para uma eficiente digestão. Segundo Mahan & Newton (1993) e Bertol (1997), o desenvolvimento adequado da capacidade de produção e ativação das enzimas digestivas ocorre entre seis e oito semanas de idade nos suínos.

De acordo com Reeds (1989), a idade do indivíduo primariamente afeta a porção de *turnover* protéico diretamente relacionado ao crescimento. Embora diferentes tecidos cresçam a taxas muito semelhantes, existem diferenças inerentes na taxa da síntese e degradação protéica entre tecidos. Em trabalho realizado com suínos, Caldara et al. (2008) encontrou valores de meia vida do pâncreas ($T=10,2$ dias) parecidos com o valor encontrado nesse experimento para o tratamento com substituição aos 42 e 63 dias de idade. A literatura consultada apresenta poucos dados relacionados com taxa de *turnover* em suínos, notadamente em estudos relacionados ao pâncreas.

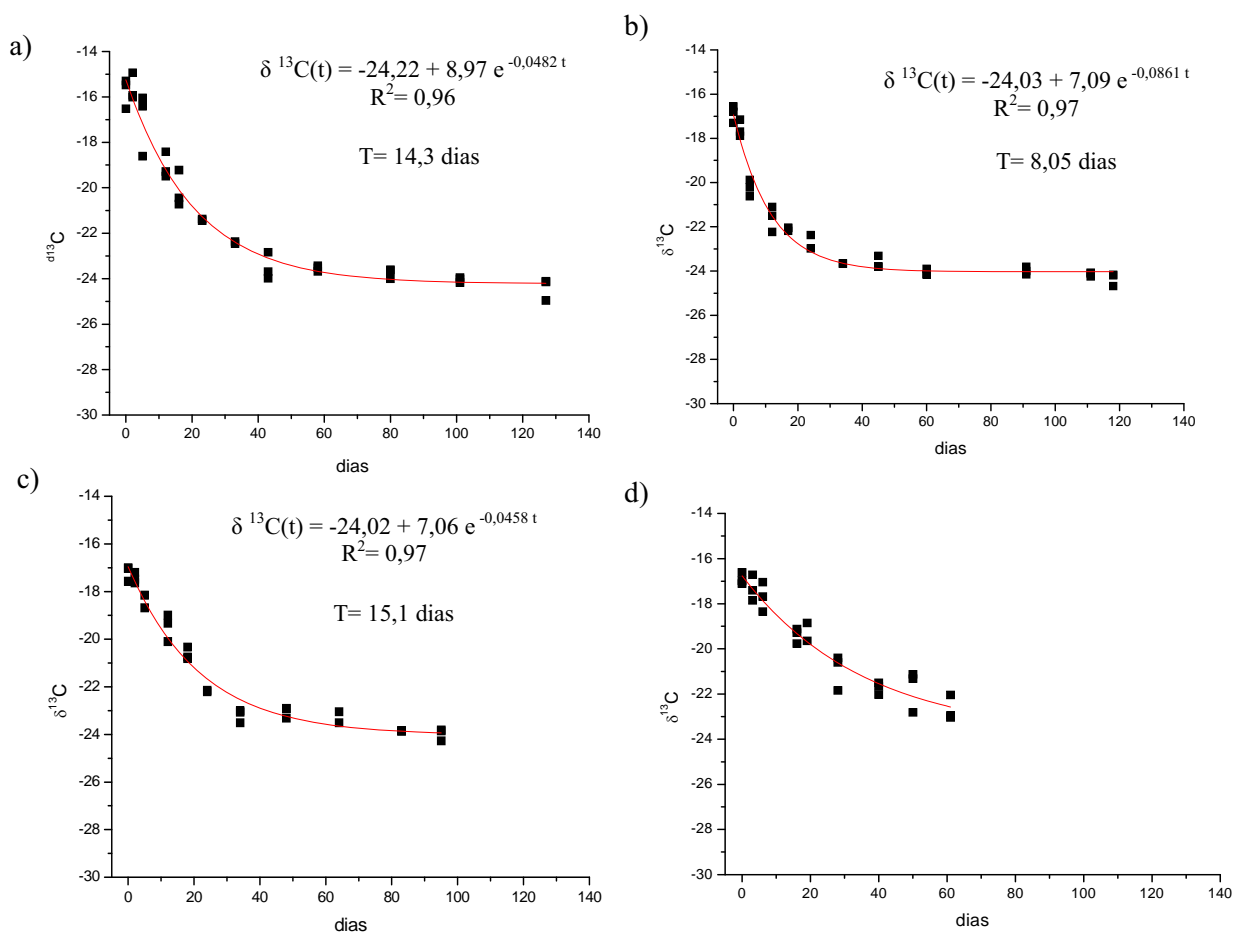


Figura 3: Representação exponencial do *turnover* dos isótopos estáveis do carbono e valores de meias-vidas em dias da tíbia com medula. a) substituição aos 21 dias, b) substituição aos 42 dias, c) substituição aos 63 dias, d) substituição aos 110 dias.

Os valores de meia vida do carbono encontrados na tíbia com medula foram 14,4; 8,05; 15,1 para os tratamentos com substituição aos 21, 42, 63 dias de idade, respectivamente.

Os valores de meia vida do carbono para o pâncreas e tíbia foram maiores nos animais logo após o desmame (substituição aos 21 dias- T21) e reflete a menor taxa de crescimento, resultante do estresse, que ocorre principalmente nas duas primeiras semanas pós-desmame. Quando a substituição das dietas ocorreu aos 42 dias de idade (T42) devido ao fato de ter havido regularização da ingestão de alimento pelos leitões desmamados e ao conseqüentemente ao rápido crescimento dos animais, os valores de meia vida do carbono foram menores para o pâncreas e tíbia foram menores. Nos animais com substituição com 110 dias podemos perceber que o tempo experimental não foi suficiente para que atingisse o equilíbrio isotópico.

O rápido *turnover* observado na tíbia tem relação direta com o crescimento ósseo e provavelmente devido ao processamento das amostras terem sido realizados com o conteúdo medular. O crescimento apresenta características alométricas, ou seja, cada tecido possui velocidade diferente de crescimento.

Em suínos a fase de aceleração do crescimento vai até aproximadamente o animal atingir 50 kg de peso vivo. De 50 a 80 kg a taxa de crescimento torna-se linear. De 80 a 130 kg começa a fase de desaceleração.

O osso apresenta função de sustentação, proteção aos órgãos e metabolismo mineral, portanto é um tecido metabolicamente ativo e multifuncional, sendo constantemente formado, removido (reabsorvido) e sintetizado ao longo da vida por processo de *turnover*.

O primeiro tecido a ser depositado é o tecido nervoso, na sequência vêm o tecido ósseo, o muscular e por último o tecido adiposo. Portanto no início da fase de vida dos animais o crescimento ósseo está acelerado desta forma a taxa de *turnover* foi mais rápida nos tratamentos com substituição aos 42 dias de idades.

Segundo Mituo (2008) avaliando taxas de *turnover* em frangos de corte em diferentes fases de crescimento a tíbia foi o tecido que apresentou *turnover* mais lento, porém durante o processamento das amostras o conteúdo medular foi retirado diferindo dos resultados encontrados nesse experimento em que a tíbia apresentou rápido *turnover*.

Tabela 3: Valores isotópicos finais ($\delta^{13}\text{C}$) das dietas e tecidos analisados de suínos.

Idade de substituição da dieta (T)	dietas	sangue	pâncreas	tíbia
21	-28,50±0,91	-25,97±0,20	-26,45±0,09	-24,22±0,02
42	-28,50±0,34	-26,90±0,75	-25,91±0,50	-24,03±0,36
63	-28,50±0,20	-25,85±0,78	-26,09±0,75	-24,02±0,29

Tabela 4: Fator de fracionamento isotópico (Δ) entre tecido e dieta dos suínos submetidos a diferentes dietas experimentais

Idade de substituição da dieta (T)	$\Delta^{13}\text{C}$		
	sangue	pâncreas	tíbia
21	2,53	2,05	4,28
42	1,60	2,59	4,47
63	2,63	2,41	4,48

O pâncreas apresentou menor variação nos fracionamento isotópico provavelmente indicando estabilização do sinal isotópico, portanto troca completa dos carbonos, este fato pode ser consequência da alta atividade metabólica deste tecido em todas as fases de vida.

O fracionamento do carbono entre a dieta e os tecidos é, geralmente, considerado em aproximadamente 0,5-1‰ (DENIRO & EPSTEIN 1978). Porém, depende do conteúdo de carboidratos, lipídeos ou proteínas do tecido analisado. Assim, o fracionamento varia de acordo com a proporção destes três componentes no tecido analisado. Tecidos moles como músculo, fígado e pele são enriquecidos em $\delta^{13}\text{C}$ em 1-2‰ em relação ao valor médio dos tecidos da dieta, enquanto o colágeno dos tecidos ósseos em geral possui valores de $\delta^{13}\text{C}$ 4-5‰ mais altos do que aqueles encontrados na dieta (KOCH 2007). É importante, portanto, levar em consideração o tecido analisado ao se compararem valores obtidos de diferentes fontes.

Conclusão

- De acordo com os valores de meia vida dos tecidos podemos concluir que o pâncreas é um tecido de rápido *turnover*.

-O sangue e a tibia com medula de acordo com os valores de meia vida são tecidos que possuem *turnover* lento.

Referências

- AYLIFFE, L.K.; CERLING, T.E.; ROBINSON, T.; WEST, A.G.; SPONHEIMER, M.; PASSEY, B.H.; HAMMER, J.; ROEDER, B.; DEARING, M.D.; EHLERINGER, J.R. Turnover of carbon isotopes in tail hair and breath CO_2 of horses fed an isotopically varied diet. **Oecologia**, Amsterdam, v.139, p.11-22, 2004.
- BERTOL, T.M. Alimentação dos leitões no aleitamento e creche. In: CURSO DE SUINOCULTURA, 1997, Concórdia. **Anais...** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 1997. p. 93-110.
- CALDARA, F. R.; DUCATTI, C.; BERTO, D.A.; DENADAI, J.C.; ANDRADE G. A.; Gioso M. M. Glutamina e turnover do carbono no tecido adiposo de leitões. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.42, n.11, p.1601-1607, nov. 2007
- CALDARA, F. R.; DUCATTI, C.; BERTO, D.A.; DENADAI, J.C.; SILVA, T.; GARCIA, R.G. Efeito da glutamina sobre o turnover do carbono ($\delta^{13}\text{C}$) de músculos e vísceras de leitões desmamados: glutamina e turnover de carbono tecidual. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**. V.30, n.3, p.291-297, 2008.

- CARRIJO, A.S.; PEZZATO, A.C.; DUCATTI, C.; SARTORI, J.R.; TRINCA, L.; SILVA, E.T. Traceability of Bovine Meat and Bone Meal in Poultry by Stable Isotope Analysis. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, v.8, p.37-42, 2006.
- DeNIRO, M.J.; EPSTEIN, S. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta*; v.42, p.495-506, 1978.
- DeNIRO, M.J. Stable isotopes and archaeology. *American Scientist*, v.75, p.182-191, 1987.
- DUCATTI, C.; CARRIJO, A.S.; PEZZATO, A.C.; MANCERA, P.F.A. Modelo teórico e experimental do reciclagem do carbono-13 em tecidos de mamíferos e aves. *Scientia Agrícola*, v.59, n.1, p.29-33, 2002.
- 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* 1998; 119A (3): 725-37.
- GOTTMANN, R. **Influência da composição das rações na rastreabilidade de farinhas de origem animal pela técnica dos isótopos estáveis em frangos de corte.** 2007. 39 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.
- KENNEDY, B.V.; KROUSE, H.R. Isotope fractionation by plants and animals: implications for nutrition research. *Canadian Journal Physiology and Pharmacology*, v.68, p.960-972, 1990.
- KOCH, P.L (2007) Isotopic study of the biology of modern and fossil vertebrates. In: Michener R, Lajtha K (eds) *Stable isotopes in ecology and environmental science*. 2nd edition. Blackwell Publishing, Boston, MA, pp. 99–154.
- MAHAN, D.C.; NEWTON, E.A. Evaluation of feed grains with dried skim milk and added carbohydrate sources on weanling pig performance. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 71, n. 12, p. 3376-3382, Dec. 1993.
- MICROCAL SOFTWARE INC. Microcal Software Origin® 6.0 Professional. Origin data analysis and technical graphics. Northampton (MS): Microcal Software Inc.; 1999.
- MITUO, M.A.O. **Turnover do Carbono-13 nos Tecidos de Frangos de Corte em diferentes fases de crescimento.** Agosto de 2008 p.70, Dissertação, Universidade Estadual Paulista (UNESP).
- OLIVEIRA, R. P. de ; DUCATTI, C. ; PEZZATO, A. C.; DENADAI, J. C.; CRUZ, V. C. da ; SARTORI, J.R.; CARRIJO, A. S.; CALDARA, F. R. Traceability of poultry offal meal in broiler feeding using isotopic analysis ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) of different tissues. *Revista Brasileira de Ciência Avícola / Brazilian Journal of Poultry Science*, v. 12, p. 13-20, 2010.
- PEARSON, D.F.; LEVEY, D.J.; GREENBERG, C.H, MARTINEZ DEL-RIO, C. Effects of elemental composition on the incorporation of dietary nitrogen and carbon isotopic signatures in an omnivorous songbird. *Oecologia*, v.135, p.516-523, 2003.

REEDS, P.J. Regulation of Protein Turnover. In: CAMPION, D.R.; HAUSMANN, G.J.; MARTIN, R.J. **Animal growth regulation**, cap.9, p.183-184, 1989.

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. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**; 2005; p.186.

VAN DER MERVE, N.J. Carbon isotopes, photosynthesis and archaeology. **American Scientist**, New Haven, v.70, p.596-606, 1982.

CAPITULO 3

Utilização da técnica dos isótopos estáveis para determinar o *turnover* do carbono nos músculos de suínos

Resumo - O objetivo deste estudo foi avaliar a taxa de *turnover* dos músculos *psaos major* e *masseter* de suínos em diferentes fases de crescimento. Foram utilizados 132 machos castrados e fêmeas, desmamados com idade média de 21 dias, distribuídos ao acaso em quatro tratamentos com substituição das dietas C₄ por C₃ em dias distintos: 21; 42; 63; 110 dias de idade, respectivamente, para os tratamentos 1, 2, 3 e 4. Para mensurar o *turnover* do carbono (diluição isotópica) nos tecidos em determinado intervalo de tempo, foram utilizados o modelo de equações de função exponencial do tempo. Os valores de meias-vidas foram: 19,0; 15,9; 17,5 e 25,9 dias para o músculo *psaos major* e 18,3; 16,8; 19,5 e 31,1 dias para o *masseter*; nos tratamentos 1, 2, 3 e 4 respectivamente. Amostras de músculos são bons exemplos para refletir mudanças na dieta de suínos por um período mais longo, apresentando taxas de *turnover* mais lento.

Termos para indexação: diluição isotópica, crescimento, fracionamento isotópico.

Using the stable isotope technique to determine the turnover of carbon in muscles of pigs

Abstract: The aim of this study was to evaluate the rate of turnover of the *psoas major* and *masseter* pigs at different stages of growth. We used 132 barrows and gilts, weaned at an average age of 21 days, randomly allotted to four treatments with replacement diets C4 to C3 on different days: 21, 42, 63, 110 days old, respectively, for treatments 1, 2, 3 and 4. To measure the turnover of carbon (isotope dilution) in tissues given time interval, we used the model equations exponential function of time. The values of half-lives were 19.0, 15.9, 17.5 and 25.9 days for the *psoas major* muscle and 18.3, 16.8, 19.5 and 31.1 days for the *masseter*; in treatments 1, 2, 3 and 4 respectively. Samples of the muscles are good examples to reflect changes in the diet of pigs for a longer period, with slow turnover rates.

Abstract- Index Term: isotopic dilution, growth, isotopic fractionation.

Introdução

Razões isotópicas de carbono e nitrogênio têm sido amplamente utilizadas para inferir fontes de alimentação dos animais (Newsome et al. 2007). A aplicação dos isótopos estáveis para estudos na nutrição animal está relacionada com o fato de os isótopos de carbono e nitrogênio mostrarem relativamente poucas e previsíveis mudanças quando os átomos destes dois elementos passam através da cadeia alimentar (Newsome et al. 2007). Desta forma a composição isotópica do carbono e nitrogênio de um animal irá refletir aproximadamente a mesma composição de sua alimentação (Rogers, 2009).

O contraste existente na relação isotópica de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ das plantas de ciclo fotossintético C_3 e C_4 é que tem possibilitado estudos na área de nutrição e metabolismo animal, utilizando como marcador o ^{13}C e sua concentração natural existente nos alimentos. Como as plantas são consumidas pelos animais, a “impressão digital isotópica” destas fontes será refletida nos tecidos específicos dos animais, após certo tempo de metabolismo (DeNiro & Epstein, 1978; Gannes et al., 1998).

Segundo Gannes et al. (1998), dietas com assinaturas isotópicas distintas podem ser utilizadas para mensurar o *turnover* de componentes corporais e órgãos de animais. Após a mudança da dieta, a alteração da composição isotópica no tecido ou corpo depende da velocidade que os constituintes da nova dieta serão incorporados.

Há um crescente uso de isótopos estáveis em estudos de autenticidade e nutrição animal (Schmidt et al. 2005; Bahar et al. 2009, Guo et al. 2010, Harrison et al. 2010, Harrison et al. 2011), origem geográfica de vários produtos como sucos de frutas (Bricout & Koziat, 1987; Koziat et al., 1993), vinhos (Martin et al., 1988), méis (Brookes et al., 1991; White et al., 1998), produtos lácteos (Rossmann et al., 2000; Manca et al., 2001), óleos vegetais (Kelly et al., 1997), além de caracterização e diferenciação do regime dietético de suínos ibéricos de acordo com a alimentação recebida no período de engorda (Gonzalez-Martin et al., 1999). Porém existem poucos dados na literatura com relação a trabalhos que avaliam o *turnover* de

carbono em suínos, portanto o objetivo desta pesquisa foi avaliar o *turnover* de músculos de suínos em diferentes fases de crescimento para aplicar a técnica em futuros estudos de rastreabilidade.

Material e Métodos

O experimento foi realizado na Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), área de Suinocultura, Botucatu, SP, Brasil, durante o período de 9 de abril a 5 de setembro de 2011. A realização do experimento está de acordo com os princípios éticos da experimentação animal sendo aprovado pela câmara de ética em experimentação animal da FMVZ sob protocolo nº 14/2010-CEEA

Foram utilizados 132 animais de linhagem comercial, machos castrados e fêmeas desmamados com média de 21 dias de idade e peso inicial de $6,87 \pm 0,65$ kg. Os animais foram alojados em salas de creche contendo baias metálicas suspensas com piso ripado equipadas com bebedouros tipo chupeta, comedouros e campânula para aquecimento. E quando alcançaram em média 63 dias de idades foram transferidos para a unidade de crescimento e terminação com baias contendo comedouros semi-automáticos e bebedouros do tipo chupeta.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, consistindo de quatro tratamentos com a substituição do milho (planta de ciclo fotossintético C₄) pelo arroz (ciclo fotossintético C₃) em dias distintos. Os tratamentos experimentais foram T1: substituição da dieta aos 21 dias de idades; T2: substituição da dieta aos 42 dias de idades; T3: substituição da dieta aos 63 dias de idades; T4: substituição da dieta aos 110 dias de idade.

Antes da substituição das dietas, os animais receberam ração predominantemente composta por grãos de plantas do ciclo fotossintético C₄, possuindo sinal isotópico de carbono-13 semelhante ao das rações fornecidas às matrizes que deram origem aos animais experimentais, até o momento da troca. A partir do dia da substituição, os animais passaram a

receber dieta composta por grãos de plantas do ciclo fotossintético C₃, com sinal isotópico distinto das dietas que vinham consumindo.

O programa de alimentação foi dividido em duas fases na creche, sendo a primeira de 21 a 42 dias de idade (pré-inicial) e a segunda dos 42 aos 63 dias de idade (inicial) e nas fases de crescimento (63 a 110 dias) e terminação (110 aos 175 dias). A descrição dos tratamentos experimentais e dias de coletas de músculos estão na Tabela 1.

As rações foram fornecidas à vontade. Todas as rações foram formuladas para atenderem as exigências nutricionais propostas por Rostagno et al. (2005). As dietas experimentais se encontram na Tabela 2.

Tabela 1. Descrição dos tratamentos (T) e dias de coleta de tecidos de suínos.

Idade de substituição das dietas	Período avaliado (dias)	Dia de coleta das amostras de tecidos (<i>Psoas Major</i> e <i>Masseter</i>)
21 dias	21 a 150	1; 3; 6; 13; 18; 25; 35; 45; 60; 80; 100; 129
42 dias	42 a 150	1; 3; 6; 13; 18; 25; 35; 45; 60; 80; 100; 108
63 dias	63 a 150	1; 3; 6; 13; 18; 25; 35; 45; 60; 80; 87
110 dias	110 a 175	1; 3; 6; 13; 18; 25; 35; 50; 65

Tabela 2: Composições percentuais, níveis nutricionais e valores isotópicos médios das dietas experimentais de suínos.

Ingredientes	P. Inicial		P. Inicial		Cresc. C ₃	Cresc. C ₄	Term. C ₃
	C ₃	C ₄	Inicial C ₃	Inicial C ₄			
Núcleo ou Concentrado	40	40	16	16	3	3	3
Milho	-	40	-	54	-	70	-
Quireira de Arroz	40	-	54	-	70	-	73
Farelo de Soja	20	20	25	25	27	27	24
Açúcar	-	-	5	5	-	-	-
Total	100	100	100	100	100	100	100
Níveis Nutricionais							
PB (%)	18,72	19,00	19,04	19,27	18,18	19,39	16,64
EM (Kcal/Kg)	3.408	3.320	3.385	3.360	3.289	3.267	3.296
Calcio (%)	0,78	0,74	0,64	0,64	0,709	0,75	0,73
Fósf. Disp. (%)	0,33	0,33	0,35	0,35	0,28	0,28	0,25
Lisina Disp (%)	1,32	1,32	1,07	1,07	0,85	0,85	0,77
Metion. Disp (%)	0,48	0,48	0,37	0,37	0,28	0,28	0,26
Treon. Disp (%)	0,80	0,80	0,63	0,63	0,57	0,57	0,53
Trip. Disp.(%)	0,19	0,19	0,20	0,20	0,22	0,22	0,20
Na (%)	0,45	0,43	0,32	0,31	0,24	0,23	0,22
Cobre (ppm)	100,33	100,33	-	-	-	-	-
Zinco (ppm)	2.764,63	2.764,63	-	-	-	-	-
Valores isotópicos médios analisados $\delta^{13}C$							
	-26,72±1,2	-19,58±1,9	-28,11±1,1	-16,97±0,09	-28,79±0,80	-17,30±0,98	-28,50±0,75

A cada dia de coleta, foram abatidos 03 animais dos quais foram coletadas amostras dos músculos. Os animais foram abatidos por insensibilização elétrica seguida de sangria por meio de incisão da veia jugular. Imediatamente após o abate, foram colhidas amostras (aproximadamente 2,0 x 2,0 x 1,0 cm) dos músculos *Psoas major* (composto em sua maioria por fibras musculares de contração rápida e metabolismo glicolítico) e do músculo Masseter (composto predominantemente por fibras musculares de contração lenta e metabolismo oxidativo). Todas as amostras foram devidamente identificadas e congeladas (-18°C) até a sua preparação para as análises isotópicas.

As amostras foram descongeladas e secas em estufa de ventilação forçada a 50°C, por um período de 48h. Após a secagem as amostras foram desengorduradas em éter etílico através do aparelho de Soxhlet, durante 4 horas. Posteriormente, as amostras foram retiradas do aparelho e secas em estufa de ventilação forçada a 50°C durante meia hora, para que houvesse evaporação do éter.

Todas as amostras foram moídas em moinho criogênico Spex Sample Prep, modelo Geno/Grinder 2010, à -196°C. Foram utilizadas aproximadamente 2,0 g de amostra onde foram colocadas em frasco de policarbonato juntamente com duas esferas de aço inoxidável (modelo 440, sem óleo/graxa), o qual foi devidamente fechado e imerso em nitrogênio líquido durante 3 minutos para congelamento das amostras, para posterior moagem das amostras. Neste moinho, cada amostra foi colocada em um tubo diferente, os músculos e as dietas experimentais foram moídos por um período de 5 minutos, com rotação de 920 rpm em alta frequência, para obtenção de material homogêneo, com aspecto microscópico. Para a realização das análises isotópicas, o material moído foi colocado em cápsulas de estanho e pesados (50-70 µg) em balança analítica de alta sensibilidade, com precisão de seis casas decimais. Após a pesagem as cápsulas foram introduzidas, por meio de um amostrador automático no analisador elemental, *Flash 2000 Organic Elemental Analyzer EA for IRMS*, no

qual, em presença de oxigênio (O₂) e óxido de cobre (CuO), foram queimadas quantitativamente para CO₂. Os gases formados foram separados em coluna cromatográfica gasosa e analisado no espectrômetro de massa de razões isotópicas (*Delta V Advantage Isotope Ratio MS, Thermo Scientific, Alemanha*) do Centro de Isótopos Estáveis Ambientais, do Instituto de Biociências da Unesp, *Campus* de Botucatu.

Os resultados são expressos em *delta per mil* da razão isotópica em relação ao padrão internacional *Peedee Belemnite* (PDB) para o elemento carbono, de acordo com a Equação 1:

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

Em que, $\delta^{13}\text{C}$ = enriquecimento da razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ da amostra em relação ao padrão e R = razão isotópica ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) da amostra e do padrão.

Para avaliar a velocidade de substituição do carbono nos tecidos dos animais após determinado intervalo de tempo, foi empregada a função exponencial do tempo expressa pela Equação 2:

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

Em que, $\delta^{13}\text{C}(t)$ = enriquecimento isotópico do tecido em qualquer tempo (t); $\delta^{13}\text{C}(f)$ = enriquecimento isotópico do tecido no patamar de equilíbrio, ou condição final; $\delta^{13}\text{C}(i)$ = enriquecimento isotópico do tecido, na condição inicial; k = constante de troca (*turnover*) em unidades de tempo⁻¹ e t = tempo (em dias) desde a substituição da ração (DUCATTI et al. 2002).

A meia-vida do carbono para os tecidos envolvidos nos tratamentos foi calculada pela Equação 3:

$$T = \ln 2/k \quad (3)$$

Em que, T = meia-vida, unidade: tempo (dias); ln = logaritmo neperiano; k = constante de *turnover*, unidade: dia⁻¹, sugerindo uma ideia da “velocidade” no processo de troca dos isótopos estáveis nos tecidos (Ducatti et al. 2002).

Os dados obtidos para a análise isotópica foram analisados pelo método de equações exponenciais de primeira ordem do software Origin® 6.0 Professional (Microcal Software Origin, 1999).

Os valores do fracionamento isotópico dos tecidos ao final do período experimental em relação à dieta foram calculados de acordo com DeNiro & Epstein (1978) pela equação (5):

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

Onde:

Δ = fator de fracionamento entre o tecido e a dieta, em parte per mil (‰);

δ_{tecido} = enriquecimento relativo do tecido em questão, em parte per mil (‰);

δ_{dieta} = enriquecimento relativo médio da respectiva dieta, em parte per mil (‰);

Para o cálculo do fracionamento, foram considerados para todos os tratamentos os valores da dieta final consumida.

Resultados e Discussão

A mudança no valor do $\delta^{13}\text{C}$ dos tecidos ao longo do tempo ocorreu gradativamente durante o crescimento dos suínos. As Figuras 1 e 2 ilustram o comportamento da diluição isotópica, equações exponenciais e valores de meia vida do carbono dos músculos *Psoas Major* e *Masseter*, respectivamente. Os valores isotópicos finais das dietas e tecidos se encontram na Tabela 3, enquanto os fatores de fracionamento isotópico calculados para os tecidos estão contidos na Tabela 4. Os valores de meia vida, equações exponenciais para o tratamento com substituição aos 110 dias não foram ilustrados porque estes não atingiram o patamar de equilíbrio isotópico que foi considerado como substituição de 95% dos átomos, calculados através da fórmula $t_{95\%} = (-1/k) \ln(1-F)$, onde: t = tempo de troca do carbono, k = constante de troca (*turnover*) em unidades de tempo⁻¹, F = fração de átomos trocados, em

que, F (átomos trocados) pode variar de zero 0 a 0,9999. O tempo necessário para que os músculos *psoas major* e *masseter* atingissem o patamar de equilíbrio isotópico seria de 112 e 134 dias respectivamente.

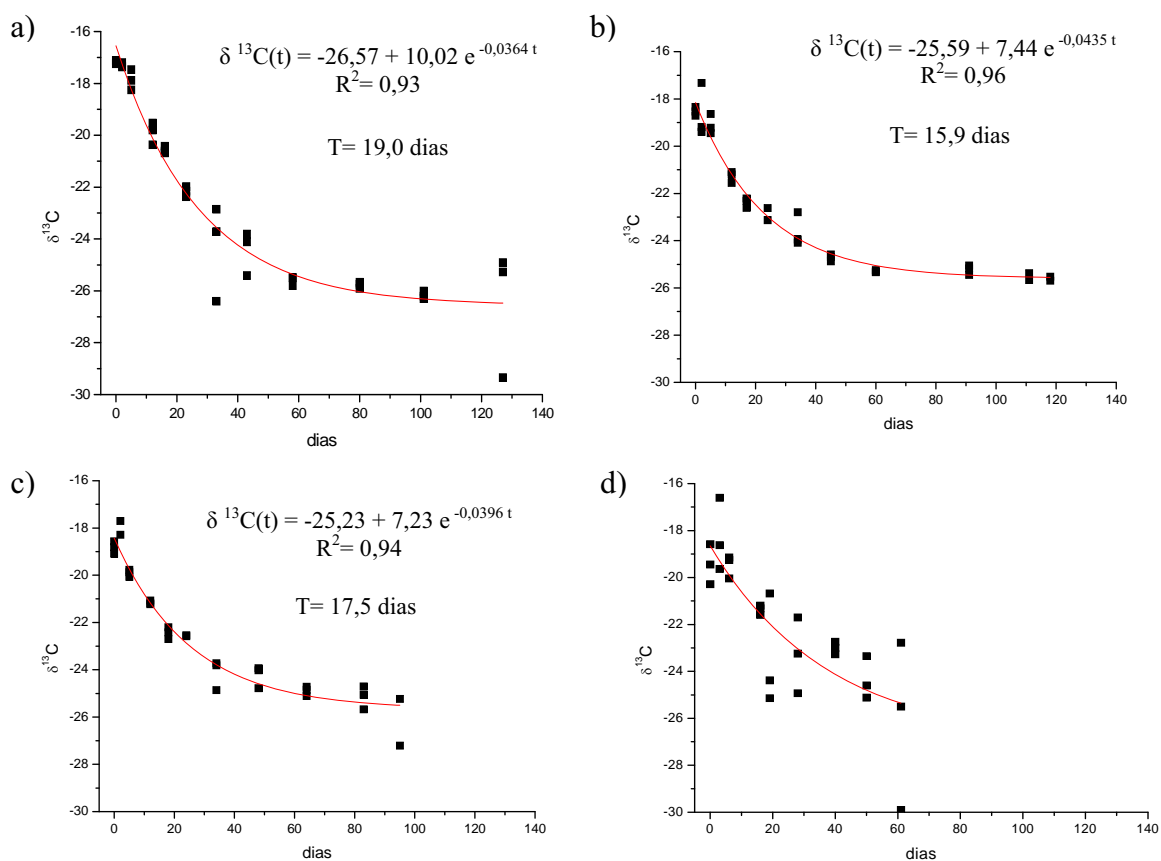


Figura 1: Representação exponencial do *turnover* dos isótopos estáveis do carbono e valores de meias-vidas em dias do músculo *Psoas Major*. a) substituição aos 21 dias, b) substituição aos 42 dias, c) substituição aos 63 dias, d) substituição aos 110 dias.

Os valores de meia vida encontrados para o *psoas major* foram 19,0; 15,9 e 17,5 dias para os tratamentos com substituição aos 21, 42 e 63 dias de idade, respectivamente.

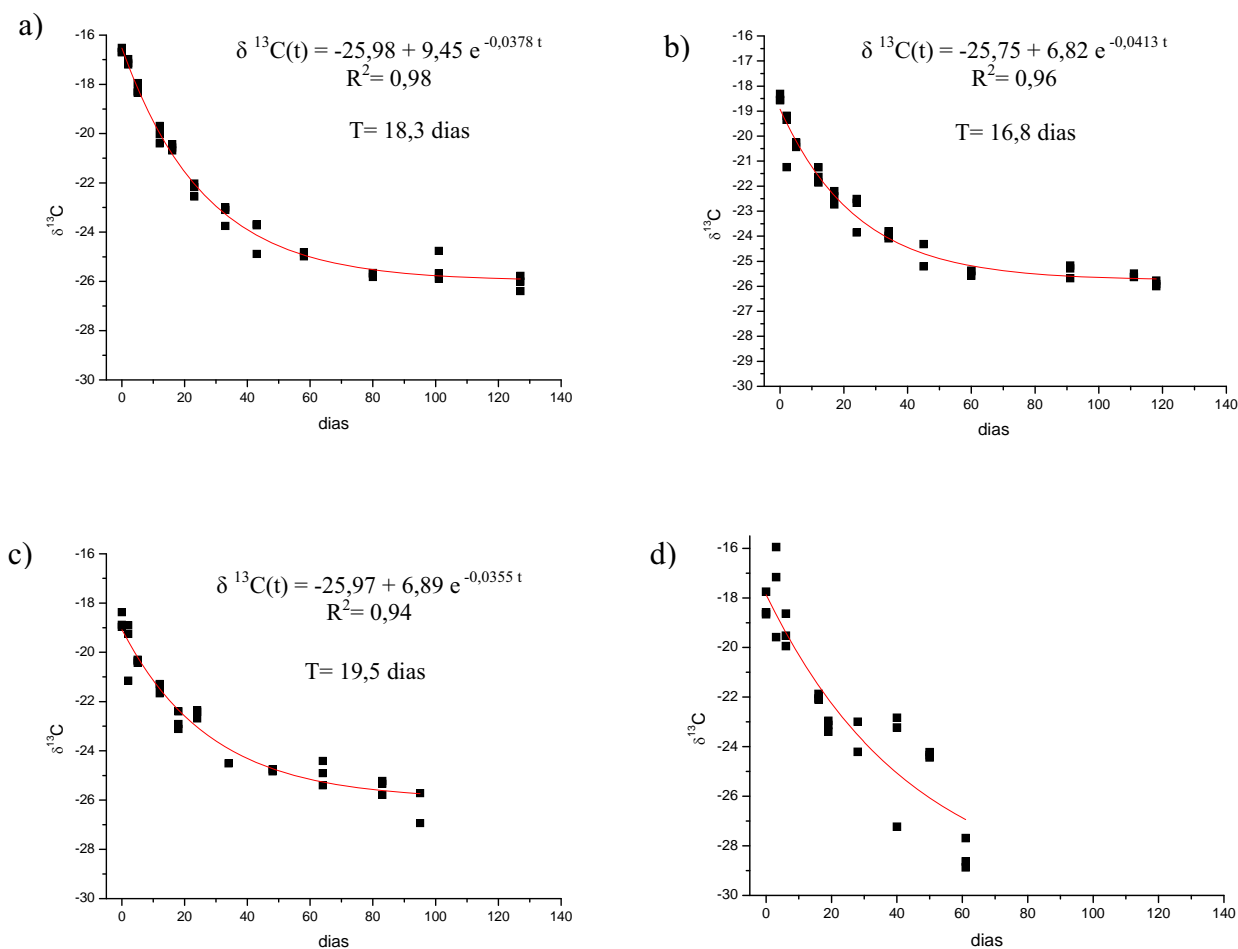


Figura 2: Representação exponencial do *turnover* dos isótopos estáveis do carbono e valores de meias-vidas (T) em dias do músculo Masseter. a) substituição aos 21 dias, b) substituição aos 42 dias, c) substituição aos 63 dias, d) substituição aos 110 dias.

Os valores de meia vida encontrados para o masseter foram 18,3; 16,8; 19,5 dias para os tratamentos com substituição aos 21, 42 e 63 dias de idade, respectivamente.

A taxa de *turnover* do carbono muscular dos suínos submetidos aos tratamentos com substituição aos 21, 42 e 63 dias de idade tanto para o músculo *Psoas major* (contração rápida e metabolismo glicolítico) como o Masseter (contração lenta e metabolismo oxidativo) não variaram muito, mostrando o mesmo comportamento da assimilação da nova dieta, apesar de os músculos apresentarem características de fibras musculares diferentes. As fibras de metabolismo glicolítico mobilizam energia principalmente por meio da glicogenólise, enquanto as fibras oxidativas obtêm energia por meio de várias reservas como os ácidos graxos livres, fosfocreatina e glicogênio. Porém observamos que nos tratamentos com

substituição aos 42 dias tanto para o músculo *psaos major* quanto o masseter a meia vida do carbono foi mais rápida.

Isso pode ser resultante da menor taxa de crescimento dos animais durante as duas primeiras semanas pós-desmame, devido ao estresse sofrido pelo desmame.

Em estudo realizado por Fry & Arnold (1982) sobre a taxa de *turnover* de ^{13}C em camarões, os autores observaram que o *turnover* do carbono estrutural dessa espécie foi rigorosamente devido ao aumento em peso durante o crescimento, e não à decorrência do tempo. A maior taxa de reposição foi obtida depois de aumentado em quatro vezes o peso inicial, quando o valor de $\delta^{13}\text{C}$ do camarão foi mais enriquecido, aproximadamente em 1‰, com a nova dieta. Para os animais adultos, com baixa taxa de crescimento, o *turnover* foi relacionado mais com o metabolismo de manutenção que com o crescimento. Um rápido ou lento *turnover* pode ser característico do crescimento animal (interespecífico), ou dos tecidos individuais (intraespecífico).

Os valores de meia vida dos músculos encontrados neste estudo foram menores do que aqueles verificados por Caldara et al. (2008) que observaram valores de meia vida de 51,4 dias para o masseter e 31,5 dias para o *psaos major* para as dietas sem inclusão de glutamina, porém quando foi incluído 1 % de glutamina o *turnover* dos músculos foi mais rápido, sendo 21,7 dias para o masseter e 20,3 para o *psaos major*.

Cruz et al. (2005) trabalharam com frangos de um a 30 dias de idade e encontraram valores de meia vida do músculo peitoral de 5 a 8 dias, no entanto Bahar et al. (2009) trabalhando com dois tipos de músculos bovinos (*longissimus dorsi* e *psaos major*) encontraram meia vida longas variando de 133 a 157 dias. Enquanto Harrison et al. (2011) , observou valores de meia vida variando de 76 a 92 dias no músculo *longissimus dorsi* de cordeiros.

Desta forma, frangos apresentam taxa de *turnover* mais rápida, suínos apresentam taxas de *turnover* intermediária e ovinos e bovinos apresentam taxas de *turnover* mais lento, confirmando a afirmação de Kennedy & Krouse, (1990) que as taxas de *turnover* podem variar entre as diferentes espécies, tecidos, frações bioquímicas e são influenciadas pelo estado fisiológico do animal.

Tabela 3: Valores isotópicos finais ($\delta^{13}\text{C}$) das dietas e tecidos analisados de suínos.

Idade de substituição das dietas	dietas	<i>psoas major</i>	masseter
21	-28,50±0,91	-26,57±3,13	-25,98±0,26
42	-28,50±0,34	-25,59±0,12	-25,75±0,16
63	-28,50±0,20	-25,23±1,40	-25,97±0,95

Tabela 4: Fator de fracionamento isotópico (Δ) entre tecido e dieta dos suínos submetidos a diferentes dietas experimentais

Idade de substituição das dietas	$\Delta^{13}\text{C}$	
	<i>psoas major</i>	masseter
21	1,46	2,05
42	2,88	2,72
63	3,42	2,53

Os fatores de fracionamento isotópico, encontrados na tabela 4, demonstram que as relações isotópicas do tecido podem variar dentro de um indivíduo alimentado com uma dieta constante, pois os isótopos fracionam de maneira diferente entre diferentes tecidos e a dieta (Tieszen et al., 1983). O *psoas major* e o masseter dos suínos submetidos ao tratamento com substituição aos 21 dias de idades apresentaram menores fracionamentos isotópicos quando comparado ao tratamento com substituição aos 42 e 63 dias de idade.

Conclusão

O músculo refletiu mudanças na dieta de suínos por um período mais longo, demorando em incorporar o novo valor da dieta consumida.

Referencias

- BAHAR, B.; MONOLEY, A. P.; MONAHAN, F.J.; HARRISON, S.M.; ZAZZO, A.; SCRIMGEOUR, C.M.; et al. Turnover of carbon, nitrogen, and sulfur in bovine longissimus dorsi and psoas major muscles: Implications for isotopic authentication of meat. *Journal of Animal Science*, v.87, p.905-913, 2009.
- BRICOUT, J.; KOZIET, J. Control of the authenticity of orange juice by isotopic analysis. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v.35, p.758-760, 1987.
- BROOKES, S.T.; BARRIE, A.; DAVIES, J.E. A rapid $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ test for determination of corn-syrups in honey. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, v.74, p.627-629, 1991.
- CALDARA, F. R.; DUCATTI, C.; BERTO, D. A.; DENADAI, J. C.; SILVA, E. T. da; Garcia, R. G. Efeito da glutamina sobre o *turnover* do carbono de músculos e vísceras de leitões desmamados. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, v. 30, p. 291-297, 2008.
- CRUZ, V.C.; DUCATTI, C.; PEZZATO, A.; PINHEIRO, D.; SARTORI, J.R.; GONÇALVES, J.C; et al. Influence of diet on assimilation and turnover of ^{13}C in the tissues of broiler chickens. *British Poultry Science*, v. 83, p.1376-1381, 2005.
- DeNIRO, M.J.; EPSTEIN, S. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta*; v.42, p.495-506, 1978.
- DeNIRO, M.J. Stable isotopes and archaeology. *American Scientist*, v.75, p.182-191, 1987.
- DUCATTI, C.; CARRIJO, A.S.; PEZZATO, A.C.; MANCERA, P.F.A. Modelo teórico e experimental do reciclagem do carbono-13 em tecidos de mamíferos e aves. *Scientia Agrícola*, v.59, n.1, p.29-33, 2002.
- FRY, B.; ARNOLD, C. Rapid $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ turnover during growth of brown shrimp (*Penaeus aztecus*). *Oecologia*, v.54, p.200-204, 1982.
- 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* 1998; 119A (3): 725-37.
- GONZÁLEZ-MARTIN I.; GONZÁLEZ-PÉREZ C.; HERNÁNDEZ-MÉNDEZ J.; MARQUÉS-MACIAS E.; SANZ POVEDA F. Use of isotope analysis to characterize meat from Iberian-breed swine. *Meat Science*, v.52, p.437-441, 1999.

- GUO, B. L.; WEI, Y.M.; PAN, J. R.; & LI, Y. Stable C and N isotope ratio analysis for regional geographical traceability of cattle in China. **Food Chemistry**, v.118, p.915-920, 2010.
- HARRISON, S. M; MONAHAN, F.J.; MONOLEY, A. P.; KELLY, S. D.; CUFFE, F.; HOOGEWERFF, J.; et al. Intra- muscular and inter- muscular variation in carbon turnover of ovine muscles as recorded by stable isotope ratios. **Food Chemistry**, v.123, p. 203-209, 2010.
- HARRISON, S.M.;SCHIMIDT, O.; MONOLEY, A. P.; KELLY, S. D.; ROSSMANN, A.; SCHELLENBERG, A.; et al. Tissue turnover in ovine muscles and lipids as recored by multiple (H, C, O, S). Stable isotope ratios. **Food Chemistry**, v. 214, p. 291-297, 2011.
- KELLY, S.; PARKER, I.; SHARMAN, M.; DENNIS, J.; GOODALL, I. Assessing the authenticity of single seed vegetable oils using fatty acid stable carbon isotope ratios ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$). **Food Chemistry**, v.59, n.2, p.181-186, 1997.
- KENNEDY ,B.V.; KROUSE, H.R.; Isotope fractionation by plants and animals: implications for nutrition research. **Canadian Journal Physiology and Pharmacology**, v.68, p. 960-972, 1990.
- KOZIET, J.; ROSSMANN, A.; MARTIN, G.J.; ASHURST, P.R. Determination of carbon-13 content of sugars of fruit and vegetable juices. **Analytica Chimica Acta**, v.271, p.31-38, 1993.
- MANCA, G.; CAMIN, F.; COLORU, G.; Del CARO, A.; DETENTORI, D.; FRANCO, M. A.; VERSINI, G. Characterization of the geographical origin of Pecorino Sardo cheese by casein stable isotope ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) ratios and free amino acid ratios. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.49, p.1404-1409, 2001.
- MARTIN, G.J.; GUILLOU, C.; MARTIN, M.L.; CABANIS, M.T.; TEP, X.; AERNY, J. Natural factors of isotope fractionation and the characterization of wines. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.36, p.316-322, 1988.
- MICROCAL SOFTWARE INC. Microcal Software Origin® 6.0 Professional. Origin data analysis and technical graphics. Northampton (MS): Microcal Software Inc.; 1999.
- NEWSOME, S. D., C. MARTINEZ DEL RIO, S. BEARHOP, AND D. L. PHILLIPS. A niche for isotopic ecology. **Frontiers in. Ecology and the Environment** 8:429-436, 2007.
- PEARSON, D.F.; LEVEY, D.J.; GREENBERG, C.H, MARTINEZ DEL-RIO, C. Effects of elemental composition on the icorporation of dietary nitrogen and carbon isotopic signatures in an omnivorous songbird. **Oecologia**, v.135, p.516-523, 2003.
- REEDS, P.J. Regulation of Protein Turnover. In: CAMPION, D.R.; HAUSMANN, G.J.; MARTIN, R.J. **Animal growth regulation**, cap.9, p.183-184, 1989.

- 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, 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. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**; 2005; p.186.
- ROSSMANN, A.; HABERHAUER, G.; HOLZL, S.; HORN, P.; PICHLMAYER, F.; VOERKELIUS, S. The potential of multielement stable isotope analysis for regional origin assignment of butter. **European Food Research & Technology**, v.211, p.32-40, 2000.
- SCHMIDT, O.; QUILTER, J. M.; BAHAR, B.; MALONEY, A. P.; SCRIMGEOUR, C.M.; Inferring the origin and dietary history of beef from C, N and S stable isotope ratio analysis. **Food Chemistry**, v. 91, p.545-549, 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, p.32-37, 1983.
- WHITE, J.W.; WINTERS, K.; MARTIN, P.; ROSSMANN, A. Stable carbon isotope ratio analysis of honey: validation of internal standard procedure for worldwide application. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v.81, p.610-619, 1998.

IMPLICAÇÕES

O mercado importador tem se mostrado cada vez mais exigente em relação à rastreabilidade de subprodutos de origem animal na alimentação de frangos e suínos, dessa forma, a técnica dos isótopos estáveis apresenta potencial aplicação prática para detecção destes subprodutos por meio da análise dos tecidos de suínos e aves. Porém é necessário o conhecimento da taxa de renovação dos tecidos (*turnover*) para posteriores estudos de rastreabilidade, principalmente na área de suinocultura em que a literatura sobre o assunto é escassa.

Com base nos tecidos avaliados podemos concluir que o pâncreas apresentou um rápido *turnover*, os músculos *psaos major* e masseter apresentaram troca lenta desta forma, maiores valores de meia vida para o carbono enquanto o sangue e a tibia com medula apresentaram valores intermediários ao pâncreas e o músculo.

O tempo de avaliação estabelecida no tratamento que teve a substituição da dieta C₄ pela C₃ com 110 dias, não foi suficiente para atingir o patamar isotópico, o período experimental foi curto, porém os dias de avaliação se encontram de acordo com a realidade da suinocultura em que os animais são abatidos com 150 dias de idade aproximadamente. Porém para alcançar o patamar de equilíbrio isotópico para o tratamento com substituição aos 110 dias seria necessário aumentar o período experimental.

Deve-se destacar que é importante a mensuração das variáveis de desempenho para que possam ser relacionadas com as taxas de crescimento e *turnover*.

A maioria dos estudos relacionados ao *turnover* é realizada com animais adultos, entretanto há um crescente número de trabalhos sendo realizados com a utilização de animais em crescimento. A utilização de animais em crescimento pode influenciar na constante de *turnover* (k) porque a expressão utilizada para o cálculo não considera o fator de crescimento, desta forma não fica claro se a mudança da dieta refletida na composição isotópica dos tecidos

está sendo atribuído ao estágio de desenvolvimento e ao crescimento do novo tecido ou ao *turnover* metabólico existente nos tecidos.

Desta forma seria importante para estudos futuros a aplicação da incorporação do crescimento na taxa de *turnover* e além dessa variável a pesagem dos órgãos dos animais seria uma ferramenta importante para avaliar o crescimento de cada órgão de acordo com o crescimento desses animais. A avaliação do osso sem a medula e a amostras de colágenos dos ossos seriam interesses para novos estudos.