

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

***TURNOVER ISOTÓPICO EM LEITE, SANGUE E FEZES DE VACAS
LEITEIRAS ALIMENTADAS COM CAMA DE AVIÁRIO***

LUCIANE DO CARMO SERAPHIM

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração: Nutrição e Alimentação Animal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora.

Botucatu - SP

Agosto/2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

***TURNOVER ISOTÓPICO EM LEITE, SANGUE E FEZES DE VACAS
LEITEIRAS ALIMENTADAS COM CAMA DE AVIÁRIO***

LUCIANE DO CARMO SERAPHIM

Zootecnista

Orientador: Prof. Dr. Roberto de Oliveira Roça

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração: Nutrição e Alimentação Animal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora.

Botucatu - SP

Agosto/2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

S481t Seraphim, Luciane do Carmo, 1984-
Turnover isotópico em leite, sangue e fezes de vacas leiteiras alimentadas com cama de aviário / Luciane do Carmo Seraphim. - Botucatu: [s.n.], 2018
xi, 43 p.: grafs. color., tabs.

Tese (Doutorado)- Universidade Estadual Paulista Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2018

Orientador: Roberto de Oliveira Roça
Inclui bibliografia

1. Bovino de leite - Alimentação e rações. 2. Cama de galinha. 3. Carbono 13. 4. Isótopos estáveis. 5. Metabolismo animal. I. Roça, Roberto de Oliveira. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. III. Título.

Elaborada por Ana Lucia G. Kempinas - CRB-8:7310

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte"

BIOGRAFIA DA AUTORA

Luciane do Carmo Seraphim—nascida em 03 de maio de 1984, na cidade de Botucatu – SP, filha de Luiz Seraphim e Lucia do Carmo Sobrinho Seraphim, concluiu o ensino médio em 2001 na escola EE Dom Lúcio Antunes de Souza, na cidade de Botucatu – SP. Graduou-se em Zootecnia pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Campus de Botucatu-SP em Dezembro de 2011. Bolsista pelo CNPq em Iniciação Tecnológica e Industrial (ITI - A) no segundo semestre de 2011 auxiliando nas pesquisas desenvolvidas pelo Instituto de Zootecnia de Sertãozinho - SP, onde auxiliou nas linhas de pesquisa com ênfase na relação entre emissão de metano, comportamento ingestivo, desempenho e eficiência alimentar de bovino Nelore. Em Agosto de 2012, ingressou no curso de Mestrado em Zootecnia, sob orientação do Prof. Dr. Carlos Ducatti, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Campus de Botucatu-SP, onde foi bolsista pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), obtendo o título de Mestre em Novembro de 2014, na área de Nutrição e Produção Animal. Em Março de 2015, iniciou o curso de Doutorado em Zootecnia na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Botucatu, sob orientação do Prof. Dr. Carlos Ducatti e, devido ao seu falecimento, em Agosto de 2016 passou sob orientação do Prof. Dr. Roberto de Oliveira Roça até seu término. Durante o curso de doutorado, a autora foi bolsista pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) até o mês de Janeiro de 2016. A defesa da tese de doutorado realizou-se no dia 07 de Agosto de 2018.

DEDICO

Aos meus pais, por todo carinho, amor, incentivo e por serem minha rede de apoio.

Aos meus filhos, por me proporcionarem o amor incondicional e fazerem eu ser uma pessoa melhor a cada dia.

Ao meu esposo pelo seu amor, companheirismo e paciência em todas as horas.

Ao Prof. Dr. Carlos Ducatti

Não seria possível ter chegado até aqui se o Sr. não tivesse me apoiado e incentivado. No meio do caminho o Sr. se foi desse plano mas, acredito que de onde estiver continua nos orientando! Com toda certeza o Sr. deixou em nós seu amor pela ciência e o desejo de que nunca devemos deixar de acreditar em nossos sonhos!

“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.” Antoine de Saint-Exúpery

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por seu imenso amor e infinita misericórdia, por ter me concedido chegar até aqui.

Aos meus pais, Lucia e Luiz, agradeço infinitamente pelo apoio em todas as etapas de minha educação. Sempre me incentivando e apoiando. Obrigada pelo amor incondicional.

A meu querido esposo, Wellington, por ser tão importante na minha vida. Sempre a meu lado, me pondo para cima. Devido a seu companheirismo, amizade, paciência, compreensão, apoio, alegria e amor, este trabalho pôde ser concretizado. Obrigada por ter feito do meu sonho o nosso sonho!

Aos meus filhos, Lucas e Luiza, por serem a minha inspiração em querer ser melhor do que fui até hoje!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Roberto de Oliveira Roça, pela confiança em me aceitar como sua orientada, pelo apoio, por sempre estar disponível e prestativo.

Ao Prof. Dr. Carlos Ducatti (*in memoriam*), pelo apoio desde a nossa primeira conversa até última. Por sempre me apoiar e não ter soltado da minha mão em nenhum momento.

Aos funcionários/ amigos do Centro de Isótopos Estáveis: Evandro Tadeu da Silva, Cibele Regina de Souza Kruliski, Nádia dos Reis Carvalho e Mariana Sasso Andreasi pelo auxílio nas análises, apoio e amizade nesses anos.

À Dr. Juliana Célia Denadai, por toda paciência, disponibilidade, por me auxiliar com os dados e sempre responder meus questionamentos.

Ao Prof. Dr. Vladimir Eliodoro Costa por todo apoio, disponibilidade e incentivo.

Ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, e à Coordenação da Raiva dos Herbívoros e das Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis, pela autorização da execução do projeto através da Informação CRHE nº 79/2013, referente ao processo nº 21052.009187/2013-02.

À Bárbara Cristina da Silva Fernandes e a Natalia pela ajuda durante as pesagens.

À Adrielle Nayara Dias Ishizuka, Marco Antônio Gonzales de Carvalho, Matheus Betelli Piccolo, Ramon Argentini Rizzieri, Rodrigo da Silva Gennari e a todos os envolvidos durante as coletas do período experimental.

Aos meus amigos, Letícia Tomazini, Lucas Schimidt Dibbern, Natalia Santos Leal, Priscila de Santi e Vânia Fournou de Lima, pela amizade e companheirismo. Durante esses anos cada um de vocês foram importantes em vários momentos da minha vida.

Aos amigos conquistados na pós-graduação: Ana Cristina Stradiotti, Bárbara Cristina da Silva Fernandes, Michelle Novaes Ravelli, Vanessa Cristina Pelícia.

Ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia pela oportunidade.

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	1
CAPÍTULO 1	3
CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	3
1. Introdução	4
2. Revisão de Literatura	4
2.1. Encefalopatia Espongiforme Bovina	4
2.2. Isótopos Estáveis Ambientais	6
2.3. <i>Turnover</i> isotópico	8
3. Referências bibliográficas	11
CAPÍTULO 2	16
<i>Turnover</i> isotópico em leite, sangue e fezes de vacas leiteiras alimentadas com cama de aviário.....	17
Resumo.....	17
Abstract	18
INTRODUÇÃO	19
MATERIAL E MÉTODOS	20
RESULTADO E DISCUSSÃO	24
CONCLUSÕES	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36
CAPÍTULO 3	40
IMPLICAÇÕES	41

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Composição percentual dos ingredientes (% matéria seca), composição química e valor isotópico médio (n=3) das dietas com desvio padrão.	21
Tabela 2. Ajuste exponencial, seus respectivos coeficientes de determinação (R^2) do leite e fezes dos animais nos 1° e 2° períodos experimentais em função o tempo.	25
Tabela 3. Ajuste exponencial, seus respectivos coeficientes de determinação (R^2) do leite e fezes dos animais no 2° período experimental em função o tempo.....	25
Tabela 4. Valores calculados de meia vida (T, dias), e do tempo necessário para a troca de 99% dos átomos de Carbono e Nitrogênio ($t_{(0,99)}$, dias) do leite e fezes nos 1° período experimental.	25
Tabela 5. Valores calculados de meia vida (T, dias), e do tempo necessário para a troca de 99% dos átomos de Carbono e Nitrogênio ($t_{(0,99)}$, dias) do leite e fezes nos 2° período experimental.	26
Tabela 6. Comparação das médias do $\delta^{13}\text{C}$ nas fezes, sangue e leite dos tratamentos Vegetal e Cama de aviário no 1° e 2° períodos.....	34
Tabela 7. Comparação das médias do $\delta^{15}\text{N}$ no leite dos tratamentos Vegetal e Cama de aviário no 1° e 2° períodos.....	34

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

- Figura 1. Curvas de *turnover* do isótopo estável de carbono em função do tempo no leite durante o 1º período (a) e 2º período (b), e do isótopo estável de nitrogênio durante o 1º período (c) e 2º período (d). 28
- Figura 2. Curvas de *turnover* do isótopo de estável de carbono em função do tempo no sangue durante o 1º período (a) e 2º período (b). 29
- Figura 3. Curvas de *turnover* do isótopo de estável de carbono em função do tempo nas fezes durante o 1º período (a) e 2º período (b). 30

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1.....	42
ANEXO 2.....	43

TURNOVER ISOTÓPICO EM LEITE, SANGUE E FEZES DE VACAS LEITEIRAS ALIMENTADAS COM CAMA DE AVIÁRIO

RESUMO GERAL: Por meio do projeto Temático nº2008/57411-4 foi desenvolvido o seguinte experimento: Foram utilizadas 12 vacas mestiças, com produção média de 6 litros/leite/dia, distribuídas em delineamento inteiramente casualizado com seis repetições e dois tratamentos avaliadas por 90 dias, dividido em 2 períodos. Os tratamentos foram: T1 – controle – dieta estritamente vegetal durante todo o período experimental; T2 – cama de aviário – que teve a inclusão inicial de cama de aviário na dieta durante o primeiro período experimental de 55 dias e depois dieta vegetal por 35 dias. As vacas foram ordenhadas 1 vez ao dia, e alimentadas, *ad libitum*, 2 vezes ao dia. Foram colhidas amostras de leite, sangue e fezes diariamente e analisadas com espectrômetro de massas de razão isotópica. A partir deste projeto inicial foram derivados mais projetos: 1) Rastreabilidade da cama de aviário por isótopos estáveis em bovinos leiteiros, 2) *Turnover* dos isótopos estáveis do carbono-13 e nitrogênio-15 no plasma sanguíneo e soro do leite de vacas alimentadas com cama de aviário e o presente projeto intitulado: *Turnover* isotópico em leite, sangue e fezes de vacas leiteiras alimentadas com cama de aviário, o qual teve como objetivo avaliar o *turnover* isotópico de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ no leite, sangue e fezes, ocasionados pela inclusão da cama de aviário na dieta de vacas leiteiras, a fim de determinar o tempo de incorporação do valor isotópico da dieta. Para mensurar o *turnover* de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ em determinado intervalo de tempo, foi utilizada a função exponencial de primeira ordem. Os dados isotópicos foram submetidos ao teste t-Student. Foi possível observar que o tempo experimental foi suficiente para que ocorresse o *turnover* total no leite e nas fezes para a incorporação de 99% dos átomos de carbono e de nitrogênio para o leite. O sangue não conseguiu atingir o patamar de equilíbrio nos períodos avaliados indicando ser um tecido para detecção de dietas de períodos mais longos. O resultado do teste de t Student ($p < 0,05$) foi semelhante ao encontrado pela análise dos isótopos estáveis mostrando que no primeiro período os valores isotópicos das fezes do T1 diferiram do T2, e para o leite não houve diferença entre os tratamentos. No segundo período, os valores isotópicos das fezes e do leite do T1 não diferiram do T2. Os valores isotópicos de $\delta^{15}\text{N}$ no leite para o 1º período diferiram entre o T1 e o T2. De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que o *turnover* isotópico do ^{13}C nas fezes e do ^{15}N no leite indicam

valores de meia vida de 1,4 dias quando houve a troca da dieta contendo cama de aviário para a somente vegetal.

PALAVRAS-CHAVE: cama de aviário, carbono-13, meia-vida, nitrogênio-15

CAPÍTULO 1
CONSIDERAÇÕES INICIAIS

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. Introdução

Atualmente, o maior produtor mundial de leite são os Estados Unidos, seguido pela Índia e China. O Brasil ocupa a 4^o posição contribuindo com 5,1% de todo o leite produzido no mundo (FAO, 2016). Em 2015, a produção brasileira de leite foi de 35 bilhões de litros e o principal estado produtor foi Minas Gerais com 9,14 bilhões de litros, seguido do Paraná, Rio Grande do Sul e Goiás (IBGE, 2015).

O consumo mundial de leite e seus derivados vêm aumentando e a busca por uma dieta adequada com alimentos saudáveis que contribuam na qualidade de vida tem gerado a crescente preocupação com a qualidade desses alimentos (SILVA; SOUZA, 2006). Esta tendência na mudança alimentar dos consumidores havendo interesse na carne de animais que não consumiram subprodutos de origem animal é um dos principais fatores que estimulam a busca por novos métodos que permitam rastrear produtos de origem animal (CRUZ et al., 2012).

Com isso, órgãos de fiscalização passaram a exigir dos fornecedores a garantia quanto à origem e a qualidade nos processos de produção de alimentos. A rastreabilidade vem para auxiliar com uma maior visibilidade as boas práticas aplicadas ao longo da cadeia produtiva, não garantindo por si só a qualidade dos alimentos sendo necessária adequação de metodologias complementares (MENDES, 2006).

A análise dos isótopos estáveis apresenta aplicação prática na nutrição e metabolismo animal, utilizando como marcadores naturais os isótopos de C, H, O, N e S permitindo rastrear a dieta à qual os animais foram submetidos (DUCATTI, 2007).

2. Revisão de Literatura

2.1. Encefalopatia Espongiforme Bovina

A Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB) é uma doença neurodegenerativa que afeta o sistema nervoso central dos bovinos e é conhecida popularmente como “mal da vaca louca”. Esta enfermidade é uma zoonose e tem como agente infeccioso o príon sendo de caráter transmissível, mas não contagioso. Foi descrita pela primeira vez em novembro de 1986 (ORTOLANI, 1999) e, desde então, tem gerado perdas de rebanho e criações de barreiras sanitárias causando grandes prejuízos econômicos (BRASIL, 2008). Humanos que consomem carne ou subprodutos de bovinos contaminados com o

príon podem desenvolver uma variante da doença de Creutzfeldt-Jakob (vDCJ) que acomete pessoas jovens (abaixo dos 30 anos) diferentemente da forma tradicional que afeta idosos acima de 60 anos (BRASIL, 2017)., assim como a EEB nos bovinos a DCJ leva a morte.

O príon é uma forma anormal de uma proteína de membrana de função desconhecida e sua forma normal está presente na maioria das membranas plasmáticas das células do sistema nervoso central (GOTELIPE, 2006), por isso os sinais clínicos apresentados são neurológicos. Analisando casos franceses, a média de idade de bovinos acometidos pela forma clássica de EEB foi de sete anos podendo variar de 3 a 15 anos, sendo significativamente menor do que em bovinos que apresentaram a forma atípica que foi de 12 anos com variação entre 7 e 19 anos (SALA et al., 2012).

A principal fonte de transmissão é pela ingestão de alimentos contendo proteína e gordura de origem animal (farinha de carne e ossos, etc). A dose para infectar o animal é baixa, menos que um grama é o suficiente, portanto, em concentrações baixas de farinha de carne e ossos, como na cama de aviário, pode haver o risco de contaminação (GONZÁLES, 2000).

Há duas formas da doença e estas diferem pela via de infecção: a forma clássica cuja via de infecção é por meio da ingestão do príon em alimento contaminado e, a outra forma que é a atípica, pela mutação espontânea da proteína normal sem haver relação com a ingestão de alimento contaminado. Os casos de EEB no mundo vem diminuindo devido aos controles sanitários da doença. Em 2015, na Grã-Bretanha (Reino Unido) foram relatados 2 casos de EEB sendo um deles atípico. No Brasil ocorreram somente 2 casos atípicos da doença nos anos de 2012 e 2014, respectivamente (OIE, 2016).

A Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) classifica o risco de um país para determinada doença analisando as medidas de prevenção sanitária, vigilância e mitigação do risco aplicada nos últimos 7 a 8 anos do país em questão utilizando uma escala em ordem crescente de grau de risco: insignificante, controlado e indeterminado (BRASIL, 2014). O Brasil é reconhecido pela OIE na categoria de risco insignificante para EEB (OIE, 2017).

A partir de 2000, a Comunidade Europeia, modificou suas normas sanitárias estabelecendo a identificação, registro e rotulagem da carne e produtos à base de carne bovina, CE n° 1760/2000, (PARLAMENTO EUROPEU, 2000); em 2001 algumas proteínas provenientes de mamíferos foram proibidas na alimentação de ruminantes, CE

n° 999/2001(PARLAMENTO EUROPEU, 2001) e no Brasil pela Instrução Normativa n° 08, com o intuito prevenir, controlar e erradicar determinadas encefalopatias espongiformes transmissíveis, sendo proibido o uso de cama de aviário na dieta de ruminantes (BRASIL, 2004). Em 2002, restringiu o uso de subprodutos de origem animal em rações de animais da mesma espécie, CE n° 1774/2002 (PARLAMENTO EUROPEU, 2002) e, em 2009 proibiu a alimentação de animais terrestres de uma determinada espécie com proteína animal derivada da mesma espécie, CE n° 1069/2009(PARLAMENTO EUROPEU, 2009).

No Brasil, a metodologia tomada como padrão oficial pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) para a detecção de proteína animal em rações de ruminantes é a microscopia. A microscopia é capaz de identificar farinha de carne e ossos, ossos cozidos no vapor, sangue, farinhas de penas e peixes a partir de 0,05% de inclusão e acima de 0,10% para farinha de vísceras de aves (SANCHES et al., 2006). Porém, este método não é realizado no produto final, mas somente nas rações o que permite adulterar a ração antes ou após as análises não havendo garantia de que a ração fornecida seja a mesma que foi analisada. Assim, a adequação de novas técnicas para a rastreabilidade de farinhas de origem animal na alimentação de ruminantes é essencial, visto que, o mercado externo exige a ausência destes produtos. A análise do isótopos estáveis já é utilizada na detecção de adulteração de mel e bebidas. A técnica baseia-se nos ingredientes assimilados e não apenas ingeridos obtendo informações de dietas consumidas a longo, médio e curto período, dependendo do tecido avaliado (DUCATTI, 2004). Portanto, a metodologia do isótopos estáveis pode ser aplicada a carne, leite, ovos, sangue, fezes, entre outros garantindo segurança ao consumidor.

2.2. Isótopos Estáveis Ambientais

Criado por Frederick Soddy o termo isótopo vem do grego *ISO* que quer dizer igual e *TOPOS* que significa lugar, indicando que são átomos que ocupam o mesmo lugar na tabela periódica e, o termo estáveis, se refere ao fato de não emitirem radiação (STRADIOTTI, 2013).

A definição de isótopos é que são átomos de um mesmo elemento químico, com números iguais de prótons e diferente número de nêutrons, assim apresentando massas atômicas distintas (SUN et al., 2011). Portanto, possuem mesmas propriedades químicas e diferentes propriedades físicas, funcionando como excelentes traçadores

naturais, pois a eletrosfera é igual para todos os isótopos, mascarando o conteúdo do núcleo e burlando o processo seletivo da membrana biológica vegetal e animal (DUCATTI et al., 2011). A identificação e quantificação de um isótopo de um mesmo elemento químico é possível pelos diferentes números de massas nucleares destes (GROOT, 2004).

Os isótopos estáveis de Carbono (C), Hidrogênio (H), Oxigênio (O) e Nitrogênio (N) ocorrem naturalmente na biosfera. Estes apresentam um isótopo estável mais abundante: ^{12}C , ^1H , ^{16}O e ^{14}N e um ou mais isótopos estáveis menos abundantes: ^{13}C , ^2D , ^{18}O , ^{17}O e ^{15}N , com proporção isotópica natural distintas, expressas em átomos % (PRESTON, 1992). Há ocorrência natural de dois isótopos estáveis de carbono (^{12}C e ^{13}C), com abundância natural em torno de 98,89 e 1,11 átomos %, respectivamente (KENNEDY; KROUSE, 1990), variando conforme a via fotossintética dos vegetais. Para o nitrogênio também há dois isótopos estáveis, ^{14}N e ^{15}N , cuja a abundâncias naturais são de 99,64 e 0,36 átomos %, respectivamente (DUCATTI, 2007).

Na comparação de composições isotópicas de carbono o padrão aceito universalmente é o PDB, *PeeDee Belemnite* e a razão isotópica entre $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ é obtida em relação a este padrão internacional (CRISS, 1999). O PDB é um carbonato de cálcio sólido da Era Cretácea Belemnitela, *Belemnitella americana*, da formação PeeDee da Carolina do Sul - EUA, empregado inicialmente como padrão por Craig (1957). Por ter sido detectada uma variação significativa neste padrão (material não homogêneo) utiliza-se o termo Vienna-Peedee Belemnite (V-PDB), sendo a nova referência calibrada laboratorialmente próxima da original. No Centro de Isótopos Estáveis Prof. Dr. Carlos Ducatti da UNESP/Botucatu-SP é utilizado um sub-padrão, uma rocha carbonatada (mármore) com alta pureza em calcita. A terminologia utilizada da razão isotópica em relação ao padrão internacional definido é a anotação expressa em delta per mil ($\delta\text{‰}$) (DUCATTI; SALATI; MATSUI, 1979). A determinação da razão isotópica entre isótopos pode ser realizada pelo espectrômetro de massas de razões isotópicas (IRMS) com precisão de 0,2‰, medindo a razão isotópica do elemento admito no sistema na forma gasosa (C-CO₂, N-N₂) em relação ao padrão internacional definido.

As plantas de ciclo fotossintético C₃ (leguminosas, hortaliças, frutíferas em geral, gramíneas temperadas, soja, arroz, trigo, cevada e algodão) fixam o CO₂ por meio do ciclo *Calvin-Benson* durante a assimilação fotossintética e apresentam valores médios de $\delta^{13}\text{C}$ de -28‰. Em contrapartida, as plantas de ciclo fotossintético C₄ fixam o HCO₃⁻

por meio do ciclo *Hatch-Slack* e apresentam valores médios de $\delta^{13}\text{C}$ de -13‰, são exemplos o milho, as gramíneas tropicais, o sorgo e a cana de açúcar (SUN et al., 2011). O sinal negativo significa que a planta apresenta menor concentração de ^{13}C que o padrão internacional PDB.

Levando em consideração que há uma diferença isotópica de 15‰ nos valores de $\delta^{13}\text{C}$ entre plantas de ciclo fotossintético C_3 e C_4 , pode-se caracterizar a dieta de animais por meio da análise dos isótopos estáveis de carbono nos tecidos (DUCATTI, 2004). Como algumas plantas são a base da alimentação de animais, a *impressão digital* isotópica destas fontes será refletida nos tecidos após certo tempo de metabolismo (DeNIRO; EPSTEIN, 1978; GANNES; DEL-RIO; KOCH, 1998).

Os isótopos estáveis de nitrogênio apresentam como padrão internacional o nitrogênio do ar atmosférico, sendo considerado uma mistura homogênea na superfície terrestre. Da mesma forma que no $\delta^{13}\text{C}$, os valores isotópicos de $\delta^{15}\text{N}$ são expressos em ‰ da razão isotópica do $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ do produto em relação ao padrão internacional. A razão isotópica de nitrogênio nas plantas não depende do ciclo fotossintético como no carbono, mas do modo de fixação deste nitrogênio. Existem duas formas de fixação de nitrogênio pelas plantas, leguminosas que possuem bactérias fixadoras de nitrogênio fixando-o do ar, enquanto as demais fixam por meio da incorporação de compostos nitrogenados do solo.

A maioria das leguminosas realizam simbiose com micorrizas e isto reflete em uma variação no valor de $\delta^{15}\text{N}$ ao redor de uma unidade sendo próximo ao padrão ($\delta^{15}\text{N} = 0,0 \pm 1,0\text{‰}$) (HANDLEY; RAVEN, 1992; WERNER; SCHIMIDT, 2002). O ^{15}N de plantas que não fixam nitrogênio atmosférico dependem da abundância isotópica do solo e da variação causada pela adubação (CHOI et al., 2002). Quando absorvido de matéria orgânica decomposta, o valor de ^{15}N fica ao redor de 5‰ e quando utilizado esterco como fertilizante seu valor chega em torno de 10‰ (SHIBUYA et al., 2006). Solos com baixa matéria orgânica, secos e arenosos ou fertilizados com adubos industriais apresentam valores negativos de ^{15}N . A fonte de nitrogênio utilizada pela indústria na fabricação de fertilizantes nitrogenados é o nitrogênio atmosférico por isso, estes apresentam ^{15}N próximo de 0‰ (YONEYAMA, 1996).

2.3. Turnover isotópico

O estado de equilíbrio dinâmico no interior das células, na qual ocorre a biossíntese e degradação constante é chamado de taxa de renovação celular ou taxa de

turnover. Com essa renovação de elementos químicos há também a renovação de seus isótopos nos tecidos.

Assim, todos os metabólicos orgânicos ou inorgânicos estão sujeitos ao *turnover* (HETENYI; PEREZ; VRANIC, 1983). A renovação tecidual pode ocorrer por dois modos: pela síntese de degradação de tecidos adultos e/ou pelo crescimento do tecido em formação (diluição isotópica) (CARRIJO; DUCATTI, 2007).

Quando os tecidos são metabolicamente ativos, como o fígado e o plasma sanguíneo, apresentam um *turnover* isotópico mais rápido, representando dietas recentes (dias). Nos tecidos de metabolismo intermediário, como o músculo, representará dietas de semanas a meses e para tecidos lentos, como dente, refletirá uma dieta de anos (TIESZEN et al., 1983; WALKER et al., 1999; ALVES-STANLEY; WORTHY, 2009).

Quando utilizadas dietas com valores isotópicos distintos pode ser mensurado o *turnover* dos tecidos corporais (GANNES, DEL-RIO; KOCH; 1998). Após ser mudada a dieta, a alteração da composição isotópica do tecido depende da velocidade desta taxa de troca dos constituintes substituídos (TIESZEN et al., 1983).

A rastreabilidade por meio da análise das razões isotópicas de carbono e nitrogênio no leite e urina de vacas sob diferentes regimes alimentares demonstram valores estáveis de $\delta^{13}\text{C}$ após 10 dias da mudança de dieta C_4/C_3 para C_3 e quando a mudança de dieta foi de C_3 para C_4/C_3 os valores $\delta^{13}\text{C}$ se estabilizam em 6 dias (KNOBBE et al., 2006).

O tipo de componentes corporais a ser analisado influencia o *turnover*, como demonstra a análise de fezes e sangue de ovelhas alimentadas com plantas C_3 – feno de alfafa e/ou C_4 silagem de milho. A fezes refletem dietas recentes e o sangue pode indicar dietas anteriores (MARTINS, et al., 2012).

Em busca de um indicador para autenticação de leite orgânico na Alemanha, Molkentin (2009) analisou os isótopos estáveis de carbono e diferenciou o leite orgânico do convencional pois, a base da dieta os animais produtores de leite orgânico é do ciclo fotossintético C_3 e no inverno é fornecido milho (C_4) sendo isto que possibilitou a diferenciação.

Analisando sistemas de produção de bovinos de corte por meio da análise dos isótopos estáveis, esta conseguiu diferenciar animais advindos de confinamento, pasto e sistema superprecoce pela diferença no valor $\delta^{13}\text{C}$ no sangue (VIEIRA JÚNIOR, 2013).

Lourenço et al. (1984) verificaram que os valores de $\delta^{13}\text{C}$ encontrados nas fezes e no leite modificaram-se rapidamente nos três primeiros dias após a substituição da

silagem de milho (C₄) pelo feno de soja perene (C₃) na alimentação das vacas enquanto no sangue a variabilidade foi pequena. Para avaliar as alterações isotópicas de carbono e nitrogênio no soro sanguíneo, Silva et al. (2012) forneceram a búfalos da raça Murrah uma dieta estritamente vegetal, encontrando um aumento nos valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ do soro sanguíneo após substituição da dieta inicial por outra contendo farinha de carne e ossos bovinos como fonte proteica.

Após alternar a alimentação de vacas leiteiras entre dietas compostas por feno de alfafa e cevada (C₃) para outra composta de milho (C₄), Boutton et al. (1988) obtiveram maior enriquecimento em ^{13}C no leite total das vacas alimentadas com a dieta C₄ em relação ao das vacas alimentadas com dieta C₃. A composição isotópica do leite aproximou-se da composição isotópica da dieta em apenas quatro dias após a troca, indicando rápida transferência do carbono dietético para o leite. No entanto os valores de $\delta^{13}\text{C}$ do leite empobreceram em relação às dietas. Os resultados encontrados demonstram que a contribuição dos nutrientes armazenados previamente no corpo animal é desprezível na formação do leite em vacas no fim da lactação (193 a 333 dias de lactação).

Scampicchio et al. (2012) conseguiram discriminar leites produzidos em diferentes regiões e tipos de processamento, pela análise de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ da proteína, caseína e gordura do leite, enquanto Bontempo et al. (2012), combinando as razões dos isótopos de C, H, O e N, encontraram um bom nível de diferenciação de produtos oriundos de dois pastos diferentes em dois locais montanhosos distintos, indicando que esses isótopos estáveis no leite e no queijo estão ligados ao local, tipo de vegetação e ambiente.

Produtos de origem animal como ovo, leite e também fezes não são considerados tecidos por isso, não é possível mensurar a taxa de renovação celular (*turnover*), porém o estudo nestes componentes corporais indica a taxa de renovação de nutrientes para sua formação (DENADAI et al., 2006).

Para utilizar a análise dos isótopos estáveis na rastreabilidade de cama de aviário na dieta de ruminantes o tecido escolhido deve refletir a dieta precedente com a finalidade de detectar sinais de assimilação isotópica do ingrediente a ser rastreado, observando se a taxa de *turnover* do tecido é lento ou rápido dependendo de qual momento se quer detectar a inclusão na dieta (mais recente ou mais antiga) o ingrediente não permitido.

O Capítulo 2 intitulado “**Turnover isotópico em leite, sangue e fezes de vacas leiteiras alimentadas com cama de aviário**” está com redação provisória de acordo com as normas para publicação no *International Dairy Journal*.

3. Referências Bibliográficas

ALVES-STANLEY, C.D.; WORTHY, G.A.J. Carbon and nitrogen stable isotope turnover rates and diet–tissue discrimination in Florida manatees (*Trichechus manatus latirostris*). **The Journal of Experimental Biology**, v.212, p.2349-2355, 2009.

BONTEMPO, L; LOMBARDI, G.; PAOLETTI, R.; ZILLER, L; CAMIN, F. H, C, N and O stable isotope characteristics of alpine forage, milk and cheese. **International Dairy Journal**, v. 23, n. 2, p. 99-104, 2012.

BOUTTON, T. W.; TYRRELL, H. F.; PATTERSON, B. W.; VARGA, G. A.; KLEIN, P. D. Carbon kinetics of milk formation in holstein cows in late lactation. **Journal of Animal Science**, v. 66, n. 10, p. 2636-2645, 1988.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. **Cartilha: Sistema Brasileiro de Prevenção e Vigilância de Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB)**. Abril, 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Sislegis, versão 1.0**. Instrução Normativa nº 08 de 26 de março de 2004. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/legislacao/sislegis>>, Acesso em: 03 fev. 2017.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Doença de Creutzfeldt Jakob, 2017**. Disponível em <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/647-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/doenca-de-creutzfeldt-jakob-dcj/11210-descricao-da-doenca>> Acesso em: 05 dez. 2017.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de defesa agropecuária Brasília 2008, **Cartilha Técnica Encefalopatia Espongiforme Bovina – EEB**. MAPA (ministério da agricultura e abastecimento) doença da vaca louca. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/arquivos-das-publicacoes-de-saude-animal/cartilha-tecnica-eeb-2008.pdf/view>> Acesso em: 22 jan. 2017.

CARRIJO, A. S.; DUCATTI, C. Utilização de isótopos estáveis do carbono para a rastreabilidade de rações. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2007, Santos. **Anais...** Campinas: FACTA, 2007. p. 289-307.

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

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.

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

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.

DUCATTI, C. Aplicação dos Isótopos Estáveis em Aquicultura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, suplemento especial, p.01-10, 2007.

DUCATTI, C. Isótopos Estáveis Ambientais. [Apostila] 2004. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004, 184p.

DUCATTI, C.; MARTINS, C.L.; ARRIGONE, M.B.; MARTINS, M.B.; VIEIRA JÚNIOR, L.C.; DENADAI, J.C. Utilização de Isótopos Estáveis em Ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, suplemento especial, p.68-75, 2011.

DUCATTI, C.; SALATI, E.; MATSUI, E. Método de análise da ração $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ em matéria orgânica e das razões $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ em carbonatos. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 51, n. 2, p. 275-286, 1979.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2016. **FAOSTAT**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL>>. Acesso em: 03/04/2018.

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

GONZÁLES, Hector E. “**Encefalopatia Espongiforme Bovina**” - MVZ-CORDOBA – 2000; 5:(1), 26-28p.

GOTELIPE, F. M. S. **Avaliação do sistema de vigilância da encefalopatia espongiforme bovina no Brasil**. 2006. 99f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

GROOT, P. A. **Handbook of stable isotope analytical techniques**. Amsterdam: Elsevier, 2004. v. 1, 1234 p.

HANDLEY, L.L.; RAVEN, J.A. The use of natural abundance of nitrogen isotopes in plant physiology and ecology. **Plant Cell and Environment**, v.15, p.965-985, 1992.

HETENYI, G. J. R.; PEREZ, G.; VRANIC, M. Turnover and precursor-product relationships of non-lipid metabolites. **Physiological Reviews**, v. 63, n. 2, p. 606-667, 1983.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – **Produção da Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro: IBGE, v. 43, 2015. 49p.

KENNEDY, B. V., AND H. R. KROUSE. 1990. Isotope fractionation by plants and animals: implications for nutrition research. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, 68:960–972.

KNOBBE, N.; VOGL, J.; PRITZKOW, W. et al. C and N stable isotope variation in urine and milk of cattle depending on the diet. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.386, p.104-108, 2006.

LOURENÇO, A. J.; MATSUI, E.; JÚNIOR, I. A. Variações de valores de ^{13}C nas fezes, leite e sangue de vacas em lactação mantidas em pastagens exclusivas de gramíneas ou consorciadas. **Boletim da Indústria Animal**, Nova Odessa, v.41 (Único), p.183-192, 1984.

MARTINS, M.B.; DUCATTI, C.; MARTINS, C.L.; DENADAI, J.C.; NATEL, A.S.; SOUZA-KRULISKI, C.R.; SARTORI, M.M.P. Stable isotopes for determining carbon turnover in sheep feces and blood. **Livestock Science**, v.149, p. 137-142, 2012.

MENDES, R.E. O impacto financeiro da rastreabilidade em sistemas de produção de bovinos no Estado de Santa Catarina, Brasil. **Ciência Rural**, v.36, p. 1524-1528, 2006.

MOLKENTIN, J. Authentication of Organic Milk Using $\delta^{13}\text{C}$ and the α -Linolenic Acid Content of Milk Fat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p.785-790, 2009.

OIE, World Organization for animal Health, 2016. **Number of cases of bovine spongiform encephalopathy (BSE) reported in the United Kingdom**. Disponível em: <<http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/bse-specific-data/number-of-cases-in-the-united-kingdom/>> Acesso em: 05 dez. 2017.

OIE, World Organization for animal Health, 2016. **Number of reported cases of bovine spongiform encephalopathy (BSE) in farmed cattle worldwide (excluding the United Kingdom)**. Disponível em: <<http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/bse-specific-data/number-of-reported-cases-worldwide-excluding-the-united-kingdom/>> Acesso em: 05 dez. 2017.

OIE, World Organization for animal Health, 2017. **OIE member countries official BSE risk status map on may 2017**. Disponível em: <<http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/official-disease-status/bse/en-bse-carte/>> Acesso em: 05 dez. 2017.

ORTOLANI, E. L.; Encefalite espongiforme bovina: considerações epizootiológicas, etiológicas e clínicas. **Revista de educação continuada do Crmv- SP**. São Paulo, v. 2, p. 3 – 8, 1999.

PRESTON, T. The measurement of stable isotope natural abundance variations. **Plant Cell and Environment**, v. 15, p. 1091-1097, 1992.

PARLAMENTO EUROPEU E CONSELHO. **EUR-Lex Acesso ao direito da União Europeia**. Regulamento (CE) nº 1760/2000 de 17 de Julho de 2000. Disponível em: <<http://eurlex.europa.eu/legalcontent/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32000R1760&from=PT>>. Acesso em: 14 mai. 2017.

PARLAMENTO EUROPEU E CONSELHO. **EUR-Lex Acesso ao direito da União Europeia**. Regulamento (CE) nº 999/2001 de 22 de Maio de 2001. Disponível em: <<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2001:147:0001:0040:PT:PDF>>. Acesso em: 25 fev. 2017.

PARLAMENTO EUROPEU E CONSELHO. **EUR-Lex Acesso ao direito da União Europeia**. Regulamento (CE) nº 1774/2002 de 03 de Outubro de 2002. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32002R1774&from=PT>>. Acesso em: 14 mai. 2017.

PARLAMENTO EUROPEU E CONSELHO. **EUR-Lex Acesso ao direito da União Europeia**. Regulamento (CE) nº 1069/2009 de 21 de Outubro de 2009. Disponível em: <<http://eurlex.europa.eu/legalcontent/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009R1069&qid=1425822763700&from=PT>>. Acesso em: 25 fev. 2017.

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.

SALA, C.; MORIGNAT, E.; OUSSAÏD, N.; GAY, E.; ABRIAL, D.; DUCROT, C.; CALAVAS, D. Individual factors associated with L- and H-type Bovine Spongiform Encephalopathy in France. **BMC Veterinary Research**, v.8, p.74-79, 2012.

SANCHES, R.L.; ALKMIN-FILHO, J.F.; SOUZA, S.V.C.; JUNQUEIRA, R.G. In house validation of a method for detection of animal meals in ruminant feeds by microscopy. **Food Control**, v.17, n.2, p.85-92, 2006.

SILVA, S.; SOUZA, C. **Avaliação microbiológica de queijo tipo minas frescal comercializado na cidade de Belém - Pará**. Belém: Laboratório Central do Estado do Pará; Centro Tecnológico da Universidade Federal do Pará, 2006.

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

SILVA, D. A. F.; BISCOLA, N. P.; SOUZA, R. M. F.; CAETANO, D. A.; DENADAI, J. C.; SARTORI, M. M. P.; SILVA, E. T.; DUCATTI, C.; MARTINS, C. L.; JORGE, A. M.; SANTOS, L. D.; FERREIRA JUNIOR, R. S.; BARRAVIERA, B. Carbon-13 and nitrogen-15 turnover in serum of bubaline donos of biological material for medical use. **Toxicon**, v. 60, n. 2, p. 117, 2012.

STRADIOTTI, A.C. **Técnica dos isótopos estáveis na incorporação de ^{13}C proveniente da L-metionina nos tecidos de frangos de corte em fases de crescimento.** 2013. 82f. Tese (Doutorado em nutrição e alimentação animal) – Faculdade e Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.

SUN Z. et al. Application of Stable Isotope Techniques in Studies of Carbon and Nitrogen Biogeochemical Cycles of Ecosystem. **Chinese Geographical Science**, v. 21, n. 2, p. 129-148, 2011.

VIEIRA JÚNIOR, L.C. **Diferenciação de sistemas de produção de bovinos de corte pela técnica da análise dos isótopos estáveis.** 2013. 68f. Tese (Doutorado em nutrição e alimentação animal) – Faculdade e Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.

WALKER, J.; POTTER, C.; MACK, S. The diets of modern and historic bottlenose dolphin populations reflect through stable isotopes. **Marine Mammal Science**, v.15, p.335-350, 1999.

WERNER, R.A.; SCHIMIDT, H.L. The in vivo nitrogen isotope discrimination among organic plant compounds. **Phytochemistry**, v.61, p.465-784 2002.

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

CAPÍTULO 2

***Turnover* isotópico em leite, sangue e fezes de vacas leiteiras alimentadas com cama de aviário**

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar o *turnover* isotópico de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ no leite, sangue e fezes, ocasionados pela inclusão da cama de aviário na dieta de vacas leiteiras, a fim de determinar o tempo de incorporação do valor isotópico da dieta. Foram utilizadas 12 vacas mestiças, distribuídas em delineamento inteiramente casualizado com seis repetições e dois tratamentos. Os tratamentos foram: T1 – dieta estritamente vegetal durante todo o período experimental; T2 – 50% cama de aviário e 50% vegetal durante o primeiro período experimental e depois dieta vegetal. Foram colhidas amostras diariamente e analisadas com espectrômetro de massas de razão isotópica. Para mensurar o *turnover* de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ em determinado intervalo de tempo, foi utilizada a função exponencial de primeira ordem. Os dados isotópicos foram submetidos ao teste t-Student. Os valores isotópicos das fezes e do leite atingiram o patamar de equilíbrio. O sangue não conseguiu atingir o patamar de equilíbrio nos períodos avaliados indicando ser um tecido para detecção de dietas de períodos mais longos. O resultado do teste de t-Student ($p < 0,05$) foi semelhante ao encontrado pela análise dos isótopos estáveis mostrando que no primeiro período os valores isotópicos das fezes do T1 diferiram do T2, e para o leite não houve diferença entre os tratamentos. No segundo período, os valores isotópicos das fezes e do leite do T1 não diferiram do T2. Os valores isotópicos de $\delta^{15}\text{N}$ no leite para o 1º período diferiram entre o T1 e o T2. De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que o *turnover* isotópico do ^{13}C nas fezes e do ^{15}N no leite indicam valores de meia vida de 1,4 dias quando houve a troca da dieta contendo cama de aviário para a somente vegetal.

Palavras-chave: cama de aviário, carbono-13, meia-vida, nitrogênio-15

Isotopic turnover in milk, blood and feces of dairy cows fed poultry litter

Abstract

The objective of this study was to evaluate the isotopic turnover of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ in milk, blood and feces, caused by the inclusion of poultry litter in the diet of dairy cows, in order to determine the incorporation time of the isotopic value of the diet. Were used twelve crossbred cows, distributed in a completely randomized design with six replicates and two treatments. The treatments were T1 - strictly vegetable diet throughout the experimental period; T2 – 50% poultry litter an 50% vegetable during the first experimental period and after vegetable diet. Samples were collected daily and analyzed with isotope ratio mass spectrometers. The first order exponential function was used to measure the turnover of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ in a certain period of time. Were submitted the isotopic data to Student's t-test. The isotopic values of feces and milk reached the plateau isotope. The blood was not able to reach the plateau isotope in the evaluated periods indicating to be a tissue for detection of diets of longer periods. The results of the Student's t-test ($p < 0.05$) were similar to those found by the stable isotope analysis, showing that in the first period, the isotopic values of the feces of the T1 differed from the T2, and for the milk there was no difference between the treatments. In the second period, the isotopic values of the feces and the milk of the T1 did not differ from the T2. The isotopic values of $\delta^{15}\text{N}$ in milk for the 1st period differed between T1 and T2. According to the results obtained, it can be concluded that the isotopic turnover of ^{13}C in feces and ^{15}N in milk indicate half-life values of 1.4 days when there was a change from diet containing poultry litter to vegetable only.

Key words: carbon-13, half-life, nitrogen-15, poultry litter.

INTRODUÇÃO

Na década de 1990, houve uma crise de encefalopatia espongiforme bovina (BSE) onde o uso de proteínas animais na alimentação de ruminantes foi proibido. Uma vez que o Brasil é o maior exportador de carne de aves do mundo e o quarto produtor de leite (FAO, 2016), além dos riscos para a saúde, a ocorrência de um caso clássico de doença da BSE pode levar a embargos na exportação de carne e seus derivados.

No Brasil, há evidências do uso de cama de aviário como alimento para ruminantes e a identificação dessas irregularidades é verificada quando os animais têm acesso à cama de aviário ou associados a outros alimentos, sendo confirmados pelos métodos de PCR oficiais (reação de polimerização na cadeia) ou microscopia eletrônica (COMISSÃO EUROPEIA, 2013). Quando não encontrados traços nos alimentos fornecidos gera dificuldade na autuação do proprietário, uma vez que alguns criadores fornecem a cama de aviário no período noturno, quando não há inspeção.

A análise dos isótopos estáveis pela espectrometria de massa de razão isotópica (IRMS) é uma das análises disponíveis para auxiliar na rastreabilidade de alimentos (CAMIN et al., 2017), sendo esta uma potencial ferramenta na autenticidade dos alimentos possibilitando a investigação de fontes alimentares isotopicamente distintas oferecidas aos animais (DENIRO;EPSTEIN, 1978).

Além de verificar a autenticidade das fontes alimentares e possíveis adulterações (GONZÁLES MARTIN et al., 1999; PIASENTIER et al., 2003; GUO et al., 2010; MOLKENTIN; GIESEMANN, 2010; MOLKENTIN, 2013; CHUNG et al., 2014) a análise também é utilizada para verificar a origem geográfica dos alimentos (KNOBBE et al., 2006), a diferenciação de alimentos orgânicos dos convencionais, tanto de origem vegetal quanto de origem animal (BATEMAN; KELLY, 2007; BAHAR et al., 2007; ROGERS, 2009; RAPISARDA et al., 2010; CAMIN et al., 2011), e a diferenciação do tipo de sistema produtivo (VIEIRA JUNIOR, 2013; PERDIGÃO, 2017).

Análise dos isótopos estáveis poderá servir como ferramenta complementar visando maior suporte ao programa de rastreabilidade onde metodologias analíticas convencionais não podem garantir resultados totalmente seguros (BAHAR et al., 2005).

Assim, o objetivo do estudo foi avaliar o *turnover* isotópico de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) no leite, sangue e fezes e do nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$) no leite ocasionados pela inclusão da cama

de aviário na dieta de vacas leiteiras, pela análise por IRMS, a fim de determinar o tempo de incorporação do valor isotópico da dieta contendo ou não cama de aviário.

MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos utilizados nesta pesquisa estão de acordo com os princípios éticos na experimentação animal e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (protocolo CEUA181/2016) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu/SP, sendo realizado de acordo com a Diretiva 63 (UNIÃO EUROPEIA, 2010). Houve também autorização pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) por meio da Coordenadoria da Raiva dos Herbívoros e das Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis, pela Informação CRHE n° 79/2013 através do processo n° 21052.009187/2013-02, devido à proibição do uso da cama de aviário na dieta de ruminantes. Desde o início até a sua conclusão, a pesquisa foi acompanhada por fiscais federais do MAPA sendo os animais do grupo que recebeu a cama de aviário em sua alimentação identificados com brincos individuais e eutanasiados ao final da pesquisa.

O experimento foi conduzido na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, no setor de Bubalinos da Fazenda Experimental Lageado da Unesp Campus de Botucatu/SP, em um período total de 105 dias, sendo os 15 primeiros de adaptação dos animais à nova dieta (silagem de milho), pois estes animais vinham de um pastejo de forragens.

Foram adquiridas 12 vacas mestiças da raça girolando, multíparas, com o mesmo período de lactação, com média de produção de leite e peso vivo semelhantes e de mesma origem para que o lote fosse o mais homogêneo possível. As vacas foram avaliadas pelo período de 90 dias distribuídas em delineamento inteiramente casualizado com seis repetições e dois tratamentos. O experimento foi dividido em dois períodos, sendo o primeiro período de 55 dias e o segundo de 35 dias, somando 90 dias de avaliação. No primeiro período experimental, os animais do T1 - controle - receberam a dieta exclusivamente vegetal, enquanto os do T2 - cama de aviário - foram alimentados com a dieta cama de aviário. Durante o segundo período, todos os animais do T1 e T2 receberam a dieta exclusivamente vegetal. As dietas foram formuladas para serem isoproteicas e isoenergéticas com base no NRC (2001) (tabela 1).

Diariamente as vacas foram ordenhadas manualmente às 06h00 e alimentadas às 08h00 e às 16h00, *ad libitum*, utilizando uma sobra de até 10% da quantidade total do alimento oferecido.

Tabela 1. Composição percentual dos ingredientes (% matéria seca), composição química e valor isotópico médio (n=3) das dietas com desvio padrão

Ingredientes (%)	Dietas	
	Cama de aviário	Vegetal
Silagem de milho	40	70
Silagem de grão úmido de milho	10	15
Farelo de soja	-	15
Cama de aviário	50	-
Total	100	100
Composição Nutricional		
Matéria Seca, %	56,7	42,7
NDT, %	67,5	67,8
PB, %	14,5	14,1
FDN, %	45,5	40,9
FDA, %	26,2	21,8
Valores Isotópicos Analisados* (‰)		
$\delta^{13}\text{C} \pm \text{dp}$	-17,4±0,4	-13,7±0,1
$\delta^{15}\text{N} \pm \text{dp}$	10,5±0,1	3,0±0,0

*Valores relativos aos padrões *PeeDeeBelemnite* (PDB) para o $\delta^{13}\text{C}$ e N_2 do ar atmosférico para o $\delta^{15}\text{N}$.

A colheita das amostras de leite foram realizadas individualmente em cada vaca após limpeza e higienização dos tetos. Foram esgotados todos os quartos e o leite foi homogeneizado. Após foram acondicionadas em tubos eppendorf e liofilizadas a vácuo à -55 °C e pressão de 50 µHg por 72 h (Liotop L108, Liobras, São Carlos, Brazil).

As amostras de sangue e fezes foram colhidas logo após a ordenha dos animais. Para a colheita de sangue total foi realizada a punção da veia coccígea com auxílio de agulha e tubos à vácuo contendo anticoagulante EDTA. O material foi acondicionado em tubos eppendorf e liofilizadas a vácuo à -55 °C e pressão de 50 µHg por 72 h (Liotop L108, Liobras, São Carlos, Brazil). As amostras de fezes foram colhidas diretamente da ampola retal dos animais, sendo secas em estufa de ventilação forçada (MA035, Marconi, Piracicaba, SP, Brasil) durante os dias 1, 2, 3, 5, 7, 10, 13, 17 e 21 do primeiro período experimental e, nos dias 1, 2, 3, 5, 7, 10, 13, 17 e 21 do segundo período experimental. Tanto as mostras de leite quanto as de sangue foram colhidas

durante os dias 1, 2, 3, 5, 7, 10, 13, 17, 21, 24, 28, 35, 42 e 55 do primeiro período experimental e, nos dias 1, 2, 3, 5, 7, 10, 13, 17, 21, 24, 28 e 35 do segundo período experimental.

Após a secagem, as amostras de fezes foram moídas em moinho criogênico em frequência de 700 rpm por 2 min à -196 °C (Geno/Grinder 2010, SpexSamplePrep LLC, Metuchen, EUA), utilizando o seguinte procedimento: as amostras foram transferidas para um frasco de polycarbonato e adicionadas duas esferas de aço inoxidável, onde foram devidamente identificadas, fechadas e imersas em nitrogênio líquido para congelamento por aproximadamente 3 minutos; após foram transferidas para o moinho a fim de obter um material homogêneo com granulometria menor que 60µm. Após a colheita e o processamento, todas as amostras foram armazenadas a -20 °C.

As amostras foram descongeladas em temperatura ambiente e pesadas em balança analítica (MX5, Mettler Toledo, Suíça), em cápsulas individuais de estanho, para a determinação da razão isotópica. Os intervalos de massas utilizados para o leite foram de 80 a 120 µg e 4000 a 45000µg para os elementos carbono e nitrogênio, respectivamente. Para as amostras de sangue e fezes foram utilizados os intervalos de massas de 70-90 e 100-120 µg para o elemento carbono, respectivamente.

Em seguida, as cápsulas foram inseridas através de amostrador automático no analisador elementar (Flash 2000 Organic EA; Thermo Fisher Scientific Inc., Bremen, Alemanha), onde em presença de oxigênio (O₂) e óxido de cobre (CuO), foram queimadas para obtenção de CO₂ e NO_x, sendo este último reduzido em N₂ na presença de cobre. Assim, os gases formados foram separados em coluna cromatográfica gasosa e analisados em um espectrômetro de massa de razão isotópica (IRMS) (DELTA-V; Advantage, Thermo Fisher Scientific Inc., Bremen, Alemanha), no Centro de Isótopos Estáveis Prof^o Dr. Carlos Ducatti do Instituto de Biociências da UNESP, campus de Botucatu/SP.

No IRMS as amostras na fase gasosa foram analisadas e obtidas a razão isotópica que consiste na relação entre a razão isotópica da amostra e do padrão. Sendo calculada pela equação 1 (PETERSON; FRY, 1987):

$$\delta X(\text{amostra, padrão}) = [(R_{\text{amostra}}/R_{\text{padrão}}) - 1] \times 1000 \quad (1)$$

Na qual:

- X: valor isotópico para o ¹³C ou ¹⁵N.

- $\delta X(\text{amostra, padrão})$ é o enriquecimento da razão isotópica do elemento de uma amostra em relação ao padrão internacional desse elemento, em partes per mil (‰).
- R_{amostra} é a razão isotópica do isótopo mais abundante em relação ao menos abundante ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) da amostra e do padrão, respectivamente.
- $R_{\text{padrão}}$ valor utilizado para o $^{13}\text{C} = 0,0112372$
- $R_{\text{padrão}}$ valor utilizado para o $^{15}\text{N} = 0,003676$

Os resultados das análises foram expressos na terminologia δ per mil (‰) utilizando os padrões internacionais PDB e N_2 do ar atmosférico para o ^{13}C e ^{15}N , respectivamente.

Para mensurar a velocidade de substituição do carbono e do nitrogênio (diluição isotópica) das dietas depois de determinado intervalo de tempo, foi empregada a função exponencial do tempo expressa pela equação 2 (DUCATTI et al., 2002), obtida utilizando-se o modelo de equações exponenciais de primeira ordem do *software OriginPro®8.6 Professional (Microcal Software, 2011)*:

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

Onde:

X = pode ser ^{13}C ou ^{15}N .

$\delta X(t)$ = enriquecimento isotópico do tecido em função tempo (t). Adimensional.

$\delta X(f)$ = enriquecimento isotópico do tecido no patamar de equilíbrio, ou condição final. Adimensional.

$\delta X(i)$ = 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 do carbono e do nitrogênio (a partir da substituição) e do acréscimo de compostos de carbono e nitrogênio, ambos contribuindo para o processo de diluição isotópica dos elementos.

Para determinar o tempo de troca e a porcentagem de átomos trocados dos elementos carbono e nitrogênio, foi utilizada a equação 3 (DUCATTI et al., 2002):

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

Onde:

t = tempo de troca do elemento (C ou N). 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).

O fracionamento isotópico foi expresso pela diferença entre $\delta\%$ do material e da dieta, conforme equação 4:

$$\Delta = \delta\% \text{ material} - \delta\% \text{ dieta} \quad (4)$$

Quando o valor do grande delta (Δ) for positivo indica que o material é mais rico em ¹³C ou ¹⁵N do que a dieta e se, for negativo indica que o material é mais pobre em ¹³C ou ¹⁵N do que a dieta (HOBSON; CLARK, 1992). 56

Na análise estatística, os dados foram submetidos ao teste de normalidade. Os elementos foram analisados utilizando o teste t Student para avaliar diferenças significativas nos δ^nX médios dos elementos entre os sistemas de produção com nível de significância de P<0,05. Para o segundo período foram utilizados os dados a partir do momento que a curva estava em patamar de equilíbrio.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O valor isotópico do $\delta^{13}C$ da dieta cama de aviário apresenta-se menor em comparação a dieta vegetal, pois seu valor isotópico se aproxima das plantas C₃, por apresentar em sua composição maravalha, enquanto o tratamento vegetal se assemelha às plantas C₄ por conter maior quantidade de silagem de milho (Tabela 1). O $\delta^{15}N$ apresentou-se mais enriquecido na dieta cama de aviário por esta conter excretas de frango ($\delta^{15}N=10,6\%$) (Tabela 1).

A equação exponencial de diluição isotópica, os coeficientes de determinação (r^2) do $\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$ no leite e nas fezes encontram-se nas Tabelas 2 e 3. A meia vida (T), e o tempo necessário para que ocorresse a troca de 99% dos átomos durante o período experimental estão expostos nas Tabelas 3 e 4. Pelas equações exponenciais de diluição isotópica (Tabelas 2 e 3) foram calculadas a meia vida do carbono nas fezes e no leite e do nitrogênio no leite (Tabelas 4 e 5). Estes valores indicaram a rapidez com que as fezes e o leite levaram para refletir a nova dieta. Salienta-se que somente o leite e as

fezes alcançaram o patamar de equilíbrio. O período experimental não foi o suficiente para que o sangue alcançasse este patamar.

Tabela 2. Ajuste exponencial, seus respectivos coeficientes de determinação (R^2) do leite e fezes dos animais no 1º período experimental em função o tempo

	Material	Equação	R²
Vegetal	Leite	$\delta^{15}\text{N} = 5,12 + 5,75e^{-0,506t}$	0,76
	Leite	$\delta^{13}\text{C} = -15,79 + 3,69e^{-0,282t}$	0,56
	Fezes	$\delta^{13}\text{C} = -15,45 + 8,18e^{-1,515t}$	0,74
Cama aviário	Leite	$\delta^{15}\text{N} = 12,46 - 3,76e^{-0,203t}$	0,69
	Leite	$\delta^{13}\text{C} = -14,65 + 3,09e^{-0,370t}$	0,59
	Fezes	$\delta^{13}\text{C} = -19,00 + 9,54e^{-0,63t}$	0,88

Tabela 3. Ajuste exponencial, seus respectivos coeficientes de determinação (R^2) do leite e fezes dos animais no 2º período experimental em função o tempo

	Material	Equação	R²
Cama aviário	Leite	$\delta^{15}\text{N} = 5,89 + 2,02e^{-0,473t}$	0,92
	Fezes	$\delta^{13}\text{C} = -14,80 - 7,70e^{-0,482t}$	0,90

Tabela 4. Valores calculados de meia vida (T, dias), e do tempo necessário para a troca de 99% dos átomos de ^{13}C e $^{15}\text{N}(t_{(0,99)})$, dias) do leite e fezes no 1º período experimental

	Material	T (dias)	t_(0,99) (dias)
Vegetal	Leite (^{15}N)	1,3	9,1
	Leite (^{13}C)	2,4	16,3
	Fezes (^{13}C)	0,46	3,0
Cama aviário	Leite (^{15}N)	3,4	22,6
	Leite (^{13}C)	1,8	12,4
	Fezes (^{13}C)	1,04	7,0

Tabela 5. Valores calculados de meia vida (T, dias), e do tempo necessário para a troca de 99% dos átomos de ^{13}C e ^{15}N ($t_{(0,99)}$, dias) do leite e fezes no 2º período experimental

	Material	T (dias)	t_(0,99) (dias)
Cama aviário	Leite (^{15}N)	1,4	9,7
	Fezes (^{13}C)	1,4	9,5

Os valores de meia vida indicam a velocidade com que os átomos de carbono e nitrogênio são trocados no leite e nas fezes, pois utiliza a constante da taxa de *turnover* (k) para os cálculos de meia vida (T) e troca de 99% dos átomos ($t_{(0,99)}$). Esses valores de T e $t_{(0,99)}$ fornecem a ideia de tempo no processo em que os isótopos estáveis de carbono e nitrogênio foram substituídos pelo ^{13}C ou ^{15}N proveniente da dieta.

Para a meia vida do ^{13}C no leite, o tratamento cama de aviário apresentou menor tempo de troca em comparação ao tratamento vegetal, enquanto que para o nitrogênio ocorreu o inverso (Tabela 4). O tempo de meia vida para o ^{15}N no 1º período do tratamento cama de aviário (T=3,4) foi maior do que no 2º período (T=1,4), com troca de 99% dos átomos de 22,6 e 9,7 dias, respectivamente (Tabelas 4 e 5). A incorporação e estabilização do valor isotópico da dieta no leite podem ocorrer entre 3 a 12 dias (BOUTTON et al., 1988; BRAUN et al., 2013). No segundo período, no tratamento cama de aviário, o leite (^{15}N) e as fezes (^{13}C) obtiveram resultados semelhantes, sendo o tempo de meia vida de 1,4 dias para ambos e com troca de 99% os átomos de 9,7 e 9,5 dias, respectivamente (Tabela 5).

A rastreabilidade por meio da análise das razões isotópicas de carbono e nitrogênio no leite e urina de vacas sob diferentes regimes alimentares demonstram valores estáveis de $\delta^{13}\text{C}$ após 10 dias da mudança de dieta C_4/C_3 para C_3 e quando a mudança de dieta é de C_3 para C_4/C_3 os valores $\delta^{13}\text{C}$ se estabilizam em 6 dias, ainda no mesmo estudo verificaram que a eliminação do ^{15}N pela urina é menor e maior no leite se comparados ao valor de ^{15}N da dieta e isto se deve ao fracionamento isotópico durante o ciclo da ureia (KNOBBE et al., 2006).

Durante o ciclo da ureia o processo de transaminação e desaminação na síntese da ureia o ^{14}N da dieta é utilizado preferencialmente em relação ao ^{15}N devido à sua massa mais leve, assim diminuindo o ^{15}N na uréia e amônia formadas no fígado, enquanto as proteínas são enriquecidas em comparação com os aminoácidos do pool metabólico

(SICK et al., 1997). O fracionamento de nitrogênio aumenta à medida que a qualidade da proteína na dieta diminui. Quando ocorre a síntese de proteínas microbianas a partir de aminoácidos não há o fracionamento de nitrogênio, no entanto, há um aumento no nitrogênio do leite e redução destina urina (WATTIAUX; REED, 1995).

Além do fracionamento no fígado, ocorre também no rúmen durante a fermentação microbiana da glicose e da celulose do metabolismo da amônia e, também, quando a enzima sintetizadora do glutamato se combina com a amônia para formar o glutamato. Quando o excesso de proteína é fornecido na dieta, uma proporção maior de nitrogênio é direcionada para a urina, aumentando a taxa de fracionamento, pois maiores quantidades de amônia e uréia são formadas no ciclo da uréia. Se houver mais síntese de uréia a partir de aminoácidos catabolizados (e potencialmente amônia), haverá mais enriquecimento dos tecidos corporais e depleção de uréia. Portanto, se a síntese da ureia é devida ao catabolismo de aminoácidos absorvidos em excesso, ou à absorção excessiva de amônia (ambos devido a maiores ingestões de nitrogênio), o enriquecimento tecidual de $\delta^{15}\text{N}$ seria maior em relação à dieta (WHEADON, 2014).

A amostra que apresentou menor tempo para meia vida e troca de 99% dos átomos foram as fezes nos dois tratamentos e períodos indicando maior rapidez na taxa de metabolismo (Tabelas 4 e 5). No primeiro período, a meia vida dos átomos de carbono nas fezes foram de 0,46 e 1,04 para as dietas vegetal e cama de aviário, respectivamente (Tabela 4). Resultados semelhantes foram encontrados quando observado o tempo de substituição do $\delta^{13}\text{C}$ das fezes de ovinos de 1,2 dias e 1 dia para as dietas C_3 e C_4 , respectivamente (MARTINS et al., 2012). As fezes expressam trocas rápidas, refletindo a nova dieta, pois está associado a taxa de passagem da digesta pelo trato gastrointestinal. Ribeiro (2013), avaliou as fezes de bovinos jovens advindos de pastagens C_4 e que passaram à dieta C_3 e encontrou valor de meia vida de 1,8 dias. Estes resultados demonstraram que as fezes refletem mudanças na dieta em poucos dias e tais resultados foram semelhantes com os deste estudo.

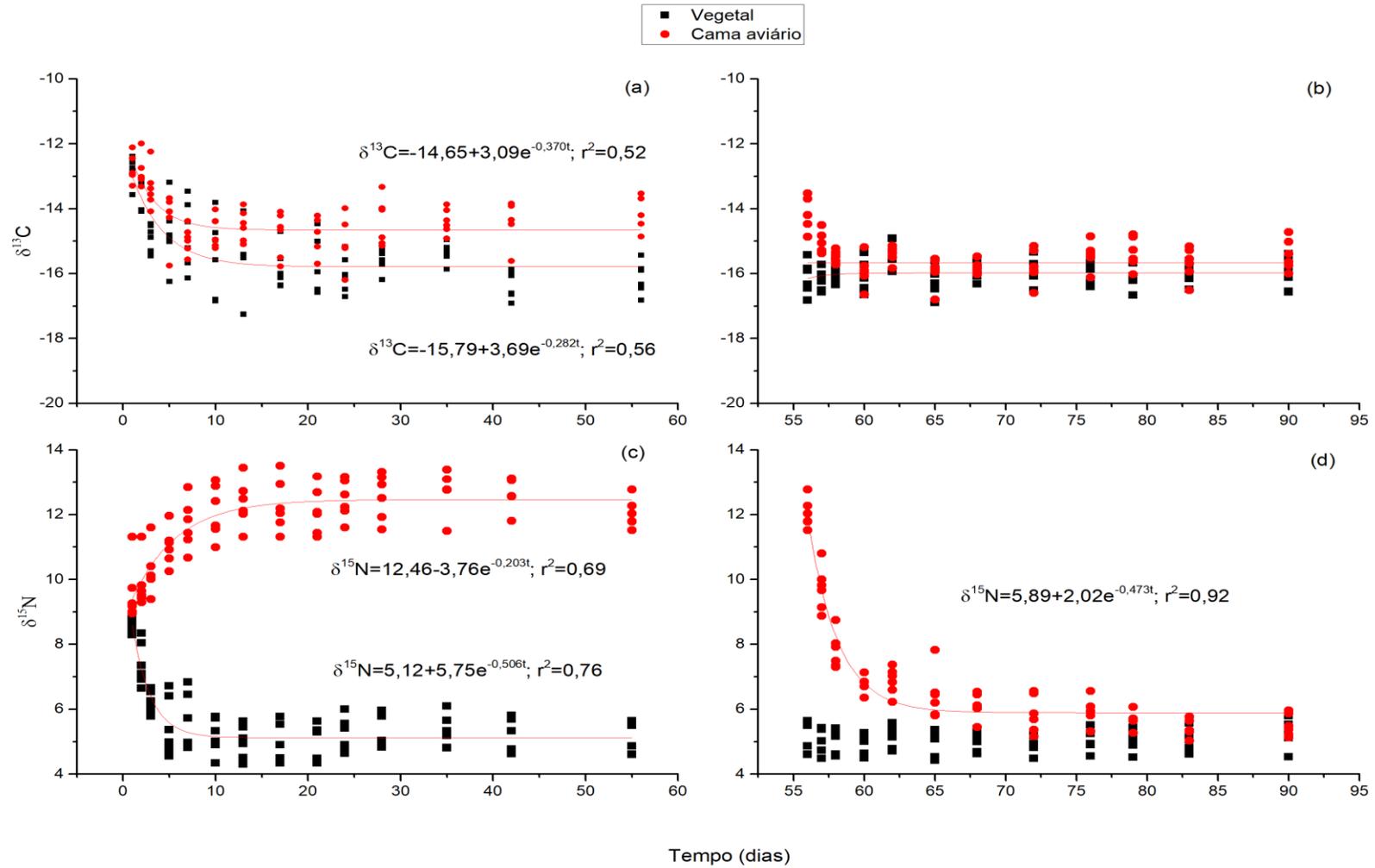


Figura 1. Curvas de *turnover* do isótopo estável de carbono em função do tempo no leite durante o 1º período (a) e 2º período (b), e do isótopo estável de nitrogênio durante o 1º período (c) e 2º período (d).

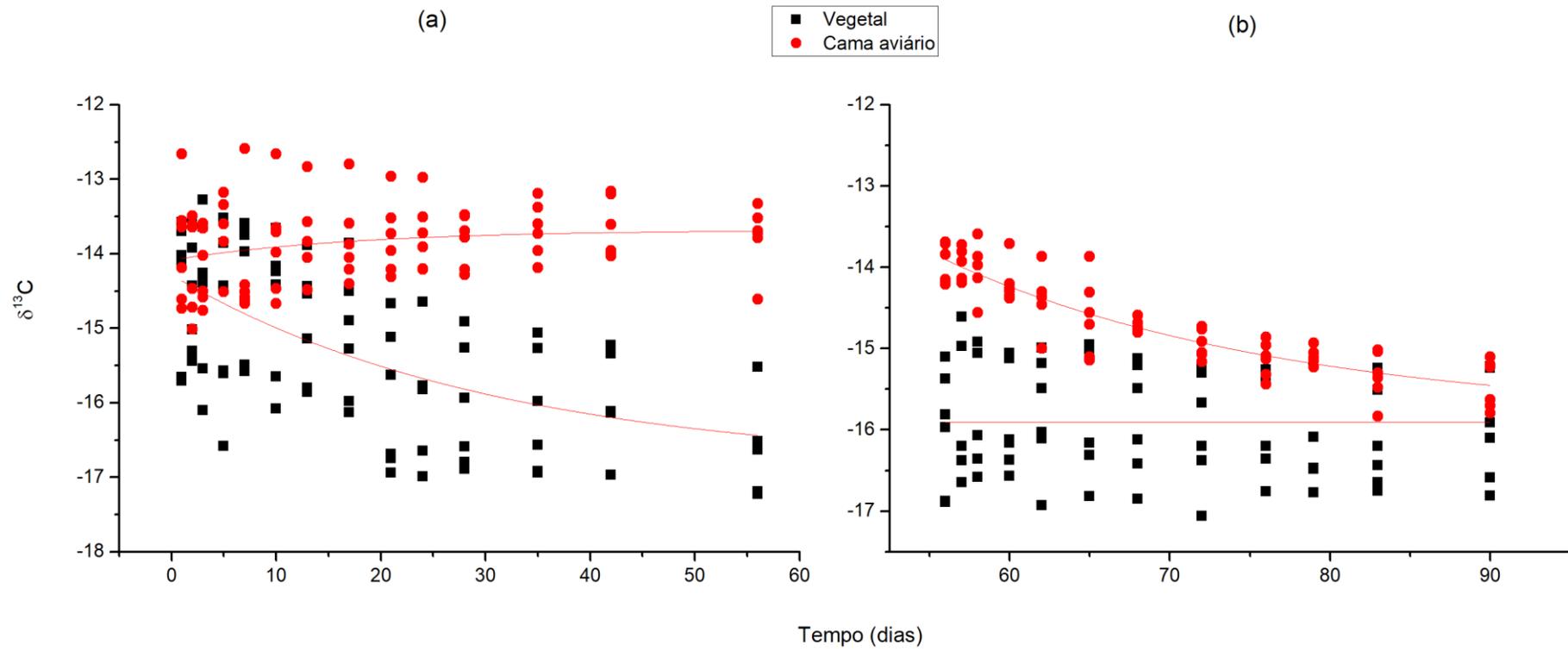


Figura 2. Curvas de *turnover* do isótopo de estável de carbono em função do tempo no sangue durante o 1º período (a) e 2º período (b), respectivamente.

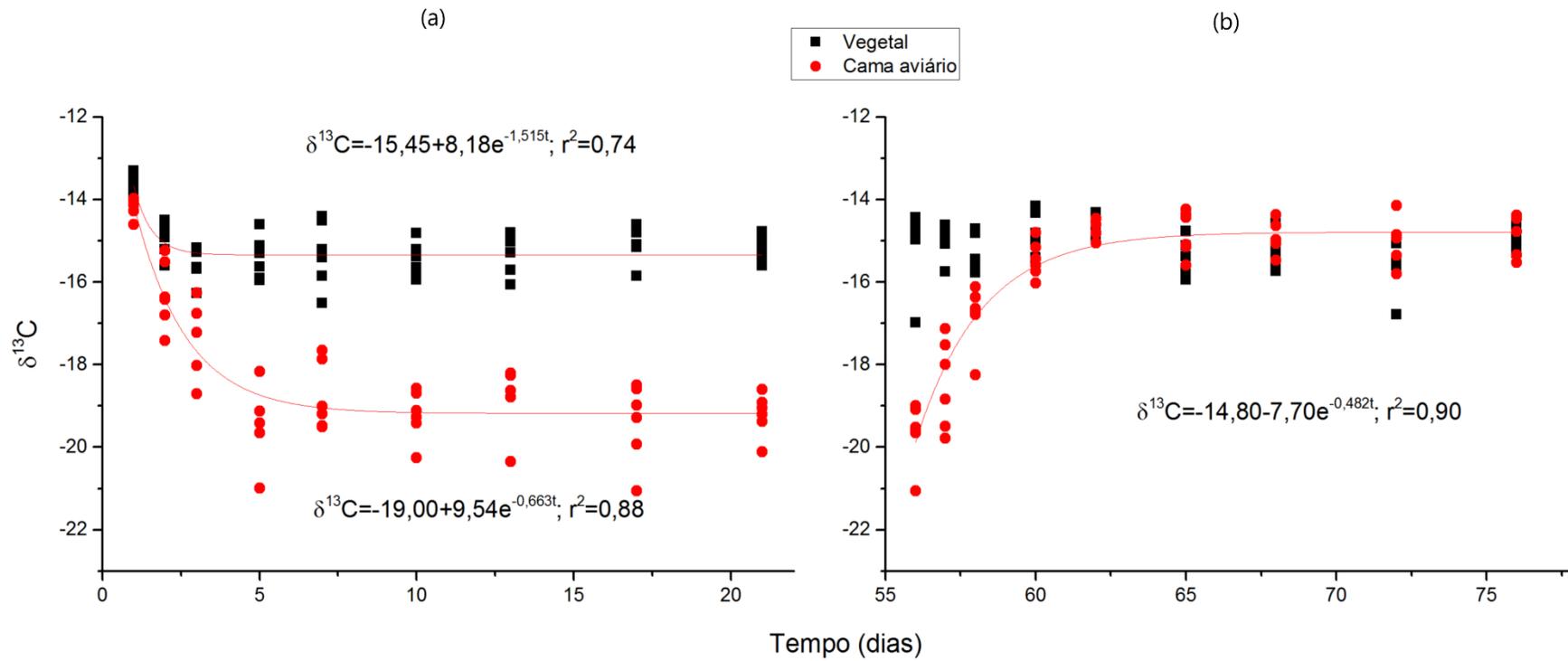


Figura 3. Curvas de *turnover* do isótopo de estável de carbono em função do tempo nas fezes durante o 1º período (a) e 2º período (b), respectivamente.

As curvas de *turnover* isotópico foram explícitas pela função exponencial em função do tempo e estão representadas nas Figuras de 1 a 3 para os valores de ^{15}N no leite e ^{13}C no leite, sangue e fezes durante o período experimental. O valor isotópico inicial de ^{13}C no leite foi em torno de -12‰ e após 55 dias houve diminuição para os dois tratamentos, pois os valores isotópicos das dietas eram mais empobrecidos que o valor inicial. (Figura 1).

Os valores de $\delta^{13}\text{C}$ no leite das vacas alimentadas com a dieta cama de aviário foram maiores do que aquelas alimentadas com a dieta vegetal (Figura 1) mesmo o valor de $\delta^{13}\text{C}$ da dieta cama de aviário sendo menor que o valor da dieta vegetal, indicando que as vacas alimentadas com cama de aviário aproveitaram menos o alimento ingerido (Tabela 1). Para o isótopo de ^{15}N o valor inicial foi em torno de 9‰, diminuindo no tratamento vegetal e aumentando no tratamento cama de aviário, aproximando dos valores isotópicos das dietas nos dois tratamentos (Figura 1). Quando no 2º período há a substituição de dieta do tratamento cama de aviário para a dieta estritamente vegetal os valores do $\delta^{15}\text{N}$ e do $\delta^{13}\text{C}$ aproximam-se do valor da dieta do tratamento vegetal (Figura 1).

Observando o ^{15}N no leite, este apresentou um enriquecimento em relação as dietas nos dois tratamentos, com valor de fracionamento isotópico dieta-tecido de + 2,0‰ para ambos. Estes dados corroboram com os resultados encontrados por Steele et al. (1978), Sutoh et al. (1987) e Knobbe et al. (2006), sendo o $\delta^{15}\text{N}$ no leite significativamente maiores do que a dieta.

Carvalho (2015), analisando o leite e suas frações conseguiu distinguir vacas leiteiras alimentadas com cama de aviário das alimentadas com silagem de milho por meio da análise do $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$, tendo maior destaque na rastreabilidade quando ^{15}N era associado com os outros elementos. Foi verificado que os valores de $\delta^{13}\text{C}$ encontrados no leite e fezes modificaram-se rapidamente no três primeiros dias após substituição da dieta de vacas alimentadas com silagem de milho (C_4) pelo feno de soja perene (C_3) (LOURENÇO et al., 1984), corroborando com os dados encontrados.

Observando as curvas de diluição isotópica do sangue para os dois tratamentos e períodos (Figura 2) pode-se verificar que os valores de $\delta^{13}\text{C}$ do sangue não alcançaram o patamar de equilíbrio isotópico, indicando que houve uma troca mais lenta do carbono da nova dieta. Os valores isotópicos finais não chegaram próximos aos valores isotópicos da dieta. Portanto, os valores de meia vida no sangue não puderam ser

calculados pois, pela equação exponencial de diluição isotópica proposta por Ducatti et al. (2002) só poderia ser calculada se os valores de $\delta^{13}\text{C}$ do tecido avaliado atingisse o patamar de equilíbrio isotópico.

O valor isotópico de ^{13}C analisado no primeiro dia de coleta para o sangue foi em torno de -13 a -14‰, valor este característico de plantas C_4 , pois a dieta fornecida as vacas no período de adaptação era de silagem de milho. No Tratamento controle, após 90 dias de período experimental houve pequena diminuição no $\delta^{13}\text{C}$ do sangue, para o tratamento cama de aviário no primeiro período houve um pequeno aumento do $\delta^{13}\text{C}$, após a troca da dieta no segundo período ocorreu uma diminuição do $\delta^{13}\text{C}$ mostrando que o período experimental não foi o suficiente para alterar os valores isotópicos do sangue, dados estes que concordam com De Smet (2004) que observaram no sangue e plasma de touros jovens recebendo dieta com plantas C_4 ou dieta mista C_4 e C_3 por 70 dias sendo clara a distinção entre os tratamentos mesmo não tendo alcançado o patamar de equilíbrio.

No sangue, os valores do $\delta^{13}\text{C}$ corresponderam apenas aos valores do $\delta^{13}\text{C}$ da dieta do tratamento vegetal. Já os valores do $\delta^{13}\text{C}$ dos animais alimentados com a dieta cama de aviário não alcançaram os valores do $\delta^{13}\text{C}$ da dieta, mesmo assim os valores encontrados puderam indicar o tipo de dieta que as vacas estavam recebendo. Esta distinção só é possível devido à diferença existente no valor de $\delta^{13}\text{C}$ entre as plantas C_3 e C_4 . O valor do $\delta^{13}\text{C}$ nas plantas C_3 varia de -22 a -34‰, dependendo da espécie e da parte da planta analisada, e nas plantas C_4 este valor fica entre -9 e -16‰. Assim, considerando a existência da diferença isotópica da ordem de 16‰ nos valores do $\delta^{13}\text{C}$ entre as plantas do ciclo fotossintético C_3 e C_4 , pode-se caracterizar a dieta do animal através da análise isotópica do carbono nos materiais ou tecidos (Ducatti, 2004).

As fezes apresentaram maior empobrecimento do $\delta^{13}\text{C}$ no tratamento cama de aviário do que no tratamento vegetal durante o primeiro período. No segundo período, ocorreu um enriquecimento do $\delta^{13}\text{C}$ no tratamento cama de aviário devido a mudança da dieta para a vegetal, convergindo para valores isotópicos semelhantes. Em ambos os tratamentos as fezes responderam de forma exponencial devido a rápida troca de carbono da dieta, concordando com Sponheimer et al. (2006); Gratton; Forbes (2006).

As fezes foram empobrecidas em ^{13}C em relação à dieta em ambos os tratamentos, com valor de fracionamento isotópico dieta-tecido de - 2,0‰ para ambos, dados estes que concordam com os de Norman et al. (2009) e Martins (2012) que encontraram valores de $\delta^{13}\text{C}$ das fezes inferiores em relação ao $\delta^{13}\text{C}$ da dieta, considerado um

fracionamento isotópico entre dieta e tecido. Este valor de fracionamento isotópico está de acordo com o intervalo descrito entre -0,4 à -2,0‰ para bovinos (JONES et al., 1979, MARTINS, 2012).

Os resultados demonstraram que as fezes refletem mudanças nas dietas de poucos dias porém, não expressa os nutrientes incorporados no tecido, mas um indicativo do que o animal ingeriu em curto prazo. Assim como as fezes, o leite apresenta dietas de curto prazo, já o sangue reflete dietas a longo prazo e ambos expressam os nutrientes assimilados.

Há três fatores que podem contribuir para erros na reconstituição de dietas analisando isótopos estáveis de carbono. O primeiro é que os tecidos ou materiais exógenos apresentam diferentes períodos de integração do carbono, ou seja, tecidos mais ativos metabolicamente apresentam *turnover* mais rápido do que os metabolicamente menos ativos (DE SMET et al., 2004; DALERUM; ANGERBJORN, 2005; GRATTON; FORBES, 2006). Assim, a escolha do tipo de tecido depende do objetivo da pesquisa (HOBSON; CLARK, 1992). O segundo é que devido ao fracionamento isotópico o tecido e/ou os materiais exógenos podem ser relativamente enriquecidos ou empobrecidos em $\delta^{13}\text{C}$ em relação a dieta (JONES et al., 1979; TIESZEN et al., 1983; GANNES et al., 1997). E o terceiro é que pode haver diferenças na digestibilidade dos componentes de dietas C_3 e C_4 refletindo na eficiência da assimilação destas dietas (JONES et al., 1979; GARCIA et al., 2000).

O teste de t Student mostrou que no primeiro período os valores isotópicos de $\delta^{13}\text{C}$ para o sangue e as fezes do T1 diferiram do T2 ($p < 0,05$), já para o leite não houve diferença entre os tratamentos (Tabela 6). No segundo período, os valores isotópicos do $\delta^{13}\text{C}$ no sangue do T1 diferiram do T2 ($p < 0,05$), já os valores isotópicos das fezes e do leite do T1 não diferiram do T2 ($p < 0,05$) (Tabela 6). Os valores isotópicos de $\delta^{15}\text{N}$ no leite para os 1º e 2º períodos diferiram entre o T1 e o T2 ($p < 0,05$) (Tabela 7).

Tabela 6. Comparação das médias do $\delta^{13}\text{C}$ nas fezes, sangue e leite dos tratamentos Vegetal e Cama de aviário no 1º e 2º períodos

Período	Material	$\delta^{13}\text{C}$		P*
		Dieta Vegetal	Dieta Cama de Aviário	
1º	Fezes	-15,15 ± 0,59	-18,17 ± 1,88	0,000
	Sangue	-15,28 ± 0,73	-13,86 ± 0,19	0,000
	Leite	- 15,20 ± 0,98	-14,26 ± 0,73	0,302
2º	Fezes	-15,10 ± 0,30	-16,08 ± 1,83	0,137
	Sangue	-15,86 ± 0,22	-14,65 ± 0,53	0,000
	Leite	-16,00 ± 0,19	-15,45 ± 0,48	0,319

* Teste t-Student para amostras independentes com nível de significância $p < 0,05$.

Tabela 7. Comparação das médias do $\delta^{15}\text{N}$ no leite dos tratamentos Vegetal e Cama de aviário no 1º e 2º períodos

Período	Material	$\delta^{15}\text{N}$		P*
		Dieta Vegetal	Dieta Cama Aviário	
1º	Leite	5,66 ± 1,06	11,69 ± 1,08	0,000
2º	Leite	5,07 ± 0,08	7,02 ± 1,98	0,003

* Teste t-Student para amostras independentes com nível de significância $p < 0,05$.

CONCLUSÕES

Os resultados indicam que pode ser utilizada a análise dos isótopos estáveis para identificar as mudanças nos valores isotópicos dos tecidos analisados em tempos diferentes dependendo da taxa de incorporação do carbono e do nitrogênio provenientes das dietas com ou sem cama de aviário. Nas condições do presente estudo, a detecção da inclusão de cama de aviário na alimentação de vaca leiteiras pelas fezes ($\delta^{13}\text{C}$) e pelo leite ($\delta^{15}\text{N}$) indicou dietas recentes. Sendo as fezes a primeira a refletir o valor isotópico da dieta, seguido pelo leite e por último o sangue.

De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que o *turnover* isotópico do ^{13}C nas fezes e do ^{15}N no leite para meia vida foi de 1,4 dias quando houve a troca da dieta contendo cama de aviário para a somente vegetal.

O sangue não conseguiu atingir o patamar de equilíbrio no período avaliado indicando ser um material para detecção de dietas de períodos mais longos.

Por essas diferenças apresentadas podemos inferir que o tipo de material influencia no *turnover* isotópico, ou seja, havendo troca mais rápida ou mais lenta do isótopo estudado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAHAR, B.; MONAHAN, F.J.; MOLONEY, A.P.; O'KIELY, P.; SCRIMGEOUR, C.M.; SCHMIDT, O. Alteration of the carbon and nitrogen stable isotope composition of beef by substitution of grass silage with maize silage. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 19, p. 1937-1942, 2005.
- BAHAR, B.;SCHMIDT, O.;MOLONEY, A.P.; SCRIMGEOUR, C.M.; BEGLEY, I.S.; MONAHAN, F.J. Seasonal variation in the C, N and S stable isotope composition of retail organic and conventional Irish beef. **Food Chemistry**, v. 106, p. 1299-1305, 2007.
- BATEMAN, A. S.; KELLY, S. D. Fertilizer nitrogen isotope signatures. **Isotopes in Environmental and Health Studies**, v. 43, p, 237-247, 2007.
- BOUTTON, T. W.; TYRRELL, H. F.; PATTERSON, B. W.; VARGA, G. A.; KLEIN, P. D. Carbon kinetics of milk formation in holstein cows in late lactation. **Journal of Animal Science**, v. 66, n. 10, p. 2636-2645, 1988.
- BRAUN, A., SCHNEIDER, S., AUERSWALD, K., BELLOF, G., & SCHNYDER, H. (2013). Forward modeling of fluctuating dietary ^{13}C signals to validate ^{13}C turnover models of milk and milk components from a diet-switch experiment. **PLoS One**, 8, e85235.
- CAMIN, F.; BONER, M.; BONTEMPO, L.; FAUHL-HASSEK, C.; KELLY, S.D.; RIEDL, J.; ROSSMANN, A. Stable isotope techniques for verifying the declared geographical origin of food in legal cases. **Trends in Food Science & Technology** v. 61, p. 176–187, 2017.
- CAMIN, F.; PERINI, M.; BONTEMPO, L.; FABRONI, S.; FAEDI, W.; MAGNANI, S.; BARUZZI, G.; BONOLI, M.; TABILIO, M.R.; MUSMECI, S.; ROSSMANN, A.; KELLY, S.D.; RAPISARDA, P. Potential isotopic and chemical markers for characterising organic fruits. **Food Chemistry**, v. 125, n. 3, p. 1072-1082, 2011.
- CARVALHO, M. A. G. Rastreabilidade da cama e aviário por isótopos estáveis em bovinos leiteiros,2015. 70 p. **Dissertação (Mestrado em Zootecnia)** – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2015.
- CHUNG, I.; PARK, I.; YOON, J.Y.; YANG, Y.S.; KIM, S.H. Determination of organic milk authenticity using carbon and nitrogen natural isotopes. **Food Chemistry**, v. 160, p. 214-218, 2014.
- DALERUM, F., ANGERBJÖRN, A. Resolving temporal variation in vertebrate diets using naturally occurring stable isotopes. **Oecologia**, v.144, p.647–658, 2005.
- DENIRO MJ AND EPSTEIN S. Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. **Geochimica et Cosmochimica Acta** v.45, p.341–351, 1981.

DE SMET, S.; BALCAEN, A.; CLAEYS, E. et al. Stable carbon isotope analysis of different tissues of beef animals in relation to their diet. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.18, p.1227-1232, 2004.

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

DUCATTI, C. **Isótopos estáveis ambientais**. Botucatu (SP): Universidade Estadual Paulista, 2004, 138p. (Apostila).

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2016. **FAOSTAT**. Disponível em: < <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL>>. Acesso em: 03 abr. 2018.

GANNES, L.Z.; OBRIEN, D.M.; DEL RIO, C.M. Stable isotopes in animal ecology: assumptions, caveats, and a call for more laboratory experiments. **Ecology**, v.78, p.1271–1276, 1997.

GARCIA, S.C.; HOLMES, C.W.; HODGSON, J. et al. The combination of the nalkanes and ^{13}C techniques to estimate individual dry matter intakes of herbage and maize silage by grazing dairy cows. **Journal of Agricultural Science**, v.135, p.47– 55, 2000.

GONZÁLEZ-MARTIN I, GONZÁLES-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.

GRATTON, C.; FORBES, A.E. Changes in delta ^{13}C stable isotopes in multiple tissues of insect predators fed isotopically distinct prey. **Oecologia**, v.147, p.615–624, 2006.

GUO BL, WEI YM, PAN JR, 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.

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, 1992.

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.18, p.91-100; v.92, p.91-100, 1979.

KNOBBE, N.; VOGL, J.; PRITZKOW, W. et al. C and N stable isotope variation in urine and milk of cattle depending on the diet. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.386, p.104-108, 2006.

LOURENÇO, A. J.; MATSUI, E.; JÚNIOR, I. A. Variações de valores de ^{13}C nas fezes, leite e sangue de vacas em lactação mantidas em pastagens exclusivas de gramíneas ou consorciadas. **Boletim da Indústria Animal**, Nova Odessa, v.41 (Único), p.183 192, 1984.

MARTINS, M. B.; DUCATTI, C.; MARTINS, C. L.; DENADAI, J. C.; NATEL, A. S.; SOUZA-KRULISKI, C. R.; SARTORI, M. M. P. Stable isotopes for determining

carbono turnover in sheep feces and blood. **Livestock Science**, v. 149, n. 1-2, p. 137-142, 2012.

MOLKENTIN, J. Applicability of organic milk indicators to the authentication of processed products. **Food Chemistry**, v. 137, p. 25-30, 2013.

MOLKENTIN, J.; GIESEMANN, A. Follow-up of stable isotope analysis of organic versus conventional milk. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, p. 1493-1500, 2010.

NORMAN, H.C.; WILMOT, M.G.; THOMAS, D.T. et al. Stable carbon isotopes accurately predict diet selection by sheep fed mixtures of C₃ annual pastures and saltbush or C₄ perennial grasses. **Livestock Science**, v.121, p.162-172, 2009.

PARLAMENTO EUROPEU E CONSELHO. **EUR-Lex Acesso ao direito da União Europeia**. Regulamento (CE) nº 51/2013 de 16 de Janeiro de 2013. Disponível em:<<http://eurlex.europa.eu/legalcontent/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32013R0051&qid=1425822722085&from=PT>>. Acesso em: 25 fev. 2017.

PERDIGÃO, A. **Rastreabilidade de Sistemas produtivos de bovinos pela análise de isótopos estáveis**.2017. 59f. Tese (Doutorado em nutrição e alimentação animal) – Faculdade e Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2017.

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

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

RAPISARDA, P.; CAMIM, F.; FABRONI, S.; PERINI, M.; TORRISI, B.; INTRIGLIOLO, F. Influence of different organic fertilizers on quality parameters and the $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^2\text{H}$, $\delta^{34}\text{S}$, and $\delta^{18}\text{O}$ values of orange fruit (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 6, p. 3502-3506, 2010.

RIBEIRO, F. A. Técnica dos Isótopos Estáveis para Determinar o *Turnover* de Carbono nas Fezes, no Sangue e Plasma de Bovinos Jovens Confinados,2013. 51p. **Dissertação (Mestrado em Zootecnia)** – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 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, p. 4236-4242, 2009.

SCAMPICCHIO, M.; MIMMO, T.; CAPICI, C.; HUCK, C.; INNOCENTE, N.; DRUSCH, S.; CESCO, S. Identification of milk origin and process-induced changes in milk by stable isotope ratio mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, n.45, p. 11268-11273, 2012.

SICK, H.; ROOS, N.; SAGGAU, E.; HAAS, K.; MEYN, V.; WALCH, B.; TRUGO, N. Amino acid utilization and isotope discrimination of amino nitrogen in nitrogen metabolism of rat liver in vivo. **Zeitschrift für Ernährungswissenschaft. Journal of nutritional sciences**, v.36, p.340-346, 1997.

SPONHEIMER, M.; ROBINSON, T.F.; CERLING, T.E. Turnover of stable carbon isotopes in the muscle, liver, and breath CO₂ of alpacas (*Lama pacos*). **Rapid Communication Mass Spectrometry**, v.20, p.1395–1399, 2006.

STEELE, K.W.; DANIEL, R.M. Fractionation of nitrogen isotopes by animals: a further complication to the use of variations in the natural abundance of ¹⁵N for tracer studies, **The Journal of Agricultural Science**, v.90, p. 7-9, 1978.

SUTOH, M.; KOYAMA, T.; YONEYAMA, T. Variations of natural ¹⁵N abundances in the tissues and digesta of domestic animals. **Radioisotopes**, v.60, p.74-77, 1987.

TIESZEN, L.L.; BOUTTON, T.W.; TESDAHL, K.G.; SLADE, N.A. Fractionation and turnover of stable carbon isotopes in animal tissues: implications for δ¹³C analysis of diet. **Oecologia**, v.57, p.32-37, 1983.

UNIÃO EUROPEIA. (2010). Directiva 2010/63/UE do Parlamento Europeu e do Conselho de 22 de Setembro de 2010 relativa à proteção dos animais utilizados para fins científicos. **Jornal Oficial da União Europeia**, v. 276, p.33-79, 2010.

VIEIRA JUNIOR, L.C. **Potencial da técnica dos isótopos estáveis para caracterização de diferentes sistemas de produção de bovinos e corte em condições tropicais**. 2013. 54f. Tese (Doutorado em nutrição e alimentação animal) – Faculdade e Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.

WATTIAUX, M.A.; REED, J.D. Fractionation of nitrogen isotopes by mixed ruminal bacteria. **Journal Animal Science**, v.73, p.257-266, 1995.

WHEADON, N. M. **Nitrogen isotopic fractionation and nitrogen use efficiency in beef and dairy cattle**. 2014. 217f. Tese (Degree of doctor of philosophy) – Universidade de Lincoln, Christchurch, Nova Zelândia, 2014.

CAPÍTULO 3

IMPLICAÇÕES

Produtos proibidos na dieta de ruminantes podem gerar riscos sanitários tanto aos animais quanto aos humanos, como é o caso do fornecimento da cama de aviário para vacas leiteiras, por conter proteínas de origem animal podem estar contaminadas com o príon da encefalopatia espongiforme bovina e, um caso clássico da doença poderia ocasionar prejuízos financeiros, como ocorreu em países acometidos pela doença. Portanto, surgiu a necessidade de se rastrear a dieta de bovinos leiteiros para identificação de produtos de origem animal em sua composição.

A utilização da análise dos isótopos estáveis possibilita obter dados da incorporação do $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ da dieta em diversos materiais como, leite, sangue e fezes. A partir dos resultados obtidos, a análise mostrou-se eficaz na determinação do *turnover* de dietas contendo ou não cama de aviário, em um curto espaço de tempo sem que houvesse sacrifício animal, pois utilizou como componentes o leite, sangue e fezes.

Como a utilização da metodologia em ruminantes é recente novos estudos são necessários para que alguns pontos sejam melhor elucidados. Sugere-se estudos avaliando o *turnover* isotópico de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ no sangue, mas com maior período de adaptação dos animais a dieta para que o tecido consiga entrar em patamar de equilíbrio, assim determinando o tempo de troca destes elementos pois, o sangue seria um bom indicador de dietas mais antigas, podendo detectar a inclusão de cama de aviário em períodos mais longos.

Também pode ser avaliado outros componentes como pelos, urina; outras categorias animais, sistemas de produção, épocas do ano e diferentes níveis de inclusão da cama de aviário e a água oferecida aos animais, pois tudo isso influenciaria na taxa de troca dos elementos.

ANEXO 1



ATESTADO

Atesto que o Projeto "Turnover isotópico de Carbono e Nitrogênio no leite e tecidos de vacas leiteiras alimentadas com cama de aviário " **Protocolo CEUA 0181/2016** , a ser conduzido por Luciane do Carmo Seraphim, responsável/orientador Prof° Dr° Roberto de Oliveira Roça, para fins de pesquisa científica/ensino - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

Finalidade	PESQUISA CIENTÍFICA
Vigência do projeto	01/12/2016 a 30/06/2017
Nome Comum / Espécie / Linhagem	// Não se aplica
Raça	Não se aplica
Nº de animais machos	0
Nº de animais fêmeas	0
Nº de animais sexo indefinido	0
Peso médio de animais machos	0
Peso médio de animais fêmeas	0
Peso médio de animais sexo indefinido	0
Idade	ano(s) e 0 mes(es) e 0 dia(s).
Procedência	Animais foram comprados

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 10/11/2016

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

ANEXO 2



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO
 Secretaria de Defesa Agropecuária
 Departamento de Saúde Animal
 Coordenação Geral de Combate a Doenças
 Coordenação da Raiva e das Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis

p. 30
 q.

INFORMAÇÃO CRHE Nº 79/ 2013

Assunto: Projeto de pesquisa com isótopos estáveis para detecção de resíduos de uso de cama de frango em leite bovino.

Data: 14 de outubro de 2013

Referência: Processo 21052.009187/2013-02

O processo em questão trata de pedido da UNESP ao Mapa, relacionado à autorização para pesquisa com isótopos estáveis para detecção de resíduos de cama de frango em leite de vacas alimentadas com esse subproduto.

2. Sobre o assunto, ressalta-se que a Instrução Normativa 08/2004 inclui a cama de frango dentre os alimentos proibidos para ruminantes (*feed ban*), como medida de prevenção da encefalopatia espongiforme bovina (EEB). No sentido de observar obediência a IN 08/2004, o serviço veterinário oficial (SVO) vem realizando rotineiras fiscalizações em regiões de potencial risco para o uso indevido da cama de frango como alimento para ruminantes, assim como investigações de eventuais denúncias sobre esse uso indevido.

3. Entendemos que, conforme os resultados dessa pesquisa inédita, será possível agregar novos elementos para fortalecer e, até mesmo, reduzir custos das atuais fiscalizações do SVO.

4. Após consulta ao Comitê Científico Consultivo de Encefalopatias do Mapa (CEET), somos favoráveis ao pleito em questão, desde que seguidos os procedimentos abaixo listados, que visam garantir que os animais objetos dessa pesquisa não imputem à situação sanitária do país quanto à EEB:

- a) aplicação de elemento de identificação permanente nas vacas que se alimentarão com cama de frango, sendo que tal procedimento deve ser realizado pelo interessado e sob a supervisão do Serviço de Saúde Animal – SSA/SFA/SP;
- b) assinatura de termo de restrição de movimentação desses animais alimentados com o produto proibido, junto ao SSA/SFA/SP, onde o interessado se compromete a não movimentar o animal e a comunicar ao SSA qualquer evento com o mesmo, semelhante ao termo de depositário de bovino importado de país de risco para EEB;
- c) destinação das vacas que se alimentarão com cama de frango: conforme previsto na IN 41/2009, ou seja, destruição na propriedade ou abate com remoção de material de risco EEB, procedimento esse sob acompanhamento do SSA/SFA/SP. Ressaltamos que não cabe restrição ao aproveitamento do leite desses animais, quanto ao risco de EEB, pois no projeto é informado que o mesmo será descartado;

5. Considerando o exposto, é importante que o SSA/SFA/SP elabore os documentos necessários e discuta com o interessado sobre os procedimentos a serem aplicados, visando atender aos itens do parágrafo anterior.


 Elaine Fátima de Sena
 Coordenadora CRHE