



## Utilização de isótopos estáveis em ruminantes

Carlos Ducatti<sup>1</sup>, Cyntia Ludovico Martins<sup>2</sup>, Mário de Beni Arrigoni<sup>3</sup>, Marcela Buosi Martins<sup>1</sup>,  
Luiz Carlos Vieira Júnior<sup>2</sup>, Juliana Célia Denadai<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Centro de Isótopos Estáveis Ambientais – IBB/UNESP/Botucatu.

<sup>2</sup> Departamento de Produção Animal – FMVZ/UNESP/Botucatu.

<sup>3</sup> Campus Experimental de Dracena – UNESP.

<sup>4</sup> Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal – FMVZ/UNESP/Botucatu.

**RESUMO** - A técnica de isótopos estáveis tem sido utilizada como ferramenta para a detecção de adulteração em alimentos. Existem vantagens importantes para o uso de isótopos estáveis sobre as técnicas convencionais, pois naturalmente ocorrem como indicadores dietéticos, além do fato de suas estimativas dietéticas isotópicas basearem-se nos alimentos assimilados, e não apenas nos alimentos ingeridos. Com esta técnica também é possível obter informações de dietas consumidas a curto e longo períodos, dependendo do tecido avaliado. Esta revisão fornece uma visão geral dos principais isótopos estáveis utilizados em estudos com ruminantes.

Palavras-chave: autenticidade, carbono, hidrogênio, nitrogênio, oxigênio, rastreabilidade

## Use of stable isotopes in ruminants

**ABSTRACT** - The technique of stable isotopes has been used as a tool for the detection of adulteration in food. There are important advantages for the use of stable isotopes over conventional techniques. Naturally occurring as dietary indicators, besides the fact of their estimates are based on the isotopic dietary food assimilated and not just in food intake. Still, by this technique, information can be obtained from diets consumed the short and long periods, depending on the tissue evaluated. This review provides an overview of key elements isotopic used in studies in ruminants.

Key Words: authenticity, carbon, hydrogen, nitrogen, oxygen, traceability

### Introdução

Os isótopos estáveis foram usados inicialmente em estudos geológicos e arqueológicos. Atualmente existem mais de 2.500 diferentes isótopos conhecidos em 110 elementos químicos diferentes, com 264 isótopos estáveis (Criss, 1999). Na área biológica e disciplinas afins, os principais elementos químicos de interesse são os bioelementos carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio e enxofre (CHON'S), os quais fazem parte da estrutura de carboidratos, lipídeos, proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos (DNA, RNA).

Nas últimas décadas, estão sendo aplicados de forma crescente e contínua em pesquisas agrícolas e ecológicas e em estudos de digestibilidade e metabolismo humano e animal. Estas investigações demonstraram que as composições isotópicas dos tecidos de animais dependem principalmente da alimentação, da água ingerida e dos gases inalados. Associado a isto, os efeitos dos isótopos estão ligados aos processos metabólicos (Kennedy & Krouse, 1990).

### Conceituação dos isótopos estáveis

O termo isótopo vem do grego *ISO* (mesmo ou igual) e *TOPOS* (lugar), referindo-se ao fato de que são elementos que ocupam o mesmo lugar na tabela periódica. Os isótopos são átomos do mesmo elemento químico, com o mesmo número de prótons e diferentes números de nêutrons e, conseqüentemente, com diferentes massas. Por possuírem sua camada eletrônica igual, ou seja, com o mesmo número de elétrons, pode-se inferir que os isótopos são elementos que apresentam as mesmas propriedades químicas (eletrosfera) e diferentes propriedades físicas (núcleo). A expressão *estável* significa que ocorrem de maneira comum na natureza, podendo ser utilizados sem riscos à saúde e ao ambiente.

A nomenclatura isotópica é expressa por  ${}^A_ZX$ , na qual  $X$  representa o elemento químico,  $A$  o número de massa em unidades de massa atômica e  $Z$  o número de prótons, de modo que  $A = Z + N$ , em que  $N$  representa o número de nêutrons.

O elemento químico carbono, por exemplo (Tabela 1), apresenta somente dois isótopos estáveis;  $^{12}_6\text{C}$  e  $^{13}_6\text{C}$ , sendo que o carbono-12 é o mais leve e o mais abundante, e os dois diferem pela existência de um nêutron a mais no núcleo. As moléculas isotópicas  $^{12}\text{CO}_2$  e  $^{13}\text{CO}_2$  não são diferenciadas pelas membranas biológicas de origem vegetal ou animal, ou seja, a pequena sutileza escondida no núcleo (nêutron a mais) não é detectada, tornando o isótopo estável do carbono-13 excelente traçador em nível de variação natural ou compostos enriquecidos, o que é extensivo para os demais bioelementos.

Os principais isótopos estáveis dos bioelementos estão explícitos na Tabela 1.

Os isótopos estáveis dos bioelementos são analisados na forma gasosa por espectrometria de massa de razão isotópica (IRMS), no qual a amostra é analisada contra um padrão internacional específico para cada elemento, com erro analítico da ordem de 0,2‰ (per mil), por meio da expressão adimensional:

$$\delta \text{ (amostra, padrão)} = (r \text{ amostra} - r \text{ padrão}) / r \text{ padrão}$$

Como os valores numéricos das diferenças entre as razões isotópicas (r) são pequenos, costuma-se multiplicar e dividir a expressão por 1000, obtendo-se a terminologia em delta per mil ( $\delta$ ‰).

#### Isótopos do carbono

Os valores isotópicos do carbono-13 são expressos em termos do padrão internacional, Peedee Belemnite (PDB), visto que o padrão PDB é aceito universalmente na comparação das composições isotópicas do carbono (Ducatti, 2007). Trata-se do carbonato sólido de Belemnite da era cretácea, *Belemnite americana*, da formação Peedee da Carolina do Sul, empregado inicialmente como padrão por Craig (1957).

A fonte primária do carbono para as plantas terrestres é o  $\text{CO}_2$  atmosférico, o qual tem valor de  $\delta^{13}\text{C}$  de aproximadamente -7,7‰ (Kennedy & Krouse, 1990). Esse carbono sofre discriminação isotópica ao longo do processo de fotossíntese. O termo discriminação isotópica indica

enriquecimento ou empobrecimento isotópico relativo do produto em relação à fonte precursora. De acordo com o ciclo fotossintético, as plantas podem ser classificadas, na sua maioria, em dois grupos principais: plantas  $\text{C}_3$  (arroz, leguminosas, trigo, cevada, hortaliças, beterraba, mandioca, algodão, alfafa, soja, feijão, frutíferas em geral, gramíneas temperadas, entre outros) e  $\text{C}_4$  (cana de açúcar, milho, gramíneas tropicais, entre outras).

Em plantas  $\text{C}_3$  o valor de  $\delta^{13}\text{C}$  varia de -22 a -34‰ e nas  $\text{C}_4$ , de -9 a -16‰ (Vogel, 1993; Boutton, 1996). A diferença entre estes valores decorre das distintas rotas bioquímicas na produção de carboidratos, pois plantas  $\text{C}_3$  desde o estágio inicial (estômatos) até a formação dos compostos de carbono incorporam mais  $^{12}\text{C}$  que  $^{13}\text{C}$ . Esta preferência ou discriminação isotópica pelas moléculas  $^{12}\text{CO}_2$ , isótopo estável leve, é muito maior nas plantas  $\text{C}_3$  do que nas plantas  $\text{C}_4$ . Logo, plantas  $\text{C}_3$  são em média -14,4‰ mais leves que  $\text{C}_4$ .

O contraste existente na relação isotópica de  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  das plantas de ciclo fotossintético  $\text{C}_3$  e  $\text{C}_4$  tem possibilitado estudos na área de nutrição e metabolismo animal, utilizando como marcador o  $^{13}\text{C}$  e sua concentração natural nos alimentos (Ducatti, 2007). Em razão de as plantas serem fonte de alimento aos animais, a “impressão digital isotópica” destas fontes é refletida nos tecidos específicos dos animais, após certo tempo de metabolismo (Deniro & Epstein, 1978; Gannes et al., 1998), evidenciando as dietas a partir da análise isotópica nos tecidos (Ducatti, 2007).

O principal elemento considerado na análise do diagnóstico alimentar é o carbono. Entretanto, a complexidade na interpretação dos valores isotópicos sobre as possíveis fontes alimentares sugere a necessidade de complementação com outros isótopos, como o nitrogênio (Fry & Sherr, 1984).

#### Isótopos do nitrogênio

Para os isótopos estáveis do nitrogênio, o padrão internacional é o nitrogênio do ar atmosférico, considerado uma mistura isotópica homogênea na superfície terrestre.

Tabela 1 - Isótopos estáveis dos elementos H, C, N, O e S e suas moléculas gasosas comumente utilizadas na espectrometria de massas

Isótopos estáveis	Abundância átomos %	Gás	Isótopos estáveis	Abundância átomos %	Gás
$^1\text{H}$	99,9844		$^{16}\text{O}$	99,7628	CO
$^2\text{H}$	0,0156	$\text{H}_2$	$^{17}\text{O}$	0,0372	$\text{CO}_2$
$^{12}\text{C}$	98,8890		$^{18}\text{O}$	0,2000	
$^{13}\text{C}$	1,1110	$\text{CO}_2$	$^{32}\text{S}$	95,0180	
$^{14}\text{N}$	99,6340		$^{33}\text{S}$	0,7500	
$^{15}\text{N}$	0,3660	$\text{N}_2$	$^{34}\text{S}$	4,2150	
			$^{36}\text{S}$	0,0170	$\text{SO}_2$

Os valores isotópicos de nitrogênio-15 ( $^{15}\text{N}$ ) também são expressos na notação delta per mil da razão isotópica  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  do produto em relação ao padrão internacional.

Diferentemente do carbono, a razão isotópica  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  nas plantas não depende do ciclo fotossintético realizado, e sim do modo de fixação. Entretanto, embora a atmosfera seja abundante em  $\text{N}_2$ , somente as plantas que possuem bactéria fixadora de nitrogênio consegue fixá-lo do ar. As demais plantas o fixam através da incorporação de compostos nitrogenados do solo. Na maioria das leguminosas, por realizar simbiose com micorrizas, o valor de  $^{15}\text{N}$  varia em torno de uma unidade, próximo ao padrão ( $^{15}\text{N} = 0,0 \pm 1,0\text{‰}$ ) (Handley & Raven, 1992; Werner & Schimidt, 2002). O  $^{15}\text{N}$  das plantas que não conseguem fixar o nitrogênio atmosférico é dependente, em grande parte, da abundância isotópica do solo e da variação causada pela adubação (Choi et al., 2002). Se absorvido da matéria orgânica decomposta, o valor do  $\delta^{15}\text{N}$  é mais significativo, aproximadamente 10‰ (Shibuya et al., 2006). Contrariamente, valores negativos são observados em solos com baixa porcentagem de matéria orgânica, em particular solos secos e arenosos ou fertilizados com adubos industriais. Conforme Yoneyama (1996), adubos nitrogenados utilizados na agricultura possuem valores de enriquecimento relativo para  $^{15}\text{N}$  próximo a 0‰, porque a fonte de nitrogênio utilizada pelas indústrias para a fabricação de adubo é o nitrogênio atmosférico.

#### *Isótopos do hidrogênio e oxigênio*

Para os isótopos estáveis do hidrogênio, o padrão internacional é o Standard Mean Ocean Water, abreviadamente SMOW. Já os padrões isotópicos do oxigênio podem ser o PDB ou SMOW (Ducatti, 2007).

Avaliações dos isótopos de hidrogênio e oxigênio são aplicadas em estudos que visam determinar a caracterização da origem geográfica. Estudos reportaram que o conteúdo de  $^{18}\text{O}$  e  $^2\text{H}$  na água consumida pelos animais exibe estreita correlação com aqueles encontrados nos produtos animais, como leite, manteiga e queijo (Manca et al., 2001). Esta transferência isotópica tem sido base para ecologistas na determinação do padrão migratório de pássaros (Wassenaar & Hobson, 2001), em razão de tais isótopos estarem sujeitos a processos de fracionamento, como evaporação, condensação e precipitação, que estão, todavia, atrelados à dependência da latitude. Isso porque a evaporação das águas do oceano reduz a concentração dos isótopos pesados na água das nuvens comparadas com aquelas do mar. Como as nuvens se movem em direção ao continente e atingem latitude e altitude superiores, ocorre redução na temperatura que, atrelada a novos eventos de evaporação,

condensação e precipitação, ocasionam a supressão na concentração de Deutério ( $^2\text{H}$ ) na água das chuvas (Craig, 1961).

Assim, a água subterrânea reflete as mudanças no gradiente isotópico (Dansgaard, 1964). Logo, a água ingerida pelos animais pode repercutir tal sinal isotópico. Ainda, a composição isotópica do hidrogênio nos tecidos vegetais não apenas reflete a água absorvida, mas também é resultado dos efeitos resultantes da evaporação, difusão durante a transpiração e troca isotópica entre moléculas orgânicas e água da planta (Barbour et al., 2005).

A variação do  $^{18}\text{O}$  na hidrosfera segue padrão análogo ao que ocorre com o deutério.

#### *Isótopos estáveis na experimentação com ruminantes*

A utilização dos isótopos estáveis ambientais na Zootecnia e a rastreabilidade nos animais começa com a sua principal fonte de alimentação, as plantas e os subprodutos do ciclo fotossintético  $\text{C}_3$  (arroz, trigo, cevada, alfafa, outros), com valor médio do enriquecimento isotópico relativo do carbono-13 de  $\delta^{13}\text{C} = -28\text{‰}$ , e as plantas e seus subprodutos do ciclo fotossintético  $\text{C}_4$  (cana-de-açúcar, milho, gramíneas tropicais etc), com valor médio de  $\delta^{13}\text{C} = -12\text{‰}$ .

Assim ocorrendo, percebe-se a existência da diferença isotópica entre elas [ $\Delta(\text{C}_4, \text{C}_3) = \delta\text{C}_4 - \delta\text{C}_3$ ] da ordem de 16‰.

Esta ponderação abre perspectiva na alimentação e ou rações utilizadas pelos animais, uma vez que o erro cometido na determinação da variabilidade natural do carbono pelo espectrômetro de massas é de 0,2‰, permitindo com segurança a rastreabilidade destes ingredientes, a qual é extensiva aos isótopos estáveis dos bioelementos.

Jones et al. (1979), em experimento de alternância de plantas  $\text{C}_4$  (pangola) e  $\text{C}_3$  (cowpea hay) contra o tempo, foi fundamental nos experimentos de alimentação em animais de grande porte (ruminantes) analisando as excretas. Neste experimento, os autores obtiveram a figura de uma onda quadrada ( $\delta^{13}\text{C}$  versus tempo), na qual se verificou um patamar de equilíbrio isotópico para a oferta de plantas  $\text{C}_4$  e outro para a alimentação  $\text{C}_3$ , durante 120 dias.

Assim procedendo, se utilizar os valores médios do patamar de equilíbrio isotópico  $\text{C}_3$  e o patamar  $\text{C}_4$ , obtém-se um gabarito entre as fontes de alimentação (A e B). Ofertando os dois alimentos de interesse no pasto ou em confinamento, obtém-se o valor isotópico no produto (P) gerado, o qual permite obter quantitativamente os alimentos digeridos e assimilados pela equação de balanço de massa e isotópico;

$$(a) \delta a + (b) \delta b = \delta P; \quad a + b = 1,$$

na qual (a) e (b) indicam o índice participativo de cada alimento (no cálculo, basta inserir  $b = 1 - a$  na expressão).

A continuidade dos valores isotópicos nos subprodutos, entre os patamares isotópicos gerados pela Fonte A e posteriormente pela Fonte B, é função exponencial do tempo (segunda classe de experimento).

Ducatti et al. (2002), em estudo da síntese e degradação de metabólitos sob regime de dieta a base de plantas  $C_3$  e  $C_4$ , ou misturas isotópicas, com valores de  $\delta$  distintos entre si, propuseram uma função exponencial expressa pela equação:

$$\delta_t = \delta_f + [\delta_i - \delta_f] e^{-kt}$$

na qual o principal parâmetro de análise é a constante  $k$  (constante de alimentação, constante de troca ou constante de *turnover*) em unidade de tempo<sup>-1</sup>, a qual permite a mensuração da meia vida  $T = \ln 2/k$ , em unidade de tempo.

Os valores de  $\delta_i$  e  $\delta_f$  poderiam ser por exemplo  $\delta C_4$  e  $\delta C_3$ , respectivamente, ou vice e versa. O valor de  $\delta_t$  reflete o enriquecimento isotópico relativo em qualquer tempo ( $t$ ) no experimento em condução.

O comportamento da equação geral do *turnover* e a interpretação dos conceitos empregados podem ser visualizados na Figura 1.

Neste sentido, o conceito da meia-vida ( $T = \ln 2/k$ ) torna-se um parâmetro de ordem prática a ser mensurado. A expressão para a meia-vida sugere que tecidos (fígado, músculo etc) com meia-vida curta apresentam “alta velocidade” de metabolização ou incorporação dos isótopos estáveis no tecido em questão, e o inverso, como o caso do colágeno do osso, apresenta “baixa velocidade” de incorporação no tecido. Tieszen et al. (1983) sugerem que esta observação seja interpretada da seguinte forma: os

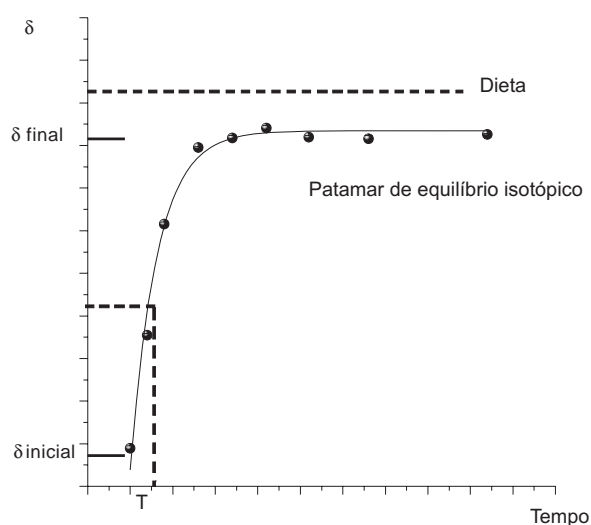


Figura 1 - *Turnover* isotópico, meia vida ( $T$ ) e patamar de equilíbrio isotópico.

tecidos mais ativos metabolicamente devem apresentar taxa de *turnover* mais rápida que os tecidos menos ativos.

A constante ( $k$ ) é importante também na estimativa do tempo ( $t$ ), para que ocorra a troca ( $f$ ) de 99% dos átomos iniciais ( $\delta_i$ ) pelos átomos finais ( $\delta_f$ ) através de  $t = (-1/k) \ln (1-f)$ .

Da Silva (2003) obteve uma função exponencial do tipo sigmoidal de Boltzmann (desenho aproximado da letra S estendida, em gráfico de  $\delta^{13}C$  versus tempo) no estudo da determinação da fase lactente-ruminante em cordeiros, ofertando ração  $C_3$  em *creep-feeding* e alimentando-se também do leite  $C_4$ . Esse autor constatou uma atividade ruminal plena aos 30 – 35 dias de vida, através do conceito de meia-vida.

Na técnica de rastreabilidade do produto de origem animal na alimentação dos animais, utiliza-se o sistema de equações com dois isótopos estáveis na formação do produto, expresso por:

$$(a)\delta_a + (b)\delta_b = \delta^{13}C$$

$$(a)\delta'a + (b)\delta'b = \delta^{15}N,$$

ou três isótopos se assim for necessário. O símbolo linha (') expressa a indicação do enriquecimento isotópico relativo do nitrogênio-15 nas duas fontes de alimentações. Isolando (b) entre elas e igualando-as entre si, obtém-se o índice participativo (a) da fonte vegetal no produto final.

No sentido de evitar o fator de fracionamento entre a fonte e o produto ou mesmo as diferentes concentrações de carbono e nitrogênio entre as diversas fontes e o produto, a experiência tem recomendado utilizar o mesmo tecido utilizado nas fontes (músculo) e produto (músculo) ou fontes (sangue) e produto (sangue), ou qualquer outro tecido de interesse nos dois tipos de experimentos (patamar de equilíbrio isotópico ou função exponencial).

#### *Aplicação prática da técnica dos isótopos estáveis com ruminantes*

#### *Análise dos isótopos estáveis x Discriminação de dietas*

Os isótopos estáveis têm sido utilizados há décadas em estudos com animais ruminantes, pelo fato de os valores isotópicos determinados terem como base os alimentos assimilados, e não apenas os alimentos ingeridos. Portanto, permitem a obtenção de informações de dietas consumidas recentemente ou até mesmo aquelas que foram fornecidas no período inicial da vida dos animais (Hobson & Clark, 1992).

Ludlow et al. (1976) propuseram uma técnica para determinação das proporções de espécies de plantas  $C_3$  e  $C_4$  na dieta dos animais. A técnica baseou-se no fato de que, no processo fotossintético, o  $^{13}C$  do  $CO_2$  atmosférico sofre

discriminação isotópica em relação ao total de carbono, quando integrado aos tecidos das plantas. No caso de plantas que possuem a via fotossintética do ácido carboxílico ( $C_4$ ), a abundância isotópica do  $^{13}C$  chega aproximadamente -12 a -14 ‰, enquanto em plantas do ciclo de Calvin ( $C_3$ ) os valores se situam entre -26 e -28 ‰. Posteriormente, Lourenço et al. (1984) estudaram o grau de seletividade da dieta em vacas leiteiras, mantidas em pastos de gramínea e leguminosa, através do  $\delta^{13}C$  determinado nas fezes, no leite e sangue. Piasentier et al. (2003) analisaram, além do isótopo  $^{13}C$ , o  $^{15}N$  e reportaram que os valores para o  $^{15}N$  podem ter sofrido interferência em função do tipo de solo, possível presença de plantas leguminosas na dieta e ainda ser oriunda dos próprios fatores metabólicos do animal.

#### *Análise dos isótopos estáveis x Rastreabilidade*

Bahar et al. (2005), com o intuito de testar a técnica dos isótopos no sistema de rastreabilidade para autenticação de produtos de origem animal, estudaram as alterações na composição dos isótopos estáveis de carbono e nitrogênio no músculo de bovinos. Concluíram que a composição desses isótopos no músculo estudado alterou consideravelmente, devido à substituição da silagem de capim ( $C_3$ ) pela silagem de milho ( $C_4$ ) na dieta de bovinos de corte. No entanto, o tecido muscular estudado mostrou não ser adequado para mudanças curtas e recentes de dietas, pois os autores verificaram que, após 167 dias de experimento, o *turnover* do tecido não tinha sido completo, refletindo o  $\delta^{13}C$  da antiga dieta.

Knobbe et al. (2006) estudaram as razões isotópicas de carbono e nitrogênio para fins de rastreabilidade, no leite e na urina de vacas sob diferentes regimes alimentares, e encontraram valores estáveis do  $\delta^{13}C$  do leite e da urina 10 dias após o início da mudança de dieta de  $C_4/C_3$  para  $C_3$ . Após mudança da alimentação de  $C_3$  para  $C_4/C_3$ , os valores de  $\delta^{13}C$  foram alcançados em 6 dias.

Estes estudos comprovam que a escolha do tecido ou órgão animal no estudo de rastreabilidade para autenticação de produtos influencia as conclusões sobre a dieta, pois tecidos com rápido metabolismo indicam dietas recentes, enquanto aqueles com taxa de substituição lenta indicam alimentos ingeridos anteriormente.

A técnica dos isótopos também pode ser utilizada em processos de autenticação e certificação do leite, como um complemento para os processos de certificação existentes.

Molkentin (2009) estudou a associação do isótopo de carbono e do ácido  $\alpha$ -linolênico presentes na gordura do leite, para verificar sua aplicabilidade como indicadores na autenticação do leite orgânico na Alemanha. A princípio os

valores para a identificação do leite orgânico alemão foram estabelecidos para delimitar quase todas as amostras de leite convencional. Esse autor conseguiu diferenciar o leite orgânico alemão do convencional, visto que o leite orgânico produzido na Alemanha é proveniente de animais cuja dieta é baseada em forrageiras do ciclo fotossintético  $C_3$ . Assim, o fornecimento de milho ( $C_4$ ), principalmente no inverno, foi o que possibilitou diferenciar o leite orgânico do convencional. Porém, se esta mesma pesquisa fosse executada nas condições brasileiras, provavelmente não haveria diferença para o sinal isotópico do elemento carbono, entre leite orgânico e convencional, pois a grande maioria das forrageiras cultivadas no Brasil realiza a via  $C_4$  em seu ciclo fotossintético.

A análise da razão isotópica de apenas um elemento pode não ser suficiente para fornecer informação inequívoca sobre atribuições ou características de determinado produto. Entretanto, análises combinadas, ou seja, utilizando mais de um elemento, podem incrementar ou até mesmo promover link entre informações, a fim de promover melhor entendimento sobre o objeto em estudo.

#### *Isótopos estáveis x discriminação da origem geográfica*

Se por um lado, as análises dos elementos estáveis carbono e nitrogênio têm permitido determinar a dieta dos animais, por outro a análise conjunta com os isótopos de oxigênio e hidrogênio nos tecidos pode prover indicação da origem geográfica dos animais. Para estes últimos elementos, dados de estudos com bovinos evidenciaram que a variação na composição nos tecidos ocorreu de forma similar àquela encontrada na água consumida pelos animais.

No entanto, o uso da técnica dos isótopos estáveis para inferir origem geográfica ainda necessita de estudos além de estar sujeita a fatores de fracionamento. Deve-se considerar alguns pontos, por exemplo, tempos de *turnover* metabólico no tecido ou até mesmo a movimentação de animais antes do abate (Schwagele, 2005). Contudo, há uma série de publicações (Tabela 2) específicas relativas à identificação de origem geográfica e regime de produção de carnes, utilizando a análise de isótopos de elementos múltiplos (Kelly et al., 2005).

Ainda, a análise dos isótopos foi utilizada por Schmidt et al. (2005), em pesquisa que possibilitou distinguir bovinos criados em países da Europa e América (Figura 2), produtos lácteos produzidos em diferentes regiões da Austrália (Critenden et al., 2007) e a origem geográfica da carne distribuída no Japão (Nakashita et al., 2008).

A possibilidade de escolha de um produto, tendo como base sua identificação geográfica, animais de raças com características apreciadas ou sistemas de produção com

Tabela 2 - Análises isotópicas de multielementos em estudos com origem geográfica

Produtos	Isótopos avaliados	Referências
Carne		
Gado	$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$	Hegerding et al. (2002)
Gado	$^2\text{H}/^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ , $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ , $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$	Boner & Forstel (2004)
Gado	$^2\text{H}/^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ , $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$	Renou et al. (2004)
Carneiro	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ , $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$	Piasentier et al. (2003)
Produtos lácteos		
Leite	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ , $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ , $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$	Kornexl et al. (1997)
Queijo	$^2\text{H}/^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ , $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ , $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$	Pillonel et al. (2004)
Manteiga	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ , $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ , $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ , $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ , $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$	Rossmann et al. (2000)

Fonte: Adaptado de Kelly et al. (2005).

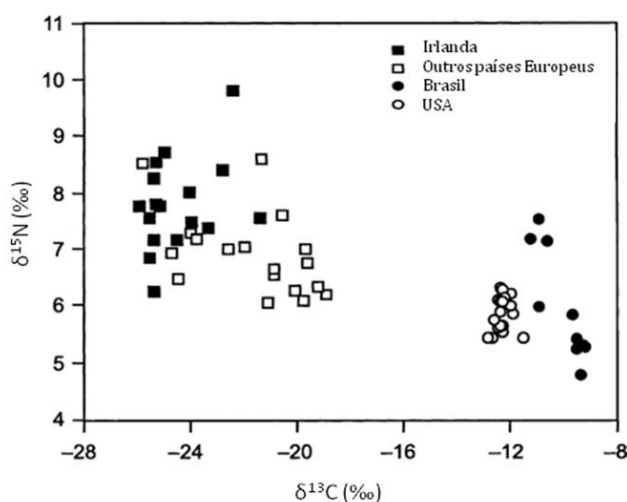


Figura 2 - Valores em permil (‰) para carbono e nitrogênio de músculos livres de lipídios de bovinos criados em diferentes países.

Fonte: Adaptado de Schmidt et al. (2005).

tipo de alimentação peculiar, pode servir como interessante estratégia comercial.

Seria conveniente em futuros trabalhos determinar a composição isotópica dos bovinos produzidos no Brasil, numa estratégia de agregar valor à carne de animais criados em pastagens tropicais ( $C_4$ ), especialmente daqueles produzidos no Pantanal Brasileiro. Tendo em vista que este bioma compreende características peculiares de clima, solo e precipitação, a execução de novas tecnologias pode ter sucesso.

#### *Pesquisas desenvolvidas no Centro de Isótopos Estáveis Ambientais da UNESP – campus Botucatu*

Da Silva (2003) verificou a eficácia da técnica dos isótopos estáveis de carbono na determinação da fase de transição do consumo da dieta basicamente líquida (leite) para dieta líquida sólida (leite, ração). Foram coletadas diariamente amostras de fezes de cordeiros recebendo leite

(mamando) proveniente de ovelhas alimentadas com dieta  $C_4$  e tiveram acesso ao *creep-feeding* com ração  $C_3$  desde o nascimento. O modelo de regressão sigmoide de Boltzmann foi o que melhor explicou o comportamento da dinâmica de consumo do grupo durante 60 dias de vida.

Combinando o modelo linear da diluição isotópica simples com o modelo sigmoide, pode-se estimar as proporções do leite ( $C_4$ ) e ração ( $C_3$ ) ingeridos e assimilados pela seguinte equação:

$$a = 1/[1 + \exp(t - x_0)/dx],$$

em que  $a$  = proporção do alimento  $C_3$  adimensional;  $x_0$  = ponto de inflexão da sigmoide (meia vida), em dias;  $t$  = tempo experimental (dias de vida);  $dx$  = constante de tempo da sigmoide (dias).

Assim, verificou-se a grande importância do leite durante as quatro primeiras semanas de vida e o consumo da ração no *creep-feeding* após este período. A técnica dos isótopos estáveis do carbono foi adequada para explicitar, com acurácia, as contribuições percentuais das fontes  $C_3$  e  $C_4$  na dieta dos cordeiros.

Avaliaram-se também a precisão e a praticidade da técnica na determinação da preferência alimentar de ovinos. Para isso, Martins (2010) estudou o *turnover* do carbono nas fezes e sangue de ovinos alimentados com plantas  $C_3$  (feno de alfafa) e  $C_4$  (silagem de milho) e verificou que o sangue possui *turnover* mais lento, ou seja, uma troca mais lenta de carbono da nova dieta, e as fezes *turnover* mais rápido. Estas diferenças analisadas entre as fezes e o sangue demonstraram claramente que o tipo de tecido em estudo influencia o *turnover*, ou seja, a troca mais rápida ou mais lenta do carbono. Por esses motivos, as fezes mostraram ser o melhor indicativo para determinação da preferência alimentar dos ovinos, sendo consideradas indicadoras de consumo.

Para os cálculos da preferência, utilizou-se a mensuração da composição isotópica natural do carbono nos alimentos e nas fezes. O modelo de mistura de duas fontes alimentares isotopicamente diferentes entre si foi

aplicado para verificar a proporção destas fontes na dieta alimentar em condições de confinamento.

A técnica dos isótopos estáveis na determinação da preferência alimentar mostrou ser muito viável, proporcionando alta precisão nos resultados e facilidade na condução do estudo.

Atualmente, alguns trabalhos estão em fase de execução no Centro de Isótopos Estáveis da UNESP/Botucatu, onde é pesquisada a possível utilização da análise de isótopos estáveis de carbono, nitrogênio, oxigênio e deutério como método traçador da dieta de bovinos jovens, no sangue, plasma, fezes, fígado, tecido muscular e adiposo, pela avaliação da taxa de fracionamento e *turnover* isotópico dos elementos. Além disso, desenvolve-se estudo do potencial da análise de isótopos estáveis de multi-elementos (C, N, O, H) para rastrear a carne de bovinos criados em diferentes sistemas de produção (confinamento tradicional, superprecoce e sistema de produção em pastagens) como ferramenta de autenticação e certificação de origem.

### Conclusões

Análises envolvendo isótopos estáveis dos bioelementos (CHON'S) apresentam-se como uma ferramenta promissora. Entretanto, estudos utilizando animais, principalmente ruminantes, ainda são incipientes. Ainda são necessárias metodologias e equipamentos acessíveis para que estas análises possam ser executadas de maneira rotineira no País.

### Referências

- BAHAR, B.; MONAHAN, F.J.; MOLONEY, A.P. et al. Alteration of the carbon and nitrogen stable isotope composition of beef by substitution of grass silage with maize silage. **Rapid Communications Mass Spectrometry**, v.19, p.1937-1942, 2005.
- BARBOUR, M.M.; HUNT, J.E.; DUNGAN, R.J. et al. Variation in the degree of coupling between  $\delta^{13}\text{C}$  of phloem sap and ecosystem respiration in two mature *Nothofagus* forests. **New Phytologist**, v.166, p.497-512, 2005.
- BOUTTON, T.W. Stable carbon isotope ratios of soil organic matter and their use as indicators of vegetation and climate change. In: BOUTTON, T.W.; YAMASAKI, S-I. (Eds.) **Mass spectrometry of soils**. New York: Marcel Dekker, 1996. p.47-82.
- CHOI, W.J.; LEE, S.M.; RO, H.M. et al. Natural  $^{15}\text{N}$  abundances of maize and soil amended with urea and composted pig manure. **Plant and Soil**, v.245, 223-232, 2002.
- CRAIG, H. Isotopic variations in meteoric water. **Science**, v.133, p.1702-1703, 1961.
- CRISS, R.E. **Principles of stable isotope distribution**. New York: Oxford University Press, 1999. 254p.
- CRITTENDEN, R.G.; ANDREW, A.S.; LEFOURNOUR, M. et al. Determining the geographic origin of milk in Australasia using multi-element stable isotope ratio analysis. **International Dairy Journal**, v.17, p.421-428, 2007.
- DA SILVA, J.J. **Determinação da fase lactente** – ruminante em cordeiros pelas técnicas do  $\delta^{13}\text{C}$  e micro-histologia fecal. 2003. 43f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- DANSGAARD, W. Stable isotopes in precipitation. **Tellus**, v.16, p.436-468, 1964.
- 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. **Isótopos estáveis ambientais**. Curso de Pós-graduação. Disciplina: Aplicação de Isótopos Estáveis Ambientais. Programa de Pós-graduação em Zootecnia. FMVZ/UNESP. 2007. 204p. [Apostila]
- DUCATTI, C.; CARRIJO, A.S.; PEZZATO, A.C. et al. Modelo teórico e experimental da reciclagem do carbono-13 em tecidos de mamíferos e aves. **Scientia Agrícola**, v.59, n.1, p.29-33, 2002.
- FRY, B.; SHERR, E.B.  $\delta^{13}\text{C}$  measurements as indicators of carbon flow in marine and fresh water ecosystems. **Contribution in Marine Science**, v.27, p.13-47, 1984.
- GANNES, L.Z.; DEL-RIO, C.M.; KOCH, P. Natural abundance variations in stable isotopes and their potential uses in animal physiological ecology. **Comparative Biochemistry Physiology**, v.119, p.725-737, 1998.
- 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.
- HOBSON, K.A.; CLARK, R.G. Assessing avian diets using stable isotopes I: turnover of  $\delta^{13}\text{C}$  in tissues. **The Condor**, v.94, p.181-188, 1992.
- JONES R.; LUDLOW M.; TROUGHTON, J. Estimation of the proportion of  $\text{C}_3$  and  $\text{C}_4$  plant species in diet of animals from the ratio of natural  $^{12}\text{C}$  and  $^{13}\text{C}$  isotopes in the faeces. **Journal of Agricultural Science**, v.18, p.91-100, 1979.
- KELLY, S.D.; HEATON, K.; HOOGEWERFF, J. Tracing the geographical origin of food: the application of multi-element and multi-isotope analysis. **Trends in Food Science and Technology**, v.16, p.555-567, 2005.
- KENNEDY, B.V.; KROUSE, H.R. Isotope fractionation by plants and animals: implications for nutrition research. **Canadian Journal Physiology and Pharmacology**, v.68, p.960-972, 1990.
- 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.; ARCARO JÚNIOR, I. Variações de valores de  $\delta^{13}\text{C}$  nas fezes, leite e sangue de vacas em lactação mantidas em pastagens exclusivas de gramíneas ou consorciadas. **Boletim da Indústria Animal**, v.41 (n.único), p.183-192, 1984.
- LUDLOW, M.M.; TROUGHTON, J.H.; JONES, R.J. A technique for determining the proportion of  $\text{C}_3$  and  $\text{C}_4$  species in plant samples using stable natural isotopes of carbon. **Journal Agricultural Science**, v.87, p.625-632, 1976.
- MANCA, G.; CAMIN, F.; COLORU, G. C. et al. Characterization of the geographical origin of Pecorino Sardo cheese by casein stable isotope ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) ratios and free amino acid ratios. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.3, p.1404-1409, 2001.
- MARTINS, M.B. **Turnover de carbono e a preferência alimentar de ovelhas por isótopos estáveis**. 2010. 68p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- MOLKENTIN, J. Authentication of organic milk using  $\delta^{13}\text{C}$  and the  $\alpha$ -linolenic acid content of milk fat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p.785-790, 2009.
- NAKASHITA, R.; SUZUKI, Y.; AKAMATSU, F. et al. Stable carbon, nitrogen, and oxygen isotope analysis as a potential tool for

- verifying geographical origin of beef. **Analytica Chimica Acta**, v.617, p.148-152, 2008.
- PIASSENTIER, E.; VALUSSO, R.; CAMIN, F. et al. Stable isotope ratio analysis for authentication of lamb meat. **Meat Science**, v.64, p.239-247, 2003.
- PRESTON, T. The measurement of stable isotope natural abundance variation. **Plant Cell and Environment**, v.15, p.1091-1097, 1992.
- SCHWAGELE, F. Traceability from an European perspective. **Meat Science**, v.71, p.164-173, 2005.
- SCHMIDT, O.; QUILTER, J.M.; BAHAR, B. et al. Inferring the origin and dietary history of beef from C, N and S stable isotope ratio analysis. **Food Chemistry**, v.91, p.545-549, 2005.
- SHIBUYA, E.K.; SARKIS, J.E.S.; NETO, O.N. et al. Souring Brazilian marijuana by applying IRMS analysis to seized samples. **Forensic Science International**, v.160, p.35-43, 2006.
- TIESZEN L.L.; BOUTTON T.W.; TESDAHL, K.G. et al. 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.
- VOGEL, J.C. Variability of carbon isotope fractionation during photosynthesis. In: EHLERINGER, J.R.; HALL, A.E.; FARQUHAR, G.D. (Eds.). **Stable isotopes and plant carbon: water relations**. San Diego: Academic Press, 1993. p.29-46.
- WASSENAAR, L.I.; HOBSON, K.A. A stable-isotope approach to delineate geographical catchment areas of avian migration monitoring stations in North America. **Environmental Science and Technology**, v.35, n.9, p.1845-1850, 2001.
- WERNER, R.A.; SCHMIDT, H.L. The in vivo nitrogen isotope discrimination among organic plant compounds. **Phytochemistry**, v.61, p.465-784 2002.
- YONEYAMA, T. Characterization of natural  $^{15}\text{N}$  abundances of soils. In: BOUTTON, T.W.; YAMASAKI, S.I. (Eds.). **Mass spectrometry of soils**. New York: Marcel Dekker, 1996. p.205-224.