

Caracterização isotópica ($\delta^{13}\text{C}$) de rações comerciais de suínos

Projeto

Rebecca Philipa Braga Terra

Licenciatura em
Ciências Agrárias- Ramo de Zootecnia



Angra do Heroísmo

[2025]

Caracterização isotópica ($\delta^{13}\text{C}$) de rações comerciais de suínos

Projeto

Rebecca Philipa Braga Terra

Tutora

Professora Doutora Mayra Anton Dib Saleh

Projeto submetido como requisito parcial para aprovação na unidade curricular de Projeto da licenciatura em Ciências Agrárias – Ramo de Zootecnia.



Índice

1 - Resumo.....	I
2 - Abstract	II
3 - Introdução	1
4 - Perspetivas futuras no que respeito à aplicabilidade da IRMS	4
5 - Objetivos	5
6 - Metodologia	6
7 - Resultados	8
8 - Discussão	9
9 - Conclusão.....	11
10 - Anexo 1	12
11 - Anexo 2.....	13
12 - Anexo 3	14
13 - Anexo 4.....	15
14 - Referências bibliográficas.....	16

Índice de Figuras

Figura 1.....	4
Figura 2.....	7

Resumo

O uso de isótopos estáveis tem crescido nas pesquisas agropecuárias. A análise da relação isotópica pode ser uma alternativa importante para responder à exigência e qualidade procurada pelo mercado. A caracterização das rações animais e rastreabilidade dos ingredientes que as compõe são exemplos do que esta técnica pode oferecer.

As plantas de diferentes ciclos fotossintéticos (C_3 e C_4) apresentam diferentes valores de discriminação isotópica ($\delta^{13}\text{C}$), tornando assim, possível a execução desta técnica.

O objetivo geral deste trabalho experimental foi identificar o sinal isotópico de rações comerciais de suínos e, o objetivo específico, correlacionar o sinal isotópico final dessas rações com o sinal isotópico do ingrediente mais utilizado nas respectivas formulações.

Para isso, analisaram-se quatro rações comerciais para suínos, produzidas na ilha Terceira, abrangendo duas fases produtivas: de lactação (T_1 e T_2) e cria (T_3 e T_4). As composições das rações foram registradas com base nas informações presentes nos rótulos das embalagens, visando à identificação da matéria-prima com maior inclusão na fórmula.

As amostras foram submetidas a processos de secagem, desengorduramento e moagem para garantir a homogeneidade antes da análise isotópica. A determinação dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ foi realizada por espectrometria de massas no Laboratório de Isótopos Estáveis Ambientais da UNESP e os resultados foram analisados estatisticamente utilizando o software SAS, com o teste de Tukey adotando 5% de significância.

Os valores de $\delta^{13}\text{C}$ nas rações comerciais de lactação foram de -17,83‰ para a ração T_1 e de -14,30‰ para a ração T_2 , refletindo diferentes proporções de ingredientes vegetais do tipo C_4 (como o milho). No que respeita às rações destinadas à fase de cria, a ração T_3 apresentou o valor isotópico mais negativo (-18,87‰), indicando uma maior predominância de ingredientes C_3 , enquanto a ração T_4 registou um valor de -14,51‰, sugerindo uma formulação com maior inclusão de milho (C_4) ou uma composição mista C_3 - C_4 .

Palavras-chave: isótopos; sinal isotópico; discriminação isotópica; formulação

Abstract

The use of stable isotopes has been increasing in agricultural research. The analysis of isotopic ratios can be an important alternative to meet the demand for quality that the market highly seeks. The characterization of animal feeds and the traceability of their ingredients are examples of what this technique can offer.

Plants with different photosynthetic pathways (C_3 and C_4) exhibit distinct isotopic discrimination values ($\delta^{13}\text{C}$), thus enabling the application of this technique.

The general objective of this experimental study was to identify the isotopic signature of commercial swine feeds, while the specific objective was to correlate the final isotopic signature of these feeds with the isotopic signature of the most used ingredient in their formulations.

To this end, four commercial swine feeds produced on Terceira Island were analyzed, covering two production phases: lactation (T_1 and T_2) and nursery (T_3 and T_4). The feed compositions were recorded based on the information available on the package labels, aiming to identify the raw ingredient with the highest inclusion in the formula.

Samples underwent drying, defatting, and grinding processes to ensure homogeneity before isotopic analysis. The determination of $\delta^{13}\text{C}$ values was performed by isotope ratio mass spectrometry at the Environmental Stable Isotopes Laboratory of UNESP, and the results were statistically analyzed using SAS software, with Tukey's test applied at a 5% significance level.

The $\delta^{13}\text{C}$ values in commercial lactation feeds were -17.83‰ for feed T_1 and -14.30‰ for feed T_2 , reflecting different proportions of C_4 -type plant ingredients (such as corn). Regarding the feeds intended for the weaning phase, feed T_3 showed the most negative isotopic value (-18.87‰), indicating a higher predominance of C_3 ingredients, whereas feed T_4 registered a value of -14.51‰ , suggesting a formulation with greater maize (C_4) inclusion or a mixed C_3 - C_4 composition.

Keywords: isotopes; isotopic signature; isotopic discrimination; formulation

Introdução

Os avanços nos programas de nutrição e reprodução, nas práticas de gestão, bem como as melhorias nas condições sanitárias e nas infraestruturas das explorações contribuíram para o aumento da produtividade e da qualidade na produção de suínos em contextos comerciais (Amorim *et al.*, 2017).

Para intensificar ainda mais a produtividade pecuária, é fundamental utilizar de forma eficiente os recursos alimentares disponíveis localmente. No caso dos monogástricos, essa eficiência está fortemente associada ao melhor aproveitamento das proteínas, especialmente as de origem vegetal (Makkar, 2008). Assim, torna-se essencial oferecer uma dieta nutricionalmente adequada, por meio da criteriosa seleção e formulação de ingredientes que atendam às exigências de manutenção, crescimento e produção dos animais, uma vez que desequilíbrios nutricionais comprometem de forma significativa o desempenho na fase atual e nas subsequentes (Jaramillo *et al.*, 2022).

Os ingredientes utilizados na formulação de rações animais contêm diversas moléculas biológicas, compostas por átomos de diferentes elementos químicos. Cada elemento possui propriedades químicas únicas e ocupa uma posição definida na tabela periódica, determinada pelo número de prótons presentes em seu núcleo, ou seja, pelo seu número atômico (O'Brien, 2015).

Nas últimas décadas, verificou-se que os processos químicos, biológicos e físicos geram "assinaturas isotópicas" únicas em materiais biológicos, permitindo rastrear as origens de substâncias orgânicas (Gannes *et al.*, 1998). Nesse contexto, a aplicação de isótopos estáveis tem crescido em pesquisas agropecuárias, sendo uma alternativa promissora para investigar processos relacionados ao metabolismo de nutrientes em humanos e animais, além de possibilitar a rastreabilidade e certificação de dietas animais (Pearson *et al.*, 2003; Piasentier *et al.*, 2003; Förstel, 2007).

Os isótopos são átomos de um mesmo elemento químico que diferem pelo número de nêutrons e, conseqüentemente, pela sua massa atômica. Pelo facto de apresentarem-se com igual número de elétrons, possuem propriedades químicas semelhantes, mas diferem nas propriedades físicas (Ducatti *et al.*, 2011). Assim, podem ser classificados em instáveis ou estáveis. Os instáveis, também chamados de radioativos, sofrem desintegrações espontâneas, libertando partículas nucleares ou radiação eletromagnética, originando isótopos radiogênicos. Por outro lado, os isótopos estáveis não passam por processos de desintegração e são amplamente encontrados na biosfera, sendo elementos essenciais nos ciclos hidrológico, geológico e

biológico, como o hidrogénio, carbono, nitrogénio, oxigénio e enxofre (Clark & Fritz, 1997; Gannes *et al.*, 1998).

Cada elemento químico apresenta um isótopo estável leve predominante, como o carbono-12 (^{12}C), hidrogénio-1 (^1H), oxigénio-16 (^{16}O) e nitrogénio-14 (^{14}N), além de um ou dois isótopos estáveis mais pesados, como o carbono-13 (^{13}C), hidrogénio-2 (^2H), oxigénio-17 (^{17}O), oxigénio-18 (^{18}O) e nitrogénio-15 (^{15}N). A abundância desses isótopos na natureza é expressa em percentagem atómica. No caso do carbono, o ^{12}C representa abundância isotópica de aproximadamente 98,89%, enquanto para o ^{13}C , corresponde a cerca de 1,11% (Bowling *et al.*, 2008).

Apesar de os isótopos estáveis de um mesmo elemento formarem ligações químicas equivalentes, diferenças em suas massas atómicas resultam em variações subtis nas velocidades de reação. Isso gera o fracionamento isotópico, que por sua vez, altera as proporções entre os isótopos pesados e leves (O'Brien, 2015).

As proporções isotópicas estáveis (*Stable Isotope Ratios* - SIRs) de elementos como o carbono, o nitrogénio e o enxofre variam naturalmente entre os vários alimentos, refletindo a origem ecológica dos seus componentes. As medições das SIRs são obtidas através de proporções relativas à razão isotópica do padrão internacional e expressas em unidades delta (δ) per mil (‰), ao invés de proporções absolutas. Isso deve-se ao facto de as amostras apresentarem a composição isotópica próxima à abundância natural (Inácio & Urquiaga, 2017).

As SIRs funcionam como biomarcadores diretos, quantificáveis nos tecidos e pouco influenciados por processos endógenos, o que aumenta a robustez das associações dietéticas (Skrzypek, 2013). Assim, o uso de isótopos estáveis como indicadores permite inferir informações sobre a dieta de curto e longo termo, conforme a taxa de renovação do tecido analisado (O'Brien, 2015; Ducatti *et al.*, 2011).

A fotossíntese é um dos principais fatores que influenciam a variação isotópica do carbono nas plantas (Brien, 2015). Elas são agrupadas principalmente em dois tipos conforme o mecanismo de fixação de CO_2 durante a fotossíntese: ciclo C_3 e ciclo C_4 . Nas plantas C_3 , o primeiro composto orgânico formado é um ácido carboxílico, que possui três átomos de carbono, enquanto nas plantas C_4 , o primeiro composto orgânico formado apresenta quatro átomos (DeNiro & Epstein, 1981; Kennedy & Krouse, 1990).

O ciclo fotossintético C_3 é característico de muitas dicotiledóneas, como árvores, soja, arroz, trigo, cevada e algodão; enquanto, o ciclo C_4 é encontrado em culturas como milho, cana-de-açúcar, sorgo e forrageiras típicas de regiões tropicais e subtropicais (DeNiro & Epstein, 1981; Kennedy & Krouse, 1990).

Durante o processo de assimilação e fotossíntese do CO_2 pelas plantas, um fenómeno biofísico ocorre, a chamada discriminação isotópica, que indica o ganho ou perda isotópica relativa do produto em relação à fonte precursora (Fry & Sherr, 1989). Para percebermos a importância desse fenómeno, torna-se necessário inicialmente saber que o CO_2 atmosférico (que atua como a principal fonte de carbono para as plantas não-aquáticas), apresenta um valor isotópico ($\delta^{13}\text{C}$) em torno de $-7,7\text{‰}$ (Farquhar *et al.*, 1982). Após ser utilizado na fotossíntese, uma redução da concentração de ^{13}C e aumento da concentração de ^{12}C ocorrem.

Desse modo, as plantas de diferentes ciclos fotossintéticos apresentarão diferentes valores de discriminação isotópica ($\delta^{13}\text{C}$), que teoricamente consiste na diferença entre a proporção de isótopos pesados em relação aos isótopos leves em uma dada amostra em comparação com o padrão (Jaramillo *et al.*, 2022). Assim, em termos práticos, as plantas C_3 que utilizam o ciclo de Calvin-Benson, apresentarão valores de $\delta^{13}\text{C}$ que variarão entre -22 a -34‰ , com valor modal de $-26,7\text{‰}$ (Park & Epstein, 1961; Caswell *et al.*, 1973).

Em contrapartida, as plantas C_4 que utilizam o ciclo Hatch-Slack, acabarão por apresentar valores $\delta^{13}\text{C}$ entre -9 a -16‰ , com valor modal de $-12,6\text{‰}$ (Park & Epstein, 1961; Caswell *et al.*, 1973). O sinal negativo indica uma menor concentração de ^{13}C em relação ao padrão internacional isotópico. Desse modo, devido ao fracionamento isotópico que ocorre durante a fotossíntese, podemos afirmar que as plantas C_3 e C_4 apresentam assinaturas isotópicas distintas (Gessler *et al.*, 2014).

Os valores de ^{13}C são comparados ao padrão internacional *Peedee Belemnite* (PDB), derivado do carbonato sólido de belemnite da norte-americana, uma formação rochosa da Carolina do Sul, amplamente aceite para análises isotópicas (Gessler, 2024).

Devido à diferença isotópica intermédia de 14‰ (conforme Figura 1), explicada pelo facto das rotas bioquímicas, na produção de hidratos de carbono serem distintas (Ducatti *et al.*, 2011) e à maior concentração de ^{13}C nas plantas C_4 em comparação com as C_3 , é possível utilizar essas plantas e seus derivados como marcadores em estudos na alimentação animal (Hobson & Clark, 1992), sem necessidade de utilizar compostos marcados sinteticamente (Ducatti *et al.*, 2002).

Caracterização isotópica ($\delta^{13}\text{C}$) de rações comerciais de suínos

A determinação precisa da relação entre a composição isotópica do carbono de um animal e a sua dieta, com base nos valores de $\delta^{13}\text{C}$ de animais e plantas recolhidos no campo é limitada por dois fatores principais. O primeiro refere-se às variações sazonais na composição isotópica da dieta que podem ser significativas, com diferenças superiores a 5‰ ao longo da estação de crescimento. Assim, a análise de componentes recentemente sintetizadas ou a utilização de um valor integrado da dieta são essenciais para maior precisão. O segundo fator pressupõe que os herbívoros consomem as plantas disponíveis de forma aleatória, mas a escolha alimentar pode influenciar os valores de $\delta^{13}\text{C}$ ingeridos. Esse efeito é particularmente relevante quando a dieta inclui plantas C_3 e C_4 (DeNiro *et al.*, 1978).

Para a execução dessas análises, utilizam-se espectrômetros de massa, que determinam a concentração dos diferentes isótopos em amostras gasosas (H_2 , CO_2 , N_2 e SO_2) (Vogel, 1993). Recorre-se às análises isotópicas de mais do que um elemento para obter resultados fidedignos, caso contrário faltaria informação suficiente para conseguir determinar as características ou atribuições de um dado produto. A análise dos elementos carbono e nitrogénio permite determinar a dieta dos animais e a indicação geográfica dos animais pela análise conjunta dos elementos oxigénio e hidrogénio nos respetivos tecidos (Ducatti *et al.*, 2011).

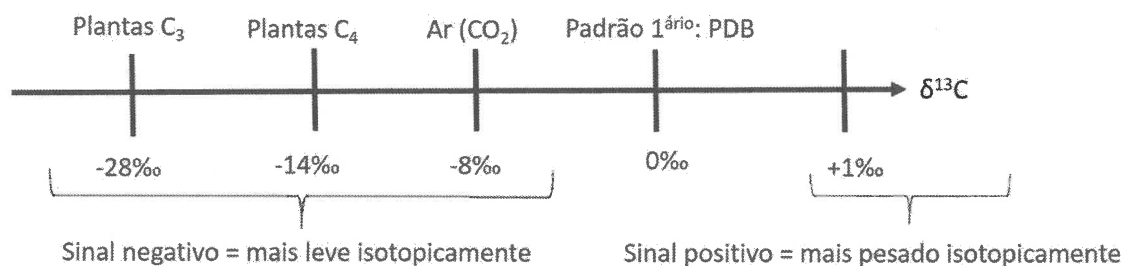


Figura 1. Régua isotópica com os valores intermédios ($\delta\text{‰}^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$) das plantas C_3 e C_4 .

Perspetivas futuras no que respeito à aplicabilidade da IRMS

As razões isotópicas estáveis (SIRs) têm um grande potencial para serem usadas como biomarcadores dietéticos. Isso deve-se à variabilidade entre os diferentes tipos de alimentos, à precisão com que são capturadas nos tecidos e à facilidade com que podem ser medidas. Além disso, elas permanecem estáveis em amostras armazenadas, o que possibilita análises retroativas. No entanto, para que se tornem ferramentas eficazes na rastreabilidade nutricional, ainda são necessários mais estudos para validar esses biomarcadores, especialmente no que diz respeito à melhoria de sua especificidade (Inácio & Urquiaga, 2017).

Estudos controlados de alimentação são essenciais para entender como os biomarcadores isotópicos se relacionam com a ingestão alimentar. Esses estudos são importantes ao longo do tempo, pois as medições isotópicas capturam sinais dietéticos acumulados. Para garantir a precisão, é necessário que as medições isotópicas correspondam à dieta consumida durante cada fase do estudo (O'Brien, 2015).

Esses estudos devem utilizar as melhores metodologias para medir o sistema de alimentação, reconhecendo que pode haver distorções nos resultados. Para aumentar a precisão das medições de isótopos estáveis, novas abordagens estão sendo exploradas, como a combinação das SIRs com outros biomarcadores dietéticos ou a medição de isótopos em moléculas diretamente relacionadas aos alimentos. A validação dessas abordagens deve considerar diversos componentes da dieta, garantindo que os biomarcadores SIR sejam interpretados corretamente no contexto de monitorização e rastreamento das origens e trajetórias dos nutrientes, visando garantir sua qualidade e segurança ao longo da cadeia alimentar (Förstel, 2007).

Além disso, o avanço da aplicabilidade da IRMS em contextos agroalimentares requer a construção de bancos de dados isotópicos regionais robustos e representativos, que sirvam como referência para a identificação de padrões específicos de ingredientes e produtos. A IRMS pode ser usada como uma ferramenta estratégica no combate à fraude alimentar e na garantia da autenticidade dos alimentos, sobretudo em regiões com elevada diversidade agrícola. A integração de análises isotópicas com métodos estatísticos multivariados tem-se mostrado promissora para melhorar a rastreabilidade e o controle de qualidade ao longo da cadeia de produção (Caxito & Silva, 2015).

Nesse contexto, a análise da relação isotópica ($\delta^{13}\text{C}$) pode ser uma ferramenta valiosa para caracterizar rações animais, auxiliando nutricionistas na formulação de rações com base na disponibilidade de matérias-primas locais e garantindo a rastreabilidade dos ingredientes, em resposta às crescentes exigências do mercado agropecuário por qualidade e certificação de origem.

Objetivos

O presente trabalho teve por objetivo geral identificar o sinal isotópico de rações comerciais de suínos e, por objetivo específico, correlacionar o sinal isotópico final dessas rações com o sinal isotópico do ingrediente de maior inclusão em sua formulação.

Metodologia

O experimento consistiu na aquisição de quatro rações comerciais para suínos, produzidas na ilha Terceira, abrangendo duas fases de alimentação: lactação (intitulada como T₁ e T₂) e cria (intituladas como: T₃ e T₄). As composições das rações foram registadas com base nas informações presentes nos rótulos das embalagens, visando à identificação da matéria-prima com maior inclusão na fórmula.

Após a homogeneização prévia das sacas adquiridas, uma subamostragem foi realizada, com o objetivo de separar porções representativas de 1000 g de cada uma das rações (T₁, T₂, T₃ e T₄). As subamostras foram acondicionadas em sacos plásticos transparentes previamente identificados e seladas termicamente a vácuo.

Posteriormente, as amostras foram enviadas por correio aéreo internacional ao laboratório de análises isotópicas ambientais da Universidade Estadual Paulista (UNESP, Estado de São Paulo, Brasil), onde foram submetidas à secagem em estufa de ventilação forçada (marca Marconi, modelo MA-035/5), adotando os procedimentos do método 934.01 exigidos pela *Association of Official Analytical Chemists - AOAC* (2019), sendo então desengorduradas em aparelho de Soxhlet (marca Tecnal, modelo TE-044), segundo o método 920.39 (AOAC, 2019). Essa etapa foi necessária, pois a fração lipídica pode ocasionar fracionamento isotópico de até 5‰ nos valores de ^{13}C (Piasentier *et al.*, 2003).

De seguida, as amostras foram submetidas a nova secagem em estufa de ventilação forçada a 50°C durante meia hora, para evaporação do reagente utilizado no desengorduramento das amostras. Após arrefecimento, as amostras foram moídas em moinho criogénico à temperatura de -196°C (marca SPEX SamplePrep Geno/Grinder, modelo 2010) para obtenção de material homogéneo com granulometria menor ou igual a 60 μm , de forma a evitar problemas de repetibilidade no momento da análise.

Na sequência, uma quantidade aproximada de 70 μg dessas amostras foram pesadas em triplicado em balança analítica (marca Mettler Toledo, modelo MX5) utilizando cápsulas de estanho, as quais foram posteriormente introduzidas por meio de amostrador automático no analisador elementar (marca Thermo Fisher Scientific, modelo Flash 2000 CHNS/O), no qual, em presença de oxigénio, cada amostra sofreu combustão para a obtenção quantitativa de CO_2 , conforme diagrama de fluxo fornecido na Figura 2.

Os gases formados foram separados em coluna cromatográfica gasosa e analisados no espectrómetro de massas de razões isotópicas (marca Thermo Fisher Scientific, modelo IRMS

Caracterização isotópica ($\delta^{13}\text{C}$) de rações comerciais de suínos

Delta V Advantage), no Laboratório de Isótopos Estáveis Ambientais da UNESP, campus de Botucatu, Brasil.

Os resultados dessas análises foram expressos em notação delta per mil ($\delta^{13}\text{C}$, ‰) em relação ao padrão internacional *Peedee Belemnite* (PDB), com erro de análise da ordem de 0,2‰, utilizando a seguinte equação:

$$\delta^{13}\text{C}_{(\text{amostra, padrão})} = \left\{ \left[\left(\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \right)_{\text{amostra}} - \left(\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \right)_{\text{padrão}} \right] / \left(\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \right)_{\text{padrão}} \right\} \times 1000, \text{ onde:}$$

$\delta^{13}\text{C}$ = enriquecimento do isótopo mais pesado $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ da amostra em relação ao padrão internacional; expresso em ‰

R = razão isotópica entre o isótopo menos e mais abundante ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$); adimensional.

Os dados obtidos pelas análises isotópicas foram compilados em ficheiro utilizando-se o software *Microsoft Office Excel* e posteriormente submetidos à análise estatística, utilizando-se o software *SAS* (2023) adotando o procedimento GLM para análise de variância dos dados. No que respeita à avaliação das diferenças entre as médias foi utilizado o teste de Tukey, considerando-se 5% como nível de significância.

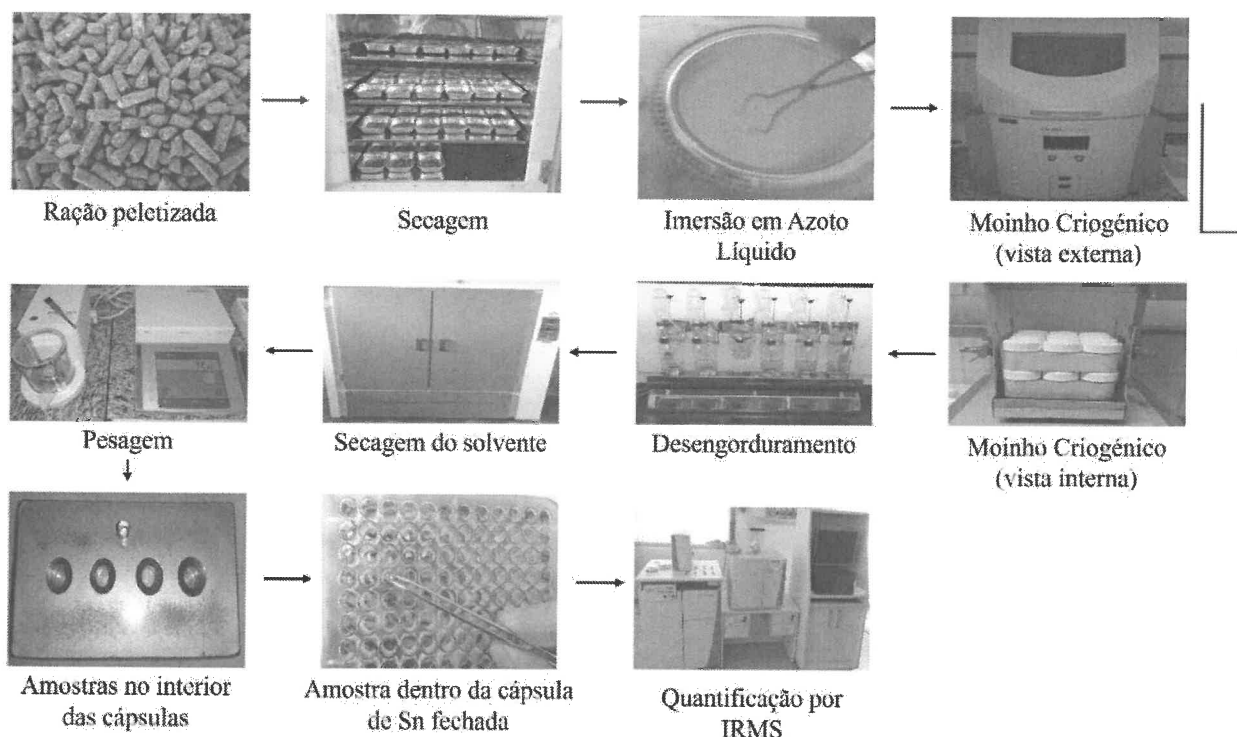


Figura 2. Etapas de tratamento pré-analíticas das rações.

Resultados

A seguinte Tabela 1 apresenta os valores isotópicos de $\delta^{13}\text{C}$ de rações de duas categorias de suínos, sendo respectivamente, as T₁ e T₂ de lactação e as T₃ e T₄ de cria.

Tabela 1. Sinais isotópicos médios das rações comerciais de suínos.

Sinal	*T ₁	*T ₂	*T ₃	*T ₄
isotópico ($\delta^{13}\text{C}$)**	-17,83‰ ± 0,01 b	-14,30‰ ± 0,1 d	-18,87‰ ± 0,01 a	-14,51‰ ± 0,02 c

*T₁ e T₂: referem-se às rações de lactação e T₃ e T₄: referem-se às rações de leitões.

** n = 3 ± desvio padrão, sendo as letras minúsculas na linha diferentes entre si pelo teste de Tukey a 5%.

As diferenças observadas entre os sinais isotópicos das rações comerciais foram estatisticamente significativas ($P < 0,0001$), de acordo com a análise de variância. O teste de comparações múltiplas de Tukey ($\alpha = 0,05$) revelou diferenças significativas entre todas as combinações entre as médias: T₁ vs. T₂, T₁ vs. T₃, T₁ vs. T₄, T₂ vs. T₃, T₂ vs. T₄, e T₃ vs. T₄, com valores de $P \leq 0,001$ entre todas as comparações.

O sinal isotópico $\delta^{13}\text{C}$ da ração T₁ (-17,83‰) aproximou-se do intervalo típico de -17‰ a -20‰ (Bontempo *et al.* 2014), associado à presença de uma elevada proporção de milho (planta C₄, $\delta^{13}\text{C} \approx -13\text{‰}$) em sua composição, combinada com ingredientes de origem C₃, como colza, trigo, palmiste e girassol, conforme o fornecido no Anexo 1.

A ração T₂ apresentou um sinal isotópico de -14,30‰, valor menos negativo em comparação com a ração T₁. Esta diferença poderá ser atribuída à inclusão de uma proporção ainda maior de milho na fórmula, de acordo com os dados do Anexo 2. A maior presença de milho, cuja assinatura isotópica é mais enriquecida em ^{13}C , resultou em um aumento do valor de $\delta^{13}\text{C}$, ou seja, tornou o sinal isotópico da ração menos negativo.

No caso da ração T₃, observou-se um sinal isotópico mais negativo (-18,87‰), resultado de uma composição mais diversificada entre ingredientes C₄ (milho) e C₃ (soja, trigo, girassol, palma). Embora o milho representasse cerca de 45% da formulação (Anexo 3), a maior participação de ingredientes C₃ (cerca de 38%) contribuiu para a diminuição do valor de $\delta^{13}\text{C}$.

Por sua vez, a ração T₄ apresentou um sinal isotópico de -14,51‰ (Anexo 4), valor que refletiu uma formulação mista, com predominância de milho (C₄) e presença de ingredientes de origem C₃, como soja, trigo, alfarroba e cevada. Assim, o valor obtido situou-se numa faixa intermédia, influenciado pela combinação de matérias-primas C₃ e C₄.

Discussão

Como a aplicação da técnica de isótopos estáveis em estudos de nutricionais ainda é relativamente recente e sua utilização tem se concentrado maioritariamente em estudos de rastreabilidade de produtos cárneos (especialmente para a detecção de fraudes), há uma escassez de pesquisas voltadas à caracterização isotópica de rações, especialmente para suínos. Essa lacuna na literatura reforça a originalidade e a relevância do presente estudo. Consequentemente, a limitação no número de referências citadas nesta seção deve-se a essa realidade.

De acordo com Bontempo *et al.* (2014), os valores de $\delta^{13}\text{C}$ nas rações estão fortemente associados à proporção relativa de ingredientes vegetais do tipo C_3 e C_4 . Ingredientes do tipo C_4 , como o milho e o sorgo, apresentam valores isotópicos $\delta^{13}\text{C}$ mais enriquecidos (entre -11% e -13%), enquanto ingredientes do tipo C_3 , como trigo, cevada, soja, girassol ou colza, revelam valores isotópicos $\delta^{13}\text{C}$ mais negativos, geralmente inferiores a -25% . Assim, a composição isotópica de uma ração mista depende da proporção relativa desses ingredientes, refletindo-se diretamente no valor isotópico final de $\delta^{13}\text{C}$ da formulação.

No presente estudo, observou-se que os valores isotópicos ($\delta^{13}\text{C}$) das quatro rações analisadas se enquadraram nos intervalos descritos na literatura para formulações mistas, com diferentes graus de predominância de ingredientes C_4 ou C_3 (Boecklen *et al.*, 2011; Bontempo *et al.*, 2014).

As rações T_1 e T_2 , destinadas à fase de lactação, revelaram valores de $\delta^{13}\text{C}$ $-17,83\%$ e $-14,30\%$, respectivamente. A ração T_1 apresentou uma composição equilibrada, com inclusão significativa de milho (C_4), o que justificou um valor relativamente enriquecido. No entanto, a presença marcante de ingredientes C_3 , como trigo, girassol, colza e palmiste, contribuiu para tornar o sinal isotópico mais negativo do que seria esperado para uma ração exclusivamente C_4 . Enquanto a ração T_2 , com uma formulação mais centrada no milho geneticamente modificado, registou um $\delta^{13}\text{C}$ mais elevado (menos negativo), condizente com a sua maior proporção de ingredientes C_4 e menor presença de fontes C_3 .

Para além dos valores aqui apresentados, Amorim *et al.* (2017) relataram um valor isotópico $\delta^{13}\text{C}$ de $-16,14\%$ na ração destinada a porcas em lactação, valor que se situa dentro do intervalo encontrado no presente estudo para as formulações T_1 e T_2 , devido à maior inclusão de milho (planta C_4) na fórmula.

Relativamente às rações de cria, T_3 e T_4 , a tendência manteve-se. A ração T_3 apresentou o valor mais negativo entre todas as rações ($-18,87\%$), o que refletiu uma predominância clara de ingredientes do tipo C_3 em sua composição – como a farinha de soja, trigo, girassol e óleo de

soja. Embora o milho estivesse presente (cerca de 45%), a sua proporção não foi suficiente para compensar o contributo isotopicamente mais leve em ^{12}C dos restantes ingredientes. A ração T₄, por outro lado, apresentou uma quantidade considerável de milho expandido (C₄), o que se traduziu em um sinal isotópico menos negativo ($\delta^{13}\text{C}$ -14,51‰). Ainda assim, a presença significativa de ingredientes C₃ como soja, trigo e cevada conferiu-lhe um sinal isotópico intermédio, característico de formulações mistas.

Estes resultados estão em concordância com os dados apresentados por Amorim *et al.* (2016) que relataram valores isotópicos para rações de leitões, conforme as recomendações de Rostagno *et al.* (2011), respetivamente de -26,86‰ (ração pré-inicial I), -27,11‰ (ração pré-inicial II) e -27,46‰ (ração inicial). Esses valores indicam uma maior proporção de plantas C₃ na formulação, principalmente arroz e farelo de soja (aproximadamente 82%, $\delta^{13}\text{C} \approx -28\text{‰}$), e uma menor inclusão de plantas C₄, como o milho (cerca de 15%, $\delta^{13}\text{C} \approx -17,40\text{‰}$).

Os valores reportados por Saleh *et al.* (2018) corroboram os observados no presente estudo, com valores isotópicos para rações de leitões de -26,49‰ (ração pré-inicial I), -27,49‰ (ração pré-inicial II) e -28,77‰ (ração inicial), também conforme as recomendações de Rostagno *et al.* (2011). Esses dados evidenciam uma predominância de plantas C₃, como arroz e farelo de soja (em torno de 83%, $\delta^{13}\text{C} \approx -28\text{‰}$), e menor participação de plantas C₄, como milho (aproximadamente 12%, $\delta^{13}\text{C} \approx -17,40\text{‰}$), reforçando a utilidade da análise isotópica na caracterização da composição vegetal das rações e na distinção entre formulações com diferentes proporções de ingredientes C₃ e C₄.

A metodologia isotópica permite ainda identificar alterações nas fontes de ingredientes que possam decorrer de variações sazonais, regionais ou de processos de fabrico, contribuindo para a melhoria contínua do controlo da alimentação animal (Assoni *et al.*, 2017).

Além disso, conforme discutido por Saleh *et al.* (2018), a análise isotópica do carbono não só permite distinguir entre ingredientes C₃ e C₄, como também oferece *insights* valiosos para monitorizar a variabilidade da dieta ao longo do tempo e a sua relação com o desempenho produtivo dos animais.

Segundo Saleh *et al.* (2018), a aplicação combinada da análise isotópica com outras técnicas analíticas, como a avaliação química detalhada e a determinação da digestibilidade, permite uma caracterização mais completa da qualidade nutricional das rações.

Complementando essa abordagem, Santos *et al.* (2019) destacaram que o uso de isótopos estáveis, além de permitir a avaliação precisa da origem vegetal das rações, é eficaz para controlar adulterações em ingredientes declarados nas formulações comerciais. A integração da técnica

isotópica com dados de rotulagem e composição declarada permite identificar desvios entre o rótulo e o conteúdo real, fornecendo respaldo científico para auditorias e regulamentações no setor agroalimentar. Ainda segundo os autores, a estabilidade e confiabilidade dos dados isotópicos, mesmo após processamento industrial dos alimentos, conferem uma vantagem analítica relevante para a rastreabilidade alimentar em toda a cadeia de produção.

Em suma, o presente estudo, ao corroborar os dados de Assoni *et al.* (2017), evidenciou o potencial da análise isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ como ferramenta científica indispensável na avaliação e otimização da composição vegetal das rações, alinhando-se com as melhores práticas descritas na literatura (Saleh *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2019). Tal abordagem contribui para garantir a qualidade, autenticidade e sustentabilidade das formulações alimentares utilizadas na produção animal.

Para além disso, os resultados obtidos no presente estudo confirmam que a discriminação isotópica dos ingredientes provenientes de plantas com distintos ciclos fotossintéticos (C_3 e C_4), assim como, os princípios da diluição isotópica foram observados conforme descrito por Hobson & Clark (1992), Jones *et al.* (1979) e Tieszen *et al.* (1983).

Como perspectiva futura, o presente estudo sugere a ampliação da aplicação da análise isotópica para monitorizar variações sazonais e regionais nas matérias-primas, assim como para avaliar impactos de diferentes processos industriais sobre a composição das rações. A integração da técnica IRMS com outras metodologias analíticas poderá fornecer um quadro ainda mais completo para garantir a autenticidade e sustentabilidade das formulações alimentares, promovendo avanços na segurança alimentar e na eficiência produtiva do setor agropecuário.

Conclusão

Os valores isotópicos de $\delta^{13}\text{C}$ das rações comerciais analisadas confirmaram que as diferenças nos valores de $\delta^{13}\text{C}$ refletem as distintas proporções de ingredientes vegetais C_3 e C_4 nas formulações das rações, permitindo a distinção clara entre os diferentes tipos de rações e corroborando a eficácia da análise isotópica na caracterização da composição das rações comerciais de suínos.

Caracterização isotópica ($\delta^{13}\text{C}$) de rações comerciais de suínos

Anexo 1

Tabela 2. Composição centesimal da ração comercial de lactação.

Ingredientes (%)	T1
Milho geneticamente modificado	55
Bagaço de colza extratado	12
Bagaço de girassol	8
Bagaço de palmiste	5
Sêmea de trigo	10
Carbonato de cálcio	2
Cloreto de sódio	0,8
Fosfato dicálcico	1,5
Núcleo vitamínico-mineral	0,7
Material inerte	5
Total	100
Valores analisados	
Energia Metabolizável (kcal/kg)	2690
Proteína Bruta (%)	13,1
Fibra bruta (%)	6,4
Cinzas totais (%)	5,3
Metionina digestível (%)	0,27
Lisina digestível (%)	0,53
Metionina + Cisteína digestível (%)	0,73
Treonina digestível (%)	0,41
Triptofano digestível (%)	0,12
Cálcio total (%)	0,9
Fósforo total (%)	0,6
Sódio total (%)	0,3

Aditivos por kg de ração: Vitamina A: 1,6 UI, Vitamina D3: 99 UI, Vitamina E: 63 mg, Vitamina B1: 2 mg, Vitamina B2: 6 mg, Vitamina B6: 3 mg, Vitamina K3: 3 mg, Vitamina B12: 0,035 mg, Biotina: 0,6 mg, Sulfato de ferro monohidratado: 120 mg, Iodeto de potássio: 1,5 mg, Acetato de cobalto II tetra-hidratado: 50 mg, Sulfato de cobre pentahidratado: 10 mg, Quelato de cobre de glicina hidratado: 10 mg, Óxido de manganês: 50 mg, Óxido de zinco: 70 mg, Quelato de zinco de glicina hidratado: 50 mg, Selenito de sódio: 0,35 mg, L-lisina: 162 mg, Endo-1,4-beta-glucanase: 0,1 UI, Endo-1,3-beta-D-glucanase: 0,09 UI, Endo-1,4-beta-xilanase: 0,3 UI, Antioxidante BHT: 30 mg.

Caracterização isotópica ($\delta^{13}\text{C}$) de rações comerciais de suínos

Anexo 2

Tabela 3. Composição centesimal da ração comercial de lactação.

Ingredientes (%)	T2
Milho geneticamente modificado	58
Farelo de soja 46%	10
Bagaçõ de girassol	7
Sêmea de trigo	8
Óleo vegetal	3
Carbonato de cálcio	1,7
Cloreto de sódio	0,5
Fosfato dicálcico	1,5
Núcleo vitamínico-mineral	0,8
Material inerte	1,5
Total	100
Valores analisados	
Energia Metabolizável (kcal/kg)	2800
Proteína Bruta (%)	15
Fibra bruta (%)	5,8
Cinzas totais (%)	4,3
Metionina digestível (%)	0,43
Lisina digestível (%)	0,95
Metionina + Cisteína digestível (%)	0,72
Treonina digestível (%)	0,66
Triptofano digestível (%)	0,22
Cálcio total (%)	1,6
Fósforo total (%)	0,7
Sódio total (%)	0,3

Aditivos por kg de ração: Vitamina A: 1,5 UI, Vitamina D3: 100 UI, Vitamina E: 60 mg, Vitamina B1: 1,8 mg, Vitamina B2: 5,5 mg, Vitamina B6: 3 mg, Vitamina K3: 2,8 mg, Vitamina B12: 0,04 mg, Biotina: 0,7 mg, Sulfato de ferro monohidratado: 120 mg, Iodeto de potássio: 1,5 mg, Sulfato de cobre pentahidratado: 12 mg, Quelato de cobre de glicina hidratado: 12 mg, Óxido de manganês: 50 mg, Óxido de zinco: 80 mg, Quelato de zinco de glicina hidratado: 55 mg, Selenito de sódio: 0,4 mg, Endo-1,4-beta-glucanase: 0,1 UI, Endo-1,4-beta-xilanase: 0,3 UI, Antioxidante BHT: 30 mg.

Caracterização isotópica ($\delta^{13}\text{C}$) de rações comerciais de suínos

Anexo 3

Tabela 4. Composição centesimal da ração comercial de leitões (cria).

Ingredientes (%)	T3
Milho geneticamente modificado	45
Farelo de soja 45%	20
Soro de leite em pó	7
Bagaço de girassol	5
Sêmea de trigo	8
Proteína suína hidrolisada	2
Óleo de soja	3
Gordura vegetal de palma	2
Carbonato de cálcio	1,1
Fosfato dicálcico	1,2
Cloreto de sódio	0,5
Núcleo vitamínico-mineral	0,2
Material inerte	5
Total estimado	100
Valores analisados	
Energia metabolizável (kcal/kg)	3059,50
Proteína Bruta (%)	17,98
Fibra bruta (%)	4,4
Cinzas totais (%)	4,7
Metionina digestível (%)	0,291
Lisina digestível (%)	0,901
Metionina + Cisteína digestível (%)	0,471
Treonina digestível (%)	0,681
Triptofano digestível (%)	0,188
Cálcio total (%)	0,7
Fósforo total (%)	0,5
Sódio total (%)	0,2

Aditivos por kg de ração: Vitamina A: 2,5 unidades internacionais (UI), Vitamina D3: 99 UI, Vitamina E: 4 mg, Vitamina B1: 2 mg, Vitamina B2: 6 mg, Vitamina B6: 4 mg, Vitamina K3: 3 mg, Vitamina B12: 0,05 mg, Biotina: 1,2 mg, Betaina: 100 mg, Sulfato de ferro monohidratado: 100 mg, Iodeto de potássio: 1,0 mg, Quelato de cobre de glicina hidratado: 90 mg, Óxido de manganês: 50 mg, Óxido de zinco: 100 mg, Selenito de sódio: 0,25 mg, L-lisina: 12 mg, Metionina: 948 mg, Endo-1,4-beta-glucanase: 0,1 UI, Endo-1,3-beta-D-glucanase: 0,09 UI, Endo-1,4-beta-xilanase: 0,3 UI, Antioxidante BHT: 40 mg, Ácido láctico: 900 mg; Ácido fórmico: 300 mg.

Caracterização isotópica ($\delta^{13}\text{C}$) de rações comerciais de suínos

Anexo 4

Tabela 5. Composição centesimal da ração comercial de leitões (cria).

Ingredientes (%)	T4
Expandido de milho	20
Expandido de trigo	7
Soro de leite em pó	8
Expandido de cevada	4
Expandido de alfarroba	2
Milho	10
Sêmea de trigo	5
Concentrado proteico de soja	15
Proteína suína hidrolisada	3
Plasma suíno	3
Óleo de peixe	1,5
Óleo vegetal	3,5
Bagaço de soja	5
Carbonato de cálcio	1
Fosfato monocálcico	1,2
Núcleo vitamínico-mineral	1,3
Material inerte	0,5
Total estimado	100
Valores analisados	
Energia metabolizável (kcal/kg)	3400
Proteína Bruta (%)	16,4
Fibra bruta (%)	2,6
Cinzas totais (%)	4,0
Lisina digestível (%)	1,35
Metionina digestível (%)	0,30
Metionina + Cisteína digestível (%)	0,49
Treonina digestível (%)	0,83
Triptofano digestível (%)	0,27
Cálcio total (%)	0,52
Fósforo total (%)	0,55
Sódio total (%)	0,27

Aditivos por kg de ração: Vitamina A: 16000 unidades internacionais (UI). Vitamina D3: 2000 UI. Vitamina E: 120 mg. Vitamina B1: 1,5 mg. Vitamina B2: 5 mg. Vitamina B6: 2,5 mg. Vitamina K3: 1 mg. Vitamina B12: 0,03 mg. Biotina: 0,48 mg. Betaina: 500 mg. Pantotenato cálcico: 12 mg. Ácido fólico: 0,5 mg. Cloreto de colina: 300 mg. Aromatizantes: 500 mg. Carbonato ferroso: 120 mg. Iodeto de potássio: 1,0 mg. Quelato de ferro: 100 mg. Sulfato de manganês: 50 mg. Sulfato de cobre pentahidratado: 150 mg. Óxido de zinco: 120 mg. Selenito de sódio: 0,4 mg. Silica precipitada: 15 mg. 6-fitase: 300 FTU; Endo-1,4-beta-glucanase: 9,65 UI. Antioxidante BHT: 45 mg. Ácido nicotínico: 20 mg. Ácido láctico: 1000 mg. Ácido fórmico: 300 mg. Formiato de cálcio: 3000 mg.

Referências bibliográficas

- AOAC International. (2019). *Official methods of analysis of AOAC International* (21st ed.). AOAC International.
- Amorim, A. B., Berto, D. A., Saleh, M. A. D., Telles, F. G., Denadai, J. C., Sartori, M. M. P., Luiggi, F. G., Santos, L. S., & Ducatti, C. (2016). Effect of glutamine, glutamic acid and nucleotides on the turnover of carbon ($\delta^{13}\text{C}$) in organs of weaned piglets. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 29(8), 1152–1158. <https://doi.org/10.5713/ajas.15.0132>
- Amorim, A. B., Berto, D. A., Saleh, M. A. D., Miassi, G. M., & Ducatti, C. (2017). Dietary glutamine, glutamic acid and nucleotides increase the carbon turnover ($\delta^{13}\text{C}$) on the intestinal mucosa of weaned piglets. *Animal*, 11(9), 1472–1481. <https://doi.org/10.1017/S1751731117000192>
- Assoni, A., Amorim, A. B., Saleh, M. A. D., Tse, M. L. P., & Berto, D. A. (2017). Dietary glutamine, glutamic acid and nucleotide supplementation accelerate carbon turnover ($\delta^{13}\text{C}$) on stomach of weaned piglets. *Animal Nutrition*, 3(3), 225–231. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.04.006>
- Boecklen, W. J., Yarnes, C. T., Cook, B. A., & James, A. C. (2011). On the use of stable isotopes in trophic ecology. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 42, 411–440. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-102209-144726>
- Bontempo, L., Camin, F., Larcher, R., Wehrens, R., & Paolini, M. (2014). Stable isotope ratio analysis for authentication of animal feed. *Analytica Chimica Acta*, 820, 92–98. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.02.009>
- Bowling, D. R., Pataki, D. E., & Randerson, J. T. (2008). Carbon isotopes in terrestrial ecosystem pools and CO_2 fluxes. *New Phytologist*, 178(1), 24–40. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02342.x>
- Caswell, H., Reed, F., Stephenson, S. N., & Werner, P. A. (1973). Photosynthetic pathways and selective herbivory: A hypothesis. *The American Naturalist*, 107(956), 465–480. <https://doi.org/10.1086/282851>
- Caxito, F. A., & Silva, A. V. (2015). Isótopos estáveis: Fundamentos e técnicas aplicadas à caracterização e proveniência geográfica de produtos alimentícios. *Geonomos*, 23(1), 10–17. <https://doi.org/10.18285/geonomos.v23i1.657>
- Clark, I. D., & Fritz, P. (1997). *Environmental isotopes in hydrogeology*. Routledge. <https://doi.org/10.1201/9781482242911>

DeNiro, M. J., & Epstein, S. (1978). Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 42(5), 495–506. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(78\)90199-0](https://doi.org/10.1016/0016-7037(78)90199-0)

DeNiro, M. J., & Epstein, S. (1981). Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 45(3), 341–351. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(81\)90244-1](https://doi.org/10.1016/0016-7037(81)90244-1)

Ducatti, C., Carrijo, A. S., Pezzato, A. C., & Mancera, P. F. A. (2002). Modelo teórico e experimental da reciclagem do carbono-13 em tecidos de mamíferos e aves. *Scientia Agrícola*, 59(1), 29–33. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162002000100003>

Ducatti, C., Martins, C. L., Arrigoni, M. B., Martins, M. B., Vieira Júnior, L. C., & Denadai, J. C. (2011). Utilização de isótopos estáveis em ruminantes. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 40, 68–75. <https://www.sbz.org.br/revista/artigos/66298.pdf>

Farquhar, G. D., O'Leary, M. H., & Berry, J. A. (1982). On the relationship between carbon isotope discrimination and the inter-cellular carbon dioxide concentration in leaves. *Australian Journal of Plant Physiology*, 9(2), 121–137.

Fry, B., & Sherr, E. B. (1989). $\delta^{13}\text{C}$ measurements as indicators of carbon flow in marine and freshwater ecosystems. In P. W. Rundel, J. R. Ehleringer, & K. A. Nagy (Eds.), *Stable isotopes in ecological research* (vol. 68, pp. 196–229). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3498-2_12

Förstel, H. (2007). The natural fingerprint of stable isotopes – Use of IRMS to test food authenticity. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388(3), 541–544. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1241-z>

Gannes, L. Z., Martínez del Rio, C., & Koch, P. (1998). Natural abundance variations in stable isotopes and their potential uses in animal physiological ecology. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 119(3), 725–737. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(98\)01016-2](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(98)01016-2)

Gessler, A. (2024). Why leaves become isotopically lighter than photosynthetic carbon isotope discrimination explains: On the importance of post-photosynthetic fractionation. *Journal of Experimental Botany*, 75(5), 1210–1212. <https://doi.org/10.1093/jxb/erad497>

Gessler, A., Ferrio, J. P., Hommel, R., Treydte, K., Werner, R. A., & Monson, R. K. (2014). Stable isotopes in tree rings: Towards a mechanistic understanding of isotope fractionation and mixing processes from the leaves to the wood. *Tree Physiology*, 34(8), 796–818. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpu040>

Hobson, K. A., & Clark, R. G. (1992). Assessing avian diets using stable isotopes I: Turnover of ^{13}C in tissues. *The Condor*, 94(1), 181–188. <https://doi.org/10.2307/1368807>

Inácio, C. T., & Urquiaga, S. (2017). *Aplicações da análise de isótopos estáveis na agricultura* (52 p.). EMBRAPA Solos.

Jaramillo, D. M., Dubeux, J. C. B., Ruiz-Moreno, M., DiLorenzo, N., Vendramini, J. M. B., Sollenberger, L., Mackowiak, C., Queiroz, L. M. D., Abreu, D. S., Garcia, L., Santos, E. R. S., & Kieke, B. A. (2022). Stable isotopes of C and N differ in their ability to reconstruct diets of cattle fed C_3 – C_4 forage diets. *Scientific Reports*, 12, 17138. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-21051-4>

Jones, R. J., Ludlow, M. M., Troughton, J. H., & Blunt, C. G. (1979). Estimation of the proportion of C_3 and C_4 plant species in the diet of animals from the ratio of natural ^{12}C and ^{13}C isotopes in the faeces. *The Journal of Agricultural Science*, 92(1), 91–100. <https://doi.org/10.1017/S0021859600060843>

Kennedy, B. V., & Krouse, H. R. (1990). Isotope fractionation by plants and animals: Implications for nutrition research. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 68(7), 960–972. <https://doi.org/10.1139/y90-146>

Makkar, H. P. (2008). A review of the use of isotopic and nuclear techniques in animal production. *Animal Feed Science and Technology*, 140(3–4), 418–443. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.03.002>

O'Brien, D. M. (2015). Stable isotope ratios as biomarkers of diet for health research. *Annual Review of Nutrition*, 35(1), 565–594. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071714-034511>

Park, R., & Epstein, S. (1961). Metabolic fractionation of ^{13}C and ^{12}C in plants. *Plant Physiology*, 36(2), 133–138. <https://doi.org/10.1104/pp.36.2.133>

Pearson, S. F., Levey, D. J., Greenberg, C. H., & Martínez del Rio, C. (2003). Effects of elemental composition on the incorporation of dietary nitrogen and carbon isotopic signatures in an omnivorous songbird. *Oecologia*, 135, 516–523. <https://doi.org/10.1007/s00442-003-1221-8>

Piasentier, E., Valusso, R., Camin, F., & Versini, G. (2003). Stable isotope ratio analysis for authentication of lamb meat. *Meat Science*, 64(3), 239–247. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(02\)00183-3](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00183-3)

Remien, C. H. (2015). Modeling the dynamics of stable isotope tissue-diet enrichment. *Journal of Theoretical Biology*, 367, 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2014.11.018>

Caracterização isotópica ($\delta^{13}\text{C}$) de rações comerciais de suínos

Rostagno, H. S., Albino, L. F. T., Donzele, J. L., Gomes, P. C., Oliveira, R. F., Lopes, D. C., Ferreira, A. S., Barreto, S. L. T., & Euclides, R. F. (2011). *Brazilian tables for poultry and swine: Composition of feedstuffs and nutritional requirements* (3rd ed.). Universidade Federal de Viçosa.

Santos, L. S., Miassi, G. M., Tse, M. L. P., Gomes, L. M., Berto, P. M., Denadai, J. C., Caldara, J. R., Dalto, D. B., & Berto, D. A. (2019). Growth performance and intestinal replacement time of ^{13}C in newly weaned piglets supplemented with nucleotides or glutamic acid. *Livestock Science*, 227, 160-165. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2019.07.008>

Saleh, M. A., Santos, L. S., Berto, D. A., Amorim, A. B., Costa, V. E., & Ducatti, C. (2018). Timing carbon turnover ($\delta^{13}\text{C}$) in weaned piglet's brain by IRMS. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 90, 2469–2478. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820170861>

Saleh, M. A. D., Santos, L. S., Berto, D. A., Amorim, A. B., Tse, M. L. P., & Costa, V. E. (2019). IRMS as a tool to obtain the carbon turnover ($\delta^{13}\text{C}$) in organs of weaned piglets fed glutamic acid and nucleotides. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 103(3), 906–914. <https://doi.org/10.1111/jpn.13089>

SAS Institute Inc. (2023). *SAS® 9.4 (TSIM8)*. SAS Institute Inc.

Smith, B. N., & Epstein, S. (1971). Two categories of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios for higher plants. *Plant Physiology*, 47(3), 380–384. <https://doi.org/10.1104/pp.47.3.380>

Skrzypek, G. (2013). Normalization procedures and reference material selection in stable HCNOS isotope analyses: An overview. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(9), 2815–2823. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6517-2>

Tieszen, L. L., Boutton, T. W., Tesdahl, K. G., & Slade, N. A. (1983). Fractionation and turnover of stable carbon isotopes in animal tissues: Implications for $\delta^{13}\text{C}$ analysis of diet. *Oecologia*, 57(1), 32–37. <https://doi.org/10.1007/BF00379558>

Vogel, J. C. (1993). Variability of carbon isotope fractionation during photosynthesis. In J. R. Ehleringer, A. E. Hall, & G. D. Farquhar (Eds.), *Stable isotopes and plant carbon-water relations* (pp. 29–46). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-091801-3.50010-6>

Assinatura do Autor do Projeto



Rebecca Philipa Braga Terra

Assinatura do Tutor do Projeto



Prof^a. Doutora Mayra Anton Dib Saleh

Angra do Heroísmo, 27 de junho de 2025.