

Turnover do carbono em sangue e plasma, nas fases crescimento e postura, de codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*)

[Turnover of carbon in blood and plasma, growth stages and posture, japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*)]

G.E.M. Pimenta¹, J.C. Denadai², M.M.P. Sartori², A.C. Pezzato¹, J.R. Sartori¹, E.A. Garcia¹, A.N.D. Ishizuka¹, F.G. Luiggi¹, R. Fasanaro¹, G.A.M. Pasquali¹, E.T. Silva², C. Ducatti²

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ/UNESP – Botucatu, SP

²Centro de Isótopos Estáveis Ambientais – IBB/UNESP – Botucatu, SP

RESUMO

O estudo objetivou avaliar o *turnover* do ¹³C no sangue e plasma de codornas japonesas utilizando a técnica de isótopos estáveis, para a obtenção do patamar de equilíbrio isotópico que servirá de fundamento para estudos de rastreabilidade. Foram utilizadas 300 aves durante o período experimental de 1-42 e 49-97 dias de idade. Os tratamentos da primeira fase foram constituídos de dietas à base de arroz (C₃), contendo ou não farinha de carne e ossos bovinos e um com dieta à base de milho (C₄). Nessa primeira fase foi analisado o *turnover* do sinal isotópico do matrizeiro à base de dietas C₄ para dietas à base de C₃, como também as diferenças isotópicas das dietas contendo ou não farinha de origem animal. Na segunda fase houve uma substituição de dietas, ou seja, as aves no tratamento C₄ da primeira fase passaram a consumir dieta C₃, e o tratamento que antes consumia dieta C₃ passou para dieta C₄. Para determinar a taxa de *turnover* e o percentual estimado de participação da farinha na composição do material coletado, foi empregado o modelo de diluição isotópica utilizando valores do δ¹³C. A comparação entre as meias-vidas do sangue e plasma da primeira fase revelou o enriquecimento do δ¹³C na dieta; já na segunda fase foi possível observar as velocidades de incorporação após a troca das dietas.

Palavras-chave: codornas japonesas, farinha de origem animal, plantas C₃, plantas C₄, patamar de equilíbrio

ABSTRACT

The study aimed to evaluate the turnover of ¹³C in the blood and plasma of Japanese quail using the technique of stable isotopes to obtain the level of isotopic equilibrium that will be the foundation for studies of traceability. A total of 300 birds during the experimental period of 1-42 and 49-97 days of age. The first phase of the treatments consisted of diets based on rice (C₃), with or without meat and beef bones and a diet based on corn (C₄). This was first examined the turnover signal farm matrix isotope-based diets based diets C₄ to C₃, as well as isotopic differences of diets with or without animal meal. In the second stage there was a substitution of diets, or C₄ treatment of the first stage passes to consume C₃-based diet than before treatment and diet consumed C₃ to C₄ diet. To determine the **turnover** rate and the estimated percentage of participation of flour in the composition of the collected material was used isotope dilution model using δ¹³C values. A comparison of the half-lives of blood and plasma from the first phase discloses the enrichment of dietary δ¹³C, in the second phase was observed after incorporation speeds exchange diets.

Keywords: japanese quail, animal meal, C₃ plants, C₄ plants, a level of balance

Recebido em 15 de março de 2013

Aceito em 10 de junho de 2014

E-mail: gmpimenta@zootecnista.com

INTRODUÇÃO

A técnica de isótopos estáveis tem sido utilizada para o estabelecimento de esboço geral da via metabólica, empregando a forma isotópica de um dado elemento químico para marcar um metabólito, considerando que a composição dos tecidos do consumidor reflete a sua dieta. Um dos avanços mais significativos realizados com esse método foi a descoberta de que os componentes macromoleculares das células e dos tecidos sofrem um processo constante de renovação metabólica. Existe um estado de equilíbrio dinâmico no interior celular, no qual a biossíntese é constante e exatamente contrabalançada por igual velocidade de degradação (Maneta *et al.*, 2003). Esse processo de troca metabólica, “renovação celular”, é também chamado de taxa de reposição de tecidos biológicos ou taxa de *turnover*.

Os tecidos mais ativos metabolicamente (fígado e plasma sanguíneo) possuem taxas de *turnover* mais elevadas, refletindo a dieta recente, de poucos dias. Tecidos com taxas metabólicas intermediárias refletem uma dieta de semanas a meses, como no caso do músculo, pele, cérebro e hemácias, ao passo que tecidos menos ativos, como dentes e barbatanas, refletem uma dieta de anos (Tieszen *et al.*, 1983; Walker *et al.*, 1999; Alves-Stanley e Worthly, 2009).

A diferença natural, de 14‰ mais rica em ^{13}C , em plantas do ciclo fotossintético C_4 , em relação às plantas do ciclo C_3 , possibilita utilizar essas plantas e seus subprodutos como traçadores naturais em animais, sem a necessidade de síntese de compostos enriquecidos em ^{13}C ou a utilização de isótopos radioativos (Metges *et al.*, 1990).

O objetivo deste estudo foi avaliar a incorporação do sinal isotópico de dietas à base de plantas do ciclo fotossintético C_3 , contendo ou não farinha de origem animal na fase de crescimento, e o *turnover* do $\delta^{13}\text{C}$ pela substituição de dietas com base C_3 ou C_4 na fase de postura, em sangue e plasma de codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*) utilizando a técnica de isótopos estáveis.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na UNESP, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Campus de Botucatu/SP, no Laboratório de Nutrição de Aves/Câmara Bioclimática, durante os meses de fevereiro a maio de 2012. O protocolo experimental (nº56/2011-CEUA/FMVZ) foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) por estar de acordo com os princípios éticos na experimentação animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

As codornas foram obtidas de matrizes alimentadas com dietas compostas predominantemente por grãos de plantas de ciclo fotossintético C_4 . Ao nascerem, possuíam em seus tecidos corporais sinais isotópicos de ^{13}C semelhantes aos da dieta dessas matrizes.

O período experimental foi dividido em duas fases, período de crescimento e de postura. O primeiro período foi do dia 0-42 e o segundo, de 49-97 dias de idade. A temperatura e ventilação foram controladas a fim de manter a zona de conforto térmico (temperatura termoneutra) durante todo o período de criação. O resfriamento das salas foi realizado por meio da utilização de aparelhos de ar-condicionado, dotados de controle automático de temperatura. Os valores de temperatura e umidade relativa do ar (máxima e mínima) foram obtidos através de um termo-higrômetro para cada câmara.

As aves foram alojadas e distribuídas em gaiolas de arame galvanizado, medindo 0,40m de altura, 0,50m de largura e 0,60m de profundidade, dispostas em três andares e localizadas em uma câmara climatizada de ambiente termoneutra. As gaiolas foram revestidas com folhas de jornal e telas plásticas de malha de um centímetro para evitar fuga das aves e possíveis traumatismos nas pernas das mesmas.

Aos 32 dias de idade, as aves foram transferidas para a câmara bioclimática, a qual possuía 4,30m de comprimento por 4,50m de largura e 2,60m de altura. A sala comportava duas baterias de gaiolas, sendo a capacidade de cada uma de 180 aves. Cada bateria composta de cinco andares, com duas gaiolas por andar, com 1,00m de comprimento por 0,34m de largura e 0,16m de altura. As gaiolas foram equipadas com

Turnover do carbono...

comedouros, de chapa metálica galvanizada, e bebedouros tipo nipples.

Na fase de crescimento, foram utilizadas apenas as gaiolas dos três primeiros andares. A densidade de alojamento utilizada foi de aproximadamente 0,019m²/ave. Para que não houvesse mistura de rações pela dispersão causada pela ave ao mexer no comedouro, as aves do mesmo tratamento foram dispostas na mesma bateria.

Foram utilizadas 300 codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*), sexadas e com 1 dia de idade. As aves foram alojadas em delineamento inteiramente casualizado, com dois tratamentos e seis repetições, sendo a água e a ração fornecidas *ad libitum* durante todo o período de crescimento.

Os tratamentos consistiam em ASFB, dieta à base de quirera de arroz sem adição de farinha de carne e ossos bovinos, e ASFCO, dieta à base de quirera de arroz adicionada de farinha de carne e ossos bovinos.

Nos dias 0, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14, 19, 25, 32 e 42 do período experimental foram tomados aleatoriamente sangue e plasma das aves. Durante as primeiras coletas foi feito um *pool* de três aves para compor cada amostra das seis repetições por tratamento, devido ao tamanho corporal da espécie. Até a sétima coleta as aves foram sacrificadas por deslocamento da articulação craniocervical, as demais coletas de sangue foram realizadas da veia braquial, da asa esquerda das aves, com seringa e agulha descartáveis, sendo que cada ave analisada representou uma medida da unidade experimental.

Para a coleta das amostras no período experimental de postura (segunda fase), foram alimentadas 108 codornas de 1 a 42 dias de idade com dieta à base de milho adicionada de farinha de carne e ossos bovinos (MSFCO), além das acima descritas.

O delineamento experimental utilizado no período de postura foi inteiramente ao acaso, com dois tratamentos, sendo cada tratamento com seis repetições. Os tratamentos consistiam na troca de alimentação C₄ para C₃ e C₃ para C₄, ou seja: as aves que receberam ASFCO na fase

de crescimento para MSFCO na fase de postura, e MSFCO na fase de crescimento para ASFCO na fase de postura.

As dietas experimentais foram formuladas de modo a atender às exigências das aves de acordo com a composição nutricional; 22 e 20% de proteína; 0,9 e 3,10% de cálcio; 0,38 e 0,32% de fósforo disponível; 2900 e 2800kcal/kg para energia metabolizável e aminoácidos nas fases de crescimento e postura, respectivamente, estabelecidos por Rostagno *et al.* (2011).

Após a formulação das dietas, foram colhidas amostras para a determinação da razão isotópica ¹³C/¹²C das dietas. Os valores isotópicos (δ¹³C) das dietas da fase de crescimento analisados foram -28,79‰; -28,38‰ e -18,44‰, respectivamente para os tratamentos ASFB, ASFCO e MSFCO. Os valores (δ¹³C) das dietas da fase de postura foram -18,19‰ e -27,63‰, respectivamente para os tratamentos MSFCO e ASFCO.

Na fase de postura, os dias de coleta foram 0, 1, 2, 4, 7, 10, 14, 18, 23, 28, 35, 41 e 48 do período experimental. Aproximadamente 2mL de sangue foi coletado de cada ave, sendo que essa quantidade era fracionada em 0,7mL em microtubos plásticos para a amostragem de sangue e o restante em tubos de ensaio devidamente heparinizados e identificados.

Os tubos de ensaio foram centrifugados a uma velocidade de 5.000rpm em duração de 10 minutos. Após essa etapa o plasma foi pipetado em microtubos identificados e assim armazenados para o processamento.

Na etapa do processamento, as amostras foram liofilizadas em aparelho L108 (Liobras®). Primeiramente as amostras contidas nos microtubos plásticos foram acomodadas nas bandejas do equipamento. Essas bandejas foram acondicionadas em caixa criogênica contendo nitrogênio líquido, dando início ao processo de congelamento das amostras por 5 minutos.

Após esse período, essas bandejas foram retiradas cuidadosamente da caixa criogênica e colocadas no liofilizador. A duração do processo de liofilização foi de 48 horas, e as amostras foram secas a vácuo a -55°C e pressão em torno de 50μHg.

As amostras das dietas foram moídas em moinho criogênico (*Spex-modo 6750 freezer/mill, Metuchen, EUA*), a -196°C por 8 minutos, em frequência máxima, a fim de obter material homogêneo de finíssima granulometria, com aspecto de talco (Ducatti, 2004).

As análises isotópicas das amostras foram realizadas no Centro de Isótopos Estáveis Ambientais do Instituto de Biociências (CIEA/IBB) da UNESP, *Campus* de Botucatu, de forma que o material liofilizado foi colocado em cápsulas de estanho e pesado em balança analítica de alta sensibilidade, aproximadamente 50 a 70 μg de amostras de sangue e dietas e 70 a 90 μg de plasma.

Após a pesagem, as cápsulas foram introduzidas por meio de um amostrador automático no analisador Elemental, Flash 2000 *Organic Elemental Analyzer EA for IRMS*, no qual, em presença de oxigênio e óxido de cobre, foram queimadas quantitativamente para dióxido de carbono. Os gases formados foram separados em colunas cromatográficas gasosas e analisados no espectrômetro de massa de razões isotópicas (Delta V Advantage Isotope Ratio MS, Thermo Scientific, Alemanha).

Os resultados foram expressos em notação $\delta^{13}\text{C}$, em relação ao padrão *PeedeeBelemnite* (PDB), com erro de análise da ordem de 0,2‰ e calculado pela equação 1: $\delta^{13}\text{C}_{(\text{amostra, padrão})} = [(R_{\text{amostra}}/R_{\text{padrão}}) - 1] \times 10^3$, onde: $\delta^{13}\text{C}$ = enriquecimento relativo da razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ da amostra em relação ao padrão PDB, em partes por mil (‰) e R = razão isotópica ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) da amostra e do padrão.

Para mensurar o *turnover* isotópico do carbono (diluição isotópica) em um determinado intervalo de tempo, foi empregada a função exponencial do tempo expressa pela equação 2 (Ducatti *et al.*, 2002): $\delta^{13}\text{C}(t) = \delta^{13}\text{C}(f) + [\delta^{13}\text{C}(i) - \delta^{13}\text{C}(f)]e^{-kt}$, onde: $\delta^{13}\text{C}(t)$ = enriquecimento isotópico do tecido em qualquer tempo (t); $\delta^{13}\text{C}(f)$ = enriquecimento isotópico do tecido no patamar de equilíbrio, ou condição final; $\delta^{13}\text{C}(i)$ = enriquecimento isotópico do tecido, na condição inicial; k = constante de troca (*turnover*) em dia^{-1} ; e t = tempo (em dias) a partir da substituição da dieta.

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

A meia-vida do carbono-13 para o tecido, na condição de 50% da condição inicial e 50% da condição final, em $t = T$, foi calculada pela equação 3: $T = \ln 2/k$, onde: T = meia-vida, em tempo (dias); ln = logaritmo neperiano; e k = constante da taxa de *turnover* no tecido, em dia^{-1} .

Para determinar o tempo de troca de 99% de átomos de carbono, foi utilizada a equação 4: $t = -(1/k) \ln (1-f)$, onde: t = tempo de troca do carbono; k = constante de troca (*turnover*) em unidades de tempo^{-1} ; e f = fração de átomos trocados, neste caso 0,99.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período experimental, o valor do $\delta^{13}\text{C}$ do sangue e plasma das aves foi alterado gradativamente ao longo do tempo até alcançar o novo patamar de equilíbrio. As Figuras 1 e 2 representam os ajustes das diluições isotópicas do material coletado durante o período experimental (crescimento e postura).

No período de crescimento, foram coletados sangue e plasma dos tratamentos ASFB e ASFCO; no primeiro material o sinal isotópico no início do experimento foi de $\delta^{13}\text{C} = -19,28\%$, para o ASFB e $-19,38\%$ para o tratamento ASFCO. Com o término dessa fase, os valores calculados foram de $-26,60\%$ e $-26,25\%$ (Fig. 1a e 1b), respectivamente.

O plasma coletado no dia zero obteve valores de $-19,45\%$ e $-19,51\%$, para os tratamentos ASFB e ASFCO. Aos 48 dias de avaliação, os valores isotópicos mudaram para $27,46\%$ e $26,94\%$ (Fig. 1c e 1d), respectivamente para os tratamentos citados acima.

Através do modelo exponencial proposto, obtiveram-se os valores de meia-vida e tempo total de átomos de carbonos ($t_{(99\%)}$) para o sangue e plasma dos tratamentos experimentais (ASFB e ASFCO) no período de crescimento.

Observou-se que, em decorrência da inclusão de farinha de carne e ossos bovinos (FCO) nas dietas, houve enriquecimento nos valores

Turnover do carbono...

isotópicos de carbono-13. Esse fato ocorreu, provavelmente, devido às variações na composição percentual dos ingredientes nas dietas. Como as rações foram formuladas para serem isocalóricas e isoproteicas entre si, com a inclusão de farinha de carne e ossos bovinos na ração diminuiu-se a percentagem de farelo e óleo de soja.

Esse enriquecimento em $\delta^{13}\text{C}$ está de acordo com estudos realizados por Carrijo *et al.* (2006), Móri *et al.* (2007) e Denadai *et al.* (2008), que avaliaram níveis de inclusão de farinhas de origem animal em dietas para frangos de corte, codornas de corte e poedeiras comerciais, respectivamente.

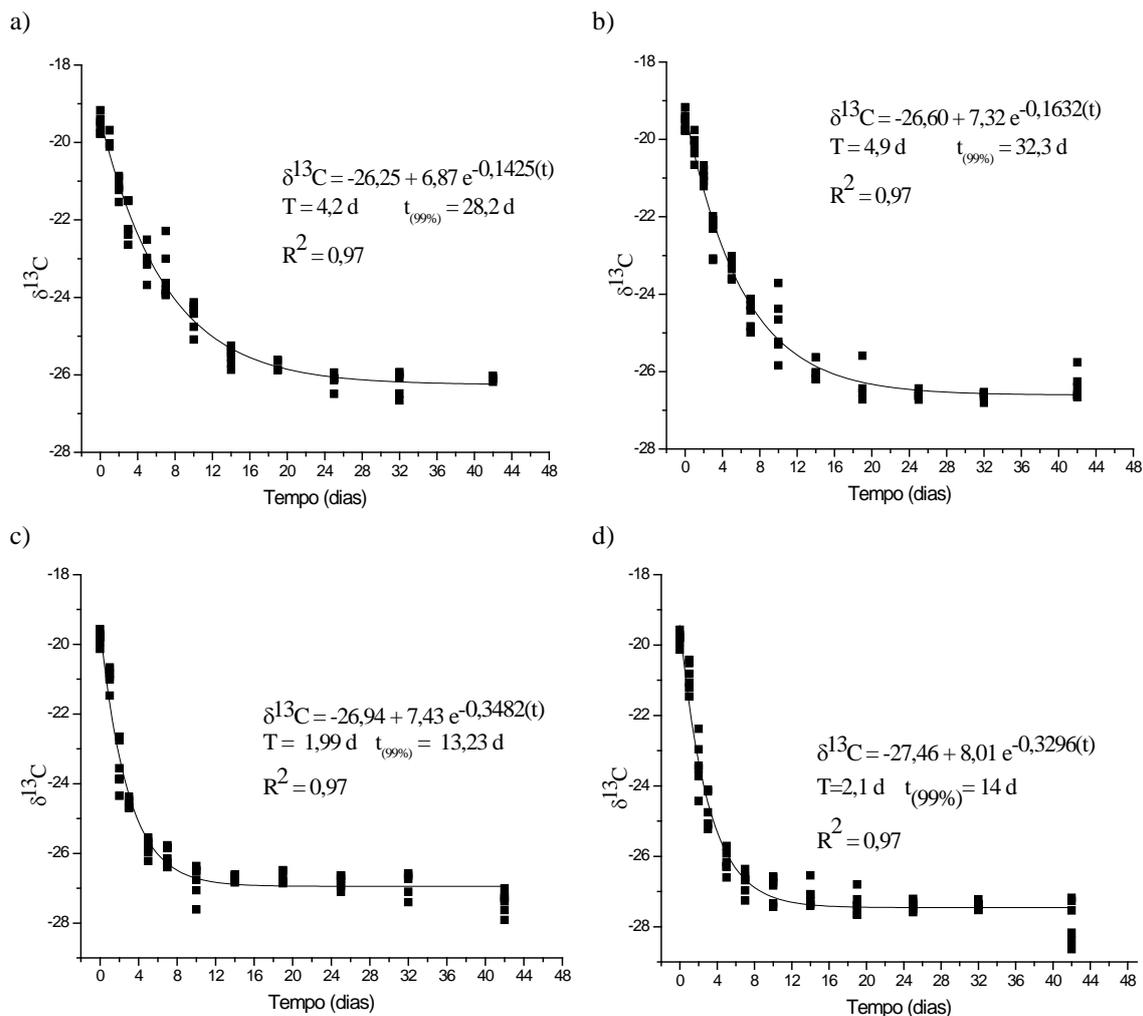


Figura 1. Curvas de *turnover* dos isótopos estáveis de carbono no sangue e plasma, respectivamente dos tratamentos ASFB (a, c) e ASFCO (b, d) em função do intervalo de avaliação no período de crescimento.

Quando as aves atingiram 49 dias de idade, iniciou o período de postura, sendo estabelecido dia zero do segundo período do experimento. No tratamento ASFCO, ao final do período pré-experimental, o sinal isotópico no sangue foi de $\delta^{13}\text{C} = -19,60\text{‰}$, e aos 49 dias após a troca da

dieta (ASFCO-MSFCO) alcançaram o sinal isotópico de $\delta^{13}\text{C} = -26,34\text{‰}$ (Fig. 2a).

O sinal isotópico do sangue no tratamento MSFCO ao final do período pré-experimental (dia 0) foi de $\delta^{13}\text{C} = -19,93\text{‰}$, e aos 49 dias após a troca da dieta (MSFCO-ASFCO) alcançaram o sinal isotópico de $\delta^{13}\text{C} = -26,31\text{‰}$ (Fig. 2b).

As razões isotópicas do plasma que eram de -28,38‰ e -18,93‰ na fase pré-experimental nos tratamentos ASFCO-MSFCO e MSFCO-ASFCO, respectivamente, obtiveram os valores de -19,75‰ e -27,71‰ no final do período experimental (Fig. 2c e 2d).

Através do modelo exponencial proposto, obtiveram-se os valores de meia-vida e tempo total de átomos de carbonos ($t_{(99\%)}$) para o sangue e plasma dos tratamentos experimentais (ASFCO-MSFCO e MSFCO-ASFCO) no período de postura.

Por meio da observação do tempo de troca total de carbonos, foi possível notar que o tempo

experimental da fase de crescimento e postura foi suficiente para que ocorresse incorporação do novo sinal isotópico no sangue e plasma.

Além disso, o tempo de incorporação da dieta C_3 foi mais rápido que da dieta C_4 para ambas as fases, o que pode ser explicado pelas diferenças histoanatômicas desses dois grupos fotossintéticos. Segundo Wilson *et al.* (1991), aproximadamente 80-85% dos tecidos presentes na lâmina foliar das gramíneas C_3 são rapidamente digeridos, enquanto nas espécies C_4 esses tecidos representam apenas 30-35% do total de tecidos.

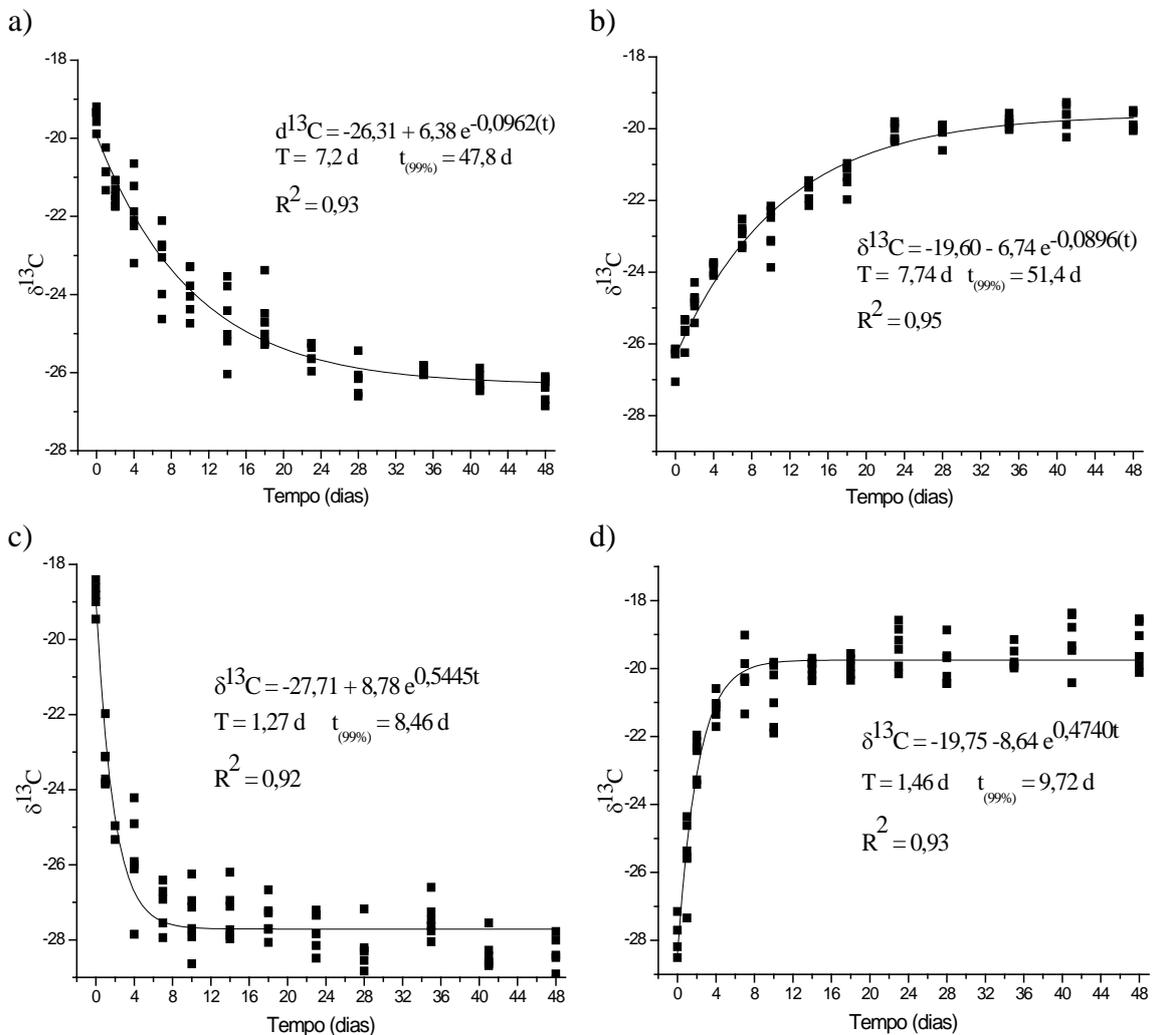


Figura 2. Curvas de *turnover* dos isótopos estáveis de carbono no sangue e plasma, respectivamente dos tratamentos ASFCO-MSFCO (a, c) e MSFCO-ASFCO (b, d) em função do intervalo de avaliação no período de postura.

Na composição química do arroz quirera e do milho (7,99%), a percentagem de amido encontrado é de 74,45 e 62,66, respectivamente. Em relação aos aminoácidos limitantes, metionina e lisina, os valores digestíveis (%) são 0,17 e 0,24 para o arroz quirera e de 0,15 e 0,19 para o milho (7,99%) (Rostagno *et al.*, 2011). Ou seja, plantas do ciclo fotossintético C₃ tanto histoanatomicamente quanto bromatologicamente possuem elementos mais biodisponíveis do que as plantas C₄, fatos que podem comprovar a maior velocidade de incorporação.

Na análise dos resultados de incorporação isotópica no sangue e plasma no período de postura, observou-se que houve diferenças significativas após o dia 23 do período experimental, fato que pode ser explicado pelo tempo de vida dos eritrócitos, que, entre as espécies aviárias, é em torno de 20 a 40 dias (Dukes e Reece, 2006). É possível que o curto período de vida dos eritrócitos nas aves seja devido à sua temperatura corpórea elevada e rápida taxa metabólica.

É notável que o tempo de incorporação do novo sinal isotópico no plasma é mais rápido tanto no período de crescimento quanto no de postura quando comparado ao do sangue.

Estes resultados estão de acordo com Hobson & Clark (1993), que observaram maiores taxas de *turnover* do carbono para a fração plasma comparado à fração de células sanguíneas em corvos americanos (*Corvus brachyrhynchos*), e Pearson *et al.* (2003), que, através de estudos, indicaram que o plasma sanguíneo fornece informações de curto prazo (cerca de 1-4 dias), enquanto o sangue total fornece mais informações (cerca de 8-12 dias) porque suas células têm maior longevidade do que os constituintes do plasma, tendo um ritmo mais lento na taxa de *turnover*.

CONCLUSÕES

Concluiu-se que a técnica dos isótopos estáveis de carbono-13 é capaz de identificar a inclusão de farinha de origem animal (FCO) em dietas de codornas japonesas por meio da análise do sangue e plasma das aves. Através dessa técnica, também foi possível calcular o *turnover* de dietas C₃ para C₄ e C₄ para C₃, tendo como resultado a

incorporação mais lenta de dietas à base de plantas C₄, possivelmente pelos diferentes valores biológicos de seus ingredientes.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP pelo auxílio financeiro para a execução deste projeto, que faz parte do projeto temático 2008/57411-4.

REFERÊNCIAS

- 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 J. of Experim. Biol.*, v.212, p.2349-2355, 2009.
- CARRIJO, A.S.; PEZZATO, A.C.; DUCATTI, C. *et al.* Traceability of Bovine Meat Bone Meal in Poultry by Stable Isotope Analysis. *Rev. Bras. Cienc. Avícola*, v.8, p.37-42, 2006.
- DENADAI, J.C.; DUCATTI, C.; SARTORI, J.R. *et al.* The traceability of animal meals in layer diets as detected by stable carbon and nitrogen isotope analyses of eggs. *Rev. Bras. Cienc. Avícola*, v.10, p.147-152, 2008.
- DUCATTI, C.; CARRIJO, A.S.; PEZZATO, A.C.; MANCERA, P.F.A. Modelo teórico e experimental de reciclagem do carbono-13 em tecidos de mamíferos e aves. *Sci. Agrícola*, v.59, p.29-33, 2002.
- DUCATTI, C. Isótopos estáveis ambientais. [Apostila]. Botucatu (SP): Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista; p.184, 2004.
- DUKES, H.H.; REECE, W.O. *Fisiologia dos animais domésticos*. 12. ed. Rio de Janeiro (RJ), Guanabara Koogan, p.926, 2006.
- HOBSON, K.A.; CLARK, R.G. Turnover of ¹³C in cellular and plasma fractions of blood: implications for nondestructive sampling in avian dietary studies. *Auk*, v.110, p.638-641, 1993.
- MANETTA, G.I.; CECILIO, E.B. Aplicação da técnica de isótopos estáveis na estimativa da taxa de *turnover* em estudos ecológicos: uma síntese. *Acta Scientiarum: Biol. Sci.*, v.25, p.121-129, 2003.

METGES, C.; KEMPE, K.; SCHIMIDT, H.L. Dependence of the carbon isotope contents of breath carbon dioxide, milk, serum and rumen fermentation products on the delta ^{13}C value of food in dairy cows. *Br. J. Nutrition*, v.63, p.187-196, 1990.

MINITAB[®] 16 Statistical Software, 2010.

MÓRI, C.; GARCIA, E.A.; DUCATTI, C. *et al.* Traceability of animal byproducts in quail (*Coturnix coturnix japonica*) tissues using carbon ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) and nitrogen ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) stable isotopes. *Rev. Bras. Cienc. Avícola*, v.9, p.263-269, 2007.

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

ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L. *et al.* Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. 3. Ed., Viçosa: UFV, Departamento de Zootecnia, 2011. 31-39p; 160-166p.

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.

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

WILSON, J.R.; DEINUM, B.; ENGELS, F.M. Temperature effects on anatomy and digestibility of leaf and stem of tropical and temperate forage species. *Neth. J. Agric. Sci.*, v.39, p.31-48, 1991.