

# MODELO TEÓRICO E EXPERIMENTAL DA RECICLAGEM DO CARBONO-13 EM TECIDOS DE MAMÍFEROS E AVES

Carlos Ducatti<sup>1</sup>; Alfredo Sampaio Carrijo<sup>2\*</sup>; Antônio Celso Pezzato<sup>3</sup>; Paulo Fernando de Arruda Mancera<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Centro de Isótopos Estáveis - Depto. de Física e Biofísica - UNESP/IBB, C.P. 510 - CEP: 18618-000 - Rubião Júnior, SP.

<sup>2</sup>Depto. de Produção Animal - UFMS, C.P. 549 - CEP: 79070-900 - Campo Grande, MS.

<sup>3</sup>Depto. de Nutrição e Melhoramento Animal - UNESP/FMVZ, C.P. 560 - CEP: 18618-000 - Rubião Júnior, SP.

<sup>4</sup>Depto. de Bioestatística - UNESP/IBB, C.P. 510 - CEP: 18618-000 - Rubião Júnior, SP.

\*Autor correspondente <acarrijo@nin.ufms.br>

**RESUMO:** A diferença entre fontes alimentares da ordem de 14‰, originárias de plantas com ciclos fotossintéticos Carbono-3 (C3) e Carbono-4 (C4) e seus subprodutos, abre novas perspectivas para o estudo do metabolismo do carbono em aves e animais de pequeno porte. Os autores propõem um modelo teórico e experimental capaz de exprimir os resultados de enriquecimento relativo, delta *per* mil ( $\delta\%$ ) da razão  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  *versus* tempo em diferentes tecidos. Utilizou-se a equação  $y(t) = (y_0 - q/k)e^{-kt} + q/k$  onde,  $y(t)$  é a concentração isotópica no tempo desejado,  $y_0$  a concentração isotópica inicial existente no tecido,  $k$  é uma constante de troca isotópica com unidade 1/tempo,  $t$  é unidade de tempo e  $q$  é a taxa de entrada de metabólitos que contém carbono, com valores de  $\delta\%$ /tempo. Para fígado de galinhas que tiveram a ração de ciclo fotossintético C4 substituída por dieta C3 obteve-se a equação  $\delta^{13}\text{C} = -24,74\% + 12,37\% e^{-0,237(nt)}$ , com meia-vida ( $T$ ) de 2,9 dias. O patamar de equilíbrio de substituição do carbono foi alcançado em  $-24,48\%$ , de modo que praticamente 98,4% do conteúdo isotópico do C4 no fígado foi substituído por C3 após 5,6 meias-vidas. O modelo foi adequado para determinar o tempo de reciclagem total ou parcial da concentração de carbono nos tecidos em estudo.

Palavras-chave: aves de postura, C3, metabolismo nutricional,  $\delta^{13}\text{C}$ , modelo teórico-experimental

## THEORETICAL AND EXPERIMENTAL MODEL FOR CARBON-13 TURNOVER IN MAMMALIAN AND AVIAN TISSUES

**ABSTRACT:** Food source differences of about 14‰ from plants with carbon-3 (C3) and carbon-4 (C4) photosynthetic cycles and their derived products make carbon metabolism studies possible in birds and small mammals. The authors suggest a theoretical and experimental model for determining the relative enrichment results, *delta per* thousand ( $\delta\%$ ) of the  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratio as a function of time for different tissues. The following equation was used:  $y(t) = (y_0 - q/k)e^{-kt} + q/k$  where,  $y(t)$  is the isotopic concentration at time  $t$ ,  $y_0$  is the initial isotopic concentration in the tissue,  $k$  is the turnover constant expressed in 1/time, and  $q$  is the input of metabolites which contain carbon expressed in  $\delta\%$ /time. The equation below was obtained from the analysis of hen livers, the carbon-4 photosynthetic cycle ration of which was switched to a carbon-3 diet:  $\delta^{13}\text{C} = -24.74\% + 12.37\% e^{-0.237(nt)}$  with 2.9 day half-life. The carbon switching steady-state was reached at  $-24.48\%$  so that nearly 98.4% of the C4 isotopic content in the liver was replaced by C3 after 5.6 half-lives. The proposed model is suitable to determine the partial or entire turnover of carbon concentration in some selected tissues.

Key words: hens, C3, nutritional metabolism,  $\delta^{13}\text{C}$ , theoretical experimental modeling

## INTRODUÇÃO

As plantas dos ciclos fotossintéticos C3 e C4 e seus derivados, ou os seus subprodutos, apresentam valores isotópicos distintos. A diferença isotópica entre elas, da ordem de 14‰, permite realizar experimentos biológicos com alimentação utilizando-se a técnica de diluição isotópica de somente duas fontes de alimentação de cada vez (Fry & Sherr, 1989).

A alternância da fonte isotópica, após determinado intervalo de tempo, gera resultados de enriquecimento isotópico relativo, ou delta *per* mil ( $\delta\%$ )

*versus* tempo em dias, com perfil aproximado de uma onda quadrática, específica para cada tecido ou subproduto analisado (Jones et al., 1979).

Normalmente, a continuidade dos valores isotópicos obtidos nos subprodutos, entre os patamares isotópicos gerados pela Fonte A e posteriormente pela Fonte B é uma função exponencial do tempo. A exploração desta função exponencial abre perspectivas de novas interpretações nestes experimentos, visando o estudo da síntese e degradação de metabólitos sob regime de dieta à base de plantas do ciclo fotossintético C3 ou C4, ou misturas isotópicas, com valores de  $\delta\%$  distintos.

O objetivo visa a obtenção da equação diferencial teórica, capaz de exprimir os resultados experimentais de enriquecimento relativo, delta *per mil* da razão  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ , *versus* tempo em dias.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Fundamentos Teóricos

Admitindo-se uma substância, como por exemplo, uma dieta contendo os isótopos estáveis de razão  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ , a qual será metabolizada e introduzida a uma taxa constante em um determinado tecido já formado, conforme o esquema da Figura 1. Supondo-se que a mistura destes isótopos, com os já existentes, ocorra de imediato e de forma homogênea, segundo a expressão de *input*:

$$dy / dt = q \quad (1)$$

A partir de uma determinada concentração isotópica inicial  $y_0$ , considerando o processo de eliminação, segundo a expressão de *output*:

$$dy / dt = - ky \quad (2)$$

com  $k$  constante, a ser definida.

No processo global de *input* e *output* simultâneo no tecido adulto (a expressão tecido adulto é para evitar a variável crescimento), com uma concentração inicial  $y_0$ , torna-se razoável, segundo Aguiar et al. (1988), a justaposição dos dois processos ou que:

$$dy / dt = - ky + q \quad ; \quad y(0) = y_0 \quad (3)$$

Assim procedendo, procura-se a solução da equação (3). Para o caso particular em que  $q = \text{zero}$ , têm-se:

$$dy / dt + ky = \text{zero} \quad ; \quad y(0) = y_0$$

Utilizando-se a técnica da separação de variáveis para a resolução da equação diferencial, têm-se:

$$\int_{y_0}^y dy / y = - k \int_0^t dt$$

então;

$$\ln(y) \Big|_{y_0}^y = - k(t) \Big|_0^t$$

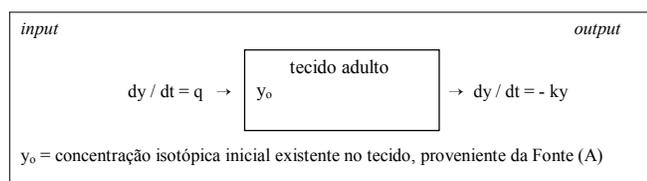


Figura 1 - Esquema de entrada e saída dos isótopos de carbono nos tecidos.

cuja solução será:

$$y(t) = y_0 e^{-kt} \quad (4)$$

Para o caso das duas equações diferenciais;

$$dy / dt + ky - q = \text{zero} \quad ; \quad dy / dt + ky = \text{zero}$$

torna-se razoável supor também que a solução difira somente por duas constantes,  $C$  e  $C_1$ , de modo que, pode-se admitir que a expressão;

$$y(t) = C_1 e^{-kt} + C \quad (5)$$

seja a solução de,

$$dy / dt + ky - q = \text{zero}$$

Na determinação das constantes, obtém-se:

$$C_1 (-k e^{-kt}) + k (C_1 e^{-kt} + C) - q = \text{zero} \quad \text{ou,}$$

$$-kC_1 e^{-kt} + kC_1 e^{-kt} + kC - q = \text{zero}$$

a qual fornece o valor da constante  $C$ :

$$C = q / k \quad (6)$$

Substituindo (6) na expressão (5), obtém-se:

$$y(t) = C_1 e^{-kt} + q / k \quad (7)$$

Utilizando a condição inicial  $y(0) = y_0$ , segue (7) que:

$$y(0) = C_1 e^{-k \cdot 0} + q / k, \text{ ou que:}$$

$$C_1 = y_0 - q / k \quad (8)$$

Substituindo-se as expressões (6) e (8), em (5), obtém-se:

$$y(t) = (y_0 - q / k) e^{-kt} + q / k \quad (9)$$

Nas condições extremas, a solução, expressão (9), apresenta os seguintes valores:

$$\text{para } t = \text{zero} \quad ; \quad y(0) = y_0$$

$$\text{para } t = \infty \quad ; \quad y(\infty) = q / k$$

$$\text{para } t = T, \text{ meia vida} \quad ; \quad y(T) = [y_0 + (q / k)] / 2$$

Na interpretação destes valores, a condição  $y(0) = y_0$  representa a concentração isotópica no tecido, proveniente exclusivamente do metabolismo da Fonte (A). Nesta condição, admite-se também que a Fonte (A) deixou de ser administrada fisicamente em experimentos com duas fontes isotópicas, distintas entre si.

Assim ocorrendo, à medida que o tempo passa, a concentração dos isótopos no tecido começa a ser substituída exponencialmente pelos isótopos estáveis da Fonte (B).

A constante  $k$  pode ser interpretada como a constante de troca isotópica com unidades de tempo<sup>-1</sup>. A constante  $q$ , pode ser interpretada como a taxa de entrada de metabólitos que contém carbono, com valores de  $\delta\%$  / tempo e unidades de tempo<sup>-1</sup>.

Assintoticamente, a concentração dos isótopos no tecido proveniente da Fonte (B), se não houver fracionamento isotópico entre a dieta e o tecido estudado, atinge o valor  $y(\infty) = q / k$  para  $t = \infty$ , na qual, ocorre a substituição completa dos isótopos no tecido.

A condição de 50% de cada fonte isotópica no tecido, em  $t = T$ , exprime-se por:

$$\frac{y_0 + (q/k)}{2} = (y_0 - q/k)e^{-kT} + q/k$$

Nesta condição, obtém-se:

$$T = \ln 2 / k \quad \text{ou} \quad T = -\ln 0,5 / k \quad (10)$$

Assim, a constante  $k$  a ser definida nas expressões (2) e (10) apresenta unidades de tempo<sup>-1</sup> e fornece a idéia da “velocidade” do processo de eliminação ou troca dos isótopos no tecido.

Como cada tecido apresenta *input* e *output* peculiares, a constante  $k$  será diferente para cada tecido estudado, assim como, o valor da meia-vida será distinto para tecidos diferentes em um mesmo animal e à semelhança do processo de desintegração radioativa, o conceito de meia-vida parece ser apropriado para o símbolo  $T$ , o qual, expressa-se em unidade de tempo.

### Análises Isotópicas

O enriquecimento isotópico relativo da razão  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ , comumente designado como delta *per mil* foi obtido pela técnica de espectrometria de massa de razão isotópica. Os valores foram obtidos pela expressão:

$$\delta^{13}\text{C} (x, \text{std}) = \left\{ \left[ \frac{R(x)}{R(\text{std})} \right] - 1 \right\} \times 10^3$$

O símbolo  $R$  representa a razão isotópica  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  da amostra ( $x$ ) e do padrão ( $\text{std}$ ).  $\delta^{13}\text{C} (x, \text{std})$  significa o enriquecimento da razão  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  da amostra, relativo à razão  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  do padrão internacional PeeDee Belemnite (PDB). Ducatti et al. (1982).

### Medidas Experimentais

Rações à base de produtos das plantas do ciclo fotossintético C3 (arroz e soja), com valores isotópicos  $(-24,74 \pm 0,20) \text{‰}$ , e rações à base de produtos das plantas do ciclo fotossintético C4 (milho), com valores isotópicos  $(-12,39 \pm 0,20) \text{‰}$ , foram utilizadas nos experimentos. Carrijo (2000) alimentou aves de postura com ração C3 durante o período de 30 dias e após este intervalo de tempo substituiu por rações C4 por um período de 50 dias. Em intervalos de tempo pré-determinados foram colhidos ovos e as aves foram sacrificadas para a obtenção de tecidos.

Procedimentos semelhantes foram utilizados nos experimentos de Tieszen et al. (1983), com *gerbils* (*Meriones unguiculatus*) e de Hobson & Clark (1992), utilizando codornas (*Coturnix coturnix*). Detalhes experimentais podem ser obtidos em Carrijo (2000).

*Scientia Agrícola*, v.59, n.1, p.29-33, jan./mar. 2002

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o primeiro resultado (Tabela 1), em que o subproduto analisado foi sangue de codorna, a equação experimental fornece que:

$$\delta^{13}\text{C} = -20,41\text{‰} - 2,85\text{‰} e^{-0,062 t}$$

A solução equivalente a ser confirmada, expressa-se por:

$$y(t) = q / k + (y_0 - q / k) e^{-kt}$$

Através da análise comparativa, obtém-se os seguintes valores:

$$q / k = -20,41\text{‰}$$

$$y_0 - q / k = -2,85\text{‰} \quad \therefore y_0 = -23,26\text{‰}$$

$$k = 0,062 \text{ dias}^{-1} \quad \therefore q = -1,26542\text{‰} \text{ dias}^{-1}$$

Das condições extremas na equação experimental em questão, obtém-se os seguintes valores:

$$\text{para } t = \text{zero}; \quad y(0) = y_0 = -23,26\text{‰}$$

$$\text{para } t = \infty; \quad y(\infty) = q / k = -20,41\text{‰}$$

$$\text{para } t = T; \quad y(T) = [y_0 + (q / k)]/2 = -21,835\text{‰}$$

Assim procedendo, a meia-vida ( $T$ ), pode ser obtida por:

$$\frac{y_0 + (q/k)}{2} = (y_0 - q/k)e^{-kT} + q/k$$

$$(-21,835\text{‰}) = [(-23,26\text{‰}) - (-20,41\text{‰})] e^{-kT} + (-20,41\text{‰})$$

ou que  $0,5 = e^{-kT}; 0,5 \cdot e^{kT} = 1$

Utilizando-se do logaritmo natural, obtém-se:

$$\ln 0,5 + kT \ln e = \ln 1$$

Como  $k = 0,062 \text{ dias}^{-1}$ , têm-se que  $T = 11,17$  dias, ou seja, adquire-se o valor experimental obtido da análise do sangue de codorna do experimento de Hobson & Clark (1992).

Assim procedendo para os demais tecidos analisados, expressos na Tabela 1, a equação sugerida,  $y(t) = (y_0 - q / k) e^{-kt} + q / k$  apresenta-se como uma solução para a classe de experimentos realizados em aves e animais de pequeno porte.

Por outro lado, o parâmetro meia-vida, pode ser obtido diretamente da expressão:

$$T = \ln 2 / k \quad \text{ou} \quad T = -\ln 0,5 / k,$$

na qual o fator  $k$  obtém-se diretamente da expressão experimental.

A expressão para a meia-vida sugere que tecidos que apresentam uma meia-vida curta, apresentam uma “alta velocidade” de metabolização ou incorporação dos isótopos estáveis no tecido em questão, e o inverso, como o caso do colágeno do osso, apresenta uma “baixa velocidade” de incorporação do carbono no tecido.

Esta mesma observação pode ser interpretada da seguinte forma, como sugerem Tieszen et al. (1983); os tecidos mais ativos metabolicamente devem apresentar uma taxa de *turnover* do carbono mais rápida do que os tecidos menos ativos metabolicamente.

Para que ocorra a substituição completa dos isótopos estáveis do carbono da Fonte A, já existentes no tecido ou órgão formado, pelos isótopos estáveis da Fonte B, será necessário o tempo de equilíbrio  $t^* = nT$ .

Assim ocorrendo, a expressão teórica torna-se:

$$y(t^*) = (q / k) + (y_0 - q / k) e^{-k(nT)}$$

Quando  $y(t^*) \rightarrow (q / k)$ , a substituição isotópica mantém-se constante com o tempo, atingindo a condição do patamar de equilíbrio isotópico. Consequentemente  $[y(t^*) - (q / k)] \rightarrow$  zero e  $n \rightarrow \infty$  ou que,  $t^* = (nT) \rightarrow \infty$

Em termos práticos, o valor do número  $n$  poderá ser obtido da curva experimental de cada tecido, para cada animal, quando o valor delta *per mil* da função experimental começar a atingir o patamar do equilíbrio isotópico, ou quando se mantiver constante com o tempo.

Considerando como exemplo, a curva experimental do fígado em galinhas de postura, ração C4 trocada por ração C3 (Carrijo, 2000), observa-se que:

$$\delta_{\text{‰}}^{13}\text{C}^* = -24,74\text{‰} + 12,37\text{‰} e^{-0,237(nT)}$$

No respectivo gráfico experimental (Figura 2), o valor de  $\delta_{\text{‰}}^{13}\text{C}^*$  se mantém constante no patamar do equilíbrio, e é igual a  $-24,48 \text{‰}$ , de modo que obtém-se:

$$-24,48 \text{‰} = -24,74 \text{‰} + 12,37 \text{‰} e^{-0,237(nT)}$$

com  $nT = 16,30$  dias.

Tabela 1 - Valores da Equação Experimental e da Meia-Vida, em diferentes tecidos animais, obtidos por Tieszen et al. (1983), Hobson & Clark (1992) e Carrijo (2000).

Tecido/Animal	Expressão experimental (*)	Meia Vida (dia)
1. Sangue/codorna	$\delta^{13}\text{C} = -20,41\text{‰} - 2,85\text{‰} e^{-0,062 t}$ ; $r^2 = 0,92$	11,4
2. Músculo/codorna	$\delta^{13}\text{C} = -19,85\text{‰} - 3,35\text{‰} e^{-0,056 t}$ ; $r^2 = 0,95$	12,4
3. Fígado/codorna	$\delta^{13}\text{C} = -20,67\text{‰} - 2,90\text{‰} e^{-0,272 t}$ ; $r^2 = 0,86$	2,6
4. Colágeno/codorna	$\delta^{13}\text{C} = -18,30\text{‰} - 2,94\text{‰} e^{-0,004 t}$ ; $r^2 = 0,75$	173,3
5. Fígado/gerbil	$\delta^{13}\text{C} = -21,53\text{‰} + 8,51\text{‰} e^{-0,109 t}$ ; nd	6,4
6. Gordura/gerbil	$\delta^{13}\text{C} = -25,37\text{‰} + 10,72\text{‰} e^{-0,044 t}$ ; nd	15,6
7. Músculo/gerbil	$\delta^{13}\text{C} = -21,22\text{‰} + 8,34\text{‰} e^{-0,025 t}$ ; nd	27,6
8. Pêlo/gerbil	$\delta^{13}\text{C} = -20,30\text{‰} + 9,46\text{‰} e^{-0,015 t}$ ; nd	47,5
9. Cérebro/gerbil	$\delta^{13}\text{C} = -20,22\text{‰} + 7,58\text{‰} e^{-0,025 t}$ ; nd	28,2
10. Ovo/galinha (C4 trocado por C3)	$\delta^{13}\text{C} = -25,71\text{‰} + 14,56\text{‰} e^{-0,188 t}$ ; $r^2 = 0,934$	3,7
11. Ovo/galinha (C3 trocado por C4)	$\delta^{13}\text{C} = -13,02\text{‰} - 13,10\text{‰} e^{-0,173 t}$ ; $r^2 = 0,986$	4,0
12. Fígado/galinha (C4 trocado por C3)	$\delta^{13}\text{C} = -24,74\text{‰} + 12,37\text{‰} e^{-0,237 t}$ ; $r^2 = 0,977$	2,9
13. Fígado/galinha (C3 trocado por C4)	$\delta^{13}\text{C} = -12,39\text{‰} - 12,21\text{‰} e^{-0,131 t}$ ; $r^2 = 0,990$	5,3

1,2,3,4, Hobson & Clark (1992); 5,6,7,8,9, Tieszen et al. (1983); 10,11,12,13, Carrijo (2000). (\*) Os tempos (t) nas expressões experimentais são expressos em dias. nd = não determinado.

Tabela 2 - Valores teóricos do tempo em função da meia-vida.

Concentração Isotópica $y(t) = \text{Fonte A} + \text{Fonte B}$	Tempo	$y_0 = x(q/k)$
$y(t) = 1y_0 + 0(q/k)$	$t = 0$	$x = 0$
$y(t) = 1/2y_0 + 1/2(q/k)$	$t = 1T$	$x = 0,5$
$y(t) = 1/4y_0 + 3/4(q/k)$	$t = 2T$	$x = 0,75$
$y(t) = 1/8y_0 + 7/8(q/k)$	$t = 3T$	$x = 0,875$
$y(t) = 1/16y_0 + 15/16(q/k)$	$t = 4T$	$x = 0,9375$
$y(t) = 1/32y_0 + 31/32(q/k)$	$t = 5T$	$x = 0,96875$
$y(t) = 1/64y_0 + 63/64(q/k)$	$t = 6T$	$x = 0,984375$
$y(t) = 1/128y_0 + 127/128(q/k)$	$t = 7T$	$x = 0,9921875$
$y(t) = 1/256y_0 + 255/256(q/k)$	$t = 8T$	$x = 0,996093775$
$y(t) = 1/512y_0 + 511/512(q/k)$	$t = 9T$	$x = 0,998046875$
$y(t) = 1/1024y_0 + 1023/1024(q/k)$	$t = 10T$	$x = 0,999023438$
$y(t) = 1/2048y_0 + 2047/2048(q/k)$	$t = 11T$	$x = 0,99951719$
$y(t) = 1/4096y_0 + 4095/4096(q/k)$	$t = 12T$	$x = 0,999755859$
$y(t) = 1/8192y_0 + 8191/8192(q/k)$	$t = 13T$	$x = 0,999877930$
$y(t) = 0 y_0 + 1 (q/k)$	$t \rightarrow \infty T$	$x \rightarrow 1$

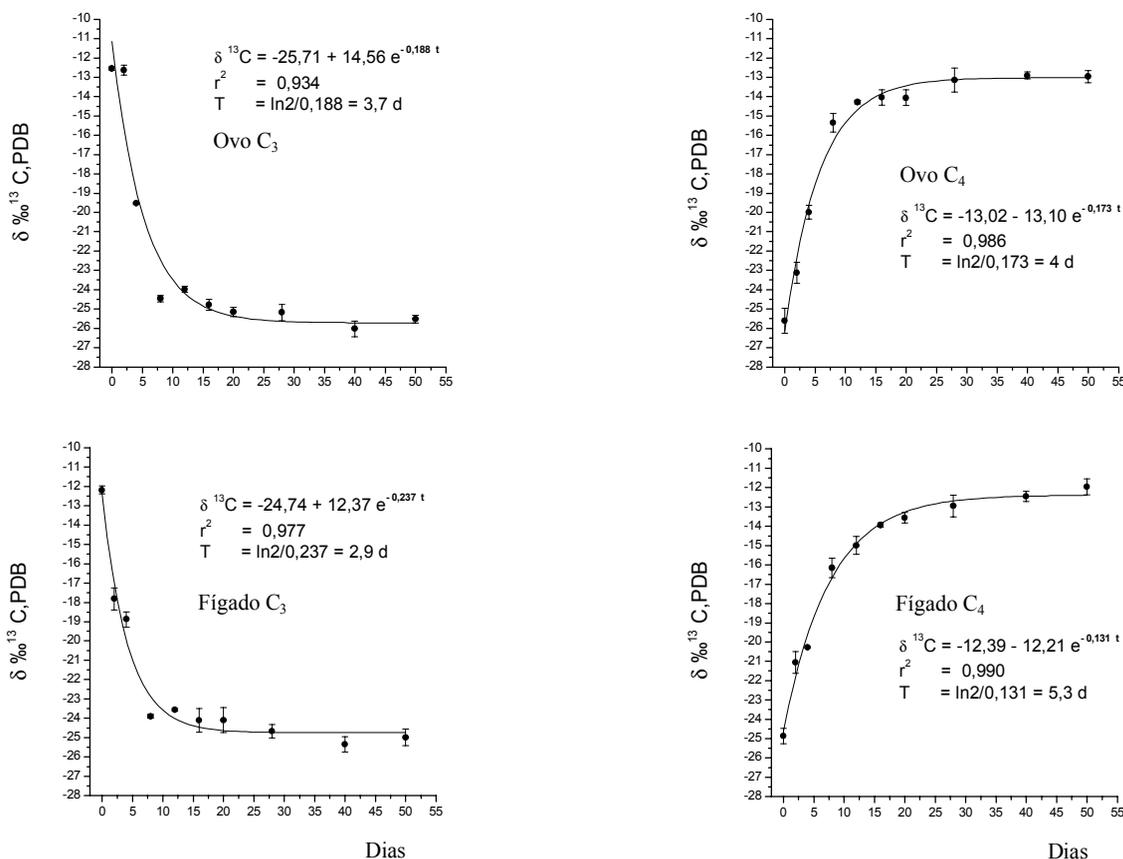


Figura 2 - Modelo exponencial para os isótopos estáveis do carbono (média + desvio padrão, n = 3) em ovo e fígado de aves de postura adultas alimentadas com dietas formuladas à base de plantas dos ciclos fotossintéticos C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub>. Carrijo (2000).

PDB = padrão internacional Pee Dee Belemnite. T = meia-vida.

Como a meia-vida calculada vale T = 2,9 dias, o valor numérico de n será igual a 5,6. Assim ocorrendo, observa-se através da Tabela 2, que praticamente 98,4% do conteúdo isotópico do carbono no ovo foi substituído pelos isótopos estáveis da Fonte B (-12,37 ‰), após decorrido 5,6 meias-vidas.

## CONCLUSÕES

O modelo teórico e experimental proposto descreve o comportamento da substituição do carbono em diversos tecidos de aves e pequenos mamíferos não ruminantes. O modelo foi adequado para explicitar o tempo de reciclagem total ou parcial da concentração de carbono nos tecidos. A técnica de diluição dos isótopos estáveis do carbono, presentes em duas dietas isotopicamente distintas, oferece nova perspectiva para a interpretação do metabolismo do carbono em trabalhos de substituição utilizando-se dietas naturais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, A.F.A.; XAVIER, A.F.S.; RODRIGUES, J.E.M. **Cálculo para ciências médicas e biológicas**. São Paulo: Editora Harbra, 1988. 351p.

*Scientia Agrícola*, v.59, n.1, p.29-33, jan./mar. 2002

CARRIJO, A.S. Avaliação do metabolismo nutricional em poedeiras, pela técnica dos isótopos estáveis do carbono (<sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C), provenientes de rações formuladas com plantas do ciclo C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub>. Botucatu, 2000. 40p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

DUCATTI, C.; MATSUI, E.; SALATI, E. Fundamentos teóricos dos fatores de correção, para a análise das variações relativas das razões <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C e <sup>18</sup>O/<sup>16</sup>O por espectrometria de massa.

**Energia Nuclear na Agricultura**, v.4, p.41-58, 1982.

FRY, B.; SHERR, E.B. <sup>δ</sup><sup>13</sup>C Measurements as indicators of carbon flow in marine and freshwater ecosystems. In: RUNDEL, P.W.; EHLERINGER, J.R.; NAGY, K.A. (Ed.) **Stable isotopes in ecological research**. New York: Springer-Verlag Inc, 1989. p. 196-229.

HOBSON, K.A.; CLARK, R.G. Assessing avian diets using stable isotopes I: Turnover of <sup>13</sup>C in tissues. **Condor**, v.94, p.181-188, 1992.

JONES, R.J.; LUDLOW, M.M.; TROUGHTON, J.H.; BLUNT, C.G. Estimation of the proportion of C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plant species in the diet of animals from the ratio of natural <sup>12</sup>C and <sup>13</sup>C isotopes in the faeces. **Journal of Agricultural Science**, v.92, p.91-100, 1979.

TIESZEN, L.L.; BOUTTON, T.W.; TESDAHL, K.G.; SLADE, N.A. Fractionation and turnover of stable carbon isotopes in animal tissues: Implications for <sup>d</sup><sup>13</sup>C analysis of diet. **Oecologia**, v.57, p.32-37, 1983.

Recebido em 23.10.00