

**TURNOVER DO $\delta^{13}\text{C}$ NA SUBSTITUIÇÃO DE DIETAS COM INGREDIENTES DE
DIFERENTES CICLOS FOTOSSINTÉTICOS EM OVOS DE CODORNAS JAPONESAS
(*Coturnix coturnix japonica*)¹**

GUILHERME EMYGDIO MENDES PIMENTA^{2,3*}, JULIANA CÉLIA DENADAI³, MARIA MARCIA PEREIRA SARTORI³, VANESSA
CRISTINA PELICIA^{2,3}, PRISCILA CAVALCA DE ARAUJO^{2,3}, ANA CRISTINA STRADIOTTI^{2,3}, CARLOS DUCATTI³

¹Recebido para publicação em 19/02/14. Aceito para publicação em 03/09/14.

²Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Botucatu, SP, Brasil.

³Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Instituto de Biociência (IB), Botucatu, SP, Brasil.

*Autor correspondente: gmpimenta@zootecnista.com.br

RESUMO: O estudo objetivou avaliar o *turnover* do ^{13}C pela substituição de dietas do ciclo fotossintético C_3 para C_4 e C_4 para C_3 em ovos de codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*) utilizando a técnica de isótopos estáveis. Foram utilizadas duzentas e dezesseis codornas japonesas, com 50 dias de idade, distribuídas em delineamento experimental inteiramente casualizado em dois tratamentos com seis repetições, em período experimental de 48 dias. Antes dos 50 dias de idade, metade das codornas consumia dieta a base de plantas C_4 (milho) e a outra metade a base de plantas C_3 (arroz), ambas contendo farinha de carne e ossos bovinos. Houve substituição dessas dietas no período experimental, dieta a base C_3 para C_4 e C_4 para C_3 . Seis ovos foram coletados de cada tratamento por dia de coleta, de acordo com os dias de idade das codornas: 50, 51, 52, 54, 57, 60, 64, 68, 73, 78, 85, 91 e 98. Para determinar a taxa de *turnover* foi empregado o modelo exponencial de diluição isotópica. Foi possível observar que o tempo experimental de 48 dias foi suficiente para que ocorresse o *turnover* total nos ovos, havendo a incorporação de 99% dos átomos de carbono da nova dieta. A velocidade de incorporação é mais lenta quando há substituição de dietas C_3 para C_4 do que de C_4 para C_3 , o que pode ser explicado pela diferença bromatológica dos ingredientes.

Palavras-chave: diluição isotópica, ovos de codornas japonesas, plantas C_3 e C_4 .

*TURNOVER OF $\delta^{13}\text{C}$ REPLACEMENT OF DIETS WITH DIFFERENT PHOTOSYNTHETIC CYCLES EGGS
IN JAPANESE QUAILS EGGS(*Coturnix coturnix japonica*)*

ABSTRACT: The study aimed to evaluate the turnover of ^{13}C by replacing the C_3 photosynthetic pathway diet to C_4 and C_4 to C_3 in eggs of japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) using the technique of stable isotopes. Two hundred and sixteen japanese quail, 50 days old, distributed in a completely randomized experimental design with two treatments in six replications, in an experimental period of 48 days, were used. Prior to 50 days of age, half of quails consumed diet based on C_4 plants (corn) and the other half based on C_3 plants (rice), both containing meat meal and bone meal. There was replacement of those diets during the experimental period, C_3 based diet to C_4 and C_4 to C_3 . A total of six eggs were collected from each treatment per day, according the quails age: 50, 51, 52, 54, 57, 60, 64, 68, 73, 78, 85, 91 and 98 days. To determine the turnover rate, the exponential model of isotopic dilution was employed. The experimental time of 48 days was enough for the total turnover in the eggs, with the incorporation of 99% of the carbon atoms of the new diet. The incorporation speed was slower when replacing diets were from C_3 to C_4 than C_4 to C_3 , which can be explained by bromatological differences of the ingredients.

Keywords: Isotopic dilution, eggs of japanese quail, C_3 and C_4 plants.

INTRODUÇÃO

O termo isótopo vem do grego ISO (mesmo ou igual) e TOPOS (lugar), referindo-se ao fato de que são elementos que ocupam o mesmo lugar na tabela periódica (DUCATTI *et al.*, 2011). O isótopo possui o mesmo número de prótons e número diferente de nêutrons. O termo estável refere-se a átomos que não emitem radiação.

Os isótopos estáveis de vários elementos são formados por um isótopo dominante (ex: ^{12}C , ^{14}N , ^{16}O , ^{32}S , e ^1H), e um ou dois isótopos mais pesados (ex: ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{18}O , ^{33}S , ^{34}S e ^2H) com abundância natural menor (Ducatti, 2012). São estes isótopos de baixa abundância que incitam a novas oportunidades para o uso de isótopos como traçadores em estudos bioquímicos, biológicos e ambientais.

As plantas apresentam grupos distintos quanto à caracterização isotópica, principalmente com relação aos valores de $\delta^{13}\text{C}$. As plantas de ciclos fotossintéticos C_3 e C_4 apresentam mecanismos fisiológicos que discriminam diferentemente o carbono atmosférico. No ciclo fotossintético C_3 as plantas fixam o carbono via ciclo de Calvin e discriminam o CO_2 , apresentando um valor médio de $\delta^{13}\text{C}$ de -27‰, enquanto que as plantas do ciclo C_4 fixam CO_2 via ciclo de Hatsch-Slack, no qual ocorre menor discriminação do CO_2 , originando valor médio de $\delta^{13}\text{C}$ de -13‰ (BOUTTON, 1996).

Os animais podem apresentar, nos seus tecidos celulares, composições isotópicas diferentes das características dos alimentos que consomem, provavelmente devido a três fatores: "memória" isotópica; fracionamento metabólico e direcionamento isotópico.

Os tecidos mais ativos metabolicamente (tecido hepático e sanguíneo) possuem taxas de *turnover* mais elevadas, refletindo a dieta recente, de poucos dias. Tecidos com taxas metabólicas intermediárias refletem dietas de semanas a meses, como no caso dos que formam o músculo, pele, cérebro e hemácias, enquanto que tecidos menos ativos, como dentes e barbatanas, dietas de anos (TIESZEN *et al.*, 1983; HOBSON e CLARK, 1992; WALKER *et al.*, 1999; ALVES-STANLEY e WORTHY, 2009).

No ovo, assim como em leite e fezes, não é possível calcular a taxa de renovação tecidual (*turnover*), uma vez que estes não são considerados tecidos. Entretanto, o estudo do *turnover* nestes produtos indica a taxa de deposição dos nutrientes para a sua formação, refletindo o metabolismo dos tecidos que geraram estes produtos (DENADAI *et al.*, 2006).

De acordo com CARRIJO *et al.* (2000), a análise isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ em ovos de aves poedeiras permite uma avaliação precisa de possíveis alterações na composição das rações através de múltiplas amostragens, em curto espaço de tempo, sem o sacrifício do animal. Entretanto, é necessário conhecer o comportamento dos isótopos estáveis dos ingredientes da dieta durante sua assimilação nos componentes dos ovos ao longo de sua síntese e verificar o quanto influencia no *turnover* do $\delta^{13}\text{C}$.

Em função do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o *turnover* do $\delta^{13}\text{C}$ pela substituição de dietas do ciclo fotossintético C_3 para C_4 e C_4 para C_3 nos ovos de codornas japonesas utilizando a técnica de isótopos estáveis.

MATERIAL E METODOS

O experimento foi conduzido na UNESP, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, SP, em câmara bioclimática, durante os meses de março a maio de 2012, sendo previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso dos Animais (protocolo nº56/2011-CEUA/FMVZ) desta Faculdade.

Foram utilizadas 216 codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*) alojadas com 43 dias de idade em câmara bioclimática para período de adaptação, com início do período experimental sete dias após o alojamento (50 dias de idade).

A câmara bioclimática possuía 4,30 m de comprimento por 4,50 m de largura e 2,60 m de altura, em que continha duas baterias de gaiolas. Cada bateria era composta de cinco andares, com duas gaiolas por andar, com 1,00 m de comprimento por 0,34 m de largura e 0,16 m de altura. Foram usados os três primeiros andares, totalizando 12 gaiolas, com capacidade de 18 aves cada. As gaiolas foram equipadas com comedouros tipo calha e bebedouros tipo nipples.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com dois tratamentos, sendo cada tratamento com seis repetições, em que a gaiola com capacidade de 18 aves foi considerada a repetição. Os tratamentos consistiam de troca de alimentação C_4 para C_3 e C_3 para C_4 , ou seja, as aves que receberam dieta contendo arroz quírrera (AS) na fase de crescimento passaram a receber dieta contendo milho moído (MS) na fase de postura e as codornas que receberam MS na fase de crescimento passaram a receber AS na fase de postura.

As dietas experimentais foram formuladas de modo a atender as exigências nutricionais das aves

e os ingredientes utilizados tiveram seus teores de proteína, cálcio, fósforo, energia metabolizável e aminoácidos, estimados conforme descrito por ROSTAGNO *et al.* (2011). Após a formulação foram colhidas amostras para a determinação da razão isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ dessas dietas. A composição e o valor isotópico das dietas estão descritos nas Tabelas 1 e 2.

Aos 50, 51, 52, 54, 57, 60, 64, 68, 73, 78, 85, 91 e 98 dias de idade foram coletados aleatoriamente seis ovos por tratamento. Estes ovos foram homogeneizados e armazenados em microtubos pré-identificados e posteriormente congelados a -18°C . Na etapa do processamento, todas as amostras foram liofilizadas em aparelho L108 (Liobras[®]) por 48 horas, a -55°C e pressão em torno de $50\mu\text{Hg}$.

Tabela 1. Composição e valor isotópico das dietas da fase de crescimento

Ingredientes	MS ¹	AS ²
		%
Milho, grão	59,72	-
Soja, farelo	33,71	32,55
Soja, óleo bruto	0,07	0,97
Arroz, quirera	0,53	60,28
Farinha de carne e ossos	4,60	5,00
Calcário calcítico	0,54	0,39
DL-Metionina	0,13	0,12
L-Lisina	0,06	0,05
Suplemento vitamínico/mineral ³	0,30	0,30
Sal comum	0,34	0,34
Valor isotópico (Média±DP, n=3)	-18,44±0,26	-28,38±0,03

¹MS: dieta a base de milho e farelo de soja. ²AS: dieta a base de quirera de arroz e farelo de soja. ³Suplemento vitamínico/mineral, níveis de garantia/kg de ração: Vit. A 6999,99 UI, Vit. D3 2000,00 UI, Vit. E 5,00 UI, Vit. K 1,599 mg, Vit. B2 3 mg, Vit. B12 8,00 mg, niacina 20,00 mg, ácido pantotênico 5,00 mg, colina 0,23 g, cobre 8,00 mg, ferro 50 mg, manganês 90 mg, zinco 50 mg, iodo 1,20 mg, selênio 0,20 mg, B.H.T. 15,00 mg, bacitracina de zinco 20,00 mg.

Tabela 2. Composição e valor isotópico das dietas da fase de postura (50-98 dias de idade)

Ingredientes (%)	MS ¹	AS ²
		%
Milho, grão	56,99	-
Soja, farelo	30,64	29,47
Soja, óleo bruto	1,13	1,98
Arroz, quirera	-	57,06
Farinha de carne e ossos	3,72	4,15
Calcário calcítico	6,70	6,54
DL-Metionina	0,23	0,22
Suplemento vitamínico/mineral ³	0,30	0,30
Sal comum	0,29	0,28
Valor isotópico (Média±DP, n=3)	-18,19±0,13	-27,63±0,36

¹MS: dieta a base de milho e farelo de soja. ²AS: dieta a base de quirera de arroz e farelo de soja. ³Suplemento vitamínico/mineral, níveis de garantia/kg de ração: Vit. A 6999,99 UI, Vit. D3 2000,00 UI, Vit. E 5,00 UI, Vit. K 1,599 mg, Vit. B2 3 mg, Vit. B12 8,00 mg, niacina 20,00 mg, ácido pantotênico 5,00 mg, colina 0,23 g, cobre 8,00 mg, ferro 50 mg, manganês 90 mg, zinco 50 mg, iodo 1,20 mg, selênio 0,20 mg, B.H.T. 15,00 mg, bacitracina de zinco 20,00 mg.

Depois de liofilizadas, as amostras de ovos foram acondicionadas em papel filtro devidamente identificadas para a extração de gordura. Os lipídeos foram extraídos porque esses são relativamente pobres em carbono-13, e a extração facilita a comparação entre tecidos e frações com proporções lipídicas distintas (tecidos e dietas) (TIESZEN *et al.*, 1983). As amostras foram imersas em éter etílico no aparelho Soxhlet e mantidas sob temperatura em torno de 55 a 65°C por 4 horas (DENADAI *et al.*, 2006). Após este período, as amostras foram suspensas durante uma hora para que apenas éter reconicionado as lavasse e, posteriormente, as mesmas foram retiradas do aparelho e secas em estufa de ventilação forçada durante uma hora para que houvesse evaporação do éter.

As amostras de ovos e dietas foram moídas em moinho criogênico (Spex Sample Prep, modelo Geno/Grinder 2010), a -196°C por três minutos para os ovos e oito minutos para as dietas, em frequência máxima (980 rpm) a fim de obter material homogêneo de finíssima granulometria (<50 μm), com aspecto de talco (DUCATTI, 2012).

As análises isotópicas das amostras foram realizadas no Centro de Isótopos Estáveis Ambientais do Instituto de Biociências (CIEA/IBB), UNESP, Botucatu, SP. O material moído foi colocado em cápsula de estanho e pesado em balança analítica de alta sensibilidade (Modelo MX5, Metler Toledo, Suíça), aproximadamente, 50 a 70 μg . Após a pesagem as cápsulas foram introduzidas, por meio de amostrador automático, no analisador Elementar, Flash 2000 *Organic Elemental Analyzer EA for IRMS*, no qual, em presença de oxigênio e óxido de cobre, foram queimadas quantitativamente para obtenção de dióxido de carbono. Os gases formados foram separados em colunas cromatográficas gasosas e analisados no espectrômetro de massas 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: $\delta^{13}\text{C}_{(\text{amostra, padrão})} = [(R_{\text{amostra}}/R_{\text{padrão}}) - 1] \times 10^3$; em que $\delta^{13}\text{C}$ = 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 determinado intervalo de tempo, foi empregada a função exponencial do tempo expressa pela equação: $\delta^{13}\text{C}_{(t)} = \delta^{13}\text{C}_{(f)} + [\delta^{13}\text{C}_{(i)} - \delta^{13}\text{C}_{(f)}]e^{-kt}$; em que $\delta^{13}\text{C}_{(t)}$ = 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 (DUCATTI *et al.*, 2002). A constante k engloba os processos de *turnover* metabólico e o acréscimo de compostos, ambos para o processo de diluição isotópica do carbono.

Para determinar o tempo de troca de 50% (meia-vida) e 99% de átomos de carbono foi utilizada a equação: $t = (-1/k) \ln(1-f)$; em que t = tempo de troca do carbono; k = constante de troca (*turnover*) em unidades de tempo^{-1} e f = fração de átomos trocados, neste caso 0,50 e 0,99. O cálculo de troca total fornece confiabilidade no cálculo de meia-vida, ou seja, se o período experimental foi necessário para que ocorresse toda troca dos carbonos da fração avaliada pelos da nova dieta, só assim o parâmetro meia-vida serve para comparação dos tratamentos.

Os dados obtidos foram analisados através do método de equações exponenciais do MINITAB®16 Statistical Software 2010 (State College: Minitab Inc.).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período experimental os valores do $\delta^{13}\text{C}$ dos ovos foram alterados gradativamente ao longo do tempo até alcançar o novo patamar de equilíbrio. A Figura 1 representa os ajustes das diluições isotópicas, equação do *turnover* e coeficiente de determinação de ambos os tratamentos.

O valor isotópico dos ovos do tratamento AS-MS no início do experimento foi, em média, de -27,26‰, e 48 dias após a troca da dieta, o valor isotópico obtido foi, em média, de -19,56‰. No tratamento MS-AS, o $\delta^{13}\text{C}$ inicial era, em média, de -19,10‰ e no final, em média, de -26,52‰ (Figura 1).

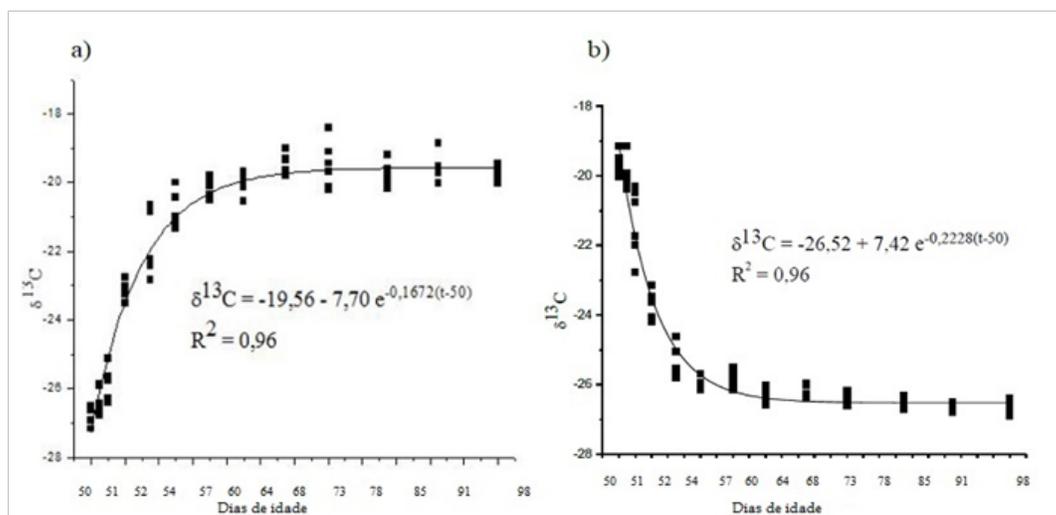


Figura 1. Curvas de turnover dos isótopos estáveis de carbono no ovo (gema+albúmen) das codornas dos tratamentos que passaram de quirera de arroz para milho moído (AS-MS) (a) e de milho moído para quirera de arroz (MS-AS) (b), em função do intervalo de avaliação.

Através do modelo exponencial proposto, obtiveram-se as meias-vidas e tempo de troca de 99% dos carbonos (troca total). Por meio da observação do tempo de troca total de carbonos, pode-se notar que o tempo experimental de 48 dias foi suficiente para que ocorresse o *turnover* total havendo a incorporação de 99% dos átomos de carbono da nova dieta (Tabela 3).

Tabela 3. Valores calculados da meia-vida (T) e troca total de átomos de carbono ($t_{(99\%)}$), em dias, do ovo inteiro (gema + albúmen) dos tratamentos que passaram de quirera de arroz para milho moído (AS-MS) e de milho moído para quirera de arroz (MS-AS), a partir do dia de substituição das dietas

Tratamentos	T	$t_{(99\%)}$
	dias	
AS-MS	4,1	27,4
MS-AS	3,1	20,6

Estes resultados estão de acordo com Carrijo *et al.* (2000) que, avaliando as taxas de *turnover* em ovos de poedeiras, encontraram valores de meia-vida de 4,0 dias quando trocaram a dieta C_3 pela

dieta C_4 e de 3,7 dias quando trocaram a dieta C_4 pela dieta C_3 e com DENADAI *et al.* (2006), de 3,8 dias na substituição de dietas C_4 para C_3 e 4,8 dias na substituição de C_3 para C_4 .

Além disso, o tempo de incorporação da dieta C_3 foi mais rápido que a dieta C_4 , o que pode ser explicado pelas diferenças histo-anatômica destes 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 que nas espécies C_4 estes tecidos representam apenas 30-35% do total de tecidos.

Na composição química do arroz quirera e 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 C_3 tanto histo-anatomicamente quanto bromatologicamente possuem elementos mais biodisponíveis do que plantas C_4 , fatos que podem explicar a maior velocidade de incorporação nos ovos das aves alimentadas com dieta C_3 .

A aliança entre a ferramenta dos isótopos estáveis e o conhecimento da nutrição e fisiologia aviária também é utilizada em estudos de ovos

marcados, origem geográfica das aves e certificação de sistemas de criação. É técnica de grande importância na nutrição, pois, trata-se de alimento de alto valor biológico, de baixo custo, e que pode suprir exigências nutricionais específicas nos humanos.

CONCLUSÃO

A utilização da técnica dos isótopos estáveis possibilita avaliar o *turnover* do ^{13}C na substituição de dietas, predominantemente C_3 para C_4 e C_4 para C_3 , em ovos de codornas japonesas. A velocidade de incorporação do sinal isotópico da dieta C_3 é mais rápida que a C_4 devido às diferenças bromatológicas entre a quirera de arroz e do milho moído.

AGRADECIMENTOS

A Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ/UNESP/Botucatu-SP), Centro de Isótopos Estáveis Ambientais (IBB/UNESP), Laboratório de Nutrição de Aves (FMVZ/UNESP) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo auxílio concedido (Projeto Temático "Isótopos Estáveis na Zootecnia" - Número do processo 2008/5741-4).

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 Journal of Experimental Biology**, v.212, p.2349-2355, 2009.
- BOUTTON, T.W. Stable carbon isotope ratios of soil organic matter and their use as indicators of vegetation and climate change. In: BOUTTON, T.W.; YAMASAKI, S.I. **Mass spectrometry of soils**. New York: Marcel Dekker, 1996. p.47-82.
- CARRIJO, A.S.; PEZZATO, A.C.; DUCATTI, C. Nutritional metabolism evaluation of laying hens using stable carbon isotopes ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$). **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.2, p.209-218, 2000.
- DENADAI, J.C.; DUCATTI, C.; PEZZATO, A.C.; CARRIJO, A.S.; CALDARA, F.R.; OLIVEIRA, R.P. Studies on carbon-13 *turnover* in eggs and blood of commercial layers. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.8, p.251-256, 2006.
- DUCATTI, C.; CARRIJO, A.S.; PEZZATO, A.C.; MANCERA, P.F.A. Modelo teórico e experimental da reciclagem do carbono-13 em tecidos de mamíferos e aves. **Scientia Agrícola**, v.59, p.29-33, 2002.
- DUCATTI, C.; MARTINS, C.L.; ARRIGONI, M.B.; MARTINS, M.B.; VIERA JÚNIOR, L.C.; DENADAI, J.C. Utilização de isótopos estáveis em ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, p.68-75, 2011. Suplemento especial.
- DUCATTI, C. **Isótopos estáveis ambientais**. Botucatu, SP: Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências; 2012. (Apostila).
- HOBSON, K.A.; CLARK, R.G. Assessing avian diets using stable isotopes I: *turnover* of ^{13}C in tissues. **The Condor**, v.94, p.181-188, 1992.
- 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. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 3.ed. Viçosa: UFV, Departamento de Zootecnia, 2011. 189p.
- 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.L.; POTTER, C.W.; MACKO, S.A. The diets of modern and historic bottlenose dolphin populations reflect through stable isotopes. **Marine Mammal Science**, 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. **Netherlands Journal of Agricultural Science**, v.39, p.31-48, 1991.