

1 – Introdução

A produção do porco Alentejano, actualmente, é uma actividade promissora que tem, por um lado, o fornecimento de matéria prima para as indústrias de presunto, nacional e espanhola, e de enchidos e, por outro lado, a produção de carne para consumo em fresco (Freitas, 2006). Assim, o aprofundamento do conhecimento das técnicas de produção do porco Alentejano é essencial para responder ao aumento da procura destes produtos, sendo a fase de acabamento do porco Alentejano, a Montanheira, especialmente importante para a qualidade dos produtos obtidos.

Um dos factores que maior peso tem em qualquer exploração pecuária é a alimentação, sendo esta muitas vezes decisiva na produção total do efectivo. Para que haja uma boa gestão da Montanheira é relevante ter conhecimento de quais os alimentos que são ingeridos pelos animais, bem como as suas quantidades. Desta forma, o estudo de técnicas de estimativas de ingestão e digestibilidade revelam-se importantes, de modo a que se possa fazer uma melhor gestão dos recursos alimentares dos animais, com a diminuição dos custos a eles associados.

Existem várias metodologias que foram desenvolvidas para a estimativa da ingestão e da digestibilidade, quer *In vivo*, quer *In vitro*, sendo que uma das mais recentes tem como recurso a utilização de n-alcenos. Os n-alcenos são hidrocarbonetos, que estão naturalmente presentes nas cutículas cerosas das plantas e possuem tamanho da cadeia variável. O perfil de alcenos é específico para cada espécie vegetal (Mayes *et al.*, 1986). Esta metodologia possui vantagens relativamente a outras técnicas com o mesmo fim, uma vez que possibilita utilizar o mesmo tipo de marcador para a estimativa da ingestão e da digestibilidade, reduzindo o trabalho laboratorial e analítico e, ainda, permite estimar a ingestão e a digestibilidade para cada animal individualmente (Oliván *et al.*, 1999). A digestibilidade é estimada utilizando alcenos ímpares (naturais) e a ingestão através da técnica de marcador duplo, isto é de alcenos pares (doseados), que funcionam como marcadores externos e de alcenos ímpares, que funcionam como marcadores internos.

Assim como os alcenos, os álcoois de cadeia longa são compostos que se encontram naturalmente nas plantas e as suas concentrações variam nas diferentes partes da planta e, também, consoante a espécie vegetal (Ali *et al.*, 2004, citados por Dove e Mayes, 2005). Os álcoois de cadeia longa são utilizados para complementar os

resultados dos n-alcenos, uma vez que as espécies vegetais são separadas com maior sucesso combinando-se estes dois compostos, do que utilizando apenas os alcenos (Bugalho *et al.*, 2004, citados por Dove e Mayes 2005).

Embora a técnica dos n-alcenos já tenha sido testada em várias experiências em ruminantes, existem poucos resultados publicados em suínos de raça Alentejana e, desta forma, pretende-se com este trabalho complementar estudos já efectuados anteriormente, devido à importância deste tema para o futuro da produção suína em extensivo no nosso país.

O objectivo deste trabalho é contribuir para a validação da utilização de n-alcenos e de álcoois de cadeia longa como marcadores para estimar a ingestão, a digestibilidade e a composição da dieta na raça suína Alentejana em Montanheira.

Para se atingir os objectivos propostos, realizou-se um ensaio com nove porcos em caixas metabólicas, para determinar a ingestão e a digestibilidade da dieta pelo método *In vivo* e em simultâneo dosear alcenos e estimar a ingestão e digestibilidade pela técnica dos n-alcenos. Neste trabalho, em particular, foram avaliados parâmetros associados à excreção dos marcadores externos (alcenos com número par de carbonos) e internos (alcenos com número ímpar de carbonos e álcoois de cadeia longa), nomeadamente o tempo necessário para que o marcador externo atinja um nível de excreção estável, variação diurna da excreção de marcadores, quer externos, quer internos, e recuperações fecais dos n-alcenos. O estudo destes parâmetros é importante na medida em que o seu resultado condiciona a aplicação prática da técnica a vários níveis, particularmente, (a) o conhecimento do tempo necessário após doseamento do marcador para iniciar a colheita de fezes, (b) a decisão quanto à frequência de doseamento de marcadores e colheita de fezes e, por último, (c) a escolha de marcadores a utilizar e a necessidade de aplicar correcções para a recuperação fecal de marcadores.

2 - Revisão Bibliográfica

2.1 – O Porco de Raça Alentejana

2.1.2 – Enquadramento Histórico

No sul de Portugal, no início do século XIX, a raça suína que predominava era a Alentejana, visto que as suas características alimentares proporcionavam o aproveitamento dos recursos naturais dos montados e de produtos agrícolas de baixo valor comercial (Oliveira, 1998).

Conforme Freitas (1998), na década de quarenta, a importância da raça suína Alentejana era evidente, ao nível da economia agro-pecuária das regiões do Sul do Tejo, na produção, comércio e industrialização da carne de porco do país.

No período entre o final da década de cinquenta até ao início dos anos noventa, houve uma diminuição dos efectivos de porco Alentejano e, conseqüentemente, o abandono do sistema de montanha, tendo ocorrido um crescimento das explorações intensivas de suínos (Freitas, 1998). Tal ocorreu devido à peste suína e à mudança de hábitos alimentares, que, conseqüentemente, esta gerou (Tavares 1983, citado por Freitas, 1998).

Na década de noventa, segundo Qureshi (1993), citado por Freitas *et al.* (2006), os sistemas de produção animal deveriam ser ambientalmente correctos, tecnicamente apropriados, economicamente viáveis e socialmente aceites. Tais factos aliados ao maior poder de compra e interesse pelo ambiente e bem-estar animal por parte dos consumidores, fizeram com que o efectivo suíno extensivo aumentasse significativamente (Freitas, 1998).

A fim de garantir os efectivos ainda existentes e de evitar a extinção da raça Alentejana, houve apoio financeiro para esta, para a recuperação dos montados e reinserção do porco de montanha. Os produtores formaram Associações (Associação de Criadores de Porco Alentejano e Associação Nacional de Criadores de Porco Alentejano) e estas, em 1992, uniram-se na União de Associações, que se

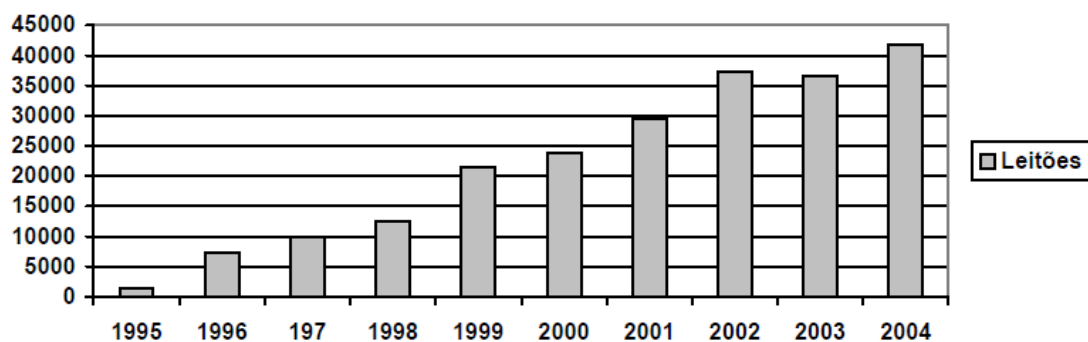
tornou a responsável pela gestão do Livro Genealógico da Raça Suína Alentejana (Fernandes *et al.*, 2008).

Muitos produtos alimentares derivados da produção de porco alentejano foram certificados, através das Denominações de Origem e da Indicação Geográfica (Tabela 2.1), o que contribuiu para um aumento das vendas dos mesmos e para tal se poder concretizar a produção de porco de raça alentejana, também aumentou (Freitas *et al.*, 2006). Na figura 2.1, pode verificar-se a evolução do número de leitões registados, até 2004.

Tabela 2.1: Produtos de Porco Alentejano certificados.

<u>Denominação de Origem</u>	<u>Indicação Geográfica</u>
Presunto de Barrancos	Presunto de Campo Maior e Elvas
Presunto do Alentejo	Paleta de Campo Maior e Elvas
Paleta do Alentejo	Presunto da Santana da Serra
Carne de Porco Alentejano	Paleta de Santana da Serra
	Enchidos de Portalegre
	Enchidos de Estremoz e Borba
	Enchidos de Beja

FONTE: Freitas *et al.* (2006).



FONTE: Freitas *et al.* (2006).

Figura 2.1: Evolução do número de leitões inscritos no livro de nascimentos.

2.1.1 - Breve Caracterização da Raça

A raça suína Alentejana é uma raça autóctone, com origem no Tronco Ibérico, cujo solar é a região do Alentejo (Ferreira, 2008). Segundo Reis (1995), citado por Ferreira (2008), trata-se de uma raça com grande adaptabilidade, com uma capacidade adipogénica ímpar, aproveitando da melhor maneira os recursos naturais do sul do país.

Ferreira (2008) afirma que o porco alentejano apresenta as seguintes características gerais:

- Tipo: animal corpulência médio-pequena, de esqueleto aligeirado, grande rusticidade e temperamento vivo;
- Pele: de cor preta ardósia, com cerdas raras e finas, de cor preta, aloirada ou ruiva;
- Cabeça: comprida e fina, de ângulo fronto-nasal acentuado, orelhas relativamente pequenas e finas, dirigidas para diante, de forma triangular e com ponta ligeiramente lançada para fora;
- Pescoço: de comprimento médio e regulamente musculado;
- Tronco: roliço, de regular capacidade, espádua regularmente desenvolvida, região dorso-lombar de mediano comprimento e largura, um pouco arqueada, ligando-se bem com a garupa; garupa de regular comprimento e largura, pouco oblíqua; ventre um pouco descaído; rabo de média inserção, fino, terminando com um abundante tufo de cerdas; coxas regularmente descaídas e de mediano desenvolvimento;
- Membros: de comprimento médio, delgados e bem aprumados, terminando por pés pequenos de unha rija;
- Andamentos: ágeis e elásticos.

Em relação às características reprodutivas, a gestação dura aproximadamente 112 dias e a taxa de fertilidade ronda os 90% (Nunes, 1993). Factores como o número de partos por animal, as condições alimentares, o maneio e a época do ano, influenciam o número de leitões nascidos por parto, que, de uma forma geral, é entre 5,5 e 8 (Fernandes, 1999).

No sistema de montanha, a produção de suínos alentejanos baseia-se no acabamento destes animais entre os 14 e os 18 meses de idade (Nunes, 1993).

2.2 – O montado Alentejano

O montado é a imagem de marca da paisagem agrária alentejana (Ferreira, 2001), sendo composto por formações relativamente abertas, semi-florestais mediterrânicas (Freitas, 1998). Este possui melhor adaptação às limitações do clima mediterrâneo, tais como a escassez de água durante os meses de temperaturas elevadas, com ocorrência no Verão, e temperaturas bastante baixas no Inverno, que condiciona o desenvolvimento vegetal, tornando-o característico das zonas deste tipo de clima (Lopez-Bote, 1998, citado por Mendes, 2005). Os solos dos montados alentejanos são pobres ou muito pobres, contribuindo para que haja prevalência de sistemas de produção pastoris ou florestais (Mendes, 2005).

O montado alentejano está assente num sistema silvo-pastoril onde os recursos alimentares naturais são directamente aproveitados pelas raças autóctones (Nunes, 2007), animais de elevada rusticidade e explorados em grandes propriedades privadas (Nunes, 1993). Deve-se, desta forma, frisar a elevada importância dos montados na conservação genética, pois permitem rendimentos económicos suportados a longo prazo (Nunes, 1993).

2.2.1 – Recursos Alimentares

As espécies arbóreas que mais se evidenciam no horizonte do montado alentejano são *Quercus rotundifolia* e *Quercus suber*, a azinheira e o sobreiro, respectivamente. No entanto, pode-se encontrar, ainda, o carvalho-negral (*Quercus pyrenaica*) ou o carvalho-cerquinho (*Quercus faginea*) (Freitas, 1998). As quercíneas são espécies bem adaptadas aos solos pobres e ácidos e às características semi-áridas do clima mediterrânico (Nunes, 2007).

No montado, a produção de frutos, bolota e lande, varia consoante o potencial genético de cada árvore e factores que lhes são extrínsecos (incidência de pragas e técnicas culturais utilizadas) ou intrínsecos (idade e número de ramos eliminados na poda), o ano e a região (Freitas, 2006). Segundo Picão (1947), citado por Ventura (1986) a azinheira apenas produz uma camada de bolota, que varia em tamanho e qualidade, conforme as castas, terreno e os excepcionais cuidados culturais. Quanto ao sobreiro, apresenta a maturação anual em três etapas:

- “Bastão” – com queda em Setembro-Outubro, é o mais grosso, escasso e temporão;

- “Lande” – com queda em Outubro-Dezembro, constitui a melhor camada, muito abundante e menos volumosa que a anterior;

- “Janeirinha” – queda em Janeiro, miúda e tardia.

Consoante a época de colheita e o estado da maturação da bolota a sua composição química difere, conforme é possível verificar na tabela seguinte.

Tabela 2.2: Composição química da bolota em diferentes épocas de colheita (resultados expressos em percentagem de Matéria Seca).

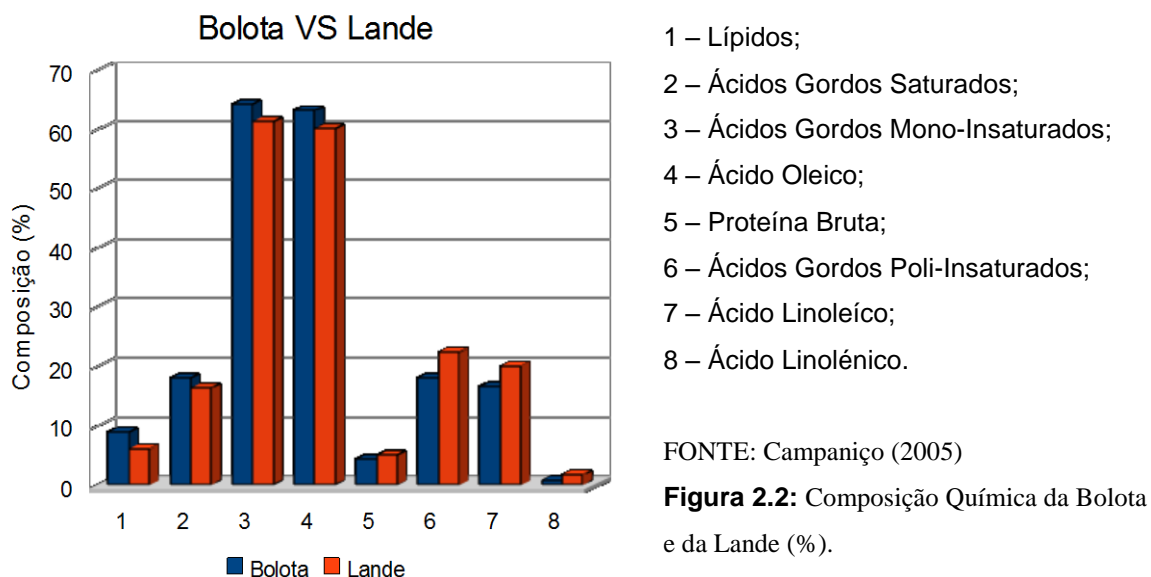
Época de Colheita	Matéria Seca (%)	Proteína Bruta	Extracto Etéreo	Açúcares Solúveis	Amido	Fenóis Totais	Taninos
Setembro	46,36	3,16	5,0	9,41	17,98	7,32	9,76
Outubro	53,43	3,26	7,7	10,20	51,64	7,94	7,35
Novembro	58,32	3,69	8,5	13,43	57,29	4,90	2,94

FONTE: Almeida e Marinho (1991), adaptação de Nunes (1993).

Observa-se que todos os componentes químicos analisados aumentam com a maturação da bolota, à excepção dos fenóis e dos taninos que diminuem, fazendo com que haja menor adstringência no fruto mais maduro.

Das duas árvores predominantes no montado alentejano a que mais fruto dá é a azinheira, tendo produções de bolota de 15 a 25kg/azinheira, enquanto que por sobreiro as produções são entre 2 a 17kg de lande (Freitas, 2006).

Campaniço (2005) afirma que a bolota é geralmente maior e mais doce que a lande, possuindo teores mais elevados de lípidos (8,91 vs 6,13%), ácidos gordos saturados (18,03 vs 16,39%) e mono-insaturados (64,12 vs 61,32%), reflectindo um teor superior de ácido oleico (63,11 vs 60,12%) e teores inferiores de proteína bruta (4,27 vs 5,02%) e ácidos gordos poli-insaturados (18,02 vs 22,49%), reflectindo o teor em ácido linoléico (16,56 vs 20,04%) e de ácido linolénico (0,79 vs 1,78%) mais baixos – Figura 2.2.



Natural ou melhorada, a vegetação herbácea é um outro recurso que os montados oferecem, porém em produções irregulares, a nível de qualidade e quantidade (Freitas, 2006). Mesmo assim a erva é importante, uma vez que funciona como complemento da bolota, tanto na possível redução da toxicidade provocada pelos taninos, como a nível proteico (Mendes, 2005). A composição química das pastagens do montado varia significativamente ao nível proteico ao longo do ano e de acordo com a variabilidade presente nos vários tipos de pastagem (Abreu 1992). A composição química da erva, nas épocas de maior disponibilidade de bolota, varia de acordo com os dados da tabela 2.3.

Tabela 2.3: Composição química da erva nas épocas de maior disponibilidade de bolota.

Época	MS (%)	% de Matéria Orgânica		
		PB	NDF	Celulose
Outono	33,2	16	65,3	34,9
Inverno	18,7	20,9	50,1	25

FONTE: Abreu (1992)

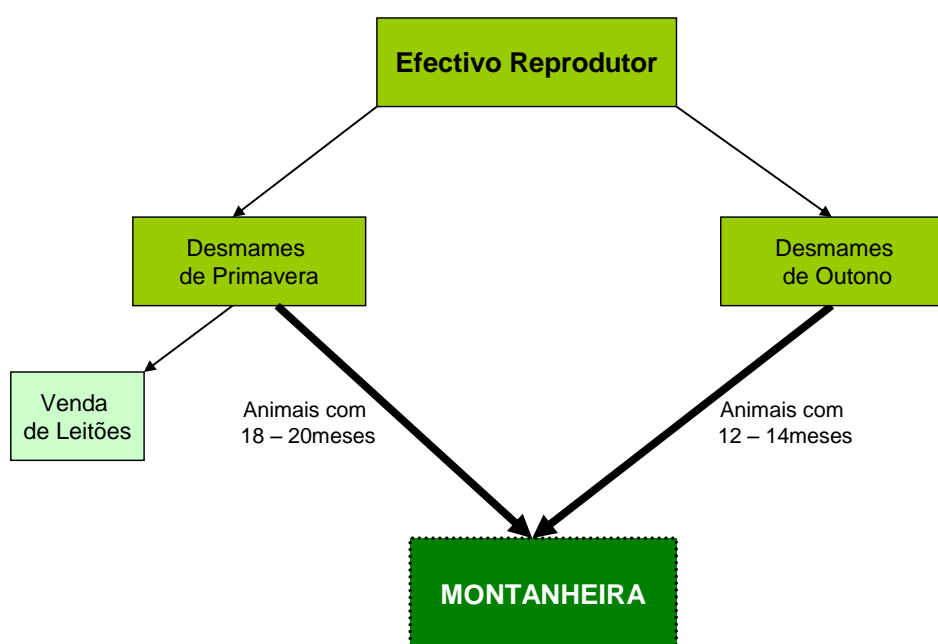
Segundo Abreu (1992), nas pastagens mediterrâneas é possível constatar a existência de diversas plantas, entre elas: *Dactylis*, *Lolium*, *Trifolium repens*, *Medicago*, *Phalaris*, *Trifolium subterraneum*, *Trifolium yannanicum*, *Trifolium brachycalycinum* e *Bromus*.

Além dos alimentos naturais já referidos, o porco de raça Alentejana aproveita ainda outros recursos do montado, como tubérculos, raízes, insectos, larvas e restolhos (Gomes, 2008).

“A opinião de que o porco é o melhor utilizador dos recursos do montado é comum à lavoura e à investigação” (Nunes, 2003), e é uma convicção realçada por afirmações como “a bolota além de um bom alimento para gados de todas as espécies, (...), aplica-se com notória vantagem, na criação, sustento e rápida engorda de muitos milhares de suínos” (Picão, 1944, citado por Nunes, 1993) e “a natureza criou a bolota para os porcos, e os porcos nasceram para a bolota (Picão, 1944, citado por Mendes, 2005).

2.2.2 – Sistema de Produção Tradicional: Montanheira

A engorda em montanheira, segundo Freitas (2006), é o elemento central e estratégico do sistema produtivo (Figura 2.3), a forma de acabamento mais tradicional e a que melhor valoriza os montados e os produtos do porco da raça Alentejana. Esta inicia-se nos finais de Outubro, princípios de Novembro e termina no final de Fevereiro, tratando-se de uma fase em que há elevada disponibilidade energética e que permite a obtenção de elevados crescimentos (Freitas, 2006).



FONTE: Adaptado de Farinha *et al.* (2005).

Figura 2.3: Esquema da exploração tradicional de porco de raça Alentejana.

O porco Alentejano é, desde tempos remotos, explorado em Montanheira, regime extensivo, perfeitamente integrado num sistema agro-silvo-pastoril bem definido e onde, durante os três ou quatro meses referidos, se faz a engorda intensiva dos animais nos montados de azinho e de sobro (Fernandes *et al.*, 2008).

Este traço da exploração do porco de raça Alentejana conserva-se até aos dias de hoje (Fernandes *et al.*, 2008) e, segundo estes autores, a duração do ciclo de produção depende do tipo de produto final: leitão para assar, carne para consumo em fresco, matéria-prima para indústria de enchidos ou indústria de Presunto. Os últimos três produtos passam pela Montanheira e os pesos vivos finais desejados são, respectivamente, 90 a 100Kg, 120 a 140Kg e 150 a 170Kg (Fernandes *et al.*, 2008).

O ganho médio diário de peso dos animais, em montanheira, varia consoante as características genéticas, a idade e o peso de entrada e a produção dos recursos naturais do montado (Carbó e Andrada, 2000).

Existem valores conhecidos da composição química dos principais alimentos (erva e bolota) que o porco de raça Alentejana ingere em Montanheira, porém a composição quantitativa da dieta destes animais não é de todo conhecida (Mendes *et al.*, s.d.). A pouca informação disponível relativa à ingestão e à digestibilidade dos alimentos em Montanheira constitui uma falha relevante para o conhecimento do sistema (Ribeiro *et al.*, 2007).

2.3 – Ingestão

Para se ter uma noção mais precisa do equilíbrio dietético de um animal deve ser estabelecida uma relação entre as necessidades nutricionais do animal e o que o alimento consumido lhe propicia (Dove e Mayes, 1991). Tal só é possível se a ingestão e a digestibilidade dos alimentos forem conhecidas (Castro, 2009).

Gomes (2010) afirma que o conhecimento destes parâmetros permite uma melhor utilização do montado pelos porcos Alentejanos, uma vez que é possível ajustar o encabeçamento dos animais à área destinada ao pastoreio, tendo-se noção se os recursos disponíveis são os suficientes para a alimentação dos animais, ou, se pelo contrário, existem necessidades nutricionais a suprir, através da suplementação alimentar. Desta forma, existe uma superior rentabilização das explorações agropecuárias dos porcos Alentejanos e segundo Mendes *et al.* (s.d.) a determinação da

composição da dieta, ao longo do período de engorda, pode permitir compreender melhor os efeitos da alimentação tradicional de montanha na qualidade dos produtos originados por estes animais.

Segundo Greenhalgh (1982), as técnicas para estimar a ingestão podem ser divididas em dois grupos, aquelas que se baseiam em medições na pastagem – métodos baseados na pastagem - e, por outro lado, as que estimam a ingestão com base no ganho obtido pelo animal - métodos baseados no animal.

No primeiro grupo é englobada a medição da ingestão através da quantificação da erva disponível, antes e depois do pastoreio. No entanto, esta técnica não permite efectuar a medição da ingestão de forma individual, a não ser que o animal seja colocado individualmente numa parcela (Abreu, 1992).

Nos métodos baseados no animal, a ingestão pode ser determinada:

- I. Pela variação de peso vivo do animal, sendo efectuadas pesagens dos animais imediatamente antes e depois do pastoreio, das suas fezes, urina e água ingerida (Erizian 1932, citado por Du e Penning, 1982). Assim, é necessário que os animais utilizem dispositivos para recolher amostras de fezes e urina e torna-se difícil determinar a quantidade de matéria seca da erva ingerida (Abreu, 1992);
- II. Através das necessidades energéticas do animal, conhecendo o conteúdo energético do alimento que lhe é fornecido, é possível estimar a quantidade de alimento que o animal poderá consumir. Para tal, é necessário fazer medições do peso vivo dos animais, para que em conjunto com as suas necessidades de manutenção e produção, sejam determinadas as necessidades energéticas totais (Baker, 1982). Nesta técnica, é importante referir que a determinação das necessidades energéticas depende da escolha das tabelas e fórmulas que melhor se adaptem às espécies e raças em estudo, fase produtiva, condições ambientais e de pastoreio (Abreu, 1992);
- III. Com base no comportamento alimentar dos animais em pastoreio, fundamentada no tempo de pastoreio e/ou pelo número de dentadas ao longo do tempo. Porém, este método pode resultar em estimativas de ingestão pouco correctas, devido à variação do tamanho das dentadas ao longo do tempo, ao curto espaço de tempo para observação e à dificuldade inerente em efectuar a observação sem afectar o comportamento natural dos animais (Dove e Mayes, 2000);

IV. Com a utilização de marcadores para determinar a excreção fecal e a digestibilidade dos alimentos (Abreu, 1992). Segundo Dove e Mayes (1996), os métodos que apresentam resultados mais fiáveis, para a estimar a ingestão individual de animais em pastoreio, são aqueles que tomam como base a digestibilidade do alimento ingerido e a sua produção fecal. A ingestão é estimada relacionando estes dois componentes, conforme a equação 2.1.

$$\text{Ingestão (Kg MS)} = \text{Produção Fecal (Kg MS)} / (1 - \text{Digestibilidade Total})$$

Equação 2.1: Estimativa da Ingestão (Kg MS).

2.3.1 – Determinação da Produção Fecal

A colheita de fezes total no campo é difícil e pode perturbar o comportamento normal dos animais, como tal a produção fecal é habitualmente estimada pela diluição de um marcador nas fezes, administrado por via oral (Dove e Mayes, 2005). A estimativa da excreção utilizando marcadores externos indigestíveis tem-se revelado mais eficiente, uma vez que é uma técnica de fácil aplicação e possui uma menor interferência no comportamento animal (Dove e Mayes, 1996)

Afim de ser considerada um marcador fecal ideal, uma substância deve ser totalmente recuperável nas fezes, de fácil identificação e análise, não pode sofrer alterações ao longo do processo digestivo, não deve ter efeitos tóxicos ou fisiológicos e, por fim, deve ter características idênticas ao conteúdo do tubo digestivo do animal no que diz respeito à densidade e tamanho das partículas (Dove e Mayes, 2003). A fórmula de cálculo para a produção fecal baseia-se no rácio entre a concentração de marcador fornecido e a concentração desse mesmo marcador presente nas fezes do animal (Mayes *et al.*, 1995) – Equação 2.2.

$$\text{Produção fecal (Kg MS/dia)} = \text{Dose Marcador Fornecido (mg/dia)} / \text{Concentração Marcador nas Fezes (mg/Kg MS)}$$

Equação 2.2: Estimativa da Produção Fecal (Kg MS/dia).

Têm sido utilizados vários marcadores para a estimativa da produção fecal, mas segundo Dove e Mayes (2005) nenhum cumpriu os referidos critérios de marcador ideal.

O óxido de crómio (Cr_2O_3) apresenta uma alta recuperação fecal e tem resultados satisfatórios como marcador externo, em ovelhas e caprinos (Dove e Mayes, 2005). É um dos marcadores externos mais utilizados nos estudos de digestão, por ser de baixo custo, rapidamente incorporado na dieta e analisado com facilidade. Porém este apresenta alguns inconvenientes como a não recuperação total, a variação na recuperação fecal entre animais e a concentração nas fezes inconstante ao longo do dia (Titgemeyer, 1997, citado por Berchielli *et al.*, 2005). Outra desvantagem do óxido de crómio é o facto da sua concentração nas fezes apenas se equilibrar seis a sete dias após o seu fornecimento (Rodríguez *et al.*, 2006). Devido aos distúrbios provocados nos animais e às suas possíveis características cancerígenas para os operadores, o uso deste marcador tem vindo a decrescer (Dove e Mayes, 2000).

O óxido de titânio (TiO_2) foi também utilizado como marcador em estimativas de ingestão da quantidade de solo ingerida pelos animais, devido ao facto de ser um elemento presente no solo em quantidades consideráveis e não ser absorvido pelas plantas. Como possível substituto do Cr_2O_3 para a estimativa da excreção fecal em ruminantes, foi ainda identificado um outro marcador, o sulfato de bário (BaSO_4) (Mayes *et al.*, 1995).

Existem alguns elementos raros, também presentes no solo, que podem ser utilizados como marcadores fecais, por possuírem recuperações fecais elevadas, como o Itérbio (Yb), pois ao ser doseado oralmente uma ou duas vezes por dia, permite a obtenção de resultados favoráveis (Dove e Mayes, 2000).

A lenhina é um componente indigestível, também, utilizado como marcador de digestibilidade (McDonald *et al.*, 2006) e durante o processo digestivo dos animais protege a celulose e a hemicelulose da hidrólise enzimática, sendo bastante resistente à degradação biológica (Béguin e Aubert, 1994, citado por Pires, 2008). No entanto, este composto pode ser deficientemente recuperado nas fezes, por diversos motivos, tais como a digestão verdadeira, a digestão aparente, que resulta da formação de um complexo solúvel lenhina-carbohidrato, a degradação parcial da lenhina fecal pelos reagentes usados durante a análise e as diferenças físicas e/ou químicas entre os alimentos e fezes quanto à natureza do material definido como lenhina (Muntifering, 1982, citado por Rodríguez *et al.*, 2006).

Para estimar a digestibilidade dos nutrientes em caprinos, bovinos e equinos é possível a utilização de cinza residual da determinação da fibra indigestível em detergente ácido (ADF) e de cinza insolúvel em ácido, tendo resultados satisfatórios (Rodríguez *et al.*, 2006). Porém, segundo Dove e Mayes (2003), tanto a lenhina, como as fibras insolúveis em detergente ácido não apresentaram resultados satisfatórios, pois levaram a recuperações fecais inconsistentes e, conseqüentemente, a estimativas de ingestão erróneas.

Os n-alcenos têm merecido especial destaque neste género de estudos, porque não causam riscos à saúde humana e animal, possibilitam estimativas cuidadas da ingestão de matéria seca e da composição botânica das dietas consumidas pelos animais e a sua análise laboratorial é extremamente simples e rigorosa (Dove e Mayes, 1999).

Na tabela 2.4 estão identificados alguns marcadores fecais utilizados em estimativas de produção fecal em herbívoros, as suas recuperações fecais e a forma de associação com o conteúdo no tubo digestivo.

Tabela 2.4: Diferentes marcadores fecais utilizados na estimativa da excreção fecal em herbívoros.

Marcador	Tipo	Análise	Recuperação	Associação
Cr₂O₃	Óxido insolúvel	AA ou RFX	Muito Alta	Nenhuma, densa
TiO₂	Óxido insolúvel	AA ou RFX	Muito Alta	Nenhuma, densa
BaSO₄	Sal insolúvel	RFX	Muito Alta	Nenhuma, densa
Ce, Dy, Er, Eu, Yt, Yb	Elementos raros solo	AA ou RFX	Média/Alta	Fase sólida, maioritariamente
Partículas plásticas	Polímero insolúvel	Física	Muito Alta	Nenhuma
Alcenos artificiais	Fibras insolúveis	CG	Média/Alta	Fase sólida, maioritariamente
CrEDTA	Complexo solúvel	AA ou RFX	Média /Alta	Fase líquida
CoEDTA	Complexo solúvel	AA ou RFX	Média/ Alta	Fase líquida

AA: espectroscopia de absorção atómica; RFX: espectroscopia fluorescente de raios X; CG: cromatografia gasosa. FONTE: Dove e Mayes (2000)

2.3.1 – Determinação da Digestibilidade da Dieta

A digestibilidade da matéria seca (MS) pode ser definida como a quantidade que não é excretada nas fezes e que, desta forma, é a absorvida pelo organismo animal e pode ser calculada de acordo com a fórmula:

$$\text{Digestibilidade MS} = (\text{MS ingerida (g)} - \text{MS excretada (g)}) / \text{MS ingerida (g)}$$

FONTE: McDonald *et al.* (2006).

Equação 2.3: Digestibilidade da MS.

Porém, a obtenção de uma estimativa precisa da digestibilidade, apresenta a dificuldade de se obter uma amostra representativa da dieta realmente consumida (Dove e Mayes, 2005), porque os animais em pastoreio possuem um comportamento alimentar selectivo e as espécies vegetais consumidas diferem da totalidade de espécies que se encontram na pastagem (Mayes *et al.*, 1995).

2.3.2.1 – Método “*In Vitro*”

Para se obterem estimativas da digestibilidade o mais correctas possível, são necessárias correcções com ensaios realizados *in vivo*, para as técnicas de estimativa de digestibilidade *in vitro* (Dove e Mayes, 2000).

A digestibilidade *in vitro* é geralmente estimada por meio de recolha de uma amostra de alimento, no esófago do animal fistulado, sendo representativa da dieta consumida por este (Dove e Mayes, 1996). Embora seja um método rápido e pouco dispendioso (Mendes, 2005), existem desvantagens mencionadas por Dave e Mayes (1996), que são:

- Os resultados são muitas vezes aplicados a animais de classes diferentes ou mesmo de espécies distintas ou com níveis de ingestão divergentes, cujos dados são usados para calibrar a digestibilidade *in vitro/in vivo*;
- A digestibilidade *in vitro* analisa um único valor, que é aplicado a todos os animais em estudo, não respeitando o facto de a digestibilidade variar de indivíduo para indivíduo;
- O procedimento *in vitro* ignora possíveis interacções entre diferentes componentes da dieta, como a proteína ou os suplementos amiláceos.

2.3.2.2 – Utilização de Marcadores Internos

Com a finalidade de se superar as desvantagens do procedimento *in vitro* para estimar a digestibilidade, começou-se a utilizar substâncias naturais e indigestíveis da dieta animal, como marcadores internos (Dove e Mayes, 2005). Os marcadores internos são substâncias que se encontram presentes de forma natural na dieta e que por serem indigestíveis ou apresentarem recuperação fecal elevada são utilizadas para estimar a digestibilidade (Dove e Mayes, 1991). A digestibilidade pode ser calculada pelas concentrações relativas do marcador na dieta e nas fezes (equação 2.4).

$$\text{Digestibilidade (\%)} = [1 - (\text{Concentração Marcador Dieta (mg/kg MS)} / \text{Concentração Marcador Fezes (mg/kg MS)})] \times 100$$

Equação 2.4: Estimativa da Digestibilidade com Marcadores Internos (%).

A concentração do marcador aumenta progressivamente, à medida que este avança no tracto gastrointestinal, devido à remoção de alguns constituintes do alimento pela digestão e pela absorção, sendo o aumento da concentração proporcional à digestibilidade, esta pode ser calculada através da concentração do marcador nas fezes (Astigarraga, 1997, citado por Rodríguez *et al.*, 2006).

A utilização de marcadores internos permite determinar a digestibilidade da dieta na sua totalidade, quando é conhecida a concentração do marcador nessa mesma dieta. Caso os animais sejam suplementados, em condições de pastoreio, é, ainda, necessário saber qual a concentração do marcador no suplemento, para que se possa determinar a sua digestibilidade (Dove e Mayes, 2000).

De um modo geral, apesar das vantagens do uso de marcadores internos na estimativa da digestibilidade, têm sido apontadas críticas à sua utilização. Entre elas, o facto de muitas substâncias utilizadas como marcadores internos terem recuperações fecais inconstantes, a incerteza de que o composto medido nas fezes corresponde exactamente ao que foi medido na dieta e as baixas recuperações fecais obtidas nalguns estudos. Estas situações levantam dúvidas sobre a verdadeira causa de obtenção de resultados antagónicos, pois muitos marcadores que apresentam

resultados bastante aceitáveis nalguns trabalhos, noutros revelaram-se ineficazes (Mendes, 2005).

A tabela 2.5 lista alguns dos marcadores internos mais utilizados para determinar a digestibilidade em herbívoros, as suas recuperações fecais e a forma de associação com o conteúdo no tubo digestivo.

Tabela 2.5: Diferentes marcadores internos utilizados na estimativa digestibilidade em herbívoros.

Marcador	Tipo	Análise	Recuperação	Associação
Lenhina	Fracção Fibrosa	RE	Variável	Fase sólida
Lenhina Ácido - detergente	Fracção Fibrosa	RE	Variável	Fase sólida
ADF indigestível	Fracção Fibrosa	RE	Variável	Fase sólida
NDF indigestível	Fracção Fibrosa	RE	Variável	Fase sólida
Celulose	Fracção Fibrosa	RE	Variável	Fase sólida
Cinzas ácido insolúveis	Siliciosa	RE	Alta	Fase sólida
Sílica	Siliciosa	Variável	Alta	Fase sólida
Cromogéneo	Pigmento	Colorimetria	Variável	Incerta
AG cadeia longa	Ceras Cuticulares	GC	Alta	Fase sólida, maioritariamente
N-alcenos cadeia longa	Ceras Cuticulares	GC	Média/alta	Fase sólida, maioritariamente

ADF: Fibra ácido detergente; NDF: Fibra digestível em detergente neutro; AG: ácidos gordos; RE: Resíduo de extracção; GC: cromatografia gasosa. FONTE: Dove e Mayes (2000)

2.4 – Constituintes das Ceras Cuticulares das plantas

Dove e Mayes (2005) afirmam que praticamente todas as plantas superiores têm uma cutícula de cera nas suas superfícies externas, que normalmente é uma mistura complexa de compostos lipídicos alifáticos sintetizados pela própria planta. Estes autores referem também que a composição da cera difere bastante entre distintas espécies de plantas e, ainda, entre as diferentes partes da mesma planta.

Nas plantas, as ceras normalmente estão na fracção cuticular e os alcanos (desde o C₂₁ até ao C₃₇) constituem uma grande parte do total das substâncias, onde predominam os compostos de cadeias com número impar de átomos de carbono. Outros constituintes das ceras cuticulares das plantas são, vulgarmente, cadeias hidrocarbonadas ramificadas, aldeídos, ácidos gordos livres, diversas cetonas e

álcoois livres, podendo estes últimos formarem até metade de certas ceras (McDonald *et al.*, 2006). Na tabela 2.6, pode-se observar alguns componentes comuns presentes naturalmente na cera cuticular das plantas.

Tabela 2.6: Componentes comuns da cera cuticular insaponificada das plantas.

Componente	Ocorrência nas plantas	Níveis típicos (%cera) nas <i>Poaceae</i>
<i>N</i>-alcenos	Comum	3-40
Monoésteres	Comum	5-20
Álcoois primários	Comum	2-70
Ácidos Gordos de cadeia longa	Comum	Normalmente <10
Álcoois secundários e cetonas	Comum	-
B-dicetonas	Comum	5-70
Hidróxi ou oxo-β-dicetonas	Incomum	3-50

FONTE: Tulloch, 1976 citado por Dove e Mayes (1991)

Os componentes das ceras cuticulares foram considerados possíveis marcadores pelas seguintes razões, que foram citadas por Ribeiro (2005):

- Podem ser analisados como elementos discretos;
- São relativamente inertes;
- Pouco absorvidos pela mucosa intestinal.

2.4.1 – Utilização como Marcadores de Digestibilidade

2.4.1.1 – Os N-Alcanos

Os alcanos têm a fórmula geral C_nH_{2n+2} e têm a característica de serem moléculas que apenas possuem ligações simples, contendo o número máximo de átomos de hidrogénio que se podem ligar com o número de átomos de carbono existente na molécula (Chang, 2005). Apresentam-se em cadeias lineares ou ramificadas, são predominantemente compostos por cadeias ímpares entre 21 a 37 átomos de carbono, são relativamente estáveis devido às ligações carbono-hidrogénio, são apolares, praticamente insolúveis em água, menos densos que esta e a sua concentração é mais elevada nas folhas do que nos caules, na maioria das espécies vegetais (Dove e Mayes, 2001), sendo componentes das ceras epicuticulares das

plantas (Ferreira *et al.*, s.d.). São usadas como marcadores internos para estimar a digestibilidade por serem altamente indigestíveis (Dove e Mayes, 2001).

Existem diferenças no perfil de n-alcenos entre espécies vegetais (tabela 2.7) e entre partes da mesma planta, desta forma os n-alcenos podem ser utilizados para estimar a composição e proporções da dieta seleccionada pelos animais (Ferreira *et al.*, 2007). Assim, Côrtes *et al.* (2005) afirmam que cada planta possui um perfil único de n-alcenos o que permite conhecer aproximadamente a composição de misturas complexas.

A utilização dos n-alcenos como marcadores internos para estimar a composição da dieta é um procedimento simples, baseado na comparação do perfil de n-alcenos de uma mistura (fezes) com o perfil de n-alcenos que poderão contribuir para essa mistura (alimentos) (Ferreira *et al.*, s.d.). Para tal, é fundamental conhecer o perfil de n-alcenos das espécies forrageiras antes de se iniciar o referido procedimento, afim de se obterem bons resultados nas estimativas de ingestão, composição da dieta e digestibilidade (Paine *et al.*, 2002).

Além dos resultados precisos que o método dos n-alcenos fornece, existem outras vantagens como a possibilidade de estimar a ingestão e digestibilidade em sistemas extensivos, utilizar os mesmos marcadores para a estimativa da ingestão e da digestibilidade, reduzindo o trabalho de laboratório e analítico, e estimar individualmente a ingestão e a digestibilidade (Oliván *et al.*, 1999). Estas substâncias, apesar de não serem os componentes presentes em maior concentração nas ceras cuticulares das plantas, têm sido usadas em estudos taxonómicos e ensaios de ingestão e digestibilidade, por estarem bem distribuídas nas ceras cuticulares e por serem de fácil análise e identificação (Dove e Mayes, 1991).

Tabela 2.7: Concentrações de n-alcenos e de álcoois de cadeia longa na cera cuticular em diferentes espécies vegetais (mg/kg MS).

	n-Alkanes						Long-chain alcohols				
	C ₂₅	C ₂₇	C ₂₉	C ₃₁	C ₃₃	C ₃₅	1-C ₂₄ -OH	1-C ₂₆ -OH	10-C ₂₉ -OH	1-C ₂₈ -OH	1-C ₃₀ -OH
Dicotyledons											
<i>Brassica oleracea</i>	2	6	456	136	5	0	23	142	196	25	29
<i>Calluna vulgaris</i>	13	63	160	636	458	14	363	167	14	260	298
<i>Fagus sylvatica</i>	18	361	13	3	3	0	191	89	7	3	39
<i>Lotus corniculatus</i> cv. Goldie	14	38	38	34	33	0	13	2154	0	905	1015
<i>Lotus pedunculatus</i> cv. Maku	15	151	212	55	37	1	28	2463	0	1327	1285
<i>Picea sitchensis</i>	2	3	8	4	2	0	85	18	2065	14	20
<i>Pinus sylvestris</i>	13	28	21	1	10	4	81	58	1853	13	114
<i>Trifolium glomeratum</i>	11	35	313	267	36	0	48	124	0	73	1199
<i>Trifolium repens</i>	9	35	108	124	15	4	18	143	0	61	1297
<i>Trifolium subterraneum</i>	4	16	250	74	10	-	193	408	0	281	4709
<i>Trifolium striatum</i>	10	48	990	68	8	0	37	214	0	444	1259
Monocotyledons											
<i>Austrodanthonia racemosa</i>	8	17	73	613	625	13	45	66	-	126	455
<i>Austrodanthonia richardsonii</i>	19	26	58	90	11	0	66	435	0	171	131
<i>Bothriochloa macra</i>	22	132	65	111	34	4	61	44	-	285	221
<i>Bromus catharticus</i>	6	15	116	60	34	4	13	85	17	4052	84
<i>Chloris gayana</i>	12	89	180	243	137	32	64	56	-	187	149
<i>Cynodon dactylon</i>	0	11	30	66	91	58	31	25	-	-	0
<i>Digitaria dactyla</i>	5	24	55	96	126	42	88	76	-	-	0
<i>Festuca arundinacea</i>	24	42	129	216	59	2	27	639	10	101	58
<i>Lolium perenne</i>	10	33	77	103	84	11	104	2628	10	446	627
<i>Microlaena stipoides</i>	5	12	70	216	156	8	11	17	-	35	1660
<i>Paspalum dilatatum</i>	0	8	12	56	36	13	41	15	-	-	20
<i>Paspalum notatum</i>	0	0	5	35	168	308	31	9	-	-	0
<i>Pennisetum clandestinum</i>	0	7	12	79	195	204	30	9	-	-	0
<i>Phalaris aquatica</i>	27	17	21	16	7	2	19	3726	23	45	472
<i>Setaria anceps</i>	32	82	62	74	25	5	28	20	-	-	24
<i>Themeda triandra</i>	7	20	59	278	255	41	26	33	-	15	69
<i>Vulpia myuros</i>	28	41	176	184	37	3	80	901	13	42	65

Adapted in part from data in Bugalho et al. (2004) and Ali et al. (2005).

FONTE: Dove e Mayes (2005).

Na dieta tradicional dos porcos Alentejanos a concentração de n-alcenos é relativamente baixa, principalmente porque a bolota tem uma baixa concentração, comparativamente à pastagem. Na bolota é na casca que se encontram as concentrações mais elevadas de n-alcenos, devido à existência de uma camada cerosa na sua superfície (Ribeiro *et al.*, 2007 e Gomes, 2010). Na tabela seguinte estão presentes as concentrações médias de diferentes n-alcenos em bolota e erva em ensaios realizados com porcos de raça Alentejana.

Tabela 2.8: Concentrações médias dos n-alcenos constituintes da erva e bolota (mg/kg MS).

	C ₂₅	C ₂₇	C ₂₈	C ₂₉	C ₃₀	C ₃₁	C ₃₂	C ₃₃	C ₃₅	C ₃₆	
Bolota Inteira	5,38	21,58	6,54	61,50	2,81	4,14	0,59	1,25	0,00	0,00	1
	17,47	46,54	16,85	80,90	8,65	9,03	5,25	5,14	0,00	3,48	2
	9,50	31,90	9,40	47,10	3,70	4,40	2,00	1,00	0,80	1,50	3
Miolo de Bolota	4,14	4,89	4,17	5,46	2,54	2,00	1,14	1,97	0,46	0,31	1
	12,35	14,96	11,79	18,68	7,19	5,97	5,42	4,61	0,00	3,50	2
	5,40	5,50	4,50	4,70	3,10	1,90	1,20	0,70	0,20	0,60	3
Casca de Bolota	14,39	71,19	17,07	222,37	6,80	11,90	2,02	3,50	0,00	0,00	1
	29,66	162,64	36,34	366,63	9,34	16,64	3,12	4,35	0,00	0,00	2
	12,80	62,00	17,80	155,10	4,10	5,20	1,30	0,80	0,70	0,70	3
Erva	13,44	32,30	13,10	146,06	23,61	351,00	26,01	102,02	23,24	0,00	1
	15,50	37,80	9,90	176,70	13,00	231,10	9,30	39,60	1,80	7,60	2

FONTE: 1- Gomes (2010); 2- Castro (2009); 3- Ribeiro *et al* (2007)

Segundo Oliveira e Prates (2000) os alcanos não são totalmente inertes no tracto digestivo dos animais e, por isso, a sua recuperação fecal não é completa, ou seja, é inferior a 100%, desta forma o uso da técnica dos n-alcenos conduz à subestimativa da digestibilidade. A recuperação fecal é determinada através do rácio entre a quantidade excretada e a quantidade ingerida de marcador (equação 2.5).

$$\text{Recuperação Fecal (\%)} = \frac{\text{Quantidade excretada marcador (mg)}}{\text{Quantidade ingerida marcador (mg)}} \times 100$$

Equação 2.5: Estimativa da Recuperação Fecal (%).

Com o intuito de minimizar erros associados à incompleta recuperação fecal utiliza-se um n-alcano sintético, com número par de átomos de carbono, que é administrado oralmente, recorrendo a cápsulas de gelatina, *pellets* de papel, bolinhos, etc. (Gomes, 2010). Desta forma, obtém-se uma equação mais complexa e precisa para estimar a ingestão (equação 2.6).

$$\text{Ingestão (kg MS/dia)} = D_j / [(F_j / F_i) \times (H_i - H_j)]$$

Sendo:

F_j – Concentração fecal n-alceno sintético (mg/kg MS);

F_i – Concentração fecal n-alceno natural (mg/kg MS);

D_j – Dose diária administrativa do n-alceno sintético (mg);

H_i – Concentração do n-alceno natural da dieta (mg/kg MS);

H_j – Concentração n-alceno sintético na dieta (mg/kg MS).

Equação 2.6: Estimativa da Ingestão utilizando a técnica dos n-alcenos (Kg MS/dia).

Assim, o n-alceno natural funciona como marcador interno para estimar a digestibilidade, enquanto que o n-alceno sintético doseado serve como marcador externo para avaliar a produção fecal e, caso a recuperação fecal do n-alceno natural e do n-alceno sintético sejam iguais, os erros associados com a recuperação fecal incompleta anulam-se (Dove e Mayes, 2005). A estimativa da ingestão utilizando n-alcenos de comprimento de cadeia idênticos é mais precisa, uma vez que as recuperações fecais dos n-alcenos tendem a ser semelhantes e, por isso, a estimativa da ingestão será mais correcta (Dove e Mayes, 2005).

A recuperação fecal dos alcanos sintéticos é por norma mais elevada, devido ao facto destes marcadores externos estarem normalmente associados à componente líquida da dieta, o que torna a sua recuperação fecal mais elevada. Contrariamente aos alcanos naturais, que se encontram normalmente associados à componente sólida da dieta, os alcanos sintéticos associam-se à componente líquida da dieta, apresentando uma passagem mais rápida pelo tubo digestivo e, como tal, são absorvidos em menor quantidade e apresentam maior recuperação fecal (Dove e Mayes, 1991).

Em estudos com animais monogástricos, como cavalos e porcos, a recuperação fecal de n-alcenos parece não depender do tamanho da cadeia, sendo sempre semelhante para os diferentes alcanos utilizados (Dove e Mayes, 1996).

Nos estudos feitos com porcos Alentejanos, utilizando a técnica dos n-alcenos, a recuperação fecal foi mais elevada nos alcanos sintéticos (C₃₂ e C₃₆) do que nos alcanos naturais e normalmente possuem valores próximos dos 100% (tabela 2.9).

Tabela 2.9: Percentagens médias de recuperação fecal dos n-alcenos de cadeia ímpar e de cadeia par, em porcos de raça Alentejana (%).

	C₂₅	C₂₇	C₂₉	C₃₁	C₃₂	C₃₃	C₃₆	
Recuperação	58,63 ^a	53,51 ^{ab}	62,79 ^{ac}	-	94,88 ^d	-	103,19 ^e	1
Fecal Média	13,10 ^a	75,06 ^{be}	133,91 ^c	91,45 ^{bd}	106,77 ^{bc}	56,81 ^e	109,95 ^{cd}	2
(%)	38,5 ^a	54,3 ^b	67,5 ^c	-	72,6 ^c	68,4 ^c	69,1 ^c	3

^{a-e} Médias com letras diferentes correspondem a diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$).

^{a-c} Médias com letras diferentes correspondem a diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$).

FONTE: 1 - Gomes (2010), 2 -Ribeiro *et al.* (2007), 3 - Oliveira *et al.* (2005).

A quantidade diária de alceno sintético deverá ser doseada de acordo com a concentração fecal que se pretende obter com esse marcador, ou seja de acordo com a ingestão prevista para os animais em estudo. Desta forma, a concentração obtida nas fezes para o alceno sintético não deverá ser significativamente diferente da obtida para o alceno natural e assim, os erros que possam surgir na análise cromatográfica são minimizados (Oliván e Osoro, 1997).

Apesar de todas as vantagens da técnica dos n-alcenos como marcadores para estimar a digestibilidade ou a composição de dietas já apresentadas, existem limitações inerentes a esta, devido ao facto de alguns alcenos apresentarem baixas concentrações nos alimentos (Dove e Mayes, 2000) e, ainda, à possibilidade da concentração de n-alcenos encontrada nas fezes poder ser influenciada pela existência de hidrocarbonetos insaturados, que durante o processo digestivo podem sofrer modificações e saturar, aumentando consequentemente, a concentração fecal de alcenos (Dove e Mayes, 1991).

A obtenção de estimativas de ingestão fiáveis, com a utilização de concentrações fecais na dieta de n-alcenos depende de factores como: i) a concentração do n-alceno natural na dieta (Oliván e Osoro, 1997); ii) a obtenção de uma amostra representativa da dieta; iii) o conhecimento preciso da quantidade do n-alceno sintético administrado aos animais; iv) o doseamento dos n-alcenos sintéticos e a obtenção de uma amostra representativa de fezes; v) a escolha de um par de alcenos adjacentes com recuperações fecais semelhantes; e vi) a preparação, as amostras e a extracção dos n-alcenos (Dove e Mayes, 1991).

2.4.1.2 – Os Álcoois de Cadeia Longa

Os álcoois, quimicamente, são moléculas que possuem o grupo hidroxilo (OH) (Chang, 2005).

A possibilidade de serem utilizados outros componentes das ceras cuticulares além dos n-alcenos, nomeadamente os n-alcenos e álcoois de cadeia longa, em ensaios de digestibilidade tem sido objecto de vários estudos (por exemplo, Oliván e Osoro, 1997).

Os álcoois de cadeia longa são compostos que, como os alcanos, possuem diferentes concentrações nas várias espécies de plantas e nas distintas partes das plantas, como foi possível verificar na tabela 2.7, podendo ser obtidos juntamente com os alcanos, como parte do mesmo procedimento analítico (Ali *et al.*, 2004, citados por Dove e Mayes, 2005). Ao serem utilizados em conjunto com os n-alcenos, estes compostos podem alargar o leque de componentes identificados numa dieta (Oliván e Osoro, 1997).

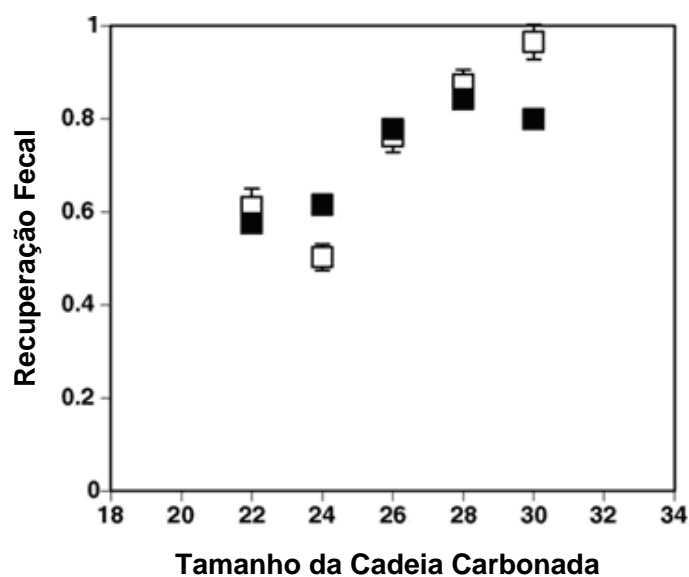
No estudo realizado por Gomes (2010), foram determinadas as concentrações de álcoois de cadeia longa presentes na bolota e na luzerna, alimentos da dieta de porcos de raça Alentejana (tabela 2.10). Tal como para os n-alcenos, os álcoois de cadeia longa, também, se encontram maioritariamente na casca da bolota, porém, ao contrário do que acontece nos n-alcenos, os álcoois que tendem a predominar são os que apresentam número par na cadeia carbonada. Os cromatogramas dos extractos dos álcoois de cadeia longa nos alimentos, refugos e fezes, revelaram a presença de um pico – “pico X” – com um tempo de retenção de, aproximadamente, 13,37 minutos, que não foi identificado, uma vez que não se utilizou nenhum padrão com um tempo de retenção semelhante. Este pico apresentou uma área com valores bastante consideráveis (Gomes, 2010).

Tabela 2.10: Concentrações médias dos álcoois de cadeia longa presentes na bolota e na luzerna (mg/kg MS).

	Pico X *	C ₂₂ OH	C ₂₄ OH	C ₂₆ OH	C ₂₈ OH	C ₃₀ OH
Bolota Inteira	192,68	0,00	90,64	18,55	15,96	311,96
Miolo de Bolota	210,47	0,00	36,21	13,41	8,56	308,56
Casca de Bolota	446,81	0,00	283,36	45,77	50,49	477,18
Luzerna	451,42	0,00	65,48	151,39	228,45	317,34

* Os valores apresentados não são concentrações, dado que não se pôde calcular o factor de resposta para esta substância. FONTE: Gomes (2010).

Foram estudadas as recuperações fecais dos álcoois de cadeia longa em ovinos e verificou-se que há um acréscimo progressivo destas com o aumento do tamanho da cadeia, tal como nos n-alcenos (Dove e Mayes, 2005). Nestes estudos, as recuperações fecais variaram de cerca de 60% para o álcool C₂₂OH, até cerca de 90% no álcool C₃₀OH (Figura 2.4).



■ Ali *et al.* (2004) - □ Dove e Charmeley (s.d.) – FONTE: Dove e Mayes (2005)
As barras verticais representam os erros padrões associados à média das recuperações fecais.

Figura 2.4: Recuperações fecais dos álcoois de cadeia longa (C₂₂OH até C₃₀OH).

Gomes (2010) estudou a recuperação fecal de álcoois de cadeia longa em porcos Alentejanos, obtendo resultados com valores mais baixos para a recuperação média fecal dos mesmos álcoois, em relação a outros estudos. Anteriormente, verificou-se que o álcool C₃₀OH atingiu o valor mais alto de recuperação fecal no

ensaio de Ali *et al.* (2004) e o segundo mais elevado no ensaio de Dove e Charmeley (s.d), porém no estudo de Gomes (2010) foi o álcool que teve menor valor de recuperação fecal. Como existiram diferenças significativas ($p \leq 0,05$) para o álcool $C_{30}OH$, nos diferentes tratamentos, não foi feita a comparação da recuperação fecal média deste álcool com os restantes (Tabela 2.11).

Tabela 2.11: Recuperações fecais médias dos álcoois de cadeia longa em porcos de raça Alentejana (%).

	C₂₄OH	C₂₆OH	C₂₈OH	n	EPM
Recuperação Fecal Média (%)	53,70 ^a	56,60 ^a	66,39 ^b	27	1,562

^{a-b} Médias com letras diferentes correspondem a diferenças significativas ($p \leq 0,05$).

FONTE: Gomes (2010)

Bugalho *et al.* (2004) demonstraram que a informação fornecida pelos álcoois de cadeia longa é complementar àquela já suportada pelos alcanos. Consequentemente, a discriminação entre espécies vegetais com a combinação de alcanos e álcoois de cadeia longa, é mais eficiente do que apenas com alcanos (Dove e Mayes, 2005).

2.4.2 – Estimativa da Composição da Dieta

Foram desenvolvidos alguns métodos para estimar a composição da dieta seleccionada pelos animais, sendo os mais usuais a recolha de amostras de pastagem, tentando simular o comportamento de pastoreio dos animais e a utilização de animais com fístulas esofágicas (Oliván *et al.*, 1999). Existem outros métodos para estimar a composição da dieta que são baseados nas taxas de isótopos de carbono em amostras e na utilização de constituintes das ceras cuticulares das plantas como marcadores (Dove e Mayes, 2005).

Os n-alcenos e os álcoois de cadeia longa podem ser utilizados na estimativa da composição da dieta, uma vez que os seus teores diferem amplamente ao nível da cutícula das plantas. No entanto, pela facilidade de análise, os alcanos têm sido mais utilizados para esse fim (Dove e Mayes, 2000), apesar dos álcoois serem considerados bons marcadores para a determinação da composição da dieta, devido à

sua grande diversidade em diferentes espécies vegetais e à sua elevada recuperação fecal (Oliván e Osoro, 1997).

O método utilizado nestas determinações tem como base comparar a concentração de n-alcenos nas fezes com a concentração existente nos componentes da dieta. São construídos sistemas de equações em que é igualada a concentração de n-alcenos presentes nas fezes, à concentração de n-alcenos nos diferentes componentes da dieta (Oliván e Osoro, 1997) – equação 2.7.

$$x\text{Ai} + \text{Bi} + z\text{Ci} = \text{Hi}$$

Sendo:

x – Proporção do componente A na dieta;

y – Proporção do componente B na dieta;

z – Proporção do componente C na dieta (1 – x – y);

A_i – Concentração do alceno i no componente A da dieta;

B_i – Concentração do alceno i no componente B da dieta;

C_i – Concentração do alceno i no componente C da dieta;

H_i – Concentração do alceno i nas fezes dos animais/recuperação fecal.

Equação 2.7: Determinação de diferentes componentes da dieta através da concentração de n-alcenos presentes na dieta.

A concentração fecal dos n-alcenos na dieta deve ser corrigida de acordo com a recuperação fecal do n-alceno utilizado na estimativa. Caso contrário, os resultados na estimativa da composição da dieta será desviado a favor das espécies que apresentam maiores concentrações de n-alcenos de cadeia longa, uma vez que estes por norma possuem maiores valores de recuperação fecal (Oliván e Osoro, 1997).

A técnica dos n-alcenos oferece a possibilidade de determinar a composição da dieta dos animais em pastoreio, permitindo estimar a proporção dos componentes da pastagem, que apresentem um padrão de alcenos diferente na sua composição, como é o caso das gramíneas e leguminosas e plantas herbáceas e lenhosas (Oliván e Osoro, 1997).

Nas plantas dicotiledóneas, as concentrações do álcool C₃₀ são geralmente bastante mais elevadas do que nas monocotiledóneas, podendo ser um factor muito útil, ao se utilizar concentrações de álcoois para o estudo de estimativas da composição da dieta. Nos trabalhos que envolvem a análise de plantas

gimnospérmicas, o álcool secundário 10-nonacosanol poderá ser importante, uma vez que pode funcionar como marcador da composição da dieta (Dove e Mayes, 2005).

Dove e Mayes (2005), citados por Dove e Charmley (2008), mostraram que a combinação de n-alcenos com álcoois de cadeia longa permitiram uma melhor discriminação dos componentes da dieta do que qualquer classe de outro marcador sozinho. Como resultado, as estimativas mais precisas do consumo de forragem foram aquelas baseadas na combinação de alcenos e álcoois (Dove e Mayes, 2005).

3 - Materiais e Métodos

3.1 - Ensaio *in vivo*

Todo o ensaio *in vivo* foi realizado no ano lectivo de 2008 – 2009, para execução de outros trabalhos elaborados por colegas do mesmo Mestrado. No entanto, como foram utilizadas as amostras de fezes recolhidas neste ensaio de campo, para a análise laboratorial, torna-se relevante proceder à explicação da forma como o ensaio de campo foi concretizado, bem como a preparação das amostras de alimentos, fezes e refugos.

3.1.1 - Animais e alojamento

Foram colocados em “quartelhas” individuais 17 porcos de raça Alentejana, machos e castrados, pertencentes à Herdade da Mitra. Todos tinham acesso a água *ad libitum* e foram alimentados com luzerna e aveia, duas vezes por dia, durante uma semana.

Destes animais, escolheram-se nove conforme o seu comportamento e facilidade de hábito à luzerna, cujo peso vivo médio era de 97,6Kg \pm 12,3. Procedeu-se à pesagem de todos os animais à entrada e saída das “quartelhas”.

Os nove suínos escolhidos foram alojados em caixas metabólicas individuais, em duas salas das instalações do ovil, na Herdade da Mitra, na Universidade de Évora.

3.1.2 - Distribuição de alimentos

As caixas metabólicas possuíam comedouros, para uma alimentação controlada e “chupetas”, de forma que a água estivesse sempre disponível durante todo o ensaio.

Os alimentos fornecidos ao longo do ensaio foram uma mistura de bolota e lande, colhidas na herdade da Mitra, no final do ano de 2008, e luzerna desidratada comercial. O alimento foi distribuído três vezes por dia (8h30, 13h00 e 17h30), com o intuito de que os animais se alimentassem de forma contínua, tanto quanto possível, para se assemelhar ao que acontece em Montanheira.

Contributo para a validação da utilização de constituintes das ceras cuticulares das plantas como marcadores para estimar a ingestão em porcos Alentejanos: Caracterização da excreção de n-alcenos e álcoois de cadeia longa em porcos alentejanos

Os suínos em ensaio foram submetidos a diferentes regimes alimentares, porém todos passaram por cada um dos referidos regimes, nos diferentes períodos do ensaio. Os tratamentos alimentares eram três:

1º - 4Kg de bolota;

2º - 4Kg de bolota e 0,2Kg de luzerna desidratada (95:5);

3º - 4Kg de bolota e 0,4Kg de luzerna desidratada (90:10).

Desta forma, os animais foram alimentados conforme o regime alimentar, segundo o esquema seguinte.

Tabela 3.1: Esquema de regimes alimentares.

	1º Período	2º Período	3º Período
Animal 1			
Animal 2			
Animal 3			
Animal 4			
Animal 5			
Animal 6			
Animal 7			
Animal 8			
Animal 9			

Tratamento 1 - bolota
Tratamento 2 - 95% bolota + 5% Luz.
Tratamento 3 - 90% bolota + 10% Luz.

Assim, pode-se constatar que o ensaio de campo foi realizado seguindo o delineamento experimental de quadrado latino, uma vez que existiam três grupos com três animais e cada grupo possuía um tratamento diferente (T1, T2 e T3), nos diferentes períodos (1ºP, 2ºP e 3ºP).

Os alimentos refugados foram recolhidos entre as refeições e quantificados no final de cada dia.

As análises da bolota distribuída e refugada, quer em composição química, quer em concentração de n-alcenos e álcoois de cadeia longa, foram sempre feitas ao

nível da casca, miolo e bolota inteira, uma vez que ao longo do ensaio os animais ingeriram maioritariamente miolo de bolota.

3.1.3 - Distribuição Cronológica

O ensaio de campo consistiu em três períodos de durações e tratamentos diferentes, como já foi referido. Com a finalidade de habituação dos animais às instalações, o primeiro foi o período mais longo, tendo durado 15 dias, enquanto que o segundo durou 12 e o terceiro, 10 dias. Entre o primeiro e o segundo período, os animais voltaram a ser colocados em “quartelhas” afim de descansarem das caixas metabólicas.

Os primeiros dias de cada período tiveram como finalidade a adaptação dos animais ao novo tipo de regime alimentar, sendo fornecidos, além dos alimentos do respectivo tratamento, “bolos” sem alcanos nos dias 1 e 2, excepto no terceiro período, para que se habituassem a ingeri-los. A partir do terceiro dia eram dados aos porcos dois “bolos”, um antes da primeira refeição e outro antes da terceira, com os alcanos C₃₂ e C₃₆, na quantidade de 50mg de cada por bolo. No terceiro período, estes bolos foram dados logo no primeiro dia, uma vez que os animais já estavam habituados a estes e não os rejeitavam. Na tabela 3.3, resume-se o esquema do ensaio.

Tabela 3.2: Resumo dos tempos de adaptação, recolha de fezes e de fornecimento de alcanos, em cada período.

Dias	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1ºP	Tempo de adaptação														
											Recolha de amostras				
			Fornecimento de “bolos” com alcanos												
2ºP	Tempo de adaptação														
								Recolha de amostras							
			Fornecimento de “bolos” com alcanos												
3ºP	Tempo de adaptação														
						Recolha de amostras									
	Fornecimento de “bolos” com alcanos														

Os últimos cinco dias, de cada período, destinavam-se à recolha de fezes totais e urinas, tendo sido os refugos recolhidos um dia antes destas e os alimentos um dia antes da recolha de refugos. Deste modo tinha-se a excreção fecal da respectiva alimentação, uma vez que se assumiu que a duração de passagem dos alimentos no tracto digestivo dos animais é cerca de 48 horas.

Durante o tempo de adaptação, recolheram-se as fezes totais dos animais ao longo do dia, para determinar o número de dias necessários para se atingir um patamar estável de excreção dos n-alcenos. Na fase de colheitas existiu um sub-período de 3 dias, em que as amostras de fezes eram colhidas de 2,5 em 2,5 horas, 4 a 5 vezes por dia, de maneira a possibilitar a determinação da variação diurna da concentração fecal dos n-alcenos.

3.1.4 – Preparação dos Bolos com Alcanos

Para se estudar a variação da concentração fecal dos n-alcenos foram fornecidos bolos previamente doseados com alcanos pares (C_{32} e C_{36}) a partir do terceiro dia, duas vezes por dia, um antes da primeira refeição e outro antes da última refeição.

Antes do ensaio *in vivo*, foi feita a preparação dos bolos com alcanos, que consistiu na realização de uma solução dos alcanos sintéticos, C_{32} e C_{36} , em n-heptano, para que cada bolo contivesse 50mg de C_{32} e 50mg de C_{36} . A solução foi colocada em banho-maria, a quente, para que não houvesse precipitação. Cada bolo foi furado ao centro e, utilizando-se uma pipeta, aplicou-se 1ml da solução. Por fim, todos os bolos foram secos numa estufa a 100°C, ao longo de uma hora, com o intuito que o n-heptano evaporasse e que não existissem perdas dos alcanos, ficando os C_{32} e C_{36} absorvidos nos queques.

No final, os bolos foram armazenados em sacos de papel em doses diárias, 18 bolos por saco, para o seu posterior fornecimento aos animais.

3.1.5 – Preparação de Amostras

À medida que foram colhidas, as amostras de alimentos, fezes e refugos foram armazenadas numa arca congeladora a -20°C.

As amostras de fezes foram liofilizadas e as amostras de refugos foram secas numa estufa com ventilação, durante dois dias, a 65°C. Quanto às amostras de bolota foram descongeladas e contou-se o número existente em cada recolha diária. Metade das bolotas foi cortada para ser analisada como bolota inteira e a outra metade foi separada em miolo e casca, para uma análise disjunta de cada componente da bolota. As amostras foram pesadas e só depois liofilizadas. Após estes processos, todas as amostras foram moídas, num moinho com um crivo de 1mm, e, no final, armazenadas em frascos de vidro.

3.2- Análises Laboratoriais

A análise laboratorial incidiu na determinação de Matéria Seca e nas Extracções de alcanos e álcoois de cadeia longa das amostras de fezes recolhidas, durante o ensaio de campo já descrito. Estas amostras estavam armazenadas em frascos de vidro, no Laboratório de Nutrição Animal da Herdade da Mitra, e as fezes encontravam-se já moídas, como referido anteriormente.

Esquemáticamente, na figura 3.1, é possível verificar a forma como a análise laboratorial das amostras foi efectuada.

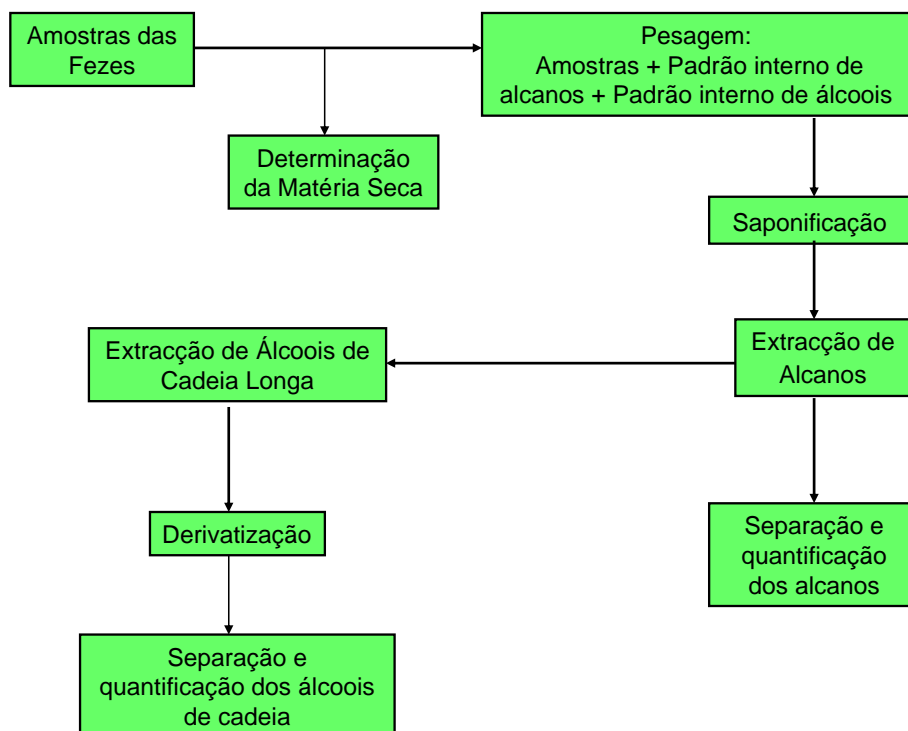


Figura 3.1: Sequência das análises laboratoriais efectuadas.

Todas as análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal, infra-estrutura do Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas (ICAAM), à excepção das separações e quantificações dos alcanos e dos álcoois de cadeia longa, que foram realizadas no Laboratório de Enologia, pois era neste local que se encontrava o Cromatógrafo Gasoso. Ambos os laboratórios se situam na Herdade da Mitra, da Universidade de Évora.

3.2.1 - Determinação da Matéria Seca (MS)

A determinação da MS foi realizada afim de ser possível reportar à MS as concentrações de n-alcenos e álcoois de cadeia longa de diferentes amostras de fezes.

Apesar de todas as amostras terem sido sujeitas à análise de matéria seca em trabalhos anteriores, esta voltou a ser repetida, uma vez que já estavam armazenadas em frascos de vidro há alguns meses.

A MS foi determinada de acordo com a norma ISO 6496:1999. Pesaram-se 3 gramas de cada amostra em duplicado, para cadinhos de metal previamente tarados e numerados. Estes eram colocados na estufa a 106°C durante uma noite e no dia seguinte foram novamente pesados, depois de arrefecerem num excicador.

No final, com base na seguinte expressão matemática, calculou-se o teor de MS de cada amostra:

$$\text{MS (\%)} = \frac{\text{peso final cadinho} - \text{tara cadinho}}{\text{Peso amostra}} \times 100$$

Equação 3.1: Cálculo do teor em Matéria Seca (%).

3.2.2 - Alcanos e Álcoois de Cadeia Longa

3.2.2.1 – Extracção

A extracção dos n-alcenos e dos álcoois de cadeia longa foi feita de acordo com o método proposto por Dove e Mayes (2006).

Pesaram-se 0,1 gramas de cada amostra de fezes, em duplicado, para tubos de vidro com tampas PTFE. De seguida para cada um destes tubos são introduzidas as soluções de padrão interno de alcanos e de álcoois, cujas concentrações estão apresentadas nas tabelas 3.4 e 3.5, respectivamente.

Tabela 3.3: Concentrações dos padrões internos dos n-alcenos sintéticos (mg de alcano sintético/g de decano).

N-alcenos Sintéticos	Concentração do Padrão Interno (mg/g decano)	Concentração do Padrão Interno * (mg/g decano)
C₂₂	0,3664	0,3425
C₃₄	0,3449	0,3479

*A primeira solução esgotou-se e foi necessário preparar uma nova solução.

Tabela 3.4: Concentrações dos padrões internos do álcool de cadeia longa C₂₇OH (mg de álcool/g de heptano:etanol).

Álcoois	Concentração do Padrão Interno (mg/g heptano: etanol)
C₂₇OH	1,2580
C₂₇OH*	1,2948
C₂₇OH*	1,3109
C₂₇OH*	1,3922
C₂₇OH*	1,3759
C₂₇OH*	1,6534

*A primeira solução esgotou-se e foi necessário preparar novas soluções.

Às amostras e às soluções colocadas nos tubos, adicionaram-se 1,5 mililitros de hidróxido de potássio etanólico. Os tubos, posteriormente, são postos no bloco de aquecimento, durante 16 horas, para que ocorra hidrólise de trigliceridos e de outros esteris. Passado este tempo, a temperatura do bloco de aquecimento é diminuída para os 60°C, sendo o resto da metodologia da extracção realizada sempre nesta temperatura. Com a finalidade de se obterem duas fases líquidas nos tubos (aquosa e não aquosa), são-lhes adicionados 1,5ml de n-heptano, agitando-se suavemente, e, depois 0,4 ml de água destilada, sendo então vigorosamente agitados. Desta forma, é possível transferir-se a fase não aquosa, que contem hidrocarbonos, incluindo alcanos, álcoois de cadeia longa, esteróis, pigmentos e outros compostos e que se encontra superficialmente nos tubos, para vias de 4ml (V1). Esta extracção é repetida após se adicionar mais uma vez 1,5 ml de n-heptano. O conteúdo extraído para os vias é, então, evaporado até secagem completa, no bloco de aquecimento, que se

encontra equipado com um concentrador de amostras que sopra ar a uma baixa pressão. De seguida, os extractos obtidos são dissolvidos com 0,3 ml de n-heptano, estas soluções são filtradas em colunas de polietileno com enchimento em sílica gel, para extrair os n-alcenos dos restantes compostos. Antecipadamente, por baixo de cada uma das colunas foram colocados segundos viais (V2) para que se pudesse recolher o eluído, que possui os alcenos extraídos. Para que os extractos sejam extraídos adiciona-se por mais duas vezes 1ml de n-heptano aos V1 e coloca-se nas colunas. Depois, junta-se 0,5 ml de n-heptano directamente no topo da coluna. Para se remover o n-heptano dos V2, estes são colocados no bloco de aquecimento com o evaporador de concentrado e, por fim os extractos são redissolvidos com 0,3ml de dodecano e, depois, transferidos para viais de 2ml, adequados ao aparelho de cromatografia gasosa, ficando os n-alcenos prontos para a análise cromatográfica. Na diluição final dos extractos é utilizado o dodecano, uma vez que é menos volátil que o heptano e, assim, a resolução dos picos de alcenos, nos cromatogramas, é superior (Dove e Mayes, 2003).

Os álcoois de cadeia longa, que se pretendem extrair, encontram-se nas matérias que ficaram retidas nas colunas de polietileno e como tal, é nesta fase que se inicia a extracção dos referidos compostos, colocando-se no topo de cada coluna 90ml de n-heptano : acetato de etilo (80:20), já com novos viais de 4ml (V3) previamente colocados debaixo destas. Os solventes resultantes nos V3 são evaporados no concentrador e, de seguida, dissolvidos com 0,5ml de n-heptano. São transferidos 50µl de conteúdo dos V3, para colunas de SPE já preparadas e colocadas na unidade de vácuo. Adicionam-se ao topo das colunas 0,95ml de n-heptano, liga-se o vácuo e estas extracções são ignoradas, sendo relevante o conteúdo que ficou nas colunas. Assim, colocam-se viais V4, por baixo das colunas, afim de prosseguir a extracção dos álcoois. No cimo das colunas colocam-se 0,9ml de heptano:acetato de etilo (95:5) e 0,9ml de heptano:acetato de etilo (90:10), accionando-se o vácuo após cada uma destas adições. Os V4 são colocados no concentrado de amostras, até à evaporação completa dos solventes.

Após esta metodologia efectua-se a derivatização dos álcoois, uma vez que são compostos voláteis, pois tratam-se moléculas polares, uma vez que possuem o grupo hidroxilo (OH) e, assim, são modificados de modo a formar-se trimetilsilil (TMS) para que os compostos sejam menos voláteis, o que permite que sejam analisados no cromatógrafo gasoso com maior rigor. Para tal, os extractos presentes nos V4 são dissolvidos em 200µl de heptano:etanol (50:50) e transferidos para viais de 2ml. O

conteúdo destes é evaporado e, depois, é-lhes adicionado 250µl da solução de derivatização. Os viais são aquecidos em banho de areia, no bloco de aquecimento de amostras, a 90°C e durante 45 minutos, ficando as amostras prontas para a análise cromatográfica.

3.2.2.2 - Preparação de reagentes e padrões

(A) Hidróxido de Potássio (KOH) etanólico:

Pesam-se 56 gramas de KOH e dissolvem-se em 600 ml de etanol a quente, com o auxílio de um agitador magnético. No final, ajusta-se o volume para 1 l com etanol.

(B) Sílica gel para enchimento da coluna:

Mistura-se num erlenmeyer sílica gel com n-heptano, de maneira a que este fique 1 cm acima da sílica em repouso.

(C) Solução de derivatização:

Para cada 10 ml de solução misturam-se 0,99 ml de BSTFA, 0,01 ml de TMCS, 4,0 ml de Piridina e 5,0 ml de dodecano.

(D) Padrão interno de alcanos:

Prepara-se uma solução com aproximadamente 0,3 mg de C₂₂ e 0,3 mg de C₃₄, por grama de decano. As concentrações exactas que foram utilizadas de cada alcano estão apresentadas na tabela 3.3.

(E) Padrão interno de álcoois:

Prepara-se uma solução com aproximadamente 1,2 mg de C₂₇OH por grama de heptano/etanol (50:50). As concentrações exactas que foram utilizadas de C₂₇OH estão apresentadas na tabela 3.4.

Durante este trabalho experimental, um erro laboratorial fez com que não fosse possível obter valores das concentrações dos álcoois de cadeia longa para a variação fecal ao longo dos dias nos animais 7, 8 e 9 e para a variação fecal durante o dia nos animais 1, 2, 3 e 4.

(F) Padrão externo de alcanos:

Faz-se uma solução com as quantidades adequadas dos n-alcenos que se pretendem identificar, em decano. As quantidades de alcanos utilizadas apresentam-se na tabela 3.6.

Tabela 3.5: Concentrações dos padrões externos nos n-alcenos, diluição 10x (mg/l).

N-alcenos	Concentração do Padrão Externo (mg/l)
C₂₂	59,20
C₂₃	20,40
C₂₅	22,80
C₂₇	38,30
C₂₈	15,30
C₂₉	50,80
C₃₀	10,50
C₃₁	25,00
C₃₂	71,10
C₃₃	10,35
C₃₄	60,00
C₃₅	7,85
C₃₆	56,70

(G) Padrão externo de álcoois:

Tal como no padrão externo de alcanos, no padrão externo de álcoois, também é feita uma solução em decano, com as quantidades apropriadas dos álcoois que se pretendem identificar. Para os dois padrões externos de álcoois utilizados (P₁ e P₂), as quantidades estão apresentadas na tabela 3.7.

Tabela 3.6: Concentrações dos padrões externos nos álcoois de cadeia longa, diluição 5x (mg/l).

Álcoois de Cadeia Longa	Concentração do Padrão Externo 1 (mg/l)	Concentração do Padrão Externo 2 (mg/l)
C ₁₉ OH	255,00	-
C ₂₀ OH	539,00	-
C ₂₁ OH	259,00	-
C ₂₂ OH	450,00	104,60
C ₂₄ OH	-	51,40
C ₂₆ OH	-	76,20
C ₂₇ OH	-	96,20
C ₂₈ OH	-	52,00
C ₃₀ OH	-	103,40

3.2.2.3- Separação, Identificação e Quantificação

A separação, identificação e quantificação, tanto dos alcanos, como dos álcoois, foram feitas por cromatografia gasosa.

A cromatografia gasosa é utilizada na separação de compostos ou gases, possuindo duas fases:

- Fase estacionária: onde permanecem as substâncias sólidas ou líquidas;
- Fase móvel: onde existe um gás de arraste (Silva, 2007), que neste trabalho foi utilizado o hélio.

Segundo Degani et al (1998), os gases utilizados na fase móvel devem ter alta pureza e ser inertes, em relação à fase estacionária.

As substâncias da amostra a ser analisada passam para o estado gasoso assim que são injectadas no aparelho, pois passam por um vaporizador (Silva, 2007). Estas substâncias são transportadas sob condições de temperatura controladas, por um gás de arraste inerte para a coluna que contém a fase estacionária (Brewer, s.d.).

Depois da coluna, a amostra passa por um detector e os dados pretendidos podem ser obtidos por um registador potenciométrico, ou por um integrador, ou por um computador, sendo as substâncias identificadas pelos seus tempos de retenção na fase estacionária (Degani *et al*, 1998), isto é, de acordo com o tempo que cada componente leva para atingir o final da coluna, poderá ser determinada a sua

afinidade pela fase estacionária, facilitando a sua caracterização e identificação (Silva, 2007).

A coluna capilar usada no cromatógrafo, com 30m de comprimento, 0,53 mm de diâmetro interno e espessura de revestimento de 0,5 µm. Trata-se de uma coluna Rtx@ - 1 (restek 10140), sendo revestida a 100% com dimetilpolisiloxano. As características da coluna escolhida estão relacionadas com a polaridade e a volatilidade das substâncias que se pretendem separar e é empregado um sistema de “injecção directa” com a utilização de um liner específico recomendado por Dove e Mayes, 2006.

As quantidades injectadas de cada amostra foram de 1 µl. A temperatura utilizada para o injector foi 280°C, o fluxo do hélio na coluna foi 4ml/minuto, a temperatura inicial do forno foi de 170°C durante quatro minutos, a primeira rampa sofreu um aumento de 30°C/minuto até aos 215°C, onde permaneceu durante um minuto. Houve uma segunda rampa, com um aumento de temperatura de 6°C/minuto até atingir os 300°C. Esta temperatura manteve-se durante três minutos. No detector a temperatura era 340°C.

Foram injectados dois padrões externos a cada dez amostras no caso dos alcanos (figura 3.2). Os padrões externos dos alcanos continham treze alcanos em quantidades conhecidas (C₂₂, C₂₃, C₂₅, C₂₇, C₂₈, C₂₉, C₃₀, C₃₁, C₃₂, C₃₃, C₃₄, C₃₅ e C₃₆). Nos álcoois de cadeia longa foram utilizados dois padrões externos, um primeiro que possuía uma mistura de quatro álcoois, C₁₉OH, C₂₀OH, C₂₁OH e C₂₇OH, e um segundo composto por seis álcoois, C₂₂OH, C₂₄OH, C₂₆OH, C₂₇OH, C₂₈OH e C₃₀OH. O primeiro foi feito com o intuito de completar o segundo, uma vez que em análises feitas em trabalhos anteriores, surgiu um pico que não se conseguiu identificar, tentando-se com este novo padrão determinar a que álcool este corresponde. No caso dos álcoois, eram injectados dois padrões externos do primeiro modelo, seguido de dois padrões externos do segundo, a cada dez amostras, conforme o esquema ilustrado na figura 3.3.

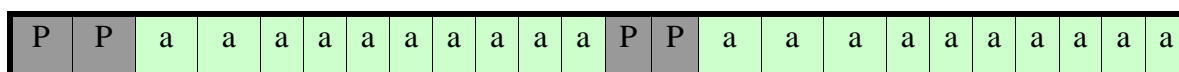


Figura 3.2: Ordem de injecção de padrões externos (P) e amostras (a) de alcanos, no Cromatógrafo Gasoso.

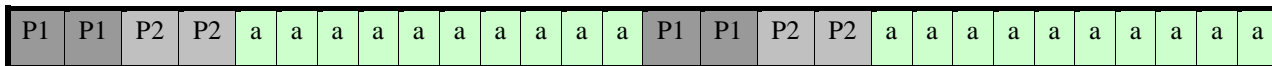


Figura 3.3: Ordem de injeção de padrões externos (P1 e P2) e amostras (a) de álcoois de cadeia longa, no Cromatógrafo Gasoso.

As amostras líquidas, depois de injectadas, passam para a coluna capilar, já no estado gasoso, onde existe a fase estacionária e é neste local que vão ser separadas as várias substâncias; no final passam por um detector (figura 3.4). Durante este período de tempo, pode-se observar directamente no Chemstation os picos que vão sendo obtidos em tempo real, o início é marcado por uma linha vermelha que corresponde ao momento de injeção da amostra (figura 3.5).

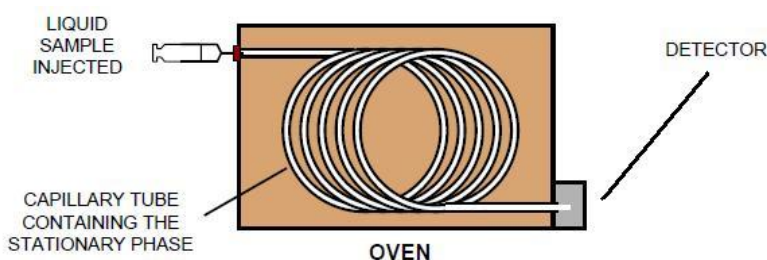


Figura 3.4: Esquema dos locais de passagem das amostras pelo Cromatógrafo Gasoso (Chromatography, s.d.)

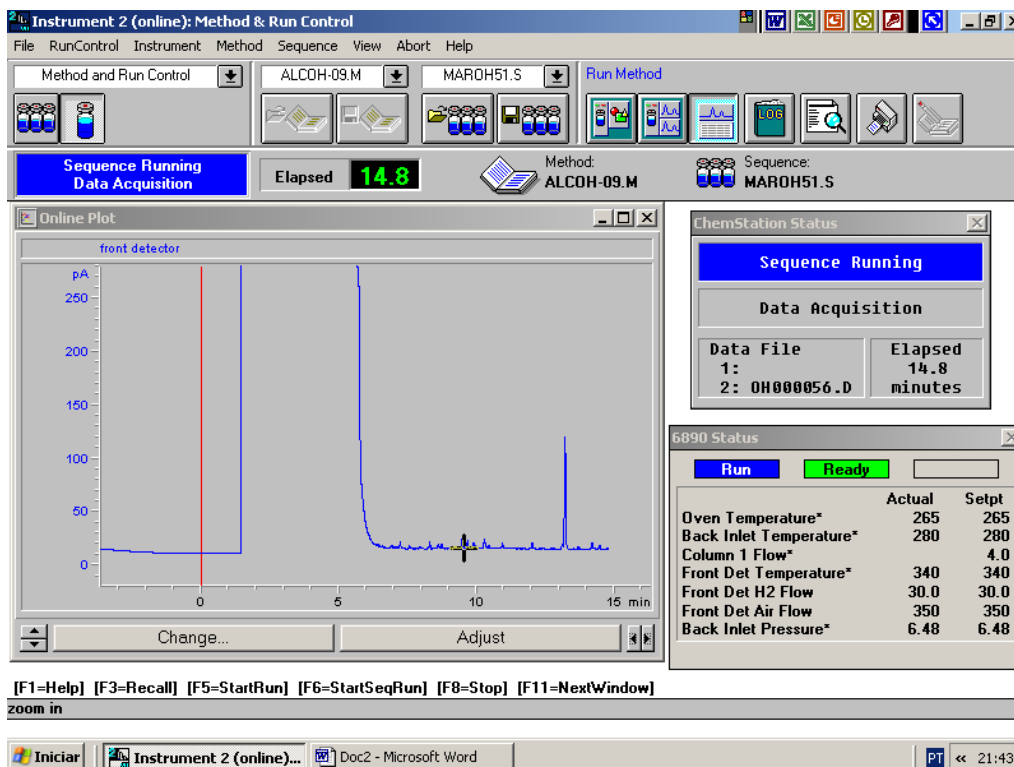


Figura 3.5: Observação dos picos de um álcool de cadeia longa no decorrer da sua passagem pelo cromatógrafo gasoso.

Cada composto da amostra injectada é representado por um pico e as áreas de cada pico equivalem à quantidade existente em cada substância da referida amostra. Estas são automaticamente calculadas pelo ChemStation (Anexo 1) e, através das equações apresentadas em 3.3.1 e 3.3.2, facilmente se obtém a quantidade de cada n-alceno e de cada álcool de cadeia longa, respectivamente.

A identificação das substâncias faz-se através da correspondência dos tempos de retenção de uma amostra conhecida, no caso utilizaram-se padrões externos, e as amostras que se pretendem estudar (figura 3.6).

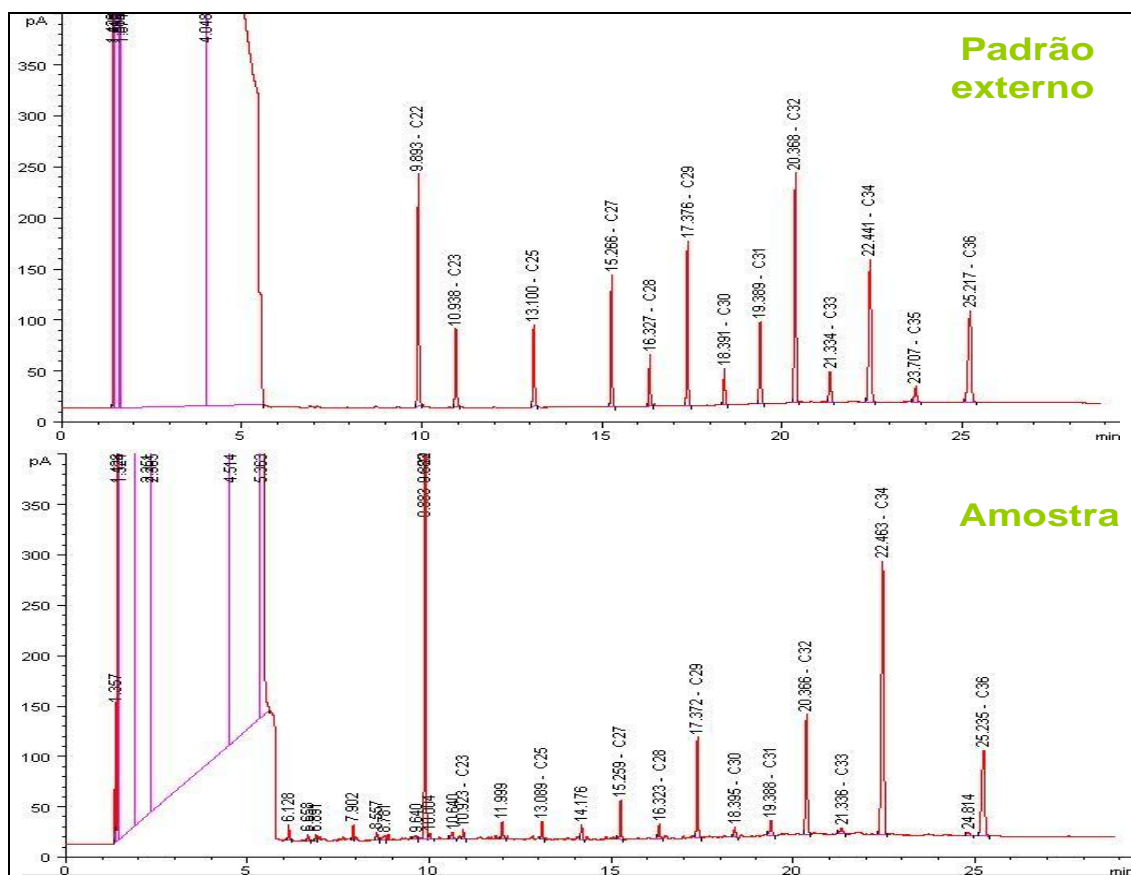


Figura 3.6: Ilustração da utilização dos compostos do Padrão Externo para identificar os n-alcenos de uma amostra em estudo.

3.3 – Equações Utilizadas

3.3.1 - Cálculo das Concentrações dos N-Alcanos

A equação utilizada para calcular a Área em percentagem dos n-alcenos foi a seguinte:

$$\% \text{ Área do alceno}_i = (\text{Área do pico do alceno}_i \times 100) / \text{Área do pico do alceno } C_{34}$$

Equação 3.2 Cálculo da área dos n-alcenos (%).

O Factor de Resposta (FR) de cada alceno foi calculado pela fórmula apresentada abaixo:

$$\text{FR} = \% \text{ Área Alceno no Padrão Externo} / \% \text{ Peso Padrão Externo do Alceno}$$

Equação 3.3 Cálculo do Factor Resposta dos n-alcenos.

Para o alceno C_{22} , que corresponde ao Padrão Interno, o Factor de Fraccionamento (FF C_{22}) foi calculado através da fórmula que se segue:

$$\text{FF } C_{22} = (\% \text{ Área } C_{22} \text{ na amostra} / \text{FR } C_{22}) / (100 \times C_{22}:C_{34} \text{ no Padrão Interno})$$

Equação 3.4 Cálculo do Factor de Fraccionamento do alceno C_{22} .

Nos restantes alcenos, o Factor de Fraccionamento (FF) foi calculado com a seguinte equação:

$$\text{FF } C_i = (i - 22) \times ((1 - \text{FF} C_{22}) / 12) + \text{FF } C_{22}$$

Equação 3.5 Cálculo do Factor de Fraccionamento para os restantes n-alcenos.

Por fim, o cálculo da Concentração de cada alceno foi feito de acordo com a fórmula seguinte:

$$\text{Concentração Alceno}_i \text{ (mg/Kg MS)} = (10 \times \% \text{ Área Alceno}_i \times \text{Peso do Padrão Interno } C_{34}) / (\text{Peso da Amostra em MS} \times \text{FR}_i \times \text{FF}_i)$$

Equação 3.6 Cálculo da Concentração dos n-alcenos (mg/kg MS).

3.3.2 - Cálculo das Concentrações dos Álcoois de Cadeia Longa

O cálculo da Área em percentagem dos álcoois de cadeia longa foi semelhante ao apresentado para os alcenos, sendo o seguinte:

$$\% \text{ Área do álcool}_i = (\text{Área do pico do álcool}_i \times 100) / \text{Área do pico do álcool } C_{27}$$

Equação 3.7 Cálculo da área dos álcoois de cadeia longa (%).

Novamente, à semelhança dos alcanos, o Factor de Resposta (FR) é calculado da forma que se apresenta de seguida, para cada álcool:

$$FR = \% \text{ Área Álcool no Padrão Externo} / \% \text{ Peso Padrão Externo do Álcool}$$

Equação 3.8 Cálculo do Factor de Resposta dos álcoois de cadeia longa.

No final, obteve-se a Concentração dos álcoois de cadeia longa com a utilização da próxima equação:

$$\text{Concentração Álcool}_i \text{ (mg/Kg MS)} = (10 \times \% \text{ Área Álcool}_i \times \text{Peso do Padrão Interno } C_{27}\text{OH}) / (\text{Peso da Amostra em MS} \times FR_i)$$

Equação 3.9 Cálculo da concentração dos álcoois de cadeia longa (mg/Kg MS).

3.3.3 - Cálculo da Recuperação Fecal

A Recuperação Fecal de cada n-alceno e de cada álcool de cadeia longa foi calculada através da equação:

$$RF (\%) = (Q_i / Q_j) \times 100$$

Equação 3.10: Cálculo da Recuperação Fecal dos n-alcenos e dos álcoois de cadeia longa (%).

Em que:

Q_i – Quantidade excretada do marcador o nas fezes (mg);

Q_j – Quantidade ingerida do marcador i (mg).

3.4 – Análise Estatística

Nos alcanos, para averiguar os efeitos dos tratamentos, dos dias e das horas de recolha das amostras nas variáveis em estudo (concentrações fecais e taxas de recuperação fecal) foram feitos testes paramétricos com a ANOVA medições repetidas. Os pressupostos da ANOVA foram sempre validados (normalidade, homogeneidade de variâncias e esfericidade).

Para os álcoois de cadeia longa foi também efectuada a análise estatística com a ANOVA de medições repetidas, no entanto, devido ao menor número de amostras

passíveis de serem analisadas em relação aos alcanos, foi utilizado o método de “sacrifício” de dias e de horas, de forma a existirem graus de liberdade suficientes para ser aceite o teste paramétrico e para se poder comparar tratamentos. O “sacrifício” de dias e de horas consistiu em eliminar, no caso da variação da excreção fecal ao longo dos dias, os dias 3 e 5 do estudo, e na situação da variação diurna da excreção fecal, a hora 2 (colheita das 11h). Porém, a fim de se analisar se existiam ou não diferenças significativas entre os dias 3 e 5 e os restantes dias e entre a hora 2 e as restantes, foi feita uma ANOVA de medições repetidas, mas sem o factor “tratamento”, para que fosse possível a comparação.

Quando se obteve diferenças significativas (utilizando um intervalo de confiança de 95%) entre tratamentos ou dias ou horas, realizaram-se testes de comparação de médias – Bonferroni e Tukey - , de forma a conhecerem-se as diferenças em causa.

O programa utilizado para toda a análise estatística dos dados foi o PASW Statistics 18.

4 – Resultados e Discussão

4.1 – Alimentos

A composição química (Matéria Seca, Cinzas Totais, Proteína Total, NDF, ADF e ADL) da bolota e da luzerna desidratada utilizadas neste ensaio encontram-se no anexo 2. Como os animais descascaram a bolota, esta foi analisada inteira e nos seus dois constituintes: miolo e casca.

Os resultados (composição em n-alcenos e álcoois de cadeia longa, ver tabelas 4.1 e 4.2) relativos aos alimentos utilizados no ensaio que serviu de base a este trabalho, foram obtidos no ano de 2009 (Gomes, 2010). A apresentação destes resultados é importante, uma vez que são importantes para a caracterização do perfil de alcenos e álcoois de cadeia longa dos alimentos, bem como para o cálculo das recuperações fecais dos diferentes alcenos.

Tabela 4.1: Concentrações médias nos alimentos fornecidos aos animais de n-alcenos \pm desvio padrão (mg/kg MS).

Amostra de alimento /N-alcenos	C ₂₃	C ₂₅	C ₂₇	C ₂₈	C ₂₉	C ₃₀	C ₃₁	C ₃₂	C ₃₃	C ₃₅	C ₃₆
Bolota Inteira	2,2 $\pm 0,1$	5,4 $\pm 0,4$	21,6 $\pm 0,7$	6,5 $\pm 0,2$	61,5 $\pm 1,6$	2,8 $\pm 0,1$	4,1 $\pm 0,3$	0,6 $\pm 0,1$	1,3 $\pm 0,2$	0,0 $\pm 0,0$	0,0 $\pm 0,0$
Miolo de Bolota	2,8 $\pm 0,1$	4,1 $\pm 0,1$	4,9 $\pm 0,1$	4,2 $\pm 0,1$	5,5 $\pm 0,1$	2,5 $\pm 0,1$	2,0 $\pm 0,2$	1,1 $\pm 0,2$	2,0 $\pm 0,2$	0,5 $\pm 0,5$	0,3 $\pm 0,3$
Casca de Bolota	4,8 $\pm 0,5$	14,4 $\pm 1,5$	71,2 $\pm 8,5$	17,1 $\pm 2,0$	222,4 $\pm 26,6$	6,8 $\pm 0,8$	11,9 $\pm 0,5$	2,0 $\pm 0,5$	3,5 $\pm 0,4$	0,0 $\pm 0,0$	0,0 $\pm 0,0$
Luzerna	6,2 $\pm 0,1$	13,4 $\pm 0,2$	32,3 $\pm 0,1$	13,1 $\pm 0,7$	146,1 $\pm 1,7$	23,6 $\pm 0,5$	351,0 $\pm 0,6$	26,0 $\pm 0,2$	102,0 $\pm 0,8$	23,2 $\pm 0,6$	0,0 $\pm 0,0$

De uma forma geral os alcanos que possuem maiores concentrações são aqueles que têm número ímpar de carbonos, tanto na luzerna como na bolota, o que concorda com as observações de outros autores (Trigo, 2002; Ribeiro *et al*, 2007; Castro, 2009; Tejeda *et al*, 2001). Doves e Mayes (1996) afirmam que na maioria das plantas os alcanos ímpares predominam sobre os alcanos pares.

Como se pode observar na tabela 4.1, os n-alcenos que predominam na luzerna são C₂₉, C₃₁ e o C₃₃, que são semelhantes aos resultados obtidos por Dove e Mayes (1996), com a excepção do alcano C₃₃, que neste trabalho tem maior concentração, possivelmente por ter sido utilizada luzerna desidratada neste estudo. Na bolota inteira e na casca sobressaem o C₂₇ e o C₂₉, enquanto que no miolo da bolota estão presentes em maiores concentrações o C₂₅, C₂₇, C₂₈ e o C₂₉, apesar de possuírem concentrações relativamente baixas. Mendes (2005) e Ribeiro (2005) obtiveram resultados semelhantes no que se refere às concentrações das diferentes fracções da bolota. Verifica-se ainda que a concentração dos n-alcenos é superior na casca da bolota do que no miolo da bolota. Ribeiro, *et al* (2007) constataram também este facto e afirmaram que, a maior concentração de alcanos na casca da bolota, deve-se à existência de uma camada cerosa na sua superfície.

Na figura 4.1 apresenta-se o exemplo de um cromatograma com n-alcenos de uma amostra de bolota inteira.

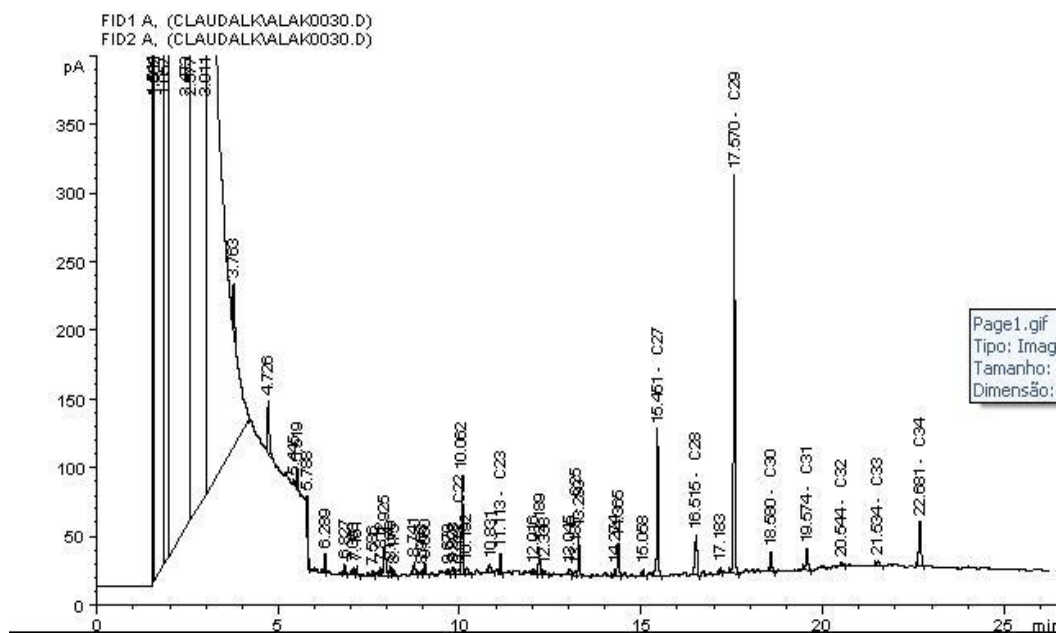


Figura 4.1: Cromatograma de n-alcenos para uma amostra de bolota inteira.

Contributo para a validação da utilização de constituintes das ceras cuticulares das plantas como marcadores para estimar a ingestão em porcos Alentejanos: Caracterização da excreção de n-alcenos e álcoois de cadeia longa em porcos alentejanos

No cromatograma da figura 4.1 é possível verificar a ausência dos picos correspondentes aos alcanos C₃₅ e C₃₆ e, por outro lado, os picos dos alcanos C₂₇ e C₂₉ são os mais representativos.

Tabela 4.2: Concentrações médias de álcoois de cadeia longa ± desvio padrão (mg/kg MS) nos alimentos.

Amostra de alimento / Álcoois	Pico X ¹	C ₂₂ OH	C ₂₄ OH	C ₂₆ OH	C ₂₈ OH	C ₃₀ OH	Pico Y ¹
Bolota Inteira	192,7 ±11,9	0,0 ±0,0	90,7 ±3,3	18,6 ±0,9	16,0 ±0,6	21,4 ±2,4	292,0 ±22,8
Miolo de Bolota	210,5 ±18,2	0,0 ±0,0	36,2 ±1,8	13,4 ±1,4	8,6 ±1,0	0,0 ±0,00	302,0 ±15,5
Casca de Bolota	446,8 ±17,0	0,0 ±0,0	283,5 ±32,9	45,8 ±3,7	50,6 ±4,2	81,3 ±4,3	465,0 ±37,9
Luzerna	451,4 ±60,3	0,0 ±0,0	65,5 ±7,2	151,5 ±7,4	348,1 ±296,0	895,8 ±52,9	309,3 ±44,9

¹ – Como não foi possível calcular o factor resposta para esta substância, os valores que se apresentam não são concentrações.

Na tabela 4.2 pode-se observar que as concentrações mais elevadas de álcoois de cadeia longa na luzerna pertencem aos álcoois C₂₈OH e C₃₀OH, enquanto que na bolota inteira, casca e miolo o álcool que ocorre em concentrações mais elevadas é o C₂₄OH. Observa-se que o álcool C₂₂OH não está presente em nenhum dos alimentos estudados e no miolo de bolota não foi detectado o álcool C₃₀OH, no entanto é o álcool com maior concentração na luzerna. Esta informação está de acordo com o que foi afirmado por Dove e Mayes (2005), uma vez que a luzerna é uma dicotiledónea e, segundo estes autores, as plantas dicotiledóneas têm concentrações elevadas do álcool C₃₀OH. Dove e Mayes (2005) apresentaram resultados obtidos por outros autores que indicam que o trevo subterrâneo (planta leguminosa, como a luzerna) tem concentrações do álcool C₃₀OH superiores aos restantes álcoois (tabela 2.7), enquanto que nas gramíneas, como é o caso do azevém (*Lolium perenne*) é o álcool C₂₆OH que ocorre em concentrações mais elevadas.

Como foi referido anteriormente, a casca da bolota possui uma camada cerosa, desta forma, tal como acontece com os alcanos e sendo os álcoois de cadeia longa

constituintes das ceras cuticulares das plantas, é a casca da bolota que possui maior concentração de álcoois, quando comparada com o miolo.

Ao analisar os cromatogramas obtidos para os extractos dos álcoois de cadeia longa constatou-se a existência de um pico com o tempo de retenção de aproximadamente 22,13 minutos. Foi chamado de “Pico Y”, uma vez que não foi identificado por não haver à disposição qualquer padrão com tempo de retenção semelhante. No entanto, revela-se de grande interesse aprofundar o estudo da substância que origina este pico, pois possui áreas com valores bastante elevados, podendo ser um potencial marcador na estimativa da ingestão e da digestibilidade em porcos de raça Alentejana. Gomes (2010) verificou similarmente a existência do “Pico X”, cujo tempo de retenção é aproximadamente aos 13,37 minutos. As áreas deste pico têm também valores muito elevados e, como tal, ao longo deste trabalho tentou-se identificar a substância associada ao pico X, quer com a utilização do equipamento GCMS (Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa), como sugerido por Gomes (2010), quer com a utilização de um novo padrão.

Na figura 4.2 apresenta-se um cromatograma de uma amostra de bolota inteira para os álcoois de cadeia longa, em que se pode verificar os picos X e Y, com tempos de retenção de 13,378 e 22,125, respectivamente.

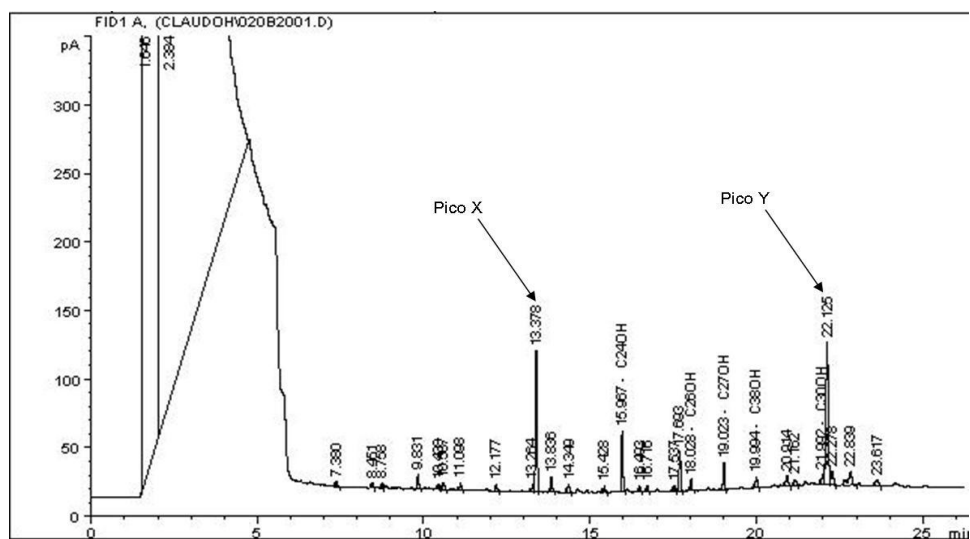


Figura 4.2: Cromatograma de álcoois de cadeia longa para uma amostra de bolota inteira.

4.2 - Refugos Alimentares

Foram recolhidos e analisados os alimentos não ingeridos pelos animais ao longo do ensaio realizado para o trabalho de Gomes (2010). Os resultados referentes às análises laboratoriais feitas aos refugos constam no anexo 3.

A constituição dos refugos era, principalmente, casca de bolota e luzerna, mostrando que os animais tinham um comportamento alimentar selectivo. O facto de os animais “descascarem” a bolota, mostrando preferência pelo miolo é verificado também por outros autores (Mendes, 2005; Ribeiro *et al*, 2007; Castro, 2009). Verificou-se que os animais refugam grandes quantidades de ambos alimentos, no entanto, a percentagem de bolota refugada é sempre superior (tabela 3.2), o que seria de esperar dada a composição das três dietas fornecidas aos animais.

As concentrações de n-alcenos e de álcoois de cadeia longa presentes nos refugos apresentam-se nas tabelas 4.3 e 4.4, respectivamente.

Tabela 4.3: Concentração média dos n-alcenos \pm desvio padrão das amostras de refugos colhidas, por cada tratamento (mg/kg MS).

Tratamento	N-Alcenos										
	C ₂₃	C ₂₅	C ₂₇	C ₂₈	C ₂₉	C ₃₀	C ₃₁	C ₃₂	C ₃₃	C ₃₅	C ₃₆
1	5,2 \pm 0,3	13,9 \pm 0,5	61,2 \pm 1,1	17,8 \pm 1,1	190,5 \pm 18,0	8,1 \pm 1,1	13,4 \pm 2,7	2,4 \pm 0,5	5,2 \pm 1,6	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
2	5,3 \pm 0,2	13,7 \pm 0,7	56,8 \pm 4,9	17,0 \pm 0,6	181,4 \pm 10,3	9,8 \pm 1,1	63,1 \pm 11,5	6,3 \pm 0,8	19,8 \pm 4,3	4,4 \pm 1,0	0,0 \pm 0,0
3	5,4 \pm 0,2	13,5 \pm 0,2	52,1 \pm 3,3	17,0 \pm 0,7	172,9 \pm 7,8	11,8 \pm 1,2	107,3 \pm 14,6	9,7 \pm 1,4	32,7 \pm 4,4	7,5 \pm 1,1	0,0 \pm 0,0

Tratamento 1: 4Kg de Bolota; **Tratamento 2:** 4Kg de Bolota + 200g de Luzerna; **Tratamento 3:** 4Kg de Bolota + 400g de Luzerna

Pela observação da tabela 4.3, verifica-se que existe uma concentração elevada dos alcenos C₂₇, C₂₉, C₃₁ e C₃₃, nos refugos, apesar de estes dois últimos alcenos estarem presentes maioritariamente nos refugos do tratamento 3. Como se analisou anteriormente na tabela 4.1, os alcenos que ocorrem em concentrações mais elevadas na luzerna são o C₂₉, C₃₁ e C₃₃ e na bolota inteira e casca são os o C₂₇ e C₂₉, logo é possível denotar a rejeição de luzerna e casca de bolota pelos suínos, já que

são estes alcanos que ocorrem em concentrações mais elevadas nos alimentos refugados.

Na figura 4.3 está representado um cromatograma dos n-alcenos numa amostra de refugo do tratamento 3 (4kg de bolota + 400g de luzerna).

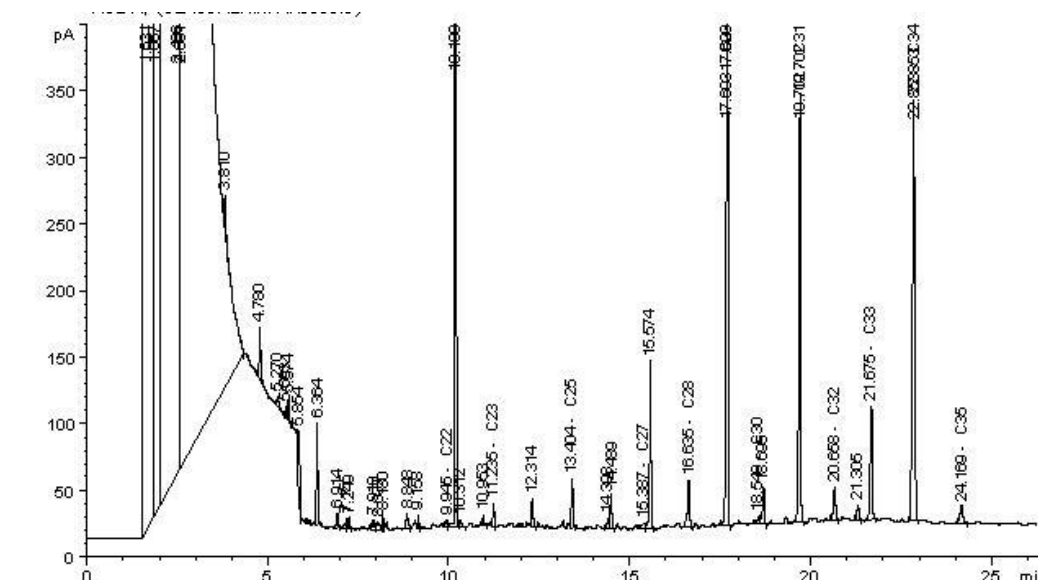


Figura 4.3: Cromatograma de n-alcenos para uma amostra de alimentos refugados.

Através da tabela 4.4, é também possível verificar que a luzerna foi rejeitada pelos suínos, uma vez que existe uma grande concentração do álcool $C_{28}OH$, que como se observou anteriormente é um dos álcoois presentes na luzerna em concentrações mais elevadas (tabela 4.2). O álcool $C_{24}OH$ ocorre também em grande concentração nos refugos, possivelmente devido à pouca preferência dos animais pela casca de bolota. Os picos X e Y aparecem, também, nos refugos em grandes quantidades.

Tabela 4.4: Concentração média dos álcoois de cadeia longa \pm desvio padrão nas amostras de refugos colhidas, por cada tratamento (mg/kg MS).

Tratamento	Álcoois de cadeia longa						Pico Y ¹
	Pico X ¹	C ₂₂ OH	C ₂₄ OH	C ₂₆ OH	C ₂₈ OH	C ₃₀ OH	
1	544,0 \pm	1,6 \pm	257,3 \pm	40,8 \pm	37,3 \pm	342,9 \pm	563,0 \pm
	50,3	3,2	28,6	3,9	4,6	68,5	68,3
2	547,2 \pm	0,9 \pm	239,3 \pm	60,2 \pm	67,3 \pm	344,8 \pm	550,0 \pm
	46,7	2,7	21,5	5,7	8,5	40,3	48,7
3	579,8 \pm	0,9 \pm	213,2 \pm	75,2 \pm	92,5 \pm	319,7 \pm	499,2 \pm
	71,8	2,6	16,0	6,0	9,9	27,5	64,0

¹ – Como não foi possível calcular o factor resposta para esta substância, os valores que se apresentam não são concentrações.

Tratamento 1: 4Kg de Bolota; **Tratamento 2:** 4Kg de Bolota + 200g de Luzerna; **Tratamento 3:** 4Kg de Bolota + 400g de Luzerna

O cromatograma dos álcoois de cadeia longa para uma amostra de refugo, no tratamento 3, apresenta-se na figura 4.4.

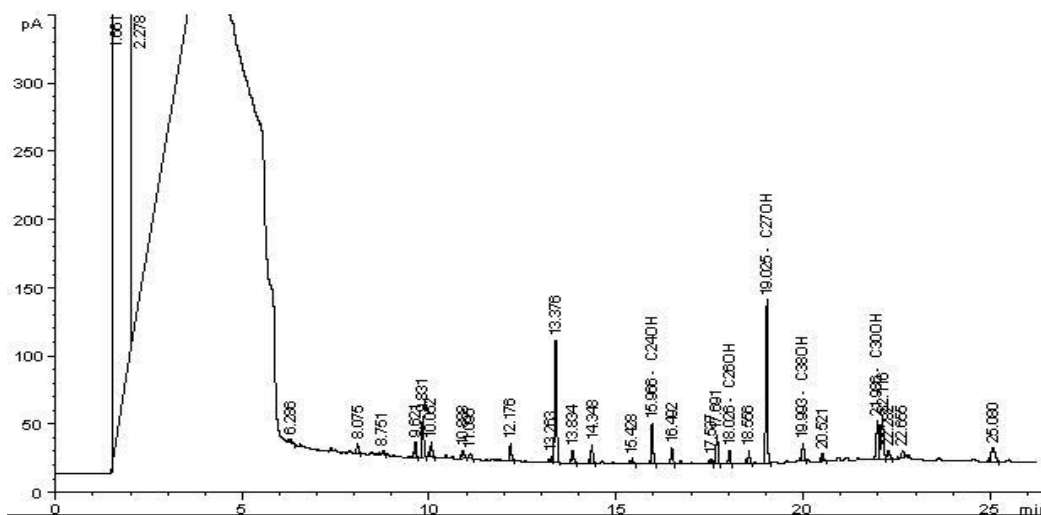


Figura 4.4: Cromatograma de álcoois de cadeia longa para uma amostra de alimentos refugados.

4.3 - Variação da Concentração Fecal dos Alcanos Externos (C_{32} e C_{36}) após o seu Doseamento aos Animais

Para estudar a variação da concentração fecal dos marcadores doseados (C_{32} e C_{36}), foi feita uma mistura de três colheitas de fezes realizadas em cada dia. Para os alcanos foram analisadas as amostras de fezes de dois períodos diferentes, o primeiro com sete dias e o segundo com quatro (1^o e 2^o Períodos). Estes períodos foram estatisticamente analisados separadamente, por se tratar de observações feitas em números de dias distintos.

As matérias secas das amostras de fezes colhidas nos dois períodos foram determinadas, com o objectivo de reportar as concentrações dos diferentes marcadores à matéria seca, e os seus valores encontram-se no anexo 4.

O objectivo que se pretende atingir com a determinação da variação da concentração fecal dos n-alcenos é definir o tempo que é necessário para que seja alcançado um nível de concentração estável dos alcanos, que foram fornecidos (C_{32} e C_{36}), nas fezes. Desta forma é possível saber-se após quantos dias se pode iniciar a colheita de fezes, para se poder utilizar as concentrações dos alcanos na estimativa da ingestão da dieta.

No anexo 5 podem ser observados os valores das concentrações fecais médias dos alcanos C_{32} e C_{36} ao longo dos dias, em cada tratamento e por período. As concentrações fecais médias dos três tratamentos, no período 1, apresentam-se no gráfico 4.1.

Para ambos os alcanos verificou-se que não existiam diferenças significativas entre os tratamentos ($P > 0,05$ – Anexo 6).

Entre dias registaram-se diferenças significativas, para ambos os alcanos, sendo o dia 1 diferente dos dias 3, 4, 5, 6 e 7, tal como acontece com o dia 2 ($P < 0,05$ – Anexo 7). Em relação aos dias 1 e 2 não existem diferenças significativas entre eles, o que sugere que a produção fecal estabiliza ao terceiro dia, como é possível verificar no gráfico 4.1, já que entre estes dois dias e os restantes há diferenças significativas.

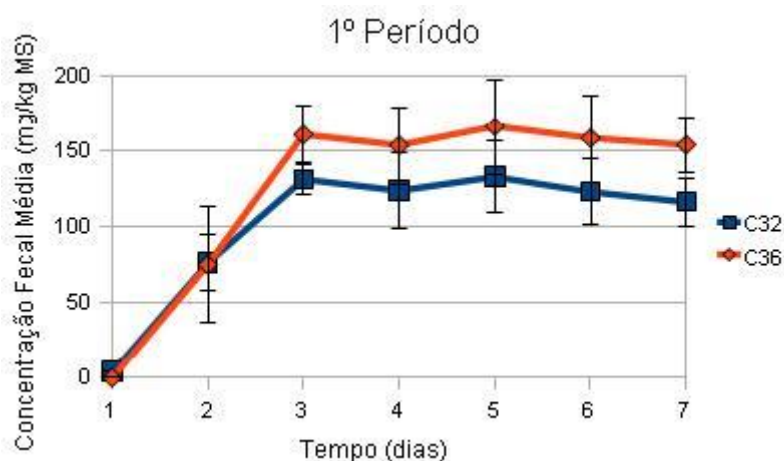


Gráfico 4.1: Concentração Fecal média (três tratamentos) dos alcanos C₃₂ e C₃₆ ao longo dos dias, no 1º Período (mg/kg MS).

Relativamente ao segundo período, no alcano C₃₂ constatou-se que existiam diferenças significativas entre tratamentos ($P < 0,05$ – Anexo 8). Pelo teste de TuKey, demonstra-se que os tratamentos que diferem entre si são o 2 e 3 ($P < 0,05$ – Anexo 9). Existindo diferenças significativas entre tratamentos, não é possível verificar para o segundo período a partir de que dia é atingido um patamar de excreção estável, no entanto a variação fecal dos alcanos C₃₂ e C₃₆ nos diferentes tratamentos estão apresentados nos gráficos seguintes. Verifica-se que os valores das concentrações dos alcanos tendem para um patamar de excreção estável, porém como não é possível efectuar a análise estatística destes resultados, não se consegue identificar a partir de que dia se atinge esse nível.

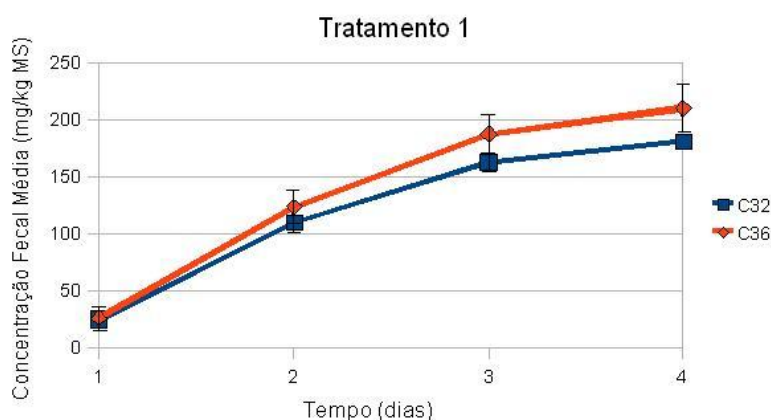


Gráfico 4.2: Concentração Fecal média dos alcanos C₃₂ e C₃₆ ao longo dos dias no tratamento 1 (4kg bolota), no 2º Período (mg/kg MS).

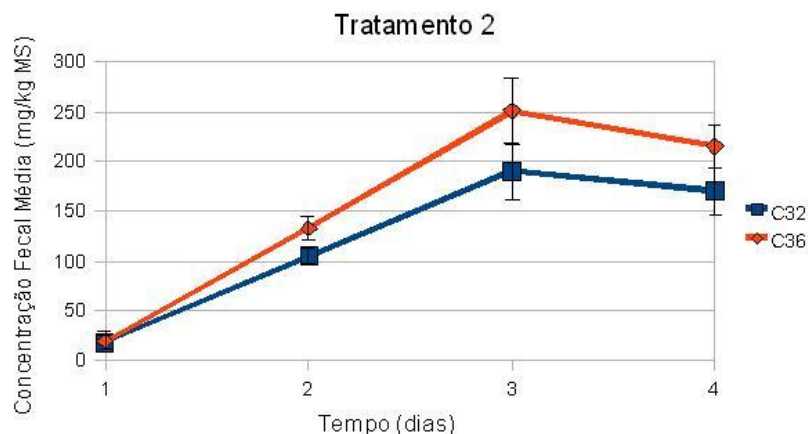


Gráfico 4.3: Concentração Fecal média dos alcanos C_{32} e C_{36} ao longo dos dias no tratamento 2 (4kg bolota + 200g luzerna), no 2ºPeríodo (mg/kg MS).

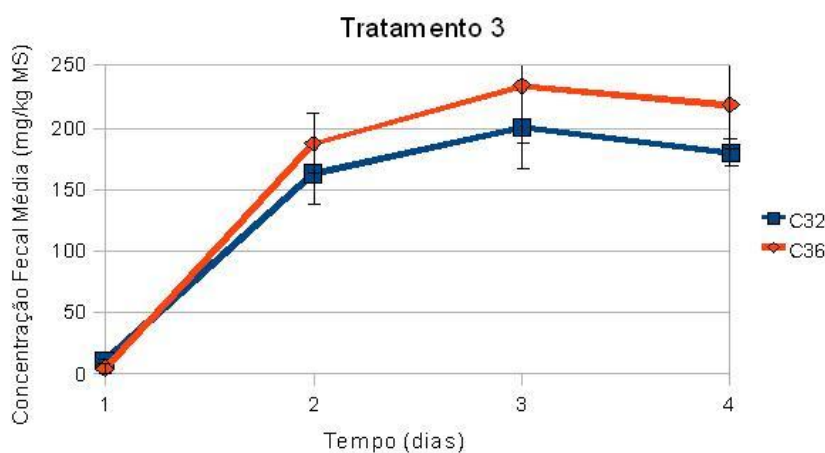


Gráfico 4.4: Concentração Fecal média dos alcanos C_{32} e C_{36} ao longo dos dias no tratamento 3 (4kg bolota + 400g luzerna), no 2ºPeríodo (mg/kg MS).

Trigo (2002) alcançou uma plataforma estável de alcanos nas fezes ao terceiro dia, tal como foi obtido neste trabalho para o primeiro período, enquanto que Ribeiro *et al* (2007) atingiram uma excreção estável dos alcanos C_{32} e C_{36} ao quinto dia. Esta diferença poderá estar relacionada com o nível de ingestão dos animais, que neste trabalho é superior.

Na figura 4.5 está apresentado, como exemplo, um cromatograma de n-alcenos de uma amostra de fezes colhida no primeiro dia do primeiro período, no tratamento 1 (4kg de bolota).

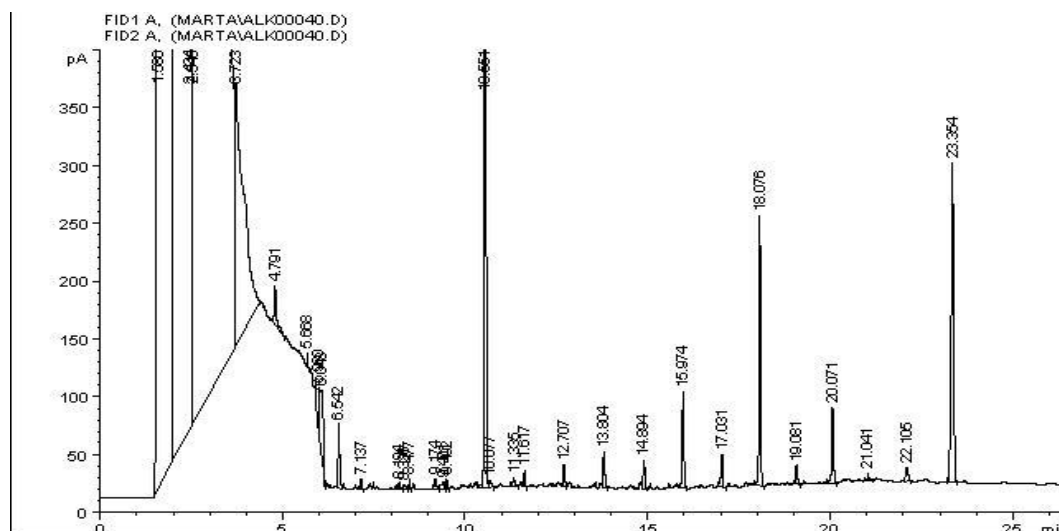


Figura 4.5: Cromatograma de n-alcenos para uma amostra de fezes colhida no dia um do 1º Período.

4.4 - Variação da Concentração Fecal dos Alcanos Internos (alcanos ímpares)

Os resultados referentes à concentração fecal dos alcanos internos foram obtidos somente como informação adicional, para as eventuais variações que possam existir na excreção de alcanos ao longo dos dias.

A análise estatística dos valores obtidos revela que não há diferenças significativas entre tratamentos, nem entre os diferentes dias. Os valores das concentrações fecais dos alcanos ímpares são bastante elevados para o alcano C₂₉ e nulos para o alcano C₃₅ (gráfico 4.5).

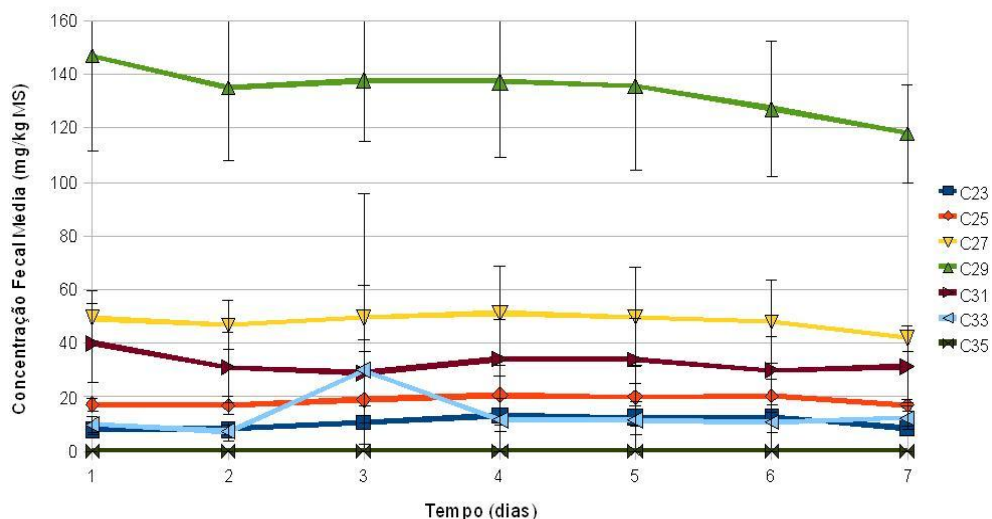


Gráfico 4.5: Concentração Fecal média dos alcanos internos (C₂₃, C₂₅, C₂₇, C₂₉, C₃₁, C₃₃ e C₃₅) no 1º Período (mg/kg MS).

O facto de não existirem diferenças entre dias seria expectável, visto que são alcanos presentes genuinamente nos alimentos fornecidos aos animais, sendo a sua variação natural, uma vez que não houve doseamento de nenhum destes compostos. No entanto seriam de esperar diferenças entre tratamentos, uma vez que os alimentos e as suas quantidades variavam de tratamento para tratamento.

4.5 – Variação da Concentração Fecal dos Álcoois de Cadeia Longa ao Longo dos Dias

Os resultados que se apresentam para a concentração fecal dos álcoois de cadeia longa são relativos à sua variação natural, isto é, a que depende da dieta ingerida. O seu estudo prende-se com o objectivo de obter possíveis informações adicionais sobre a variação da excreção dos álcoois ao longo dos dias e verificar se a excreção dos álcoois provenientes da dieta se mantém constante.

Para a variação da concentração fecal dos álcoois de cadeia longa apenas foram estudados os tratamentos 1 e 2, uma vez que ocorreu um erro laboratorial ao não ser colocado o padrão interno de C₂₇OH (já referido no capítulo anterior), que impossibilita o cálculo das concentrações dos álcoois do tratamento 3.

Nos álcoois C₂₂OH, C₂₄OH e C₃₀OH ocorreram diferenças significativas entre os dois tratamentos analisados, como se pode observar pela tabela 4.6, o que seria de esperar, já que no tratamento 2 os animais tinham à sua disposição luzerna desidratada e bolota, enquanto que no tratamento 1 apenas havia bolota. Para os sete dias estudados, unicamente se verificou diferenças significativas entre o primeiro e o segundo dias, no álcool C₂₄OH (p≤0,05 - anexo 10). Nos restantes álcoois de cadeia longa não foi identificada qualquer diferença significativa entre dias.

As concentrações fecais dos álcoois C₂₆OH e C₂₈OH não apresentaram diferenças significativas quer entre tratamentos, quer entre dias. Os valores das concentrações destes álcoois (mg/kg MS) para cada tratamento e para cada dia estão apresentados no anexo 11. A variação das concentrações ao longo dos sete dias do primeiro período pode ser verificada no gráfico 4.5. É possível observar que as concentrações dos álcoois têm comportamentos distintos, a concentração do álcool C₂₆OH inicialmente possui um valor mais elevado que a concentração do álcool C₂₈OH e a primeira, à medida que o tempo passa, diminui, enquanto que a segunda vai aumentando.

Tabela 4.5: Concentração média dos álcoois de cadeia longa (mg/kg MS), em cada tratamento.

Álcoois Cadeia Longa	Concentração Fecal Média (mg/kg MS)		n	EPM	Significância Tratamento
	Tratamento 1	Tratamento 2			
C22OH	0,0 ^a	168,7 ^b	3	10,001	0,000
C24OH	210,2 ^a	147,6 ^b	3	9,069	0,008
C26OH	84,0	69,3	3	8,049	0,266
C28OH	136,1	78,5	3	19,672	0,107
C30OH	48,2 ^a	155,0 ^b	3	16,029	0,009

^{a-b} Médias com letras diferentes na mesma linha correspondem a diferenças significativas para a variável tratamento (p≤0,05);

EPM – erro padrão associado à média;

Significância – p-value ou sig.

Tratamento 1: 4Kg de Bolota; **Tratamento 2:** 4Kg de Bolota + 200g de Luzerna.

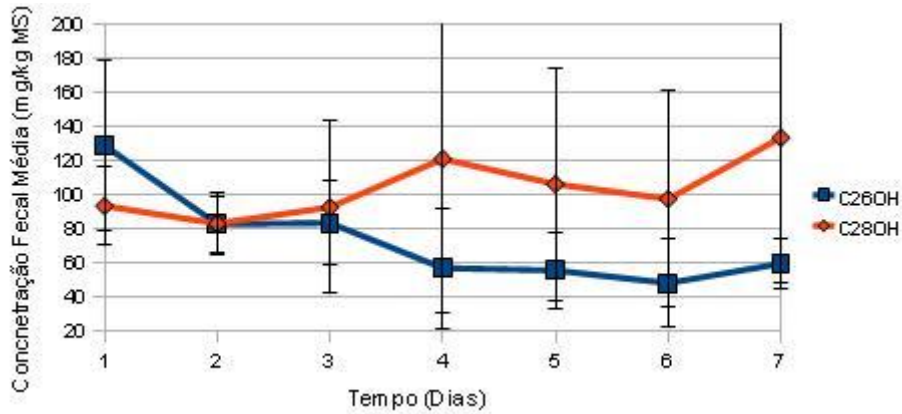


Gráfico 4.6: Concentração Fecal média dos álcoois C₂₆OH e C₂₈OH ao longo dos dias, no 1º Período (mg/kg MS).

Na figura 4.6 pode-se observar um cromatograma para álcoois de cadeia longa de uma amostra colhida no primeiro dia, do primeiro período, de um animal submetido ao tratamento 1 (4Kg de bolota).

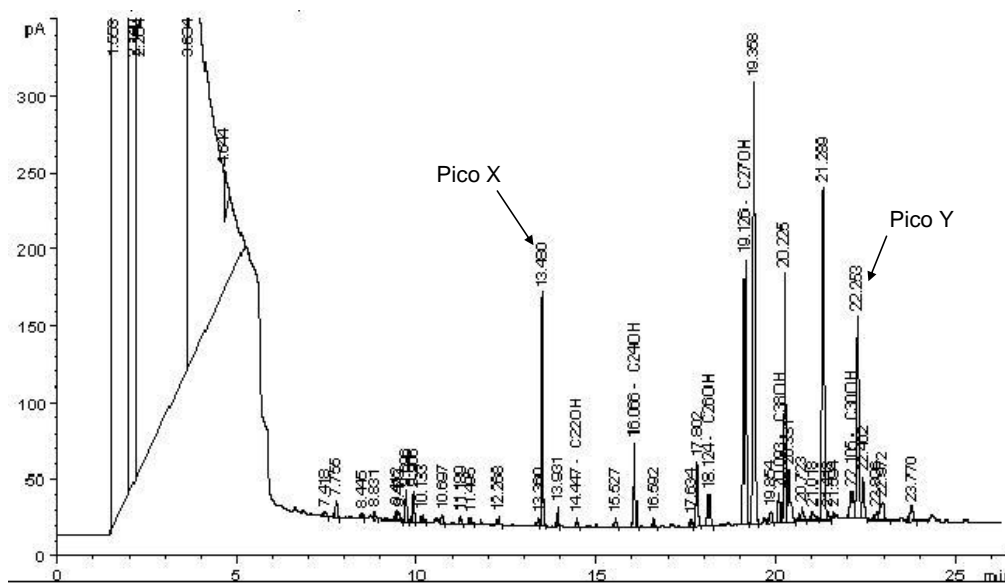


Figura 4.6: Cromatograma de álcoois de cadeia longa para uma amostra de fezes colhida no dia um do 1º Período, de um animal submetido ao tratamento 1.

Verifica-se na figura 4.6 que o pico X e o pico Y voltam a aparecer nos cromatogramas relativos às fezes. Como referido anteriormente tentou-se ao longo deste estudo efectuar a identificação do pico X com a utilização do equipamento GCMS, mas não se conseguiu decifrar a que composto corresponde este pico. Fez-se ainda uma segunda tentativa com a utilização de um novo padrão externo, já

mencionado no capítulo três deste trabalho. Este padrão foi chamado de “Padrão 2” e era constituído pelos álcoois C₁₉OH, C₂₀OH, C₂₁OH, C₂₂OH e C₂₇OH. Porém os tempos de retenção destes álcoois não correspondem ao tempo de retenção do Pico X (≈13,37 minutos), como se pode observar na figura 4.7. O tempo de retenção do álcool C₁₉OH é aos 10,739 minutos, os 11,094 minutos corresponde ao tempo de retenção do álcool C₂₀OH, enquanto que o álcool C₂₁OH tem o tempo de retenção aos 12,871 minutos e o álcool C₂₂OH aos 14,433 minutos. Nenhum destes tempos coincide com o tempo de retenção do Pico X, pelo que a substância deste pico continua por ser identificada. Quanto ao Pico Y, de futuro, poder-se-á recorrer também ao GCMS para se conseguir identificar o composto em causa.

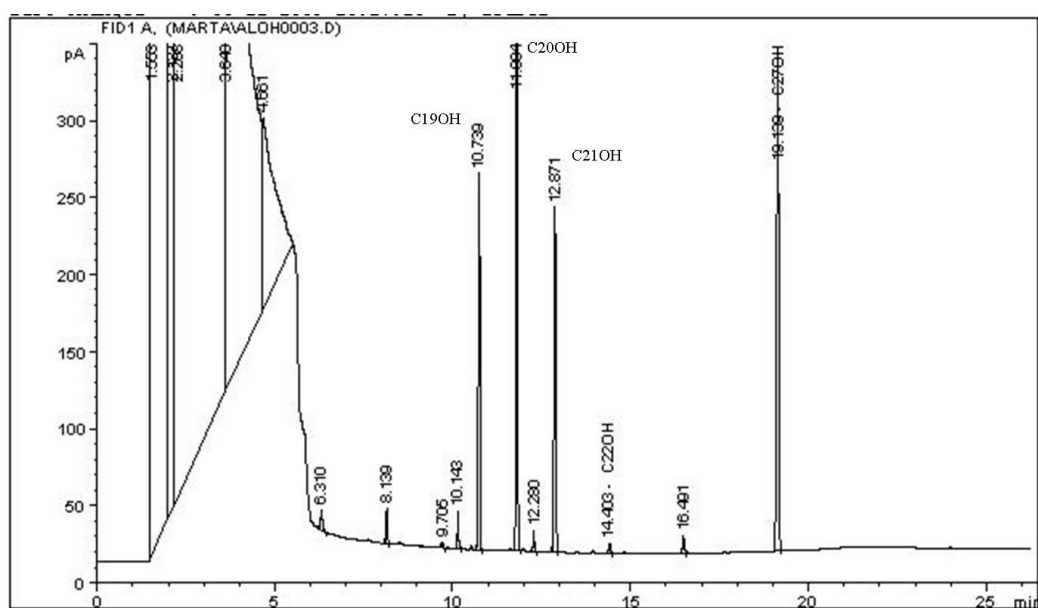


Figura 4.7: Cromatograma do Padrão Externo 2 com os álcoois C₁₉OH, C₂₀OH, C₂₁OH, C₂₂OH e C₂₇OH.

4.6 – Variação Diurna da Concentração Fecal dos N-Alcanos e dos Álcoois de Cadeia Longa

Os resultados apresentados neste sub-capítulo correspondem às concentrações das fezes recolhidas de 2,5 em 2,5 horas, 5 vezes por dia, de forma a determinar a forma como a excreção fecal varia ao longo do dia.

No anexo 12 apresentam-se as matérias secas em percentagem das amostras de fezes colhidas, nos diferentes tratamentos do primeiro período.

4.6.1 – Variação Diurna da Concentração Fecal dos N-Alcanos

A concentração fecal média dos alcanos sintéticos C₃₂ e C₃₆, das colheitas ao longo de três dias, recolhidas em cinco horas diferentes de cada um deles encontram-se no anexo 13, estando os resultados apresentados por cada tratamento.

As concentrações mencionadas acima foram alvo de análise estatística, não apresentando diferenças significativas entre horas ($P > 0,05$ - Anexo 14). Esta informação sugere que os n-alcenos administrados possuem um comportamento cinético semelhante aos n-alcenos naturais, o que é essencial para se conseguir estimativas correctas da ingestão. Entre os tratamentos, estatisticamente, também não se verificaram diferenças significativas (Anexo 15). No gráfico 4.7 é possível verificar a variação diurna dos alcanos sintéticos.

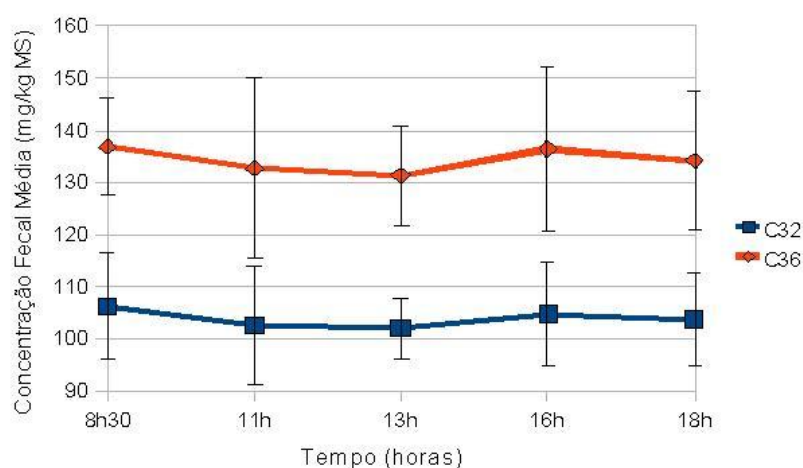


Gráfico 4.7: Concentração Fecal média (três tratamentos) dos alcanos C₃₂ e C₃₆ em diferentes momentos do dia, no 1º Período (mg/kg MS).

Nos tratamentos dos alcanos C₂₅ e C₂₈ existiam diferenças significativas, como tal não foi possível efectuar a comparação destes alcanos com os restantes (anexo 16). Esta variação entre tratamentos é natural que ocorra, uma vez que a dieta dos animais era diferente em cada tratamento. Similarmente verificou-se que existiam diferenças

significativamente para o alcano C_{31} , entre as colheitas efectuadas às 8h30 e às 11h, 11h e 18h e, por fim, 13h e 18h (anexo 17). Nos outros alcanos analisados (C_{23} , C_{29} , C_{30} , C_{33} , e C_{35}) constata-se que não existem diferenças significativas entre as horas do dia em que foram efectuadas as colheitas. No entanto, as concentrações fecais obtidas para o alcano C_{29} são bastante superiores em relação às concentrações dos alcanos C_{23} , C_{30} , C_{33} , e C_{35} , que são bastante baixas (gráficos 4.8 e 4.9).

Com a excepção do alcano C_{31} , a não existência de diferenças de concentrações entre horas ao longo do dia dos restantes alcanos está de acordo com os estudos efectuados por Oliveira *et al* (2005) e Ribeiro *et al* (2007), mostrando que as amostras de fezes podem ser recolhidas a qualquer hora do dia para o cálculo da estimativa da ingestão e da digestibilidade, não influenciando os resultados pretendidos.

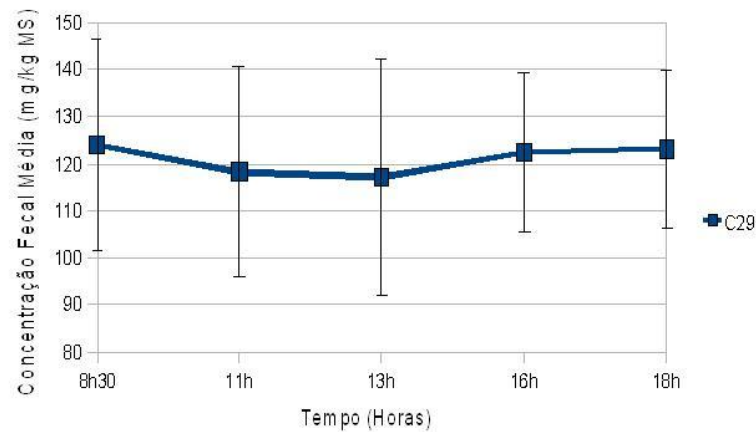


Gráfico 4.8: Concentração Fecal média do alcano C_{29} ao longo do dia (mg/kg MS).

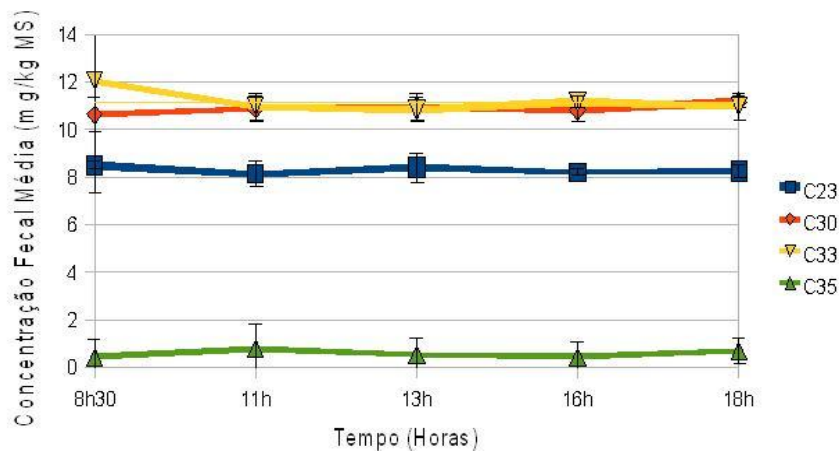


Gráfico 4.9: Concentração Fecal média dos alcanos C_{23} , C_{30} , C_{33} , e C_{35} ao longo do dia (mg/kg MS).

Na figura 4.7 consta um cromatograma de n-alcenos de uma amostra de fezes da segunda colheita do dia, no tratamento 3 (4kg de bolota + 400g de luzerna).

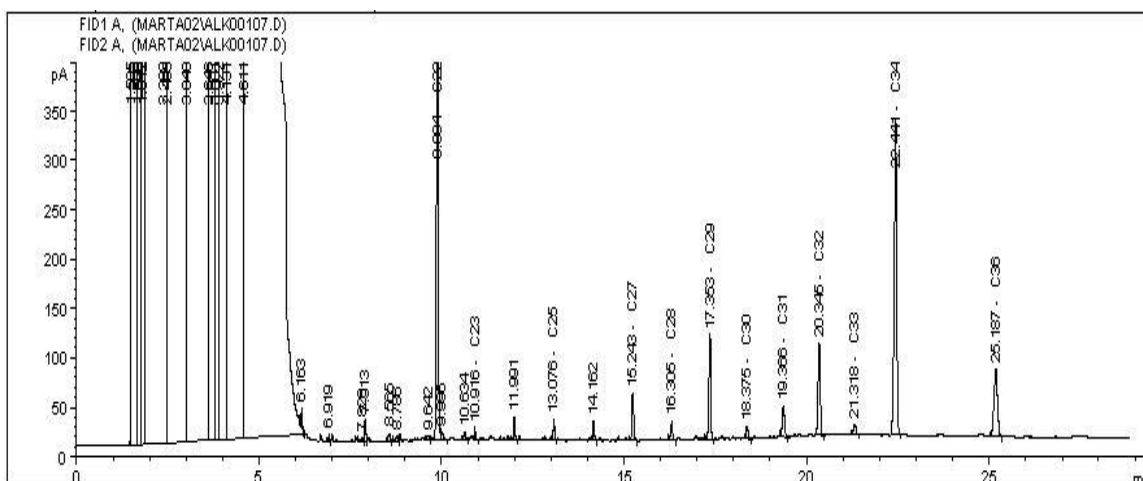


Figura 4.7: Cromatograma de n-alcenos para uma amostra de fezes na segunda colheita do dia.

4.6.2 – Variação Diurna da Concentração Fecal dos Álcoois de Cadeia Longa

Os valores das médias das concentrações fecais dos álcoois de cadeia longa das amostras colhidas ao longo do dia, afim de se saber se existem variações nos diferentes momentos do dia encontram-se no anexo 18. Os resultados apresentados correspondem às amostras que foram estudadas que são relativas aos tratamentos 2 e 3, devido ao facto de durante o processo de laboratório não ter sido colocado o padrão interno dos álcoois, C₂₇OH, como foi explicado anteriormente. Pelo mesmo motivo, no tratamento 2 foi apenas feita a média de quatro amostras (um animal no segundo dia e três animais no terceiro dia), enquanto que no tratamento três a média foi realizada perante nove amostras (três animais por cada um dos três dias de recolha de amostras).

Ao efectuar a análise estatística dos resultados obtidos constatou-se que não existiam diferenças significativas ($p > 0,05$) quer entre tratamentos, quer entre diferentes horas do dia, para todos os álcoois estudados (C₂₂OH, C₂₄OH, C₂₆OH, C₂₈OH e C₃₀OH). Esta observação indica que a colheita de amostras para analisar a excreção fecal de álcoois de cadeia longa pode ser realizada em qualquer altura do

dia, tal como acontece nos alcanos. Contudo, o facto de não haver diferenças significativas entre tratamentos não era previsto, porque os animais foram submetidos a dietas distintas, sendo que a diferença entre os dois tratamentos em causa (2 e 3) são 200g de luzerna. Como houve rejeição de grandes quantidades de luzerna, poderá ter resultado em dietas semelhantes nos dois tratamentos, o que pode explicar esta situação.

A variação da concentração fecal dos álcoois ao longo do dia apresenta-se no gráfico 4.10. É possível verificar que o álcool com maior concentração nas fezes dos animais em estudos é o $C_{28}OH$, seguido do álcool $C_{30}OH$. Por outro lado, o álcool com menor concentração fecal é o $C_{26}OH$.

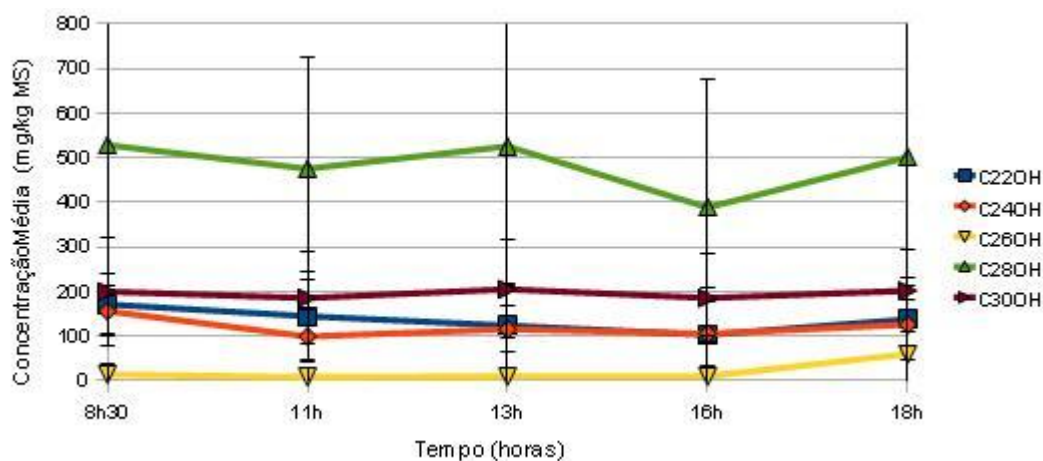


Gráfico 4.10: Concentração Fecal média dos álcoois $C_{22}OH$, $C_{24}OH$, $C_{26}OH$, $C_{28}OH$ e $C_{30}OH$ ao longo do dia (mg/kg MS).

Na figura seguinte pode-se observar um exemplo de cromatograma de álcoois de cadeia longa de uma amostra de fezes colhida no final do dia (aproximadamente às 18h), de um animal submetido ao tratamento 3 (4kg de bolota + 400g de luzerna).

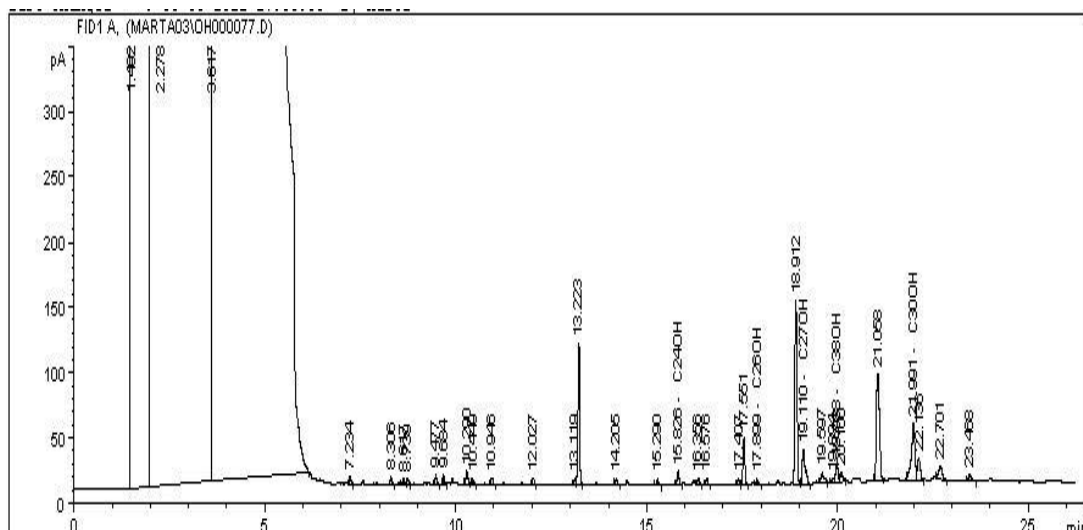


Figura 4.8: Cromatograma de álcoois de cadeia longa para uma amostra de fezes na quinta colheita do dia.

4.7 – Recuperação Fecal dos Marcadores dos N-Alcanos

A recuperação fecal foi calculada para as Fezes Totais, com os dados obtidos por Gomes (2010), utilizando a equação 3.3.3.2, apresentada no capítulo anterior.

De seguida são apresentadas as concentrações médias dos n-alcenos das fezes totais para cada um dos tratamentos do ensaio *in vivo*.

Tabela 4.6: Concentração média dos n-alcenos presentes nas fezes totais (mg/kg MS), em cada tratamento.

N-alcenos / Tratamentos	C ₂₃	C ₂₅	C ₂₇	C ₂₈	C ₂₉	C ₃₀	C ₃₁	C ₃₂	C ₃₃	C ₃₅	C ₃₆
1	5,1 ±0,3	11,4 ±0,5	36,8 ±5,8	13,1 ±0,7	112,7 ±17,8	7,8 ±1,2	10,3 ±1,6	144,8 ±37,3	5,7 ±1,8	0,0	189,5 ±50,4
2	4,7 ±0,3	10,3 ±0,7	33,5 ±5,9	12,1 ±1,4	106,6 ±18,5	8,2 ±1,7	34,5 ±10,8	109,0 ±25,5	12,8 ±3,5	2,2 ±2,1	139,1 ±29,4
3	5,3 ±0,5	11,7 ±1,3	37,6 ±7,1	13,6 ±1,7	119,9 ±24,5	9,7 ±2,2	49,8 ±17,9	132,3 ±24,6	17,8 ±6,0	4,2 ±2,1	167,7 ±30,9

Tratamento 1: 4Kg de Bolota; **Tratamento 2:** 4Kg de Bolota + 200g de Luzerna; **Tratamento 3:** 4Kg de Bolota + 400g de Luzerna

Verifica-se que os alcanos presentes em maiores concentrações são o C₂₉, C₃₂ e C₃₆. É também possível observar o aumento, do tratamento um até ao tratamento três, das concentrações fecais dos alcanos C₃₁ e C₃₃, devido ao incremento de luzerna na dieta dos animais.

As recuperações fecais médias obtidas para os n-alcenos estão presentes na tabela 4.7, assim como o erro padrão associado à média e a significância entre tratamentos.

Tabela 4.7: Recuperação fecal média dos n-alcenos nos diferentes tratamentos (%).

N-Alcanos	Tratamento 1	Tratamento 2	Tratamento 3	N	EPM	Significância Tratamento
C ₂₃	58,4	57,9	55,5	9	2,971	0,509
C ₂₅	19,2	21,0	20,1	9	1,078	0,439
C ₂₇	54,13	53,3	53,1	9	2,166	0,939
C ₂₈	59,6	60,2	59,9	9	3,719	0,296
C ₂₉	55,2	60,2	59,9	9	4,086	0,489
C ₃₀	98,6 ^a	73,3 ^b	69,2 ^b	9	6,329	0,011
C ₃₁	90,5	59,2	55,8	9	39,158	0,791
C ₃₂	97,9	92,4	94,4	9	1,909	0,158
C ₃₃	56,5	86,8	84,6	9	39,199	0,833
C ₃₅	0,0 ^a	84,8 ^{ab}	128,9 ^b	9	27,717	0,016
C ₃₆	105,9	101,1	102,5	9	1,920	0,223

^{a-b} Médias com letras diferentes na mesma linha correspondem a diferenças significativas para a variável tratamento ($p \leq 0,05$);
EPM – erro padrão associado à média;
Significância – p-value ou sig.

Tratamento 1: 4Kg de Bolota; **Tratamento 2:** 4Kg de Bolota + 200g de Luzerna; **Tratamento 3:** 4Kg de Bolota + 400g de Luzerna; **EPM:** Erro padrão associado à média.

De uma forma geral as recuperações fecais dos alcanos sintéticos C₃₂ e C₃₆ são superiores em relação aos alcanos naturais.

Existiu efeito do tratamento para os alcanos C₃₀ e C₃₅ ($p < 0,05$). Para o alcano C₃₀ o tratamento 1 foi significativamente diferente dos outros tratamentos, enquanto que para o alcano C₃₅ o tratamento 1 foi apenas significativamente diferente do tratamento 3. Como um dos requisitos para se poder utilizar a técnica dos n-alcenos é ser possível aplicá-la independentemente dos componentes da dieta, caso se pretendesse

calcular a ingestão e a digestibilidade estes dois alcanos não deveriam ser considerados.

Pelo erro padrão da média verifica-se que existiram recuperações fecais muito variáveis para os alcanos C₃₁, C₃₃ e C₃₅, podendo ser um factor negativo para a estimativa da ingestão e da digestibilidade, uma vez que poderão colocar os resultados obtidos em causa. Estas recuperações fecais parecem estar associadas aos alcanos que ocorrem em concentrações mais baixas no alimento.

Fez-se a média das recuperações fecais de todos os n-alcenos excepto daqueles em que se verificaram diferenças significativas e que evidenciaram ser passíveis de serem utilizados nas estimativas da digestibilidade e ingestão (C₃₀, C₃₁, C₃₃ e C₃₅). Os resultados estão expostos na tabela 4.8.

Tabela 4.8: Recuperação fecal média dos n-alcenos (%).

	C ₂₃	C ₂₅	C ₂₇	C ₂₈	C ₂₉	C ₃₂	C ₃₆	N	EPM
RF média (%)	57,3 ^b	20,1 ^a	53,5 ^b	59,9 ^b	54,4 ^b	94,9 ^c	103,2 ^d	27	1,476

^{a-e} Médias com letras diferentes correspondem a diferenças significativas (P<0,05); **EMP:** Erro padrão associado à média.

Na tabela 4.8 verifica-se que os alcanos sintéticos (C₃₂ e C₃₆) têm recuperações fecais médias significativamente diferentes dos restantes, possuindo valores muito próximos de 100%, como ocorreu noutra estudo em porcos de raça Alentejana (Ribeiro *et al*, 2007). Noutra trabalho com suínos da raça Alentejana de Oliveira *et al* (2005) os valores das recuperações fecais destes alcanos foram um pouco mais baixos. Mayes *et al* (1986) num estudo com ruminantes também constaram que o alcano C₂₈, que foi doseado, possuía valores de recuperações fecais superiores aos alcanos naturais C₂₇ e C₂₉, no entanto obtiveram que a recuperação fecal do alcano doseado C₃₂ foi semelhante ao alcano natural C₃₃. No geral, as recuperações fecais médias deste trabalho foram mais baixas do que aquelas que foram obtidas para ruminantes (Dove e Mayes, 1991). Oliveira *et al* (2005) obtiveram resultados semelhantes para as recuperações fecais dos alcanos C₂₇ e C₂₉, porém, por outro lado, o valor da recuperação fecal do alcano C₂₅ foi inferior, assim como sucedeu no trabalho de Ribeiro *et al* (2007).

Mayes *et al* (1986) e Dove e Mayes (2001) observaram que a recuperação fecal dos alcanos aumenta com o tamanho da cadeia carbonada. Esta correlação não se verificou neste estudo, tal como aconteceu no trabalho em porcos alentejanos, de Ribeiro *et al* (2007).

As recuperações fecais médias obtidas por Wilson *et al* (1999) foram mais elevadas, quando comparadas com este estudo, sobretudo nos alcanos com número impar de átomos de carbono. Estas diferenças sugerem que a raça e o estado fisiológico dos animais influenciam no comportamento dos n-alcenos no tubo digestivo dos suínos.

É importante efectuar a correcção para a taxa de recuperação fecal de n-alceno quando é utilizado como marcador fecal, como é comprovado pela recuperação fecal significativamente mais elevada dos alcanos sintéticos.

5 – Conclusões

A elaboração deste estudo permitiu contribuir para a caracterização da excreção de n-alcenos e álcoois de cadeia longa em porcos de raça Alentejana alimentados com bolota ou mistura de bolota e luzerna desidratada e doseados com dois alcanos externos (C_{32} e C_{36}). Conclui-se que a excreção dos alcanos externos doseados atinge uma plataforma estável três dias após o início das dosagens dos mesmos marcadores aos animais. Observou-se ainda que não há variação significativa da concentração dos alcanos externos ao longo do dia, o que indica que as duas dosagens diárias praticadas neste ensaio são adequadas para a utilização dos marcadores em estimativas da ingestão. As concentrações dos alcanos internos C_{23} , C_{29} , C_{30} , C_{33} , e C_{35} não sofreram variações ao longo do dia. Assim, a frequência e o momento da colheita de fezes ao longo do dia para a estimativa da ingestão e da digestibilidade, utilizando a técnica dos n-alcenos, parece neste caso não ser um factor importante.

Quanto à variação das concentrações fecais de álcoois de cadeia longa apenas o álcool $C_{24}OH$ apresentou diferenças entre o primeiro e o segundo dia de análise. Nos restantes álcoois de cadeia longa não foi observada qualquer diferença significativa entre dias. A colheita de amostras para analisar a excreção fecal de álcoois de cadeia longa, tal como acontece com os n-alcenos, pode ser efectuada em qualquer altura do dia.

Ao realizar-se o cálculo da recuperação fecal dos n-alcenos observou-se que os alcanos sintéticos (C_{32} e C_{36}) tiveram valores próximos de 100%. As recuperações fecais dos restantes alcanos variaram entre 20,1% (C_{25}) e 59,9% (C_{28}) e não se verificou qualquer relação entre o tamanho da cadeia carbonada e a extensão da sua recuperação fecal, como foi observado por outros autores particularmente em ovelhas.

Em porcos alentejanos existe uma grande limitação da técnica de n-alcenos para a estimativa da ingestão e da digestibilidade, que é o facto destes animais possuírem preferência pelo miolo e como se observou esta é fracção da bolota com menor concentração tanto de n-alcenos, como de álcoois de cadeia longa.

Futuramente, poderá ser estudada a existência de outros marcadores, com concentrações mais altas no miolo da bolota, como é o caso dos compostos

associados aos picos X e Y, encontrados no estudo dos álcoois de cadeia longa e que existem em grandes concentrações tanto no miolo, como na casca de bolota. Tentou-se identificar a substância que origina o pico X, durante este trabalho, no entanto não foi possível. Porém, a identificação das substâncias destes dois picos poderão ser bastante relevantes na determinação da ingestão e da digestibilidade, com a utilização de compostos naturais presentes nas ceras cuticulares das plantas em porcos de raça Alentejana.

6 – Referências Bibliográficas

- ✿ Abreu, M.; (1992) *Valor alimentar de três pastagens anuais para ovinos*. Tese de doutoramento. Universidade de Évora. Évora.
- ✿ Baker, R.; (1982) *Estimating herbage intake from animal performance*. In: *Herbage Intake Handbook*. Ed. J.D. Leaver. The British Grassland Society, 77-93.
- ✿ Berchielli, T., Oliveira, S., Carrilho, E., Feitosa, J., Lopes, A.; (2005) *Comparação de Marcadores para Estimativas de Produção Fecal e de Fluxo de Digesta em Bovinos*. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 34, 987-996.
- ✿ Brewer, L.W.; *Gas Chromatography*. [Online] Capítulo 21, 257-276; Disponível em: <http://www.cdc.gov/niosh/pdfs/74-177-k.pdf> [consultado em 15 de Setembro de 2009].
- ✿ Campaniço, L.; (2005) *Influência dos frutos de Quercus rotundifolia e Quercus suber sobre as performances produtivas e perfil de ácidos gordos da gordura subcutânea em suínos de raça Alentejana*. Trabalho de Fim de Curso. Universidade de Évora. Évora.
- ✿ Carbó, C., Andrada, A.; (2000) *Porcino Ibérico: aspectos claves*. Edição especial para Nanta, S.A.. Ediciones Mundi-Prensa.
- ✿ Castro, F. (2009) *Efeito dos Taninos da Bolota Na Digestibilidade da Proteína Bruta de Dietas de Porcos Alentejanos de Montanha*. Tese de Mestrado em Engenharia Zootécnica – Produção Animal. Instituto Superior de Agronomia. Lisboa.
- ✿ Chang, R.; (2005) *Química*. 8ª Edição; McGrawHill. Lisboa.
- ✿ Chemistry 322L Manual; *Gas Chromatography*. 32-35, Disponível em: <http://www.csun.edu/~hcchm003/322l/322lmgc.pdf> [consultado em 16 de Setembro de 2009].

- ✿ Chromatography; *Chromatography*. 1-4, Disponível em: http://knockhardy.org.uk/sci_htm_files/08chroma.pdf [consultado em 15 de Setembro de 2009].
- ✿ Cortes, C., Damasceno, J., Paine, R., Fukumoto, N., Rêgo, F., Cecato, U.; (2005) *Uso de N-alcenos na Estimativa da Composição Botânica em Amostras com Diferentes Proporções de Brachiaria brizantha e Arachis pintoi*. Revista Brasileira de Zootecnia, 34, 1468-1474.
- ✿ Degani, A., Cass, Q., Vieira, P.; (1998) *Cromatografia – um breve ensaio*. Actualidades em Química. Química Nova na Escola, n.º7, 21-25.
- ✿ Dove, H., Mayes, R.; (1991) *The use of plant wax alkanes as marker substances in studies of nutrition of herbivores: a review*. Australian Journal of Agriculture Research, 42, 913-952.
- ✿ Dove, H., Mayes, R.; (1996) *Plant wax Components: a new approach to estimating intake and diet composition in herbives*. American Institute of Nutrition.
- ✿ Dove, H., Mayes, R.; (1999) *Development in the use of plant wax markers for estimation diet selection in herbivores*. International Symposium on the Nutrition of Herbivores, 5.
- ✿ Dove, H., Mayes, R.; (2000) *Measurement of dietary nutrient intake in free-ranging mammalian herbivores*. Nutrition Research Reviews, 13, 107-138.
- ✿ Dove, H., Mayes, R.; (2003) *Analysis of n-alkanes – extraction of faeces and herbage*. Satellite Meeting: wild and domestic herbivore diet characterization, 10, 17-19.
- ✿ Dove, H., Mayes, R.; (2005) *Using n-alkanes and other plant wax components to estimate intake, digestibility and diet composition of grazing/browsing sheep and goats*. Small Ruminant Research, 59, 123-139.

- ✿ Dove, H., Mayes, R.; (2006) *Protocol for the analysis of n-alkanes and other plant-wax compounds and their use as markers for quantifying the nutrient supply of large mammalian herbivores*. Nature Protocols, 1, 1680-1697.
- ✿ Du, Y., Penning, P.; (1982) *Animal based techniques for estimating herbage intake*. In: Herbage Intake Handbook. Ed. J.D. Leaver. The British Grassland society, 37-75.
- ✿ Farinha, N., Santos, R., Ribeiro, G., Barradas, A., Bento, P.; (2005) *Alimentação do porco alentejano para produção de carne fresca*. «Utilização do porco da raça Alentejana respeitando os princípios da sustentabilidade do montado e objectivado na valorização dos produtos tradicionais de qualidade»; Resultados do projecto AGRO 321, programa PO AGRO 8.1; Escola Superior Agrária de Elvas; Elvas.
- ✿ Fernandes, L.; (1999) *Campos do Sul: Da história e agro-economia do porco alentejano ao desenvolvimento sustentável da sua agricultura*. Tese de doutoramento. Universidade de Évora; Évora.
- ✿ Fernandes, L., Freitas, A., Abreu, M.; (2008) *Evolução dos sistemas de produção de porco Alentejano e efeitos do aumento de preço dos alimentos compostos na viabilidade económica da actividade*. Revista de Suinocultura, n.º78, 54-63.
- ✿ Ferreira, D.; (2001) *Evolução da paisagem de montado no Alentejo interior ao longo do século XX: Dinâmica e incidências ambientais*. Finisterra, XXXVI, 72, pp. 179-193.
- ✿ Ferreira, L., Oliván, M., Celaya, R., Garcia, U., Rodrigues, M., Guedes, C., Dias-da-Silva, A., Osoro, K.; (2007) *Utilização de marcadores internos (n-alcenos) no estudo do comportamento alimentar em comunidades vegetais de montanha de herbívoros ruminantes e não ruminantes*. I Jornadas do CECAV, UTAD, Vila Real.

- ✿ Ferreira, T.; (2008) *Produção de Suínos de raça Alentejana em sistema intensivo até ao final da pré-engorda*. Tese de Mestrado. Universidade Técnica de Lisboa. Faculdade de Medicina Veterinária. Lisboa.
- ✿ Freitas, A. (1998) *Influência do nível e regime alimentar em pré-acabamento sobre o crescimento e desenvolvimento do porco alentejano e as suas repercussões sobre o acabamento em montanha e com alimento comercial*. Tese de doutoramento. Universidade de Évora. Évora.
- ✿ Freitas, A.; (2006) *Alimentação em Regime extensivo: raça suína Alentejana*. IV Jornadas Internacionais de Suinicultura. UTAD. Vila Real, 12 pp.
- ✿ Freitas, A.; Neves, J.; Nunes, J.; Martins, J.; (2006) *O sistema agro-silvo-pastoril da raça suína Alentejana*. IV Congresso Latinoamericano de Agroforesteria para la Producción Pecuária Sostenible. (CD-Rom, 6pp). Varadero, Cuba.
- ✿ Gomes, C.; (2008) *Utilização de n-alcenos e álcoois de cadeia longa para estimar a ingestão em porcos Alentejanos*. Projecto de Investigação. Mestrado em Zootecnia, Universidade de Évora. Évora.
- ✿ Gomes, C.; (2010) *Utilização de n-alcenos e álcoois de cadeia longa para estimar a ingestão em porcos Alentejanos*. Tese de Mestrado em Zootecnia; Universidade de Évora; Évora.
- ✿ Greenhalgh, J.; (1982) *An introduction to herbage intake measurements*. In: *Herbage Intake Handbook*. Ed. J.D. Leaver. The British Grassland Society, 1-10.
- ✿ Mayes, R., Lamb, C., Colgrove, P.; (1986) *The use of dosed and herbage n-alkanes as markers for the determination of herbage intake*. *Journal of Agricultural Science*, 107, 161-170.
- ✿ Mayes, R., Dove, H., Chen, X., Guada, J.; (1995) *Advances in the use of fecal and urinary markers for the determination of herbage intake*. *Journal of Agricultural Science*, 107, 161-170.

- ✿ McDonald, P., Edwards, R., Greenhalgh, J., Morgan, C.; (2006) *Nutrición Animal*, 6ªedición. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza.
- ✿ Mendes, C; (2005) *Estimativa da Ingestão e Digestibilidade de erva e bolota pela técnica dos n-alcenos*. Trabalho final de curso da Licenciatura em Engenharia Zootécnica. Universidade de Évora. Évora.
- ✿ Nunes, J.; (1993) *Contributo para a reintegração do Porco Alentejano no Montado*. Tese de Doutoramento em Ciências Agrárias. Universidade de Évora; Évora.
- ✿ Nunes, J.; (2007) *Produção Pecuária no Montado – Suínos*; Revista de Ciências Agrárias, volume 30, n.º1, p. 251-259.
- ✿ Oliván, M., Dove, H., Mayes, R.W., Hoebbe, S.E.; (1999) *Other plant wax components to estimate intake and diet composition in herbivores*. Revista Portuguesa de Zootecnia. Ano VI, n.º1, 22-337.
- ✿ Oliveira, D., Prates, E.; (2000) *Utilização dos componentes da cera das plantas, em especial os n-alcenos, em estudos de nutrição de ruminantes*. Ciência Rural, Santa Maria, vol. 30, n.º3, 549-557;
- ✿ Oliveira, I., Trigo, A., Neves, J., Abreu, M.; (2005) *Validation of n-alkanes technique to measure intake and digestibility in Alentejano pigs under "Montanheira"*. In: Sandoval-Castro, C.A., Hovell, D., Acosta, F.T., Ayala-Burgos, A. (eds), *Herbivores, The assessment of intake, digestibility and the roles of secondary compounds*. Nottingham University Press, UK, 55-61.
- ✿ Oliveira, O.; (2005) *Utilização de cereais secundários como fontes energéticas de dietas de suínos em crescimento*. Instituto Nacional de Investigação Agrária. Estação Zootécnica Nacional. Vale de Santarém.
- ✿ Paine, R., Júnior, J., Rego, F., Cortes, C., Fukumoto, N., Frohnt, K., Queiroz, M., Damasceno, J.; (2002) *Perfil de n-alcenos em diferentes proporções de*

Brachiaria brizantha e *Arachis pintoi*. XI Encontro Anual de Iniciação Científica. Maringá.

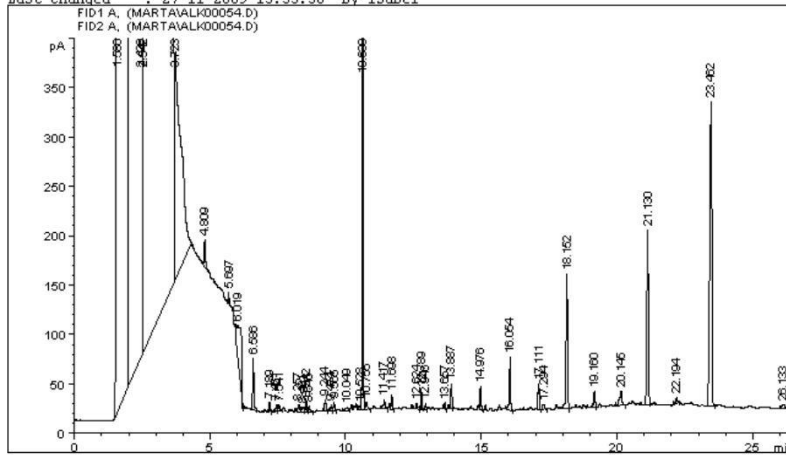
- ✿ Pires, V.; (2008) *Estrutura e função de módulos não catalíticos envolvidos na degradação da parede celular vegetal: o efeito de enzimas exógenas na valorização nutritiva de dietas à base de Lupinus albus para leitões*. Tese de doutoramento. Universidade Técnica de Lisboa. Faculdade de Medicina Veterinária. Lisboa.
- ✿ Ribeiro, T.; (2005) *Validação da técnica dos n-alcenos para a estimativa da ingestão e da digestibilidade em Porcos Alentejanos*. Trabalho final de curso da licenciatura em Engenharia Zootécnica. Universidade de Évora. Évora.
- ✿ Ribeiro, T., Ferraz-de-Oliveira, M., Mendes, C., Abreu, M.; (2007) *Estudo para a validação da técnica dos n-alcenos para estimativa da ingestão e da digestibilidade em porcos Alentejanos*. Revista de Ciências Agrárias, 30, 296-302.
- ✿ Rodríguez, N., Saliba, E., Júnior, R.; (2006) *Uso de indicadores para estimativa de consumo a pasto e digestibilidade*. Anais de Simpósios da 43ª Reunião Anual da SBZ – João Pessoa – PB, 263-288.
- ✿ Silva, S.L.; (2007) *Cromatografia Gasosa*. FarmaBio. Disponível em: www.farmabio.k6.com.br [consultado em 15 de Setembro de 2009].
- ✿ Tejeda, J., Garcia, C., Petró, M., Andrés, A., Antequera, T.; (2001). *N-alkane content of intramuscular lipids of Iberian fresh ham from different feeding systems and crossbreeding*. Meat Science, 57, 371 – 377.
- ✿ Trigo, A.; (2002) *Validação da técnica dos n-alcenos para a estimativa da ingestão e digestibilidade de bolota e erva em porcos alentejanos*. Tese de Mestrado. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa.
- ✿ Ventura, M.; (1986) *Ensaio preliminares à reintegração do Porco Alentejano na “montanha”*. Trabalho final de curso em Engenharia Zootécnica. Universidade de Évora. Évora.

7 – Anexos

Anexo 1: Exemplo de cromatograma de uma amostra de fezes e os respectivos valores das áreas medidas pelo programa ChemStation.

1.1 – Alcano

Sample Name : 183 Location : Vial 44
 Acq. Operator : Isabel Inj : 1
 Acq. Instrument : Instrument 2 Inj Volume : 1 µl
 Sequence File : C:\HPCHEM\2\SEQUENCE\MARALK3.S
 Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\ALK4-08.M
 Last changed : 27-11-2009 15:53:56 by Isabel

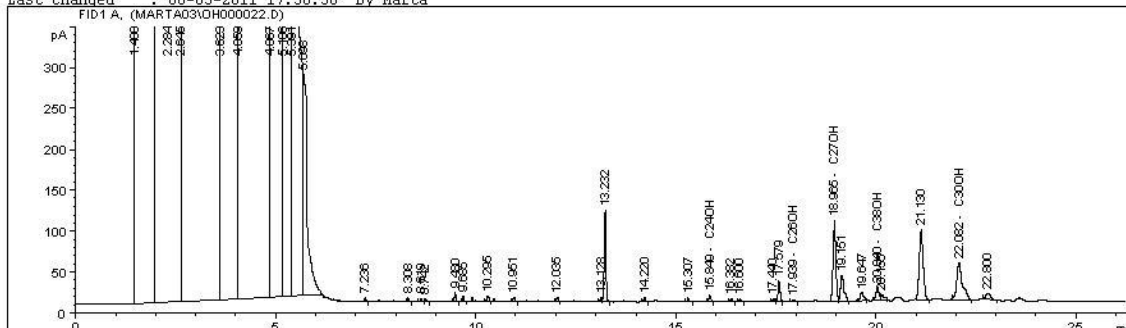


A	B	C	D	E	F	G	H	I
HeaderName	HeaderValue	Flags	PeakType	RetTime	Area	Height	Width	Symm
berOfRo	41	18	9	1,59	527161,25	64637,75		0,11
berOfCol	14	34	9	2,43	14959655	915388,25		0,27
berOfHe	9	34	9	2,54	110711,87	11018,4		0,17
fied		32	9	3,72	3564,1	230,7		0,26
Time		0	8	4,81	108,07	28		0,06
Start	0	32	8	5,7	31,13	11,88		0,04
End	0	1	8	6,02	405,31	30,25		0,16
s	0	16	8	6,59	150,61	52,14		0,04
Mode	2	17	8	7,19	30,85	9,94		0,05
		18	8	7,45	24,58	7,11		0,05
		32	8	7,54	20	7,14		0,04
		2	8	8,26	32,51	7,88		0,06
		34	8	8,4	28,14	5,18		0,07
		34	8	8,54	29,74	10,3		0,04
		33	8	8,65	23,49	5,96		0,06
		1	8	9,24	40,8	11,56		0,05
		17	8	9,47	24,83	6,58		0,05
		33	8	9,56	21,32	8,78		0,04
		18	8	10,05	23,52	2,89		0,11
		34	8	10,53	20,4	3,52		0,08
		34	8	10,63	1748,99	622,35		0,04
		32	8	10,76	34,48	7,43		0,06
		0	8	11,42	41,94	9,11		0,06
		33	8	11,7	38,94	14,69		0,04
		2	8	12,62	24,99	5,72		0,06
		32	8	12,79	60,5	20,14		0,05
		2	8	12,95	22,35	6,02		0,06
		1	8	13,66	25,65	6,74		0,06
		33	8	13,89	77,24	25,49		0,05
		32	8	14,98	74,46	24,18		0,05
		32	8	16,05	181,91	53,29		0,05
		1	8	17,11	86,84	25,92		0,05
		1	8	17,29	25,91	5,75		0,06

Contributo para a validação da utilização de constituintes das ceras cuticulares das plantas como marcadores para estimar a ingestão em porcos Alentejanos: Caracterização da excreção de n-alcenos e álcoois de cadeia longa em porcos alentejanos

1.2 – Álcool de cadeia longa

Sample Name : 479 Location : Vial 19
 Acc. Operator : Marta Inj : 1
 Acc. Instrument : Instrument 2 Inj Volume : 1 µl
 Sequence File : C:\HPCHEM\2\DATA\MARTA03\MAR0H50.S
 Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\ALCOH-09.M
 Last changed : 06-03-2011 17:38:56 by Marta



	A	B	C	D	E	F	G	H	I
	HeaderName	HeaderValue	Flags	PeakType	RetTime	Area	Height	Width	Symm
2	NumberOfRot	36	2	9	1,49	3186031,5	590360,19		0,06
3	NumberOfCol	14	34	9	2,28	5954180,5	477389,25		0,21
4	NumberOfHe	9	34	9	2,64	246693,56	6694		0,61
5	Modified		34	9	3,62	55586,73	2609,77		0,35
6	DateTime		34	9	4,06	62787,91	1714,61		0,61
7	IntegStart	0	34	9	4,87	14665,75	900,51		0,27
8	IntegEnd	0	34	9	5,19	7847,73	682,62		0,19
9	Errors	0	34	9	5,39	7657,61	565,77		0,23
10	IntegMode	2	32	9	5,7	1879,61	270,27		0,12
11			16	8	7,24	10,91	4,49		0,04
12			1	8	8,31	11,08	4,37		0,04
13			16	8	8,62	15,52	4,12		0,05
14			0	8	8,74	12,26	3,25		0,06
15			0	8	9,48	32,23	11,65		0,04
16			1	8	9,68	17,23	6,68		0,04
17			0	8	10,3	22,63	6,11		0,06
18			17	8	10,95	15,85	4,79		0,05
19			0	8	12,03	15,95	5,08		0,05
20			18	8	13,13	16,21	5,32		0,05
21			32	8	13,23	365,73	111,73		0,05
22			0	8	14,22	18,21	5,12		0,06
23			16	8	15,31	17,3	4,66		0,06
24			17	8	15,85	28,9	7,92		0,06
25			17	8	16,38	14,87	4,15		0,06
26			17	8	16,6	11,59	3,36		0,05
27			2	8	17,44	12,77	3,1		0,07
28			33	8	17,58	97,77	25,23		0,06
29			1	8	17,94	10,55	2,64		0,06
30			2	8	18,96	489,5	99		0,08
31			32	8	19,15	183,95	32,36		0,08
32			0	8	19,65	60,37	9,67		0,09
33			2	8	20,04	84,57	15,79		0,08
34			32	8	20,16	38,16	5,95		0,09

Anexo 2: Composição química média dos alimentos fornecidos aos animais ao longo do ensaio \pm desvio padrão (%).

Amostra de Alimento	% Matéria Seca ¹	Cinzas Totais (% MS)	Proteína Total (% MS)	NDF (% MS)	ADF (% MS)	ADL (% MS)
Bolota inteira	79,12 \pm 1,8	2,05 \pm 0,1	3,91 \pm 0,2	22,65 \pm 1,5	14,27 \pm 0,4	5,44 \pm 0,3
Miolo de Bolota	80,11 \pm 2,9	2,21 \pm 0,1	4,46 \pm 0,4	5,93 \pm 0,4	2,72 \pm 0,3	0,59 \pm 0,1
Casca de Bolota	80,25 \pm 1,3	1,50 \pm 0,1	2,97 \pm 0,2	71,02 \pm 1,6	52,97 \pm 2,0	22,36 \pm 1,4
Luzerna	93,44 \pm 0,1	12,66 \pm 0,2	9,92 \pm 0,1	45,34 \pm 4,8	34,27 \pm 0,8	7,16 \pm 0,4

¹- A matéria seca apresentada é a matéria seca total, isto é, a residual multiplicada pela liofilizada, com a exceção da luzerna, que é apresentada como matéria seca residual.

Anexo 3: Composição química dos refugos alimentares recolhidos ao longo do ensaio \pm desvio padrão, por cada tratamento.

Tratamento	Matéria Seca (%)	Cinzas Totais (% MS)	Proteína Total (% MS)	NDF (% MS)
1	59,62 \pm 3,5	1,2 \pm 0,1	2,7 \pm 0,3	34,5 \pm 2,4
2	58,45 \pm 3,5	1,5 \pm 0,3	2,8 \pm 0,4	35,1 \pm 5,1
3	60,69 \pm 5,5	1,7 \pm 0,5	2,8 \pm 0,5	35,4 \pm 5,3

Tratamento 1: 4Kg de Bolota; **Tratamento 2:** 4Kg de Bolota + 200g de Luzerna; **Tratamento 3:** 4Kg de Bolota + 400g de Luzerna.

Anexo 4: Matéria seca média \pm desvio padrão das amostras de fezes colhidas nos diferentes dias, por cada tratamento e em cada período (%).

	Tratamento 1	Tratamento 2	Tratamento 3
1º Período	95,54 \pm 0,65	95,01 \pm 1,37	95,27 \pm 1,27
2º Período	95,45 \pm 1,37	94,54 \pm 1,66	95,65 \pm 2,79

Tratamento 1: 4Kg de Bolota; **Tratamento 2:** 4Kg de Bolota + 200g de Luzerna; **Tratamento 3:** 4Kg de Bolota + 400g de Luzerna

Contributo para a validação da utilização de constituintes das ceras cuticulares das plantas como marcadores para estimar a ingestão em porcos Alentejanos: Caracterização da excreção de n-alcenos e álcoois de cadeia longa em porcos alentejanos

Anexo 5: Concentração Fecal dos alcanos C₃₂ e C₃₆ ao longo dos dias (mg/kg MS), no 1º e 2º Períodos.

Alcanos	1º Período								
	Tratamento	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	n
C ₃₂	1	3,61 ±1,62	56,68 ±23,77	140,80 ±17,63	142,65 ±10,94	159,73 ±38,64	145,60 ±17,34	133,75 ±15,84	3
	2	4,28 ±1,69	93,45 ±19,11	122,10 ±14,16	95,89 ±29,00	120,30 ±15,77	102,32 ±18,20	111,58 ±16,99	3
	3	4,42 ±1,61	78,21 ±86,38	129,73 ±7,89	131,96 ±3,39	117,47 ±12,26	119,91 ±7,59	102,53 ±13,90	3
C ₃₆	1	0 ±0,00	68,57 ±27,56	174,03 ±16,83	172,90 ±9,35	201,90 ±54,54	189,63 ±19,61	174,62 ±27,36	3
	2	0 ±0,00	115,82 ±17,37	138,54 ±29,51	124,80 ±38,39	151,37 ±16,96	133,46 ±28,74	147,08 ±28,27	3
	3	0 ±0,00	40,83 ±14,37	168,57 ±10,35	162,35 ±29,62	144,36 ±26,97	151,18 ±24,96	139,23 ±21,11	3

Tratamento 1: 4Kg de Bolota; **Tratamento 2:** 4Kg de Bolota + 200g de Luzerna; **Tratamento 3:** 4Kg de Bolota + 400g de Luzerna.

Alcanos	2º Período					
	Tratamento	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	n
C ₃₂	1	24,20± 8,18	109,99± 7,58	163,1± 8,91	180,74± 16,99	3
	2	18,05± 7,10	104,34± 7,13	190,19± 29,14	169,91± 23,30	3
	3	10,96± 1,33	162,71± 24,48	199,71± 32,47	179,16± 11,17	3
C ₃₆	1	26,54± 10,30	123,99± 14,57	187,72± 17,26	210,52± 21,47	3
	2	18,75± 9,13	132,3± 12,24	250,53± 34,10	215,45± 22,04	3
	3	4,96± 4,30	187± 23,64	233,78± 45,87	218,27± 34,52	3

Tratamento 1: 4Kg de Bolota; **Tratamento 2:** 4Kg de Bolota + 200g de Luzerna; **Tratamento 3:** 4Kg de Bolota + 400g de Luzerna.

Contributo para a validação da utilização de constituintes das ceras cuticulares das plantas como marcadores para estimar a ingestão em porcos Alentejanos: Caracterização da excreção de n-alcenos e álcoois de cadeia longa em porcos alentejanos

Anexo 6: Diferenças entre tratamentos para as concentrações fecais dos alcanos C₃₂ e C₃₆, respectivamente, de amostras colhidas em sete dias diferentes ($P > 0,05$ – não existem diferenças significativas).

Tests of Between-Subjects Effects - C₃₂

Measure: MEASURE_1

Transformed Variable: Average

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Intercept	640223,140	1	640223,140	445,188	,000
Tratamentos	4079,376	2	2039,688	1,418	,313
Error	8628,576	6	1438,096		

Tests of Between-Subjects Effects- C₃₆

Measure: MEASURE_1

Transformed Variable: Average

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Intercept	1015436,237	1	1015436,237	295,734	,000
Tratamentos	6384,917	2	3192,458	,930	,445
Error	20601,655	6	3433,609		

Anexo 7: Diferenças entre dias para as concentrações fecais dos alcanos C₃₂ e C₃₆, respectivamente, de amostras colhidas em sete dias diferentes ($P > 0,05$ – não existem diferenças significativas; $P < 0,05$ – existem diferenças significativas).

Pairwise Comparisons - C₃₂

Measure: MEASURE_1

(I) dias	(J) dias	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a	95% Confidence Interval for Difference ^a	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-72,010	17,678	,138	-160,923	16,903
	3	-126,771*	4,827	,000	-151,049	-102,493
	4	-119,397*	6,385	,000	-151,510	-87,283
	5	-128,397*	8,208	,000	-169,681	-87,113
	6	-118,503*	5,245	,000	-144,884	-92,123

Contributo para a validação da utilização de constituintes das ceras cuticulares das plantas como marcadores para estimar a ingestão em porcos Alentejanos: Caracterização da excreção de n-alcenos e álcoois de cadeia longa em porcos alentejanos

	7	-111,848*	5,281	,000	-138,411	-85,285
2	1	72,010	17,678	138	-16,903	160,923
	3	-54,761	16,441	332	-137,454	27,932
	4	-47,387	16,948	658	-132,632	37,859
	5	-56,387	18,454	469	-149,205	36,431
	6	-46,493	16,279	608	-128,371	35,384
	7	-39,838	15,885	967	-119,733	40,057
	3	1	126,771*	4,827	,000	102,493
2		54,761	16,441	332	-27,932	137,454
4		7,374	5,423	1,000	-19,904	34,653
5		-1,626	7,353	1,000	-38,610	35,359
6		8,268	1,920	106	-1,391	17,926
7		14,923	5,683	825	-13,659	43,506
4		1	119,397*	6,385	,000	87,283
	2	47,387	16,948	658	-37,859	132,632
	3	-7,374	5,423	1,000	-34,653	19,904
	5	-9,000	10,569	1,000	-62,157	44,157
	6	,893	4,995	1,000	-24,231	26,018
	7	7,549	6,796	1,000	-26,635	41,733
	5	1	128,397*	8,208	,000	87,113
2		56,387	18,454	469	-36,431	149,205
3		1,626	7,353	1,000	-35,359	38,610
4		9,000	10,569	1,000	-44,157	62,157
6		9,893	6,527	1,000	-22,936	42,722
7		16,549	6,257	804	-14,924	48,022
6		1	118,503*	5,245	,000	92,123
	2	46,493	16,279	608	-35,384	128,371
	3	-8,268	1,920	106	-17,926	1,391
	4	-,893	4,995	1,000	-26,018	24,231
	5	-9,893	6,527	1,000	-42,722	22,936
	7	6,656	4,480	1,000	-15,878	29,189
	7	1	111,848*	5,281	,000	85,285
2		39,838	15,885	967	-40,057	119,733
3		-14,923	5,683	825	-43,506	13,659
4		-7,549	6,796	1,000	-41,733	26,635
5		-16,549	6,257	804	-48,022	14,924
6		-6,656	4,480	1,000	-29,189	15,878

Based on estimated marginal means

Contributo para a validação da utilização de constituintes das ceras cuticulares das plantas como marcadores para estimar a ingestão em porcos Alentejanos: Caracterização da excreção de n-alcenos e álcoois de cadeia longa em porcos alentejanos

a. Adjustment for multiple comparisons: Bonferroni.

*. The mean difference is significant at the ,05 level.

Pairwise Comparisons - C₃₆

Measure: MEASURE_1

(I) dias	(J) dias	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a	95% Confidence Interval for Difference ^a	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-97,359	24,163	,145	-218,891	24,174
	3	-160,377*	6,834	,000	-194,752	-126,001
	4	-153,352*	9,504	,000	-201,155	-105,549
	5	-165,878*	12,155	,000	-227,012	-104,743
	6	-158,090*	8,241	,000	-199,539	-116,641
	7	-153,642*	8,591	,000	-196,853	-110,431
	2	1	97,359	24,163	,145	-24,174
3		-63,018	22,218	,624	-174,767	48,731
4		-55,993	22,775	1,000	-170,547	58,561
5		-68,519	24,125	,621	-189,862	52,824
6		-60,731	21,198	,601	-167,349	45,887
7		-56,283	22,088	,916	-167,378	54,812
3		1	160,377*	6,834	,000	126,001
	2	63,018	22,218	,624	-48,731	174,767
	4	7,024	7,127	1,000	-28,824	42,873
	5	-5,501	11,680	1,000	-64,251	53,248
	6	2,287	4,057	1,000	-18,121	22,694
	7	6,734	8,023	1,000	-33,621	47,090
	4	1	153,352*	9,504	,000	105,549
2		55,993	22,775	1,000	-58,561	170,547
3		-7,024	7,127	1,000	-42,873	28,824
5		-12,526	14,710	1,000	-86,512	61,461
6		-4,738	6,490	1,000	-37,380	27,904
7		-,290	10,441	1,000	-52,803	52,223
5		1	165,878*	12,155	,000	104,743
	2	68,519	24,125	,621	-52,824	189,862
	3	5,501	11,680	1,000	-53,248	64,251
	4	12,526	14,710	1,000	-61,461	86,512
	6	7,788	9,294	1,000	-38,960	54,536
	7	12,236	9,215	1,000	-34,114	58,586

Contributo para a validação da utilização de constituintes das ceras cuticulares das plantas como marcadores para estimar a ingestão em porcos Alentejanos: Caracterização da excreção de n-alcenos e álcoois de cadeia longa em porcos alentejanos

6	1	158,090*	8,241	,000	116,641	199,539
	2	60,731	21,198	,601	-45,887	167,349
	3	-2,287	4,057	1,000	-22,694	18,121
	4	4,738	6,490	1,000	-27,904	37,380
	5	-7,788	9,294	1,000	-54,536	38,960
	7	4,448	7,277	1,000	-32,154	41,049
	7	1	153,642*	8,591	,000	110,431
2		56,283	22,088	,916	-54,812	167,378
3		-6,734	8,023	1,000	-47,090	33,621
4		,290	10,441	1,000	-52,223	52,803
5		-12,236	9,215	1,000	-58,586	34,114
6		-4,448	7,277	1,000	-41,049	32,154

Based on estimated marginal means

a. Adjustment for multiple comparisons: Bonferroni.

*. The mean difference is significant at the ,05 level.

Anexo 8: Diferenças entre tratamentos para as concentrações fecais dos alcanos C₃₂ e C₃₆, respectivamente, de amostras colhidas em quatro dias diferentes (**P>0,05** – não existem diferenças significativas; **P<0,05** – existem diferenças significativas).

Tests of Between-Subjects Effects - C₃₂

Measure: MEASURE_1

Transformed Variable: Average

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Intercept	572330,076	1	572330,076	2738,033	,000
Tratamentos	2619,308	2	1309,654	6,265	,034
Error	1254,178	6	209,030		

Tests of Between-Subjects Effects - C₃₆

Measure: MEASURE_1

Transformed Variable: Average

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Intercept	818850,043	1	818850,043	1524,134	,000
Tratamentos	3615,591	2	1807,796	3,365	,105
Error	3223,536	6	537,256		

Anexo 9: Representação das diferenças significativas entre tratamentos para as concentrações fecais do alcano C₃₂ de amostras colhidas em quatro dias diferentes (**P>0,05** – não existem diferenças significativas; **P<0,05** – existem diferenças significativas).

Multiple Comparisons

MEASURE_1

Tukey HSD

(I) Tratamentos	(J) Tratamentos	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1,00	2,00	-17,5108	5,90240	,057	-35,6210	,5993
	3,00	1,1158	5,90240	,981	-16,9943	19,2260
2,00	1,00	17,5108	5,90240	,057	-,5993	35,6210
	3,00	18,6267*	5,90240	,045	,5165	36,7368
3,00	1,00	-1,1158	5,90240	,981	-19,2260	16,9943
	2,00	-18,6267*	5,90240	,045	-36,7368	-,5165

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 52,257.

*. The mean difference is significant at the ,05 level.

Anexo 10: Diferenças significativas entre os sete dias do primeiro período para as concentrações fecais do álcool de cadeia longa C₂₄OH (**P>0,05** – não existem diferenças significativas; **P<0,05** – existem diferenças significativas).

Pairwise Comparisons – C₂₄OH

Measure: MEASURE_1

(I) Dias	(J) Dias	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a	95% Confidence Interval for Difference ^a	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	35,228 [*]	5,597	,031	3,515	66,942
	3	31,563	12,365	1,000	-38,505	101,631
	4	29,535	11,496	1,000	-35,609	94,679
	5	37,063	8,645	,164	-11,921	86,048
	6	39,550	12,182	,478	-29,476	108,576
	7	48,468	14,690	,451	-34,770	131,707
2	1	-35,228 [*]	5,597	,031	-66,942	-3,515
	3	-3,665	14,742	1,000	-87,203	79,873
	4	-5,693	15,387	1,000	-92,882	81,495
	5	1,835	11,138	1,000	-61,279	64,949
	6	4,322	12,198	1,000	-64,796	73,440
	7	13,240	14,273	1,000	-67,635	94,115
3	1	-31,563	12,365	1,000	-101,631	38,505
	2	3,665	14,742	1,000	-79,873	87,203
	4	-2,028	5,972	1,000	-35,868	31,812
	5	5,500	10,881	1,000	-56,155	67,155
	6	7,987	14,346	1,000	-73,306	89,279
	7	16,905	17,937	1,000	-84,734	118,544
4	1	-29,535	11,496	1,000	-94,679	35,609
	2	5,693	15,387	1,000	-81,495	92,882
	3	2,028	5,972	1,000	-31,812	35,868
	5	7,528	8,629	1,000	-41,366	56,423
	6	10,015	14,803	1,000	-73,864	93,894
	7	18,933	18,760	1,000	-87,371	125,237
5	1	-37,063	8,645	,164	-86,048	11,921
	2	-1,835	11,138	1,000	-64,949	61,279
	3	-5,500	10,881	1,000	-67,155	56,155
	4	-7,528	8,629	1,000	-56,423	41,366
	6	2,487	8,359	1,000	-44,877	49,850

Contributo para a validação da utilização de constituintes das ceras cuticulares das plantas como marcadores para estimar a ingestão em porcos Alentejanos: Caracterização da excreção de n-alcenos e álcoois de cadeia longa em porcos alentejanos

	7	11,405	13,235	1,000	-63,593	86,403
6	1	-39,550	12,182	0,478	-108,576	29,476
	2	-4,322	12,198	1,000	-73,440	64,796
	3	-7,987	14,346	1,000	-89,279	73,306
	4	-10,015	14,803	1,000	-93,894	73,864
	5	-2,487	8,359	1,000	-49,850	44,877
	7	8,918	5,714	1,000	-23,462	41,298
7	1	-48,468	14,690	0,451	-131,707	34,770
	2	-13,240	14,273	1,000	-94,115	67,635
	3	-16,905	17,937	1,000	-118,544	84,734
	4	-18,933	18,760	1,000	-125,237	87,371
	5	-11,405	13,235	1,000	-86,403	63,593
	6	-8,918	5,714	1,000	-41,298	23,462

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the ,05 level.

a. Adjustment for multiple comparisons: Bonferroni.

Anexo 11: Concentração Fecal média dos álcoois de cadeia longa, por tratamento e por dia, no período 1 (mg/kg MS).

Álcoois Cadeia Longa	Tratamento	1º Período							n
		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	
C ₂₆ OH	1	144,55± 71,1	83,00± 22,6	73,54± 19,6	70,02± 31,9	69,55± 8,0	56,15± 8,9	53,05± 7,2	3
	2	112,99± 23,2	82,40± 13,1	93,14± 29,2	43,90± 39,6	41,46± 23,9	40,01± 37,3	65,96± 19,6	3
C ₂₈ OH	1	80,02± 28,4	87,41± 27,7	119,21± 84,8	185,56± 61,3	158,88± 69,6	140,29± 93,2	168,64± 26,7	3
	2	106,58± 19,6	78,58± 18,1	65,83± 6,3	56,07± 10,5	53,33± 20,9	54,62± 11,1	97,87± 75,2	3

Tratamento 1: 4Kg de Bolota; **Tratamento 2:** 4Kg de Bolota + 200g de Luzerna.

Contributo para a validação da utilização de constituintes das ceras cuticulares das plantas como marcadores para estimar a ingestão em porcos Alentejanos: Caracterização da excreção de n-alcenos e álcoois de cadeia longa em porcos alentejanos

Anexo 12: Matéria seca média \pm desvio padrão das amostras de fezes colhidas nas diferentes horas dos dias, por cada tratamento (%).

	Tratamento 1	Tratamento 2	Tratamento 3
M.S. (%) \pm Desvio Padrão	96,55 \pm 4,1	95,83 \pm 1,60	95,53 \pm 3,99

Tratamento 1: 4Kg de Bolota; **Tratamento 2:** 4Kg de Bolota + 200g de Luzerna; **Tratamento 3:** 4Kg de Bolota + 400g de Luzerna

Anexo 13: Concentração Fecal média de três dias dos n-alcenos ao longo de cada dia (mg/kg MS).

Alcano	Tratamento	8h30	11h	13h	16h	18h	n
C₃₂	1	116,14 \pm 21,28	103,87 \pm 21,59	103,55 \pm 13,45	104,33 \pm 18	106,84 \pm 18,27	9
	2	95,91 \pm 15,24	90,69 \pm 9,25	95,5 \pm 13,56	95,06 \pm 11,59	93,8 \pm 7,39	9
	3	106,59 \pm 18,56	113,51 \pm 24,64	106,62 \pm 21,68	114,76 \pm 18,21	110,67 \pm 18,63	9
C₃₆	1	142,7 \pm 27,35	128,36 \pm 25,67	127,72 \pm 19,46	129,37 \pm 24,7	132,61 \pm 25,33	9
	2	126,02 \pm 22,71	118,06 \pm 13,92	123,88 \pm 19,01	125,3 \pm 16,85	121,82 \pm 10	9
	3	141,9 \pm 25,3	151,61 \pm 33,26	142,33 \pm 30,1	154,34 \pm 25,09	148,09 \pm 25,93	9

Tratamento 1: 4Kg de Bolota; **Tratamento 2:** 4Kg de Bolota + 200g de Luzerna; **Tratamento 3:** 4Kg de Bolota + 400g de Luzerna

Contributo para a validação da utilização de constituintes das ceras cuticulares das plantas como marcadores para estimar a ingestão em porcos Alentejanos: Caracterização da excreção de n-alcenos e álcoois de cadeia longa em porcos alentejanos

Anexo 14: Diferenças entre horas para as concentrações fecais médias dos alcanos C₃₂ e C₃₆, respectivamente de amostras colhidas em diferentes momentos do dia (**P>0,05** – não existem diferenças significativas).

Pairwise Comparisons – C₃₂

Measure:MEASURE_1

(I) Hora	(J) Hora	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a	95% Confidence Interval for Difference ^a	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	2,413	3,996	1,000	-14,836	19,663
	3	5,568	3,643	1,000	-10,158	21,293
	4	1,498	2,299	1,000	-8,426	11,422
	5	2,978	2,197	1,000	-6,504	12,460
2	1	-2,413	3,996	1,000	-19,663	14,836
	3	3,154	1,819	1,000	-4,700	11,009
	4	-,916	2,146	1,000	-10,177	8,346
	5	,564	3,759	1,000	-15,661	16,790
3	1	-5,568	3,643	1,000	-21,293	10,158
	2	-3,154	1,819	1,000	-11,009	4,700
	4	-4,070	1,612	,450	-11,030	2,890
	5	-2,590	3,058	1,000	-15,789	10,609
4	1	-1,498	2,299	1,000	-11,422	8,426
	2	,916	2,146	1,000	-8,346	10,177
	3	4,070	1,612	,450	-2,890	11,030
	5	1,480	2,317	1,000	-8,523	11,483
5	1	-2,978	2,197	1,000	-12,460	6,504
	2	-,564	3,759	1,000	-16,790	15,661
	3	2,590	3,058	1,000	-10,609	15,789
	4	-1,480	2,317	1,000	-11,483	8,523

Based on estimated marginal means

a. Adjustment for multiple comparisons: Bonferroni.

Pairwise Comparisons – C₃₆

Measure:MEASURE_1

(I) Hora	(J) Hora	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a	95% Confidence Interval for Difference ^a	
					Lower Bound	Upper Bound

Contributo para a validação da utilização de constituintes das ceras cuticulares das plantas como marcadores para estimar a ingestão em porcos Alentejanos: Caracterização da excreção de n-alcenos e álcoois de cadeia longa em porcos alentejanos

1	2	2,787	4,607	1,000	-17,100	22,673
	3	7,234	4,696	1,000	-13,035	27,504
	4	,530	2,994	1,000	-12,395	13,455
	5	3,152	2,998	1,000	-9,790	16,094
2	1	-2,787	4,607	1,000	-22,673	17,100
	3	4,448	2,023	,703	-4,286	13,181
	4	-2,257	2,592	1,000	-13,445	8,931
	5	,366	4,285	1,000	-18,134	18,865
3	1	-7,234	4,696	1,000	-27,504	13,035
	2	-4,448	2,023	,703	-13,181	4,286
	4	-6,704	2,185	,220	-16,137	2,728
	5	-4,082	4,068	1,000	-21,645	13,480
4	1	-,530	2,994	1,000	-13,455	12,395
	2	2,257	2,592	1,000	-8,931	13,445
	3	6,704	2,185	,220	-2,728	16,137
	5	2,622	2,848	1,000	-9,673	14,918
5	1	-3,152	2,998	1,000	-16,094	9,790
	2	-,366	4,285	1,000	-18,865	18,134
	3	4,082	4,068	1,000	-13,480	21,645
	4	-2,622	2,848	1,000	-14,918	9,673

Based on estimated marginal means

a. Adjustment for multiple comparisons: Bonferroni.

Anexo 15: Diferenças entre tratamentos para as concentrações fecais médias dos alcanos C₃₂ e C₃₆, respectivamente, de amostras colhidas em diferentes momentos do dia (P>0,05 – não existem diferenças significativas).

Tests of Between-Subjects Effects – C₃₂

Measure: MEASURE_1

Transformed Variable: Average

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Intercept	484131,770	1	484131,770	969,649	,000
Tratamentos	2061,577	2	1030,789	2,065	,208
Error	2995,713	6	499,285		

Contributo para a validação da utilização de constituintes das ceras cuticulares das plantas como marcadores para estimar a ingestão em porcos Alentejanos: Caracterização da excreção de n-alcenos e álcoois de cadeia longa em porcos alentejanos

Tests of Between-Subjects Effects – C₃₆

Measure:MEASURE_1

Transformed Variable:Average

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Intercept	809580,513	1	809580,513	708,357	,000
tratamentos	4321,537	2	2160,769	1,891	,231
Error	6857,398	6	1142,900		

Anexo 16: Diferenças entre tratamentos para as concentrações fecais médias dos alcanos C₂₅ e C₂₈, respectivamente, de amostras colhidas em diferentes momentos do dia (**P<0,05** – existem diferenças significativas).

Tests of Between-Subjects Effects – C₂₅

Measure:MEASURE_1

Transformed Variable:Average

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Intercept	14163,261	1	14163,261	6585,099	,000
Tratamentos	108,391	2	54,195	25,198	,001
Error	12,905	6	2,151		

Tests of Between-Subjects Effects – C₂₈

Measure:MEASURE_1

Transformed Variable:Average

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Intercept	17144,806	1	17144,806	11568,782	,000
Tratamentos	135,608	2	67,804	45,752	,000
Error	8,892	6	1,482		

Contributo para a validação da utilização de constituintes das ceras cuticulares das plantas como marcadores para estimar a ingestão em porcos Alentejanos: Caracterização da excreção de n-alcenos e álcoois de cadeia longa em porcos alentejanos

Anexo 17: Diferenças entre horas para as concentrações fecais do alcano C₃₁ de amostras colhidas ao longo do dia ($P > 0,05$ – não existem diferenças significativas; $P < 0,05$ – existem diferenças significativas).

Pairwise Comparisons

Measure: MEASURE_1

(I) Horas	(J) Horas	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a	95% Confidence Interval for Difference ^a	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	2,548 [*]	,529	,029	,266	4,830
	3	1,931	,620	,207	-,745	4,607
	4	,553	,787	1,000	-2,842	3,949
	5	,320	,591	1,000	-2,230	2,870
2	1	-2,548 [*]	,529	,029	-4,830	-,266
	3	-,617	,347	1,000	-2,114	,881
	4	-1,994	,656	,228	-4,828	,839
	5	-2,228 [*]	,451	,026	-4,174	-,282
3	1	-1,931	,620	,207	-4,607	,745
	2	,617	,347	1,000	-,881	2,114
	4	-1,378	,438	,199	-3,269	,513
	5	-1,611 [*]	,270	,010	-2,775	-,447
4	1	-,553	,787	1,000	-3,949	2,842
	2	1,994	,656	,228	-,839	4,828
	3	1,378	,438	,199	-,513	3,269
	5	-,233	,446	1,000	-2,158	1,691
5	1	-,320	,591	1,000	-2,870	2,230
	2	2,228 [*]	,451	,026	,282	4,174
	3	1,611 [*]	,270	,010	,447	2,775
	4	,233	,446	1,000	-1,691	2,158

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the ,05 level.

a. Adjustment for multiple comparisons: Bonferroni.

Contributo para a validação da utilização de constituintes das ceras cuticulares das plantas como marcadores para estimar a ingestão em porcos Alentejanos: Caracterização da excreção de n-alcenos e álcoois de cadeia longa em porcos alentejanos

Anexo 18: Concentração Fecal média dos álcoois de cadeia longa ao longo de cada dia (mg/kg MS).

Álcoois Cadeia Longa	Tratamento	8h30	11h	13h	16h	18h	N
C ₂₂ OH	2	150,86± 25,5	155,35± 19,9	150,52± 12,4	128,10± 41,1	138,62± 53,9	4
	3	171,14± 67,0	144,94± 97,8	141,42± 94,4	103,21± 103,9	137,83± 91,13	9
C ₂₄ OH	2	107,42± 19,2	111,20± 16,3	103,46± 11,0	111,08± 14,5	114,46± 9,1	4
	3	156,23± 54,7	99,51± 57,6	115,64± 50,3	105,25± 73,1	126,04± 53,3	9
C ₂₆ OH	2	21,10± 19,3	37,61± 38,0	21,60± 15,4	37,88± 12,8	31,99± 8,6	4
	3	14,25± 21,7	8,33± 18,6	10,24± 19,0	10,33± 19,2	60,25± 50,9	9
C ₂₈ OH	2	300,33± 101,2	330,07± 125,7	289,93± 125,1	352,96± 92,7	322,76± 104,9	4
	3	528,39± 316,1	475,40± 249,5	525,55± 313,6	388,69± 286,6	501,25± 344,1	9
C ₃₀ OH	2	130,49± 79,35	206,23± 77,26	108,77± 50,37	110,89± 42,16	114,64± 42,79	4
	3	199,95± 122,4	185,68± 103,1	205,16± 109,2	185,61± 97,3	202,04± 93,4	9

Tratamento 2: 4Kg de Bolota + 200g de Luzerna; **Tratamento 3:** 4Kg de Bolota + 400g de Luzerna