

# Índice

Resumo .....	III
Abstract .....	IV
Índice de Figuras .....	V
Índice de Tabelas .....	VII
Índice de Equações .....	IX
Índice de Gráficos .....	X
Agradecimentos .....	XI
1 - Introdução .....	1
2 – Revisão Bibliográfica .....	3
2.1 – O Porco de Raça Alentejana .....	3
2.1.1 – Enquadramento Histórico .....	3
2.1.2 - Breve Caracterização da Raça .....	5
2.2 – O montado Alentejano .....	6
2.2.1 – Recursos Alimentares .....	6
2.2.2 – Sistema de Produção Tradicional: Montanheira .....	9
2.3 – Ingestão .....	10
2.3.1 – Determinação da Produção Fecal .....	12
2.3.2 – Determinação da Digestibilidade da Dieta .....	15
2.3.2.1 – Método “ <i>In Vitro</i> ”.....	15
2.3.2.2 – Utilização de Marcadores Internos .....	16
2.4 – Constituintes das Ceras Cuticulares das plantas .....	17
2.4.1 – Utilização como Marcadores de Digestibilidade .....	18
2.4.1.1 – Os N-Alcanos .....	18
2.4.1.2 – Os Álcoois de Cadeia Longa .....	24
2.4.2 – Estimativa da Composição da Dieta .....	26
3 – Materiais e Métodos .....	29
3.1 – Ensaio <i>In Vivo</i> .....	29
3.1.1 – Animais e Alojamento .....	29
3.1.2 – Distribuição de Alimentos .....	29
3.1.3 – Distribuição Cronológica .....	31

3.1.4 – Preparação dos Bolos com Alcanos .....	32
3.1.5 – Preparação de Amostras .....	32
3.2 – Análises Laboratorial .....	33
3.2.1 – Determinação da Matéria Seca .....	34
3.2.2 – Alcanos e Álcoois de Cadeia Longa .....	34
3.2.2.1 – Extração .....	34
3.2.2.2 – Preparação de Reagentes e Padrões .....	37
3.2.2.3 – Separação, Identificação e Quantificação .....	39
3.3 – Equações Utilizadas .....	43
3.3.1 – Cálculo das Concentrações dos N-Alcanos .....	43
3.3.2 – Cálculo das Concentrações dos Álcoois de Cadeia Longa .....	43
3.3.3 – Cálculo da Digestibilidade e da Recuperação Fecal .....	44
3.4 – Análise Estatística .....	44
4 – Resultados e Discussão .....	46
4.1 – Alimentos .....	46
4.2 – Refugos Alimentares .....	50
4.3 – Variação da Concentração Fecal dos Alcanos Externos (C <sub>32</sub> e C <sub>36</sub> ) após o seu Doseamento aos Animais .....	53
4.4 – Variação da Concentração Fecal dos Alcanos Internos (alcanos ímpares) .....	56
4.5 – Variação da Concentração Fecal dos Álcoois de Cadeia Longa ao longo dos Dias .....	57
4.6 – Variação Diurna da Concentração Fecal dos N-Alcanos e dos Álcoois de Cadeia Longa .....	60
4.6.1 – Variação Diurna da Concentração Fecal dos N-Alcanos .....	61
4.6.2 – Variação Diurna da Concentração Fecal dos Álcoois de cadeia Longa .....	63
4.7 – Recuperação Fecal dos N-Alcanos .....	65
5 – Conclusões .....	69
6 – Referências Bibliográficas .....	71
7 – Anexos .....	77

## **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 n-alcenos e os álcoois de cadeia longa presentes nas plantas têm sido utilizados com sucesso como marcadores fecais para estimar a ingestão e a digestibilidade em ruminantes. Em porcos Alentejanos existem poucos trabalhos.

Para caracterizar a excreção de alcenos e álcoois em porcos Alentejanos analisaram-se amostras recolhidas num ensaio em caixas metabólicas, com nove animais, submetidos a três tratamentos, compostos por bolota ou adicionalmente luzerna, e receberam, duas vezes por dia, bolos com C<sub>32</sub> e C<sub>36</sub>, 50mg cada. Recolheram-se as fezes desde o 1º dia de administração de alcenos, para determinar o perfil de excreção dos marcadores. Para a variação diurna recolheram-se fezes cinco vezes por dia, durante três dias.

Ao 3º dia atingiu-se a estabilização da excreção dos n-alcenos. Não houve variações entre dias nos alcenos internos e nos álcoois, nem variações diurnas.

As recuperações fecais dos C<sub>32</sub> e C<sub>36</sub> aproximaram-se de 100%, nos restantes alcenos variaram entre 20,1% (C<sub>25</sub>) e 59,9% (C<sub>28</sub>).

## **Contribution to the validation of use of cuticular wax constituents of plants as markers to estimate intake in Alentejo pigs: characterization of the excretion of n-alkanes and long chain alcohols in Alentejano pigs**

N-alkanes and long chain alcohols present in plants have been successfully used as faecal markers for estimating intake and digestibility in ruminants. Never the less, only a few studies exist for pigs, especially for the Alentejo pig.

To characterize the excretion of alkanes and alcohols in Alentejano pigs, the samples collected from nine Alentejano pigs in metabolic crates were analyzed. These pigs underwent three different treatments (based on acorn or acorn and lucerne) and were given cakes with  $C_{32}$  e  $C_{36}$ , 50mg each twice a day. Feces were collected at the first day of administration of n-alkanes, for determining the profile of excretion of markers. For the diurnal variation, feces were collected five times a day, during three days.

The stabilization of excretion of n-alkanes was reached at day 3. No diurnal or between days variations were observed for internal alkanes and alcohols.

The fecal recoveries of  $C_{32}$  and  $C_{36}$  were close to 100% and the remaining alkanes ranged from 20,1% ( $C_{25}$ ) to 59,9% ( $C_{28}$ ).

## Índice de Figuras

<b>Figura 2.1:</b> Evolução do número de leitões inscritos no livro de nascimentos .....	4
<b>Figura 2.2:</b> Composição Química da Bolota e da Lande (%) .....	8
<b>Figura 2.3:</b> Esquema da exploração tradicional de porco de raça Alentejana .....	9
<b>Figura 2.4:</b> Recuperações fecais dos álcoois de cadeia longa (C <sub>22</sub> OH até C <sub>30</sub> OH) ...	25
<b>Figura 2.5:</b> Componentes básicos de um cromatógrafo gasoso .....	29
<b>Figura 2.6:</b> Esquema representativo de um cromatograma .....	30
<b>Figura 3.1:</b> Sequência das análises laboratoriais efectuadas .....	33
<b>Figura 3.2:</b> Ordem de injeção de padrões externos (P) e amostras (a) de alcanos, no Cromatógrafo Gasoso .....	40
<b>Figura 3.3:</b> Ordem de injeção de padrões externos (P1 e P2) e amostras (a) de álcoois de cadeia longa, no Cromatógrafo Gasoso .....	41
<b>Figura 3.4:</b> Esquema dos locais de passagem das amostras pelo Cromatógrafo Gasoso .....	41
<b>Figura 3.5:</b> Observação dos picos de um álcool de cadeia longa no decorrer da sua passagem pelo cromatógrafo gasoso .....	41
<b>Figura 3.6:</b> Ilustração da utilização dos compostos do Padrão Externo para identificar os n-alcanos de uma amostra em estudo .....	42
<b>Figura 4.1:</b> Cromatograma de n-alcanos para uma amostra de bolota inteira .....	47
<b>Figura 4.2:</b> Cromatograma de álcoois de cadeia longa para uma amostra de bolota inteira.....	49
<b>Figura 4.3:</b> Cromatograma de n-alcanos para uma amostra de alimentos refugados.....	51
<b>Figura 4.4:</b> Cromatograma de n-alcanos para uma amostra de alimentos refugados.....	52

<b>Figura 4.5:</b> Cromatograma de n-alcenos para uma amostra de fezes colhida no dia um do 1º Período.....	56
<b>Figura 4.6:</b> 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.....	59
<b>Figura 4.7:</b> Cromatograma do Padrão Externo 2 com os álcoois C <sub>19</sub> OH, C <sub>20</sub> OH, C <sub>21</sub> OH, C <sub>22</sub> OH e C <sub>27</sub> OH.....	63
<b>Figura 4.8:</b> Cromatograma de n-alcenos para uma amostra de fezes na segunda colheita do dia.....	65
<b>Figura 4.9:</b> Cromatograma de álcoois de cadeia longa para uma amostra de fezes na quinta colheita do dia.....	67

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 2.1:</b> Produtos de Porco Alentejano certificados .....	4
<b>Tabela 2.2:</b> Composição química da bolota em diferentes épocas de colheita (resultados expressos em percentagem de Matéria Seca) .....	7
<b>Tabela 2.3:</b> Composição química da erva nas épocas de maior disponibilidade de bolota .....	8
<b>Tabela 2.4:</b> Diferentes marcadores fecais utilizados na estimativa da excreção fecal em herbívoros .....	14
<b>Tabela 2.5:</b> Diferentes marcadores internos utilizados na estimativa digestibilidade em herbívoros .....	17
<b>Tabela 2.6:</b> Componentes comuns da cera cuticular insaponificada das plantas .....	18
<b>Tabela 2.7:</b> Concentrações de n-alcenos e de álcoois de cadeia longa na cera cuticular em diferentes espécies vegetais (mg/kg MS) .....	20
<b>Tabela 2.8:</b> Concentrações médias dos n-alcenos constituintes da erva e bolota (mg/kg MS) .....	21
<b>Tabela 2.9:</b> Percentagens médias de recuperação fecal dos n-alcenos de cadeia ímpar e de cadeia par, em porcos de raça Alentejana (%) .....	23
<b>Tabela 2.10:</b> Concentrações médias dos álcoois de cadeia longa presentes na bolota e na luzerna (mg/kg MS) .....	25
<b>Tabela 2.11:</b> Recuperações fecais médias dos álcoois de cadeia longa em porcos de raça Alentejana (%) .....	26
<b>Tabela 3.1:</b> Esquema de regimes alimentares .....	30
<b>Tabela 3.2:</b> Resumo dos tempos de adaptação, recolha de fezes e de fornecimento de alcenos, em cada período .....	31
<b>Tabela 3.3:</b> Concentrações dos padrões internos dos n-alcenos sintéticos (mg de alceno sintético/g de decano) .....	35

<b>Tabela 3.4:</b> Concentrações dos padrões internos do álcool de cadeia longa C <sub>27</sub> -OH (mg de álcool/g de heptano:etanol) .....	35
<b>Tabela 3.5:</b> Concentrações dos padrões externos nos n-alcenos, diluição 10x (mg/l) .....	38
<b>Tabela 3.6:</b> Concentrações dos padrões externos nos álcoois de cadeia longa, diluição 5x (mg/l) .....	39
<b>Tabela 4.1:</b> Concentrações médias nos alimentos fornecidos aos animais de n-alcenos ± desvio padrão (mg/kg MS).....	46
<b>Tabela 4.2:</b> Concentrações médias de álcoois de cadeia longa ± desvio padrão (mg/kg MS) nos alimentos.....	48
<b>Tabela 4.3:</b> Concentração média dos n-alcenos ± desvio padrão das amostras de refugos colhidas, por cada tratamento (mg/kg MS).....	50
<b>Tabela 4.4:</b> Concentração média dos álcoois de cadeia longa ± desvio padrão nas amostras de refugos colhidas, por cada tratamento (mg/kg MS).....	52
<b>Tabela 4.5:</b> Concentração média dos álcoois de cadeia longa (mg/kg MS), em cada tratamento.....	58
<b>Tabela 4.6:</b> Concentração média dos n-alcenos presentes nas fezes totais (mg/kg MS), em cada tratamento.....	65
<b>Tabela 4.7:</b> Recuperação fecal média dos n-alcenos nos diferentes tratamentos (%).....	66
<b>Tabela 4.8:</b> Recuperação fecal média dos n-alcenos (%).....	67



## Índice de Equações

<b>Equação 2.1:</b> Estimativa da Ingestão (Kg MS) .....	12
<b>Equação 2.2:</b> Estimativa da Produção Fecal (Kg MS/dia) .....	12
<b>Equação 2.3:</b> Estimativa da Digestibilidade .....	15
<b>Equação 2.4:</b> Estimativa da Digestibilidade com Marcadores Internos (%) .....	16
<b>Equação 2.5:</b> Estimativa da Recuperação Fecal (%) .....	21
<b>Equação 2.6:</b> Estimativa da Ingestão utilizando a técnica dos n-alcanos (Kg MS/dia) .....	22
<b>Equação 2.7:</b> Determinação de diferentes componentes da dieta através da concentração de n-alcanos presentes na dieta .....	27
<b>Equação 3.1:</b> Cálculo do teor em Matéria Seca (%) .....	34
<b>Equação 3.2</b> Cálculo da área dos n-alcanos (%) .....	43
<b>Equação 3.3</b> Cálculo do Factor Resposta dos n-alcanos .....	43
<b>Equação 3.4</b> Cálculo do Factor de Fraccionamento do alcano C <sub>22</sub> .....	43
<b>Equação 3.5</b> Cálculo do Factor de Fraccionamento para os restantes n-alcanos .....	43
<b>Equação 3.6</b> Cálculo da Concentração dos n-alcanos (mg/kg MS) .....	43
<b>Equação 3.7</b> Cálculo da área dos álcoois de cadeia longa (%) .....	43
<b>Equação 3.8</b> Cálculo do Factor de Resposta dos álcoois de cadeia longa .....	44
<b>Equação 3.9</b> Cálculo da concentração dos álcoois de cadeia longa (mg/Kg MS) .....	44
<b>Equação 3.10:</b> Cálculo da Recuperação Fecal dos n-alcanos e dos álcoois de cadeia longa (%) .....	44

## Índice de Gráficos

<b>Gráfico 4.1:</b> Concentração Fecal média (três tratamentos) dos alcanos $C_{32}$ e $C_{36}$ ao longo dos dias, no 1ºPeríodo (mg/kg MS) .....	54
<b>Gráfico 4.2:</b> Concentração Fecal média dos alcanos $C_{32}$ e $C_{36}$ ao longo dos dias no tratamento 1 (4kg bolota), no 2ºPeríodo (mg/kg MS) .....	54
<b>Gráfico 4.3:</b> 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) .....	55
<b>Gráfico 4.4:</b> 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) .....	55
<b>Gráfico 4.5:</b> Concentração Fecal média dos alcanos internos ( $C_{23}$ , $C_{25}$ , $C_{27}$ , $C_{29}$ , $C_{31}$ , $C_{33}$ e $C_{35}$ ) no 1ºPeríodo (mg/kg MS) .....	57
<b>Gráfico 4.6:</b> Concentração Fecal média dos álcoois $C_{26}OH$ e $C_{28}OH$ ao longo dos dias, no 1ºPeríodo (mg/kg MS) .....	59
<b>Gráfico 4.7:</b> Concentração Fecal média (três tratamentos) dos alcanos $C_{32}$ e $C_{36}$ em diferentes momentos do dia, no 1ºPeríodo (mg/kg MS) .....	61
<b>Gráfico 4.8:</b> Concentração Fecal média do alcano $C_{29}$ ao longo do dia (mg/kg MS) ..	62
<b>Gráfico 4.9:</b> Concentração Fecal média dos alcanos $C_{23}$ , $C_{30}$ , $C_{33}$ , e $C_{35}$ ao longo do dia (mg/kg MS) .....	62
<b>Gráfico 4.10:</b> 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) .....	64

## **Agradecimentos**

Este espaço é dedicado àqueles que deram a sua contribuição para que esta dissertação fosse realizada.

À minha família, em especial à mãe, ao pai e ao Miguel, pelo carinho, compreensão, apoio e incentivo que me deram ao longo dos anos. Sem a ajuda deles tudo teria sido impossível.

À minha amiga Sara, que desde sempre se prontificou para me apoiar em todo o tipo de situações desde que nos conhecemos, especialmente nas mais delicadas, tendo sempre presente a nossa amizade acima de tudo.

À professora Isabel Ferraz de Oliveira e ao professor Manuel Cancela d'Abreu, pela orientação, informação e disponibilidade oferecidas durante o tempo de execução deste trabalho. Ao professor Amadeu Freitas e à colega Cláudia Gomes pela disponibilização de artigos e estudos relacionados com o tema da minha tese. Ao professor Paulo Infante pelo seu auxílio na análise estatística.

À Eng.<sup>a</sup> Graça Machado, à D. Margarida Romão e, mais uma vez, à professora Isabel Ferraz de Oliveira pela ajuda e instrução no laboratório de Nutrição Animal.

Aos professores que tive durante a licenciatura e o mestrado, que contribuíram para o meu desenvolvimento académico e pessoal, em especial aos professores do departamento de Zootecnia da Universidade de Évora.

Aos colegas e amigos que de alguma forma marcaram o meu percurso académico, particularmente à Sara Garcia e ao Hugo Paixim, à Liliana Santos, à Filipa Viegas, ao Mauro Soares, ao Rui Isabel, ao José Cesteiro, ao Manuel Burnay, à Ana Raimundo, à Raquel Cortesão, à Teresa Marques e à Pilar Lázaro, porque sem eles tudo teria sido mais complicado. Por fim, ao Orlando pelo afecto e estímulo nos momentos de desânimo.

A todos deixo aqui o meu mais sincero agradecimento.