

# Estudo para a validação da técnica dos n-alcenos para estimativa da ingestão e da digestibilidade em porcos Alentejanos

## Study for the validation of the n-alkane technique to estimate feed intake and digestibility in Alentejano pigs

T. Ribeiro<sup>1</sup>, M. I. Ferraz-de-Oliveira<sup>2</sup>, C. Mendes<sup>3</sup> & M. C. d'Abreu<sup>3</sup>

### RESUMO

Os n-alcenos presentes na cutícula das plantas têm sido utilizados com sucesso como marcadores fecais para a estimar a ingestão e a digestibilidade dos alimentos em ruminantes. Em porcos, existem poucos trabalhos publicados referentes à utilização da técnica dos n-alcenos, particularmente em suínos de raça Alentejana.

Este trabalho teve como objectivo a validação da técnica dos n-alcenos para a estimativa da ingestão e digestibilidade dos alimentos em porcos de raça Alentejana. Para tal, realizou-se um ensaio em caixas metabólicas, numa sala de ambiente controlado, com 8 porcos alentejanos, machos, com peso médio de cerca de 58 kg.

Foi fornecida uma dieta, composta por 3 kg de bolota e 400 g de erva, distribuída em duas refeições diárias. Os animais foram aleatoriamente distribuídos por 2 grupos de 4 animais cada. Aos animais do grupo 1 foi fornecido um bolinho por dia, contendo 100 mg de C<sub>32</sub> e 150 mg de C<sub>36</sub> e aos animais do grupo 2, 2 bolinhos por dia contendo 50 mg de C<sub>32</sub> e 75 mg de C<sub>36</sub>.

Foram feitas recolhas de fezes para amostragem a partir do primeiro dia de administração dos n-alcenos, durante 10 dias, para determinação do perfil de excreção dos marcadores; recolhas de fezes *per rectum*, de 4 em 4 horas, durante 3 dias para determinar a variação diurna da concentração fecal dos n-alcenos, e recolhas das fezes totais, durante 5 dias, para determinar as recuperações dos n-alcenos.

A estabilização da excreção dos n-alcenos foi atingida no 5º dia após o primeiro dia de administração. Não se verificaram variações diurnas das concentrações fecais dos n-alcenos pares e ímpares, pelo que em condições semelhantes às do presente ensaio, as estimativas de ingestão e digestibilidade poderão ser baseadas em apenas uma colheita diária de amostra de fezes.

As recuperações fecais dos C<sub>32</sub> e C<sub>36</sub> foram de 106,8% e 110,0%, e as dos C<sub>27</sub>, C<sub>29</sub> e C<sub>31</sub> de 75,1%, 133,9% e 91,5%, respectivamente. Dado o elevado erro padrão das médias (10,7), aquelas taxas de recuperação não foram significativamente ( $P \geq 0,05$ ) diferentes.

<sup>1</sup> Rua do Sarra, nº1 esq, 2580-503 Carregado; <sup>2</sup> Instituto de Ciências Agrárias Mediterrânicas (ICAM), Universidade de Évora, Pólo da Mitra, Apartado 94, 7002-554 Évora; email: [mifo@uevora.pt](mailto:mifo@uevora.pt); <sup>3</sup> Departamento de Zootecnia, Universidade de Évora

## ABSTRACT

The plant epicuticular n-alkanes have been used with success as faecal markers for the estimation of intake and digestibility in ruminants, but few reports have been published with pigs, particularly, "Alentejano" pigs.

The aim of this experiment is to validate the n-alkanes technique for the estimation of diet intake and digestibility in pigs of the "Alentejano" breed. An experiment was carried out with eight male "Alentejano" pigs (average LW 58 kg), housed in metabolic cages, in a controlled environment room.

The animals were given a diet composed by 3kg of acorns and 400 g of grass per day, distributed into two meals (9:30 am and 5:30 pm). The animals were randomly distributed in two groups of four animals each. Animals in group 1 received one small cake per day containing 100 mg of C<sub>32</sub> and 150 mg of C<sub>36</sub> and in group 2 received two small cakes per day containing 50 mg of C<sub>32</sub> and 75 mg of C<sub>36</sub>.

Faecal samples were collected daily, for ten days, from the first day of alkanes administration, to determine the pattern of excretion of the markers. Also *per rectum* faecal samples were taken, every four hours, during three days, to determine daily variation of faecal n-alkanes concentration. Moreover, total faecal collection was carried out, for 5 days, to determine faecal n-alkane recoveries.

The faecal excretion of the artificial n-alkanes stabilized on the fifth day after the first dosing of the alkanes. No daily variation was observed in the faecal concentrations of even-chain and odd chain n-alkanes, therefore indicating that, in similar experimental conditions, intake and digestibility estimates can be based upon only one daily faecal sample collection.

The C<sub>32</sub> and C<sub>36</sub> recoveries were 107% and 110% respectively and those of C<sub>27</sub>, the

C<sub>29</sub>, the C<sub>31</sub> were 75,1% 133,9% and 91,5% respectively. Given the high mean standard error (10,7) obtained, those recoveries were not significantly (P>0,05) different.

## INTRODUÇÃO

Em Portugal, a produção de Porco Alentejano assenta num sistema tradicional de exploração – a Montanha – que funciona como um elemento de valorização do produto final.

A falta de informação relativamente à ingestão e digestibilidade dos alimentos em Montanha constitui uma lacuna importante para o conhecimento do sistema, dado não ter havido validação de metodologias para a sua medição nas condições prevalentes em Montanha. A técnica dos n-alcenos tem sido extensivamente utilizada em ruminantes (Oliván & Osoro, 1997), e em menor escala em porcos (Sehested *et al.*, 1999), para a estimativa da ingestão e digestibilidade dos alimentos.

Os n-alcenos são hidrocarbonetos constituintes das ceras epicuticulares das plantas, de tamanho de cadeia variável e específica para cada espécie vegetal. A técnica dos n-alcenos, permite potencialmente ultrapassar desvantagens inerentes a outras técnicas: permite estimar a ingestão e digestibilidade em sistemas extensivos, utilizar os mesmos marcadores para a estimativa da ingestão e da digestibilidade, reduzindo o trabalho laboratorial e analítico, e estimar individualmente a ingestão e a digestibilidade (Oliván, *et al.*, 1999). Apesar desta metodologia ter sido ensaiada em várias experiências em ruminantes, existem muito poucos resultados publicados em suínos e em particular em suínos de raça Alentejana, tornando este tema importante para o futuro da produção suína em extensivo em Portugal.

Com este ensaio pretendeu-se validar a

técnica dos n-alcanos para a estimativa, em porcos de raça Alentejana, da ingestão e da digestibilidade da erva e da bolota.

## MATERIAL E MÉTODOS

Oito porcos alentejanos, com peso vivo médio de 58 kg, foram colocados em caixas metabólicas numa sala de ambiente controlado. Os animais foram alimentados com pastagem natural previamente colhida, trachada e congelada, e com bolota de azinho apanhada do chão entre os meses de Novembro e Dezembro, e igualmente congelada. Os alimentos foram descongelados 24 horas antes de serem distribuídos. O ensaio decorreu em 3 fases. Na primeira fase – período de pré-adaptação, 13 dias – os 8 animais, em conjunto, receberam 1 kg de alimento composto comercial e 0,5 kg de bolota por animal por dia. Seguiu-se um período de 15 dias de adaptação nas caixas metabólicas, em que foram oferecidas 2 refeições diárias (9:30 h e 17:30 h), sendo cada uma constituída por 200 g de erva e 1,5 kg de bolota. Nos últimos 3 dias deste período, procedeu-se à adaptação dos animais a bolinhos de 20 g, compostos por farinha de milho e melaço de cana, na proporção de 190 g de farinha para 210 g de melaço, fornecidos imediatamente antes da distribuição da refeição. Seguiu-se um período experimental de 10 dias em que os animais foram aleatoriamente distribuídos por dois grupos. O grupo 1 recebeu, antes da refeição da manhã, um bolinho por dia, contendo 100 mg de  $C_{32}$  e 150 mg de  $C_{36}$ . O grupo 2 recebeu 2 bolinhos por dia, contendo 50 mg de  $C_{32}$  e 75 mg de  $C_{36}$  por bolinho, fornecidos antes das refeições da manhã e da tarde. Os n-alcanos sintéticos foram incorporados nos bolinhos em substituição de igual quantidade de melaço. Durante o período experimental foram colhidas dia-

riamente (9:30 h) amostras de fezes para determinação do nível de excreção dos n-alcanos. Nos últimos 5 dias do período experimental foi feita a colheita total de fezes e, num sub-período de 3 dias, colheitas de amostras de fezes de 4 em 4 horas para avaliação da variação da concentração dos n-alcanos ao longo de um período de 24 horas. Todas as amostras de fezes foram congeladas para posterior análise. Durante os últimos 5 dias do período experimental foram colhidas amostras da erva e da bolota distribuídas e pesados os refugos individuais. Amostras e refugos foram congelados até ulterior análise.

As amostras de fezes foram liofilizadas, e as de alimento e os refugos desidratados em estufa a 65 °C, e posteriormente moídos (crivo de 1 mm). Todas as amostras (fezes, alimento e refugos) foram sujeitas à extração e doseamento de n-alcanos por cromatografia gasosa (Dove & Mayes, 2003). Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância (STATISTICA™ versão 6.0, Statsoft®) utilizando análise factorial em que os factores considerados foram os tratamentos (uma ou duas administrações por dia da mesma dose de n-alcanos), o factor dia após a primeira administração dos n-alcanos (dias 1 a 10) e a hora do dia (6, num intervalo de 24 horas). Para o tratamento dos resultados obtidos para as recuperações fecais, os factores considerados foram o tratamento e o comprimento da cadeia dos n-alcanos em estudo. Quando não se observou qualquer efeito do factor tratamento ou da interacção de dois factores, foi feita uma análise de variância a um só factor. A comparação de médias foi feita utilizando o teste LSD (Least significant difference).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No decorrer do período de adaptação

foi eliminado um animal do grupo 1, por doença. Nos resultados obtidos em relação às concentrações fecais dos n-alcenos administrados ao grupo 2 não foi considerado um animal porque sistematicamente não ingeriu o bolinho com n-alcenos.

### Alimentos

As concentrações de n-alcenos ( $\text{mg kg}^{-1}$  MS) na bolota e na erva distribuídas aos animais encontram-se no Quadro 1. As concentrações foram determinadas na casca, no miolo e na bolota inteira, dado os animais ingerirem essencialmente o miolo, deixando a casca como refugo.

Os n-alcenos ímpares existem em maior concentração do que os n-alcenos pares, tanto na erva como na bolota inteira, o que concorda com observações de outros autores (Tejeda *et al.*, 2001; Trigo, 2002). A concentração de n-alcenos na bolota é inferior à na erva, como já tinha sido demonstrado por Tejeda *et al.* (2001) e por Trigo (2002). Na bolota as concentrações mais elevadas de n-alcenos encontram-se na casca, o que não constitui surpresa, devido à presença de uma camada cerosa na superfície da sua casca. Os n-alcenos existentes em maior concentração na erva utilizada neste ensaio são o  $C_{29}$  e  $C_{31}$  e na bolota o  $C_{27}$  e o  $C_{29}$ . O  $C_{29}$  é o n-alceno presente em maior concentração tanto na casca como na bolota inteira. A concentração de n-alcenos na dieta oferecida é baixa devido à preponderância da bolota na mesma.

### Variação da Concentração Fecal dos n-alcenos

Não se tendo observado efeito significativo ( $P>0,05$ ) da frequência de administração diária (uma ou duas doses diárias) dos n-alcenos artificiais ( $C_{32}$  e  $C_{36}$ ), na sua concentração fecal, utilizaram-se os dados dos 7 animais como um grupo apenas. As concentrações de  $C_{32}$  e  $C_{36}$  nas fezes ao longo de 10 dias estão ilustradas no Figura 1.

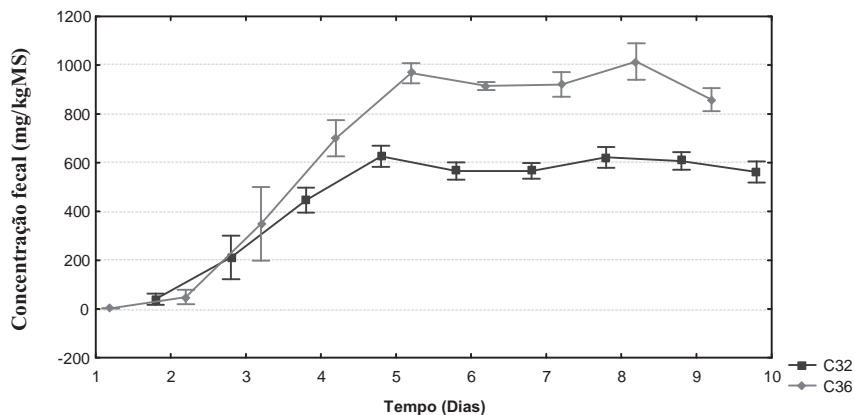
A partir do quinto dia de ensaio (Figura 1) foi atingido um nível de excreção fecal estável de  $C_{32}$  e  $C_{36}$ . O estado de equilíbrio foi atingido 2 dias mais cedo que o observado por Sehested *et al.* (1999), e 2 dias mais tarde que o registado por Trigo (2002). No entanto, no primeiro caso o nível de ingestão foi mais elevado, e no segundo mais baixo que o praticado no presente ensaio. O equilíbrio de excreção fecal pode estar associado, entre outros factores, ao nível de ingestão dos animais e também ao tipo de alimento fornecido, que foi diferente nas 3 situações aqui referidas.

### Variação da concentração fecal dos n-alcenos ao longo do dia

As concentrações do  $C_{32}$  e  $C_{36}$  nas amostras de fezes recolhidas de 4 em 4 horas, não variaram ( $P>0,05$ ), assim como as concentrações dos n-alcenos naturais  $C_{25}$ ,  $C_{27}$ ,  $C_{29}$ ,  $C_{31}$  e  $C_{33}$  (Quadro 2). Este facto sugere que os n-alcenos administrados têm um comportamento cinético

**QUADRO 1 – Concentração média dos n-alcenos constituintes da erva e bolota ( $\text{mg kg}^{-1}$  MS)**

Alimentos	Concentração de n-Alcenos ( $\text{mg/kgMS}$ )									
	$C_{25}$	$C_{27}$	$C_{28}$	$C_{29}$	$C_{30}$	$C_{31}$	$C_{32}$	$C_{33}$	$C_{35}$	$C_{36}$
Bolota Inteira	9,5	31,9	9,4	47,1	3,7	4,4	2,0	1,0	0,8	1,5
Casca Bolota	12,8	62,0	17,8	155,1	4,1	5,2	1,3	0,8	0,7	0,7
Miolo Bolota	5,4	5,5	4,5	4,7	3,1	1,9	1,2	0,7	0,2	0,6
Erva	15,5	37,8	9,9	176,7	13,0	231,1	9,3	39,6	1,8	7,6



**Figura 1** – Concentração Fecal de C<sub>32</sub> e C<sub>36</sub> durante 10 dias após o primeiro doseamento de alcanos (média ± EPM)

semelhante ao dos n-alcanos naturais da dieta, o que constitui uma condição fundamental para a obtenção de estimativas correctas da ingestão.

Estes resultados concordam com os de Ferraz de Oliveira *et al.* (2005), indicando que as estimativas de ingestão e de digestibilidade podem ser baseadas em apenas uma amostra de fezes colhida a qualquer hora do dia, em oposição à colheita total de fezes. No entanto, Sehested *et al.* (1999) num ensaio com porcas adultas, observaram alguma variação (não especificamente quantificada) ao longo do dia de todos os alcanos (pares e ímpares).

### Recuperação fecal dos n-alcanos

As recuperações fecais dos n-alcanos foram calculadas com base nas quantidades ingeridas através do miolo da bolota e da erva e nas quantidades excretadas nas fezes. Através da análise dos refugos, verificou-se que alguns animais não ingeriram erva e que os restantes a ingeriram em baixa quantidade e que o miolo da bolota foi todo ingerido, encontrando-se nos refugos apenas a casca. Os valores das recuperações fecais do C<sub>32</sub> e do C<sub>36</sub> e dos n-alcanos naturais ímpares são apresentados no Quadro 3. Não se observou qualquer relação entre o tamanho da cadeia

**QUADRO 2** – Concentração fecal média dos n-alcanos (mg kg<sup>-1</sup> MS), a várias horas do dia (média de 3 dias)

n-alcanos nas fezes	Hora						n	EPM	P
	9:30	13:30	17:30	21:30	1:30	5:30			
C <sub>25</sub>	9,3	9,8	10,6	10,7	10,2	11,1	7	0,47	0,112
C <sub>27</sub>	42,2	42,0	43,3	43,3	42,1	44,8	7	2,12	0,937
C <sub>29</sub>	91,8	94,4	83,5	83,5	86,1	96,3	7	4,54	0,284
C <sub>31</sub>	22,5	22,6	22,8	22,8	20,8	23,1	7	2,22	0,984
C <sub>32</sub>	639,4	577,5	629,7	629,7	648,6	636,6	6	36,34	0,694
C <sub>33</sub>	5,1	5,1	5,2	5,2	5,1	5,2	7	0,41	0,996
C <sub>36</sub>	974,8	906,5	969,1	969,1	1104,0	1035,2	6	50,79	0,066

**QUADRO 3 – Percentagens médias de recuperação fecal dos n-alcenos de cadeia ímpar e de cadeia par**

n-Alcano	C <sub>25</sub>	C <sub>27</sub>	C <sub>29</sub>	C <sub>31</sub>	C <sub>32</sub>	C <sub>33</sub>	C <sub>36</sub>	EPM
Recup. Fecal (%)	13,10 <sup>a</sup>	75,06 <sup>bc</sup>	133,91 <sup>c</sup>	91,45 <sup>bd</sup>	106,77 <sup>bc</sup>	56,81 <sup>c</sup>	109,95 <sup>cd</sup>	10,7

a-e Médias com letras diferentes correspondem a diferenças estatisticamente significativas ( $P \leq 0,05$ )

carbonada e as taxas de recuperação, ao contrário do observado por vários autores em estudos com ruminantes (Dove & Mayes, 1991). Wilson *et al.*, (1999) e Sehested *et al.*, (1999) também não observaram, em suínos, qualquer relação entre as recuperações fecais dos n-alcenos e o tamanho das suas cadeias carbonadas; pelo contrário, Ferraz de Oliveira *et al.* (2005) observaram, para os n-alcenos naturais ímpares, uma relação directa entre o tamanho da cadeia carbonada e os valores de recuperação fecal. As recuperações foram semelhantes ( $P > 0,05$ ) para os n-alcenos C<sub>27</sub>, C<sub>31</sub> e C<sub>32</sub>, para os C<sub>29</sub>, C<sub>32</sub> e C<sub>36</sub> e para os C<sub>31</sub>, C<sub>32</sub> e C<sub>36</sub>, embora com um erro padrão da média elevado (Quadro 3), o que se deveu à elevada variação observada entre animais. Os n-alcenos acima referidos apresentaram recuperações relativamente elevadas e não estatisticamente diferentes (dado o elevado erro padrão das médias), sugerindo a viabilidade da sua utilização como marcadores para estimar a ingestão e a digestibilidade da erva e da bolota (Mayes *et al.*, 1988) tanto mais que as recuperações dos n-alcenos sintéticos e naturais não foram significativamente diferentes.

## CONCLUSÕES

A frequência de administração (1 ou 2 vezes por dia) não afectou as concentrações fecais dos n-alcenos administrados, sugerindo a possibilidade de administração de apenas uma dose por dia daqueles marcadores aos animais explorados em

campo, facilitando todos os processos de manejo inerentes.

A excreção dos n-alcenos sintéticos (C<sub>32</sub> e C<sub>36</sub>), estabilizou cinco dias após a primeira administração. Sugere-se assim que a amostragem de fezes para estimativas de ingestão e digestibilidade seja feita a partir do quinto dia após o início da administração daqueles marcadores. A baixa variação ( $P > 0,05$ ), ao longo de 24 horas, nas concentrações fecais dos n-alcenos administrados sugere que as estimativas de ingestão e digestibilidade pela técnica dos n-alcenos, podem ser baseadas apenas numa colheita de fezes isolada. De acordo com as recuperações fecais observadas neste ensaio, os pares de n-alcenos que melhor permitirão estimar a ingestão e a digestibilidade da dieta são os C<sub>31</sub>/C<sub>32</sub>, C<sub>29</sub>/C<sub>36</sub> e C<sub>29</sub>/C<sub>32</sub> visto que os n-alcenos que os constituem têm recuperações fecais elevadas e próximas entre si.

Atendendo a que a bolota tem muito baixas concentrações de n-alcenos, e que esta pode constituir a maior parte da dieta ingerida pelo porco Alentejano em montanha importa aprofundar este tipo de estudos, nomeadamente ao nível da identificação de outros tipos de marcadores que nela possam estar mais representados.

## AGRADECIMENTOS

A autora M. I. Ferraz de Oliveira agradece a bolsa de Pós doutoramento (SFRH/BPD/5646/2001) concedida pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Dove, H. & Mayes, R.W. 1991 The use of plant wax alkanes as marker substances in studies of the nutrition of herbivores: a review. *Australian Journal of Agricultural Research*, **42**: 913-952
- Dove, H. & Mayes, R.W. 2003. *Satellite meeting: wild and domestic herbivore diet characterization of the 6th International Symposium on Nutrition of Herbivores*, pp. 1-88 Mérida, Yucatán, México.
- Ferraz de Oliveira, M. I., Trigo, A. P., Neves, J. A. & Cancela d'Abreu, M. 2005 Validation of the n-alkane 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 assesment of intake, digestibility and the roles of secondary compounds*. Nottingham University Press, UK.
- Mayes, R. W., Lamb, C. S. & Colgrove, P. M. 1988 Digestion and metabolism of dosed even-chain and herbage odd-chain n-alkanes in sheep. *Proceedings of XIIth General Meeting of the European Grassland Federation*, pp. 159-163.
- Oliván, M. & Osoro, K. 1997. Utilización da la técnica de los n-alcános en estudios de ingestión y selección de dieta de los rumiantes en pastoreo: revisión. *Itea*, **93A**: 193-208.
- Oliván, M., Dove, H., Mayes, R. W. & Hoebee, S. E. 1999. Other plant wax components to estimate intake and diet composition in herbivores. *Revista Portuguesa de Zootecnia*, **6**: 1-26.
- Sehested, J, Breinhild, K., Soegan, K., Vognsen, L., Hansen, H., Fernandez, J., Danielsen, V. & Kristensen, V. 1999. Use of n-alkanes to estimate grass intake and digestibility in sows. In: H. Dove & S. W. Coleman (eds) *Emerging techniques for studying the Nutritional Status of free-ranging herbivores*. Satellite Meeting of the Vth International Symposium on the Nutrition of Herbivores, San Antonio, Texas. (CD-ROM)
- Tejeda, J. F., Garcia, C., Petró, M. J., Andrés, A. I. & 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-alcános para a estimativa da ingestão e digestibilidade de bolota e erva em porcos alentejanos*. Tese de Mestrado. Universidade Técnica de Lisboa.
- Wilson, H., Sinclair, A. G., Hovell, D., Mayes, R. W. & Edwards, S.A. 1999 Validation of the n-alkane technique for measuring herbage intake in sows. *Proceedings of the British Society of Animal Science*, pp.177. UK.