

## Potencial Discriminatório dos *N*-alcanos em Plantas Forrageiras Tropicais por Análises Multivariadas<sup>1</sup>

Cristiano Côrtes<sup>2</sup>, Júlio César Damasceno<sup>3</sup>, Nelson Massaru Fukumoto<sup>2</sup>, Eduardo Shiguero Sakaguti<sup>3</sup>, Geraldo Tadeu dos Santos<sup>3</sup>, Claudete Regina Alcalde<sup>3</sup>

**RESUMO** - O potencial dos *n*-alcanos em discriminar frações ou espécies de gramíneas (*Brachiaria brizantha* Stapf. cv. Marandu, *Cynodon dactylon* Pers. cv. Coast-cross 1 e *Panicum maximum* Jacq. cv. Tanzânia 1) e leguminosas tropicais (*Arachis pintoi* Koprov & Gregory. cv. Amarillo e *Glycine wightii* Verdc. Soja Perene) foi avaliado neste estudo. As forrageiras foram amostradas na primavera, no verão e inverno, com quatro repetições por espécie. Utilizaram-se nas análises os *n*-alcanos C<sub>24</sub> a C<sub>35</sub>, sendo o C<sub>32</sub> e C<sub>34</sub> padrões internos. As concentrações dos *n*-alcanos nas diferentes espécies e respectivas frações (lâminas foliares, haste porções superior e inferior e matéria morta, para gramíneas; folhas, caule porções superior e inferior e matéria morta para leguminosas) foram avaliadas mediante análises multivariadas. O potencial discriminatório dos *n*-alcanos foi determinado pela análise de variáveis canônicas. As espécies e frações foram divididas em grupos por meio da análise de agrupamento. Os alcanos com menor potencial discriminatório foram: C<sub>26</sub>, C<sub>29</sub>, C<sub>25</sub>, C<sub>27</sub> e C<sub>28</sub> (primavera), C<sub>26</sub>, C<sub>28</sub>, C<sub>27</sub>, C<sub>30</sub> e C<sub>29</sub> (verão) e C<sub>28</sub>, C<sub>26</sub>, C<sub>25</sub>, C<sub>29</sub> e C<sub>27</sub> (inverno). Nos períodos de primavera e inverno, a técnica de *n*-alcanos permitiu distinguir a lâmina foliar do *coastcross* das hastes superior e inferior, bem como das gramíneas e leguminosas. Em pastagens exclusivas de *Brachiaria brizantha*, no período de verão, seria possível discriminar as frações de importância nutricional, lâmina foliar e haste superior, pela determinação dos *n*-alcanos. As análises multivariadas, as variáveis canônicas e a análise de agrupamento representam boas alternativas de cálculo para melhorar a aplicabilidade da técnica dos *n*-alcanos na discriminação das dietas de herbívoros.

Palavras-chave: análise de agrupamento, discriminação de dietas, indicadores, nutrição de ruminantes, variáveis canônicas

## Discriminatory Potential of the *N*-alkanes in Tropical Forages by Multivariate Analysis

**ABSTRACT** - The discriminatory potential of *n*-alkanes in tropical grasses (*Brachiaria brizantha* Stapf. cv. Marandu, *Cynodon dactylon* Pers. cv. Coast-cross 1 and *Panicum maximum* Jacq. cv. Tanzânia 1) and legumes (*Arachis pintoi* Koprov & Gregory. cv. Amarillo and *Glycine wightii* Verdc.) was evaluated. The forages were sampled in Spring, Summer and Winter, with four replications per species per season. The *n*-alkanes C<sub>24</sub> to C<sub>35</sub>, using C<sub>32</sub> and C<sub>34</sub> as internal markers, were considered in the analyses. Concentrations of *n*-alkanes in these species and their respective fractions (leaf blade, top and bottom portions of the stem and dead matter for grasses; leaves, top and bottom of stem and dead matter for legumes) were evaluated by multivariate analysis. The discriminatory potential of *n*-alkanes was determined by the canonical variables analysis. The species and their respective fractions were divided into groups by cluster analysis. *N*-alkanes with the smallest potential discriminatory potential were: C<sub>26</sub>, C<sub>29</sub>, C<sub>25</sub>, C<sub>27</sub> and C<sub>28</sub> (spring), C<sub>26</sub>, C<sub>28</sub>, C<sub>27</sub>, C<sub>30</sub> and C<sub>29</sub> (summer) and C<sub>28</sub>, C<sub>26</sub>, C<sub>25</sub>, C<sub>29</sub> and C<sub>27</sub> (winter). The *n*-alkanes in the spring and winter samples allowed discrimination of Coast-cross leaf blade from the top and bottom stems portions of this grass and between grass and legumes. It was possible to discriminate fractions of nutritional importance of *Brachiaria brizantha*, leaf blade and higher portion of stem in the summer. The multivariate analysis, the canonical variables and the cluster analysis are good procedures to be used in *n*-alkanes studies for herbivores diets discriminating.

Key Words: canonical variables, cluster analysis, composition of diets, markers, ruminates nutrition

### Introdução

A composição da forragem pode ser tão importante quanto a quantidade consumida (Chen et al., 1999), uma vez que altas ingestões de determinadas espécies ou frações de plantas, comparadas a outras, têm

efeito não apenas sobre o aporte nutricional dos animais, como também sobre a estabilidade da composição das espécies e a reciclagem de nutrientes no sistema solo-planta-animal. Portanto, dispor de técnicas acuradas para estimar os componentes das dietas é fundamental na condução de experimentos com

<sup>1</sup> Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor apresentada à Universidade Estadual de Maringá (UEM). Pesquisa financiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa (CNPq).

<sup>2</sup> Doutorandos em Zootecnia – Área de Concentração Produção Animal – Departamento de Zootecnia (DZO) - Universidade Estadual de Maringá - PR (UEM). E-mail: cortescristiano@yahoo.com.br

<sup>3</sup> Professores do Departamento de Zootecnia (DZO) da Universidade Estadual de Maringá – PR (UEM). Avenida Colombo, 5790, CEP: 87020-900, Maringá Paraná – Brasil. E-mail: jcdamasceno@uem.br

ruminantes em pastejo. Porém, conhecer esses fatores constitui tarefa de difícil execução, sobretudo quando se trata de sistemas de produção em pastagens heterogêneas.

Os *n*-alcanos, hidrocarbonetos saturados presentes naturalmente nas cutículas das plantas, vêm sendo utilizados como indicadores em experimentos com ruminantes em pastejo. Publicações demonstram que essa metodologia tem possibilitado estimativas acuradas da ingestão e composição da dieta (Dove & Moore, 1995; Dove et al., 1996; Duncan et al., 1999; Lewis et al., 2003).

O método dos *n*-alcanos também pode ser utilizado na estimação da composição botânica de pastagens e, conseqüentemente, da dieta dos animais a partir de procedimentos laboratoriais relativamente simples em amostras de fezes e de forragem. No entanto, é imprescindível que a forragem amostrada (dieta) seja representativa dos sítios pastejados pelos animais (Lee & Nolan, 2003)

Em se tratando de ruminantes em pastejo, as variações qualitativas das dietas consumidas são excepcionalmente amplas, pois, além das plantas forrageiras estarem em constantes variações botânicas e nutritivas em função do seu crescimento, existe o fator da seletividade de pastejo. Portanto, estimar acuradamente os recursos alimentares disponíveis e participantes das dietas de ruminantes, como espécies e frações de plantas, é tarefa bastante complexa, porém, fundamental em estudos de nutrição animal (Dove, 1992). Além disso, a discriminação das espécies e frações de plantas disponíveis na pastagem pode gerar informações acerca do impacto do pastejo sobre a planta e orientar sistemas de pastejo sustentáveis.

Teoricamente, 12 *n*-alcanos ( $C_{25}$  a  $C_{36}$ ) poderiam ser utilizados para discriminar componentes dietéticos, porém nem todos contribuem às estimativas (Newman et al., 1995). O contraste dos perfis de *n*-alcanos é fator preponderante para a correta discriminação de plantas pastejadas, que para serem identificadas, devem apresentar perfil de *n*-alcanos (“impressão digital”) distintos (Dove & Mayes, 1991). Todavia, a acurácia com que as dietas podem ser estimadas depende da complexidade das pastagens e da diferença do perfil de *n*-alcanos das espécies participantes do estudo (Chen et al., 1999).

A técnica dos *n*-alcanos é eficiente para prever a composição de dietas em situações de simulação, onde se conhece a dieta real dos animais (Dove & Mayes, 1996; Damasceno et al., 2001; Lewis et al., 2003). No entanto, quando a técnica é transferida para situações

de campo, problemas ainda são detectados nessas estimativas. Portanto, é necessário experimentar métodos matemáticos que selecionem os alcanos a serem utilizados, objetivando minimizar o erro das estimativas.

Matrizes matemáticas em equações simultâneas foram utilizadas por Newman et al. (1995), para estimar a composição da dieta a partir dos *n*-alcanos. Porém, estes autores destacaram alguns problemas nesta metodologia, como a arbitrariedade da escolha dos alcanos a serem utilizados nos cálculos.

As técnicas de análises multivariadas avaliam simultaneamente um conjunto de características, considerando-se as correlações existentes e permitindo que inferências sobre o conjunto de características sejam feitas em um nível de significância conhecido (Sakaguti, 1994). Desse modo, as análises multivariadas seriam de grande importância em experimentos que envolvem elevado número de variáveis, como é o caso da técnica de *n*-alcanos, quando utilizada para discriminar componentes de dietas.

Nesse contexto, Dove et al. (1996) utilizaram um tipo de análise multivariada, método de variáveis canônicas, na discriminação de espécies e frações de plantas. O método de variáveis canônicas identifica as variáveis independentes com alta correlação e indica o descarte daquela que é comparativamente menos importante, apontada por apresentar estatística *F* inferior (Cruz & Regazzi, 1994). Portanto, os efeitos dos *n*-alcanos “redundantes” estarão representados por outros alcanos de maior importância. Neste procedimento, o teste de hipótese ( $H_0$ ) avalia o poder discriminatório dos *n*-alcanos, de modo que a contribuição de cada variável canônica é mensurada a partir da sua significância em explicar partes ou a totalidade do fenômeno referente à discriminação dos *n*-alcanos.

Outro método estatístico interessante para se trabalhar com *n*-alcanos, é a análise de agrupamento, que consiste em reunir, por algum critério de classificação, os *n*-alcanos em vários grupos, de forma que exista homogeneidade dentro do grupo e heterogeneidade entre grupos, o que permitiria melhor visualização do poder da técnica de *n*-alcanos em discriminar frações ou espécies de plantas. A princípio, plantas ou frações pertencentes a grupos distintos seriam potencialmente discriminadas pela técnica.

O objetivo no presente trabalho foi avaliar o potencial dos *n*-alcanos em discriminar frações de uma planta ou espécies de plantas, utilizando-se análises de variáveis canônicas e de agrupamento.

## Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia (DZO) da Universidade Estadual de Maringá – PR (UEM) e no Laboratório de Alimentos do Departamento de Química (DQI) da UEM.

Estudou-se o perfil de *n*-alcanos nas seguintes espécies forrageiras tropicais: *Brachiaria brizantha* Stapf. cv. Marandu, *Cynodon dactylon* Pers. cv. Coastercross – 1 e *Panicum maximum* Jacq cv. Tanzânia, *Arachis pintoii* Koprov e Gregory cv. Amarillo e *Glycine wightii* Verdc. Soja Perene.

As colheitas foram realizadas em parcelas de 6 m<sup>2</sup> do Campo Agrostológico da Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI), pertencente à UEM. Nas gramíneas, realizou-se corte de rebaixamento, 35 dias antes das amostragens, com o objetivo de uniformizar as parcelas. Foram feitas amostragens destrutivas com auxílio de tesoura e quadrado de 0,25 m<sup>2</sup> de área, com quatro repetições por parcela, uma vez por estação do ano: novembro (primavera de 2000), março (verão de 2001), e agosto (inverno de 2001). Admitiu-se que, na ocasião das amostragens, as plantas estavam em condição de pastejo, considerando-se a época do ano. As plantas de *Brachiaria brizantha*, *Cynodon dactylon*, *Panicum maximum*, *Arachis pintoii* e *Glycine wightii* foram cortadas a 20, 10, 40, 5 e 5 cm acima do solo, respectivamente. Posteriormente, foram separadas nas frações: lâminas foliares, haste porção superior (15 cm superior da planta), porção inferior (restante da haste) e material morto. Para o estudo das leguminosas, as plantas foram fracionadas em folíolo com pecíolo e caule, subfracionando-se o caule e a haste das gramíneas. O procedimento de separação das frações foi definido respeitando-se o comportamento de pastejo dos animais e o valor nutritivo das frações das plantas.

As amostras foram congeladas e, após secagem em estufa de ventilação forçada a 55°C, durante 72 horas, foram processadas em moinho com peneira de 1 mm.

Os *n*-alcanos das forragens foram analisados segundo a técnica Vulich et al. (1995) modificada, que se baseia no processo de saponificação direta das amostras. Foram pesados em balança analítica 1,5 g das amostras moídas, adicionando-se, a cada amostra, em frascos com tampa de rosca, um padrão interno diluído em 3 mL *n*-heptano (C<sub>7</sub>H<sub>16</sub>), 0,225 mg de

dotriacontane (C<sub>32</sub>H<sub>66</sub>), para aquelas correspondentes ao período de verão, e 0,3 mg de tetratriacontano (C<sub>34</sub>H<sub>70</sub>), para as dos demais períodos. Em seguida, foram acrescentados 14 mL de solução de hidróxido de potássio alcoólica 1,5M, incubando-se, então, as amostras em banho-maria a 90°C sob agitação, durante 4,5 horas.

Depois da amostra resfriada à temperatura ambiente, foram adicionados 20 mL de *n*-heptano e 8 mL de água destilada, permanecendo a mistura a 60°C sob agitação vigorosa, em banho-maria, durante 15 minutos. Após a decantação (aproximadamente 1 hora), o sobrenadante foi coletado com uma pipeta de Pasteur e transferido para tubos de ensaio, onde foi parcialmente evaporado. Em seguida, o conteúdo restante no tubo de ensaio foi purificado em colunas de sílica-gel (70-230 mesh), suspensa em heptano, com volume de leito de 7 mL. Os hidrocarbonetos foram eluídos com 15 mL de heptano.

A mistura heptano mais *n*-alcanos foi recuperada em balões de 50 mL, sendo, então, evaporado todo o heptano, em temperatura ambiente, restando apenas os hidrocarbonetos sólidos, aderidos aos balões, que, posteriormente, foram redissolvidos em 3 mL de *n*-heptano e coletados em frascos de 10 mL para injeção em cromatógrafo a gás.

Foi utilizado o aparelho de cromatografia gasosa FINNIGAN 9001, com detector de ionização de chama (FID) e coluna capilar OV-5 de 30 m x 0,32 mm com 0,25 µm de espessura de filme. O gás carreador foi o hidrogênio (H<sub>2</sub>) 4.5 FID, com velocidade linear de 50 cm/s. Os gases para chama foram nitrogênio, hidrogênio e ar sintético e apresentaram taxa de fluxo de 25, 45 e 220 mL/minuto, respectivamente. A temperatura inicial da coluna foi de 220°C, mantida por 2 minutos, sendo acrescida em 5°C por minuto até atingir 250°C e, em seguida, em 4,5°C por minuto até 277°C, elevada em 4°C por minuto até a temperatura final de 297°C, mantendo-se nesta condição por 0,5 minuto. As temperaturas do injetor (INLET) e do detector (FID) foram 300 e 315°C, respectivamente. A amostra injetada foi de 2,0 µL, manualmente, com microseringa de 10 µL.

As áreas dos picos cromatográficos, correspondentes a cada *n*-alcano, foram determinadas por intermédio do software BORWIN<sup>TM</sup> Versão 1.21, 1997, no qual a identificação dos *n*-alcanos de comprimento de cadeia C<sub>24</sub> a C<sub>35</sub>, baseou-se na comparação com um padrão injetado anteriormente às amostras,

para se conhecer o tempo de retenção dos seguintes alcanos: tetracosano ( $C_{24}H_{50}$ ), hexacosano ( $C_{26}H_{54}$ ), dotriacontano ( $C_{32}H_{66}$ ) e tetratriacontano ( $C_{34}H_{70}$ ). Posteriormente, foram convertidas as quantidades de *n*-alcanos por referência aos padrões internos ( $C_{32}H_{66}$ ) e  $C_{34}H_{70}$  (0,3 e 0,225 mg/amostra, respectivamente), adicionados às amostras no início da análise. Em seguida, os dados obtidos foram calculados para quilograma de matéria seca para as espécies forrageiras.

Para análise dos dados, foram adotados dois procedimentos estatísticos de análise multivariada, efetuados pelo programa computacional Statistical Analysis System - SAS (SAS, 1992), possibilitando avaliar o poder discriminatório dos *n*-alcanos e agrupando as diferentes frações e espécies das plantas estudadas (Dove et al., 1996; Chen et al., 1998; Dove & Mayes, 1999).

Os dados foram submetidos à análise de variáveis canônicas, utilizada para discriminar os *n*-alcanos, conforme Cruz & Regazzi (1994). A partir do teste de hipótese ( $H_0$ ), objetivou-se identificar o nível de significância de cada *n*-alcano e, conseqüentemente, seu descarte ou não. O poder discriminatório dos *n*-alcanos é definido pelo coeficiente de ponderação, no qual variáveis com maiores magnitudes, em valores numéricos absolutos nas últimas variáveis canônicas, são consideradas de menor poder discriminatório. Isto porque o maior coeficiente de ponderação provém do não-descarte de caracter, por este ter sido previamente descartado. Neste estudo, optou-se pelo descarte da décima até a quarta variável canônica, a fim de se reduzir o número de caracteres de dez para cinco.

Para o estabelecimento dos grupos, utilizou-se a análise de agrupamento, definindo os grupos pela distância generalizada de Mahalanobis, empregando-se o método de otimização de Tocher, em que a média das medidas de dissimilaridade, dentro de cada grupo, deve ser menor que as distâncias médias entre quaisquer grupos (Cruz & Regazzi, 1994). Esse método requer a obtenção da matriz de dissimilaridade, sobre a qual é identificado o par de alcanos mais semelhante. Estes alcanos formarão o grupo inicial, avaliando-se, a partir daí, a possibilidade de inclusão de novos alcanos.

As distâncias médias em miligramas de *n*-alcanos, na formação dos grupos, foram estabelecidas conforme recomendado por Cruz & Regazzi (1994).

## Resultados e Discussão

O poder discriminatório dos *n*-alcanos quanto à significância de cada variável canônica é demonstrado, para os três períodos, na Tabela 1.

Verificou-se no teste de hipótese ( $H_0$ ), para o período de primavera, que, das dez variáveis canônicas, as oito primeiras são significativas ( $P < 0,05$ ), sendo suficientes para explicar 99,49% do fenômeno. Para o período de verão, as cinco primeiras foram significativas ( $P < 0,05$ ) e explicam 97% do fenômeno, enquanto, para o período de inverno, as seis primeiras variáveis canônicas foram significativas ( $P < 0,05$ ) e explicam 99,26% do fenômeno ocorrido.

No entanto, muitas vezes opta-se por explicar menor porcentagem do fenômeno, pois, desse modo, possibilita-se descartar maior número de variáveis com baixo poder de inferência, por serem redundantes, ou seja, outras variáveis caracterizam o seu efeito. Neste contexto, Cruz & Regazzi (1994) destacaram que, na análise multivariada, a escolha do método mais adequado tem sido determinada pela precisão que o pesquisador deseja, pela facilidade da análise e pela forma como os dados foram obtidos. Procedeu-se, portanto, ao descarte da décima até a quarta variável canônica, com o objetivo de limitar em cinco o número de caracteres.

Os coeficientes de ponderação das dez variáveis canônicas obtidas, para os períodos de primavera, verão e inverno, respectivamente, são apresentados nas Tabelas 2, 3 e 4.

Para o período de primavera (Tabela 2), considerando-se a décima variável canônica até a quarta, os alcanos com maiores coeficientes de ponderação foram  $C_{26}$ ,  $C_{29}$ ,  $C_{25}$ ,  $C_{27}$ , e  $C_{28}$ . Portanto, são os *n*-alcanos de menor poder discriminatório e acarretariam maior erro a cálculos de estimativas da composição botânica de dietas de herbívoros.

Considerando-se a décima variável canônica até a quarta, para o período de verão (Tabela 3), os alcanos  $C_{26}$ ,  $C_{28}$ ,  $C_{27}$ ,  $C_{30}$  e  $C_{29}$  apresentaram maiores coeficientes de ponderação e, portanto, são os menos adequados para estimativas.

Para o período de inverno (Tabela 4), considerando-se a décima variável canônica até a quarta, os alcanos  $C_{28}$ ,  $C_{26}$ ,  $C_{25}$ ,  $C_{29}$  e  $C_{27}$  apresentaram os maiores coeficientes de ponderação. Teriam, portanto, menor poder discriminatório em dietas de herbívoros.

Tabela 1 - Teste de hipótese (H0) para os três períodos de avaliação

Table 1 - Hypothesis test (H0), for the three evaluation periods

VC <sup>1</sup> VC	Proporção Proportion	Cumulativo <sup>2</sup> Cumulative	P>F P>F
Primavera (Spring)			
1	0,4513	0,4513	<0,0001
2	0,3015	0,7528	<0,0001
3	0,1480	0,9008	<0,0001
4	0,0605	0,9613	<0,0001
5	0,0175	0,9788	<0,0001
6	0,0111	0,9898	<0,0001
7	0,0050	0,9949	0,0015
8	0,0037	0,9986	0,0440
9	0,0010	0,9996	0,5512
10	0,0004	1,0000	0,6739
Verão (Summer)			
1	0,6842	0,6842	<0,0001
2	0,1359	0,8201	<0,0001
3	0,0674	0,8876	<0,0001
4	0,0515	0,9391	<0,0001
5	0,0309	0,9700	<0,0001
6	0,0155	0,9855	0,0698
7	0,0100	0,9955	0,6725
8	0,0031	0,9986	0,9974
9	0,0009	0,9995	0,9998
10	0,0005	1,0000	0,9964
Inverno (Winter)			
1	0,4871	0,4871	<0,0001
2	0,2639	0,7510	<0,0001
3	0,1267	0,8777	<0,0001
4	0,0727	0,9504	<0,0001
5	0,0338	0,9842	<0,0001
6	0,0085	0,9926	0,0001
7	0,0048	0,9975	0,0808
8	0,0015	0,9989	0,7990
9	0,0007	0,9996	0,9185
10	0,0004	1,0000	0,8465

\*P&lt;0,05.

<sup>1</sup> Variável canônica (canonical variable).<sup>2</sup> Contribuição das variáveis canônicas em explicar as variações de concentração de alcanos entre espécies e frações das plantas.<sup>2</sup> Canonical variables that accounted for the variations in alkanes concentration among plants species and fractions.

Observou-se que os *n*-alcanos com menor poder para distinguir componentes de dietas variaram entre as estações. No entanto, os alcanos C<sub>26</sub>, C<sub>27</sub>, C<sub>28</sub> e C<sub>29</sub> apareceram nas três estações como *n*-alcanos de baixo poder discriminatório, porém, não na mesma ordem de importância. Neste contexto, Oliveira & Salatino (2000) afirmam que as condições ambientais interferem severamente na produção das ceras cuticulares, o que pode explicar as variações ocorridas nas concentrações dos *n*-alcanos entre as estações,

causando diferenças na ordem de *n*-alcanos com menor poder discriminatório.

Para cada período de avaliação, foram estabelecidos grupos, segundo Cruz & Regazzi (1994), demonstrados nas Tabelas 5, 6 e 7. Admite-se que seria possível discriminar frações e espécies de plantas com acurácia somente se estas pertencerem a grupos distintos, em decorrência da maior magnitude dos valores médios das distâncias. Porém, provavelmente não seria possível discriminação intragrupos, pois os dados das distâncias são de menor magnitude, sujeitando as estimativas de identificação das frações estudadas a maiores erros.

Os resultados da análise de agrupamento com as distâncias médias intragrupo, os grupos e os componentes dentro dos grupos, obtidos pelo método de agrupamento de Tocher, para os três períodos estudados, encontram-se na Tabela 8.

Nos períodos de primavera e inverno, a possibilidade de discriminação entre as espécies e frações das espécies foi muito limitada. Para ambas as estações, apenas dois grupos foram formados, colocando-se a maior parte absoluta das frações e espécies no mesmo grupo. Apenas a fração lâmina foliar da espécie *C. dactylon* foi discriminada em um grupo único, para os dois períodos, indicando que seria possível discriminar em uma dieta hipotética, apenas a fração lamina foliar da espécie *C. dactylon* de todas as outras frações e espécies de plantas, nos períodos de primavera e inverno.

No período de verão, formaram-se seis grupos. O primeiro grupo foi formado por frações das cinco plantas estudadas, a saber: todas as frações da espécie *G. Wightii* exceto a fração matéria morta; todas as frações de *P. maximun*; frações lâmina foliar, haste superior e material morto da espécie *C. dactylon*; frações caule superior e inferior da espécie *A. pintoii*; e fração haste inferior da espécie *B. brizantha*. Portanto, o primeiro grupo apresentou 13 componentes, que não poderiam ser discriminados em dietas, pela técnica de *n*-alcanos.

Os efeitos de espécies, frações e idade de plantas quanto à concentração de *n*-alcanos foram estudados por Dove et al. (1996), utilizando análise multivariada. Neste estudo, os autores encontraram grande similaridade no padrão de alcanos entre as frações de plantas dentro de espécie ou na mesma fração em diferentes espécies, semelhantemente ao observado neste trabalho.

Tabela 2 - Coeficientes de ponderação e importância dos *n*-alcanos na variável canônica, para o período de primavera  
 Table 2 - Weighed coefficients and the importance of *n*-alkanes in the canonical variable, for Spring period

Variável <i>Variable</i>	Can1	Can2	Can3	Can4	Can5	Can6	Can7	Can8	Can9	Can10
C <sub>24</sub>	-0,2211	0,3275	0,6955	0,6391	-0,1095	-0,0632	0,2589	-0,0158	0,2123	-2,0471
C <sub>25</sub>	-0,1108	-4,0355	-0,3390	0,6537	0,0928	-1,9222	-1,6006	-1,2665	1,0901	1,2812
C <sub>26</sub>	-0,0768	2,4437	1,1778	0,4974	1,1937	1,5927	1,2672	0,0488	-3,3847	2,3968
C <sub>27</sub>	1,5661	7,9494	1,9766	-2,1819	-1,9668	-0,5765	-0,3119	-0,6021	0,9321	-0,4334
C <sub>28</sub>	3,2024	-8,1155	-7,9232	-1,1071	1,4550	1,3297	1,4237	-0,0694	3,3466	-2,1573
C <sub>29</sub>	-0,6035	-1,7456	-0,6936	1,3767	1,8454	-0,2617	0,1867	1,4357	-1,0222	0,0177
C <sub>30</sub>	-4,6959	3,3156	5,4701	1,2321	-1,1714	0,0146	-1,1977	0,8171	-0,9451	0,8394
C <sub>31</sub>	0,5715	-0,3656	-0,3374	-0,1870	-1,1756	-0,3550	1,1022	-0,6760	0,3017	0,0377
C <sub>33</sub>	-0,6635	-0,0705	1,0350	-1,0192	0,5934	-0,1179	-0,3366	0,4177	-0,2977	-0,1226
C <sub>35</sub>	1,7960	0,0775	-0,2934	0,6271	-0,1819	0,2274	-0,0446	-0,1465	0,2083	0,0245

Tabela 3 - Coeficientes de ponderação e importância dos *n*-alcanos na variável canônica, para o período de verão  
 Table 3 - Weighed coefficients and the importance of *n*-alkanes in the canonical variable, for Summer period

Variável <i>Variable</i>	Can1	Can2	Can3	Can4	Can5	Can6	Can7	Can8	Can9	Can10
C <sub>24</sub>	-0,3203	0,5656	0,0900	0,2802	-0,2734	0,8868	2,5694	0,8015	0,1017	0,3814
C <sub>25</sub>	-0,4756	-0,0753	-0,4330	-0,0420	-0,5255	1,2539	4,2796	0,4170	1,4277	2,7124
C <sub>26</sub>	1,1854	-0,2313	2,3301	1,0005	1,0610	2,3561	0,9372	0,3727	0,0055	4,7345
C <sub>27</sub>	1,9711	-0,2483	-0,9985	0,2473	-2,0357	4,3280	5,5491	1,5852	0,3608	0,9075
C <sub>28</sub>	0,1372	-2,4943	2,6070	-1,3221	1,5050	2,3917	0,5273	1,6314	2,9665	0,7272
C <sub>29</sub>	-1,8333	5,0428	-3,8193	-2,2140	0,3203	1,8792	2,5819	1,2596	0,2084	0,1293
C <sub>30</sub>	-1,2847	-2,3954	-0,2414	2,9622	-1,4809	1,6484	0,1543	1,3306	1,0306	0,4916
C <sub>31</sub>	0,0208	0,2752	0,4248	0,4112	1,6610	0,0926	0,2822	0,3542	0,2985	0,2901
C <sub>33</sub>	1,3595	-0,8100	-1,0235	-0,1633	-0,3782	0,1478	0,0120	0,1270	0,0324	0,1838
C <sub>35</sub>	0,5387	0,8357	1,9451	-0,2803	-0,0207	0,4968	0,0948	0,0457	0,1692	0,2579

Tabela 4 - Coeficientes de ponderação e importância dos *n*-alcanos na variável canônica, para o período de inverno  
 Table 4 - Weighed coefficients and the importance of *n*-alkanes in the canonical variable, for Winter period

Variável <i>Variable</i>	Can1	Can2	Can3	Can4	Can5	Can6	Can7	Can8	Can9	Can10
C <sub>24</sub>	0,5929	-0,3178	0,8302	0,0759	0,3889	0,5326	-0,0843	-1,1286	1,6082	1,4284
C <sub>25</sub>	0,2680	-1,6232	0,5243	1,0014	1,2326	-0,0961	1,3329	1,7610	0,8545	-1,7845
C <sub>26</sub>	-0,1018	0,9129	-0,4863	-1,4753	-1,0895	-0,3408	-1,2563	-2,4310	-2,3849	-1,9995
C <sub>27</sub>	-1,3535	5,3134	-2,0847	-2,4879	-0,6918	2,3439	0,6660	0,8364	2,3542	0,6698
C <sub>28</sub>	0,6238	-0,5272	1,8206	1,7988	-3,9261	-6,6892	-0,3649	1,2223	-2,3602	2,5665
C <sub>29</sub>	1,5492	-3,0358	-0,1720	3,7380	0,9952	-0,3148	-0,0805	-0,4159	-0,9352	-0,4230
C <sub>30</sub>	-1,6432	-2,1431	-0,7526	-2,1629	3,1876	4,8968	0,8328	-0,3703	0,8630	-0,4418
C <sub>31</sub>	-1,3069	2,2322	0,6842	-0,5324	0,5706	-0,2090	-0,1664	0,0592	-0,0655	0,0735
C <sub>33</sub>	0,9355	-2,0574	0,1952	1,0920	-1,4098	0,6432	0,1463	0,0987	0,1524	-0,0899
C <sub>35</sub>	0,9949	1,6310	0,1402	-0,8107	0,5589	-0,3944	-0,0265	-0,0324	0,0800	0,1000

O segundo grupo do período de verão foi formado pela espécie *B. brizantha*, frações haste superior e material morto e pela espécie *C. dactylon*, fração haste inferior. O terceiro grupo continha apenas a fração folha da espécie *A. pintoi*; o quarto, a fração material morto da espécie *A. pintoi*; o quinto, apenas a fração *B. brizantha* lâmina foliar; e o sexto, a fração material morto da espécie *G. wightii*. Considerando-se os diferentes agrupamentos obtidos, seria possível associar algumas frações e espécies de plantas, que poderiam ser discriminadas quando presentes, ao mesmo tempo, em dietas de herbívoros.

Admitindo-se uma pastagem pura de *B. brizantha* no período de verão, não seria possível distinguir as frações haste superior e material morto, uma vez que participam do mesmo grupo. Porém, seria possível a discriminação entre as frações lâmina foliar, haste superior e haste inferior, o que representaria avanços nos estudos de nutrição de ruminantes, pois permitiria estimar a quantidade e qualidade dos componentes da forragem que está sendo ingerida, possibilitando avaliar o *status* nutricional dos animais e o impacto do processo de pastejo sobre a planta e suas respectivas frações.

As diferenças nos perfis de *n*-alcanos podem ser utilizadas para se estimar a proporção de leguminosas na dieta (Dove, 1992; Lewis et al., 2003). Animais em pastagens têm preferência em ingerir a fração folha

das plantas, por ser nutricionalmente superior ao restante da planta forrageira. Neste contexto, com base nos dados obtidos neste trabalho, para o período de verão, seria possível discriminar os componentes de uma dieta de pastagens consorciadas, gramínea-leguminosa, utilizando a espécie *B. brizantha* associada à espécie *A. pintoi* ou à espécie *G. wightii*, pois as frações mais nutritivas destas plantas, lâmina foliar (gramínea) e folha (leguminosa) apresentam-se agrupadas distintamente. A fração haste/caule superior, freqüentemente ingerida conforme a disponibilidade de forragem, também poderia ser discriminada no período de verão.

Percebe-se, no período de verão, que a fração material morto das duas espécies de leguminosas estudadas ficou em grupos diferentes aos das outras frações, o que é relevante, pois admite-se que a fração material morto advém das outras frações da planta, principalmente folhas, sugerindo, portanto, a possibilidade de alguma transformação bioquímica no padrão de *n*-alcanos, quando a fração da planta morre. Pode-se também atribuir este fato à ausência de predomínio de alguma fração da planta, formando, assim, uma mistura de frações com um perfil de *n*-alcanos totalmente distinto. Dove (1992) relatou que as concentrações de alcanos no material morto podem diferir daquelas encontradas na planta verde da mesma espécie, confirmando as observações deste estudo.

Tabela 5 - Matriz de distâncias intergrupos<sup>1</sup>, para o período de primavera

Table 5 - Distances between cluster matrix, for Spring period

Grupo (Group)	1	2
1	0	550,1026
2	550,1026	0

<sup>1</sup>mg/kg MS (mg/kg DM).

Tabela 7 - Matriz de distâncias intergrupos<sup>1</sup>, para o período de inverno

Table 7 - Distances between cluster matrix, for Winter period

Grupo (Group)	1	2
1	0	199,9475
2	199,9475	0

<sup>1</sup>mg/kg MS (mg/kg DM).

Tabela 6 - Matriz de distâncias intergrupos<sup>1</sup>, para o período de verão

Table 6 - Distances between cluster matrix, for Summer period

Grupo (Group)	1	2	3	4	5	6
1	0	46,4181	35,4485	47,4483	10,2868	41,1723
2	46,4181	0	50,7607	52,9807	45,5486	101,8768
3	35,4485	50,7607	0	52,0237	68,1905	97,5121
4	47,4483	52,9807	52,0237	0	120,3817	75,3360
5	10,2868	45,5486	68,1905	120,3817	0	209,5263
6	41,1723	101,8768	97,5121	75,3360	209,5263	0

<sup>1</sup>mg/kg MS (mg/kg DM).

Tabela 8 - Resultados da análise de agrupamento, demonstrando as distâncias médias intragrupos, os grupos e os componentes dentro dos grupos, pelo método de agrupamento de Tocher<sup>a</sup> (períodos primavera, verão e inverno)

Table 8 - Cluster analysis results within cluster distances, groups and components within cluster by Tocher method (periods of spring, summer and winter)

Grupo Group	Fração <sup>b</sup> Fraction															Distância intragrupo Within cluster distance		
Primavera (Spring)																		
1	Ap <sup>2</sup>	Ap <sup>3</sup>	Gw <sup>3</sup>	Bb <sup>4</sup>	Gw <sup>2</sup>	Gw <sup>1</sup>	Pm <sup>1</sup>	Ap <sup>1</sup>	Cd <sup>2</sup>	Bb <sup>3</sup>	Bb <sup>2</sup>	Gw <sup>4</sup>	Ap <sup>4</sup>	Bb <sup>1</sup>	49,6255			
2	Cd <sup>1</sup>														0			
Verão (Summer)																		
1	Gw <sup>2</sup>	Gw <sup>3</sup>	Pm <sup>3</sup>	Pm <sup>2</sup>	Pm <sup>4</sup>	Gw <sup>1</sup>	Pm <sup>1</sup>	Bb <sup>3</sup>	Cd <sup>1</sup>	Cd <sup>4</sup>	Ap <sup>2</sup>	Ap <sup>3</sup>	Cd <sup>2</sup>	22,6088				
2	Bb <sup>2</sup>	Bb <sup>4</sup>	Cd <sup>3</sup>											23,2475				
3	Ap <sup>1</sup>													0				
4	Ap <sup>4</sup>													0				
5	Bb <sup>1</sup>													0				
6	Gw <sup>4</sup>													0				
Inverno (Winter)																		
1	Gw <sup>2</sup>	Gw <sup>3</sup>	Pm <sup>1</sup>	Pm <sup>4</sup>	Cd <sup>3</sup>	Pm <sup>2</sup>	Ap <sup>4</sup>	Ap <sup>2</sup>	Gw <sup>4</sup>	Cd <sup>2</sup>	Gw <sup>1</sup>	Cd <sup>1</sup>	Ap <sup>1</sup>	Bb <sup>4</sup>	Bb <sup>2</sup>	Gw <sup>5</sup>	Bb <sup>1</sup>	45,9478
2	Cd <sup>1</sup>																	0

<sup>a</sup> mg/kg MS (mg/kg DM).

<sup>b</sup> Ap = *Arachis pintoii*, Bb = *Brachiaria brizantha*, Cd = *Cynodon dactylon*, Gw = *Glycine wightii*, Pm = *Panicum maximum*.

<sup>1</sup> Folha para as leguminosas (leaf for the legumes) e lâmina foliar para as gramíneas (leaf blade for the grasses).

<sup>2</sup> Caule superior ou haste superior (stem higher portion).

<sup>3</sup> Caule inferior ou haste inferior (stem lower portion).

<sup>4</sup> Material morto (dead matter).

<sup>5</sup> Vagem (pod).

## Conclusões

Os alcanos com menor potencial discriminatório, para as espécies e frações estudadas, foram C<sub>26</sub>, C<sub>29</sub>, C<sub>25</sub>, C<sub>27</sub> e C<sub>28</sub>, para a primavera, C<sub>26</sub>, C<sub>28</sub>, C<sub>27</sub>, C<sub>30</sub> e C<sub>29</sub>, para o verão e C<sub>28</sub>, C<sub>26</sub>, C<sub>25</sub>, C<sub>29</sub> e C<sub>27</sub>, para o inverno.

Para a primavera e o inverno, a técnica de *n*-alcanos permitiu distinguir a fração lâmina foliar da espécie *C. dactylon* cv. *Coast-cross-1* das frações haste superior e inferior, bem como das gramíneas (*Brachiaria brizantha* Stapf. cv. Marandu e *Panicum maximum* Jacq cv. Tanzânia) e leguminosas (*Arachis pintoii* Koprov e Gregory cv. Amarillo e *Glycine wightii* Verdc. Soja Perene).

Para o verão, seria possível discriminar os componentes de uma dieta proveniente de pastagem consorciada, de *B. brizantha* com *A. pintoii* ou *G. wightii*, pois as frações revelaram agrupamentos distintos de *n*-alcanos.

As análises multivariadas, especificamente variáveis canônicas e análise de agrupamento, representam alternativas de cálculo para a melhor aplicabilidade da técnica dos *n*-alcanos na discriminação das dietas de herbívoros.

## Literatura Citada

- CHEN, W.; LEFROY, R.D.B.; SCOTT, J.M. et al. Field variations in alkane signatures among plant species in 'degraded' and perennial pastures on the Northern Tablelands of New South Wales. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.49, p.263-268, 1998.
- CHEN, W.; SCOTT, J.M.; BLAIR, G.J. et al. Using plant cuticular alkanes to study plant-animal interaction on pastures. **Canadian Journal of Animal Science**, v.79, n.4, p.553-556, 1999.
- CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1994. 390p.
- DAMASCENO, J.C.; CÔRTEES, C.; SANTOS, G.T. et al. Estimativa do consumo em ruminantes alimentados com dietas suplementadas, com o uso da técnica de *n*-alcanos In: SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE

- FORRAGENS CONSERVADAS, 2001, Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2001. p.286-299.
- DOVE, H.; MAYES, R.W. The use of plant wax alkanes as marker substances in studies of the nutrition of herbivores: a review. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.42, p.913-952, 1991.
- DOVE, H. Using the *n*-alkanes of plant cuticular wax to estimate the species composition of herbage mixtures. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.43, p.1711-1724, 1992.
- DOVE, H.; MAYES, R.W. Plant wax components: a new approach to estimating intake and diet composition in herbivores. **American Institute of Nutrition**, v.126, p.13-26, 1996.
- DOVE, H.; MAYES, R.W.; FREER, M. Effects of species, plant part, and plant age on the *n*-alkanes concentration in the cuticular wax of pasture plants. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.47, p.1333-1347, 1996.
- DOVE, H.; MOORE, A.D. Using a least-squares optimization procedures to estimate botanical composition based on the alkane of cuticular wax. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.46, p.1535-1544, 1995.
- DOVE, H.; MAYES, R.W. Development in the use of plant wax markers for estimation diet selection in herbivores. In: SATELLITE MEETING OF THE Vth INTERNATIONAL SYMPOSIUM NUTRITION OF HERBIVORES, 1999, San Antonio. **Anais...** Texas: 1999.
- DUNCAN, A.J.; MAYES, R.W.; LAMB, C.S. et al. The use of naturally occurring and artificially applied *n*-alkanes as markers for estimation of short-term diet composition and intake in sheep. **Journal of Agricultural Science**, v.132, p.233-246, 1999.
- LEE, G.J.; NOLAN, J.V. Source of variation in *n*-alkane concentrations in cuticular wax of two species of pasture plants. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.54, p.21-26, 2003.
- LEWIS, R.M.; MAGADLELA, A.M.; JESSOP, N.S. et al. The ability of the *n*-alkanes technique to estimate intake and diet choice of sheep. **Animal Science**, v.77, p.319-327, 2003.
- NEWMAN, J.A.; THOMPSON, W.A.; PENNING, P.D. Least-squares estimation of diet composition from *n*-alkanes in herbage and faces using matrix mathematics. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.46, p.793-805, 1995.
- OLIVEIRA, F.; SALATINO, A. Major constituents of the foliar Epicuticular Waxes of Species from the Caatinga and Cerrado. **Zeitschrift für Naturforschung**, v.55, p.688-692, 2000.
- SAKAGUTI, E.S. **Utilização de técnica de análise multivariada na avaliação de cruzamento dialélicos em coelhos**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1994. 180p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 1994.
- STATISTICAL ANALYSES SYSTEM - SAS. **SAS/STAT: changes and enhancements**. Release 6.07. Cary: 1992. (SAS Technical Report P-229)
- VULICH, S.A.; HANRAHAN, J.P.; CROWLEY, B.A. Modification of the analytical procedures for the determination of herbage and faecal *n*-alkanes used in the estimation of herbage intake. **Journal of Agricultural Science**, v.124, p.71-77, 1995.

Recebido em: 31/08/04

Aceito em: 28/03/05