

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL  
CURSO DE DOUTORADO**

**PRODUÇÃO, COMPOSIÇÃO E QUALIDADE OXIDATIVA  
DO LEITE DE OVELHAS SUPLEMENTADAS COM ERVA-  
MATE**

**Évelyn Silva de Melo Soares**

CAMPO GRANDE, MS  
2022

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL  
CURSO DE DOUTORADO**

**Produção, composição e qualidade oxidativa do leite de ovelhas  
suplementadas com erva-mate**

**Production, composition and oxidative quality of milk from ewes  
supplemented with yerba mate**

**Évelyn Silva de Melo Soares**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Camila Celeste Brandão Ferreira Ítavo  
Coorientador: Prof. Dr. Luís Carlos Vinhas Ítavo**

Tese apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Doutora em Ciência Animal.

Área de concentração: Produção Animal



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**



**Certificado de aprovação**

ÉVELYN SILVA DE MELO SOARES

**Produção, composição e qualidade oxidativa do leite de ovelhas F1 texel suplementadas com erva-mate (*Ilex paraguariensis*)**

**Production, composition and oxidative quality of milk of F1 Texel ewes supplemented with yerba mate (*Ilex paraguariensis*)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciência Animal.

Área de concentração: Produção Animal.

Aprovado em: 15-06-2022

BANCA EXAMINADORA:

---

Dra. Camila Celeste Brandao Ferreira Itavo  
(UFMS) – (Presidente)

---

Dr. Carlos Eduardo Domingues Nazario  
(UFMS)

---

Dr. Gelson dos Santos Difante  
(UFMS)

---

Dr. Geraldo Tadeu dos Santos  
(UFMS)

---

Documento assinado eletronicamente por **Gelson dos Santos Difante, Professor do Magisterio Superior**, em 15/06/2022, às 16:46, conforme



horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **MONALISSA DE MELO STRADIOTTO PERES, Usuário Externo**, em 17/06/2022, às 08:04, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Camila Celeste Brandao Ferreira Itavo, Professora do Magistério Superior**, em 20/06/2022, às 07:49, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Eduardo Domingues Nazario, Professor do Magisterio Superior**, em 20/06/2022, às 15:51, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Geraldo Tadeu dos Santos, Professor do Magisterio Superior - Visitante**, em 21/06/2022, às 11:56, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufms.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufms.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3348428** e o código CRC **052EFF23**.

---

#### COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

Av Costa e Silva, s/nº - Cidade Universitária

Fone:

CEP 79070-900 - Campo Grande - MS

## **DEDICATÓRIA**

Dedico com imenso carinho esta tese a minha família, em especial ao meu marido e filhos Thiago Kantorski Soares, Felipe de Melo Soares e Guilherme de Melo Soares, com amor. Aos professores Dr. Luís Carlos Vinhas Ítavo, Dr. Geraldo Tadeu dos Santos e Dra. Camila Celeste Brandão Ferreira Ítavo por sua dedicação, incentivo e paciência.

## **AGRADECIMENTOS**

A tese é um trabalho individual, mas não solitário! Muitos são os que contribuíram para que ao final fosse feito um bom trabalho e estes são dignos de serem citados. Por esta razão, desejo expressar os meus mais sinceros agradecimentos.

A DEUS por ser minha esperança e refúgio

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, em especial à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e ao seu corpo docente, direção e ao administrativo por terem me recebido de braços abertos durante todos esses anos e com todas as condições ao me proporcionarem dias de aprendizagem muito ricos.

Também quero agradecer ao assistente em administração do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Ricardo de Oliveira Santos, pelo seu comprometimento e excelência na qualidade em atender aos alunos.

Aos professores Dr. Luís Carlos Vinhas Ítavo, ao Dr. Geraldo Tadeu dos Santos e a Dra. Camila Celeste Brandão Ferreira Ítavo, agradeço de coração pelas muitas horas de leitura que dedicaram ao texto desta tese. Ao incentivo dado para que eu continuasse o trabalho, mesmo nos momentos em que isso não me era tão atrativo. Pela confiança depositada em meu trabalho, esperando-o pacientemente mesmo quando eu demorava a mostrar novos resultados.

Ao apoio fornecido pela bolsa Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, para a realização do presente trabalho, o qual possibilitou que eu me dedicasse exclusivamente à pesquisa e à escrita desta tese. Estendo este agradecimento ao programa de Pós-graduação em Ciência Animal e ao seu coordenador, que não mediram esforços para que estas bolsas fossem direcionadas ao nosso curso.

À Andressa de Souza Araújo, Amanda Vitória de Quadros de Godoy, Aline Aparecida da Silva Miguel, Ana Carolina Pelaes Vital, Camila de Godoy, Elivelton Bitencourt, Gabriela Macedo Carneiro, Gleice Kelli Ayardes de Melo, Jéssica da Silva Batista, Jesus Osório Cardozo, Kedma Leonora Silva Monteiro Ferelli, Lavínia Correia de Sá, Larissa Maiara Fernandes Cezar, Larissa Marques Higano, Luis Bitencourt Ovando, Lucimara Modesto Nonato, Mariana de Nadai Bonin, Thais Fernanda Farias de Souza Arco, Talita Daiane da Costa e Vinicius Rôa Baerley por terem compartilhado comigo as angústias e tensões de se elaborar uma tese e também por me auxiliarem na pesquisa.

Ao professor Dr. Carlos Eduardo Domingues Nazário, do Instituto de Química - INQUI, pelos conhecimentos, por me permitir utilizar os equipamentos pertencentes ao seu grupo de pesquisa. Aos funcionários do Laboratório de Combustíveis - LABCOM-MS, Francisco dos Santos Junior, Leandro Fontoura Cavalheiro e Rafael de Almeida Armoa pelo suporte durante a realização das minhas análises.

Aos meus pais, familiares e amigas pelo exemplo de humildade e de trabalho, nos quais tentei me espelhar para fazer esta tese. Ao meu esposo e filhos, por sua companhia e incentivo durante estes quatro anos. E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação.

**MUITO OBRIGADA!**

## RESUMO

SOARES, E.S.M. **Produção, composição e qualidade oxidativa do leite de ovelhas F1 Texel suplementadas com erva-mate (*Ilex paraguariensis*)** / 2022. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2022. 106p.

O primeiro artigo aborda a hipótese de que a associação de soja em grão e erva-mate pode aumentar a concentração de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) com menor oxidação do leite de ovelhas lactantes criadas em pastagens tropicais. Dezesesseis ovelhas foram distribuídas aleatoriamente em um esquema fatorial 2x2. Quatro dietas diferentes foram elaboradas: controle (sem soja em grão ou erva-mate); soja em grão (210 g/kg de MS); erva-mate (110 g/kg de MS) e uma combinação de soja e erva-mate. A ingestão de erva-mate reduziu o consumo de MS, extrato etéreo (EE), proteína, lactose, extrato seco desengordurado, densidade, concentrações de ômega - 3 e a razão entre ácidos graxos (AG) saturados/monoinsaturados, mas aumentou a concentração de AG monoinsaturados e o poder sequestrante dos radicais livres por DPPH sem alterar as concentrações dos dienos conjugados e as concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no leite. A suplementação com soja em grão diminuiu o peso ao nascer dos cordeiros, ao contrário, aumentou as concentrações do ácido linoléico conjugado (CLA), PUFA, ômega - 6, a razão ômega - 6/ômega - 3 e do colesterol total sanguíneo. Desta forma, conclui-se que a adição de erva-mate não influenciou no perfil oxidativo do leite. Enquanto a suplementação com soja em grão melhorou o perfil de AG do leite, aumentando as concentrações de CLA e de PUFA. A associação de soja grão e erva-mate ajuda a melhorar a qualidade da gordura do leite de ovelhas criadas em pastagens tropicais, como mostrado pela atividade antioxidante aprimorada, embora não ajude a prevenir a oxidação do leite rico em PUFA. O segundo artigo comparou os diferentes métodos de extração para lipídios totais e avaliou o efeito destas metodologias sobre a composição quantitativa de ácidos graxos em leite de ovelhas lactantes criadas em pastagens tropicais. As metodologias utilizadas foram da simples transesterificação direta, empregando-se o solvente orgânico n-hexano de pureza grau HPLC, Bligh; Dyer (extração a frio, nas proporções de mistura extratora 5, 10 e 15 mL na proporção de 2: 1: 1 (v / v / v) de clorofórmio-metanol-água). Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram separados por cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização por



chama (GC-FID). Os resultados demonstram que não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ), no teor de lipídios totais entre os métodos de extração. No entanto, o método de Bligh; Dyer obteve o melhor rendimento dos lipídios a serem extraídos do leite de ovelha, uma vez que o volume com 15 mL da solução extratora foi capaz de identificar 87% dos picos cromatográficos. Observou-se ainda que o leite de ovelha apresenta maior percentual para os ácidos graxos palmítico, esteárico e oléico, com percentuais de 20,1%, 15,5% e 33,1%, respectivamente. Portanto, a mistura extratora com volume de 15 mL utilizada neste estudo pode ser uma alternativa para realizar a extração da gordura do leite de ovelhas lactantes criadas em pastagens tropicais como método de rotina, já que expressa melhor o conteúdo lipídico deste alimento.

**Palavras-chave:** aditivo natural, antioxidantes, composição físico-química, compostos fenólicos, lactação, ovinos

## ABSTRACT

SOARES, E.S.M. **Production, composition and oxidative quality of milk of F1 Texel ewes supplemented with yerba mate (*Ilex paraguariensis*)** / 2022. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2022. 106p.

The first article addresses the hypothesis that the association of soybeans in grain and yerba mate can increase the concentration of polyunsaturated fatty acids (PUFA) with less oxidation of milk from lactating ewes reared in tropical pastures. Sixteen sheep were randomly distributed in a 2x2 factorial scheme. Four different diets were elaborated: control (without soybeans in grain or yerba mate); soybean in grain (210 g/kg of DM); yerba mate (110 g/kg of DM) and a combination of soybeans and yerba mate. The ingestion of yerba mate has reduced the consumption of DM, etheric extract (EE), protein, lactose, degreased dry extract, density, omega - 3 concentrations and the ratio of saturated/monounsaturated fatty acids (FA), but increased the concentration of monounsaturated FA and the sequestering power of free radicals by DPPH without altering the concentrations of conjugated dienes and the concentrations of substances reactive to thiobarbituric acid in milk. Supplementation with soybean grain decreased the lambs' birth weight; on the contrary, it increased the concentrations of conjugated linoleic acid (CLA), PUFA, omega - 6, the omega ratio - 6/omega - 3 and the total blood cholesterol. Thus, it is concluded that the addition of yerba mate did not influence the oxidative profile of milk. While supplementation with soybean grain improved the milk FA profile, increasing CLA and PUFA concentrations. The association of soybean grain and yerba mate helps to improve the fat quality of milk from sheep raised in tropical pastures, as shown by the enhanced antioxidant activity, although it does not help prevent the oxidation of milk rich in PUFA. The second article compared the different extraction methods for total lipids and evaluated the effect of these methodologies on the quantitative composition of fatty acids in milk from lactating ewes raised on tropical pastures. The methodologies used were simple direct transesterification, using the HPLC grade organic solvent n-hexane, Bligh; Dyer (cold extraction, extracting mixture proportions 5, 10 and 15 mL in a ratio of 2:1: 1 (v / v / v) of chloroform-methanol-water). The fatty acid methyl esters were separated by gas chromatography coupled with a flame ionization detector (GC-FID). The results show that there

was no significant difference ( $p < 0.05$ ) in the total lipid content between the extraction methods. However, Bligh's method; Dyer obtained the best yield of lipids to be extracted from 's milk, since the volume with 15 mL of the extraction solution was able to identify 87% of the chromatographic peaks. It was also observed that ewe's milk has a higher percentage of palmitic, stearic and oleic fatty acids, with percentages of 20.1%, 15.5% and 33.1%, respectively. Therefore, the extraction mixture with a volume of 15 mL used in this study can be an alternative to perform the extraction of milk fat from lactating ewes raised in tropical pastures as a routine method, as it expresses the best lipid content of this food.

**Keywords:** natural additive, antioxidants, phenolic compounds, physicochemical composition, lactation, sheep

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DE LITERATURA

<b>Figura 1</b> - Estrutura dos isômeros de CLA <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 e do ácido linoléico (C18: 2 <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12) .....	27
<b>Figura 2</b> - Via metabólica de biossíntese do CLA no rúmen, b) Via metabólica de biossíntese do CLA no tecido.....	29
<b>Figura 3</b> - Esquema geral do mecanismo da oxidação lipídica .....	31
<b>Figura 4.</b> - Estrutura fenólica dos antioxidantes sintéticos BHA, BHT, PG e TBHQ .....	35

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO DE LITERATURA

<b>Tabela 1</b> - Características de produção e tempo de lactação entre raças ovinas.....	20
<b>Tabela 2</b> – Composição média dos nutrientes básicos em leite de cabra, de ovelha, de vaca e humano .....	21
<b>Tabela 3</b> - Propriedades físico-químicas do leite de ruminantes .....	22
<b>Tabela 4</b> - Concentração do ácido linoléico conjugado total e CLA <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 em diferentes alimentos.....	28
<b>I - Erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i>) como fonte de antioxidantes com soja em grão na suplementação de ovelhas lactantes criadas em pastagens tropicais</b>	
<b>Tabela 1</b> - Ingredientes e composição química das dietas com adição de erva-mate e com suplementação de soja em grão .....	61
<b>Tabela 2</b> - Composição química da <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu em função do tratamento e do mês de utilização .....	63
<b>Tabela 3</b> - Consumo médio de concentrado e desempenho produtivo de ovelhas e seus cordeiros do parto aos 60 dias .....	68
<b>Tabela 4</b> - Produção, composição e qualidade oxidativa do leite de ovelhas alimentadas com dietas contendo erva-mate e soja em grão .....	70
<b>Tabela 5</b> - Perfil de ácidos graxos no leite (mg/g de lipídios totais) de ovelhas alimentadas com dietas contendo erva-mate e soja em grão .....	72
<b>Tabela 6</b> - Concentrações percentuais e razões de ácidos graxos agrupados no leite de ovelhas alimentadas com erva-mate e soja em grão.....	73
<b>Tabela 7</b> - Média da concentração plasmática do sangue de ovelhas alimentadas com erva-mate e soja em grão .....	74
<b>II - Comparação de métodos analíticos para determinação do perfil de ácidos graxos em leite ovino por cromatografia gasosa</b>	
<b>Tabela 1</b> - Procedimentos experimentais de extração dos lipídios do leite ovino ....	95
<b>Tabela 2</b> - Valores percentuais da composição dos ácidos graxos presentes no leite ovino .....	96
<b>Tabela 3</b> - Valores percentuais da composição dos ácidos graxos de leite ovino presentes no método 4 em comparação com estudos anteriores .....	97

## **LISTA DE SIGLAS E DE ABREVIATURAS**

**AG** – Ácido graxo  
**AGCCM** - Ácido graxo de cadeia curta e média  
**AGMI** - Ácido graxo monoinsaturado  
**AGPI** - Ácido graxo poli-insaturado  
**AGS** – Ácido graxo saturado  
**CAT** - Capacidade antioxidante total;  
**CEUA** - Comissão de Ética e Experimentação Animal  
**CLA** – Ácido Linoléico Conjugado  
**CONAB** – Companhia Nacional de Abastecimento  
**DC** - Hidroperóxidos dieno conjugados;  
**EE** – Extrato Etéreo  
**EM** – Erva-Mate  
**EMBRAPA** – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
**EPM** – Erro Padrão Médio  
**ESD** – Extrato Seco Desengordurado  
**FAO** – Food and Agriculture Organization of the United Nations  
**FDA** - Fibra em Detergente Ácido  
**FDN** – Fibra em Detergente Neutro  
**g** – Grama  
**IBGE** - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  
**IN** – Instrução Normativa  
**kg** – Quilograma  
**L** - Litro  
**mg** – Miligrama  
**mL** – Mililitro  
**MS** – Matéria Seca  
**MM** – Matéria Mineral  
**MO** – Matéria Orgânica  
**NDT** – Nutrientes Digestíveis Totais  
**NRC** – National Research Council  
**PB** – Proteína Bruta  
**SG** – Soja em Grão  
**TACO** – Tabela Brasileira de Composição de Alimentos  
**TBARS** - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.  
**USDA** - United States Department of Agriculture

## SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA .....</b>	<b>IV</b>
<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>V</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>VII</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>IX</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>XI</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>XII</b>
<b>LISTA DE SIGLAS E DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>XIII</b>
<b>SUMÁRIO .....</b>	<b>XIV</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
Considerações Gerais .....	17
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>18</b>
2.1 Panorama da Ovinocultura Leiteira no Brasil .....	18
2.2 Produção .....	19
2.3 Composição .....	21
2.4 Características da gordura do leite ovino .....	22
2.5 Efeitos dos lipídeos na produção e composição do leite .....	24
2.6 Suplementação lipídica com soja em grão .....	25
2.7 Ácido linoléico conjugado (CLA) .....	26
2.8 Oxidação lipídica .....	30
2.9 Influências da dieta sobre a estabilidade oxidativa do leite.....	32
2.10 Antioxidantes.....	33
2.11 Erva-mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> ).....	36
2.12 Fatores antinutricionais da erva-mate (tanino) .....	38
2.13 Parâmetros sanguíneos .....	40
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS .....</b>	<b>43</b>
<b>3. OBJETIVOS GERAIS.....</b>	<b>56</b>

<b>I - ERVA-MATE (<i>ILEX PARAGUARIENSIS</i>) COMO FONTE DE ANTIOXIDANTES COM SOJA EM GRÃO NA SUPLEMENTAÇÃO DE OVELHAS LACTANTES CRIADAS EM PASTAGENS TROPICAIS .....</b>	<b>57</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>57</b>
<b>YERBA MATE (<i>ILEX PARAGUARIENSIS</i>) AS A SOURCE OF ANTIOXIDANTS WITH SOYBEAN GRAIN IN SUPPLEMENTATION OF LACTATING EWES REARED IN TROPICAL PASTURES .....</b>	<b>58</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>58</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>59</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>60</b>
2.1. Design experimental e animais .....	60
2.2. Manejo das ovelhas para obtenção do leite .....	64
2.3. Coleta e análise química do sangue .....	65
2.4. Análise química da atividade antioxidante do leite .....	65
2.5. Hidroperóxidos de dieno conjugados (DC) no leite .....	66
2.6. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no leite .....	66
2.7. Determinação de ácidos graxos .....	66
2.8. Qualidade nutricional da fração lipídica do leite.....	67
2.9. Análises estatísticas .....	67
<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>68</b>
3.1 Consumo e desempenho .....	68
3.2 Produção, composição, perfil oxidativo e atividade antioxidante .....	69
3.3 Parâmetros sanguíneos .....	74
<b>4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>75</b>
4.1 Consumo e desempenho das ovelhas e de seus cordeiros .....	75
4.2 Produção, composição química do leite e concentração de ácidos graxos.....	76
4.3 Perfil sanguíneo .....	79
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>81</b>



<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>81</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>82</b>
<b>II - COMPARAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS EM LEITE OVINO POR CROMATOGRAFIA GASOSA.....</b>	<b>90</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>90</b>
<b>COMPARISON OF ANALYTICAL METHODS FOR DETERMINING FATTY ACID PROFILE IN SHEEP MILK BY GAS CHROMATOGRAPHY .....</b>	<b>91</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>91</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>92</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>93</b>
2.1. Matéria - prima .....	93
2.2. Métodos de extração da fração lipídica .....	93
2.3. Derivatização .....	94
2.4. Análise por Cromatografia Gasosa acoplada ao Detector de Ionização em Chamas - GC- FID.....	95
<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>96</b>
3.1. Área percentual do perfil de ácidos graxos .....	96
<b>4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>98</b>
4.1. Determinação dos lipídios ou gordura total.....	98
4.2. Cromatografia Gasosa acoplada ao Detector de Ionização de Chama (GC-FID) .....	99
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>100</b>
<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>101</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>102</b>
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>105</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### Considerações Gerais

Uma adequada nutrição da ovelha no terço final da gestação e durante a lactação tem como objetivos prioritários um maior crescimento do feto, desenvolvimento do úbere e de sua capacidade de produzir colostro e leite, bem como um menor desgaste das reservas corporais das matrizes, contribuindo assim para que estas cheguem à fase de acasalamento em bom estado nutricional, além de propiciar condições para aumentar o ganho de peso e reduzir a taxa de mortalidade das crias (BRONDANI *et al.*, 2016). Assim tornam-se indispensáveis estudos que mostrem novas possibilidades de suplementação ou mesmo indiquem uma melhor utilização dos recursos já existentes (LORENZO; GÓMEZ, 2012; ZEOLA *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2019).

Em relação aos produtos advindos de ruminantes, estes requisitos têm sido atendidos por meio da modificação do perfil lipídico da gordura do leite, através da manipulação da dieta com aumento na concentração dos ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) (PETIT, 2015), especialmente os ácidos graxos da família ômega, em função de seus potenciais efeitos anticarcinogênicos, preventivo de doenças cardiovasculares e moduladores do sistema imunológico (LUCATTO; BRANDÃO; DRUNKLER, 2014).

A soja (*Glycine max (L.) Merrill*) é uma oleaginosa que apresenta 18% de gordura, rica em ácidos graxos poli-insaturados (ômega 6), seu fornecimento na dieta animal pode elevar a qualidade nutricional do leite, pois tanto o leite como seus derivados, oriundos de animais alimentados com soja, poderão apresentar maiores concentrações de (PUFA), que propiciam benefícios à saúde humana (CARRÃO-PANIZZI; SILVA, 2011).

Embora a alimentação com a soja em grão demonstre ser uma alternativa viável para o aumento no teor de PUFA na gordura do leite, a modificação no perfil de ácidos graxos também pode transformar várias propriedades físicas e químicas da gordura, como a firmeza, o ponto de fusão, a viscosidade, a estabilidade oxidativa e o “*flavor*” (sabor e/ou odor) (CARDOZO *et al.*, 2013). Baseado nessa informação sabe-se que os lipídios do leite são protegidos contra a oxidação por antioxidantes naturais enzimáticos e não enzimáticos (MATUMOTO-PINTRO *et al.*, 2011). Dentre os antioxidantes destaca-se os encontrados na erva-mate (*Ilex paraguariensis*) por ter um papel na preservação dos PUFA (BRACESCO *et al.*, 2011).

A erva-mate possui propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias (FAGUNDES *et al.*, 2015), além de demonstrar maior concentração de polifenóis que o chá verde, o que lhe confere uma maior capacidade antioxidante e maior inibição de radicais livres (HARTEMINK *et al.*, 2015). São ainda encontrados 196 compostos voláteis, como ácido clorogênico que são radicais livres e sequestrantes de metais (SANTOS *et al.*, 2017). A erva-mate ainda apresenta em sua composição saponinas, cafeína e teobromina, além de possuir vitaminas, potássio, magnésio, cálcio, manganês, ferro, selênio, fósforo e zinco (FAGUNDES *et al.*, 2015).

Neste contexto, sugere-se que erva-mate poderia impedir a oxidação no leite enriquecido com PUFA e fornecer aos consumidores produtos lácteos benéficos a saúde (SANTOS *et al.*, 2017). Assim a hipótese desse trabalho foi de que a inclusão de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) *in natura* na dieta pode melhorar o desempenho produtivo, as propriedades antioxidantes, além de diminuir a lipoperoxidação no leite de ovelhas F1 Texel alimentadas com uma dieta enriquecida com soja grão, como uma fonte de ácidos graxos poli-insaturados. Além disso, buscou -se avaliar também os diferentes métodos de extração para lipídios totais e o efeito destas metodologias sobre a composição quantitativa de ácidos graxos (por meio de fatores de resposta do detector de ionização de chama e padrões internos) em leite de ovelhas lactantes criadas em pastagens tropicais.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Panorama da Ovinocultura Leiteira no Brasil**

A produção de leite, em todo o mundo, foi de aproximadamente 513 milhões de toneladas no ano de 2019 (USDA, 2019), sendo que cerca de 10 milhões de toneladas foram provenientes de ovinos (FAO, 2017). Os principais países produtores de leite de ovelha são a China, Turquia e Grécia. Já os produtos lácteos de ovelhas são encontrados com mais facilidade nos mercados de países como a China, Síria, Iran, Turquia e Argélia (FAO, 2020).

Já no Brasil a ovinocultura alcança o montante de 18,9 milhões de cabeças. Visto que a região Nordeste possui a maior concentração do rebanho do país, com cerca de (67%), seguida das regiões Sul (21,2%), Centro-Oeste (5,40%), Sudeste (3,50%) e Norte (3,20%) (IBGE, 2019). Na região Centro Oeste, o Estado de Mato Grosso do Sul possui um plantel de 436 mil cabeças (2,3% do rebanho nacional), o que representa 43% do rebanho regional (EMBRAPA, 2019).

Uma novidade no Censo Agropecuário de 2017 é o levantamento das estatísticas da ovinocultura leiteira. De acordo com o levantamento realizado, cerca de 750 estabelecimentos agropecuários declararam produzir leite de ovelhas, representando um rebanho de 5,7 mil ovelhas ordenhadas, produzindo 1,72 milhões de litros de leite de ovelha. A produtividade média obtida é 300 litros/cabeça/ano” (NÓBREGA, 2018). Deste total o Estado de Mato Grosso do Sul contribui com 18 mil litros de leite, que representam um total de 54 mil ovelhas ordenhadas, com uma produção média de 339,44 litros/cabeça/ano (IBGE, 2017).

Enquanto o volume de leite comercializado alcançou 1 milhão de litros, movimentando cerca de R\$ 2,75 milhões. Sendo que “O preço médio de venda do litro de leite de ovelha foi de R\$ 2,74, equivalente a uma agregação de valor superior a 27%, quando comparado ao leite de cabra, refletindo o potencial de mercado que este produto vem demonstrando no nosso país” (NÓBREGA, 2018).

Já em termos de legislação, o Brasil não consta com um regulamento técnico exclusivo para o leite ovino, apresentando publicações como a Instrução Normativa 62/2011 que fixa regras gerais sobre a produção, identidade e qualidade do leite (com exceção do leite de cabra que possui um regulamento técnico específico IN 37/2000) (BRASIL, 2011). Entretanto, os produtos desenvolvidos a partir do leite de ovelha são inscritos na Divisão de Inspeção de Leite e Derivados (DILEI) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (MERLIN JUNIOR *et al.*, 2015), com base em literaturas científicas e outras publicações devido à ausência de Regulamento Técnico específico.

Ainda assim, já existem laticínios específicos para o beneficiamento deste leite, que são inspecionadas pelo SIF – Serviço de Inspeção Federal, além de produtores de queijos habilitados para exportação (BRASIL, 2020). Os principais derivados lácteos produzidos com SIF são os queijos Tipos Pecorino, Toscano Fresco e Maturado, queijo Fascal, Tipo Feta, Tipo Roquefort, Ricota Fresca (PELLEGRINI *et al.*, 2013).

## **2.2 Produção**

Segundo estatísticas da FAO – *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO, 2017), a produção mundial de leite de ovelhas, corresponde a 1,4% da produção total de leite no mundo. Enquanto, no Brasil a produção e o processamento industrial, correspondem 0,0019% do total de leite produzido, isto ocorre devido a atividade leiteira ovina em escala industrial ainda ser recente, mas em crescimento (ROHENKOHL, 2011). O que

posiciona a ovelha (*Ovis aries*), como a quarta espécie produtora de leite do mundo, estando atrás das espécies bovina, bubalina e caprina (IBGE, 2018a).

Embora, em termos quantitativos, a produção de leite de ovelha seja de importância marginal em comparação ao leite de vaca, é de grande interesse o incremento do consumo de seus derivados, visto que os ovinos são animais amplamente adaptados aos mais diversos climas e disseminados por todo o planeta (PELLEGRINI *et al.*, 2013).

Dentre os maiores produtores de leite de ovelha destacam-se os países do Mediterrâneo (Itália, Turquia, Grécia, Espanha, França e Portugal), o que corresponde a dois terços da produção de leite de ovelha no mundo (MERLIN JUNIOR *et al.*, 2015). Entretanto, é a China, o país com maior volume de leite produzido, com cerca 12,2% da produção mundial de leite ovino (FAO, 2017).

A ovinocultura leiteira no Brasil, como atividade agroindustrial tecnificada é recente, tendo seu início o ano de 1992, por intermédio da importação de animais da raça francesa Lacaune no Rio Grande do Sul (MERLIN JUNIOR *et al.*, 2015). Contudo, dentre as raças leiteiras que foram introduzidas no Brasil, as que estão em destaque são: Santa Inês, East Friesian ou Milchschaf (origem Alemã), Bergamácia, Corriedale, dentre outras ou até mesmo cruzamentos entre estas (MATOS; SANTOS, 2018).

A raça Texel é de origem holandesa, ovino de porte médio, e é considerada uma raça de dupla aptidão, produzindo carne de excelente qualidade, com gordura reduzida e, também, uma boa quantidade de lã (ARCO, 2021), estando entre as raças mais exploradas no estado do Rio Grande do Sul, uma vez que esta apresenta uma boa performance para aptidão leiteira, o que permite novos modelos de ovinocultura que garantam a competitividade e sustentabilidade, já que muitos produtores gaúchos estão reestruturando seus rebanhos, passando a trabalhar com raças de dupla aptidão (carne e lã) e com raças específicas para a produção de carne (FONTOURA *et al.*, 2020; MENEZES *et al.*, 2021). Na Tabela 1 encontram - se as características de produção e tempo de lactação entre raças ovinas.

**TABELA 1** – Características de produção e tempo de lactação entre raças ovinas

Raça	Produção	Lactação
Lacaune	1,30 litros/dia	160 dias
Santa Inês	1,05 a 1,70 litros/dia	210 dias
Bergamácia	2,00 litros/dias	160 dias
East Friesian	1,88 litros/dia	220 dias

Corriedale	1,49 litros/dia	90 dias
Texel	1,43 litros/dia	49 dias

Fonte: adaptado de ZEPPEFELD *et al.*, 2007; MATOS; SANTOS (2018).

No entanto, muitos fatores contribuem para as variações na produção e na qualidade do leite de ovelhas, tais como, o ambiente, a raça, idade da ovelha, estágio da lactação, número de cordeiros, técnicas de ordenha, estado sanitário, infecções de úbere, manejo do rebanho e nível nutricional durante a gestação e lactação (ZEPPEFELD *et al.*, 2007).

### 2.3 Composição

O leite de ovino apresenta como característica sabor suave e levemente adocicado, com aroma próprio, além de possuir uma coloração branca intensa e homogênea (PARK *et al.*, 2007). Ademais, o leite ovino caracteriza-se pelo seu alto valor biológico, isto se deve as características dos seus constituintes, como se verifica na Tabela 2.

**TABELA 2** – Composição média dos nutrientes básicos em leite de cabra, de ovelha, de vaca e humano

Composição	Ovelha	Cabra	Vaca	Humano
Gordura (%)	7,9	3,8	3,6	4,0
Sólidos não gordurosos (%)	12,0	8,9	9,0	8,9
Lactose (%)	4,9	4,1	4,7	6,9
Proteína (%)	6,2	3,4	3,2	1,2
Caseína (%)	4,2	2,4	2,6	0,4
Albumina e Globulina (%)	1,0	1,0	0,6	0,7
Cinzas (%)	0,9	0,8	0,7	0,3

Fonte: Adaptado de PARK *et al.* (2007).

O leite ovino é mais rico em gordura, proteínas, cinzas, cálcio, ferro, manganês, fósforo, zinco, ácidos graxos (AG) de cadeia média, AG monoinsaturados (AGMI), ácido linolênico, todos os aminoácidos essenciais e vitaminas (exceto para caroteno) quando comparado aos leites bovino e caprino (PARK *et al.*, 2007). O que torna tais atributos relevantes na produção

de queijos, gerando sabores e texturas inigualáveis de alto valor mercadológico (CORRÊA *et al.*, 2014). Assim, cerca de 5,5 litros de leite de ovelha são necessários para fabricar 1 kg de queijo, ao passo que são necessários 11 litros de leite de vaca para produzir a mesma quantidade (NEVES *et al.*, 2014).

Por outro lado, as características de muitos produtos lácteos como queijos, iogurtes e manteiga, dependem das propriedades físico-químicas que compõe o leite (FARIAS; TAVARES; ALBANDES, 2017). A Tabela 3 apresenta variações nas propriedades físico-químicas do leite de ruminantes.

**TABELA 3** - Propriedades físico-químicas do leite de ruminantes

Propriedades	Leite de Ovelha	Leite de Cabra	Leite de Vaca
Densidade relativa	1,0347 – 1, 0384	1,029 – 1, 039	1,0231 – 1, 0398
Viscosidade	2,86 – 3,93	2,12	2,0
Índice de refração	1,3492 – 1, 3497	1,450 ± 0,39	1,451±0,35
Ponto de congelamento (-°H)	0,570	0,540 0, 570	0, 30 – 0,570
Acidez (Ácido láctico %)	0,22 – 0,25	0,14 – 0,23	0,15 – 0,18
pH	6,51 – 6,85	6,50 – 6,80	6,65 – 6,71

Fonte: Adaptado de PARK *et al.* (2007).

De um modo geral, o leite de pequenos ruminantes exibe composição bioquímica diferenciada, indicando maior viscosidade e acidez, mas menores índices de refração e ponto de congelamento em relação ao leite bovino (MERLIN JUNIOR *et al.*, 2015).

#### 2.4 Características da gordura do leite ovino

Os lipídios são um dos elementos mais estudados no leite, pois estes representam o maior valor energético do leite além de serem fontes de ácidos graxos essenciais. Eles são os componentes mais importantes do leite em termos de custo, nutrição e características físicas e organolépticas (PARK *et al.*, 2007; MENDONÇA *et al.*, 2010; CATUNDA *et al.*, 2016).

O leite ovino contém aproximadamente 7,9% de gordura (PARK *et al.*, 2007), sendo que este componente está presente no leite na forma de glóbulos, variando em quantidade por fatores fisiológicos e ambientais, dependendo da dieta, raça, período de lactação, etc. (MENDONÇA *et al.*, 2010).

Em média, 98% do teor de gordura do leite é formado principalmente por triglicerídeos e os outros 2%, por fosfolipídeos, colesterol, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e ácidos graxos livres, além de hidrocarbonetos e vitaminas lipossolúveis (PARK *et al.*, 2007). Os ácidos graxos que constituem o leite são derivados da alimentação e da atividade microbiana ruminal (MICIŃSKI *et al.*, 2012).

No rúmen, os lipídeos dietéticos são hidrolisados em ácidos graxos livres e glicerol, através da ação de lípases microbianas. O glicerol liberado é utilizado para produção de ácidos graxos voláteis (acetato, butirato e propionato) que são absorvidos através da parede ruminal. O acetato e o  $\beta$ -hidroxibutirato chegam à glândula mamária através da circulação sanguínea, onde será substrato a *síntese de novo* dos ácidos graxos de cadeia curta e média (AGCCM – C4:0 a C8:0 e 50% de C10-16) (MICIŃSKI *et al.*, 2012).

À medida que ocorre a degradação dos lipídios, os ácidos graxos insaturados, que são quimicamente mais instáveis, e não passam pela membrana da bactéria são biohidrogenados no rúmen. Assim, durante esse processo às bactérias ruminais saturam as ligações duplas dos ácidos graxos insaturados, com adição de hidrogênio (ZHAO *et al.*, 2013). Alguns ácidos graxos conseguem escapar antes da conclusão de todas as etapas, originando os produtos intermediários da biohidrogenação ruminal incompleta. Posteriormente, os ácidos graxos são absorvidos por meio da parede intestinal e transportados através de lipoproteínas, para glândula mamária, onde dão origem aos ácidos graxos de cadeia longa (maiores que C18:0) e finalmente os ácidos graxos sintetizados na própria glândula mamária ou retirados da circulação arterial são incorporados aos triacilgliceróis do leite (ZHAO *et al.*, 2013).

Antes da ocorrência da biohidrogenação dos AGPI, no rúmen, ocorre uma isomeração posicional da ligação dupla dos ácidos graxos, passando de *cis* para *trans*. Com isso a carne e o leite de ruminantes são importantes fontes de ácidos graxos-*trans* (JENKINS; HARVATINE, 2014).

O leite ovino é composto por 62,91% de ácidos graxos saturados (AGS), 22,02 % de ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) e 4,58% de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), sendo os principais representantes de cada categoria os ácidos, palmítico (20, 27%), esteárico (13, 95%) e mirístico (9, 27%); oléico (12, 90%); linoléico (1, 69%) e linolênico (1, 37%). Por sua vez, o leite de ovelha tem maiores teores de ácidos graxos *trans*, do que o leite vaca e o de cabra, respectivamente (PELLEGRINI *et al.*, 2012).



## 2.5 Efeitos dos lipídeos na produção e composição do leite

O principal nutriente que limita a produção de leite é a energia (STRADIOTTO *et al.*, 2010). Maiores exigências são verificadas em ovelhas nas primeiras oito semanas de lactação (NRC, 2007). A produção e composição do leite, assim como suas características físico-químicas podem ser alteradas, por meio da utilização de lipídios na alimentação animal (MAIA; PARENTE; ARAÚJO, 2011). Outro interesse é na busca da produção de compostos alimentares benéficos à saúde humana, haja vista que o enriquecimento do leite pode ser realizado, através da incorporação de moléculas nutracêuticas, como o ácido graxo ômega e o ácido linoléico conjugado (CLA) (CARDOZO *et al.*, 2013).

De acordo com Palmquist; Matos (2011) a utilização de suplementações com gordura de até 5-7% desta na matéria seca pode ser inserida na dieta de ruminantes. Porém, modificações nas características dietéticas causam alterações na depressão da gordura ao promoverem redução da atividade microbiana no rúmen, diminuição da síntese de ácidos graxos de cadeia curta no úbere e decréscimo na absorção de metabólitos do sangue pela glândula mamária (NUDDA *et al.*, 2014).

Exatamente porque a resposta da utilização da suplementação de gordura na dieta difere entre as espécies de ruminantes, em particular o teor de gordura no leite de cabras e ovelhas aumenta, ao contrário do que acontece com o teor de gordura do leite de vaca (COSTA; QUEIROGA; PEREIRA, 2009).

Dessa forma, respostas distintas à suplementação lipídica entre ruminantes podem ser encontradas, uma vez que a quantidade de gordura dietética transferida diretamente para a gordura do leite é variável e está ligada a complexas interações digestivas e metabólicas entre a dieta basal (natureza e proporção de forragens e concentrados), suplementação lipídica (natureza, tipo, quantidade) e características animais (espécie, estágio de lactação, potencial produtivo, etc.) (MAIA; PARENTE; ARAÚJO, 2011).

Para alterar os níveis de AGPI no leite, a ingestão de óleos ricos em AGPI e o emprego de fatores que reduzam sua hidrogenação no rúmen têm sido utilizados. O emprego de gordura protegida, compreendida por sais de cálcio mais lipídeos ou gordura inerte, tem elevado o teor de gordura do leite de ovelhas, refletindo na composição dos ácidos graxos. Paralelamente a este efeito, é comum observar redução do teor de proteína do leite nessas dietas (NUDDA *et al.*, 2014).

Sampelayo *et al.* (2007) afirmam ainda que, algumas pesquisas com suplementação lipídica envolvendo ovelhas leiteiras têm sido realizadas devido aos resultados promissores encontrados com cabras e vacas. Gómez-Cortés *et al.* (2008) ao avaliarem a inclusão de altos teores de óleo de oliva (6% na MS) na dieta de ovelhas lactantes relataram aumento na produção de leite, gordura, proteína e sólidos totais. No entanto, houve redução na porcentagem dos ácidos graxos de cadeia média (C10:0 a C16:0) e aumento dos ácidos graxos (C18:0 a C18:1) no leite dos animais que receberam óleo de oliva na dieta.

Gómez-Cortés *et al.* (2011) analisaram os níveis crescentes de inclusão de óleo de girassol (17, 34 e 51g de óleo por Kg de MS) na dieta de ovelhas leiteiras da Raça Assaf, concluíram que não houve diferença entre os tratamentos em relação à produção de leite, teor de gordura, proteína e lactose. Porém, o perfil de ácidos graxos foi substancialmente modificado. O tratamento com maior inclusão de óleo causou maior enriquecimento de CLA e diminuiu a quantidade de ácidos graxos saturados.

Zeola *et al.* (2015) incluíram 70 e 140 g kg<sup>-1</sup> de soja no concentrado de ovelhas em lactação e não encontraram diferenças entre os tratamentos em relação à produção de leite, teor de gordura, sólidos totais, proteína e lactose, assim como não houve diferença entre os ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados. Todavia, houve aumento no ácido linoléico no leite das ovelhas alimentadas com 140 g de soja kg<sup>-1</sup> em comparação com aquelas alimentadas com a dieta controle e 70 g de kg de soja<sup>1</sup>.

## 2.6 Suplementação lipídica com soja em grão

A soja (*Glycine max (L.) Merrill*) pertence à família *Leguminosae*, subfamília *Papilionoidae* e é uma das principais fontes de proteína e óleo vegetal do mundo. Foi consolidada na década de 1970 como a principal cultura do agronegócio no Brasil, pelo programa oficial de incentivo à triticultura nacional (EMBRAPA, 2020). Em 1954, ocorreu o primeiro grande plantio em 43 hectares desta espécie no estado do Paraná (ZALESKI TRINDADE, 2018).

No Brasil a produção de soja foi de 124 milhões de toneladas na safra 2021/2022, em uma área total de 41 milhões de hectares (CONAB, 2022). Os maiores produtores do mundo são segundo a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO, 2019), os Estados Unidos, Brasil e Argentina, responsáveis por 82% das exportações mundiais com controle do mercado internacional desta commodity.

A soja em grão é muito versátil quanto ao uso, não é apenas uma fonte de óleo comestível para humanos, mas também uma proteína vegetal de alta qualidade para rações animais, além de dar origem a produtos e co-produtos muito usados pela agroindústria, indústria química e bicombustíveis (CARRÃO-PANIZZI; SILVA, 2011).

A soja contém em sua composição aproximadamente 18% de extrato etéreo, 40% de proteína bruta e 93% de NDT, além de ser utilizado com intuito de ser fonte de proteína e também fonte de gordura boa, por possuir elevado teor de ácidos graxos insaturados (NRC, 2007). É também a leguminosa que possui maior conteúdo de proteína, em comparação com o feijão preto (21,3%), a ervilha em vagem (7,5%) e o amendoim (27,2%) (TACO, 2011).

Além disso, a soja apresenta em sua constituição aminoácidos essenciais como a lisina (6,9%), leucina (5,1%), fenilalanina (5,0%), treonina (4,3%), metionina, cistina e triptofano e não-essenciais como o ácido glutâmico (21%), ácido aspártico (12%) e, em menor quantidade, a arginina e a tirosina. Os carboidratos são o segundo componente mais abundante na soja e representam entre 30 e 35% dos componentes do grão (MANDARINO, 2010).

Além do mais, a soja em grão pode ser fornecida crua aos ruminantes, já que os fatores antinutricionais, para esta espécie, não apresentam um efeito significativo, como ocorre nos animais monogástricos (RENNÓ *et al.*, 2015).

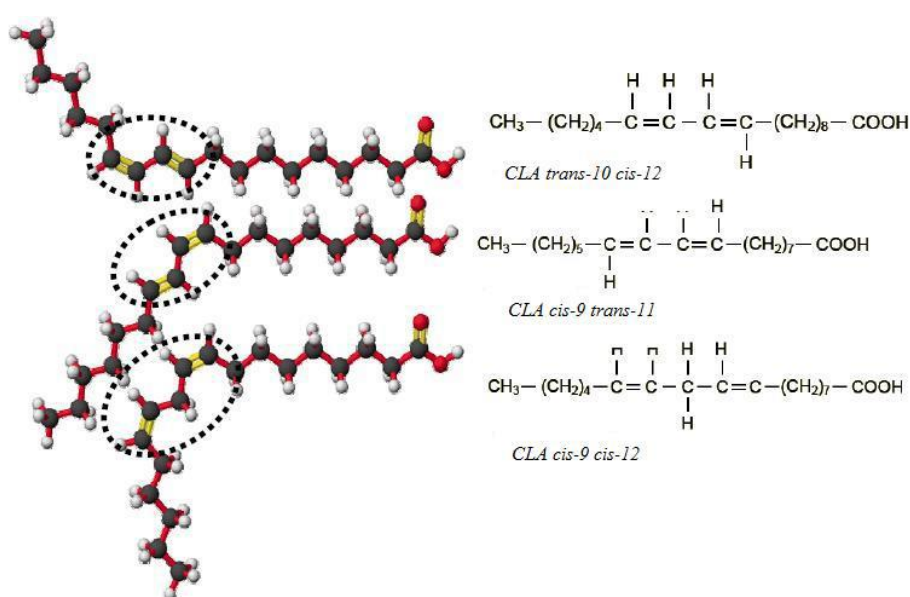
## **2.7 Ácido linoléico conjugado (CLA)**

Recentemente várias pesquisas têm sido executadas com o intuito de modificar a composição da gordura do leite, tornando-a mais adequada ao consumo humano (LOPES *et al.*, 2011; FUKU *et al.*, 2014; LUCATTO; BRANDÃO; DRUNKLER, 2014; DE LIMA *et al.*, 2018). Assim sendo, com foco na prevenção e na redução do risco de algumas doenças tem-se buscado a diminuição dos teores dos ácidos graxos saturados de cadeia média, como o láurico (C12:0), mirístico (C14:0) e palmítico (C16:0), e o incremento da concentração do ácido oléico (C18:1 cis-9) no leite (BARROS *et al.*, 2013).

Outro alvo dos estudos têm sido aumentar a concentração do CLA (do inglês conjugated linoleic acids), presente no leite, cujas propriedades anticarcinogênicas, antiaterogênicas, antidiabetogênicas (diabetes do tipo II) e imunomodulatórias têm sido demonstradas (YANG *et al.*, 2015). Assim, a elevação da concentração do ácido vacênico (C18:1 trans-11) nos derivados lácteos também é relevante, visto que ele é o principal precursor para a síntese

endógena do CLA na glândula mamária, sendo este responsável por 80% do CLA presente no leite (COSTA; QUEIROGA; PEREIRA, 2009).

O CLA corresponde a uma mistura de isômeros posicionais geométricos do ácido linoléico, com duplas ligações conjugadas, ou seja, separadas por simples ligação carbono-carbono (FUKE *et al.*, 2014). Essas configurações podem ser do tipo *cis* ou *trans*, e as duplas ligações estão presentes predominantemente nas posições 8 e 10, 9 e 11, 10 e 12 ou 11 e 13 (DE LIMA *et al.*, 2018). A Figura 1 apresenta a estrutura dos isômeros de CLA *trans*-10, *cis*-12, *cis*-9, *trans*-11 e do ácido linoléico (C18:2 *cis*-9, *cis*-12).



**FIGURA 1** - Estrutura dos isômeros de CLA *trans*-10, *cis*-12, *cis*-9, *trans*-11 e do ácido linoléico (C18:2 *cis*-9, *cis*-12)

Fonte: PARIZA; PARK; COOK (2001).

As principais fontes de CLA na dieta humana são o leite e seus derivados lácteos e a carne (LUCATTO; BRANDÃO; DRUNKLER, 2014). As concentrações de CLA em produtos lácteos variam de 2,9 a 8,2 mg/g de gordura, sendo que o isômero *cis*-9, *trans*-11 representa entre 73 a 93 % do total de CLA (FUKE *et al.*, 2014). Estima-se que a população brasileira consuma 36 mg/dia de CLA na forma de produtos lácteos, dos quais 85% são representados principalmente pelo leite integral (7,2 mg/g de gordura) (NUNES; TORRES, 2010). Na Tabela 4, tem-se a concentração do CLA em alguns alimentos que normalmente compõem a dieta humana.

**TABELA 4** - Concentração do ácido linoléico conjugado total e CLA *cis*-9, *trans*-11 em diferentes alimentos

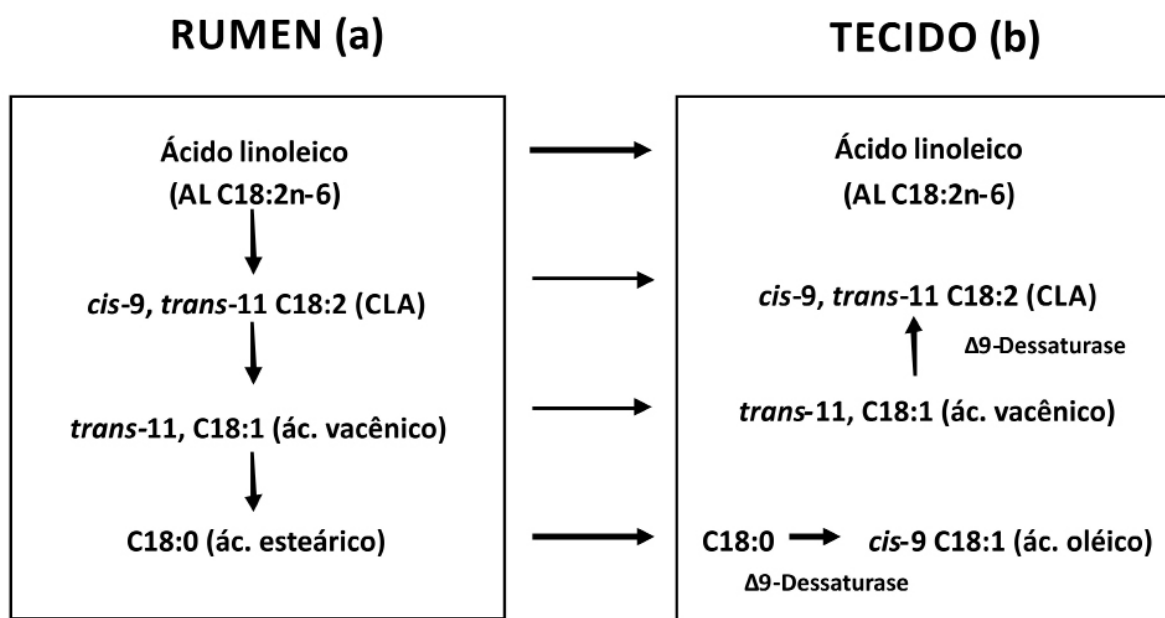
Alimentos	CLA total (% de gordura)	CLA <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 (% do total de CLA)
Queijo Cheddar	0,40-0,53	78-82
Queijo Cottage	0,45-0,59	83
Queijo Mussarela	0,34-0,50	78-95
Manteiga	0,47-0,94	78-88
Iogurte integral	0,38-0,88	83-84
Iogurte light	0,44	86
Carne bovina moída	0,16-0,43	72-85
Leite ovino	0,6 e 1,0	83- 90
Iogurte de ovelha	0,52	80
Queijo pecorino (ovino)	0,025	77

Fonte: adaptado de PRANDINI; SIGOLO; PIVA (2011); DHIMAN; NAM; URE (2005).

Todavia, uma série de fatores ligados ao manejo nutricional (composição e disponibilidade), às características individuais dos animais (raça, estágio de lactação, condição corporal), e ambientais (principalmente estresse por calor e calor) influenciam no conteúdo de CLA do leite (NUDDA *et al.*, 2014). Porém, dentre todos estes citados, a dieta dos animais é o fator mais importante por influenciar diretamente o perfil de ácidos graxos do leite, e por estar associada ao aumento do teor do CLA (URBANO *et al.*, 2014). Principalmente se a fonte lipídica utilizada tiver alto teor de ácido linoléico ou ácido linolênico em sua composição (NUDDA *et al.*, 2014).

Assim, os lipídios ingeridos por esses animais passam por importantes transformações no rúmen, denominadas de biohidrogenação. Este processo ocorre de duas formas: com a isomerização da dupla ligação *cis*-12 de ácidos graxos insaturados contendo duplas ligações nas posições *cis*-9, *cis*-12 (Ácido Linoléico,  $\alpha$ - e  $\gamma$ -linolênico). Em seguida, o isômero *cis*-9, *trans*-11 são reduzidos a ácido vacênico (BUCCIONI *et al.*, 2012). O ácido vacênico por sua vez é o intermediário da biohidrogenação do ácido linoléico a ácido esteárico e é acumulado no rúmen. Já a segunda etapa do processo ocorre quando ácido esteárico acumulado no rúmen, é absorvido pelas glândulas mamárias e serve como substrato para a síntese endógena do isômero *cis*-9, *trans*-11 no tecido mamário, pela ação da enzima  $\Delta$ 9-dessaturase durante a síntese lipídica

do leite (URBANO *et al.*, 2014). A Figura 2 demonstra as etapas do processo de biohidrogenação do ácido linoléico.



**FIGURA 2** - a) Via metabólica de biossíntese do CLA no rúmen, b) Via metabólica de biossíntese do CLA no tecido.

Fonte: LUCATTO; BRANDÃO; DRUNKLER (2014).

Assim, na tentativa de aumentar o valor nutricional da gordura do leite em ovelhas, Toral *et al.* (2010a) avaliaram o perfil de ácidos graxos do leite em ovelhas suplementadas com três níveis crescentes de algas marinhas (8, 16 e 24 g/Kg de MS), em combinação com óleo de girassol, e observaram um aumento, da concentração de CLA e do ácido vacênico no leite dessas ovelhas. Em outro estudo, Toral *et al.* (2010b) avaliaram a inclusão de óleo de peixe em combinação com óleo de girassol na dieta de ovelhas em lactação. Os autores compararam uma dieta sem suplementação lipídica (controle), (T2) - com 20g de óleo de girassol; (T3) - 10g de óleo de peixe; ou (T4) - 20g de óleo de girassol mais 10g de óleo de peixe e observaram que quando comparado com o controle, a suplementação lipídica melhorou conteúdo de leite do CLA (*cis-9, trans-11* CLA; em até quatro vezes). Sendo que todos os suplementos lipídicos resultaram em altos níveis de alguns ácidos graxos *trans*, principalmente *trans-11* C18:1 (ácido vacênico), mas também *trans-10* C18:1. O que demonstra que diferentes graus de enriquecimento da gordura do leite com o CLA são esperados quando utilizados diferentes óleos.

Nudda *et al.* (2014) ao agrupar dados de diferentes experimentos utilizando diferentes fontes de óleos observaram que em suplementações com linhaça há aumento do conteúdo de ácido vacênico, c9, t11 CLA e PUFA n-3. Já as suplementações com óleo de soja são mais eficazes que as com óleo de linhaça ou óleo de girassol em relação ao aumento do teor de CLA no leite e no queijo de ovelha. O que sugere que a biohidrogenação ruminal dos ácidos graxos insaturados é mais completa em ovelhas alimentadas com linhaça do que naquelas alimentadas com soja e, portanto, a quantidade de ácido vacênico e CLA que flui através do duodeno é maior em ovelhas alimentadas com dietas suplementadas com óleos ricos em ácido linoléico.

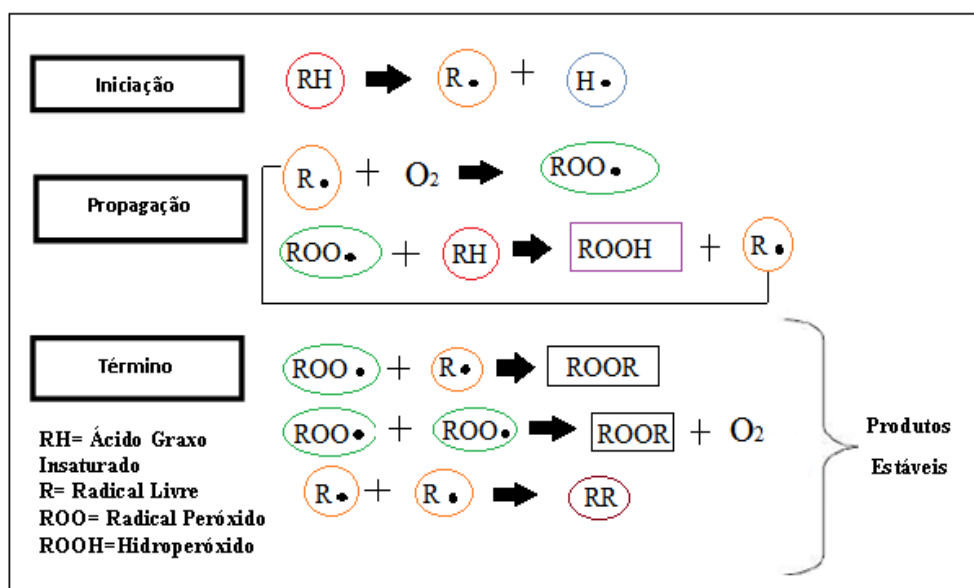
## 2.8 Oxidação lipídica

Oxidação lipídica é o termo utilizado para caracterizar uma sequência de modificações químicas resultantes da interação de lipídeos com o oxigênio (MCCLEMENTS; DECKER, 2010). Os principais problemas decorrentes da oxidação dos lipídios são as alterações sensoriais que resultam no desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis (*off flavors*) tornando o leite impróprio para consumo (SOARES *et al.*, 2012), além de também causar outras mudanças que irão afetar não só a qualidade nutritiva, mas também a integridade e segurança do alimento (LIMA JÚNIOR *et al.*, 2013).

Em todos os mecanismos de oxidação lipídica o principal alvo de ataques são os radicais livres dos lipídios, por serem constituídos por uma mistura de tri, di e monoacilgliceróis, ácidos graxos livres, glicolipídios, fosfolipídios, esteróis, etc. (RAMALHO; JORGE, 2006). Sendo que os triglicerídeos são os principais responsáveis pelo desenvolvimento do ranço (NELSON; COX, 2006). Os lipídios podem ser oxidados por diferentes caminhos, tais como: fotooxidação, autooxidação e oxidação enzimática (LIMA JÚNIOR *et al.*, 2013).

A fotooxidação de gorduras insaturadas é causada principalmente pela radiação ultravioleta em presença de fotossensibilizadores (clorofila, mioglobina, riboflavina) que absorvem a energia luminosa e a transferem para de oxigênio triplete ( $3O_2$ ) em oxigênio singlete ( $O_2$ ), sua forma mais reativa, cujas degradações posteriores originam aldeídos, álcoois e hidrocarbonetos (RAMALHO; JORGE, 2006; SOARES *et al.*, 2012; LORENZO; GÓMEZ, 2012).

A autooxidação apresenta-se como o principal procedimento de oxidação de lipídios em alimentos, ocorrendo em três etapas (iniciação, propagação e terminação) que leva à formação de radicais livres (Figura 3).



**FIGURA 3** - Esquema geral do mecanismo da oxidação lipídica

Fonte: RAMALHO; JORGE (2006).

**Iniciação** – ocorre quando os ácidos graxos poli-insaturados sofrem a reação de quebra da ligação com um átomo de hidrogênio do carbono alílico na molécula do ácido graxo, em condições favorecidas por luz e calor. Este composto se torna um radical livre, substância altamente reativa devido à presença de um elétron desemparelhado, cuja ação desencadeia a reação oxidativa (KOŁAKOWSKA; BARTOSZ, 2014).

**Propagação** – os radicais livres que são prontamente susceptíveis ao ataque do oxigênio atmosférico, são convertidos em outros radicais, aparecendo os produtos primários de oxidação (peróxidos e hidroperóxidos) cuja estrutura depende da natureza dos ácidos graxos presentes. Os radicais livres formados atuam como propagadores da reação, resultando em um processo autocatalítico (WÓJCIAK; DOLATOWSKI, 2012).

**Término** – nesta fase diminui o consumo de oxigênio, e os radicais livres passam a interagir entre si, formando produtos estáveis (produtos secundários de oxidação), causadores dos odores e sabores desagradáveis. Eles podem ser aldeídos, álcoois e outros compostos voláteis e não voláteis (WÓJCIAK; DOLATOWSKI, 2012).

A oxidação enzimática é uma reação importante, pois, limita o tempo de prateleira de vários alimentos. Ela ocorre por meio das enzimas lipoxigenases que agem sobre os ácidos graxos poli-insaturados, catalisando a adição de oxigênio à cadeia hidrocarbonada poli-insaturada. Como resultado tem-se a criação de peróxidos e hidroperóxidos com duplas ligações



conjugadas que podem desenvolver diferentes reações degradativas (LORENZO; GÓMEZ, 2012; LIMA JÚNIOR *et al.*, 2013).

Diversos fatores estão relacionados à ocorrência dos fenômenos de oxidação lipídica dentre eles o tipo de estrutura lipídica e o meio onde se encontram. Além disso, o número e natureza das insaturações dos ácidos graxos, a exposição à luz, ao calor, e a presença de pró-oxidantes metálicos ou de fatores antioxidantes, presença de enzimas, microrganismos e as condições de armazenamento são determinantes para estabilidade oxidativa dos lipídeos (CLAUSEN *et al.*, 2010).

## **2.9 Influências da dieta sobre a estabilidade oxidativa do leite**

A resistência da gordura a oxidação em determinadas condições é definida como estabilidade oxidativa (ANTONIASSI, 2001). Ela é expressa como o período de tempo necessário para alcançar um determinado grau de oxidação (ex. desenvolvimento de rancidez, detecção de sabores indesejáveis, índice de peróxidos), que em geral aumenta abruptamente (LIMA, 2011). Utilizada como parâmetro global importante para prever o grau de degradação dos óleos e gorduras, por refletir na qualidade das matérias-primas, e condições a que foi submetido o produto durante o processamento e estocagem (ANTONIASSI, 2001).

A estabilidade oxidativa do leite e de seus derivados depende da composição química dos lipídeos, que é mais susceptível a oxidação conforme há aumento do teor dos ácidos graxos poli-insaturados (MATUMOTO-PINTRO *et al.*, 2011). O perfil de ácidos graxos do leite é reflexo da composição da dieta oferecida aos animais (GÓMEZ-CORTÉS *et al.*, 2011). Assim, a inclusão de AGPI na dieta de ruminantes acelera o processo de oxidação lipídica, por predispor à gordura do leite a degradação, bem como a formação de sabores indesejáveis e potencialmente tóxicos o que reduz o tempo de prateleira do produto (MATUMOTO-PINTRO *et al.*, 2011).

De acordo com Corredu *et al.* (2015) ao investigarem a estabilidade oxidativa do leite ovino, quando a dieta incluía uma fonte de polifenóis (semente de uva) e uma fonte de ácidos graxos poli-insaturados (linhaça). Os autores concluíram que a inclusão da linhaça na dieta aumentou a quantidade de AGPI no leite, o que torna o leite mais vulnerável à oxidação, entretanto a adição da semente de uva reduziu a formação dos produtos de oxidação secundária, assim, ofereceu uma proteção ao AGPI da linhaça.

O processo de oxidação se inicia na ligação carbono-hidrogênio adjacente à dupla ligação da cadeia de carbono e pode ser influenciada por vários fatores, especialmente ambientais (umidade, temperatura luz e oxigênio), presença de metais (cobre, ferro e manganês), de enzimas e pigmentos (JOHNSON; DECKER, 2015). Em um estudo realizado por Rafałowski *et al.* (2014) observaram que os isômeros *cis* e *trans* do C18:1 e o CLA foram particularmente importantes na redução da estabilidade oxidativa do leite. E que ácidos graxos de cadeia longa e ácidos graxos insaturados interferem negativamente no desempenho de algumas enzimas (superóxido dismutase e glutathione – peroxidase) que são importantes para regulação da taxa oxidativa da gordura, acelerando a formação de hidroperóxidos lipídicos (ZHAO *et al.*, 2013). Durante os processos oxidativos, as ligações duplas dos ácidos graxos insaturados são atacadas por radicais livres, o que faz com que a quantidade de ligações insaturadas seja determinante a formação dos produtos da oxidação (CORREDDU *et al.*, 2015).

Os efeitos nocivos dos radicais livres são minimizados pela ação associada de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos produzidos pelo próprio organismo ou absorvidos da dieta (KEBEDE; ADMASSU, 2019). Portanto, a suplementação com antioxidantes é uma forma potencialmente segura e efetiva de proteger leite da oxidação (JOHNSON; DECKER, 2015).

## 2.10 Antioxidantes

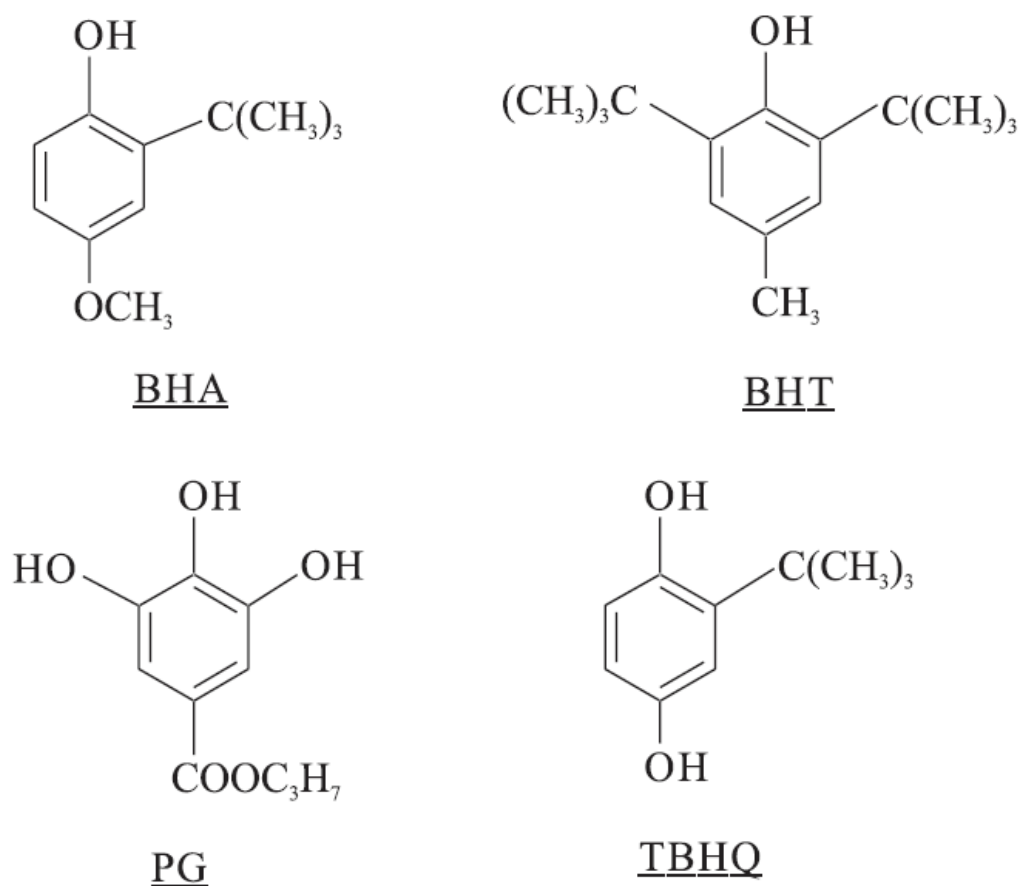
Um antioxidante é qualquer substância capaz de inibir ou retardar a oxidação de proteínas, carboidratos, lipídios e DNA (GODIC *et al.*, 2014), protegendo os sistemas biológicos contra os efeitos deletérios dos processos oxidativos (NEVES *et al.*, 2014). Para a indústria de alimentos, sua importância consiste na busca de melhorar o conteúdo nutricional de seus produtos e para isto precisa aprimorar aspectos de qualidade como a prevenção da rancidez, ou alterações na cor decorrentes da oxidação (DEL RÉ; JORGE, 2012).

Estas substâncias podem estar presentes naturalmente nos alimentos, mas também podem ser formados durante o processamento ou serem adicionadas aos produtos (SOARES *et al.*, 2012). Baseado no seu mecanismo de ação, os antioxidantes são classificados em primários (compostos que promovem ou inativam os radicais livres formados durante a iniciação ou propagação da reação, através da doação de átomos de hidrogênio), sinergistas (potencializam a atividade antioxidante), removedores de oxigênio (capturam o oxigênio presente no meio, indisponibilizando – o para atuar como propagador da reação oxidativa), biológicos (enzimas

com capacidade de remover o oxigênio ou compostos altamente reativos dos sistemas sujeitos a oxidação lipídica), agentes quelantes (complexam íons metálicos, que catalisam a oxidação lipídica) e mistos (dois ou mais mecanismos de ação combinados) (KEBEDE; ADMASSU, 2019). De maneira geral os antioxidantes são responsáveis por impedir a formação ou ataques dos radicais livres. Uma vez que estes já estão formados, os antioxidantes são capazes de reparar as lesões causadas pelos radicais livres através da reconstrução das membranas celulares danificadas (LOBO *et al.*, 2010).

Para aplicação em alimentos, algumas características são desejáveis: eficácia em baixa concentração (0,001 a 0,1%); ausência de efeitos tóxicos ou nocivos à cor, odor, sabor e a outras propriedades sensoriais do alimento; compatibilidade com o alimento, fácil aplicação; estabilidade nas condições de processo e armazenamento (RAMALHO; JORGE, 2006). Além disso, os antioxidantes têm ampla aplicação, pois são usados como aditivos em gorduras e óleos, pois quando são adicionados aos alimentos que contêm ácidos graxos insaturados impedem que fiquem rançosos, evitando a deterioração dos alimentos (SINDHI *et al.*, 2013).

Os antioxidantes sintéticos são aqueles que não ocorrem na natureza, mas são sintetizados quimicamente adicionados aos produtos alimentícios como conservantes para ajudar a prevenir a oxidação lipídica (DEL RÉ; JORGE, 2012), e os mais utilizados pela indústria para preservar os alimentos são: BHA (hidroxianisol butilado, BHT (hidroxitolueno butilado), PG (galato de propil), TBHQ (butilhidroquinona terciário) (SINDHI *et al.*, 2013). Os antioxidantes sintéticos possuem um anel fenólico, e agem por meio da doação de um próton a um radical livre, interrompendo o mecanismo de oxidação e diferem entre si pelas substituições nesse anel (Figura 4).



**FIGURA 4.** - Estrutura fenólica dos antioxidantes sintéticos BHA, BHT, PG e TBHQ

Fonte: RAMALHO; JORGE (2006).

No Brasil, as concentrações máximas permitidas para serem adicionadas em óleos e gorduras são de 100 mg/kg para BHT e o PG, e 200 mg/kg para o BHA e o TBHQ (BRASIL, 1988), e de 200 mg/kg (sobre o teor lipídico) de BHA, BHT, PG e TBHQ em margarinas (BRASIL, 2005). No entanto, apesar de serem muito efetivos e estáveis, os antioxidantes sintéticos apresentam o uso restrito em alguns países desenvolvidos devido à possibilidade de causarem efeitos indesejáveis em enzimas de vários órgãos, como inflamações e formação de tumores (CUTRIM *et al.*, 2019).

Assim, com a restrição por parte dos países desenvolvidos à adição de antioxidantes sintéticos em alimentos e rações, principalmente diante da comprovação de efeitos maléficos causados por esses principais antioxidantes (SOARES *et al.*, 2012) iniciou-se o grande interesse em encontrar novos antioxidantes que sejam seguros e provenientes de fontes naturais (SANTOS *et al.*, 2014).

Antioxidantes naturais são aqueles encontrados em frutas, verduras, grãos, óleos e legumes e carne (NEVES *et al.*, 2014). Naturalmente os antioxidantes podem ser encontrados em todas as partes da planta, como frutas, semente de nozes, folhas, raízes e cascas (KEBEDE; ADMASSU, 2019). Os principais antioxidantes da dieta são: flavonoides, ácidos fenólicos, antocianinas, taninos hidrolisáveis, lignanas, cumarinas, estibenos, além do ácido ascórbico, tocoferóis e carotenoides (GUPTA; DUBEY; KUMAR, 2016). Estes compostos, individualmente ou em sinergismo, agem por diferentes mecanismos para conferir um sistema de defesa efetivo contra o ataque dos radicais livres (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Os compostos fenólicos presentes nos antioxidantes naturais são responsáveis pela ação antioxidante em alimentos, e por apresentarem grande quantidade de propriedades fisiológicas, tais como ação antialérgica, antiarteriogênica, anti-inflamatória, antimicrobiana, antitrombótica, cardioprotetiva, vasodilatadora, emagrecedora e antidepressiva (SANTOS *et al.*, 2015). Os antioxidantes naturais agem assim como os sintéticos no sequestro dos radicais livres presentes nas células (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Portanto, existem diversas fontes de antioxidantes que podem ser apresentadas como fontes naturais. Essas fontes podem ser incorporadas diretamente na dieta dos ruminantes, como consequência, esses antioxidantes seriam transferidos para o leite e seus derivados (BICHI *et al.*, 2013). Antioxidantes como os encontrados na erva-mate e na soja podem ter papel de destaque na preservação dos AGPI, no intuito de reduzir a oxidação do leite (SANTOS *et al.*, 2019).

### **2.11 Erva-mate (*Ilex paraguariensis*)**

A *Ilex paraguariensis* St. Hil. Var. *paraguariensis* é uma planta que pertence à família *Aquifoliaceae*, conhecida popularmente como erva-mate é uma espécie nativa da América do Sul, cultivada principalmente no Brasil, Paraguai e Argentina (SALEM; OLIVEIRA, 2017). O Estado do Paraná é o maior produtor de erva-mate no Brasil com produção, em torno de 87% da produção total do país, seguido por Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul que completam a lista de produtores (IBGE, 2018b). A produção é destinada ao consumo de “chimarrão”, “tererê” e chás entre outros usos (CHAVES, 2014). De acordo com Santos *et al.* (2014), a erva-mate pode ser utilizada em insumos de alimentos como corante natural e conservante de alimentos em sorvetes, balas, bombons, caramelos, chicletes e gomas, além disso, Braghini *et al.* (2014) relatam as várias propriedades consideradas importantes do ponto

de vista farmacológico e medicinal, dentre as quais se destacam - se a ação anti-inflamatória, antioxidante, antirreumática, anticarcinogênica, antimutagênica, estimulantes, diurética e terapêutica

O interesse nessa planta é principalmente pelos compostos químicos presentes na erva-mate, incluindo minerais e vitaminas hidrossolúveis, além de vários fitoquímicos, particularmente os polifenóis (ácidos fenólicos e flavonoides), alcalóides (metilxantinas, incluindo cafeína, teobromina e teofilina) e terpenos (carotenoides e saponinas) (SALEM; OLIVEIRA, 2017). Estudos têm demonstrado que o consumo de extratos de erva-mate pode oferecer proteção contra os danos causados pelos radicais livres, e essa atividade antioxidante é atribuída principalmente aos polifenóis (PO *et al.*, 2012; BRACESCO *et al.*, 2011; COLPO *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2019).

O extrato de erva-mate é muito rico em polifenóis, com níveis mais altos que os do chá verde e dos vinhos (HEEMANN *et al.*, 2019). O ácido clorogênico, que é um captador de metal radical livre, pode interferir com a expressão gênica de enzimas antioxidantes (COLPO *et al.*, 2016), e no metabolismo de glicose (CUELHO *et al.*, 2015).

De acordo com Petit *et al.* (2008) é possível a transferência de antioxidantes das dietas para o leite. E essa transferência vai depender da concentração destes fatores antioxidantes nos alimentos fornecidos (SANTOS *et al.*, 2017). Celi; Raadsma, (2010) investigaram a ingestão de erva-mate seca peletizada na suplementação para vacas leiteiras, com 250 g/dia, por animal e observaram que não houve nenhuma alteração no perfil oxidativo dos animais. Os autores determinaram que o consumo de pellets não foi o suficiente para induzir uma diferença no perfil oxidativo de vacas leiteiras, apesar de ser capaz de aumentar a produção de leite. Outra aplicação para uso do extrato de erva-mate foi demonstrada em estudos realizados por Santos *et al.* (2019) ao investigarem a redução da oxidação do leite enriquecido com AGPI, utilizando a associação da vitamina E com erva-mate na suplementação para vacas leiteiras. Os autores determinaram que não houve interação na associação entre vitamina E com a erva-mate para os antioxidantes do leite (polifenóis, poder redutor, dienos conjugados e TBARS), porém, o poder redutor no leite aumentou quando as vacas foram suplementadas apenas com erva-mate.

Po *et al.* (2012) avaliaram a utilização da erva-mate na dieta de cordeiros e observaram que a adição de 2,5% de erva-mate na suplementação causou um efeito significativo da interação tempo de amostragem *versus* dieta nas concentrações plasmáticas de AOPP (produtos de proteínas de oxidação avançada). Os cordeiros suplementados com erva-mate apresentam níveis mais altos de AOPP do que cordeiros do grupo controle em 4 e 5 semanas. Níveis mais

altos de AOPP indicam inflamação e estresse oxidativo, isso se deve ao alto nível de ingestão de ração, que está associado negativamente à capacidade tampão do rúmen e pode causar. Neste estudo, a suplementação com erva-mate não teve impacto na capacidade antioxidante total.

Diversos estudos têm revelado que a erva-mate apresenta nutrientes e compostos funcionais importantes para a saúde do ser humano (RIACHI; DE MARIA, 2017; FRIZON *et al.*, 2018; SARAIVA *et al.*, 2019). Porém, pesquisas que demonstrem a eficiência e consequentemente, a transferência destes compostos para o leite de ovelhas lactantes alimentadas com erva-mate ainda são incipientes. Esses estudos podem levar ao desenvolvimento de novas estratégias alimentares que podem explorar os efeitos benéficos funcional como o da erva-mate (Po *et al.*, 2012).

## **2.12 Fatores antinutricionais da erva-mate (tanino)**

Além dos efeitos benéficos associados a utilização da erva-mate, também há relatos sobre seus efeitos antinutricionais (GAWRON-GZELLA; CHANAJ-KACZMAREK; CIELECKA-PIONTEK, 2021). Assim o termo “fator antinutricional” tem sido usado para descrever compostos ou classes de compostos presentes numa extensa variedade de alimentos de origem vegetal, que, quando consumidos, reduzem seu valor nutritivo, interferindo em sua digestibilidade, absorção ou utilização de nutrientes (BENEVIDES *et al.*, 2011).

As folhas da erva-mate contêm vários compostos polifenólicos, principalmente ácidos fenólicos (GAWRON-GZELLA; CHANAJ-KACZMAREK; CIELECKA-PIONTEK, 2021), entre os compostos fenólicos, os taninos são considerados como antinutrientes por causa do efeito adverso na digestibilidade da proteína, carboidratos e minerais; bem como diminuir a atividade de enzimas digestivas e a palatabilidade (BENEVIDES *et al.*, 2011).

Os taninos são metabólitos secundários presentes em plantas e, geralmente, divididos em dois tipos: hidrolisáveis e condensados (BENEVIDES *et al.*, 2011). Os taninos hidrolisáveis (TH) possuem ligações simples que são facilmente quebradas na presença de água, e quando quebrados liberam ácido gálico ou elágico. Por sua vez, os taninos condensados (TC) são polímeros que não são facilmente quebrados por hidrólise consequentemente não são absorvidos facilmente pelo trato gastrointestinal, sendo responsáveis por determinadas características como adstringência e precipitação de proteínas (NAUMANN *et al.*, 2017).

Para ruminantes acredita-se que os TH sejam tóxicos. Doce *et al.* (2013) comprovam isso alimentando touros com folhas de *Quercus pyrenaica*, um gênero conhecido por ser rico em TH, e observaram uma acentuada inibição da digestão e sintomas de toxicidade aguda, principalmente quando há condições de restrição alimentar e desnutrição. Isso pode estar relacionado aos TH terem efeitos hepatotóxicos e nefrotóxicos em alguns animais (NAUMANN *et al.*, 2017).

Já os TC tem sido relacionados a diminuição da palatabilidade da dieta, a redução da digestibilidade de nutrientes (proteínas, carboidratos e gorduras) e eficiência alimentar (NAUMANN *et al.*, 2017). Lobo *et al.* (2020) confirmam isso ao estudarem a inclusão de extrato de erva-mate na dieta de cordeiros, e observaram redução no consumo de matéria seca e, conseqüentemente, redução no desempenho geral dos cordeiros, quando estes foram alimentados com níveis elevados de extrato de erva-mate. Isso deve-se ao fato de a erva-mate ter sabor amargo e, conseqüentemente, influenciar a palatabilidade da dieta e a produção animal se incluída em níveis elevados (Lobo *et al.*, 2020).

Assim, a ingestão da erva-mate está, pelo menos inicialmente, relacionada à palatabilidade (Lobo *et al.*, 2020). É possível que a ingestão possa ser diminuída em concentrações inferiores a 5% de MS quando os TC são mais eficazes na ligação às proteínas e em concentrações superiores a 5% de MS os TC são menos eficazes. Dessa forma, dependendo da concentração de taninos ingeridos e da espécie animal, os taninos podem ser considerados benéficos ou maléficos (NAUMANN *et al.*, 2017).

Já em humanos o consumo de erva-mate muito acima da média tem sido relacionado a distúrbios gastrointestinais, como também ao aumento da frequência cardíaca de forma irregular, pressão arterial, diurese, agitação psicomotora, ansiedade e insônia (GAWRON-GZELLA; CHANAJ-KACZMAREK; CIELECKA-PIONTEK, 2021). Além disso, o consumo desta bebida também tem sido estatisticamente associado ao aumento da incidência de câncer, principalmente de esôfago, mas também de cavidade oral, faringe e laringe, e até mesmo dos pulmões, estômago, cólon, reto, rins e bexiga (BRACESCO *et al.*, 2011).

A maneira tradicional de fazer a bebida envolve derramar água sobre as mesmas folhas várias vezes e beber todas as porções resultantes da bebida. Estudos afirmam que esse consumo aumenta o risco de doenças devido à ingestão de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) tóxicos (VIEIRA *et al.*, 2010). Os HAPs podem se acumular na erva-mate como resultado da contaminação do solo e da atmosfera, bem como resultado de sua liberação durante a torrefação da matéria-prima em temperaturas elevadas (VIEIRA *et al.*, 2010).



Neste sentido, a avaliação destes metabólitos pode ser útil para monitoramento dos efeitos antinutricionais associados ao consumo da erva-mate. Portanto, alterar o processo de fabricação da erva-mate torna-se necessário, uma vez que as tecnologias pós-colheita precisam ser aprimoradas, em especial o processo de secagem que precisa ser otimizado para eliminar completamente os contaminantes. Além disso, é preciso ter um bom controle de qualidade, incluindo testes analíticos (BRACESCO *et al.*, 2011).

### 2.13 Parâmetros sanguíneos

A constituição bioquímica do plasma sanguíneo retrata de modo seguro a situação metabólica dos animais, possibilitando avaliar sua adaptação diante de desafios nutricionais e fisiológicos, assim como diagnosticar desequilíbrios metabólicos de origem nutricional, que podem desencadear baixa produtividade (BORBUREMA *et al.*, 2012). A concentração sanguínea de um metabólito revela o volume de reserva livre do mesmo, assim como o efeito do aporte nutricional das dietas. Tais valores permanecem dentro de determinados limites de variação, considerados como valores de referência (ADEYEMI *et al.*, 2016).

O perfil metabólico protéico pode ser compreendido como a determinação das concentrações séricas de proteínas totais (PT), albumina (Alb), globulinas (Glob), hemoglobina e ureia, já o metabolismo energético é representado pela concentração de glicose,  $\beta$ -hidroxibutirato (BHB), colesterol e ácidos graxos livres (AGL); enquanto o metabolismo mineral é caracterizado pelos níveis de cálcio (Ca), fósforo (P), potássio (K) e magnésio (Mg), entre outros. Também pode ser incluída a determinação da concentração de algumas enzimas, como a aspartato aminotransferase (AST) e a gama-glutamilttransferase (GGT), que permitem avaliar o funcionamento hepático e muscular (BORBUREMA *et al.*, 2012).

Sabe-se que os níveis dos metabólitos sofrem variações conforme diversos fatores, entre eles a idade e estado fisiológico, o que torna a interpretação dos valores obtidos em um perfil metabólico complexo (PEIXOTO; OSÓRIO, 2007). Assim, a avaliação metabólica de animais submetidos a diferentes dietas alimentares se torna importante, possibilitando determinar a viabilidade dessas dietas em relação às possíveis alterações nas principais vias metabólicas, relacionadas com energia, proteínas e minerais, bem como a funcionalidade de órgãos vitais (PELIZZA *et al.*, 2019).

Dessa forma, concentração de lipídeos presente na dieta de ruminantes à base de forrageiras normalmente é baixa, cerca de 1 a 5%, presentes na forma de ésteres de glicerol.

Níveis mais altos podem ser obtidos pela adição de gordura, sementes e/ou resíduos vegetais ricos em gordura (ADEYEMI *et al.*, 2016). O colesterol é fundamental para a função metabólica, pois é precursor de hormônios esteróides, sais biliares e vitamina D, além de ter grande importância para o metabolismo do cálcio e do fósforo (KANEKO *et al.*, 2008).

Cerca de 2/3 do colesterol se encontra esterificado com ácidos graxos, armazenados nos tecidos em forma de ésteres de colesterol. Como é insolúvel em água e sangue, para circular na corrente sanguínea se liga a lipoproteínas (HDL, LDL e VLDL) (KANEKO *et al.*, 2008). Cada uma dessas lipoproteínas transporta o colesterol em diferentes sentidos. A LDL transporta o metabólito do fígado até as células de vários outros tecidos, enquanto a HDL transporta o excesso de colesterol dos tecidos de volta para o fígado, para ser utilizado na síntese dos sais biliares. A VLDL transporta triglicerídeos do fígado para o tecido adiposo (SANTOS *et al.*, 2015).

Os ácidos graxos em excesso na dieta são convertidos em triacilgliceróis no fígado e transportados por meio das VLDL e LDL. Os triglicerídeos das VLDL são hidrolisados pela lipase lipoprotéica e liberam os AG para o músculo e tecido adiposo. Os triglicerídeos das LDL são hidrolisados pela lipase lipoprotéica e liberam os AG para o músculo e tecido adiposo. Uma parte das VLDL origina as LDL, compostas principalmente de colesterol, que permanecem por longo tempo no plasma e são transportadas para tecidos periféricos e removidas pelo fígado através de certos receptores. A expressão desses receptores é a principal responsável pelo nível de colesterol no sangue (FEINGOLD; GRUNFELD, 2020).

Por conseguinte, o balanço energético da dieta pode refletir nas concentrações séricas de HDL e LDL, sendo que altos níveis ocorrem quando há maior consumo de ácidos graxos de rações contendo fontes de gordura (GRESSLER *et al.*, 2015). Scarpino *et al.* (2014) observaram maiores concentrações sanguíneas de colesterol e das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (FAL) para ovelhas confinadas alimentadas com rações que continham duas fontes lipídicas (óleo de soja e óleo de soja residual). Antunović *et al.* (2019) ao avaliarem o efeito da substituição parcial do farelo de soja por grãos de ervilha e torta de girassol em dietas de ovelhas constataram que a substituição parcial do farelo de soja por torta de girassol reduziu a concentração sanguínea de proteínas totais, globulina e atividades das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e gama glutamil transferase (GGT) e aumentou o  $\beta$ -hidroxibutirato.

A união da suplementação lipídica aliada à capacidade antioxidante da erva-mate na dieta de ovelhas lactantes, indica possíveis efeitos positivos que incentivam novos estudos de

estratégias alimentares para melhorar a estabilidade oxidativa do leite enriquecido com ácidos graxos insaturados. A alimentação com oleaginosas ricas em ácidos graxos poli-insaturados, como a soja pode aumentar a proporção total de ácidos graxos insaturados no leite de ovinos. No entanto, o leite rico em ácidos graxos insaturados é propenso a lipoperoxidação ou peroxidação lipídica (ZEOLA *et al.*, 2015). A erva-mate por ser rica em polifenóis com propriedades antioxidantes incluída na suplementação animal pode melhorar a atividade antioxidante no leite, diminuindo assim oxidação lipídica (SANTOS *et al.*, 2019). Assim, levantamos a hipótese de que a associação de soja grão e erva-mate poderia diminuir a oxidação dos ácidos graxos insaturados e fornecer aos consumidores produtos lácteos com melhores benefícios à saúde.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEYEMI, K.D.; SABOW, A.B., *et al.* Serum fatty acids, biochemical indices and antioxidant status in goats fed canola oil and palm oil blend. **Journal of Animal Science and Technology**, v. 58, n. 1, p. 1–11, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/asj.12549>.

ANTONIASSI, R. Métodos de avaliação da estabilidade oxidativa de óleos e gorduras. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 19, n. 2, p. 353–380, 2001. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/alimentos/article/view/1243/1043>. Acesso em 20 de março de 2020.

ANTUNOVIĆ, Z.; SPERANDA, M., *et al.* Partial replacement of soybean meal with pea grains and sunflower cake in ewe diets: Milk quality and blood biochemical parameters. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 48, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/rbz4820180140>.

ARCO. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE OVINOS. 2021. Disponível em: <http://www.arcoovinos.com.br/index.php/mn-srgo/mn-padroesraciais/42-texel>. Acesso em 05 de junho de 2021.

BARROS, P.A.V.; GLÓRIA, M.B.A., *et al.* Qualidade nutricional e estabilidade oxidativa de manteigas produzidas do leite de vacas alimentadas com cana-de-açúcar suplementada com óleo de girassol. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n.5, p.1545-1553, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-09352013000500036>.

BENIVEVIDES, C.M.J.; SOUZA, M.V., *et al.* Fatores antinutricionais em alimentos: revisão. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v.18, n. 2, p. 67-79, 2011. Disponível em: <https://periodicos.sbu.unicamp.br/ojs/index.php/san/article/download/8634679/2598>. Acesso em 19 de junho de 2022.

BICHI, E.; HERVAS, G.; *et al.* Milk fat depression induced by dietary marine algae in dairy ewes: Persistency of milk fatty acid composition and animal performance responses. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 1, p. 524–532, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2012-5875>.

BORBUREMA, J. B.; CEZAR, M.F., *et al.* Efeito do regime alimentar sobre o perfil metabólico de ovinos Santa Inês em confinamento. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 4, p. 983–990, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-09352012000400027>.

BRACESCO, N.; SANCHEZ, A.G., *et al.* Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, n. 3, p. 378–384, 2011. DOI: [10.1016/j.jep.2010.06.032](https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.06.032).

BRASIL. Ministério da Saúde, Conselho Nacional de Saúde; Resolução nº 04, de 24 de novembro de 1988. Aprovar a revisão das Tabelas I, III, IV e V referente a Aditivos

Intencionais, bem como os Anexos I, II, III, IV e VII, todas do Decreto nº 55.871, de 26 de março de 1965. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 19 de dezembro de 1988, Seção I, p. 24716-24723. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/391619/Resolucao\\_04\\_1988.pdf/7311a4d9-d5db-44d6-adbd-c7e6891d079d](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/391619/Resolucao_04_1988.pdf/7311a4d9-d5db-44d6-adbd-c7e6891d079d). Acesso em: 13 jan. 2020.

BRASIL. Resolução RDC nº 23, de 15 de fevereiro de 2005, Aprova "Regulamento Técnico que aprova o uso de aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a categoria de alimentos óleos e gorduras - subcategoria creme vegetal e margarinas. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 10 de fevereiro de 2005. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/391619/Resolucao%2BRDC%2Bn%2B23%2Bde%2B15%2Bde%2Bfevereiro%2Bde%2B2005.pdf/ae103d4e-730f-4a47-9d52-ff6e31e1db57?version=1.0>. Acesso em: 13 jan. 2020

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Altera a Instrução Normativa MAPA nº 51, de 18 de setembro de 2002. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 30 dez. 2011. Seção 1. p.24. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/legislacao>. Acesso em: 13 jan. 2020

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Relação de produtos habilitados para exportação para o Brasil por país**. Brasília, 2020. Disponível em: [http://bi.agricultura.gov.br/reports/rwservlet?sigsif\\_cons&prod\\_hab\\_exp\\_pais.rdf&p\\_id\\_pais=189&p\\_id\\_area=&p\\_id\\_produto=&p\\_serial=124219288&paramform=no](http://bi.agricultura.gov.br/reports/rwservlet?sigsif_cons&prod_hab_exp_pais.rdf&p_id_pais=189&p_id_area=&p_id_produto=&p_serial=124219288&paramform=no). Acessado em: 27 jan. 2020.

BRAGHINI, F.; CARLI, C.G., *et al.* Physico-chemical composition of mate , before and after simulation of mate. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha – PAG (Fepagro)**, v. 20, p. 7–15, 2014. Disponível em: [http://www.fepagro.rs.gov.br/upload/1434658764\\_01.pdf](http://www.fepagro.rs.gov.br/upload/1434658764_01.pdf). Acesso em 22 de março de 2020.

BRONDANI, W.C.; LEMES, J.S., *et al.* Perfil metabólico de ovelhas em gestação. **Archivos de Zootecnia**, v. 65, p. 1-6, 2016. Disponível em: <https://www.uco.es/ucopress/az/index.php/az/article/download/449/428>. Acesso em 05 de junho de 2021.

BUCCIONI, A.; DECANDIA, M., *et al.* Lipid metabolism in the rumen: New insights on lipolysis and biohydrogenation with an emphasis on the role of endogenous plant factors. **Animal Feed Science and Technology**, v. 174, n. 1, p. 1-25, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.02.009>

CARDOZO, L.; CECIM, M., *et al.* Estabilidade oxidativa e perfil de ácidos graxos do leite de vacas suplementadas com óleo de linhaça na dieta associado ou não ao selenito de sódio injetável. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 3, p. 826–832, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-09352013000300031>.

CARRÃO-PANIZZU, M.C.; SILVA, J.B. Soja na alimentação humana: qualidade na produção de grãos com valor agregado. *In: CONGRESO DE LA SOJA DEL MERCOSUR - MERCOSOJA*, n.5, 2011, Rosário. **Resumos**. Rosário: Asociaciones de la Cadena de la Soja Argentina (ACSOJA), p. 1-3, 2011. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/148950/1/ID43800AmericasICSUpalestra4.pdf>. Acesso em 22 de março de 2020.

CATUNDA, K. L. M.; AGUIAR, E.M., *et al.* Revisão de literatura leite caprino: características nutricionais, organolépticas e importância do consumo. **Conselho Regional de Medicina Veterinária**, p. 34–55, 2016. Disponível em: [http://www.crmv.gov.br/documents/revista/vol7/LEITE\\_CAPRINO\\_CHARACTER\\_NUTRICAL\\_ORGANOL\\_IMPORT\\_CONS.pdf](http://www.crmv.gov.br/documents/revista/vol7/LEITE_CAPRINO_CHARACTER_NUTRICAL_ORGANOL_IMPORT_CONS.pdf). Acesso em 16 de março de 2020.

CELI, P.; RAADSMA, H.W. Effects of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) supplementation on the productive performance of dairy cows during mid-lactation. **Animal Production Science**, v. 50, p 339-344, 2010. DOI: 10.1071 / AN09170.

CHAVES, B. W. Utilização de resíduos industriais na dieta de bovinos leiteiros. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 18, n. 0, p. 150–156, 2014. DOI <http://dx.doi.org/10.5902/2236117013046>

CLAUSEN, M. R.; CONNOLLY, C., *et al.* Oxidative stability of bovine milk determined by individual variability in herd irrespective of selenium status. **International Dairy Journal**, v. 20, n. 8, p. 507–513, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.02.010>.

CONAB. COMPHANIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Boletim da safra de grãos**. Nono levantamento, junho 2022 – safra 2021/2022. Brasília: Companhia Nacional de Abastecimento. 2022. Disponível em: [https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos/item/download/42837\\_526b4c0d6f83ae8e34bb846683666d92](https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos/item/download/42837_526b4c0d6f83ae8e34bb846683666d92). Acesso em 17 de junho de 2022.

COLPO, A. C.; ROS, H., *et al.* Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.)-based beverages: How successive extraction influences the extract composition and its capacity to chelate iron and scavenge free radicals. **Food Chemistry**, v. 209, p. 185–195, 2016. DOI: 10.1016 / j. foodchem.2016.04.059.

CORRÊA, G. F.; ROKENKOHL, J. E.; OSORIO, M. T. M. **Produção e Qualidade do Leite Ovino. Produção de ovinos no Brasil**. Roca, São Paulo, p. 485-499, 2014.

CORREDDU, F.; NUDDA, A., *et al.* Light-Induced Lipid Oxidation in Sheep Milk: Effects of Dietary Grape Seed and Linseed, Alone or in Combination, on Milk Oxidative Stability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 15, p. 3980–3986, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01614>.

COSTA, R. G.; QUEIROGA, R. D. C. R. E.; PEREIRA, R. A. G. Influência do alimento na produção e qualidade do leite de cabra. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. SUPPL. 1, p. 307–321, 2009. DOI:<https://doi.org/10.1590/S1516-35982009001300031>.

CUELHO, C. H. F.; BONILHA, I.F., *et al.* Actualización en las propiedades bioactivas de la yerba mate. **Revista Cubana de Farmacia**, v. 49, n. 2, p. 375–383, 2015. Disponível em: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenI.cgi?IDARTICULO=64749>. Acesso em 22 de março de 2020.

CUTRIM, E. S. M.; TELES, A.M., *et al.* Evaluation of antimicrobial and antioxidant activity of essential oils and hydroalcoholic extracts of zingiber officinale (ginger) and rosmarinus officinalis (Rosemary). **Revista Virtual de Química**, v. 11, n. 1, p. 60–81, 2019. Disponível em: <http://static.sites.s bq.org.br/rvq.s bq.org.br/pdf/v11n1a06.pdf>. Acesso em 22 de março 2020.

DE LIMA, R. N.; LEITE, J.H.G.M., *et al.* The importance of conjugated linoleic acid (CLA) in animal-derived products. **Revista em Agronegocio e Meio Ambiente**, v. 11, n. 4, p. 1307–1331, 2018. DOI: 10.17765/2176-9168.2018v11n4p1307-1331

DEL RÉ, P. V.; JORGE, N. Especiarias como antioxidantes naturais: Aplicações em alimentos e implicação na saúde. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 14, n. 2, p. 389–399, 2012. DOI:<https://doi.org/10.1590/S1516-05722012000200021>.

DHIMAN, T. R.; NAM, S. H.; URE, A. L. Factors affecting conjugated linoleic acid content in milk and meat. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, n. 6, p. 463–482, 2005. DOI:10.1080 / 10408390591034463.

DOCE, R.R.; BELENGUER, A., *et al.* Effect of the administration of young leaves of *Quercus pyrenaica* on rumen fermentation in relation to oak tannin toxicosis in cattle. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 97, n. 1, p. 48-57, 2013. DOI: 10.1111/j.1439-0396.2011.01241.x.

EMBRAPA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Boletim do Centro de Inteligência e Mercado de Caprinos e Ovinos**. n 9, 2019. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/202493/1/CNPC-2019-Boletim-CI-n9.pdf>. Acesso em: 16 de março de 2020.

EMBRAPA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Soja: Diferentes usos grãos**, 2020. Londrina, Paraná. Disponível em: <https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1>. Acesso em 16 de março de 2020.

FAGUNDES, A.; DANGUY, L.B., *et al.* *Ilex paraguariensis*: compostos bioativos e propriedades nutricionais na saúde. **Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**. v.9. n.53. p.213-222. 2015. Disponível em: <http://www.rbone.com.br/index.php/rbone/article/view/394>.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Statistics division. Food and agriculture organization of the United Nations**, 2017. Disponível em: <http://faostat.fao.org/>. Acesso em: 27 de jan. 2020.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATION. **FAO statistical yearbook 2013 world food and agriculture**. 2019. Disponível em: <http://www.fao.org/economic/ess/ess-publications/ess-yearbook/en/#.Xp-RfUBKjIU>. Acesso em: 27 jan.2020.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Dairy production and products. Small ruminants**. 2020. Disponível em:<http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/milk-production/dairy-animals/smallruminants/en/>. Acesso em: 27 jan.2020.

FARIAS, R.; TAVARES, P.; ALBANDES, T. Sheep milk in Brazil : A review. **Revista Eletrônica de Veterinaria**, v.18, n.9, p.1-13, 2017. Disponível em: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63653009014>. Acesso em: 16 de março de 2020.

FEINGOLD, K. R.; GRUNFELD, C. Introduction to lipids and lipoproteins. **Endotext**. 2020. Disponível em:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK305896/>. Acesso em 22 de março de 2020.

FONTOURA, E.A.B; TÂMARA, J.Q., *et al.* Características da lactação de ovelhas Texel criadas extensivamente. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 1,1586-1597, 2020. DOI: <https://doi.org/10.34117/bjdv6n1-109>

FRIZON, C.; PERUSSELLO, C.A., *et al.* Novel beverages of Yerba-Mate and Soy: bioactive compounds and functional properties. **Beverages**, v. 4, n. 1, p. 21, 2018. DOI:10.3390/beverages4010021.

FUKE, G.; NOVACK, M.M.E., *et al.* Eficácia do ácido linoleico conjugado (CLA) na saúde humana. **Revista do Centro do Ciências Naturais e Exatas**. v.18, p. 36-46, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.5902/2236117012988>.

GAWRON-GZELLA, A.; CHANAJ-KACZMAREK, J.; CIELECKA-PIONTEK, J. Yerba Mate-A Long but Current History. **Nutrients**, v. 13, n.1, p. 3706, 2021. DOI: 10.3390/nu13113706.

GODIC, A.; POLJSK, B., *et al.* The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, 2014. DOI 10.1155 / 2014/860479.

GÓMEZ-CORTÉS, P.; FRUTOS, P., *et al.* Addition of olive oil to dairy ewe diets: Effect on milk fatty acid profile and animal performance. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 8, p. 3119–3127, 2008. DOI:10.3168/jds.2007-0954.



GÓMEZ-CORTÉS, P.; TORAL, P.G., *et al.* Effect of the supplementation of dairy sheep diet with incremental amounts of sunflower oil on animal performance and milk fatty acid profile. **Food Chemistry**, v. 125, n. 2, p. 644–651, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.053>.

GRESSLER, M. A. L.; SOUZA, M.I.L. *et al.* Biochemical profiles of ewes submitted to short-term nutritional supplementation in subtropical region. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. v.16, n.1, p.210-222, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1519-99402015000100022>.

GUPTA, D.; DUBEY, J.; KUMAR, M. Phytochemical analysis and antimicrobial activity of some medicinal plants against selected common human pathogenic microorganisms. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 6, n. 1, p. 15–20, 2016. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(15\)60978-1](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(15)60978-1).

HARTEMINK, E.; GIORGIO, D., *et al.* The effect of yerba mate (*ilex paraguariensis*) supplementation on nutrient degradability in dairy cows: An in sacco and in vitro study. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 28, n. 11, p. 1606–1613, 2015. DOI:10.5713/ajas.15.0206.

HEEMANN, A. C. W.; HEEMANN, R., *et al.* Enzyme-assisted extraction of polyphenols from green yerba mate. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 22, p. 1–10, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/1981-6723.22217>.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA**, 2017. Rio de Janeiro: IBGE. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/6720>. Acesso em: 20 de março de 2020.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Agrícola Municipal**, 2018a. Rio de Janeiro: IBGE. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=1613&z=t&o=1&i=P> Acesso em: 20 de março de 2020.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Quantidade produzida e valor da produção na extração vegetal, por tipo de produto extrativo- Erva Mate**. 2018b. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/289>. Acesso em 20 de abril de 2020.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da Pecuária Municipal** 2019. Rio de Janeiro: IBGE, v. 46, p.1-8, 2018. Disponível em: [https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm\\_2018\\_v46\\_br\\_informativo.pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2018_v46_br_informativo.pdf). Acesso em 20 de abril de 2020.

JENKINS, T.C; HARVATINE, K.J. Lipid feeding and milk fat depression. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**. v.30, n. 3, p. 623-642, 2014. DOI: 10.1016/j.cvfa.2014.07.006.

JOHNSON, D. R.; DECKER, E. A. The role of oxygen in lipid oxidation reactions: a review. **Annual Review of Food Science and Technology**. v.6, p. 171-190, 2015. DOI: 10.1146/annurev-food-022814-015532

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6th ed. Academic Press, San Diego. 916p. 2008.

KEBEDE, M.; ADMASSU, E.S. Application of antioxidants in food processing industry: options to improve the extraction yields and market value of natural products. **Advances in Food Technology and Nutritional Sciences**. v. 5, n.2, p. 38-49,2019. DOI: 10.17140/AFTNSOJ-5-

KOŁAKOWSKA, A.; BARTOSZ, G. **Oxidation of food components: an introduction** In: BARTOSZ, G. Food oxidants and antioxidants: Chemical, Biological, and Functional Properties. Boca Raton: CRC Press, 2014, Cap. 1, p. 1-20.

LIMA, J.G.; CAVALCANTE, A.N., *et al.* **Extração do óleo de babaçu (*Orbignya Speciosa*) proveniente da Embrapa Meio-Norte visando a produção de biodiesel**. p. 1–4, 2011. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1025988/extracao-do-oleo-de-babacu-orbignya-speciosa-provenientes-da-embrapa-meio-norte-visando-a-producao-de-biodiesel>. Acesso em 20 de abril de 2020.

LIMA JÚNIOR, D. M.; MONTEIRO, P.B.S., *et al.* Oxidação lipídica e qualidade da carne ovina. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 7, n. 1, p. 14–28, 2013. Disponível em: <https://periodicos.ufersa.edu.br/index.php/acta/article/download/3119/5191/0>. Acesso em 20 de março de 2020.

LOBO, V.; PATIL, A., *et al.* Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy Reviews**, v. 4, n. 8, p. 118–126, 2010. DOI: 10.4103 / 0973-7847.70902.

LOBO, R.R.; VINCENZI, R., *et al.* Inclusion of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) extract in the diet of growing lambs: effects on blood parameters, animal performance, and carcass traits. **Animals**, v. 10, n. 6, p. 961, 2020. DOI:10.3390/ani10060961.

LORENZO, J. M.; GÓMEZ, M. Shelf life of fresh foal meat under MAP, overwrap and vacuum packaging conditions. **Meat Science**, v. 92, n. 4, p. 610–618, 2012. DOI: 10.1016 / j.meatsci.2012.06.008.

LOPES, F.C.F.; BARROS, P.A.V., *et al.* Perfil de ácidos graxos no leite de vacas Holandês em pastagens tropicais suplementadas com dois níveis de concentrado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.2, p.518-521, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v63n2/37.pdf>. Acesso em 16 de março de 2020.

LUCATTO, J. N.; BRANDÃO, S. N. T. G. DE; DRUNKLER, D. A. Ácido Linoleico Conjugado: Estrutura Química, Efeitos Sobre a Saúde Humana E Análise Em Lácteos.



NELSON, D. L.; COX, M. M. 2006. **Lehninger princípios da bioquímica** 4. ed. São Paulo: Sarvier, 1202 p.

NEVES, G.Y.S.; STROHER, G.L., *et al.* Avaliação do consumo de alimentos ricos em antioxidantes e do conhecimento sobre os radicais livres por parte dos acadêmicos de ciências biológicas e enfermagem da fafiman. **Diálogos & Saberes**. v. 10, n. 1, p. 47-62, 2014. Disponível em: file:///C:/Users/User/Downloads/352-404-1-PB.pdf. Acesso em 20 de março de 2020.

NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 2007. **Nutrients requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids and new word camelids**. The National Academies Press, Washington, DC, USA.

NÓBREGA, A. Novo Censo Agropecuário mostra crescimento de efetivo de caprinos e ovinos no Nordeste. **Embrapa**, 2018. Disponível em: <https://www.embrapa.br/cim-inteligencia-e-mercado-de-caprinos-e-ovinos/busca-de-noticias/-/noticia/36365362/novo-censo-agropecuário-mostra-crescimento-de-efetivo-de-caprinos-e-ovinos-no-nordeste>. Acesso em: 8 set. 2020.

NUDDA, A.; BATTACONE, G., *et al.* Feeding strategies to design the fatty acid profile of sheep milk and cheese. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 43, n. 8, p. 445–456, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982014000800008>.

NUNES, J. C.; TORRES, A. G. Fatty acid and CLA composition of Brazilian dairy products, and contribution to daily intake of CLA. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, n. 8, p. 782–789, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.03.023>.

OLIVEIRA, P. A.; VALENTIM, I.B., *et al.* Desempenho reprodutivo de ovelhas mestiças da raça Santa Inês em Brachiaria humidícola e efeito do sexo no ganho de peso de cordeiros. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 1, p. 85–92, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000300013>.

PALMQUIST, D.L.; MATTOS, W.R.S. **Metabolismo de lipídios**. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. (Eds.) *Nutrição de Ruminantes*. 2.ed. Jaboticabal: FUNEP, 2011. p.299- 322.

PARIZA, M. W.; PARK, Y.; COOK, M. E. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. **Progress in Lipid Research**, v. 40, n. 4, p. 283–298, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(01\)00008-X](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(01)00008-X).

PARK, Y. W.; JUAREZ, M., *et al.* Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, v. 68, n. 1–2, p. 88–113, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.09.013>.

PEIXOTO, L.; OSÓRIO, M. Perfil metabólico protéico e energético na avaliação do desempenho reprodutivo em ruminantes. **Revista brasileira de agrociencia**, v. 13, n. 3, p. 299–304, 2007. DOI: [HTTP://DX.DOI.ORG/10.18539/CAST.V13I3.1376](http://dx.doi.org/10.18539/CAST.V13I3.1376).

PELLEGRINI, L. G. DE.; DE PELLEGRINI, A.C.R.S., *et al.* Análise Do Perfil De Ácidos Graxos Do Leite Bovino Caprino E Ovino. v. 7, n. 1, 2012. Disponível em: [evistas.utfpr.edu.br/pb/index.php/SysScy/article/viewFile/1511/973](http://evistas.utfpr.edu.br/pb/index.php/SysScy/article/viewFile/1511/973). Acesso em 16 de março de 2020.

PELLEGRINI, L. G. DE; GUSSO, A.P., *et al.* Physical and chemical characterization and lipid profile of sheep milk cheese. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 68, n. 394, p. 11–18, 2013. DOI: <https://doi.org/10.5935/2238-6416.20130037>.

PELIZZA, A.; HAUSER, A., *et al.* Perfil metabólico de vacas Holandês e mestiças Holandês x Jersey no periparto. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 71, n. 3, p. 741–751, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-10098>.

PETIT, H. V. ; CAVALIERI, F.B., *et al.* Quality of embryos produced from dairy cows fed whole flaxseed and the success of embryo transfer. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 5, p. 1786–1790, 2008. DOI: [10.3168 / jds.2007-0782](https://doi.org/10.3168/jds.2007-0782).

PETIT, H. V. Milk production and composition, milk fatty acid profile, and blood composition of dairy cows fed different proportions of whole flaxseed in the first half of lactation. **Animal Feed Science and Technology**, v. 205, p. 23–30, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.04.009>.

PO, E.; HORSBURGH, K., *et al.* Yerba Mate (*Ilex paraguarensis*) as a novel feed supplement for growing lambs. **Small Ruminant Research**, v. 106, n. 2–3, p. 131–136, 2012. DOI: [10.1016 / j. smallrumres.2012.05.016](https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.05.016).

PRANDINI, A.; SIGOLO, S.; PIVA, G. A comparative study of fatty acid composition and CLA concentration in commercial cheeses. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n.1, p.55-61, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.04.004>.

RAFAŁOWSKI, R.; ZEGARSKA, Z., *et al.* Oxidative stability of milk fat in respect to its chemical composition. **International Dairy Journal**, v. 36, n. 1, p. 82–87, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.01.002>.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006. DOI: [10.1590/S0100-40422006000400023](https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000400023).

RENNÓ, F. P.; CÔNSOLO, N.R.B., *et al.* Grão de soja cru e inteiro na alimentação de bovinos: Excreção de grão de soja nas fezes. **Archivos de Zootecnia**, v. 64, n. 248, p. 331–338, 2015. DOI: [10.21071/az.v64i248.417](https://doi.org/10.21071/az.v64i248.417)

RIACHI, L. G.; DE MARIA, C. A. B. Yerba mate: An overview of physiological effects in humans. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 308–320, 2017. DOI: 10.1016/j.jff.2017.09.020.

ROHENKOHL, J. E. O agronegócio de leite de ovinos e caprinos. **Indicadores Econômicos FEE**, v. 39, n. 2, p. 97–114, 2011. Disponível em: <https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:DZFLE7mpJ7wJ:https://revistas.fee.tche.br/index.php/indicadores/article/view/2510+&cd=2&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br>. Acesso em 16 de março de 2020.

SALEM, R. D. S.; OLIVEIRA, R. F. F. DE. Avaliação da capacidade antioxidante de chá de erva-mate adicionado de casca seca de ameixa vermelha (*Prunus* sp.). **Brazilian Journal of Food Research**, v. 8, n. 1, p. 126, 2017. DOI: 10.3895/rebrapa.v8n1.3816.

SANTOS, N. W.; SANTOS, G.T., *et al.* Production, composition and antioxidants in milk of dairy cows fed diets containing soybean oil and grape residue silage. **Livestock Science**, v. 159, n. 1, p. 37–45, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2013.11.015>.

SANTOS, E. C. S. ; BICCA, M.A., *et al.* Anxiolytic-like, stimulant and neuroprotective effects of *Ilex paraguariensis* extracts in mice. **Neuroscience**, v. 292, p. 13–21, 2015. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2015.02.004.

SANTOS, F. S.; ZEOULA, L.M., *et al.* Intake, digestibility and milk production and composition of dairy cows fed different levels of Yerba Mate in the diet. **Animal Feed Science and Technology**, v. 230, p. 70–76, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.05.019>

SANTOS, F. S.; ZEOULA, L.M., *et al.* Effect of supplementation with Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) and vitamin E on milk lipoperoxidation in cows receiving diets containing ground soybean seeds. **Journal of Dairy Research**, v. 86, n. 3, p. 279–282, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0022029919000529>.

SAMPELAYO, S.M. R.; CHILLIARD, Y., *et al.* Influence of type of diet on the fat constituents of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, v. 68, n. 1–2, p. 42–63, 2007 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.09.017>.

SARAIVA, B. R.; VITAL, A.C.P., *et al.* Effect of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) addition on the functional and technological characteristics of fresh cheese. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 3, p. 1256–1265, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03589-w>.

SCARPINO, F. B. O.; EZEQUIEL, J.M.B., *et al.* Óleo De Soja E Óleo De Soja Residual Em Dietas Para Ovinos Confinados: Parâmetros Sanguíneos. **Archivos de Zootecnia**, v. 63, n. 241, p. 207–210, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S0004-05922014000100022>.

STRADIOTTO, M.M. ; SIQUEIRA, E.R., *et al.* Efeito da gordura protegida sobre a produção e composição do leite em ovelhas da raça Bergamácia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 5, p. 1154–1160, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982010000500029>.

SINDHI, V.; GUPTA, V., *et al.* Potential applications of antioxidants – A review. **Journal of Pharmacy Research**, v. 7, n. 9, p. 828–835, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jopr.2013.10.001>.

SOARES, D. J.; TAVARES, T.M., *et al.* Processos oxidativos na fração lipídica de alimentos. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 30, n. 2, p. 263–272, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.5380/cep.v30i2.30504>.

TACO. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. 4<sup>a</sup> edição revisada e ampliada, Campinas – São Paulo, 2011.

TORAL, P. G.; HERVAS, G., *et al.* Milk fatty acid profile and dairy sheep performance in response to diet supplementation with sunflower oil plus incremental levels of marine algae. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 4, p. 1655–1667, 2010a. DOI: 10.3168/jds.2009-2769.

TORAL, P. G.; FRUTOS, P., *et al.* Changes in milk fatty acid profile and animal performance in response to fish oil supplementation, alone or in combination with sunflower oil, in dairy ewes. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 4, p. 1604–1615, 2010b. DOI:10.3168/jds.2009-2530.

URBANO, S. A.; FERREIRA, M.A., *et al.* Fontes de gordura sobre a modulação do perfil de ácidos graxos da carne de pequenos ruminantes. **Archivos de Zootecnia**, v. 63, n. 241, p. 147, 2014.

Disponível em: <file:///C:/Users/User/Downloads/DialnetLipidSourcesOnModulationOfFattyAcidProfileOfSmallR-6505170.pdf>. Acesso em 16 de março de 2020.

USDA. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Dairy: world markets and trade**. 2019. Disponível em: <https://downloads.usda.library.cornell.edu/usda-smis/files/5>. Acesso em 27 jan. 2020.

VIEIRA, M.A.; MARASCHIN, M., *et al.* Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons throughout the processing stages of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*). **Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess**, v. 27, p. 776–782, 2010. DOI: 10.1080/19440041003587310.

WÓJCIAK, K. M.; DOLATOWSKI, Z. J. Oxidative stability of fermented meat products. **Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria**, v. 11, n. 2, p. 99–109, 2012. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/22493153>. Acesso em: 20 de março de 2020.

YANG, B.; CHEN, H., *et al.* Review of the roles of conjugated linoleic acid in health and disease. **Journal of Functional Foods**. v.15, p.314-325, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.03.050>.

ZALESKI TRINDADE, R. T. Soybean and polish settlers in southern Brazil: The case of ceslau biezanko and other characters (1930-1934). **Historia Unisinos**, v. 22, n. 2, p. 254–263, 2018. Disponível em: <http://revistas.unisinos.br/index.php/historia/article/viewFile/htu.2018.222.09/60746316>. Acesso 16 de março de 2020.

ZEOLA, N. M. B. L.; SOBRINHO, A.,G.S., *et al.* Production, composition and processing of milk from ewes fed soybean seeds. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 44, n. 4, p. 146–154, 2015. DOI:<https://doi.org/10.1590/S1806-92902015000400003>

ZEPPENFELD, C.C.; PIRES, C.C. *et al.* Produção e composição do leite ovino durante as sete primeiras semanas de lactação. **Zootecnia Tropical**, v. 25, n. 2,77-81.2007. Disponível em: [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0798-72692007000200003](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-72692007000200003). Acesso em 05 de junho de 2021.

ZHAO, X.; WANG, J., *et al.* Effects of different fat mixtures on milk fatty acid composition and oxidative stability of milk fat. **Animal Feed Science and Technology**, v. 185, n. 1–2, p. 35–42, 2013. DOI: [10.1016/j.anifeedsci.2013.06.009](https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2013.06.009).



### 3. OBJETIVOS GERAIS

Avaliar os efeitos da erva-mate, soja em grão e suas interações na ingestão, metabolismo sanguíneo, desempenho, produção, composição físico-química, perfil lipídico, atividade antioxidante e *status* oxidativo do leite de ovelhas lactantes criadas em pastagens tropicais.

Avaliar os diferentes métodos de extração para lipídios totais e o efeito destas metodologias sobre a composição quantitativa de ácidos graxos (por meio de fatores de resposta do detector de ionização de chama e padrões internos) em leite de ovelhas lactantes criadas em pastagens tropicais.

## **I - Erva-mate (*Ilex paraguariensis*) como fonte de antioxidantes com soja em grão na suplementação de ovelhas lactantes criadas em pastagens tropicais**

### **RESUMO**

A hipótese testada é que a associação de soja em grão e erva-mate como fonte antioxidante pode aumentar a concentração de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) com menor oxidação do leite de ovelhas lactantes criadas em pastagens tropicais. Dezesesseis ovelhas foram distribuídas aleatoriamente em um esquema fatorial 2x2 (com ou sem soja em grão a 210 g / kg de matéria seca (MS); com ou sem erva-mate a 110 g / kg de MS) e forneceram quatro dietas diferentes: controle (sem soja em grão e erva-mate); soja em grão (210 g / kg de MS); erva-mate (110 g / kg de MS) e uma combinação de soja (210 g / kg de MS) e erva-mate (110 g / kg de MS). A ingestão de erva-mate reduziu o consumo de MS, e as concentrações de extrato etéreo (EE), proteína, lactose, extrato seco desengordurado, densidade, concentrações de ômega - 3 e a razão entre ácidos graxos (AG) saturados/monoinsaturados, mas aumentou a concentração de AG monoinsaturados e o poder sequestrante dos radicais livres por DPPH sem alterar as concentrações dos dienos conjugados e as concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no leite. A suplementação com soja em grão diminuiu o peso ao nascer dos cordeiros, e aumentou as concentrações do ácido linoléico conjugado (CLA), PUFA, ômega - 6, a razão ômega - 6/ômega - 3 e do colesterol total sanguíneo. A adição de erva-mate não influenciou no perfil oxidativo do leite. A suplementação com soja em grão melhorou o perfil de AG do leite, aumentando as concentrações de CLA e de PUFA. A associação de soja grão e erva-mate ajuda a melhorar a qualidade da gordura do leite de ovelhas criadas em pastagens tropicais, embora não ajude a prevenir a oxidação do leite rico em PUFA.

**Palavras - chave:** aditivo natural; composição físico-química; compostos fenólicos; lactação

**Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) as a source of antioxidants with soybean grain in supplementation of lactating ewes reared in tropical pastures**

**ABSTRACT**

The hypothesis tested is that the association of soybean beans and yerba mate as an antioxidant source can increase the concentration of polyunsaturated fatty acids (PUFA) with less oxidation of milk from lactating ewes reared in tropical pastures. Sixteen ewes were randomly distributed in a 2x2 factorial scheme (with or without soybean beans at 210 g / kg of dry matter (DM); with or without yerba mate at 110 g / kg of DM) and provided four different diets: control (without soybeans in grain and yerba mate); soybean in grain (210 g / kg DM); mate (110 g / kg DM) and a combination of soybeans (210 g / kg DM) and mate (110 g / kg DM). The ingestion of mate has reduced the consumption of DM, and the concentrations of ether extract (EE), protein, lactose, degreased dry extract, density, omega - 3 concentrations and the ratio of saturated/monounsaturated fatty acids (FA), but increased the concentration of monounsaturated FA and the sequestering power of free radicals by DPPH without altering the concentrations of conjugated dienes and the concentrations of substances reactive to thiobarbituric acid in milk. Supplementation with soybean grain decreased the lambs' birth weight, and increased the concentrations of conjugated linoleic acid (CLA), PUFA, omega - 6, the omega ratio - 6/omega - 3, and total blood cholesterol. The addition of yerba mate did not influence the oxidative profile of milk. Supplementation with soybean grain improved the milk FA profile, increasing CLA and PUFA concentrations. The association of soybean grain and yerba mate helps to improve the fat quality of milk from sheep reared in tropical pastures, although it does not help prevent the oxidation of PUFA-rich milk.

**Keywords:** lactation, natural additive; phenolic compounds; physical-chemical composition

## 1. INTRODUÇÃO

O aumento da divulgação e acesso a informações sobre o papel da alimentação na saúde tem despertado grande interesse da população, nos cuidados com uma alimentação mais saudável (SARAIVA *et al.*, 2019). Em relação aos produtos advindos de ruminantes, esses requisitos têm sido atendidos com a modificação do perfil lipídico da gordura do leite, por meio da adição de fontes ricas em ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), como a soja em grão (SANTOS *et al.*, 2019). A soja é rica em ácido linoléico, sua adição na dieta de ruminantes é uma forma de elevar a proporção de ácidos graxos considerados saudáveis, como o ácido linoléico conjugado (CLA), e resultar em um tipo de leite com maior valor nutritivo e de valor terapêutico (PRABAKARAN *et al.*, 2018).

O uso de lipídios na dieta animal, em quantidade elevada, acima de 7% da matéria seca, pode ter efeitos deletérios na fermentação, principalmente em bactérias fibrolíticas. Além disso, fontes de lipídios com altos níveis de AGPI podem ser mais vulneráveis à reação de oxidação (SANTOS *et al.*, 2019) e, portanto, à perda parcial de suas propriedades. Uma solução para este problema pode ser o fornecimento de compostos antioxidantes naturais aos ruminantes pela alimentação, uma vez que podem ser transferidos ao leite. (SANTOS *et al.*, 2017). Assim, o uso de antioxidantes naturais minimiza a preocupação dos consumidores acerca da segurança e toxicidade de aditivos alimentares (SARAIVA *et al.*, 2019).

Neste sentido, a *Ilex paraguariensis* está entre os antioxidantes naturais já estudados que podem ser usados como aditivo alimentar natural (MAZUR *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2019; SARAIVA *et al.*, 2019). Ela é uma planta nativa da América do Sul; como Argentina, Brasil, Uruguai e Paraguai (MAZUR *et al.*, 2019). Sendo conhecida como erva-mate (EM), e comumente vendida em folhas secas e trituradas para consumo em infusão quente ou fria (chimarrão ou tererê, respectivamente) (BRACESCO *et al.*, 2011).

Os compostos fenólicos presentes na EM são especialmente os ácidos clorogênicos, flavonóides e saponinas, que em associação com as metilxantinas são responsáveis pela alta capacidade antioxidante da EM (SARAIVA *et al.*, 2019). Além do antioxidante, o ácido clorogênico e seus derivados têm uma ação hipocolesterolêmica, hepatoprotetiva, hipoglicêmica (MAZUR *et al.*, 2019). Além disso, a erva-mate é um potente inibidor do estresse oxidativo (BARBATO *et al.*, 2019).

Os estudos em animais usando erva-mate são muito limitados e alguns relataram resultados positivos. Foi relatado que a suplementação com erva-mate aumentou o consumo de

ração e dos sólidos do leite em ovelhas (PO *et al.*, 2012) e sustentou a produção de leite em vacas em lactação (CELI; RAADSMA, 2010), enquanto sua administração em vacas leiteiras foi observado aumento do poder redutor do leite (SANTOS *et al.*, 2017). No entanto, o efeito da associação entre soja em grão e erva-mate na dieta de ovelhas criadas em pastagens tropicais durante o período de lactação ainda é incipiente, e necessita de estudos adicionais.

Assim, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da erva-mate, soja em grão e suas interações na ingestão, metabolismo sanguíneo, desempenho, produção, composição físico-química, perfil lipídico, atividade antioxidante e *status* oxidativo do leite de ovelhas lactantes criadas em pastagens tropicais. A hipótese é que a suplementação com soja em grão aumenta a concentração dos AGPI, e a erva-mate a capacidade antioxidante e, conseqüentemente, diminui a oxidação do leite, e a associação entre soja em grão e a erva-mate aumenta a concentração de AGPI no leite em conjunto com menor oxidação.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Design experimental e animais

Esta pesquisa foi desenvolvida no Setor de Ovinocultura da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, na Fazenda Escola da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ; 20°26'34,31''S; 54°50'27,86''O; 530,7 m de altitude), situada no município de Terenos/MS. O experimento foi realizado de acordo com as diretrizes da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (Protocolo número 1.119/2019).

O experimento foi realizado durante a fase de lactação (60 dias), sendo que foram utilizados 14 dias antes do parto para a adaptação dos animais ao manejo alimentar, utilizando-se dezesseis ovelhas F1 Texel (7 ovelhas com parto gemelar e 9 com parto simples), em média três anos de idade, com escore corporal médio 3 (escala 1 a 5) (RUSSEL *et al.*, 1969), com peso pós-parto médio de  $64,36 \pm 6,54$  Kg.

As dietas foram isoprotéicas e planejadas de acordo com um arranjo fatorial  $2 \times 2$  (com ou sem soja em grão; com ou sem erva-mate): (1) dieta controle (sem adição de erva-mate e soja em grão); (2) concentrado com adição de soja em grão (210 g / kg de matéria seca - MS); (3) concentrado com adição de erva-mate (110 g / kg de MS); (4) concentrado com adição da combinação entre soja em grão (210 g / kg de MS) e erva-mate (110 g / kg de MS). As doses

experimentais de soja em grão e erva-mate foram definidas com base em estudos anteriores (SANTOS *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2019; ZEOULA *et al.*, 2019; respectivamente) onde esses ingredientes foram usados.

Para garantir o consumo da soja em grão e da erva-mate, antes do consumo da ração os ingredientes foram pesados e misturados ao concentrado diariamente. A erva-mate utilizada foi *in natura* do tipo crioula (com 70% de folhas secas e 30% de galhos, moídos) e apresentou a seguinte composição química média: 843,6 g / kg de MS; 114,2 g / kg de proteína bruta (PB); 18,2 g / kg de extrato etéreo (EE) e, 594,4 g / kg de fibra detergente neutro (FDN). O perfil polifenólico da erva-mate consistiu em 116,8 mg/g equivalente de ácido gálico e uma atividade antioxidante total pela captura do radical livre (DPPH) de 945,40 mg/mL.

As matrizes, acompanhadas dos seus respectivos cordeiros, foram mantidas em piquetes de pastagens de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu, em uma área de 1,92 ha, divididos em quatro piquetes com livre acesso a água, onde receberam os concentrados experimentais em cochos individuais, uma vez ao dia, logo após segunda ordenha da manhã (10:00h). As dietas foram formuladas conforme recomendações do NRC (2007), de modo que estas pudessem atender às exigências nutricionais totais de ovelhas acima de 60 kg em fase de lactação. Os ingredientes e a composição química das dietas são apresentados na Tabela 1.

**TABELA 1** – Ingredientes e composição química das dietas com adição de erva-mate e com suplementação de soja em grão

	Tratamentos			
	Sem Erva-Mate		Com Erva-Mate	
Ingredientes (g kg <sup>-1</sup> de MS)	Sem Soja	Com Soja	Sem Soja	Com Soja
Farelo de soja	138,00	-	119,00	-
Erva-mate	-	-	110,00	110,00
Milho moído	812,00	740,00	721,00	630,00
Soja em grão	-	210,00	-	210,00
Mistura mineral <sup>1</sup>	50,00	50,00	50,00	50,00
Nutrientes (base na MS)				
Matéria seca (g/kg <sup>-1</sup> MS)	880,40	863,00	886,60	896,80
Matéria Orgânica (g/kg <sup>-1</sup> MS)	948,40	935,90	932,80	933,50
Matéria Mineral (g/kg <sup>-1</sup> MS) <sup>1</sup>	51,60	64,10	67,20	66,50

Proteína bruta (g/kg <sup>-1</sup> MS)	147,20	146,90	147,00	148,00
Extrato etéreo (g/kg <sup>-1</sup> MS)	31,50	50,40	22,70	78,40
Fibra em detergente neutro <sup>2</sup> (g/kg <sup>-1</sup> MS)	265,20	257,30	269,20	263,70
Ácidos graxos (g/kg <sup>-1</sup> MS)				
16:0	11,82	11,01	13,14	10,70
18:0	2,45	3,40	3,30	3,37
<i>cis</i> 9-18:1	25,13	28,85	26,92	24,19
<i>cis</i> 6 18:2	29,23	33,82	19,06	39,22
<i>cis</i> 3-18:3	1,10	1,87	0,70	2,90

<sup>1</sup> Composição média (por kg do produto): Ca 150 g; P 90 g; S 50 g; Na 72 g; F 900mg; Zn 1.800 mg; Cu 250 mg; Mn 600 mg; I 28 mg; Co 20 mg; Se 9 mg.

As matrizes foram pesadas a cada sete dias no mesmo dia em que eram realizadas as coletas de leite, concomitantemente, foram feitos os ajustes nos cálculos da oferta de alimento, para manter o fornecimento da suplementação de 2% do peso corporal das matrizes.

Durante o período experimental, a ingestão foi medida diariamente pesando a ração determinada e conforme recusa. Sendo que as amostras das dietas (oferecido e sobras) e da pastagem foram determinadas de acordo com a metodologia AOAC (2016) para matéria seca (método 930, 15), extrato etéreo (método 920, 39), proteína bruta (método 976, 05) e fibra em detergente neutro de acordo com Van Soest *et al.* (1991) adaptada para utilização num aparelho Ankom® 200 Fiber Analyzer (Ankom Technology Corp., Fairport, NY, USA) usando  $\alpha$ -amilase e sulfito de sódio. A qualidade nutricional da pastagem utilizada durante o experimento encontra - se na Tabela 2.

**TABELA 2** - Composição química da *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em função do tratamento e do mês de utilização

	Tratamentos												CV (%)
	Sem Erva-Mate						Com Erva-Mate						
	Sem Soja			Com Soja			Sem Soja			Com Soja			
	Junho	Julho	Agosto	Junho	Julho	Agosto	Junho	Julho	Agosto	Junho	Julho	Agosto	
	Colmo + bainha												
MS (g/kg)	351,80	332,20	346,50	337,50	330,60	337,80	339,60	344,00	345,20	347,70	348,30	330,90	2,05
PB (g/kg MS)	20,90	24,60	18,90	17,70	24,50	26,00	20,60	26,90	23,60	20,70	21,80	15,50	3,30
EE (g/kg MS)	8,90	8,90	7,80	8,80	7,10	8,40	9,10	8,50	7,80	9,00	8,20	9,20	7,26
FDN (g/kg MS)	764,60	741,80	701,10	772,10	783,90	759,50	661,50	708,40	793,10	707,40	792,30	790,30	5,59
FDA (g/kg MS)	425,80	512,90	484,10	431,80	483,20	513,60	440,80	485,20	598,40	394,40	447,90	594,40	12,54
NDT (g/kg MS)	523,10	532,50	549,30	520,00	515,20	525,20	565,60	546,30	511,40	546,70	511,70	512,50	3,25
	Tratamentos												
	Sem Erva-Mate						Com Erva-Mate						
	Sem Soja			Com Soja			Sem Soja			Com Soja			
	Junho	Julho	Agosto	Junho	Julho	Agosto	Junho	Julho	Agosto	Junho	Julho	Agosto	
	Lâmina foliar												
MS (g/kg)	324,40	353,60	321,30	303,10	348,90	340,10	326,80	330,50	321,40	320,90	335,80	318,70	4,08
PB (g/kg MS)	59,10	60,60	51,90	49,40	52,00	55,50	54,90	62,00	57,70	48,40	52,70	56,50	7,52
EE (g/kg MS)	22,20	22,60	22,90	19,90	21,30	18,40	21,30	23,20	21,30	21,90	22,70	22,60	6,13
FDN (g/kg MS)	674,00	692,50	682,90	702,90	776,40	685,60	658,50	635,50	696,80	677,30	711,30	696,80	4,69
FDA (g/kg MS)	369,20	394,90	428,70	389,20	447,90	382,00	411,90	390,40	390,70	383,10	382,70	386,00	5,39
NDT <sup>1</sup> (g/kg MS)	560,40	552,80	556,80	548,50	518,30	555,60	566,80	576,30	551,00	559,10	545,10	551,00	2,41

MS= Matéria seca; PB= Proteína bruta, EE= Estrato etéreo, FDN= Fibra em detergente neutro; FDA= Fibra em detergente ácido; NDT= Nitrogênio digestível total; CV= Coeficiente de variação.

<sup>1</sup>Valor estimado pela equação de CAPELLE *et al.* (2001):  $NDT = 83,79 - 0,4117 * FDN$  ( $r^2 = 0,82$ ;  $P < 0,01$ ).



Para avaliar o efeito da suplementação das matrizes F1 Texel sobre o desempenho dos cordeiros, calculou-se o ganho médio diário (GMD), em gramas, por diferença entre o peso final (PF) e o peso inicial (PI), dividido pelo número de dias experimentais (60 dias) (HEIMBACH *et al.*, 2019).

## 2.2. Manejo das ovelhas para obtenção do leite

Semanalmente as ovelhas foram ordenhadas do sétimo ao 60º dia pós-parto, utilizando-se o método de coleta direta (BENSON *et al.*, 1999), durante oito semanas de lactação. Durante o período da manhã às 05:30 h, os cordeiros eram separados de suas mães, as quais eram destinadas a primeira ordenha após administração de 1 mL de ocitocina (10 UI) via intramuscular, com o objetivo de esvaziamento do úbere, sendo o leite neste momento descartado. Depois da primeira ordenha as ovelhas continuavam separadas dos cordeiros por um período de 3 horas (05:30 h à 8:30 h), em que existia apenas o contato visual entre as ovelhas e seus cordeiros, ao final desse período as ovelhas recebiam uma nova dose de ocitocina e eram prontamente ordenhadas. O leite obtido na segunda ordenha era mensurado para determinação da produção de leite em três horas, que é extrapolada para uma produção em 24 horas (produção diária), sendo considerada por semana de lactação (SUSIN *et al.*, 1995).

Foram realizados cálculos de produção de leite corrigido para gordura (6,5%) e produção de leite corrigida para gordura (6,5%) e proteína (5,8%). Foram utilizadas as seguintes equações (PULINA; NUDDA, 2004):

$$\text{LCG (6,5\%)} = (0,37 + 0,097 \times (\% \text{gordura})) \times \text{kg leite}$$

$$\text{LCGP (6,5\% e 5,8\%)} = (0,25 + 0,085 \times (\% \text{gordura}) + 0,035 \times (\% \text{proteína})) \times \text{kg leite}$$

Sendo, LCG=Leite corrigido para gordura (1020 kcal/kg)

LCGP = Leite corrigido para gordura e proteína (1047 kcal/kg)

A cada sete dias, durante a ordenha, foram coletadas duas alíquotas de 50 mL de leite que eram acondicionadas em frascos de polietileno. Uma alíquota foi armazenada em frascos contendo bronopol-B2 a 4 °C para avaliação da composição e qualidade do leite. Sendo que as concentrações de proteínas, gorduras, lactose no leite foram determinadas por espectroscopia no infravermelho (Bentley model 2000; Bentley Instrument Inc., Chaska, MN, USA), seguindo procedimento 972,16 (SANTOS *et al.*, 2017). A segunda alíquota foi coletada sem conservantes e congelada a -20 °C para determinar o perfil de ácidos graxos e antioxidantes.

### 2.3. Coleta e análise química do sangue

Foram coletadas amostras de sangue, no momento da ordenha e antes da alimentação, da seguinte forma: 1ª semana de lactação, 14 dias após a adaptação a dieta alimentar; 4ª semana de lactação, 30 dias após; 8ª semana, término da lactação, por meio da punção da veia jugular, com auxílio de vacutainer em tudo de ensaio com capacidade de 10 mL. Após as coletas, as amostras de sangue foram submetidas à centrifugação a 3000 rpm durante 15 min, para a separação do plasma. O plasma obtido foi transferido para *ependorf* e imediatamente congelados -20 °C para posteriores determinações de proteína total (kit ref. 04657586), albumina (kit ref. 04657357), creatinina (kit ref. 05401755), colesterol (kit ref. 04718917), glicose (kit ref. 04657527), ureia (kit ref. 04657616), triglicerídeos (kit ref. 04657594), aspartato aminotransferase (kit ref. 04657543) e gama glutamiltransferase (kit ref. 05401461). O perfil bioquímico foi determinado por meio de kits comerciais (Roche Diagnostics®, Indianápolis, USA), sendo as leituras realizadas em um analisador bioquímico automático (Imunonalisador Cobas C111 - Roche Diagnostics, Indianápolis, USA).

### 2.4. Análise química da atividade antioxidante do leite

A atividade antioxidante foi analisada a partir dos extratos das amostras do leite, sendo obtidos através da adição de 9 mL de metanol em 1 mL de leite. Posteriormente a mistura foi agitada em vortex durante 5 minutos e centrifugada a 1080 g x 10 minutos. A atividade antioxidante do leite foi determinada como descrita por Li *et al.* (2009) através do método de sequestro do radical livre 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH).

Para o sequestro do radical livre (DPPH), alíquotas de 150 µL de extrato foram misturadas com 2,85 mL do radical DPPH (0,06 mM), homogeneizadas em vórtex e mantidas em condições escuras durante 30 minutos. A leitura da absorvância foi realizada no espectrofotômetro Evolution 300 (Thermo Scientific, EUA) a 515 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem.

A capacidade antioxidante total (CAT) das amostras de leite foi determinada conforme descrito por Rufino *et al.* (2007) com a adição de 40 µL do extrato e 1,96 mL de radical ABTS+ (2,2-azinobis- [3-etil-benzotiazolina-6-sulfônico]) ao extrato. A leitura da absorvância foi realizada no espectrofotômetro Evolution 300 (Thermo Scientific, EUA) a 734 nm após 6 minutos de reação. A CAT foi expressa em equivalente de Trolox (µm Trolox/mL).

## 2.5. Hidroperóxidos de dieno conjugados (DC) no leite

A produção de dienos conjugados (DC) no leite foi avaliada pela metodologia descrita por Kiokias *et al.* (2006), cuja finalidade é medir oxidação lipídica do leite, para isso foi adicionado 50 µL de leite à 2,5 mL de uma solução isooctano/2-propanol (2:1, v/v) e misturados por vortex durante 1 min. A mistura foi filtrada em filtro de membrana PTFE, 0,22 µm, e a absorbância foi medida com um espectrofotômetro Evolution 300 (Thermo Scientific, EUA), sendo expressos os resultados em mmol/kg de gordura.

## 2.6. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no leite

A análise de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) no leite foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Vyncke (1970), uma alíquota de 500 µL do leite foi transferida para tubos falcon de 15 mL contendo 2,0 mL de solução de Ácido tiobarbitúrico (TBA 1%, TCA 15% e HCl 562,5 mM). As amostras foram aquecidas em banho maria (100 °C) durante 15 min, esfriadas em água gelada durante cinco minutos e depois foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi transferido a uma cubeta para posterior leitura a 532 nm com um espectrofotômetro Evolution 300 (Thermo Scientific, EUA). Os resultados foram expressos em concentração de (mmol/kg de gordura).

## 2.7. Determinação de ácidos graxos

Para estimar o perfil de ácidos graxos do leite e das dietas, os lipídios totais foram extraídos por meio da técnica a frio descrita por Bligh; Dyer (1959), que remove a fase lipídica da amostra. A transesterificação foi realizada através da metilação da fase lipídica das amostras, de acordo com a metodologia de Hartman; Lago (1973), modificado por Maia; Rodrigues-Amaya (1993).

Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram separados e determinados por um cromatógrafo a gás (Shimadzu<sup>®</sup>, modelo GC 2010), equipado com coluna capilar de sílica fundida (CP – BPX-70, 30 m x 0,25 mm d.i. e 0,25 µm) e detector de ionização de chama (GC - FID) (AGUILAR *et al.*, 2014). O gás de arraste empregado foi o hélio. As injeções foram realizadas utilizando um injetor automático AOC 20i, equipado com uma seringa de 10 µL. O volume injetado foi de 1 µL em modo Split 50:1. A temperatura do injetor e do detector foi

configurada em 250 C. A temperatura inicial da coluna foi estabelecida em 80 C durante 3 minutos, em seguida aumentou – se a temperatura a uma taxa de 10°C/min até atingir 140 C, posteriormente a rampa de aquecimento foi aumentada a uma taxa de 5°C/min, até atingir 250 C, permanecendo nesta faixa por 5 minutos, totalizando 40 minutos de análise.

As áreas dos picos e os tempos de retenção foram determinados através do software GC solution. Os cálculos foram realizados conforme o método de Joseph; Ackman (1992) e os fatores correção teóricos (VISENTAINER, 2012) foram empregados para determinar as concentrações. Os dados foram expressos em mg/g de lipídios totais (mg AG/g LT).

## 2.8. Qualidade nutricional da fração lipídica do leite

A qualidade nutricional da fração lipídica do leite foi avaliada através dos índices de aterogenicidade (IA) e trombogenicidade (IT) foram obtidos através das equações a seguir, propostas por Ulbricht; Southgate (1991):

$$IA = (C12:0 + (4 \times C14:0) + C16:0) / [\Sigma AGMI + \Sigma AGPI (n-6 + n-3)]$$

$$TI = (C14:0 + C16:0 + C18:0) / [(0.5 \times \Sigma AGMI) + (0,5 \times \Sigma AGPI (n-6)) + (3 \times \Sigma AGPI (n-3)) + (n-3) / (n-6)].$$

e a proporção de ácidos graxos hipocolesterolêmicos para hipercolesterolêmicos (SANTOS-SILVA, BESSA; SANTOS-SILVA, 2002).

$$h / H = [(C18: 1 \text{ cis-9} + C18: 2 \omega 6 + C18: 3 \omega 3 + C20: 5 \omega 3 + C22: 6 \omega 3) / (C14: 0 + 16: 0)]$$

## 2.9. Análises estatísticas

O ensaio foi conduzido em esquema fatorial 2X2 (com e sem erva-mate X com e sem soja em grão), de acordo com o modelo geral:

$$Y_{ijk} = \mu + U_i + O_j + U \times O_{ij} + e_{ijk}$$

Em que  $Y_{ijkl}$  é o valor observado;  $\mu$  é a média geral;  $U_i$  é o efeito fixo da erva-mate ( $i=1$  e  $2$ );  $O_j$  é o efeito fixo da soja em grão ( $j=1$  e  $2$ );  $U \times O_{ij}$  é o efeito fixo da interação entre a erva-mate e a soja em grão;  $e_{ijk}$  é o erro residual. Os efeitos dos tratamentos foram comparados por contrastes ortogonais: 1. ausência vs presença de erva-mate; 2. ausência vs presença de soja em grão; 3. interação erva-mate vs soja em grão. Quando houve interação entre os fatores erva-mate e soja em grão foi aplicado o teste de Tukey, adotando o nível de significância de 5%. As

análises estatísticas dos dados foram feitas utilizando procedimento PROC MIXED por meio do programa SAS - Statistical Analysis Systems (SAS, 2002) versão 9.0.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Consumo e desempenho

Houve interação entre a erva-mate e a soja em grão sobre a ingestão de todos os nutrientes avaliados (MS, MO, PB, EE e FDN). Verificou-se que a inclusão de erva-mate (EM) na dieta afetou o consumo ( $P < 0,05$ ) PB e EE na ausência da soja em grão.

Não houve interação entre os efeitos da erva-mate e da soja em grão ( $P > 0,05$ ) sobre desempenho das ovelhas e de seus cordeiros. Entretanto, a suplementação com soja em grão reduziu o peso ao nascer - PN ( $P = 0,0242$ ) dos cordeiros (Tabela 3).

**TABELA 3-** Consumo médio de concentrado e desempenho produtivo de ovelhas e seus cordeiros do parto aos 60 dias

	Tratamentos				EPM <sup>2</sup>	Erva	Soja	Interação
	Sem Erva-Mate		Com Erva-Mate					
	Sem Soja	Com Soja	Sem Soja	Com Soja				
Consumo do concentrado (kg/dia) <sup>1</sup>								
MS	1,07 <sup>a</sup>	1,00 <sup>b</sup>	0,98 <sup>b</sup>	1,10 <sup>a</sup>	44,96	0,6442	0,0843	<0,0001
MO	1,01 <sup>a</sup>	0,93 <sup>b</sup>	0,91 <sup>b</sup>	1,02 <sup>a</sup>	42,10	0,8046	0,2042	<0,0001
PB	0,17 <sup>a</sup>	0,14 <sup>b</sup>	0,13 <sup>b</sup>	0,17 <sup>a</sup>	6,80	<0,0001	0,0038	<0,0001
EE	0,03 <sup>c</sup>	0,05 <sup>b</sup>	0,02 <sup>d</sup>	0,09 <sup>a</sup>	2,94	<0,0001	<0,0001	<0,0001
FDN	0,28 <sup>a</sup>	0,26 <sup>b</sup>	0,26 <sup>b</sup>	0,29 <sup>a</sup>	11,87	0,0883	0,8673	<0,0001
Matrizes <sup>3</sup>								
PPP	65,28	62,03	62,98	67,13	6,54	0,6761	0,8928	0,2800
PW60	60,78	57,95	54,83	62,35	7,64	0,8427	0,5501	0,2006
GPT (kg)	- 6,95	- 10,63	- 9,0	- 9,83	8,85	0,8900	0,6203	0,7529
GMD (g/dia)	- 116	- 177	-150	-164	0,15	0,8900	0,6203	0,7529
Cordeiros <sup>4</sup>								
PN	4,32	3,17	3,63	3,37	0,72	0,4520	0,0242	0,1441
PD	20,76	18,00	21,12	18,06	4,18	0,9656	0,0993	0,9335
GMD (g/dia)	0,274	0,247	0,292	0,245	0,62	0,8416	0,1613	0,7021

<sup>a-d</sup> Valores na mesma linha com diferentes sobre escrito diferem ( $P < 0,05$ ).

<sup>1</sup> MS= matéria seca; MO= matéria orgânica; PB= proteína bruta; EE= extrato etéreo; FDN= fibra detergente neutra.

<sup>2</sup> EPM = erro padrão da média;

<sup>3</sup> PPP= peso pós-parto; PW60 = peso após 60 dias de lactação; GPT= ganho de peso total; GMD= ganho médio diário. <sup>4</sup> PN= peso ao nascer; PD= peso ao desmame.

### **3.2 Produção, composição, perfil oxidativo e atividade antioxidante**

Não observamos interação ( $P > 0,05$ ) entre erva-mate e soja em grão para a produção (PL), produção de leite corrigida para gordura (PLCG), produção de leite corrigida para gordura e proteína (PLCGP), composição do leite e atividade antioxidante (Tabela 4). Os teores gordura do leite não foram influenciados pelos tratamentos avaliados ( $P > 0,05$ ). Enquanto que a suplementação com erva-mate apresentou tendência em aumentar o poder do sequestro do radical livre do leite (DPPH) ( $P = 0,0510$ ) e diminuiu a concentração de proteína, lactose, extrato seco desengordurado, densidade ( $P < 0,05$ ).

**TABELA 4** - Produção, composição e qualidade oxidativa do leite de ovelhas alimentadas com dietas contendo erva-mate e soja em grão

	Tratamentos				EPM <sup>2</sup>	Erva	Soja	Interação
	Sem Erva-Mate		Com Erva-Mate					
	Sem Soja	Com Soja	Sem Soja	Com Soja				
Produção (kg/dia)								
PL <sup>1</sup>	1,24	1,20	1,17	1,28	0,33	0,9069	0,5775	0,2278
PLCG <sup>3</sup>	0,95	1,04	0,96	1,07	0,30	0,6728	0,0760	0,8855
PLCGP <sup>4</sup>	0,91	0,98	0,91	0,99	0,28	0,8144	0,1026	0,8962
Composição do leite (%)								
Gordura	4,23	5,13	4,78	4,96	1,72	0,4852	0,1125	0,2489
Proteína	3,85	3,82	3,74	3,52	0,49	0,0163	0,1971	0,2536
Lactose	5,58	5,52	5,44	5,11	0,72	0,0309	0,1641	0,2693
Extrato seco desengordurado	10,22	10,10	9,90	9,35	1,31	0,0187	0,1918	0,3403
Densidade	1,038	1,037	1,036	1,034	5,55	0,0126	0,1084	0,5817
Antioxidantes <sup>5</sup>								
DPPH (mg/ mL)	79,60	76,50	85,50	85,10	2,08	0,0510	0,6493	0,7167
CAT - (µM Trolox/mL)	200,06	198,04	201,57	196,31	13,47	0,9642	0,1294	0,4968
DC (mmol/kg gordura)	72,87	59,06	66,49	61,93	40,26	0,8056	0,1993	0,5169
TBARS (mmol/kg de gordura)	247,22	239,20	254,31	266,22	146,72	0,5159	0,9431	0,70263

<sup>1</sup>PL= produção de leite; PLCG= produção de leite corrigida para gordura; PLCGP= produção de leite corrigida para gordura e proteína.

<sup>2</sup>EPM= Erro padrão médio;

<sup>3</sup>Valor estimado pela equação de Pulina; Nudda, (2004):  $PLCG=(PL*(0,37+0,097*G))$ ;

<sup>4</sup>Valor estimado pela equação de Pulina; Nudda, (2004):  $PLCGP=(PL*(0,25 + 0,085*G + 0,035*P))$ ;

<sup>5</sup> DPPH= sequestro do radical livre 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl; CAT= capacidade antioxidante total; DC= dienos conjugados; TBARS= substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

Foi observado efeito de interação entre erva-mate e soja em grão sobre C17:1, C18:2n6c, C21:0, C20:3n6, C24:0, C24:1n9 e C22:6n3 ( $P < 0,05$ ). A adição de erva-mate aumentou as concentrações dos ácidos C21:0 e C22:6n3 na ausência de soja em grão, enquanto na presença de soja em grão houve aumento as concentrações de C24:0 e C24:1n9. A suplementação com soja em grão aumentou as concentrações dos ácidos graxos C18:2n6c e C20:3n6. De modo geral, a suplementação com soja em grão reduziu ( $P < 0,05$ ) a concentração dos ácidos graxos de cadeia curta e média, C6:0, C12:0, C14:0 e C16:0, e aumentou ( $P < 0,05$ ) a concentração dos ácidos graxos de cadeia longa C16:1, C17:0, C18:0, C18:2 n6t, C18:2n6c e C20:3 n6. A dieta com erva-mate diminuiu C18:3n3 e 20:4n6, no entanto, aumentou C18:1n9c e C20:5n3. Não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) para os ácidos graxos C4:0, C10:0, C11:0, C13:0, C18:1n9t, C18:3n6, C20:0, C20:1, C20:3 n3 e NI (Tabela 5).



**TABELA 5** - Perfil de ácidos graxos no leite (mg/g de lipídios totais) de ovelhas alimentadas com dietas contendo erva-mate e soja em grão

Ácidos graxos	Tratamentos				EPM <sup>1</sup>	Erva	Soja	Interação
	Sem Erva-Mate		Com Erva-Mate					
	Sem Soja	Com Soja	Sem Soja	Com Soja				
C4:0 (butírico)	0,86	0,86	0,91	1,01	0,54	0,3014	0,5410	0,6003
C6:0 (capróico)	1,69	1,60	1,76	1,55	0,39	0,9857	0,0344	0,3660
C8:0 (caprílico)	1,23	1,26	1,35	1,18	0,27	0,6993	0,1113	0,0508
C10:0 (cáprico)	4,61	4,51	4,84	3,85	1,30	0,3523	0,1540	0,0651
C11:0 (undecílico)	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,1766	0,4050	0,1417
C12:0 (láurico)	2,81	2,64	2,70	2,21	0,79	0,0579	0,0204	0,2857
C13:0 (tridecílico)	0,01	0,03	0,01	0,06	0,02	0,4004	0,6190	0,6394
C14:0 (mirístico)	7,49	7,04	7,44	6,38	1,62	0,1855	0,0102	0,3117
C15:0 (pentadecílico)	0,64	0,65	0,60	0,51	0,14	0,0002	0,0721	0,0506
C16:0 (palmítico)	23,29	22,77	23,70	22,05	2,30	0,6472	0,0086	0,1880
C16:1 (palmitoléico)	0,67	0,56	0,64	0,52	0,09	0,0090	<0,0001	0,8998
C17:0 (margárico)	0,74	0,61	0,74	0,66	0,15	0,6915	0,0001	0,4702
C17:1 (heptadecanóico)	0,31 <sup>a</sup>	0,21 <sup>b</sup>	0,29 <sup>a</sup>	0,26 <sup>b</sup>	0,07	0,6973	<0,0001	0,0396
C18:0 (esteárico)	13,80	17,89	13,23	17,45	2,27	0,6125	<0,0001	0,8797
C18:1n9t (elaídico)	0,38	0,37	0,33	0,35	0,11	0,0990	0,6741	0,6249
C18:1n9c (oléico)	26,91	25,85	27,89	28,39	4,54	0,0372	0,7378	0,3568

C18:2n6t (linoeláidico)	0,21	0,25	0,18	0,21	0,08	0,0219	0,0160	0,7499
C18:2n6c (linoléico)	1,90 <sup>b</sup>	2,36 <sup>a</sup>	1,75 <sup>b</sup>	1,82 <sup>b</sup>	0,52	0,0012	0,0097	0,0356
C18:3n6 ( $\gamma$ -linolênico)	0,004	0,011	0,007	0,004	0,02	0,1698	0,1325	0,1201
C18:3n3 (linolênico)	0,26	0,23	0,21	0,21	0,06	0,0313	0,4596	0,5266
C20:0 (araquídico)	0,22	0,20	0,19	0,20	0,08	0,2567	0,8071	0,4857
C20:1 (gadoléico)	0,011	0,008	0,023	0,032	0,07	0,7508	0,1042	0,1972
C20:2 (eicosadienóico)	0,001 <sup>b</sup>	0,002 <sup>a</sup>	0,001 <sup>b</sup>	0,001 <sup>b</sup>	0,01	0,2178	0,0580	0,0686
C21:0 (heneicosanóico)	0,016 <sup>b</sup>	0,017 <sup>b</sup>	0,021 <sup>a</sup>	0,020 <sup>b</sup>	0,01	0,8300	0,0690	0,0176
C20:3n6 (dihomo- $\gamma$ -linolênico)	0,001 <sup>b</sup>	0,005 <sup>a</sup>	0,003 <sup>b</sup>	0,003 <sup>b</sup>	0,01	0,8659	0,0174	0,0414
C20:4n6 (araquidônico)	0,18	0,20	0,17	0,15	0,04	0,0004	0,7372	0,0760
C20:3n3 (dihomo- $\alpha$ -linolênico)	0,014	0,014	0,016	0,037	0,07	0,5944	0,3225	0,4631
C20:5n3(eicosapentaenóico)	0,001	0,003	0,005	0,004	0,01	0,0304	0,6096	0,1273
C24:0 (lignocérico)	0,010 <sup>b</sup>	0,008 <sup>b</sup>	0,010 <sup>b</sup>	0,017 <sup>a</sup>	0,07	0,0050	0,1149	0,0087
C24:1n9 (nervônico)	0,001 <sup>b</sup>	0,001 <sup>b</sup>	0,004 <sup>b</sup>	0,039 <sup>a</sup>	0,25	<0,0001	<0,0001	<0,0001
C22:6n3(docosahexaenóico)	0,0001 <sup>b</sup>	0,0006 <sup>ab</sup>	0,0039 <sup>a</sup>	0,0001 <sup>b</sup>	0,03	<0,0001	0,0012	<0,0001
NI <sup>2</sup>	11,92	9,89	11,08	11,10	3,42	0,9413	0,1427	0,1054

<sup>a-c</sup> Valores na mesma linha com diferentes sobrescritos diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey (P<0,05).

<sup>1</sup>EPM= erro padrão médio;

<sup>2</sup>NI= ácidos graxos não identificados

De modo geral, houve efeito da interação entre erva-mate e soja em grão ( $P < 0,05$ ) sobre CLA total, AGPI, n-6 e sobre a razão n-6/n-3, sendo que a suplementação lipídica, na ausência de erva-mate aumentou tais variáveis. Contudo as dietas com soja em grão diminuíram os AGCM ( $P < 0,05$ ) e aumentaram os AGCL ( $P < 0,05$ ). Além disso a adição de erva-mate aumentou a concentração AGMI ( $P = 0,0482$ ), e diminuiu das concentrações de n-3 e da razão entre AGS/AGMI. Não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) para as concentrações dos AGCC, AGS, AI, TI e h/H (Tabela 6).

**TABELA 6** - Concentrações percentuais e razões de ácidos graxos agrupados no leite de ovelhas alimentadas com erva-mate e soja em grão

Item	Tratamentos				<sup>1</sup> EPM	Erva	Soja	Interação
	Sem Erva-Mate		Com Erva-Mate					
	Sem Soja	Com Soja	Sem Soja	Com Soja				
<sup>2</sup> CLA Total	2,10 <sup>b</sup>	2,59 <sup>a</sup>	1,93 <sup>b</sup>	1,96 <sup>b</sup>	0,58	0,0007	0,0085	0,0002
AGCC	3,78	3,73	4,02	3,74	0,77	0,3640	0,2212	0,4171
AGCM	38,87	37,67	39,30	35,06	5,47	0,2418	0,0055	0,1338
AGCL	45,44	48,73	45,59	50,07	5,99	0,3714	0,0005	0,5917
AGS	57,43	60,13	57,52	57,13	4,95	0,1662	0,2584	0,0927
AGMI	28,22	26,95	29,13	29,45	4,64	0,0482	0,5804	0,3525
AGPI	2,31 <sup>b</sup>	2,89 <sup>a</sup>	2,12 <sup>b</sup>	2,17 <sup>b</sup>	0,63	0,0006	0,0117	0,0273
n-3	0,20	0,22	0,18	0,14	0,11	0,0152	0,6018	0,1677
n-6	2,01 <sup>b</sup>	2,52 <sup>a</sup>	1,88 <sup>b</sup>	1,91 <sup>b</sup>	0,55	0,0011	0,0147	0,0178
n-6/n-3	7,09 <sup>b</sup>	10,07 <sup>a</sup>	7,44 <sup>b</sup>	6,33 <sup>b</sup>	4,25	0,0592	0,3212	0,0104
AGS/AGMI	2,16	2,28	2,03	2,02	0,53	0,0487	0,6054	0,4829
AI	1,98	1,84	1,87	1,66	0,61	0,1629	0,1182	0,7632
TI	2,97	3,13	2,82	2,93	0,65	0,1750	0,2565	0,8411
h/H	0,98	0,96	0,98	1,10	0,24	0,1317	0,1879	0,1279

<sup>a</sup> - <sup>ab</sup> Valores na mesma linha com diferentes sobrescritos diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

<sup>1</sup>EPM= Erro padrão médio;

<sup>2</sup> CLA Total= ácido linoléico conjugado; AGCC= ácidos graxos de cadeia curta (4 a 8 carbonos); AGCM= ácidos graxos de cadeia média (10 a 16 carbonos); AGCL= ácidos graxos de cadeia longa (>16 carbonos); AGS= ácidos graxos saturados; AGMI= ácidos graxos monoinsaturados; AGPI= ácidos graxos poli-insaturados; AI= índice de aterogenicidade; TI=

índice de trombogenicidade; h/H = proporção de ácidos graxos hipocolesterolêmicos para hipercolesterolêmicos.

### 3.3 Parâmetros sanguíneos

Houve efeito da interação entre erva-mate e soja em grão ( $P < 0,05$ ) sobre CT e GGT. No entanto, as matrizes suplementadas somente com soja em grão tiveram um aumento no CT (90,00 mg/dL). Além disso, a inclusão da erva-mate, na ausência da suplementação lipídica afetou a PT e ALB. (Tabela 7).

**TABELA 7** – Média da concentração plasmática do sangue de ovelhas alimentadas com erva-mate e soja em grão

	Tratamentos				<sup>1</sup> EPM	Erva	Soja	Interação
	Sem Erva-Mate		Com Erva-Mate					
	Sem Soja	Com Soja	Sem Soja	Com Soja				
Composição <sup>2</sup>								
PT (g/dL)	6,18	6,60	6,32	6,67	0,81	0,0142	0,7502	0,0804
ALB (g/dL)	2,53	2,65	2,63	2,96	0,46	0,0180	0,2992	0,0517
UR (mg/dL)	17,65	17,33	17,48	18,40	7,81	0,2013	0,5411	0,4113
CRE (mg/dL)	1,30	1,20	1,19	1,24	0,08	0,4540	0,8769	0,8371
GLI (mg/dL)	73,96	75,39	62,14	64,76	10,08	0,0824	0,5690	0,2446
CT (mg/dL)	77,00 <sup>ab</sup>	90,00 <sup>a</sup>	71,33 <sup>ab</sup>	58,25 <sup>b</sup>	9,74	0,0005	0,0195	0,0006
TG (mg/dL)	20,10	16,12	17,38	17,72	5,87	0,6384	0,6349	0,7642
AST (U/L)	109,15	125,93	93,75	86,10	29,24	0,0585	0,6461	0,2065
GGT (U/L)	52,73 <sup>a</sup>	51,10 <sup>a</sup>	49,93 <sup>a</sup>	50,62 <sup>a</sup>	11,45	0,0081	0,1531	0,0179

<sup>a - ab</sup> Valores na mesma linha com diferentes sobrescritos diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

<sup>1</sup>EPM= Erro padrão médio;

<sup>2</sup>PT= proteína total; ALB= albumina; UR= ureia; CRE= creatinina; GLI= glicose; CT= colesterol total; TG= triglicérides; AST= aspartato aminotransferase; GGT= gama-glutamil transferase.

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1 Consumo e desempenho das ovelhas e de seus cordeiros

A adição de erva-mate (EM) a dieta, sem a presença de soja em grão (SG) reduz a ingestão PB e EE. Esta redução pode estar associada a presença dos taninos, por estes apresentarem efeito sobre a proteína dietética, uma vez que os taninos diminuem a degradação da proteína, especialmente por formar um complexo tanino-proteína (HARTEMINK *et al.*, 2015). Em relação ao EE, o tanino pode causar a inibição da lipase (ALKHATIB; ATCHESON, 2017). Por outro lado, verificou-se que houve interação quando a EM foi adicionada juntamente com a SG na dieta ocorrendo assim um efeito positivo na ingestão de todos os nutrientes avaliados (MS, MO, PB, EE e FDN). Assim, na presença da SG os efeitos negativos da EM sobre a ingestão da PB e do EE foram anulados.

Não houve efeito da interação entre erva-mate e soja em grão para o desempenho das ovelhas lactantes e de seus cordeiros. Desta forma, a perda de peso que ocorreu durante a lactação é explicada devido ao estado fisiológico das matrizes, pois, no início da lactação, as ovelhas são forçadas a usar suas reservas corporais para produzir leite (ÁNGELES HERNÁNDEZ *et al.*, 2018; HEIMBACH *et al.*, 2020), isso porque há aumento da demanda energética animal que supera sua capacidade de ingestão de energia pelos nutrientes da dieta, uma vez que a produção de leite é crescente, e o consumo ainda não atingiu o máximo e assim normalmente ocorre mobilização de reservas corporais (HEIMBACH *et al.*, 2020).

O peso ao nascer (PN) dos cordeiros foi influenciado pela nutrição materna. As matrizes que foram suplementadas com soja em grão sem a presença da erva-mate produziram cordeiros com o menor PN, uma vez que super nutrição durante a gestação promove uma rápida síntese de tecido materno (principalmente de tecido adiposo) às custas das necessidades nutricionais do útero gravídico (WALLACE *et al.*, 2005). Desta forma, PN dos cordeiros está relacionado ao histórico de nutrição da ovelha durante o período de gestação, assim ovelhas super nutridas também podem ter restrição no crescimento fetal (ARCO *et al.*, 2021). Embora a restrição de crescimento placentário e fetal serem observados mais comumente em ovelhas com restrição materna (HEIMBACH *et al.*, 2019).

## 4.2 Produção, composição química do leite e concentração de ácidos graxos

Não houve efeito da interação para a produção (PL), produção de leite corrigida para gordura (PLCG), produção de leite corrigida para gordura e proteína (PLCGP), composição do leite e atividade antioxidante. Assim, a semelhança na produção de leite acordo com Mora-Medina *et al.* (2016) pode ser atribuída ao vínculo ovelha e cordeiro que demonstra ser um forte mediador de secreção de ocitocina. Ao mesmo tempo, a ejeção constante do leite precisa de elevada concentração de ocitocina ao longo de toda a ordenha e qualquer falha no processo de ejeção do leite pode atrapalhar sua remoção (BRUCKMAIER; BLUM, 1998).

Este estudo ainda demonstra que os tratamentos avaliados não afetaram a gordura do leite, o que concorda com os resultados de Santos *et al.* (2017), ao observarem vacas leiteiras que foram suplementadas com (250, 500 ou 750 g/dia) erva-mate. Contudo, o teor de proteína, lactose, extrato seco desengordurado, densidade foram reduzidos com as dietas contendo a erva-mate.

Estes resultados sugerem que dietas contendo erva-mate proporcionaram a glândula um menor aporte de aminoácidos para a síntese de proteínas do leite. Uma vez que a erva-mate contém taninos (hidrolisáveis *versus* condensado) que proporcionam uma menor degradabilidade no rúmen (SANTOS *et al.*, 2019). Estes autores também não abordaram a síntese de proteína microbiana, mas acreditam que os tanininos poderiam ter reduzido a síntese de proteína no rúmen, e, portanto, possivelmente reduzido a disponibilidade de aminoácidos para síntese de proteínas mamárias (SANTOS *et al.*, 2019).

Os teores de lactose diminuem suas concentrações, provavelmente, porque a secreção de lactose no lúmen alveolar requer a disponibilidade de glicose e lactalbumina (ZHAO, 2013). Duas hipóteses serão discutidas. A primeira é a redução na disponibilidade da lactalbumina através da suplementação com erva-mate, visto que a erva-mate possui taninos hidrolisáveis que podem ser degradados pelos microrganismos ruminais, e após a absorção estes compostos podem ficar acumulados no sangue, contribuindo para menor síntese de lactose (SANTOS *et al.*, 2017). A segunda hipótese refere-se ao decréscimo nas proporções de lactose devido ao menor suprimento de glicose para a glândula mamária, uma vez que a erva-mate é rica em ácido clorogênico (BRACESCO *et al.*, 2011), e este ácido pode impedir a atividade da glicose-6-fosfatase, que é a enzima vinculada à etapa final da gliconeogênese (BASSOLI *et al.*, 2008).

Por conseguinte, a redução nos teores de extrato seco desengordurado (ESD) e da densidade do leite quando as matrizes foram suplementadas com dietas que continham erva-

mate, visto que essa redução está relacionada a mudanças nos teores de proteína e, ocasionalmente, nos teores de lactose do leite (MARQUES *et al.*, 2011).

Com respeito à atividade antioxidante no leite, a suplementação com adição de erva-mate na ausência da soja em grão foi a que apresentou uma tendência a aumentar a resposta do poder de sequestro do radical livre do leite (DPPH). Huang *et al.* (2014), em um estudo em laboratório, observaram maior resposta do 2,2-difenil-1-picril-hidrazi (DPPH) e do 2,2'-azinobis 3-etilbenzotiazoline-6-ácido sulfônico (ABTS) à medida que os níveis de erva-mate aumentaram de 100 a 500 ppm. Entretanto, os agentes oxidantes agem de forma distinta entre si e ainda não há concordância entre os pesquisadores sobre uma técnica única, padrão ou forma de expressar os resultados (COTTICA *et al.*, 2019).

Os resultados ainda demonstram que os tratamentos avaliados não afetaram os dienos conjugados (DC), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), o que confirma que a suplementação com erva-mate não foi capaz em diminuir a lipoperoxidação no leite. Isso concorda com os resultados encontrados por Santos *et al.* (2019) ao avaliarem os efeitos da suplementação com erva-mate e vitamina E no leite de vacas da raça Holandesa recebendo dietas contendo grãos moídos de soja.

Esse resultado não era esperado, pois a suplementação com erva-mate foi a que apresentou maior resposta para a atividade antioxidante por DPPH nas amostras de leite, assim esperávamos que ocorresse efeito protetor contra danos causados pela lipoperoxidação, porém essa questão ainda não está totalmente elucidada dado que segundo Shahidi; Ambigaipalan, (2015) afirmam que o potencial antioxidante dos compostos fenólicos depende do número e da disposição dos grupos hidroxila nas moléculas, de modo que os mesmos níveis de compostos fenólicos não correspondem as mesmas respostas antioxidantes. Da mesma forma que o conteúdo fenólico medido pelo método de Folin-Ciocalteu depende da sua natureza química, e do seu potencial de eliminação de radicais (DAI; MUMPER, 2010).

As dietas com soja em grão reduziram os ácidos graxos de cadeia curta e média (AGCCM), isso pode ser pela maior concentração dos AGPI que contém a soja em grão (LIMA *et al.*, 2011). Os AGPI da soja em grão podem sofrer biohidrogenação incompleta dando origem as AG trans-9, cis-11-CLA e trans-10, cis-12-CLA (BARLETTA *et al.*, 2016). Este último AG é inibidor da síntese de gordura do leite (BARLETTA *et al.*, 2016), de tal modo este CLA (trans-10, cis-12-CLA) possivelmente reduziu os AGCCM (C6:0, C8:0, C12:0, C14:0 e C16:0).

De modo geral, as dietas com soja em grão aumentaram os ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) (C18:0, C18:2n6t, C18:2n6, C20:3n6, C20:4n6 e C20:2). Isto pode ser explicado

pela composição da soja em grão, que é rica em C18:3 n-6, e quando chega no rúmen pode sofrer biohidrogenação, com a finalidade de proteger as bactérias ruminais e, gerar ácidos graxos intermediários, tais como ácidos linoléicos conjugados (CLA), ácidos transvacênicos (TVA) e outros ácidos, com ácido esteárico (18:0) como produto final que podem ser incorporados na gordura do leite, aumentando assim os AGCL no leite (BARLETTA *et al.*, 2016).

Assim a suplementação com soja em grão, sem a adição de erva-mate influenciou os ácidos graxos do leite, aumentando o CLA total, AGPI, n- 6 e razão n-6/n-3. O aumento dos AGPI resulta em melhor perfil de ácidos graxos para o consumo humano. Isto porque fontes protegidas de ácidos graxos diminuem a biohidrogenação ruminal, melhorando assim concentração abomasal. Esse resultado demonstra o poder de proteção e a lenta liberação de lipídios dos grãos de soja (BARLETTA *et al.*, 2016).

Assim sendo, o aumento do isômero CLA desempenha um importante papel na saúde humana, em razão das suas propriedades antimutagênica, anticarcinogênica, capacidade de reduzir a obesidade e diabetes, prevenção de aterosclerose, melhora do sistema imunológico e anti-hipertensivo (CORREDU *et al.*, 2020). Portanto, aumentar sua concentração na gordura do leite, destinado à produção de derivados lácteos, através da suplementação lipídica é benéfico (CORREDU *et al.*, 2020).

Todavia, mais importante do que os teores de n-3 consumido na dieta, é a razão n-6/n-3. Quando essa razão fica muito elevada, mais ômega 6 sendo ofertado, ocorrem reações de inflamação no organismo, pois o n-6 compete pelas enzimas responsáveis pela dessaturação e alongação com o n-3 (WELTER *et al.*, 2016). Como consequência, promove produção de substâncias pró-inflamatórias, vasoconstritoras e pró-agregantes (OLIVEIRA *et al.*, 2021). Nessa perspectiva, de acordo com Welter *et al.* (2016) a Organização Mundial da Saúde (OMS), em conjunto com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO), recomenda uma proporção de (5: 1) até (10: 1), para se ter para uma dieta balanceada na proporção ômega 6/ômega 3.

Vale destacar também o aumento do AG C22:6 n-3 (ácido docosahexaenóico, DHA) na gordura do leite de ovelhas lactantes, pela adição da erva-mate na dieta, pois este apresenta inúmeros benefícios ao consumidor dos produtos oriundos deste leite enriquecido. Este ácido graxo reduz a incidência de doenças cardiovasculares, por prevenir agregação plaquetária, controle da pressão arterial e estabilizar a formação de placas de ateromas e triglicérides, além



de diminuir os marcadores de inflamação sistêmica e de estresse oxidativo (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015).

Ademais, adição da erva-mate aumenta a atividade da enzima  $\Delta 9$ -dessaturase, provavelmente devido à sua atuação como cofator das enzimas responsáveis pela dessaturação dos ácidos graxos (CZUMAJ; ŚLEDZIŃSKI, 2020). Assim, o aumento da atividade da enzima  $\Delta 9$ -dessaturase promoveria o aumento da concentração de AGMI e reduziria AGS no leite, agregando melhorias ao perfil lipídico (CZUMAJ; ŚLEDZIŃSKI, 2020), já que segundo Valenti *et al.* (2020) isto ocorre devido a presença dos taninos que podem influenciar a biohidrogenação ruminal, ocorrendo a saturação progressiva de AGPI para 18:0 e, como consequência, aumento do fluxo de ácidos graxos (18:2 c9 t11 e o TVA, 18:1 t11, bem como outros isômeros trans 18:1) que podem ser absorvidos, posteriormente metabolizados e acumulados na glândula mamária.

A aterogenicidade (AI) é a capacidade de causar a aterosclerose, enquanto a trombogenicidade (TI) é a capacidade de provocar ataques cardíacos e derrames (WELTER *et al.*, 2016). Esses índices apontam que quanto menores os teores, maior a quantidade de ácidos graxos aterogênicos presentes em uma dada gordura ou óleo, e maior o potencial de prevenção contra o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (OLIVEIRA *et al.*, 2021). Já a razão entre os ácidos graxos hipocolesterolêmicos e hipercolesterolêmicos (h/H) atuam de forma contrária aos índices anteriormente citados, pois quanto maior o h/H, melhor o valor nutricional do óleo ou gordura e menor o risco de incidência de doenças cardiovasculares (WELTER *et al.*, 2016). Entretanto, não existe valor indicado para nenhum desses índices em produtos lácteos (OLIVEIRA *et al.*, 2021).

Neste sentido, pode-se afirmar que as dietas avaliadas não influenciaram significativamente nestes índices do leite em ovelhas lactantes Texel F1 mantidas em pastagens tropicais, pois este estudo não foi capaz de demonstrar alterações nas concentrações totais dos AGS que promovem a trombose e os ateromas, porém considera-se que quanto menor o valor dos índices AI e TI, e maior h/H, mais favorável é o perfil de ácidos graxos à saúde humana (WELTER *et al.*, 2016).

### 4.3 Perfil sanguíneo

Os resultados do nosso estudo mostram que a inclusão da erva-mate afetou os níveis séricos para PT e ALB. Entretanto, as concentrações para estes parâmetros mantiveram-se

dentro dos valores normais de referência (PT - 6,0 a 7,9 g/dL<sup>-1</sup> e ALB - 2,4 a 3,0 g/dL<sup>-1</sup>) segundo Kaneko *et al.* (2008). Esta resposta, provavelmente, se deve ao fato de a proteína sérica total ser composta de albumina e globulinas e variar de acordo com o estado fisiológico do animal (LOBO *et al.*, 2020). Assim, a albumina, principal proteína na composição do soro, pode ser considerada como um indicador sensível ao estado nutricional das proteínas a longo prazo, uma vez que as baixas concentrações geralmente indicam ingestão inadequada de proteínas (LOBO *et al.*, 2020).

A interação entre erva-mate e soja em grão afetou as concentrações CT e GGT. As matrizes suplementadas com soja em grão, sem a adição da erva-mate, apresentaram aumento no valor plasmático de colesterol total (90 mg/dL<sup>-1</sup>) acima dos valores considerados como padrão por Kaneko *et al.* (2008) (52 e 76 mg/dL<sup>-1</sup>). Este aumento da concentração do colesterol no lipidograma do soro pode ser justificado devido ao maior consumo de ácidos graxos na ração, que proporciona aumento das respectivas frações relativas ao metabolismo de lipídios transportados no sangue (BARLETTA *et al.*, 2012).

As concentrações plasmáticas encontradas neste estudo discordam dos resultados encontrados por Celi; Robinson (2010) ao avaliarem bezerros da raça Holandesa que foram divididos aleatoriamente em dois grupos. O grupo controle foi alimentado com leite fresco e o outro grupo recebeu leite fresco suplementado com 50 g de erva-mate moída. Estes autores não encontram diferenças nos níveis de proteína, ureia, colesterol, enquanto as concentrações plasmáticas de triglicérides foram significativamente maiores nos bezerros suplementados com erva-mate em comparação com o grupo controle.

Já a atividade enzimática representadas pela GGT mantiveram-se no limite considerado normal para a espécie ovina (20–52 U / L) (KANEKO *et al.*, 2008). Desta forma, os resultados sugerem que a dietas experimentais oferecidas aos animais não causaram nenhum comprometimento ao funcionamento hepático (MOREIRA *et al.*, 2019), uma vez que para caracterizar a lesão hepática, outros parâmetros bioquímicos do sangue precisam ser avaliados, como concentração de ALB e AST, ambos os parâmetros não se alteraram quando houve ingestão de erva-mate (LOBO *et al.*, 2020).

Logo, essa discrepância nos resultados sobre a erva-mate e seus efeitos pode estar associada aos taninos e outros ingredientes da dieta, diferenças nas espécies animais (bovinos *versus* ovinos) (SANTOs *et al.*, 2017), ou ainda na duração e dose do regime de suplementação (BARBATO *et al.*, 2019).

## **5. CONCLUSÃO**

A suplementação com erva-mate, soja em grão e suas interações não afetam a produção de leite e o desempenho das ovelhas lactantes criadas em pastagens tropicais. Além disso, adição de erva-mate não influencia no perfil oxidativo do leite. Enquanto que a suplementação com soja em grão melhorou o perfil de AG do leite, aumentando as concentrações de CLA e de AGPI. A associação de soja em grão e erva-mate ajuda a melhorar a qualidade da gordura do leite de ovelhas criadas em pastagens tropicais, embora não ajude a prevenir a oxidação do leite rico em AGPI.

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; a Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul; e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES (Código de Financiamento 001).

## REFERÊNCIAS

AGUILAR, C., TORO-MUJICA, P. *et al.* A comparative study of the fatty acid profiles in commercial sheep cheeses. **Grasas Aceites**. v. 65, n. 4, p. 1-7, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.3989/gya.0460141>.

ALKHATIB, A., ATCHESON, R. Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) metabolic, satiety, and mood state effects at rest and during prolonged exercise. **Nutrients**. v.15; n. 9, p. 778-882, 2017. DOI: 10.3390/nu9080882.

ÁNGELES HERNÁNDEZ, J.C., RADIC SCHILLING, S. *et al.* Effect of live weight pre- and post-lambing on milk production of East Friesian sheep. **Journal Animal Science**. v.17, p. 184–194, 2018. DOI: 10.1080/1828051X.2017.1349536.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of AOAC International**, 20 ed. Rockville: AOAC International. 2016.

ARCO, T.F.F.S., ÍTAVO, C.C.B.F. *et al.* Effects of supplementation on production and age anticipation at first mating of ewe lambs in tropical pastures. **Tropical Animal Health and Production**, v. 53, n. 5, p. 481, 2021. DOI: 10.1007/s11250-021-02930-w.

BARBATO, O., HOLMES, B. *et al.* Dietary supplementation of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) during the dry period improves redox balance in lactating dairy cows. **Antioxidants**. v.8, n. 38, p.1-10, 2019. DOI:10.3390/antiox8020038.

BARLETTA, R.V., RENNÓ, F.P., *et al.* Desempenho e parâmetros sanguíneos de vacas leiteiras alimentadas com grão de soja. **Archivos de Zootecnia**. v.61, p. 483–492, 2012. DOI:<https://doi.org/10.4321/s0004-05922012000400001>

BARLETTA, R.V., GANDRA, J.R. *et al.* Ruminal biohydrogenation and abomasal flow of fatty acids in lactating cows: Oilseed provides ruminal protection for fatty acids. **Animal Feed Science and Technology**. v. 219, p.111-121, 2016. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2016.06.011.

BASSOLI, B.K., CASSOLLA, P. *et al.* Chlorogenic acid reduces the plasma glucose peak in the oral glucose tolerance test: effects on hepatic glucose release and glycemia. **Journal Cell Biochemistry and Function**. v.26, n.3, p. 320-328, 2008. DOI: 10.1002/cbf.1444.

BENSON, M.E., HENRY, M.J., CARDELLINO, R.A. Comparison of weigh-suckle-weigh and machine milking for measuring ewe milk production. **Journal Animal Science**. v.77, p. 2330–2335, 1999. DOI: 10.2527/1999.7792330x.

BLIGH, E.G., DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**. v.27, n. 8, p. 911-917, 1959. DOI:10.1139 / o59099.

BRACESCO, N., SANCHEZ, A.G. *et al.* Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **Journal of Ethnopharmacology**. v.136, p. 378–384, 2011. DOI: 10.1016/j.jep.2010.06.032.

BRUCKMAIER, R.M., BLUM, J.W. Oxytocin Release and Milk Removal in Ruminants. **Journal of Dairy Science**. v.81, p. 939–949, 1998. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(98)75654-1.

CAPPELLE, E.R.; VALADARES FILHO, S.C. *et al.* Estimativas do valor energético a partir de características químicas e bromatológicas dos Alimentos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.6, p.1837-1856, 2001. DOI: 10.1590/S1516-35982001000700022.

CELI, P., RAADSMA, H.W. Effects of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) supplementation on the productive performance of dairy cows during mid-lactation. **Animal Production Science**, v. 50, p. 339-344, 2010. DOI: 10.1071/AN09170

CELI, P., ROBINSON, A. Effects of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) supplementation on the performance of dairy calves. **Animal Production Science**. v.50, p. 376–381, 2010. DOI: 10.1071/AN09169.

CZUMAJ A, ŚLEDZIŃSKI T. Biological role of unsaturated fatty acid desaturases in health and disease. **Nutrients**. v.12, n. 2, p.356, 2020. DOI:10.3390/nu12020356.

COTTICA, S.M., AMADO, D.A.V. *et al.* Antioxidant activity and lipid oxidation in milk from cows with soybean oil and propolis extract added to their feed. **Food Science and Technology**. v.39, n. 2, p. 467-474, 2019.DOI: 10. 1590/fst. 33817.

CORREDU, F., LUNESU, M.F. *et al.* Can Agro-Industrial By-Products Rich in Polyphenols be Advantageously Used in the Feeding and Nutrition of Dairy Small Ruminants. **Animals**. v.10, n.1, p.131- 155, 2020. DOI: 10.3390/ani10010131.

DAI, J., MUMPER, R.J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**. v.15, n. 10, p. 7313-7352, 2010. DOI: 10.3390/molecules15107313.

HARTMAN, L., LAGO, R.C.A. **Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids**. Laboratory Practice London. v. 22, n. 8, p. 475-6, 1973. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/18441624\\_Rapid\\_preparation\\_of\\_fatty\\_acid\\_methyl\\_esters](https://www.researchgate.net/publication/18441624_Rapid_preparation_of_fatty_acid_methyl_esters). Acesso em: 15 de março de 2020.

HARTEMINK, E., GIORGIO, D. *et al.* The effect of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) supplementation on nutrient degradability in dairy cows: An in sacco and in vitro study. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v.28, n.11, p.1606–1613, 2015. DOI: 10.5713/ajas.15.0206.

HEIMBACH, N.S., ÍTAVO, C.C.B.F. *et al.* Weaning Age of Lambs Creep Fed While Grazing on Marandu Pasture. **Journal of Agricultural Studies**, v.7, n. 4, p. 22-37, 2019. Disponível em: <https://www.macrothink.org/journal/index.php/jas/article/view/15354>. Acesso em: 15 de março de 2020.

HEIMBACH, N.S., ÍTAVO, C.C.B.F. *et al.* Productive and Reproductive Performance of Ewes at 60 and 90 Days Postpartum Treated by Different Weaning System. **Tropical Animal Science**. v. 43, n. 3, p. 248-253, 2020. DOI: 10.5398/tasj.2020.43.3.248.

HUANG, W.Y., LEE, P.C. *et al.* Effects of water quality on dissolution of yerba mate extract powders. **Scientific World Journal**. 2014. DOI: 10.1155 / 2014/768742.

JOSEPH, J.D, ACKMAN, R.G. Capillary column gas chromatographic method for analysis of encapsulated fish oils and fish oil ethyl esters collaborative study. **Journal of AOAC International**. v.75, n. 3, p. 488 506, 1992. DOI: 10.1093/jaoac/75.3.488.

KANEKO, J.J., HARVEY, J., BRUSS, M. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6.ed. NewYork:Academic Press. 2008.

KIOKIAS, S.N., DIMAKOU, C.P. *et al.* Effect of compositional factors against the thermal oxidative deterioration of novel food emulsions. **Food Biophysisc**. v. 1, p. 115-125, 2006. DOI: 10.1007/s11483-006-9015-2.

LI, W., HYDAMAKA, A.W. *et al.* Comparison of antioxidant capacity and phenolic compounds of berries, chokecherry and seabuckthorn. **Journal Biology**. v. 4, n. 4, p. 499–506, 2009. DOI: 10.2478/s11535-009-0041-1.

LIMA, L.S., OLIVEIRA, R.L. *et al.* Composition and fatty acid profile of milk from cows on pasture subjected to licuri oil supplement. **Revista Brasileira de Zootecnia**. n.12, p.2858-2865, 2011. DOI: 10.1590/S1516-35982011001200033.

LOBO, R. R., VINCENZI, R. *et al.* Inclusion of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extract in the diet of growing lambs: effects on blood parameters, animal performance, and carcass traits. **Animals**. v.10, n. 6, p. 961, 2020. DOI: 10.3390/ani10060961.

MAIA, E.L., RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Avaliação de um método simples e econômico para a metilação de ácidos graxos com lipídios de diversas espécies de peixes. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. v. 53, n. 1/2, p. 27-35, 1993. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/ses-854>. Acesso em 15 de março de 2020.

MARQUES, L.T., FISCHER, V. *et al.* Milk yield, milk composition and biochemical blood profile of lactating cows supplemented with anionic salt. **Brazilian Journal Animal Science**.

v. 40, p. 1088–1094, 2011. DOI: 10.1590/S1516-35982011000500021.

MAZUR, M., ZWYRZYKOWSKA-WODZINSKA, A. *et al.* Effect of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) supplementation on oxidative stress in ruminants. **Journal of Agricultural Research**. v. 79, p. 316–322, 2019. DOI: 10.4067/S0718-58392019000200316.

MORA-MEDINA, P., ORIHUELA-TRUJILLO, A. *et al.* Sensory factors involved in mother-young bonding in sheep: a review. **Czech Academy of Agricultural Sciences**. v. 61, p. 595-611, 2016. DOI: 10.17221/255/2014-VETMED.

MOREIRA, R.T., ASSIS, L.C. *et al.* Metabolic profile during the periparturient ewes santa inês with simple and multiple pregnancy. **Brazilian Animal Science**. v. 20, p. 1–15, 2019. DOI: 10.1590/1089-6891v20e-34181.

NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrients requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids and new world camelids**. The National Academies Press, Washington, DC, USA. 2007.

OLIVEIRA, M.X.S., PALMA, A.S.V. *et al.* Inclusion of soybean and linseed oils in the diet of lactating dairy cows makes the milk fatty acid profile nutritionally healthier for the human diet. **Journal PLoS ONE**. v.2, p.1-16, 2021. DOI: 10.1371/journal.pone.0246357.

PO, E., XU, Z. *et al.* The effect of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) supplementation on the productive performance of Dorper ewes and their progeny. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**. v.25, n. 7, p. 945-949, 2012. DOI: 10.5713/ajas.2012.12031.

PULINA, G., NUDDA, A. Milk production. In: PULINA, G. (Ed.). **Dairy sheep nutrition**, CABI Publishing, chap. 1, p.11-27, 2004.

PRABAKARAN, M., LEE, K.J. *et al.* Changes in soybean (*glycine max* l.) flour fatty-acid content based on storage temperature and duration. **Molecules**. v.23, n.10, p.2713, 2018. DOI: 10.3390/molecules23102713



RUFINO, M., ALVES, R.E. *et al.* **Scientific methodology: determination of total antioxidant activity in fruits by capturing the free radical ABTS**. Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico. 128. Fortaleza–CE.2007. Disponível em: [https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAT/10225/1/Cot\\_128.pdf](https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAT/10225/1/Cot_128.pdf). Acesso em: 15 de março de 2020.

RUSSEL, A.J.F., DOONEY, J.M., GUNN, R.G. Subjective assessment of body fat in live sheep. **Journal of Agricultural Science**. v. 72, n. 3, p.451-454, 1969. DOI: 10.1017/S0021859600024874

SANTOS-SILVA, J., BESSA, R.J.B., SANTOS-SILVA, F. Effect of genotype, feeding system and slaughter weight on the quality of light lambs: II. Fatty acid composition of meat. **Livestock Production Science**. v.77, p. 187–194, 2002. DOI: 10.1016/S0301-6226(02)00059-3.

SANTOS, F.S., ZEOULA, L.M. *et al.* Intake, digestibility and milk production and composition of dairy cows fed different levels of Yerba Mate in the diet. **Animal Feed Science and Technology**. v. 230, p 70–76, 2017. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2017.05.019

SANTOS, F.S., ZEOULA, L.M. *et al.* Effect of supplementation with Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) and vitamin E on milk lipoperoxidation in cows receiving diets containing ground soybean seeds. **Journal Dairy Research**. v. 86, p. 279–282, 2019. DOI: 10.1017/S0022029919000529.

SARAIVA, B.R., VITAL, A.C.P. *et al.* Effect of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) addition on the functional and technological characteristics of fresh cheese. **Journal Food Science and Technology**. v. 56, p. 1256–1265, 2019. DOI: 10.1007/s13197-019-03589-w.

SAS. Institute Inc. **Statistical analysis system**. Release 9.0. (Software). Cary. USA. 2002.

SHAHIDI, F., AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. **Journal of Functional Food**. v.18, p. 820-897, 2015. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.018>.

SUSIN, I., LOERCH, S.C. et al. Effects of feeding a high-grain diet at a restricted intake on lactation performance and rebreeding of ewes. **Journal of Animal Science**, v.73, p. 3199-3205, 1995. DOI:10.2527/1995.73113199x.

ULBRICHT, T.L.V., SOUTHGATE, D.A.T. Coronary heart disease: seven dietary factors. **The Lancet**. v. 338, n. 8773, p. 985-992, 1991. DOI: 10.1016 / 0140-6736 (91) 91846-m.

VALENTI, B., CAMPIDONICO, L. *et al.* Fatty acids in rumen and meat of lambs fed with different condensed and hydrolysable tannin extracts. **Research Square**. v.1, p.1-24, 2020. DOI: 10.21203/rs.3.rs-119707/v1.

VAN SOEST, P.J., ROBERTSON, J.B. *et al.* Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal Dairy Science**. v. 74, p. 3583-3597, 1991. DOI: 10.3168/jds. S0022-0302(91)78551-2.

VISENTAINER, J.V. Analytical aspects of the flame ionization detector response of fatty acid esters in biodiesels and foods. **Química Nova**. v. 35, n. 2, p. 274-279, 2012. DOI: 10.1590/S0100-40422012000200008.

VYNCKE, W. Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. **Journal Lipid Science and Technology**. v.72, n.72, p.1084-1087, 1970. DOI: 10.1002/lipi.19700721218.

ZHAO, F.Q. Biology of glucose transport in the mammary gland. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**. v.19, p. 3-17, 2013. DOI: 10.1007/s10911-013-9310-8.

ZEOLA, N.M., MACHADO, E. *et al.* Antioxidant action in diets with ground soybeans on ruminal microbial production, digestion, and fermentation in buffaloes. **Brazilian Journal of Animal Science**. v. 48, p. 1-11, 2019. DOI:10.1590/rbz4820180167.

WALLACE, J.M.; MILNE, J.S.; AITKEN, R.P. The effect of overnourishing singleton-bearing adult ewes on nutrient partitioning to the gravid uterus. **British Journal of Nutrition**, v.94, p.533-539, 2005. DOI:10.1079/BJN20041398.

WELTER, K.C., MARTINS, C.M. DE M.R. *et al.* Canola oil in lactating dairy cow diets reduces milk saturated fatty acids and improves its omega-3 and oleic fatty acid content. **Journal PLoS ONE**. v. 3, p. 1-11, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0151876.

## II - Comparação de métodos analíticos para determinação do perfil de ácidos graxos em leite ovino por cromatografia gasosa

- (Publicado: Journal PLoS ONE - <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0263071>)

### RESUMO

Estudos comparando metodologias para ácidos graxos são muito importantes, pois podem influenciar na qualidade e na quantificação final da fração lipídica. Objetivou-se neste estudo comparar diferentes métodos de extração para lipídios totais e avaliar o efeito destas metodologias sobre a composição quantitativa de ácidos graxos em leite de ovelhas lactantes criadas em pastagens tropicais. As metodologias utilizadas foram da simples transesterificação direta, empregando-se o solvente orgânico n-hexano de pureza grau HPLC, Bligh; Dyer (extração a frio, nas proporções de mistura extratora 5, 10 e 15 mL na proporção de 2: 1: 1 (v / v / v) de clorofórmio-metanol-água). Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram separados por cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização por chama (GC-FID). Os resultados demonstram que não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ), no teor de lipídios totais entre os métodos de extração. No entanto, o método de Bligh; Dyer obteve o melhor rendimento dos lipídios a serem extraídos do leite de ovelha, uma vez que o volume com 15 mL da solução extratora foi capaz de identificar 87% dos picos cromatográficos. Observou-se ainda que o leite de ovelha apresenta maior percentual para os ácidos graxos palmítico, esteárico e oléico, com percentuais de 20,1%, 15,5% e 33,1%, respectivamente. Portanto, a mistura extratora com volume de 15 mL utilizada neste estudo pode ser uma alternativa para realizar a extração da gordura do leite de ovelhas lactantes como método de rotina, já que expressa o melhor conteúdo lipídico deste alimento.

**Palavras - chave:** ácidos graxos, cromatografia gasosa, extração, leite ovino, lipídios.

## Comparison of analytical methods for determining fatty acid profile in sheep milk by gas chromatography

(Published: Journal PLoS ONE - <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0263071>)

### ABSTRACT

Studies comparing methodologies for fatty acids are very important because they can influence the quality and final quantification of the lipid fraction. The objective of this study was - to compare different extraction methods for total lipids and to evaluate the effect of these methodologies on the quantitative composition of fatty acids in milk from lactating ewes reared in tropical pastures. The methodologies used were simple direct transesterification, using the organic solvent n-hexane purity grade HPLC, Bligh; Dyer (cold extraction, in the proportions of extractor mixture 5, 10 and 15 mL in the ratio of 2: 1: 1 (v / v/ v/ v) of chloroform-methanol-water). The fatty acid methyl esters were separated by gas chromatography coupled to the flame ionization detector (GC-FID). The results show that there was no significant difference ( $p < 0.05$ ) in the total lipid content between the extraction methods. However, the Bligh method; Dyer obtained the best yield of the lipids to be extracted from sheep's milk, since the volume with 15 mL of the extracting solution was able to identify 87% of the chromatographic peaks. It was also observed that sheep's milk has a higher percentage for palmitic, stearic and oleic fatty acids, with percentages of 20.1%, 15.5% and 33.1%, respectively. Therefore, the pumping mixture with 15 mL volume used in this study may be an alternative to perform the extraction of milk fat from lactating sheep as a routine method, since it expresses the best lipid content of this food.

**Keywords:** fatty acids, gas chromatography, extraction, sheep milk, lipids.

## 1. INTRODUÇÃO

O leite ovino apresenta uma composição química constituída de proteínas de alto valor biológico e ácidos graxos essenciais, além de seu conteúdo mineral e vitamínico, o que qualifica como um alimento de elevado valor nutricional, além disso representa grande importância na alimentação pelas suas características de hipoalergenicidade e digestibilidade devido aos glóbulos de gordura diminuídos (BALTHAZAR *et al.*, 2017).

No entanto, a gordura do leite de ruminantes contém altos níveis de ácidos graxos saturados (AGS), ou seja, aproximadamente 2/3 do total de ácidos graxos (MOATSOU; SAKKAS, 2019), sendo estes associados com diversas doenças em humanos, em especial as cardíacas. Por outro lado, há de se considerar a presença dos ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) e poli-insaturados (AGPI) e conjugados (CLA) no leite, por estes estarem relacionados a propriedades anticarcinogênicas, redução da aterosclerose, dentre outros efeitos benéficos na saúde humana (BALTHAZAR *et al.*, 2017).

Desta forma, estudos têm sido desenvolvidos no sentido de se avaliar os efeitos da fração lipídica do leite e de seus derivados sobre a saúde humana, uma vez que a determinação de lipídios é importante para estudos bioquímicos, fisiológicos e nutricionais (RYDLEWSKI *et al.*, 2020). A extração dos lipídios é uma etapa crítica nas análises de lipídios totais especialmente sobre a composição de ácidos graxos, já que estes sofrem a interferência das estações do ano, da alimentação fornecida aos animais, do estágio de lactação e do processamento do alimento (ZACARCHENCO *et al.*, 2013).

Assim sendo, estudos de comparação de metodologias para ácidos graxos são muito importantes, pois algumas amostras requerem cuidados especiais para a obtenção da fração lipídica, dado que fatores como co-extração dos componentes não-lipídicos e a oxidação indesejada podem influenciar a qualidade e a quantificação final da fração lipídica (AMORES; VIRTO, 2019).

Neste sentido, informações a respeito da qualidade nutricional do leite ovino, apresentam-se como contribuição na busca de alternativas para ovinocultura e o fortalecimento desta cadeia produtiva, já que constantemente a literatura sobre o leite de vaca é atualizada, enquanto que um pequeno número de estudos tem sido relatados para o leite ovino (MOATSOU; SAKKAS, 2019).

Assim sendo, objetivou-se neste estudo comparar diferentes métodos de extração para lipídios totais e avaliar o efeito destas metodologias sobre a composição quantitativa de ácidos

graxos em leite de ovelhas lactantes criadas em pastagens tropicais, com hipótese de validar a técnica que melhor expresse o conteúdo lipídico total do leite de ovelhas lactantes criadas em pastagens tropicais, apresentando um método que garanta a eficiência e a reprodutibilidade dos resultados, uma vez que esta gera subsídios para padronização de metodologia em diversos laboratórios.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Matéria - prima**

Um volume de 50 mL de leite de ovelha foi coletado semanalmente durante oito semanas de lactação por meio de ordenha mecânica, acompanhada de pré- e pós-*dipping*, com o uso de 1 mL de ocitocina por animal. Essas amostras foram coletadas no Setor de Ovinocultura da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, na Fazenda Escola da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Sendo que as matrizes utilizadas neste experimento foram mantidas em piquetes de pastagens de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu, com livre acesso a água. Este experimento foi realizado de acordo com as diretrizes da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (Protocolo número 1.119/2019).

### **2.2. Métodos de extração da fração lipídica**

As extrações de lipídios totais foram realizadas em duplicata, e para uma primeira tentativa direta de extração e derivatização (método de extração 1 - utilizando HPLC grau n-hexano), foram realizadas as seguintes etapas: em tubo de centrífuga de 15 mL com tampa de rosca e septo de Teflon, 1 mL de amostra de leite de ovelha foi adicionado a 2 mL de solução de NaOH 0,5 M em metanol (grau cromatográfico), mantido sob aquecimento em banho-maria (60 ° C) por 5 min, e resfriado em água corrente. Posteriormente, foram adicionados 3 mL da solução esterificante (15 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10g de NH<sub>4</sub>Cl e 300 mL de metanol), repetindo o processo de banho-maria por 2 min e resfriado em água corrente. Em seguida, 2 mL da solução aquosa saturada de NaCl foram adicionados e agitados completamente 4 mL de hexano foram adicionados e agitados novamente em vórtice por 30 s. A solução foi então centrifugada por 5 min a 2.000 rpm e o sobrenadante removido, pois era onde os ésteres metílicos de ácidos graxos formados (FAMES) foram encontrados. Após o procedimento, a amostra foi utilizada para

análise do perfil de FA por cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização de chama (GC-FID).

Através do método simples de isolamento e purificação descrito por Folch *et al.* (1957), com adaptações realizadas por Rule (1997), foi feita a extração com solvente a frio utilizando uma mistura extratora de clorofórmio-metanol-água na proporção de 2:1:1 (v/v/v). Este método foi criado por Bligh; Dyer, (1959) e foi realizado da seguinte forma: 1 mL da amostra de leite foi adicionado a um tubo de centrífuga de 50 mL com tampa de rosca e septo de Teflon, e 5, 10 ou 15 mL da mistura extratora foram adicionados, agitado em vórtex por 2 min e, em seguida, colocado em ultrassom por 20 min. Posteriormente, 1 mL de clorofórmio, 0,5 mL de solução de KCl 2,0 M foram adicionados e agitados por mais 1 min em vórtice. Após agitação, os tubos foram centrifugados por 5 min a 2500 rpm.

A camada inferior contendo o extrato lipídico foi coletada e evaporada sob fluxo de nitrogênio.

### **2.3. Derivatização**

Após a finalização do processo de extração as amostras dos métodos 2, 3 e 4 foram submetidas ao processo de derivatização conforme a metodologia de Maia; Rodriguez-Amaya (1993). O método foi realizado com 300,0 mg da amostra em um tubo de ensaio, no qual foram adicionados 2,0 mL de solução 0,5 molar de NaOH em metanol, e o mesmo foi mantido sob aquecimento em banho-maria (60°C) por 5 min., e posteriormente resfriado em água corrente. Imediatamente após foram adicionados 5,0 mL de solução do reagente esterificante (15 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10g de NH<sub>4</sub>Cl e 300 mL de metanol), repetindo-se o mesmo método de aquecimento no banho-maria na mesma temperatura, porém deixado apenas 2 min., e resfriado em água corrente novamente.

Em seguida, foi adicionado 2 mL de solução saturada de Cloreto de Sódio (NaCl), agitou-se o tubo de ensaio em vórtex por 30 seg., adicionou-se 4 mL de Hexano e novamente agitou-se o tubo de ensaio em vórtex por 30 seg. Logo após esta etapa, a amostra foi submetida à centrifugação por 5 min. a 2000 rpm, por consequência, retirou-se uma alíquota do sobrenadante e inserida em frasco de 2mL com tampa para posterior análise no GC-FID. O resumo dos procedimentos experimentais para a extração dos lipídios do leite ovino encontra-se na Tabela 1.



**TABELA 1** - Procedimentos experimentais de extração dos lipídios do leite ovino

Experimento	Volume de amostra de leite	Solvente de extração	Volume de solvente de extração	Derivatização <i>in situ</i>
Método 1	1 mL	Hexano	4 mL	Sim
Método 2	1 mL	Clorofórmio-metanol-água 2:1:1 (v/v/v)	5 mL	Não
Método 3	1 mL	Clorofórmio-metanol-água 2:1:1 (v/v/v)	10 mL	Não
Método 4	1 mL	Clorofórmio-metanol-água 2:1:1 (v/v/v)	15 mL	Não

#### 2.4. Análise por Cromatografia Gasosa acoplada ao Detector de Ionização em Chamas - GC-FID

Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram separados e determinados por um cromatógrafo a gás (Shimadzu®, modelo GC 2010), equipado com coluna capilar de sílica fundida (CP – BPX-70, 30 m x 0,25 mm d.i. e 0,25 µm) e detector de ionização de chama (GC - FID) (AGUILAR *et al.*, 2014). O gás de arraste empregado foi o hélio (com purificação de 99,999 %). As injeções foram realizadas utilizando um injetor automático AOC 20i, equipado com uma seringa de 10 µL. O volume injetado foi de 1 µL em modo Split 50:1. A temperatura do injetor e do detector foi configurada em 250°C. A rampa de aquecimento da coluna foi programada para iniciar em 80°C durante 3 minutos, em seguida aumentou – se a temperatura a uma taxa de 10°C/min até atingir 140°C, posteriormente a rampa de aquecimento foi aumentada a uma taxa de 5°C/min, até atingir 250°C, permanecendo nesta faixa por 5 minutos, totalizando 40 minutos de análise. As áreas dos picos e os tempos de retenção foram determinados através do software LabSolutions da Shimadzu. Os AGs identificados foram baseados em comparação aos tempos de retenção com o padrão FAMEs.

Os resultados obtidos foram submetidos análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias dos tratamentos feitas pelo teste de Tukey, adotando o nível de significância de 5%. As análises estatísticas foram feitas por meio do programa SAS Statistical Analysis Systems (SAS, 2002) versão 9.0.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Área percentual do perfil de ácidos graxos

A tabela 2 apresenta a composição em lipídios totais, o somatório e a razão entre os grupos de ácidos graxos de leite de ovelhas lactantes criadas em pastagem tropicais submetidas a diferentes métodos de extração de lipídios. O método de Bligh; Dyer apresentou o melhor rendimento dentre os métodos analisados, sendo que o método 4 foi o que apresentou o melhor rendimento quando comparado ao método 1. Na composição lipídica do leite foram detectados em média 43,0% (AGS), 28,9% (AGI), 26,2% (AGMI), 2,1 (AGPI) e, 0,7% (AGI/AGS).

**TABELA 2** - Valores percentuais da composição dos ácidos graxos presentes no leite ovino

Ácido graxo	Método 1	Método 2	Método 3	Método 4	EPM	P
C4:0 (butírico)	1,1	1,1	1,6	1,5	0,02	0,2447
C6:0 (capróico)	0,7	1,2	1,2	1,2	0,03	0,5151
C8:0 (caprílico)	0,5 <sup>b</sup>	1,1 <sup>a</sup>	1,0 <sup>a</sup>	1,1 <sup>a</sup>	0,05	0,0091
C10:0 (cáprico)	1,6 <sup>c</sup>	3,7 <sup>a</sup>	3,1 <sup>b</sup>	3,5 <sup>a</sup>	0,02	<0,001
C12:0 (láurico)	0,8 <sup>c</sup>	2,2 <sup>a</sup>	1,5 <sup>b</sup>	1,7 <sup>a</sup>	0,02	<0,001
C14:0 (mirístico)	2,8 <sup>c</sup>	4,8 <sup>b</sup>	4,6 <sup>b</sup>	5,3 <sup>a</sup>	0,03	<0,001
C16:0 (palmítico)	11,7 <sup>d</sup>	16,0 <sup>c</sup>	17,5 <sup>b</sup>	20,1 <sup>a</sup>	0,20	<0,001
C16:1 (palmitoléico)	0,4	0,7	0,8	1,1	0,14	0,1120
C17:0 (heptadecanóico)	0,7	0,6	0,7	0,9	0,11	0,5769
C18:0 (esteárico)	9,5 <sup>d</sup>	16,3 <sup>a</sup>	13,3 <sup>c</sup>	15,5 <sup>b</sup>	0,08	<0,001
C18:1n9c (oléico)	20,7 <sup>c</sup>	19,4 <sup>d</sup>	27,1 <sup>b</sup>	33,1 <sup>a</sup>	0,06	<0,001
C18:2n6c (linoléico)	1,0 <sup>b</sup>	1,9 <sup>a</sup>	1,3 <sup>ab</sup>	1,6 <sup>ab</sup>	0,05	0,0014
FAs identificados	53,5 <sup>d</sup>	71,5 <sup>c</sup>	76,7 <sup>b</sup>	87,2 <sup>a</sup>	0,70	<0,001
Compostos não identificados	46,5 <sup>a</sup>	28,5 <sup>b</sup>	23,3 <sup>c</sup>	12,8 <sup>d</sup>	0,37	<0,001
<b>Soma e proporção</b>						
∑ AGS	29,4 <sup>d</sup>	47,0 <sup>b</sup>	45,4 <sup>c</sup>	50,2 <sup>a</sup>	0,38	<0,001
∑ AGI	22,6 <sup>d</sup>	24,5 <sup>c</sup>	31,3 <sup>b</sup>	37,0 <sup>a</sup>	0,06	<0,001
∑ AGMI	21,4 <sup>d</sup>	20,5 <sup>c</sup>	28,2 <sup>b</sup>	34,6 <sup>a</sup>	0,12	<0,001
∑ AGPI	1,5 <sup>b</sup>	2,6 <sup>a</sup>	1,7 <sup>b</sup>	2,5 <sup>a</sup>	0,06	<0,001

AGI/AGS                      0,8                      0,5                      0,7                      0,7                      0,04                      0,3596

\* Ácidos graxos (AGs) com valores percentuais menores que 0,5% não foram descritos na tabela, mas foram contabilizados no percentual total do método de quantificação.  $\Sigma$ AGS = soma dos ácidos graxos saturados;  $\Sigma$ AGI = soma de ácidos graxos insaturados;  $\Sigma$ AGMI = soma dos ácidos graxos monoinsaturados;  $\Sigma$  AGPI = soma de ácidos graxos poli-insaturados; AGI/AGS = razão entre ácidos graxos insaturados e saturados; EPM = erro padrão médio; Médias seguidas de letras minúsculas na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (P <0,05).

Por outro lado, ao comparar o método 4 deste trabalho com estudos anteriores, é possível confirmar que a matriz do leite ovino possui os ácidos graxos C16:0 (ácido palmítico), C18:0 (ácido esteárico) e C18:1n9c (ácido oléico) como majoritários em sua composição (Tabela 3).

**TABELA 3** - Valores percentuais da composição dos ácidos graxos de leite ovino presentes no método 4 em comparação com estudos anteriores

Ácidos Graxos	Método 4	Aguilar et al., 2014	Zeola et al., 2015	Djordjevic et al., 2019	Kasapidou et al., 2021
C4:0	1,5	1,18	1,43	8,00	1,60
C6:0	1,2	1,36	2,16	5,00	1,84
C8:0	1,1	1,62	3,05	4,00	6,89
C10:0	3,5	5,92	11,45	6,00	4,65
C12:0	1,7	3,99	7,46	5,00	2,58
C14:0	5,3	11,43	13,55	10,00	12,50
C16:0	20,1	28,55	27,60	22,00	29,55
C16:1	1,1	1,40	1,38	N.A.	1,20
C17:0	0,9	0,76	0,52	N.A.	0,70
C18:0	15,5	11,64	5,59	10,00	8,73
C18:1n9c	33,1	19,64	16,19	22,00	20,19
C18:2n6c	1,6	2,22	3,74	4,00	2,66
$\Sigma$ AGS	50,2	67,78	74,42	N.A.	70,69
$\Sigma$ AGI	37,0	31,62	25,43	N.A.	29,32

$\Sigma$ AGMI	34,6	27,51	20,16	N.A.	24,63
$\Sigma$ AGPI	2,5	4,11	5,27	N.A.	4,69
AGI/AGS	0,7	0,47	0,34	N.A.	0,41

Ácidos graxos (AGs) com valores percentuais inferiores a 0,5% não foram descritos na tabela, mas foram contabilizados no percentual total do método de quantificação.  $\Sigma$ AGS = somatório ácidos graxos saturados;  $\Sigma$ AGI = somatório ácidos graxos insaturados;  $\Sigma$ AGMI = somatório ácidos graxos monoinsaturados;  $\Sigma$ AGPI = somatório ácidos graxos poli-insaturados; AGI/AGS = razão entre ácidos graxos insaturados e saturados.

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1. Determinação dos lipídios ou gordura total

Apesar de existirem métodos analíticos de extração de lipídios recomendados para cada classe de alimentos, estes estão em constante avaliação técnica devido a necessidade de se levar em conta o custo, eficiência de extração, toxicidade, disponibilidade, qualidade do produto final (AMORES; VIRTO, 2019). Além disso, devido à complexidade, uma análise completa de todos os lipídios presentes na amostra de leite requer mais de um instrumento e, portanto, a escolha deste instrumento depende dos objetivos do estudo (RYDLEWSKI *et al.*, 2020).

Assim, tomando como base as metodologias descritas por estudos anteriores (AGUILAR *et al.*, 2014; ZEOLA *et al.*, 2015; DJORDJEVIC *et al.*, 2019; KASAPIDOU *et al.*, 2021) foram feitas as devidas modificações no procedimento de extração de lipídeos do leite ovino, pois há etapas do processo no qual existia possibilidades de aprimoramento ou a necessidade de adequação à nossa rotina laboratorial.

Neste sentido, as condições experimentais para a extração de lipídeos foram baseadas em diferentes formas de encontrar as proporções de hexano e clorofórmio-metanol que renderiam uma maior extração quantitativa de lipídios.

No método *in situ*, em que ocorre uma única etapa de extração e esterificação dos lipídios de forma direta, podemos observar a identificação de 15 ácidos graxos, sendo que o ácido oléico ocorre em maior proporção. Entretanto, esse método conseguiu identificar em média 54% dos picos cromatográficos, isto porque solventes apolares (*n*-hexano) não tem a mesma eficiência para extrair lipídios que os com solventes polares (BRUM; FERRAZ; REGITANO-D'ARCE, 2009). Uma segunda razão seria o fato de que a solubilidade dos

lipídios polares é menor em solventes hidrocarbonetos, tais como *n*-hexano, do que em clorofórmio (BRUM; FERRAZ; REGITANO-D'ARCE, 2009).

Quanto as diferentes diluições (5, 10 e 15 mL da solução extratora clorofórmio-metanol-água 2:1:1 (v/v/v)) utilizadas neste ensaio, observa-se que o percentual de ácidos graxos identificados aumenta com o volume do solvente extrator. Assim, o método que utiliza 15 mL da solução extratora identifica em média 87,2% dos picos cromatográficos e apresenta o menor percentual de compostos não identificados (12,8%).

Este bom rendimento observado para os lipídios totais, proporcionado pelo método de Bligh; Dyer pode ser explicado pela ampla faixa de polaridade que este apresenta pela mistura de solventes utilizados. Assim uma vantagem apresentada pelo uso do clorofórmio e metanol, é destes serem mais polares que o *n*-hexano e, dessa forma, há uma extração mais eficiente de lipídios polares e apolares (RYDLEWSKI *et al.*, 2020).

#### **4.2. Cromatografia Gasosa acoplada ao Detector de Ionização de Chama (GC-FID)**

O GC-FID é o método de separação e determinação mais utilizado, por ser de fácil manutenção e barato (quando comparado a outros detectores), além dos ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAGs ou FAMES - fatty acid methyl esters) poderem ser facilmente identificados e detectados. A identificação dos EMAGs é feita baseando-se na ordem de eluição e no tempo de retenção destes analitos (RYDLEWSKI *et al.*, 2020).

No entanto, a GC-FID possui uma desvantagem, ela deve ser limitada a amostras voláteis e termicamente estáveis, assim sendo para analitos não voláteis, uma etapa prévia de derivatização é necessária, a fim de transformá-los em compostos voláteis (RYDLEWSKI *et al.*, 2020). Além disso, esta análise pode degradar lipídios sensíveis a altas temperaturas, que por consequência podem deixar de ser identificados (RYDLEWSKI *et al.*, 2020).

Com base nessa óptica, após o processo de extração as amostras dos métodos 2, 3 e 4 foram submetidas ao processo de derivatização, com intuito dos triglicerídeos serem transformados em ésteres metílicos de ácidos graxos. E iniciou-se a programação a uma temperatura inferior ao ponto de ebulição do componente mais volátil presente na amostra, decorrido a taxa de aquecimento de 10°C/min., sendo que a segunda escala de temperatura a 140°C serviu para auxiliar na eluição de ésteres de ácidos graxos com ponto de ebulição intermediários, ou seja, não tão voláteis como os anteriores. Por fim, a última escala de

temperatura utilizada foi a de 250°C para permitir que ésteres de ácidos graxos metílicos de maior ponto de ebulição fossem eluídos por último (FENG; LOCK; GARNSWORTHY, 2004).

Deste modo, através GC-FID foi possível determinar o perfil cromatográfico dos ácidos graxos constituintes no leite ovino, sendo que cerca de 68,7 % dos AGs totais encontrados no leite foram o ácido palmítico 20,1%, esteárico 15,5% e oléico 33,1%; o total de SFA representou 50,2 % do total de AGs, já o conteúdo de UFA foi de 37 %. Estes resultados concordam com os relatados por Inostroza *et al.* (2020) que investigaram a composição e a distribuição dos lipídios durante a lactação de ovelhas crioulas Araucana criadas em sistemas de pastagens. Encontram através GC-FID em média 58,9% de SFA, 36,5% de MUFA, sendo que 74,5% da composição lipídica estava presente os ácidos graxos palmítico C16: 0 (26,8%), esteárico C18: 0 (18,3%) e oléico C18: 1n (29,4%), respectivamente após 90 dias de lactação.

Ao comparar o método 4 (15 mL de mistura extratora) nesse trabalho com estudos anteriores, foi possível observar que as amostras de leite analisadas apresentaram maior quantidade de ácidos graxos insaturados. Similarmente, os resultados obtidos demonstram que o ácido oléico (C18:1n9c) apresentou um maior percentual quando comparado aos valores da literatura.

Neste sentido objetivou - se nesse estudo de comparar diferentes métodos de extração para lipídios totais e avaliar o efeito destas metodologias sobre a composição quantitativa de ácidos graxos (por meio de fatores de resposta do detector de ionização de chama e padrões internos) em leite de ovelhas lactantes criadas em pastagens tropicais. Nossa hipótese foi de validar a técnica que melhor expressasse o conteúdo lipídico total do leite de ovelhas lactantes criadas em pastagens tropicais, apresentando um método que garanta a eficiência e a reprodutibilidade dos resultados, uma vez que esta gera subsídios para padronização de metodologia em diversos laboratórios.

## 5. CONCLUSÃO

A metodologia a ser escolhida para a extração da fração lipídica da matriz do leite de ovelhas lactantes criadas em pastagens tropicais pode afetar o rendimento dos lipídeos extraídos. Neste estudo, os solventes utilizados nas extrações influenciaram a eficiência da extração. Assim com base nos resultados deste trabalho, quando as frações lipídicas foram extraídas, a utilização de 15 mL da mistura extratora foi a que apresentou o melhor resultado,

o que demonstra a eficiência da metodologia de Bligh; Dyer. Uma vez que os extratos obtidos com hexano apresentam um menor rendimento em lipídios totais nas amostras analisadas.

### **Agradecimentos**

Á Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; a Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul; e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

## REFERÊNCIAS

AGUILAR, C., TORO-MUJICA, P., *et al.* A comparative study of the fatty acid profiles in commercial sheep cheeses. *Grasas Aceites*, v. 65, n. 4, p. 1-7, 2014. DOI: 10.3989/gya.0460141.

AMORES, G.; VIRTO, M. Total and free fatty acids analysis in milk and dairy fat. *Separations*. v.6, n. 1, 1- 14, 2019. DOI: 10.3390/separations6010014.

BALTHAZAR, C.F., PIMENTEL, T.C., *et al.* Sheep Milk: physicochemical characteristics and relevance for functional food development. *Comprehensive Reviews. Food Science and Food Safety*, v.16, n. 2, p.247-262, 2017. DOI: 10.1111/1541-4337.12250.

BLIGH, E.G., DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. v.27, n. 8, p. 911-917, 1959. DOI: 10.1139 / o59-099.

BRUM, A.A.S., FERRAZ, L.A., REGITANO-D´ARCE, M.A.B. Extraction methods and quality of the lipid fraction of vegetable and animal samples. *Química Nova*, v. 32, n. 4, p. 849-854, 2009. DOI: 10.1590/S0100-40422009000400005.

DJORDJEVIC, J., LEDINA, T., *et al.* Fatty acid profile of milk. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*, v. 333, p. 22-25, 2019. DOI: 10.1088/1755-1315/333/1/012057.

FENG, S., LOCK, A.L., GARNSWORTHY, P.C. A rapid lipid separation method for determining fatty acid composition of milk. *Journal of Dairy Science*, v. 87, n. 11, p. 3785-3788, 2004. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73517-1.

FOLCH, J., LEES, M., STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 226, n.1, p. 497-509, 1957. Disponível em: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(18\)64849-5/pdf](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(18)64849-5/pdf) Acesso em: 18 de março de 2021.



INOSTROZA, K., BRAVO, S., *et al.* Variation in milk composition and fatty acid profile during the lactation of Araucana creole ewes in a pasture-based system. **Animals**, v. 10, p. 1-13, 2020. DOI: 10.3390/ani10010092.

KASAPIDOU, E.; BASDAGIANNI, Z., *et al.* Effects of intensive and semi-intensive production on sheep milk chemical composition, physicochemical characteristics, fatty acid profile, and nutritional indices. **Animals**, v. 11, n.9, p. 2567-2578, 2021. DOI:10.3390/ani11092578.

MAIA, E.V., RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.R. Evaluation of a simple and inexpensive method for the methylation of fatty acid with lipids of various fish species. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. v. 53, p. 27-35,1993. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-141017>. Acesso em: 18 de março de 2021.

MOATSOU, G., SAKKAS, L. Sheep milk components: Focus on nutritional advantages and biofunctional potential. **Small Ruminant Research**, v. 180, p. 86-99, 2019. DOI:10.1016/j.smallrumres.2019.07.009.

RULE, D.C. Direct transesterification of total fatty acids of adipose tissue, and of freeze-dried muscle and liver with boron-trifluoride in methanol. **Meat Science**, v. 46, n. 1, p. 23-32, 1997. DOI: 10.1016/S0309-1740(97)00008-9.

RYDLEWSKI, A.A., PIZZO, J.S. Analytical methods used for the determination of lipids in human milk: a review. **Revista Virtual de Química**, v.12, n. 1, p.1-12, 2020. DOI: 10.21577/1984-6835.20200013ISSN 1984-6835

SAS. Institute Inc. **Statistical analysis system**. Release 9.0. (Software). Cary. USA. 2002.

ZACARCHENCO, P.B., GALLINAA, D.A., *et al.* Conjugated linoleic acid (CLA) - Health benefits, its presence and stability in dairy products. **UNOPAR Científica, Ciências Biológicas e da Saúde**; v. 15, p. 401-409, 2013. DOI: 10.17921/2447-8938.2013v0n0p%25p.

ZEOLA, N.M.B.L., SOBRINHO, A.G.S., *et al.* Production, composition and processing of milk from ewes fed soybean seeds. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 44, n. 4, p. 146-154, 2015. DOI: 10.1590/S1806-92902015000400003.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Durante a lactação a suplementação com erva-mate, soja em grão e suas interações não afetaram a produção de leite, o desempenho das matrizes e nem ocasionou distúrbios metabólicos. Além disso, adição de erva-mate não influencia no perfil oxidativo do leite. Enquanto que a suplementação com soja em grão melhorará o perfil de AG do leite, aumentando as concentrações de CLA e de AGPI. Portanto, a associação de soja em grão e erva-mate ajuda a melhorar a qualidade da gordura do leite de ovelhas criadas em pastagens tropicais, como mostrado pela atividade antioxidante pelo método por DPPH, embora não ajude a prevenir a oxidação do leite rico em AGPI.

A metodologia escolhida para a extração da fração lipídica pode afetar a quantidade extraída e a qualidade oxidativa do leite. Já que os solventes utilizados nas extrações do óleo de um tecido animal devem ser escolhidos conforme as características intrínsecas (químicas e físicas) da matriz. Assim em relação às metodologias de preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos a metodologia Bligh e Dyer foi a que apresentou o melhor resultado quando comparada a metodologia *in situ*. Quanto à quantificação dos ácidos graxos na fração lipídica da matriz do leite de ovelhas lactantes criadas em pastagens tropicais recomenda-se a utilização de 15 mL da mistura extratora (clorofórmio-metanol-água na proporção de 2:1:1), uma vez que os extratos obtidos com hexano apresentam um menor rendimento em lipídios totais. Desta forma, o método Bligh e Dyer e utilização de 15 mL da mistura extratora é o recomendado para as avaliações do conteúdo lipídico, especialmente na determinação de ácidos graxos em leite de ovelhas lactantes criadas em pastagens tropicais.