



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA - UFBA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS
GRAXOS EM LEITE DE EQUÍDEOS E RUMINANTES**

**DOUGLAS MELO DE SOUZA
ZOOTECNISTA**

**SALVADOR – BAHIA
FEVEREIRO – 2022**

DOUGLAS MELO DE SOUZA

**MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS
GRAXOS EM LEITE DE EQUÍDEOS E RUMINANTES**

Dissertação apresentada ao Programa de
Mestrado em Zootecnia da Universidade
Federal da Bahia como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

Área de Concentração: Produção Animal

Orientadora: Profa. Chiara Albano de Araujo
Oliveira

Co-orientador: Prof. Cláudio Vaz Di Mambro
Ribeiro

SALVADOR – BA
FEVEREIRO – 2022

Souza, Douglas Melo de.
Métodos analíticos para determinação de ácidos graxos em leite de equídeos e ruminantes /
Douglas Melo de Souza. - 2022.
55 f.: il.

Orientadora: Profª. Dra. Chiara Albano de Araujo Oliveira.
Coorientador: Prof. Dr. Cláudio Vaz Di Mambro Ribeiro.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária e
Zootecnia, Salvador, 2022.

1. Zootecnia. 2. Ácidos graxos. 3. Ácidos graxos Ômega-3. 4. Análise cromatográfica. 5. Leite -
Análise. I. Oliveira, Chiara Albano de Araujo. II. Universidade Federal da Bahia. Escola de Medi-
cina Veterinária e Zootecnia. III. Título.

CDD - 637
CDU - 637

TERMO DE APROVAÇÃO

“MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS EM LEITE DE EQUÍDEOS E RUMINANTES”

Douglas Melo de Sousa

**Dissertação defendida e aprovada para obtenção do grau de
Mestre em Zootecnia**

Salvador, 16 de fevereiro de 2022

Comissão examinadora:



**Dra. Chiara Albano de Araújo
Oliveira UFBA
Orientadora / Presidente**



**Dr. José Esler de Freitas Júnior
UFBA**



**Dra. Carolina Oliveira de Souza
UFBA**

[...]Y un día después de la tormenta
Cuando menos piensas sale el sol
De tanto sumar pierdes la cuenta
Porque uno y uno no siempre son dos
Cuando menos piensas sale el sol[...]

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me deu saúde e força, pois sem ele eu não teria chegado até aqui.

A minha mãe que sem sua força e conselhos não chegaria nessa etapa da minha vida.

Aos meus irmãos que me mostram o quanto o amor vale a pena.

A minha avó que sempre foi o alicerce da família, dando toda a base, possibilitando meu crescimento.

As minhas tias que são como mãe, sempre presentes em todos os momentos da minha existência.

Agradeço a todos os professores que de alguma forma contribuíram para a minha formação.

A minha orientadora, Chiara Oliveira pelo apoio, pela compreensão, pela paciência na orientação. Por ter acreditado em mim e em meu potencial e pelo incentivo.

Ao professor Dr. Claudio Vaz pelo apoio e pela ajuda.

A Jaqueline Reis de Souza Bispo (Técnica do Lab Multifuncional), por ser pacientemente ensinado e reensinado quando necessário.

A meu noivo Gilmar pelo amor, carinho, companheirismo, incentivo e apoio incondicional.

A Carmen, Zé e Pingo por terem me dado paciência e me ajudado em todos os momentos que precisei deles.

A todos meus amigos que sempre estiveram me incentivando para dar o melhor de mim.

A todos aqueles que de alguma forma estiveram e estão próximos de mim, fazendo esta vida valer cada vez mais a pena

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1- Teores médios dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC; C4:0, C6:0 e C8:0), cadeia média (AGCM; C10:0, C12:0 e C14:0) e cadeia longa (AGCL; C16:0, C18:0, C18:1 n-9, C18:1 n-11, C18:2 n-6, C18:3 n-3, C20:4 n-6, C20:5 n-3 e C22:6 n-3) de leite de égua, jumenta e vaca.....	39
Figura 2- Teores médios da soma dos ácidos graxos $\sum n3$: (C18:3 n-3 + C20:5 n-3 + C22:6 n-3); $\sum n6$: (C18:2 n-6 + C20:4 n-6) de leite de égua, jumenta e vaca, determinados segundo Kramer et al. (1997).....	39
Figura 3- Índices de aterogenicidade (IA) e de trombogenicidade (IT) de leite de vaca, égua e jumenta.....	40

LISTA DE TABELAS

Páginas

Tabela 1- Perfil de ácidos graxos de leite de égua, jumenta, cabra e vaca determinados com diferentes métodos de metilação dos ésteres metílicos.....	38
Tabela 2 - Correlação entre ácidos graxos de leite de égua, jumenta e vaca.....	41
Tabela 3 – Variação intra-dia (DPR%) do perfil de ácidos graxos de matrizes lácteas de monogástricos e ruminantes avaliadas por diferentes métodos de metilação dos ésteres metílicos.....	42
Tabela 4 – Variação inter-dia (DPR%) do perfil de ácidos graxos de matrizes lácteas de monogástricos e ruminantes avaliadas por diferentes métodos de metilação dos ésteres metílicos.....	43

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1. Técnicas para determinação de ácidos graxos: quantitativos e qualitativos	11
2.1.1 Cromatografia Gasosa (CG)	11
2.1.3 Determinação de AG em matrizes lácteas - Metilação	12
2.2 Leite de equídeos: jumentas e éguas	13
2.2.1 Composição do leite de éguas e jumentas	14
2.2.3 Moléculas bioativas do leite dos equídeos	17
2.2.4 Utilizações do leite de equídeos: alimentação e tratamento de doenças	20
3. REFERÊNCIAS	22
CAPÍTULO 1	29
RESUMO	30
1. INTRODUÇÃO	32
2. MATERIAL E MÉTODOS	34
2.1. Amostras	34
2.2 Determinação de ácidos graxos	34
2.3 Análise de ácidos graxos por cromatografia gasosa	35
2.4 Avaliação da precisão e acurácia	35
2.5 Análise estatística	36
3. RESULTADOS	37
4. DISCUSSÃO	44
5. CONCLUSÃO	49
6. REFERÊNCIA	50
ANEXO A	54

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os ácidos graxos (AG) são uma classe importante de compostos em alimentos e laticínios. A preparação e extração dos ésteres metílicos de AG é um dos gargalos nos métodos analíticos de amostras de leite e outras amostras biológicas. Os métodos clássicos para extração de lipídios frequentemente envolvem solventes tóxicos, como clorofórmio (BLIGH e DYER, 1959), são trabalhosos, demorados e com riscos potenciais à saúde quando utilizados de forma rotineira.

Métodos de derivatização (metilação) combinados em um único passo têm sido utilizados como forma de evitar problemas associados com a extração, que a depender da metodologia aplicada, há a necessidade de fazer a extração lipídica, para que posteriormente ocorra a derivatização. Metodologias que utilizam tanto esterificação catalisada em meio ácido, como em meio alcalino foram amplamente aplicadas nas análises de AG de amostras de leite (AMORES et al., 2019). A metilação por catálise ácida pode converter todas as formas de AG em éster metílicos, mas o processo é geralmente mais lento e pode haver isomerização de ácidos linolêicos conjugados (CLA). Em contraste, a metilação em meio alcalino é mais rápida, mas os AG livres não são metilados (CHRISTIE, 1982; LIU et al., 2018).

Na última década as qualidades benéficas do consumo humano de leite equídeo tem despertado interesse quanto as metodologias de análises de moléculas bioativas e seus benefícios.

Devido às diferentes metodologias de metilação e as implicações que causam nas diferentes matrizes lácteas para análise do perfil de AG por cromatografia gasosa, as hipóteses do presente estudo são: i) existe diferença no perfil de AG do leite entre os métodos de metilação; ii) o teor de AG essenciais do leite de jumenta é menor no método que utiliza a catálise básica; iv) a reprodutibilidade qualitativa dos AG essenciais é melhor para o leite de equídeos; v) o perfil de AG do leite equídeo é melhor para saúde humana.

O objetivo do presente estudo foi comparar métodos de avaliação qualitativa do perfil de AG de leite de equídeos e ruminantes e identificar a metodologia mais adequada para os leites de éguas e jumentas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Técnicas para determinação de ácidos graxos: quantitativos e qualitativos

A cromatografia é uma técnica utilizada para separação de componentes de uma mistura complexa. Essa separação se dá pela migração diferencial dos componentes em uma fase estacionária, quando uma fase móvel flui através desta. A fase móvel pode ser um gás, um líquido ou um fluido supercrítico. A fase móvel passa por uma fase estacionária, com a qual é imiscível, que se encontra incorporada a uma coluna ou a uma superfície sólida. Os componentes da amostra se distribuem de forma distinta entre a fase móvel e a fase estacionária. Os componentes fortemente retidos pela fase estacionária se movem mais lentamente com a fase móvel; ao contrário, os componentes que interagem menos com a fase estacionária, se movem com rapidez e chegam mais rápido ao detector. Devido a essa diferença de velocidade de mobilidade, os componentes da amostra se separam permitindo a análise qualitativa e/ou quantitativa (DEGANI et al., 1998; SKOOG et al., 2001; PERES, 2002; GOULART, 2012). Os principais tipos de cromatografias são: cromatografia em papel (CP), cromatografia de camada delgada (CCD), cromatografia gasosa (CG), cromatografia em fluido supercrítico, cromatografia líquida clássica (CLC) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC).

2.1.1 Cromatografia Gasosa (CG)

A cromatografia gasosa (CG) é uma técnica com alto poder de resolução, o que permite analisar várias substâncias em uma mesma amostra. A técnica baseia-se na partição dos componentes da mistura, entre a fase móvel e a fase estacionária, por meio de processos físicos e químicos. A fase estacionária é um material líquido ou sólido, enquanto a fase móvel é gasosa, por esse motivo todos os itens do cromatógrafo ficam enclausurados em uma caixa. A fase estacionária líquida é um líquido pouco volátil, que recobre um suporte sólido, separando as substâncias presentes na amostra devido às diferenças de solubilidade e volatilidade. Como fase móvel é utilizado um gás, denominado gás de arraste, transportando a amostra através da coluna de separação até atingir o detector, onde os compostos são separados e detectados. Contudo a técnica apresenta limitação pois é necessário que a amostra seja volátil e termicamente estável (CURVALL et al., 1982; DEGANI et al., 1998; PERES, 2002; PENTEADO et al., 2008).

A fase estacionária (coluna) deve possuir polaridade adequada para permitir a separação dos componentes da amostra. A coluna deve ser confeccionada com material inerte e que resista a altas pressões, geralmente são de aço inoxidável, reaproveitáveis,

sendo empacotadas com suportes quimicamente funcionalizados, de tamanho e formato de partículas controladas que viabilizam altas resoluções cromatográficas. Vários detectores podem ser colocados na saída da coluna, estes devem apresentar ampla faixa de aplicação, proporcionando identificação e quantificação contínua da amostra.

2.1.3 Determinação de AG em matrizes lácteas - Metilação

Os avanços das técnicas por CG proporcionaram grande impacto no estudo dos AGs, contribuindo para a investigação mais detalhada das composições dos alimentos de origem animal. Entretanto, as etapas analíticas, como o processo de derivatização, necessário para a análise, podem gerar problemas associados com a preparação dos ésteres. (ACKMAN, 1972). Podendo ocorrer erros na análise química, assim como, contaminação ou extração inadequada do componente de interesse, o que, conseqüentemente irá remeter a resultados e interpretações erradas (TANAMATI et al., 2005).

Durante a extração lipídica, as amostras devem ser preparadas e analisadas cuidadosamente para evitar a oxidação dos ácidos graxos, a qual pode comprometer a identificação e quantificação dos componentes da fração lipídica (MILINSK et al., 2008).

Na extração de lipídios totais do leite de vaca, por exemplo, os métodos mais utilizados no mundo são aqueles descritos por Folch et al. (1957) e Bligh e DYER (1959), ambos utilizando os solventes clorofórmio e metanol; no entanto, os volumes de solventes utilizados nestes métodos são diferentes (TONIAL et al., 2009). Os solventes usados para extração de lipídios devem solubilizar todos os componentes lipídicos e serem suficientemente polares para promoverem as dissociações das membranas celulares com lipoproteínas sem que ocorra reação química (SMEDES, 1999).

Outros métodos utilizados para extração de lipídios do leite são os descritos por Gerber (1981), o qual envolve processo de separação físico-química em meio ácido (ácido sulfúrico); Roese-Gottlieb (1990), que descreve a reação em meio alcalino (hidróxido de amônio); Murphy e MCneill (1995), o qual utiliza processos físicos de centrifugação para separação da fração gordurosa do leite e a transesterificação é feita em solução de n-heptano e KOH/metanol; e Luna et. al. (2005), que se baseia em duas etapas de centrifugação a temperatura ambiente (20 °C) para separar a gordura do leite.

A grande maioria dos estudos comparativos de métodos de extração da gordura do leite e caracterização do perfil de ácido graxo é feita em leite de vaca, havendo poucas informações a respeito dos efeitos dos métodos de extração em leite de cabra, égua e

jumenta os quais possuem composições de ácidos graxos substancialmente diferentes em relação ao leite de vaca.

Dentre as metodologias de catálise ácida, a metodologia desenvolvida por O'Fallon et al. (2007) utiliza os solventes diluídos em água, diferentemente do método desenvolvido por Kramer et al. (1997), que usa o metanol como solvente. Segundo O'Fallon et al. (2007) é importante ressaltar que a água não interfere na metilação de nenhum ácido graxo e leva produtos químicos familiares e econômicos, como o metanol, hidróxido de potássio e ácido sulfúrico, mas usa esses reagentes na presença de água. Na primeira etapa, os ésteres de ácido graxo da amostra são hidrolisados em ácidos graxos livres e na segunda etapa, os ácidos graxos livres são convertidos em ésteres metílicos de ácidos graxos.

2.2 Leite de equídeos: jumentas e éguas

O leite é um dos alimentos mais completos, principalmente durante os primeiros meses de vida do neonato (MALACARNE et al., 2002; PIKUI et al., 2008). Nos mamíferos além do papel na imunidade dos recém-nascidos, as secreções mamárias são fonte de nutrientes, vitaminas, enzimas, hormônios e fatores tróficos responsáveis pelo rápido crescimento dos potros nos primeiros meses de vida (SALIMEI E FANTUZ, 2012).

A produção e composição do leite dos mamíferos variam com a curva de lactação e são influenciadas por fatores ambientais, pelos manejos sanitários e alimentar, pela ordem de parto, e dentre outros (NAVRÁTILOVÁ et al., 2018). Nos equídeos a quantidade de leite produzida difere muito das espécies leiteiras convencionais, especialmente em termos de oferta de leite, os asininos em lactação produzem em torno de 1 a 1,7 L/dia (BORDONARO et al., 2013; SALARI et al., 2020) enquanto as éguas produzem em média 4,5L/dia (AKIMBEKOV et al., 2018).

O consumo de leite de égua é tradicional na Ásia, principalmente na Mongólia, Cazaquistão, Quirguistão e Rússia. Atualmente, o leite de égua está se tornando um produto muito procurado nos países da América do Norte e da Europa, conforme demonstrado por fazendas que operam na Holanda, Bélgica, Alemanha, Polônia, França e Itália (HAZELEGER e BEUMER, 2016; COSENTINO et al., 2017). No entanto, continua sendo um produto restrito e está sujeita à alta volatilidade da demanda.

Nos últimos 10 anos, a criação de jumentos para a produção de leite aumentou, junto com o número de trabalhos de pesquisa publicados sobre sua utilização e

composição. As fazendas de jumentos leiteiros na União Europeia estão localizadas principalmente na Itália, França, Espanha e Bélgica (VALLE et al., 2018).

As propriedades nutricionais e terapêuticas do leite de equino e asinino são descritas desde o século V D.C. (REIS et al., 2007). Além disso, o consumo do leite equino para produção de koumiss (ou airag), bebida nômade tradicional na Ásia Central, é relatada na literatura, não apenas como um ingrediente da "dieta branca" tradicional da população das estepes da Mongólia, mas também como remédio popular para uma variedade de doenças (ÖZER, 2000).

As descobertas científicas recentes sobre a composição do leite de equídeo descrevem o potencial na promoção da saúde humana, aumentando o interesse de consumo (LI et al., 2018). Estudos clínicos indicaram que o leite de jumenta e égua podem ser usados como alternativa às fórmulas hipoalergênicas disponíveis para bebês que sofrem de intolerância à proteína do leite de vaca, pois nutricionalmente, o leite de jumenta e éguas são comparáveis ao leite humano, no perfil de ácidos graxos. (NAYAK et al., 2020). Estudos em modelos animais relatam que os componentes bioativos do leite de jumenta podem melhorar a resposta imunológica (YVON et al., 2018).

2.2.1 Composição do leite de éguas e jumentas

A composição do leite de equídeos difere das espécies leiteiras convencionais (vaca, cabra e ovelha). Em comparação com o leite bovino, o leite equídeo contém menos gordura e proteína, porém mais lactose, chegando a concentrações próximas a do leite humano (BHARDWAJ et al., 2020).

Aroua et al. (2018) trabalhando com 73 jumentas tunisianas, relatou teores de matéria seca (MS) entre 9,2% e 10,4%, corroborando com o trabalho de Malacarne et al. (2019) que encontrou teores de 9,6% de MS em leite extraído de 9 jumentas da raça Ragusana (Italiana). Em leite de égua valores similares foram descritos, SALIMEI e FANTUZ (2012) encontraram concentrações de 11,0% de MS no leite equino, e OFTEDAL et al. (1983) descreveu valor de 10,5% de MS, similares a do leite humano (12,5%)

No colostro equino foi encontrado teores de MS variando de 14,7% a 29,4%, já no chamado leite de transição (2º a 5º dia da lactação) o teor de MS foi de 12,6% (SALAMON, 2009). PECKA-KIELB et al. (2018) estudando éguas de diferentes raças descreveu teores de 19,3% de MS no colostro e no leite de transição de 11,4% de MS. No colostro asinino valores semelhantes de MS foram relatados por MARTINI et al. (2020)

variando de 18% a 19% MS e no leite de transição teores variando de 11% a 13% MS. NIKKHAH (2012) relatou que o colostro de égua apresenta maior teor de sólidos, variando de 24,2% a 26,2% no primeiro dia de lactação, 12% de 2 a 5 dias após o parto e 10% de 8 a 45 dias após o parto.

De acordo com os autores, o teor de proteína no leite varia entre as espécies e é influenciado pela raça, estágio de lactação, alimentação, clima e estado de saúde do úbere (GUBIĆ et al. 2015). Nos equinos o teor de proteína do leite é semelhante à dos asininos, em média 1,68% (BARRETO et al., 2020).

MALACARNE et al. (2019) descreveram valor médio de 1,3% de proteína no leite de jumenta durante nove meses de lactação; MARTINI et al. (2020) e IVANKOVIĆ et al. (2009) relataram valores de proteína no leite asinino de 1,5%; e VALLE et al. (2018) apresentou valores de 1,7% a 1,9% de proteína no leite de jumenta. MALACARNE et al. (2019) relataram média de 0,72% e SALIMEI et al. (2002) valores de 1,72% de caseína no leite de jumenta.

A caseína, proteína do soro e proteína da membrana do glóbulo de gordura do leite são as principais proteínas do leite (CAO et al., 2017; MURGIA et al., 2016). Segundo SALIMEI e FANTUZ (2012) os constituintes do soro do leite dos equídeos são a lactoglobulina B, a α -lactoglobulina, a imunoglobulina, a albumina sérica e a lisozima. As caseínas do leite estão presentes em diferentes frações: α -s1, α -s2, beta-caseína e kappa-caseína. As caseínas no leite de jumenta não foram amplamente estudadas (MARTINI et al., 2018). No entanto, todas as quatro frações foram identificadas (BERTINO et al., 2010) embora existam apenas poucos dados que relatam baixos teores das quatro frações de caseína. As caseínas mais representadas em vacas são α -s1 e beta-caseína. Em contraste, as caseínas constituem um componente menor do leite humano, de asininos e equinos. A beta-caseína é a fração principal em ambos os leites (cerca de 0,27 e 0,37 g / 100 mL) (CHEN et al 2016), enquanto α -s1 e kappa-caseína são encontrados apenas em níveis muito baixos, e α -s2 está ausente no leite humano (BERTINO et al., 2010). Em equinos valores de caseína variaram de 13,7% no colostro e 1,3% no leite, demonstrando ampla variação dependendo do estágio de lactação que a fêmea se encontra (BARRETO et al., 2020).

O leite da égua e da jumenta são mais claros e brancos do que o leite de vaca; têm baixo teor de gordura e proteína, dos quais apenas 50 a 55% é caseína (JASTRZEBSKA et al., 2017). A quantidade de gordura no leite equino é bastante variável durante o período de lactação, a gordura do colostro é cerca de 20% maior do que a gordura do leite

produzida no terço inicial da lactação (PECKA et al., 2012). Em estudos com éguas da raça quarto de milha foi encontrado valores médios de 1,3% de gordura totais no leite, sendo semelhante ao encontrado por Gibbs et al. (1983) que apresentou faixa de 1,0-1,5% em éguas da mesma raça, porém Reis et al. (2007) encontrou valores de 0,6% em éguas da raça Mangalarga. Em jumentas valores próximos também foram relatados por Martini et al. (2014), variando de 0,5 a 1,7% de gordura; Malacarne et al. (2019) descreveu valores de 0,2g/100g de gordura no leite de jumentas da raça Ragusano.

O leite equino e asinino tem baixos teores de gordura quando comparado ao leite de outras espécies, entretanto, a mensuração desse componente no leite é influenciada pelo manejo nutricional e métodos de coleta de difícil controle, que se traduzem em elevado coeficiente de variação cerca de 61,30% (BARRETO et al., 2020). Salimei e Fantuz (2012) relatam a necessidade da ordenha completa para que o teor de gordura obtido represente a realidade, pois éguas e jumentas apresentam cisternas do úbere pequenas e requerem ordenhas ou amamentação frequentes do potro (BARRETO et al., 2020). Potros com bom estado de saúde consomem leite várias vezes por hora, quando extrapoladas para a metodologia de coleta de amostras, essas peculiaridades anatômicas e fisiológicas refletem a dificuldade de esvaziamento completo do úbere, que está diretamente relacionada ao teor de gordura do leite, uma vez que a fração residual do leite é rica em gordura (GIBBS, 1983).

De acordo com Markiewicz-Keszycka et al. (2014) a evolução da lactação nas éguas e jumentas leva à produção de um leite rico em lactose, mas pobre em gordura, proteína e sólidos totais. Em média, o leite equino contém 6,5% (SANTOS et al., 2005), 6,4 a 6,9% (CAIS-SOKOLIŃSKA et al., 2018) de lactose; e o colostro equino 1,5% (Malacarne et al., 2019). VALLE et al. (2018) reportou teores variando de 1,8 a 2,0% de lactose no leite de jumentas italianas; 6,7% de lactose (PECKA-KIEŁB et al., 2018). Em estudo desenvolvido por Salimei et al. (2002) foi relatado que o teor de lactose no leite de jumentas não é influenciado pela raça e estágio de lactação.

A gordura do leite humano difere da gordura do leite de vaca, búfalo, cabra, ovelha, camelo, égua e jumenta significativamente no perfil de ácidos graxos. Os maiores ácidos graxos saturados (AGS) totais são encontrados no leite de cabra, seguido pelo leite de vaca, jumenta, búfala, ovelha, camelo, humano e de égua (JASTRZEBSKA et al., 2020). Os teores de ácidos graxos monoinsaturados são mais elevados nos leites de humanos, camelos, éguas, vacas, búfalas, cabras, ovelhas e jumentas. Os ácidos graxos poliinsaturados aparecem e maiores teores no leite de equídeos ao leite humano, camelo,

vaca, ovelha, cabra e búfala (NAYAK et al., 2020).

Os AGS estão presentes na gordura do leite de asininos em quantidades semelhantes às do leite humano (57 e 45g/100g de gordura, respectivamente) e inferiores ao leite de vaca (71g/100g de gordura) (ROGONA et al., 2016). O leite equídeo é caracterizado pelo alto teor de ácidos graxos poliinsaturados. Os lipídios contêm menos triacilgliceróis (81%), em comparação ao leite de vaca (97%) e o humano (98%) (NAVRÁTILOVÁ et al., 2018).

As diferenças na presença de ácidos graxos no leite de égua e de jumenta em comparação com o leite de ruminantes estão associadas as dietas (NAVRÁTILOVÁ et al., 2018), biossíntese de ácidos graxos e processos digestivos no trato gastrointestinal (DOREAU E BOULOT, 1989).

2.2.3 Moléculas bioativas do leite dos equídeos

A caracterização dos principais constituintes do leite tem importância na relação entre saúde e nutrição (DEDARK, 2020). A fração proteica do soro foi caracterizada no leite de jumenta e éguas por vários autores (VINCENZETTI, 2017; POTOČNIK et al., 2011; UNIACKE-LOWEET et al., 2010). De acordo com os estudos, alguns componentes do leite equídeo são benéficos para a saúde humana como as β -Lactoglobulina, α -lactalbumina, Lisozima, Lactoferrina, Lactoperoxidase e os AGs essenciais.

A β -lactoglobulina é a proteína de soro de leite mais representada em ruminantes, No leite de jumenta o teor é de 3,75g/L, valor muito próximo ao encontrado no leite bovino (3,3g/L) e no leite de égua. A β -lactoglobulina contém 162 aminoácidos e pertence à família das proteínas da lipocalina, tem massa molecular de 18,36 kDa (VINCENZETTI, 2017). É conhecida por ter várias funções, tanto nutricionais quanto funcionais. Uma das funções mais estudadas no momento é a capacidade da proteína de se ligar a moléculas de interesse nutricional e servir como matriz protetora durante a digestão. Foi demonstrado que a β -lactoglobulina se liga a vitaminas (D2, D3), colesterol e catequinas (KARAMI, 2019). Além de se ligar a algumas vitaminas, essa proteína pode estar envolvida na regulação enzimática e na aquisição passiva da imunidade neonatal (KONTOPIDIS, 2004).

A α -lactalbumina (α -La), proteína composta por 123 resíduos de aminoácidos, com peso molecular de 14,2 kDa, possui em sua estrutura terciária quatro pontes dissulfeto. O leite de jumenta contém uma quantidade considerável de α -La com

concentração de 1,80 g / L, muito próxima à encontrada no leite humano e bovino (VINCENZETTI, 2017). A α -La é conhecida por suas qualidades nutricionais, principalmente em bebês, tem elevado teor de triptofano e desempenha um papel importante na produção de leite em mamíferos, pois interage com a enzima β -1,4-galactosiltransferase produzindo a lactose sintase que é essencial para a formação da lactose (ALTOMONTE et al., 2019).

Estudos têm mostrado que a ingestão regular de α -lac por adultos torna possível aumentar as quantidades plasmáticas de triptofano, melhorando assim certas funções neurológicas (atenção, desempenho cognitivo, alerta matinal, etc.) (ALTOMONTE et al., 2019; MARKUS et al., 2005).

A lisozima é uma enzima globular composta por 129 aminoácidos e pertencente à classe das hidrolases (VELUSAMY, 2011). O leite de jumenta contém 1,0 g / L de lisozima (maior que do leite humano), enquanto no leite de cabra e bovino esta proteína está ausente (VINCENZETTI et al., 2017; KARAMI et al., 2019).

ZHANG et al. (2008) relatam a ação bactericida da lisozima, que ocorre porque ela desorganiza a parede celular dos microrganismos; sua reação hidrolítica ocorre apenas nos compostos de glicosila, isso resulta na clivagem da ligação glicosídica entre o carbono 1 da glucosamina e o carbono 4 do ácido murâmico, causando, assim, a quebra da parede celular bacteriana. A lisozima pode ajudar a prevenir infecções intestinais em lactentes (TRINCHESE, 2018); e confere ao leite de jumenta e de égua a propriedade de controle microbiológico, proporcionando maior vida de prateleira quando comparados a leites de ruminantes (VINCENZETTI et al., 2017; KARAMI et al., 2019). Juntamente a ação bactericida, foi demonstrado que essa enzima tem outras funções fisiológicas como, atividade anti-inflamatória, atividade imunorregulatória e atividade antitumoral (MAO, 2009).

A lactoferrina, também chamada de lactotransferrina, é uma glicoproteína de 80,0 kDa pertencente à família da transferrina, é uma glicoproteína quelante de ferro e tem uma estrutura composta por dois domínios homólogos, cada um ligando-se a um íon férrico (Fe^{3+}) e um ânion carbonato. No leite de égua, a concentração de lactoferrina é de cerca de 0,10 g / L, enquanto no colostro varia de 1,5 a 5,0 g / L. No leite de jumenta foi encontrada uma concentração de lactoferrina de 0,08 g / L (DIAS et al., 2002).

Segundo Dias et al. (2002) e Sarti et al. (2019) a lactoferrina apresenta várias funções, incluindo a regulação da homeostase do ferro, crescimento e diferenciação celular, defesa contra agentes infecciosos, proteção anti-inflamatória e contra o câncer e,

finalmente, uma atividade trófica na mucosa intestinal. A atividade antimicrobiana da lactoferrina se aplica a uma ampla gama de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas apresentando dois mecanismos diferentes. O primeiro mecanismo tem efeito bacteriostático, pois, graças à sua alta afinidade com o ferro, pode subtrair esse metal a bactérias dependentes de ferro, que ficam privadas de crescimento nutritivo essencial, o segundo é devido a um mecanismo de ação direta da lactoferrina que é capaz de danificar a parede celular de bactérias gram-negativas, ligando-se ao lipopolissacarídeo (BRUMINI, 2016).

A enzima lactoperoxidase (LPO) é uma enzima oxidoreductase, secretada predominantemente pela glândula mamária, mas também pode ser encontrada em outras secreções glandulares e tem função protetora contra infecções por microrganismos. É encontrada em baixas concentrações no leite fresco de jumenta, bem como no leite humano. (MARTINI et al., 2018). Esta enzima faz parte da família das peroxidases, é uma glicoproteína composta por 608 aminoácidos com massa molecular de 78,0 kDa. A lactoperoxidase também está ligada a um íon cálcio, importante para a manutenção da integridade estrutural da proteína. (TENOVUO, 1985).

Além das proteínas a fração lipídica do leite de jumenta é caracterizada por altos teores de ácidos graxos essenciais (GASTALDI et al., 2010). Os ácidos graxos saturados (AGS) estão contidos na gordura do leite de jumentas em quantidades semelhantes às do leite humano (57 e 45 g / 100g de gordura, respectivamente) e inferiores ao leite de vaca (71 g / 100g de gordura) (RAGONA et al., 2016). O que pode auxiliar na prevenção de doenças cardiovasculares, autoimunes e inflamatórias (MARTINI et al., 2014).

O teor médio de ácido oleico (C18: 1) no leite de jumenta é comparável ao leite de vaca (17 e 18,35 g / 100g de gordura, respectivamente) e inferior ao do leite humano (31 g / 100g de gordura). Por outro lado, o teor do ácido linoléico (C18: 2n6) é semelhante no leite de jumenta e humano (9,5 e 12,29 g / 100g de gordura, respectivamente), superior ao do leite de vaca (2,05 g / 100g de gordura). Entre os leites de espécies leiteiras convencionais, o leite dos equídeos tem maiores teores de ácido α -linolênico (C18: 3n3) (7,25 g / 100g de gordura), quantidades superiores às do leite humano e de leite de vaca (1,15 e 0,56 g / 100g de gordura, respectivamente) (PEGOLO et al., 2017).

O leite dos equídeos pode auxiliar terapeuticamente casos como doenças hepáticas, doenças infecciosas, pulmonares e de pele, devido as propriedades de suas moléculas bioativas (BHARDWAJ et al., 2019).

2.2.4 Utilizações do leite de equídeos: alimentação e tratamento de doenças

A produção e composição do leite variam nas espécies de mamíferos com a curva de lactação e é influenciada por fatores ambientais, manejos sanitário e alimentar, ordem de parto, dentre outros (GIOSUÈ et al., 2008). Em comparação com leite humano, o leite asinino é similar em composição, com isso, pode ser incluído na alimentação humana, principalmente de crianças que apresentam intolerância ao leite de vaca ou alergias alimentares variadas (MANSUETO et al., 2013).

Estima-se que cerca de 30 milhões de pessoas no mundo bebam leite de égua/jumenta (MALACARNE et al., 2002). Há relatos que na Roma Antiga, o leite equídeo e seus derivados eram utilizados como medicamentos (SALIMEI & FANTUZ, 2012). Na França, no século XIX o de leite de jumenta foi utilizado na alimentação de bebês com sífilis (SOUROULLAS et al., 2018).

As propriedades terapêuticas do leite de jumentas já são estudadas como substituto do leite humano para recém-nascidos e prematuros (REIS et al., 2007), em idosos com imunodeficiência, na preservação de doenças cardíacas (SALIMEI e FANTUZ, 2012) e na prevenção de doenças degenerativas e hepatopatias (NIKKHAH, 2012; REIS et al., 2007).

Uniacke-Lowe et al. (2010) indicam que o leite de jumenta pode ser utilizado na elaboração de formulações nutricionais infantis. A quantidade de selênio no leite de jumenta é 5,16 vezes maior quando comparado ao leite de vaca, e as quantidades de lactalbumina e lactoglobulina respondem por mais de 60% do conteúdo total de proteínas.

O elevado teor de α -lactalbumina do leite de jumenta fornece uma base teórica moderna para a prevenção e tratamento do diabetes (LI et al., 2020).

Com isso nos últimos anos, as propriedades do leite equídeo têm sido estudadas e apreciadas pelos cidadãos. Este movimento resultou na melhoria de fazendas de pequeno ou médio porte dedicadas à produção de leite de jumenta, principalmente na Itália, onde o leite produzido é empregado na alimentação humana e como ingrediente na indústria cosmética.

Além do leite cru, o leite de jumenta apresenta derivados lácteos com propriedades funcionais, portanto, o valor biológico e nutricional do leite de equídeos exige um conhecimento profundo, que pode ser usado vantajosamente para a produção de produtos fermentados que podem ser considerados como “novos alimentos” (PERNA et al., 2015).

Diferentes tipos de produtos fermentados alimentícios estão surgindo seguindo as demandas do mercado. Chiavari et al. (2005) demonstraram o efeito benéfico de consumo

de leite de equídeo, principalmente de leite fermentado para o tratamento da intolerância ao leite de vaca em crianças pequenas. Coppola et al. (2002) investigaram as propriedades fermentativas do leite de asininos sugerindo a possibilidade de usar este leite para tais fins.

3. REFERÊNCIAS

- AKIMBEKOV, A. R. et al. Dairy productivity and milk composition of mares of different genotypes. **Reports of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan**, v. 1483, p. 54 – 62, 2018.
- ALTOMONTE, I.; SALARI, F.; LICITRA, R.; MARTINI, M. Donkey and human milk: Insights into their compositional similarities. **International Dairy Journal**. v. 89, p. 111-118, 2019.
- AROUA, M. et al. Milk composition Comparison between donkey , goat and cow breeds. v. 9, n. 5, p. 202–206, 2018.
- ASPRI, M.; ECONOMOU, N.; PAPADEMAS, P. Donkey milk: An overview on functionality, technology, and future prospects. **Food Reviews International**, v. 33, p. 316-333, 2017.
- ASSIS, D. C. S. Validação de metodologia analítica por UPLC/MS-MS para avaliação da presença de resíduos de antimicrobianos em músculo de frangos de corte após tratamento. **Tese apresentada à Escola de Veterinária-UFMG, programa de pós-graduação Ciência Animal**, Belo Horizonte. 2015.
- BARRETO, Í. M. L. G. et al. Chemical composition and lipid profile of mare colostrum and milk of the quarter horse breed. **PLoS ONE**, v. 15, n. 9 september, p. 1–10, 2020.
- BERTINO, E. et al. Detailed proteomic analysis on DM: Insight into its hypoallergenicity. **Frontiers in Bioscience - Elite**, v. 2 E, n. 2, p. 526–536, 2010.
- BHARDWAJ, A. et al. Donkey milk composition and its therapeutic applications. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 90, n. 6, p. 837–841, 2020.
- BORDONARO, S. et al. The mathematical modeling of the lactation curve for dairy traits of the donkey (*Equus asinus*). **Journal of Dairy**, 2013.
- BRUMINI, D.; CRISCIONE, A.; BORDONARO, S.; VEGARUD, G.E.; MARLETTA, D. Whey proteins and their antimicrobial properties in donkey milk: a brief review. **Dairy Science & Technology**, v.96, p. 1-14, 2016.
- CAIS-SOKOLIŃSKA, D. et al. Freezing point and other technological properties of milk of the Polish Coldblood horse breed. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 11, p. 9637–9646, 2018.
- CAO, X., SONG, D., YANG, M., YANG, N., YE, Q., TAO, D., YUE, X. Comparativo análise de N-glicoproteínas de soro no colostro humano e leite maduro usando glicoproteômica quantitativa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, p. 10360 – 10367, 2017.

CHEN Q, ZHANG J, KE X, LAI S, LI D, YANG J. Simultaneous quantification of α -lactalbumin and β -casein in human milk using ultra-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry based on their signature peptides and winged isotope internal standards. **Biochim Biophys Acta**, Proteins Proteomics, p. 1864:1122, 2016.

CHIAVARI, C., COLORETTI, F., NANNI, M., SORRENTINO, E., GRAZIA, L. Use of donkey's milk for a fermented beverage with Lactobacilli. **Lait**, 2005.

COSENTINO, C., G. NOTARNICOLA, R. PAOLINO, C. D'ADAMO, C. LABELLA, M. MUSTO E P. FRESCHI. Características do colostro e do leite em éguas da raça Murgesse. **Czech J. Anim. Sci.** v. 62, p. 466–472, 2017.

CURVALL, M.; EEVA, K. V.; ENZELL, C. R. Simultaneous determination of nicotine and cotinine in plasma using capillary column gas chromatography with nitrogen-sensitive detection. **Journal of Chromatography**, n. 232, 1982.

DEGANI, A. L.; CASE, Q. L.; VIERA, P. C. Cromatografia um breve ensaio. Química nova na escola, São Paulo, n. 7, 1998.

DERDAK, R. et al. Donkey Milk Bioactive Proteins and Peptides, **Health and Food Applications-A review**. n. July, p. 1–18, 2020.

DOREAU, M., BOULOT, S. Conhecimento recente sobre a produção de leite de égua: uma revisão. **Ciência da Produção Animal**, v. 22 (3-4), p. 213-235, 1983.

GIBBS PG, POTTER GD, BLAKE RW, MCMULLAN A. Produção de leite de cavalo Quarto de milha durante 150 dias de lactação. **J Anim Sci.**; v. 3 (54), p. 497–450, 1982.

GOULART, D. S. Aplicações das técnicas de cromatografia no diagnóstico toxicológico. **Tese apresentada ao Programa de pós-graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás –UFG**, Goiânia, 2012.

GUBIĆ J, TOMIĆ J, TORBICA A, ILIČIĆ M, TASIĆ T, ŠARIĆ L. Caracterização de várias proteínas do leite em burros domésticos dos Balcãs se reproduzem durante a lactação, usando eletroforese capilar labon-a-chip. **Chem Ind Chem Eng Q**, v. 22, p. 9–15, 2016.

GUO, H. Y.; PANG, K.; ZHANG, X. Y.; ZHAO, L.; CHEN, S. W. DONG, M. L. Composition physiochemical properties, nitrogen fraction distribution and amino acid profile of donkey milk. **Journal of Dairy Science**, v.90, p. 1635-1643, 2007.

HAZELEGER, WC E RR BEUMER. Qualidade microbiana de matéria-prima leite de

- cavalo. **Int. Dairy J.** v. 63, p. 59–61, 2016.
- HORROBIN, D.F. Essential fatty acid metabolism and its modification in atopic eczema. **Am. J. Clin. Nutr.** 2000.
- IVANKOVIC, A.; RAMLJAR, J.; STULINA, I; ANTUNAC, N.; BASIC, I.; KELAVA, N.; KONJACIC, M. Characteristics of the lactation, chemical composition and Milk hygiene quality of the Littorak- Dinaric Izvorniznanstvenirad, 2009.
- JASTRZĘBSKA E, WADAS E, DASZKIEWICZ T, PIETRZAK-FIEĆKO R. Nutritional value and health-promoting properties of mare’s milk – a review. **Czech Journal of Animal Science**, v. 62, p.511–518, 2017.
- KARAMI, Z.; AKBARI-ADERGANI, B. Bioactive food derived peptides: a review on correlation between structure of bioactive peptides and their functional properties. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, p. 535-547, 2019.
- KESSLER, A.; MENENDEZ-AGUIRRE, O.; HINRICHS, J.; STUBENRAUCH, C.; WEISS, J. Alphascasein-PE6400 mixtures: a fluorescence study. **Faraday Discuss**, v.166, p. 399-416, 2013.
- KONTOPIDIS, G.; HOLT, C.; SAWYER, L. Invited review: Beta-lactoglobulin: Binding properties, structure, and function. **J. Dairy Sci.**, v. 87, p. 785–796, 2004.
- KROENING, T.A.; MUKERJI, P.; HARDS, R.G. Analysis of beta-casein and its phosphoforms in human milk. **Nutrition Research**, v.18, p. 1175-1186, 1998.
- LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v.1, 2009.
- LI, L .; LIU, X .; GUO, H. The nutritional ingredients and antioxidant activity of donkey milk and donkey milk powder. **Food Sci. Biotechnol**, v. 27, p. 393–400, 2018
- LI, Y. F., ABDUL S. S., ZHENDONG W., DONGLIANG W., HAINING T., Dezhou donkey (*Equus asinus*) milk a potential treatment strategy for type 2 diabetes, **Journal of Ethnopharmacology**, 2020.
- LONNERDAL, B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. **Am J Clin Nutr**, v. 77, p. 1537-1543, 2003.
- MALACARNE, M. et al. New insights into chemical and mineral composition of donkey milk throughout nine months of lactation. **Animals**, v. 9, n. 12, 2019.
- MALACARNE, M.; MARTUZZI, F.; SUMMER, A.; MARIANI, P. Protein and fat composition of mare’s Milk: some nutritional remarks with reference to human and cow’s Milk. **International Dairy Journal**, 2002.
- MANSUETO, P., IACONO, G., TAORMINA, G., SEIDITA, A., D’ALCAMO, A,

- ADRAGNA, F. & CARROCCIO, A. Ass's milk in allergy to cow's milk protein: A review. **Acta Med Mediterr.**, v. 29, 2013.
- MAO, X.; GU, J.; SUN, Y.; XU, S.; ZHANG, X.; YANG, H.; REN, F. Anti-proliferative and anti-tumour effect of active components in donkey milk on A549 human lung cancer cells. **Int. Dairy J.**, v. 19, p. 703–708, 2009.
- MARKIEWICZ-KÉ SZYCKAM, WÓJTOWSKI J, CZY Ź AK-RUNOWSKA G, KUCZY Ń SKA B, PUPPEL K, KRZY Ź EWSKI J, BAGNICKA E. Concentração de ácidos graxos selecionados, vitaminas solúveis em gordura e β - caroteno no leite de éguas no final da lactação. *Int milk J.*, v. 38, p. 31–36, 2014.
- MARKIEWICZ-KĘSZYCKA M, WOJTOWSKI J, KUCZYŃSKA B, PUPPEL K, CZYŹAK-RUNOWSKA G, BAGNICKA E. Chemical composition and whey protein fraction of late lactation mares milk. **International Dairy Journal**, v. 31, p. 62–64, 2012.
- MARKUS, C.R.; JONKMAN, L.M.; LAMMERS, J.H.; DEUTZ, N.E.; MESSER, M.H.; RIGTERING, N. Evening intake of α -lactalbumin increases plasma tryptophan availability and improves morning alertness and brain measures of attention. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, p. 1026-1033, 2005.
- MARTINI, M. et al. Nutritional and Nutraceutical Quality of Donkey Milk. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 65, p. 33–37, 2018.
- MARTINI, M. et al. Quality of donkey mammary secretion during the first ten days of lactation. **International Dairy Journal**, v. 109, p. 104781, 2020.
- MARTINI, M.; ALTOMONTE, I.; SALARI, F. Amiata donkeys: fat globule characteristics, Milk Gross composition and fatty acids. **Italian Journal of Animal Science**, v. 13, p. 123 – 126, 2014.
- MEDHAMMAR, E.; WIJESINHA-BETTONI, R.; STADLMAYR, B.; NILSSON, E.; CHARRONDIERE, U. R.; BURLINGAME, B. Composition of milk from minor dairy animals and buffalo breeds: a biodiversity perspective. **Journal Science Food Agriculture**, 2012.
- MURGIA, A., SCANO, P., CONTU, M., IBBA, I., ALTEA, M., BUSSU, M., CABONI, P. Caracterização do leite de burra e metabólito e comparação com leite humano e leite em pó. **LWT-Food Science and Technology**, v. 74, p. 427 – 433. 2016.
- NAERT, L., B. VANDE, G. VERHOEVEN, L. DUCHATEAU, S. DE SMET, E F. COOPMAN. Avaliação da heterogeneidade da composição do leite de égua na Flandres. **Vlaams Diergeneesk. Tijdschr.** v.82, p. 23–30, 2013.

NAVRÁTILOVÁ, P. et al. Content of nutritionally important components in mare milk fat. *Mljekarstvo*, v. 68, n. 4, p. 282–294, 2018.

NAYAK, C.; C T, R.; KUMAR, G. A Comprehensive Review on Composition of Donkey Milk in Comparison to Human, Cow, Buffalo, Sheep, Goat, Camel and Horse Milk. *The Mysore Journal of Agricultural Sciences*, v. 54, n. 3, p. 42–50, 2020.

NIKKHAH, A. Equidae milk promises substitutes for cow and human breast milk. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, v. 36, p. 470-475, 2012.

OFTEDAL OT, HF HINTZ, HF SCHRYVER, Lactation in the horse: Milk composição e ingestão por potros, *J. Nutr.*, v.113, p. 2196–2206, 1983.

O'FALLON, J. V.; BUSBOOM, J. R.; NELSON, M. L.; GASKINS, C. T. A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: Application to wet meat tissues, oils, and feedstuffs, *Journal of Animal Science*, v. 85, 2007.

OZER, B. Fermented milks. Products of Eastern Europe and Asia. Encyclopedia of food microbiology. C. A. B. R. K. Robinson, & P. D. Patel (Eds.), **London: Academic Press.**, p. 803–804, 2000.

PECKA. E, DOBRZA. Z, ZACHWIEJA A, SZULC T, CZY Ź K. Estudos de composição e principais níveis de proteína no leite e colostro de éguas. *Anim Sci J.*; v. 83, p.162–168., 2012.

PECKA-KIEŁB, E. et al. Influence of nutrition on the quality of colostrum and milk of ruminants. *Mljekarstvo*, v. 68, n. 3, p. 169–181, 2018.

PEGOLO S, STOCCO G, MELE M, SCHIAVON S, BITTANTE G, CECCHINATO A. Factors affecting variations in the detailed fatty acid profile of Mediterranean buffalo milk determined by 2-dimensional gas chromatography. *J Dairy Sci*, v. 100, p. 2564–2576, 2017

PENTEADO, J. C. P.; MAGALHÃES, D.; MASINI, J. C. Experimento didático sobre cromatografia gasosa: uma abordagem analítica e ambiental. *Química Nova*, v. 31, 2008.

PERES, T. B. Noções básicas de cromatografia. *Biológico*, São Paulo, v. 64, n. 2, 2002.

PIETRZAK-FIEĆKO, R., & KAMELSKA-SADOWSKA, A. M. The Comparison of Nutritional Value of Human Milk with Other Mammals' Milk. *Nutrients*, 2020.

PIKUL J, WÓJTOWSKI J, DANKÓWR, KUCZYNSKA B, LOJEK J. Perfil de teor de gordura e ácidos graxos do colostro e do leite de cavalos Konik primitivos (*Equus caballus gmelini* Ant.) durante seis meses de lactação. *J Dairy Res*, v. 75, p. 302, 2008.

- POTOCNIK, K.; GANTNER, V.; KUTEROVAC, K.; CIVIDINI, A. Mare's milk: composition and protein fraction in comparison with different milk species. **Mljekarstvo**, v.61, p.107-113, 2011.
- RAGONA G, CORRIAS F, BENEDETTI M, PALADINI I, SALARI F, ALTOMONTE I. Cadeia leiteira de jumenta Amiata: avaliação da saúde animal e qualidade do leite. **Ital J Food Saf** , v. 5, p.173, 2016.
- REIS, A. P.; MESQUITA, A. J.; MOREIRA, C. H. G.; CURADO, E. A. F.; SILVA, E. B.; NICOLAU, E. S. Composição do leite de éguas da raça Mangalarga Marchador. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*. V.66, p. 130-135, 2007.
- SALAMON, R. V. Composition of mare ' s colostrum and milk I . Fat content , fatty acid composition and vitamin contents. v. 1, p. 119–131, 2009.
- SALARI, F. et al. Donkey Feeding During Maintenance , Pregnancy , and Lactation : Effects on Body Weight , Milk Production , and Foal Growth. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 91, p. 103131, 2020.
- SALIMEI, E. & FANTUZ, F. Equid milk for human consumption. **International Dairy Journal**, v. 24(2), p. 130-142, 2012
- SANTOS EM, ALMEIDA FD, VIEIRA AA, PINTO LB, CORASSA A, PIMENTEL RM, SILVA VP, GALZERANO L. Lactação em éguas da raça Mangalarga Marchador: produção e composição do leite e ganho de peso dos potros lactentes. *R Bras Zootec.*, v. 34 (2), p. 627–634, 2005.
- SARTI, L.; MARTINI, M.; BRAJON, G.; BARNI, S.; SALARI, F.; ALTOMONTE, I.; RAGONA, G.; MORI, F.; PUCCI, N.; MUSCAS, G.; BELLI, F.; CORRIAS, F.; NOVEMBRE, E. Donkey's Milk in the Management of Children with Cow's Milk protein allergy: nutritional and hygienic aspects. **Italian Journal of Pediatrics**, v. 45, p. 102, 2019.
- SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A.; *Principios de Análisis Instrumental*, Bookman: Porto Alegre, 2001.
- TENOVUO, J.O. The peroxidase system in human secretions. In *The Lactoperoxidase System: Chemistry and Biological Significance*; Pruitt, K.M., Tenovuo, Eds.; Marcel Dekker: New York, NY, USA, p. 101–122, 1985.
- TRINCHESE, G.; CAVALIERE, G.; DE FILIPPO, C.; ACETO, S.; PRISCO, M.; CHUN, J.T.; PENNA, E.; NEGRI, R.; MUREDDA, L.; DEMURTAS, A.; BANNI, S.; BERNI-CANANI, R.; MATTACE RASO, G.; CALIGNANO, A.; MELI, R.; GRECO, L.; CRISPINO, M.; MOLLICA, M.P. Human Milk and Donkey Milk, Compared to

- Cow Milk, Reduce Inflammatory Mediators and Modulate Glucose and Lipid Metabolism, Acting on Mitochondrial Function and Oleyethanolamide Levels in Rat Skeletal Muscle. *Front Physiol*, v. 9, p. 32, 2018.
- UNIACKE-LOWE, T.; HUPPERTZ, T.; FOX, P. F. Equine milk proteins: chemistry, structure and nutritional significance. ***International Dairy Journal***, v.20, p.609- 629, 2010.
- VALENTE, L. M. M.; ALVES, F. F.; BEZERRA, G. M.; ALMEIDA, M. B. S.; ROSARIO, S. L.; MAZZER, J. L.; AVILLA, L. A.; SIANI, A. C. Desenvolvimento e aplicação de metodologia por cromatografia em camada delgada para determinação do perfil de alcaloides oxindólicos pentacíclicos nas espécies sul-americanas do gênero *Uncaria*. ***Revista Brasileira de Farmacologia***, v. 16, n. 2, 2006.
- VALLE, E. et al. Effect of farming system on donkey milk composition. ***Journal of the Science of Food and Agriculture***, v. 98, n. 7, p. 2801–2808, 2018.
- VELUSAMY, V. ; PALANIAPPAN, L. Compositional analysis α -lactalbumin. *Am. J. Biochem. Mol. Biol*, v. 1, p. 106-120, 2011.
- VINCENZETTI, S.; PUCCIARELLI, S.; POLZONETTI, V.; POLIDORI, P. Role of proteins and of some bioactive peptides on the nutritional quality of donkey milk and their impact on human health. *Beverages* 2017.
- YVON, S. ; SCHWEBEL, L. ; BELAHCEN, L. ; TORMO, H. ; PETER, M. ; HAIMOUD-LEKHAL, DA; EUTAMENE, H. ; JARD, G. Efeitos do leite de jumenta termizado com atividade da lisozima na alteração da barreira intestinal em camundongos expostos ao estresse de evitar a água. *J. Dairy Sci.*, v. 102, p. 7697–7706, 2019.
- ZHANG, X.Y.; ZHAO, L.; JIANG, L.; DONG, M.L.; REN, F.Z. The antimicrobial activity of donkey milk and its microflora changes during storage. *Food Control*, v.19, p. 1191–1195, 2008.

CAPÍTULO 1

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE METILAÇÃO PARA ANÁLISE DE ÁCIDOS GRAXOS DA GORDURA DO LEITE DE EQUÍDEOS E RUMINANTES

SOUZA, Douglas Melo. COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE METILAÇÃO PARA ANÁLISE DE ÁCIDOS GRAXOS DA GORDURA DO LEITE DE EQUÍDEOS E RUMINANTES Salvador, Bahia, 2022. Dissertação de mestrado – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, 2022.

RESUMO

O objetivo do estudo foi comparar métodos de avaliação do perfil de ácidos graxos (AG) de leite de equídeos e ruminantes e identificar a metodologia mais adequada para os leites de éguas e jumentas. Ainda, determinar as principais diferenças do perfil de AG entre os leites de equídeos e ruminantes voltados para o consumo humano. Foram utilizadas amostras de leite de égua, jumenta, vaca e cabra. Os AG dos leites foram identificados por cromatografia gasosa após três diferentes metodologias de metilação: Kramer et al. (1997) com catalise ácido/base; O’Fallon et al. (2007) com catalise ácido/base em meio aquoso e Liu et al. (2020) com catalise básica. Não foram observadas diferenças significativas entre os métodos de metilação para os AG identificados nas diferentes matrizes lácteas. Os valores médios dos teores de AG de cadeia curta (AGCC) e AG cadeia média (AGCM) diferiram significativamente entre os métodos, e a identificação destes grupos de AG é um fator importante na escolha da metodologia para cada matriz láctea. Na avaliação quali-quantitativa do perfil de AG de leite de equídeos e ruminantes, os métodos de metilação utilizados foram semelhantes entre si, indicando que os leites de éguas e jumentas podem ser analisados pelos três métodos avaliados no presente estudo. Os teores dos AGCC (C4:0, C6:0 e C8:0) foram semelhantes, e os AGCM (C10:0, C12:0 e C14:0) foram maiores no leite de jumenta. O leite de égua apresentou o teor mais elevado de C18:3n3, que influenciou no somatório de $\sum n3$ (C18:3n3, C20:5n3 e C22:6n3), grupo este com maior teor no leite de égua, 12 vezes mais elevado que no leite de vaca e 8 vezes que no de jumenta. O $\sum n6$ (C18:2 n6 e C20:4 n6) foi mais elevado no leite de jumenta (17,75 %), seguido pelo leite de égua (12,64%), e 15 vezes menor no leite de vaca (2,55%), comparado ao leite de jumenta. Quando comparado ao leite de vaca, o leite equídeo apresenta maiores teores de n3 e n6. Conclui-se que as metodologias estudadas são indicadas para a avaliação do perfil de AG de leite de éguas, jumentas, cabras e vacas sem que haja prejuízo na identificação. Os leites dos equídeos tem o melhor perfil de AG essenciais e são indicados para o consumo humano.

Palavras-chave: cromatografia, leite asinino, matrizes lácteas, ômega-3, saúde humana

ABSTRACT

The aim of the study was to compare methods of qualitative evaluation of the fatty acid (FA) profile of equine and ruminant milk and to identify the most appropriate methodology for mares and donkeys' milk. Also, determine the best FA profile for human consumption between equine and ruminant milks. Samples of mare, donkey, cow and goat milk were used, ruminant milk was used as a control. The FA of the milks were identified by gas chromatography after three different methylation methodologies, Kramer (1997), acid/base catalysis; O'Fallon (2007) acid/base catalyzes in aqueous medium, and Liu (2020) base catalyzes. No significant differences were observed between the methylation methods for the identified FAs. The mean values of short-chain FA and medium-chain FA contents differed significantly between the methods, and the identification of these FA groups is an important factor in choosing the methodology for each milk. In the qualitative evaluation of the FA profile of milk from mares, donkeys and ruminants, the methylation methods used were similar, indicating that the milks of mares and donkeys can be analyzed by the three methods evaluated in the present study. Short chain FA (C4:0, C6:0 and C8:0) contents were similar, and medium chain FA (C10:0, C12:0 and C14:0) were higher in donkey milk. The mare's milk had the highest content of C18:3n3, which influenced the \sum n3 (C18:3n3, C20:5n3 and C22:6n3), this group with the highest content in mare's milk, 12 times higher than in cow's milk and 8 times that in donkey's milk. \sum n6 (C18:2 n6 and C20:4 n6) were higher in donkey milk (17.75%), followed by mare's milk (12.64%), and 15 times lower in cow's milk (2.55%), when compared to donkey milk. When compared to cow's milk, equid milk has higher levels of n3 and n6; therefore, it has the best FA profile for human consumption. Concluded that the milk of mares and donkeys has a better FA profile for the promotion of human health and can be methylated for the three methods studied without prejudice in the identification.

Key words: chromatography, donkey milk, dairy matrices, human health, omega-3

1. INTRODUÇÃO

Os ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) e ácidos linoléicos conjugados (CLA) do leite são importantes em pequisas devido ao seu papel potencial na promoção da saúde humana (ZÁRATE et al., 2017). Um dos pontos a se considerar na composição do leite é a qualidade nutritiva de sua gordura, a qual é determinada pelo perfil de AG (ácidos graxos) (LARSEN et al., 2013).

O leite de ruminantes principalmente o de vacas, é o mais estudado; tanto sua composição, quanto o perfil de AG. Porém, o leite de outras espécies, como os equídeos, vem ganhando espaço na literatura científica. O leite dos equídeos apresenta características de interesse na promoção da saúde humana, como baixo teor de caseína e elevada concentração de AGPI (ácidos graxos poliinsaturados), quando comparado ao leite de ruminantes (BARRETO et al., 2019). Os AGPI se classificam em AG ômega 6 (n-6) e ômega 3 (n-3), os quais são comprovadamente benéficos para a saúde humana. (LIN et al., 1993).

O leite de éguas e o de jumentas apresentam similaridades em composição de AG e palatabilidade, podem ser utilizados como alternativa ao leite humano na alimentação de crianças com intolerância à proteína do leite de vaca ou alergias alimentares múltiplas (MANSUETO et al., 2013). Estudos do perfil de AG no leite de não ruminantes são escassos quando comparados ao estudo do leite de ruminantes na promoção da saúde.

Uma das formas de identificar os AG do leite é por meio da cromatografia gasosa (CG). Entretanto, as etapas de derivatização (metilação) podem gerar problemas associados com a preparação dos ésteres metílicos de AG (EMAG). Existem diferentes métodos de extração e metilação de AG. No caso da gordura do leite, os métodos de metilação direta “one step methylation”; Sukhija e Palmquist (1988) são bastantes utilizados, porém demandam maior tempo e gasto de insumos químicos quando comparado ao método catalisado por base (GRETI et al., 1993). Os métodos catalisados por ácidos são capazes de metilar tanto AG livres quanto os esterificados, mas necessitam de incubação de 1 a 3 h a 80-100 °C (GRETI et al., 1993).

Nos métodos com catalisador alcalino, a metilação é mais rápida (5-20 minutos) e não parece causar isomerização do CLA, mas sua principal desvantagem é que não metila os AG livres (Kramer et al., 1997). Devido à sua simplicidade, maior rendimento e não isomerização dos CLA, o método com catálise alcalina parece ser a melhor escolha, desde que possa produzir resultados comparáveis ao método catalisado por ácido.

A precisão quali-quantitativa de um método depende, dentre outros fatores, da matriz orgânica da amostra, da polaridade dos solventes e dos lipídios que contém os AG de interesse. A quase totalidade dos métodos utilizam agentes catalizadores solubilizados em solventes apolares; embora, de acordo com O'Fallon et al. (2007), a água pode ser utilizada como solvente dos reagentes.

No presente estudo foram avaliadas as seguintes hipóteses: i) existe diferenças no perfil de AG do leite entre os métodos de metilação; ii) o teor de AG do leite de jumenta é menor no método que utiliza a catálise básica; iii) a reprodutibilidade quali-quantitativa dos AG essenciais é melhor para o leite de equídeos.

O objetivo do estudo foi comparar métodos de avaliação do perfil de ácidos graxos (AG) de leite de equídeos e ruminantes e identificar a metodologia mais adequada para os leites de éguas e jumentas. Ainda, determinar as principais diferenças do perfil de AG entre os leites de equídeos e ruminantes voltados para o consumo humano.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostras

Foram utilizadas amostras de leite liofilizado de quatro diferentes espécies: bovina, caprina, equina e asinina. O leite equino foi coletado de animais com dieta exclusiva de pasto, fornecido pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN-RN). O leite asinino foi coletado de jumentas consumindo ração comercial e feno de *Coast-cross* (50:50) da Fazenda Experimental da Universidade Federal do Agreste de Pernambuco (UFAPE-PE). O leite bovino e caprino foram adquiridos no comércio de Salvador-BA.

Os solventes e reagentes químicos utilizados para a preparação dos ésteres metílicos de ácidos graxos: hexano (99%), metanol (99,8%), metóxido de sódio e cloreto de acetila (98%) foram adquiridos da empresa SIGMA-ALDRICH®; hidróxido de potássio (98%), ácido sulfúrico (37%), ácido clorídrico (37%) e carbonato de potássio (99%) foram obtidos da empresa NEON® comercial.

2.2 Determinação de ácidos graxos

Foi realizada a determinação do perfil de AG de matrizes lácteas de jumenta, égua, cabra e vaca, em um delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 3x4 (3 métodos x 4 matrizes lácteas). Foram utilizadas três métodos para a determinação da composição de AG das amostras de leite das diferentes espécies. 1) Kr: catálise ácida e básica segundo Kramer et al. (1997); 2) Of: catálise ácida e básica segundo O'Fallon et al. (2007); 3) CB: catálise básica segundo Liu et al. (2020). Os catalisadores foram dissolvidos em metanolo para o método Kr e em água para o método Of.

Para todos os métodos, aproximadamente 1 grama das amostras foram acondicionadas em tubos de vidro (16 x 125 mm) com tampa de rosca. Para a metilação pelo método Kr, foram adicionados 1 ml de hexano contendo padrão interno (C19:0 – 1mg/ml) e 2 ml de metóxido de sódio (0,5M) em metanol nos tubos contendo as amostras de leite, os quais foram posteriormente tampados e agitados em vortex por 30 s. Para a reação de metilação, os tubos foram colocados em banho-maria a 50°C por 10 min. Na sequência, os tubos foram resfriados até a temperatura ambiente, em seguida adicionados 3 ml de cloreto de acetila (10%) em metanol e agitados por 30 s. Após a agitação, os tubos foram colocados em banho maria à 80°C por 10 min. Os tubos foram resfriados em temperatura ambiente, 1 ml de hexano e 10 ml de K₂CO₃ a 6% foram adicionado e depois as amostras foram centrifugados por 5 min a 3500 rpm e prontamente transferidos os

sobrenadantes para tubos de 15 ml, contendo aproximadamente 1 g de Na₂SO₄ seco. Após a transferência, os tubos foram centrifugados à 3500 rpm por 5 min, o conteúdo dos tubos transferido para vials e acondicionados a -20° C até a análise.

Para o tratamento Of, foram adicionados 1 ml de hexano contendo padrão interno (C19:0 – 1mg/ml) e 5,3 ml de metanol às amostras de leite contidas em tubos de ensaio, posteriormente agitados em vortex por 30s. Após a agitação, foram adicionados 0,7 ml de KOH (0,6 M) em água, e agitados por mais 30s. Para iniciar a reação de metilação, os tubos foram colocados em banho-maria à 55°C durante 1 hora e 30 min com agitação manual de 5s a cada 20 min. Após o resfriamento a temperatura ambiente, foram adicionados 0,58 ml de H₂SO₄ em água, e levados para agitação em vortex por 30s. Novamente os tubos foram levados ao banho-maria à 55 °C por 1 hora e 30 min com 5s de agitação manual a cada 20 min. Após este tempo, os tubos foram resfriados a temperatura ambiente, posteriormente adicionados 3 ml de hexano e agitados no vortex por 30s. Na sequência, os tubos foram centrifugados por 5 min a 3500 rpm e os sobrenadantes foram transferidos para tubos de 15 ml, contendo aproximadamente 1 g de Na₂SO₄ seco; os tubos foram então centrifugados à 3500 rpm por 5 min e o conteúdo transferido para vials e acondicionados a -20 ° C até análise.

Para o método CB, às amostras de leite foram adicionadas 2 ml de hexano; os tubos foram tampados e agitados em vortex por 30s. Em seguida, 2,5 mL de KOH (0,2 M) em metanol foram adicionados e os tubos agitados por 30s. Para a reação de metilação, os tubos foram incubados em banho-maria à 50°C por 30 min, com 5s de agitação manual a cada 5 min. Em seguida, foram resfriados a temperatura ambiente, adicionados 1 mL de HCl (1 M) em metanol, agitados por 10s e adicionados 1 ml de hexano. Os tubos foram novamente agitados por 30s e posteriormente centrifugados por 5 min a 3500 rpm. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram prontamente transferidos para tubos de 15 ml, contendo aproximadamente 1 g de Na₂SO₄. Os tubos foram centrifugados à 3500 rpm por 5 min e os conteúdos transferidos e acondicionados a -20°C até análise.

2.3 Análise de ácidos graxos por cromatografia gasosa

A composição dos EMAG foi determinada por CG em coluna capilar SPTM – 2560 (100m x 0,25mm x 0,20µm) instalada em cromatógrafo (Thermo Scientific, Focus GC, Milão, Itália). A temperatura inicial do forno foi de 140°C, aumentada até 220°C a uma taxa de 1°C/min e então mantida por 25 minutos. O hidrogênio foi utilizado como gás de

arraste a um fluxo de 1,5mL/min. A temperatura do injetor mantida em 250°C e do detector em 280°C. A taxa de Split foi de 30:1. Com detector de ionização de chamas. Os AG foram identificados comparando tempos de retenção com padrões de referência de cromatográficos (Padrão EMAG 189-19 SIGMA ALDRICH). A quantificação foi feita utilizando o Excel® (2016).

2.4 Índices de aterogenicidade e de trombogenicidade

Os índices de aterogenicidade e de trombogenicidade foram calculados para as três matrizes lácteas utilizando-se as equações descritas por Ulbricht e Southgate (1991).

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

$$IT = (C14 : 0 + C16 : 0 + C18 : 0) / [0.5 \times \Sigma AGMS + 0.5 \times \Sigma (n - 6) + 3 \times \Sigma (n - 3) + \Sigma (n - 3) / \Sigma (n - 6)]$$

2.5 Avaliação da precisão e acurácia

A precisão dos métodos foi determinada por meio da repetibilidade que representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra e pela precisão intermediária que indica o efeito das variações dentro do laboratório devido a diferentes dias (MAPA, 2021). Ambos os valores foram expressos com o desvio padrão relativo (DPR%). O DPR intra-dia foi calculado a partir de quadruplicatas em um único dia e o DPR inter-dia foi calculado utilizando os resultados das análises (quadruplicata) de 3 dias consecutivos.

2.6 Análise estatística

Os dados foram analisados em um delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 3x4 (3 métodos x 4 matrizes lácteas). As análises foram realizadas em quadruplicata, e repetidas por 3 dias consecutivos. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e, quando significativos pelo teste F, foram comparados pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Na avaliação de precisão dos métodos foram calculados os valores intra-dia e inter-dia de cada matriz láctea para cada método, e calculados os desvios padrões relativos médios que foram avaliados de forma descritiva. Para todas as análises foi utilizado o software R (4.1.0, 2021).

3. RESULTADOS

Para todos os métodos de metilação dos ésteres metílicos (KR, OF e CB) foram observadas diferenças entre os teores de AG para os leites das diferentes espécies avaliadas (égua, jumenta, cabra e vaca). Foram observadas diferenças ($P < 0,05$) entre os métodos para os AGCC e AGCM. Os teores dos AGCL, somatório de n3 e n6, AGS e AGI foram semelhantes entre os métodos (Tabela 1).

Os valores dos AGCC (C4:0, C6:0 e C8:0) e AGCM (C10:0, C12:0 e C14:0) diferiram entre os leites de jumenta, égua e vaca. (Figura 1).

Na fração dos AGPI n3, o leite de égua foi o que mais se destacou, sendo seu teor 3 vezes mais elevado que no leite de jumenta e 29 vezes mais elevado que no leite de vaca. Já na fração n6, no leite de jumenta foi observado teor superior ao leite de égua e 7 vezes mais elevado que o teor presente no leite de vaca (Figura 2).

Os teores médios para os índices de IA e IT, foram inferiores a dois para os leites de égua e jumenta, valor que indica melhor perfil de ácidos graxos antitrombogênicos.

Na Tabela 2 os dados da correlação entre os AG das matrizes lácteas estudadas (égua, jumenta e vaca), todas as correlações avaliadas foram significativas. Nas tabelas 3 e 4 estão descritos os DPR médios da repetibilidade (intra-dia) e reprodutibilidade (inter-dia) das amostras dos leites de égua, jumenta, vaca e cabra que foram utilizados para avaliar a precisão dos três métodos de metilação de ésteres metílicos de AG. Demonstrando que os dados encontrados em sua maioria estão de acordo com o padronizado pelo MAPA (<10%).

Tabela 1- Perfil de ácidos graxos de leite de égua, jumenta, cabra e vaca determinados com diferentes métodos de metilação dos ésteres metílicos.

Ácidos Graxos (g 100 ^g -1 EMAG)*	KR				OF				CB				EMP	Pvalor espécie	Pvalor metilação	Pvalor interação
	Égua	Jumenta	Cabra	Vaca	Égua	Jumenta	Cabra	Vaca	Égua	Jumenta	Cabra	Vaca				
C16:0	21,50	19,04	26,40	30,27	20,97	19,10	26,73	30,76	22,96	20,34	26,64	30,74	1,30	<0,001	0,521	<0,001
C18:0	2,05	1,98	9,89	10,09	2,58	2,59	9,42	9,86	2,35	2,05	9,96	10,26	1,16	<0,001	0,061	0,012
C18:1 9c	18,32	19,99	21,39	20,93	18,534	19,81	21,29	20,72	18,26	19,84	21,58	20,82	0,36	<0,001	0,663	0,881
C18:2 n6	12,34	17,57	3,16	2,39	12,22	16,54	2,92	2,43	11,55	17,91	2,88	2,24	1,90	<0,001	0,361	<0,001
C18:3 n3	12,71	3,92	0,331	0,415	11,79	3,68	0,291	0,374	12,51	3,87	0,284	0,361	1,02	<0,001	0,986	0,400
AGCC	2,37	5,28	6,20	4,87	1,85	4,30	4,41	3,35	1,69	4,22	5,69	4,93	0,41	<0,001	<0,001	<0,001
AGCM	15,77	21,42	20,89	16,1	15,26	21,53	22,21	16,86	14,98	19,87	20,94	16,48	0,82	<0,001	0,029	0,083
AGCL	59,29	52,82	46,21	48,28	61,01	53,78	46,36	48,67	59,52	54,44	46,45	47,47	1,62	<0,001	0,934	0,101
∑n3	12,76	3,98	0,350	0,44	11,89	3,86	0,48	0,500	13,17	5,14	0,32	0,410	1,51	<0,001	0,899	0,021
∑n6	12,55	17,69	3,35	2,56	12,68	16,73	3,14	2,63	11,69	18,03	3,09	2,41	1,90	<0,001	0,430	<0,001
AGS	41,69	47,72	63,39	61,43	40,66	47,52	62,77	60,83	41,99	46,48	63,23	62,41	2,80	<0,001	0,523	0,039
AGI	58,30	52,27	36,60	38,57	59,34	52,47	37,21	39,17	58,00	53,52	36,76	37,59	2,80	<0,001	0,523	0,039

*EMAG: Ésteres metílicos dos ácidos graxos. KR: catálise ácida e básica segundo Kramer et al. (1997); OF: catálise ácida e básica segundo O'Fallon et al. (2007); CB: catálise básica segundo Liu et al. (2020); EMP: Erro médio padrão; AGCC: Ácidos graxos de cadeia curta (C4:0, C6:0, C8:0); AGCM: Ácidos graxos de cadeia média (C10:0, C12:0, C14:0, C16:0); AGCL: Ácidos graxos de cadeia longa (C18:0, C18:1 n-9, C18:1 n-11, C18:2 n-6, C18:3 n-3, C20:4 n-6, C20:5 n-3, C22:6 n-3); ∑n3: (C18:3 n-3 + C20:5 n-3 + C22:6 n-3); ∑n6: (C18:2 n-6 + C20:4 n-6); AGS: Ácidos graxos saturados (C4:0, C6:0, C8:0; C10:0, C12:0, C14:0, C16:0; C18:0); AGI: Ácidos graxos insaturados (C18:1 n-9, C18:1 n-11, C18:2 n-6, C18:3 n-3, C20:4 n-6, C20:5 n-3, C22:6 n-3).

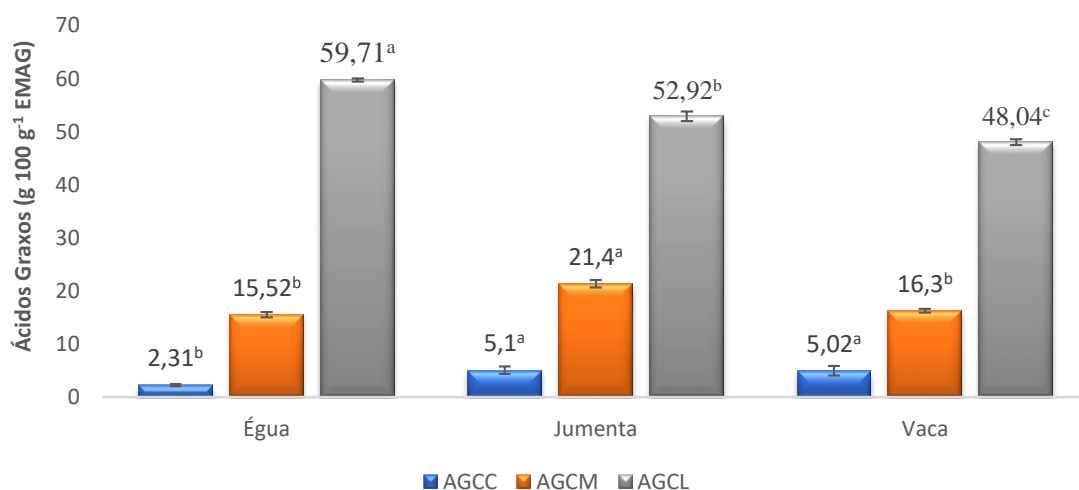


Figura 1- Teores médios dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC; C4:0, C6:0 e C8:0), cadeia média (AGCM; C10:0, C12:0 e C14:0) e cadeia longa (AGCL; C16:0, C18:0, C18:1 n-9, C18:1 n-11, C18:2 n-6, C18:3 n-3, C20:4 n-6, C20:5 n-3 e C22:6 n-3) de leite de égua, jumenta e vaca; determinados segundo Kramer et al. (1997). Os teores médios dos leites das diferentes espécies indicados por letras diferentes nas colunas diferem significativamente entre si (Tukey, $P < 0,05$).

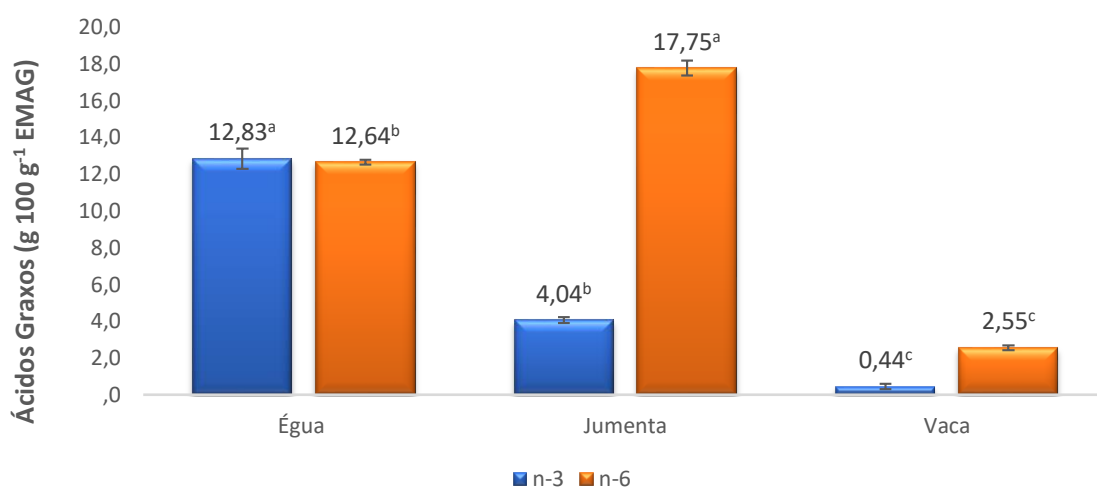


Figura 2- Teores médios da soma dos ácidos graxos $\sum n3$: (C18:3 n-3 + C20:5 n-3 + C22:6 n-3); $\sum n6$: (C18:2 n-6 + C20:4 n-6) de leite de égua, jumenta e vaca, determinados segundo Kramer et al. (1997). Os teores médios dos leites das diferentes espécies indicados com letras diferentes nas colunas diferem significativamente entre si (Tukey, $P < 0,05$).

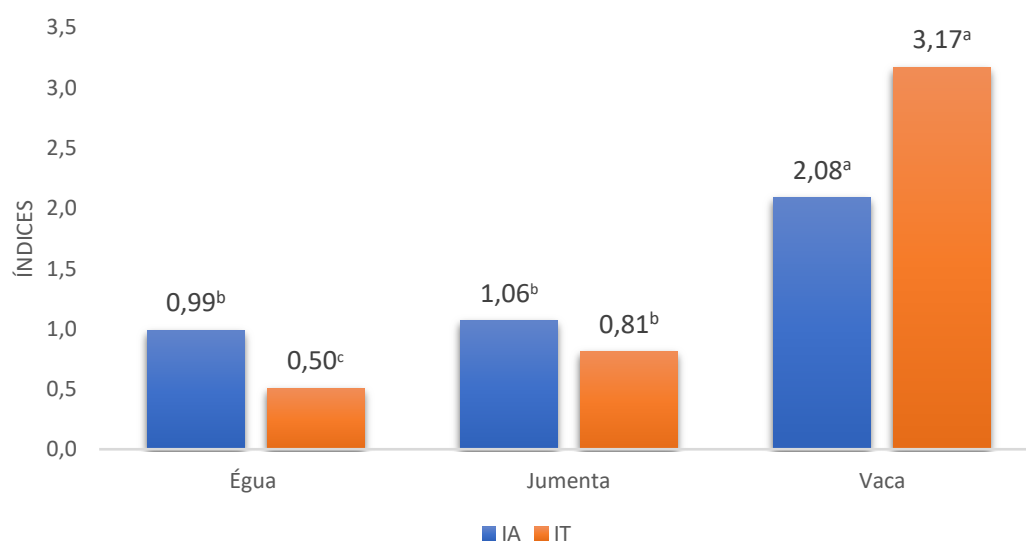


Figura 3- Índices de aterogenicidade (IA) e de trombogenicidade (IT) de leites de vaca, égua e jumenta. Os teores médios dos leites das diferentes espécies indicados com letras diferentes entre as colunas diferem significativamente entre si (Tukey, $P < 0,05$).

Tabela 2 - Correlação entre ácidos graxos de leite de égua, jumenta e vaca.

Ácidos Graxos												
	C16	C18	C18:1 n9	C18:2 n6	C18:3 n3	AGCC	AGCM	AGCL	∑n3	∑n6	AGS	AGI
C16:0	1,00											
C18:0	0,83**	1,00										
C18:1 n9	0,76**	0,51**	1,00									
C18:2 n6	-0,58**	-0,87**	-0,06**	1,00								
C18:3 n3	-0,38**	-0,73**	-0,24*	0,58**	1,00							
AGCC	0,44**	0,57**	0,59**	-0,23	-0,70**	1,00						
AGCM	0,33**	0,23*	0,74**	0,19*	-0,30**	0,70**	1,00					
AGCL	-0,83**	-0,69**	-0,91**	0,28**	0,48**	-0,76**	-0,79**	1,00				
∑n3	-0,39**	-0,75**	-0,24*	0,60**	0,99**	-0,70**	-0,29**	0,48**	1,00			
∑n6	-0,58**	-0,87**	-0,06**	0,99**	0,58**	-0,24*	0,19*	0,28**	0,61**	1,00		
AGS	0,90**	0,86**	0,84**	-0,52**	-0,61**	0,75**	0,64**	-0,96**	-0,61**	-0,52**	1,00	
AGI	-0,90**	-0,86**	-0,84**	0,52**	0,60**	-0,74**	-0,64**	0,96**	0,61**	0,51**	-1,00	1,00

*P <0,05%; **P <0,001. AGCC: Ácidos graxos de cadeia curta (C4:0, C6:0, C8:0); AGCM: Ácidos graxos de cadeia média (C10:0, C12:0, C14:0, C16:0); AGCL: Ácidos graxos de cadeia longa (C18:0, C18:1 n-9, C18:1 n-11, C18:2 n-6, C18:3 n-3, C20:4 n-6, C20:5 n-3, C22:6 n-3); ∑n3: (C18:3 n-3 + C20:5 n-3 + C22:6 n-3); ∑n6: (C18:2 n-6 + C20:4 n-6); AGS: Ácidos graxos saturados (C4:0, C6:0, C8:0; C10:0, C12:0, C14:0, C16:0; C18:0); AGI: Ácidos graxos insaturados (C18:1 n-9, C18:1 n-11, C18:2 n-6, C18:3 n-3, C20:4 n-6, C20:5 n-3, C22:6 n-3). Determinados segundo Kramer et al. (1997).

Tabela 3 – Variação intra-dia (DPR%) do perfil de ácidos graxos de matrizes lácteas de monogástricos e ruminantes avaliadas por diferentes métodos de metilação dos ésteres metílicos.

Ácidos Graxos (g 100 g ⁻¹ EMAG)*	Kr				OF				CB			
	Égua	Jumenta	Cabra	Vaca	Égua	Jumenta	Cabra	Vaca	Égua	Jumenta	Cabra	Vaca
C16	2,30	2,90	0,47	1,67	4,16	3,10	0,80	0,50	3,47	2,44	0,42	0,48
C18	16,75	10,20	1,02	2,46	34,10	21,03	1,75	1,98	32,65	22,47	1,43	2,33
C18:1 9c	4,70	2,39	0,74	2,28	9,20	4,16	1,32	2,37	6,05	1,93	1,02	1,37
C18:2 n6	3,14	3,04	5,52	5,58	4,24	4,30	4,35	7,95	3,58	2,70	3,40	4,91
C18:3 n3	5,50	3,97	26,37	39,95	11,36	7,70	33,59	39,27	5,85	3,77	32,09	37,54
AGCC	11,16	16,50	4,45	24,24	7,35	8,64	7,37	14,55	9,04	4,53	2,59	6,61
AGCM	5,30	3,03	0,78	1,97	5,61	5,67	2,96	3,90	5,26	2,41	11,29	1,86
AGCL	2,37	1,92	0,61	1,69	2,19	2,32	1,86	2,48	1,65	1,40	5,11	1,30
∑n3	5,55	5,05	24,52	37,07	11,43	10,71	20,31	35,22	7,81	8,74	32,20	30,27
∑n6	2,84	3,01	5,13	5,45	6,11	3,83	4,35	9,00	3,46	2,66	3,33	4,75
AGS	3,71	1,82	0,38	1,05	2,43	1,74	1,25	1,70	1,51	1,84	3,75	0,71
AGI	2,65	1,66	0,67	1,67	1,66	1,57	2,12	2,64	1,10	1,60	6,45	1,18

*EMAG: Ésteres metílicos dos ácidos graxos ; KR: catálise ácida e básica segundo Kramer et al. (1997); OF: catálise ácida e básica segundo O’Fallon et al. (2007); CB: catálise básica segundo Liu et al. (2020). AGCC: Ácidos graxos de cadeia curta (C4:0, C6:0, C8:0); AGCM: Ácidos graxos de cadeia média (C10:0, C12:0, C 14:0, C16:0); AGCL: Ácidos graxos de cadeia longa (C18:0, C18:1 n-9, C18:1 n-11, C18:2 n-6, C18:3 n-3, C20:4 n-6, C20:5 n-3, C22:6 n-3); ∑n3: (C18:3 n-3 + C20:5 n-3 + C22:6 n-3); ∑n6: (C18:2 n-6 + C20:4 n-6); AGS: Ácidos graxos saturados (C4:0, C6:0, C8:0; C10:0, C12:0, C 14:0, C16:0; C18:0); AGI: Ácidos graxos insaturados (C18:1 n-9, C18:1 n-11, C18:2 n-6, C18:3 n-3, C20:4 n-6, C20:5 n-3, C22:6 n-3).

Tabela 4 – Variação inter-dia (DPR%) do perfil de ácidos graxos de matrizes lácteas de monogástricos e ruminantes avaliadas por diferentes métodos de metilação dos ésteres metílicos.

Ácidos Graxos (g 100 g ⁻¹ EMAG)*	KR				OF				CB			
	Égua	Jumenta	Cabra	Vaca	Égua	Jumenta	Cabra	Vaca	Égua	Jumenta	Cabra	Vaca
C16	2,16	2,36	0,01	1,50	3,12	1,62	0,55	0,21	2,54	0,39	0,32	0,26
C18	12,76	5,71	0,32	2,09	17,15	10,03	1,15	1,74	23,35	4,98	1,18	0,64
C18:1 9c	2,15	1,94	0,46	1,75	3,43	1,47	0,83	1,84	4,49	0,44	0,88	0,43
C18:2 n6	2,02	0,46	2,93	4,63	2,86	3,50	3,16	4,13	3,19	0,87	1,79	3,73
C18:3 n3	4,14	1,70	21,12	3,72	7,55	7,69	19,72	30,78	5,48	2,69	15,40	30,48
AGCC	6,49	4,00	2,14	18,06	8,07	5,44	6,39	14,79	6,34	4,21	1,97	5,10
AGCM	2,28	2,47	0,62	1,61	4,67	4,52	2,97	3,82	3,73	2,39	5,96	0,63
AGCL	1,19	0,89	0,41	1,31	1,52	1,84	1,75	2,37	1,05	1,31	2,62	0,65
∑n3	4,17	1,01	19,73	3,73	7,30	10,63	15,61	12,45	7,55	2,76	22,95	27,02
∑n6	1,78	0,45	2,69	4,73	3,60	3,41	3,38	5,59	3,14	0,79	1,91	3,46
AGS	2,14	0,66	0,25	0,78	1,83	1,01	1,12	1,58	0,97	1,44	1,86	0,38
AGI	1,53	0,60	0,43	1,23	1,25	0,91	1,89	2,45	0,70	1,25	3,20	0,63

*EMAG: Ésteres metílicos dos ácidos graxos ; Kramer: catálise ácida e básica segundo Kramer et al. (1997); O’Fallon: catálise ácida e básica segundo O’Fallon et al. (2007); CB: catálise básica segundo Liu et al. (2020). AGCC: Ácidos graxos de cadeia curta (C4:0, C6:0, C8:0); AGCM: Ácidos graxos de cadeia média (C10:0, C12:0, C14:0, C16:0); AGCL: Ácidos graxos de cadeia longa (C18:0, C18:1 n-9, C18:1 n-11, C18:2 n-6, C18:3 n-3, C20:4 n-6, C20:5 n-3, C22:6 n-3); ∑n3: (C18:3 n-3 + C20:5 n-3 + C22:6 n-3); ∑n6: (C18:2 n-6 + C20:4 n-6); AGS: Ácidos graxos saturados (C4:0, C6:0, C8:0; C10:0, C12:0, C14:0, C16:0; C18:0); AGI: Ácidos graxos insaturados (C18:1 n-9, C18:1 n-11, C18:2 n-6, C18:3 n-3, C20:4 n-6, C20:5 n-3, C22:6 n-3).

4. DISCUSSÃO

Na literatura científica existem diversos métodos para preparação dos EMAG do leite para análise em CG (CHRISTIE et al., 1982; SUKHIJA e PALMQUIST, 1988). Nesses protocolos são utilizados catalisadores ácidos (HCl e BF₃) ou catalisadores alcalinos (NaOH, NaOCH₃ e KOH), cada método utiliza diferentes concentrações dos catalisadores, temperatura e duração da incubação. Não existem estudos que comparem as padronizações desta etapa crítica na análise de AG para os leites equídeos, e como cada método pode interferir nos resultados do perfil de AG das matrizes lácteas destas espécies.

O presente estudo indicou que não há diferença entre os métodos de metilação dos lipídeos das matrizes lácteas avaliadas, quando se trata dos principais AG (C16:0, C18:0, C18:1 n-9, C18:2 n-6 e C18:3 n-3). Entretanto, na literatura, alguns autores citam que a adição de água no processo de metilação pode ser prejudicial para essa etapa de metilação, pois a depender da concentração de água nas reações o sentido da reação pode ser alterado, com tendência para o início da reação (KRAMER et al., 1997). Todavia, na presente pesquisa o método que utiliza água no processo para a metilação dos AG dos leites de égua, jumenta, cabra e vaca, não interferiu na identificação do perfil de AG, quando comparado aos demais métodos. Embora certos AG tenham solubilidade limitada em água e em metanol, a hidrólise de EMAG ainda ocorre na interface água-metanol e pode, de fato, ser contabilizada pelo padrão interno (O'FALLON et al., 2007).

A metilação de base alcalina é incapaz de converter AG livre em EMAG (CHRISTIE, 1982), podendo levar a uma subestimação na quantificação de AG em matrizes que contenham AG não esterificados. No leite de equídeos contrariamente ao leite humano e de vaca, os triglicérides representam aproximadamente 80% dos lipídios totais, os AG livres cerca de 10% e os fosfolipídios e esteróis aproximadamente 5% dos lipídios totais (MALACARNE et al., 2002).

O estudo desenvolvido por Liu et al. (2018) demonstrou que, embora os ácidos graxos livres (AGL) estejam presentes em produtos pasteurizados (ex.: leite comercial), sua concentração é muito baixa (< 1% do AG total). Portanto, a porção de AGL não causa uma redução significativa na estimativa de AG totais quantificados. No presente estudo, os resultados de EMAG obtidos pelos dois métodos de metilação indicam que o método CB, o qual utiliza a catálise alcalina, não subestimou o teor de AG do leite para os principais AG quando comparado aos demais métodos (Figura 1).

Este resultado indica que o método CB (LIU et al., 2020) não subestimou a

identificação dos grupos avaliados (Tabela 1), tendo resultados semelhantes aos métodos de OF (O'FALLON et al., 2007) e KR (KRAMER et al., 1997). Ainda, o método CB tem menor tempo de reação.

Quando se trata dos AGCC e AGCM, a solubilidade desses conjuntos de AG é um fator importante na escolha de qual método deve ser utilizado para a metilação de uma matriz láctea, pois a depender dos reagentes pode ocorrer diferença na extração e conseqüentemente na quantificação, além da metodologia utilizada. Deste modo quando se utiliza água na solução a força da reação é modificada e conseqüentemente a metilação dos AG é prejudicada quando se trata dos AGCC como um todo (O'FALLON et al., 2007). Sendo assim, para avaliação do grupo de AGCC o método OF é menos preciso (Tabela 1; Tabela suplementar 1), quando comparado ao KR e LIU.

Não foram observadas diferenças nos perfis de AG das matrizes lácteas avaliadas com os métodos de metilação utilizados, deste modo os teores de AG do leite de equídeos, foram semelhantes em todas as metodologias aplicadas, mesmo na CB. Entretanto, na avaliação dos Σ AGCC e Σ AGCM foram observadas diferenças entre as metodologias de metilação utilizadas (Tabela 1, Tabela suplementar 1).

Quando comparamos espécies quanto ao perfil de AG na promoção da saúde humana, a composição do leite de equídeos difere do leite dos bovinos, principal espécie leiteira no mundo. As diferenças no perfil de AG no leite de égua e de jumenta (não ruminantes) em comparação ao de ruminantes estão associadas à diferenças na biossíntese de AG e nos processos do trato digestório das espécies (DOREAU e BOULOT, 1989).

Dentre os leites das espécies estudadas foram observadas diferenças significativas nos teores dos AGS (C4:0, C6:0, C8:0, C10:0, C11:0, C12:0, C14:0, C16:0 e C18:0). Observamos no leite de vaca teores médios superiores (61,64%), seguido pelo leite de jumenta (47,63%) e de égua (37,37%). Nos leites de égua e jumenta observamos teores mais elevados de AGI (C16:1, C18:1 n-9, C18:1 n-11, C18:2 n-6, C18:3 n-3, C20:4 n-6, C20:5 n-3 e C22:6 n-3), diferindo significativamente do leite de vaca (Tabela 1), principalmente devido ao seu metabolismo e particularidades digestórias.

Quando comparados os AGCL (>C16:0) os leites diferiram entre si, sendo o leite de égua com maior teor médio, seguido pelos leites de jumenta e pelo leite de vaca. Entretanto, quando avaliado individualmente, o ácido esteárico (C18:0) no leite de vaca teve maior teor médio, aproximadamente 5 vezes superior aos teores observados no leite dos equídeos (Tabela 1). No somatório dos AGCC, o leite de égua apresentou média significativamente menor quando comparada aos leites de vaca e jumenta, que por sua

vez foram semelhantes (Figura 1).

Estudos comparando o leite de cabra, vaca e jumenta relatam que o leite com menor teor de gordura é o de jumenta (DI RENZO et al., 2013), o qual possui teor semelhante ao de égua ($\pm 1,4\%$) (SALIMEI et al., 2004). Os triglicerídeos do leite de égua representam aproximadamente 80% dos lipídios totais, os AG livres cerca de 10% e os fosfolipídios e esteróis aproximadamente 5% (MALACARNE et al., 2002). A gordura do leite asinino consiste em 80% a 85% de triglicerídeos; 9,5% de AG livres e 5% a 10% de fosfolipídios (CLAYES et al., 2014),

Segundo Palmquist et al. (1993), a gordura do leite contém AG derivados da síntese de novo da glândula mamária (C4:0 a C14:0 mais uma porção de C16:0) e dos AG pré-formados na saída da glândula mamária. A gordura do leite dos equídeos contém maior porcentual de AGPI, menor de AGS e AGMI, quando comparada a gordura do leite de ruminantes (CLAYES et al., 2014). Esses AG são capazes de ajudar no controle da lipídemia e conter reações inflamatórias, entre outros benefícios. Dessa forma, podem ser coadjuvantes no tratamento de doenças cardiovasculares.

O percentual de AGI no leite de éguas é superior ao leite de vaca. Isto se deve pelo alto teor de AG poli-insaturados (SOLAROLI et al., 1993). Essa diferença também foi observada no presente estudo, no qual o leite de égua apresentou maior teor médio de AGI quando comparado ao leite de vaca e de jumenta.

No atual estudo, os AGS foram os AG com teores mais elevados no leite de vaca (61,6%), corroborando com resultados de outros autores que relataram teores de AGS de 70,8% no leite de vaca (GASTALDI et al., 2010; CHIOALO et al., 2006). Pikul e Wójtowski (2008) relataram que tal variação dos AGS nos leites dos mamíferos está relacionada a dieta dos animais. Entretanto, independente da dieta, é uma característica do leite de ruminantes, quando comparados com espécies não ruminantes, teores mais elevados de AGS.

As amostras de leite utilizadas no presente estudo foram coletadas de animais que receberam dietas distintas, não controladas; as éguas foram alimentadas exclusivamente com pasto verde, diferentemente das jumentas que foram alimentadas com dietas a base de feno e concentrado, já o leite de vaca foi adquirido em mercado local.

Na produção de leite de equídeos, as principais fontes de variação são provenientes da dieta, a qual desempenha um papel relevante na qualidade e quantidade do leite, pois nas espécies não ruminantes a absorção de nutrientes antecede a fermentação ceco-cólica (DOREAU et al., 2002). Deste modo, a fração n3 é influenciada pela dieta,

principalmente quando as éguas ou jumentas estão consumindo forragem verde. Com isso o leite das éguas que foram alimentadas com forragens verdes, apresentou maior teor de n3, em seguida o leite de jumenta e com menor teor o leite de vaca (Figura 2). Coppa et al. (2015) demonstraram em estudo com jumentas, que forragens verdes são particularmente ricas em AG C18:3 n3. Uma absorção maior de C18: 3 n3 acontece em equídeos, quando comparados aos ruminantes, isso se dá por conta do processo de biohidrogenação nas espécies não ruminantes ocorrer na porção pós-ileal (HOLANDA et al., 2011) onde não há absorção destas moléculas; deste modo, o AG C18:0 n3 estará presente em maior concentração no leite de equídeos alimentados com forragens verdes do que em ruminantes.

Tal fato pode explicar o elevado teor de n3 do leite de égua avaliado no presente estudo, pois estas matrizes foram alimentadas exclusivamente com pastagem verde durante o período de lactação quando foram coletadas as amostras de leite. A partir desses resultados podemos considerar que a manipulação de AG nas dietas de éguas e jumentas pode influenciar no perfil de AG dos leites dessas espécies de equídeos.

O leite asinino, quando comparado ao de ruminantes, apresenta maior teor de AGI, importante na prevenção de doenças inflamatórias cardiovasculares (COSENTINO et al., 2015). Como indicadores da qualidade da gordura do leite os índices de aterogenicidade (IA) e trombogenicidade (IT) estimam o potencial de estímulo à agregação plaquetária. Quanto mais baixos do que 2 (valor de referência) forem os valores de IA e IT maior será a quantidade de AG anti-aterogênicos presente no alimento, conseqüentemente, maior será o potencial de prevenção ao aparecimento de doenças coronarianas (TURAN et al., 2007).

O cálculo destes índices foi proposto com o objetivo de considerar o efeito biológico dos AG, uma vez que nem todos os AGS possuem efeito trombótico, apenas o mirístico (C14:0), palmítico (C16:0) e o esteárico (C18:0), e os graus de aterogenicidade dos ácidos láurico (C12:0), mirístico e palmítico são distintos. Dessa forma, quanto menores forem os IA e IT, melhor a qualidade nutricional do alimento. Nos cálculos dos IA e IT dos leites avaliados no presente estudo, observamos que os leites de éguas e jumentas apresentaram menores índices em comparação ao leite de vaca, o que indica benefícios da sua utilização em dietas para humanos.

Quando avaliamos a correlação entre os AG das matrizes lácteas estudadas, observamos que o AG C16:0 apresentou correlação positiva com o AG C18:0 (Tabela 2), pois AG de cadeia longa, juntamente com grande parte do C16:0, chegam até a glândula

mamária pela circulação sanguínea e são provindos da alimentação a qual o animal está submetido (MARTINEZ, 2009). O conjunto dos AGCC apresentou correlação moderada e positiva com os AGs C16:0 e C18:0; entretanto, a correlação foi negativa para os AG C18:2 n6 e C18:3 n3.

O $\sum n3$ apresentou correlação forte e positiva com o AG C18:3 n3 (Tabela 2), pois esse AG está presente no somatório que compõe os conjuntos dos n3 ($\sum n3$: C18:3 n-3 + C20:5 n-3 + C22:6 n-3). O $\sum n6$ apresentou correlação forte e positiva com o AG C18:2 n6, sendo esse AG participante do somatório dos n6 ($\sum n6$: C18:2 n-6 + C20:4 n-6). Contudo, a correlação com o AGS é negativa para ambos os somatórios ($\sum n3$, e $\sum n6$) pois os AG que fazem parte desses grupos apresentam insaturação em sua estrutura química, fato que não ocorre nos AGS.

O conjunto dos AGS apresentou correlação forte e positiva com os ácidos graxos C16:0, C18:0 e C18:1 n9 (Tabela 2). Esse resultado já era esperado visto que são AG que apresentam apenas ligações simples em sua estrutura química (MARTINEZ, 2009). Entretanto, a correlação forte e positiva com o C18:1 n9 não era esperada, porém a partir do AG C18:0 por meio da introdução de uma dupla ligação entre os átomos de carbonos 9 e 10 catalisada pela enzima $\Delta-9$ desnaturase o C18:0 é convertido em C18:1 n9, esta enzima está presente em plantas e animais (MOREIRA et al., 2002), por isso a correlação entre os AGS e o ácido oleico é forte e positiva.

Quanto a etapa de avaliação da precisão e repetibilidade da aplicação das metodologias, foi utilizado o desvio padrão relativo (DPR%) intra-dia e inter-dia. Quanto mais próximo de 0 for o desvio padrão, mais homogêneo são os dados (LUNET et al., 2006). De acordo com o guia de validação e controle de qualidade analítica do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o critério de aceitação de DPR% para repetibilidade é de 10% para amostras com concentração de 100 a 1000 mg/g. Então, os resultados obtidos em sua maioria estão dentro do limite preconizado pelo MAPA (BRASIL, 2011).

Entretanto, nos leites de égua e jumenta, o C18:0 para todos os métodos (KR, OF e CB) houve variação acima de 10% intra-dia. Isso pode ser explicado pelo teor desses AG no leite de equídeos ser baixa. No leite de jumenta, o conjunto de AGCC apresentaram DPR intra-dia maior que 10% (Tabela 3). A baixa precisão ocorreu também nos leites de vaca e cabra, nos quais o C18:3 n3 e o $\sum n3$ apresentaram DPR intra-dia acima dos 10%. Tais resultados indicam que para os AG de menores teores, mais difícil a precisão na aplicação das metodologias.

Na avaliação da variação inter-dia (Tabela 4), os métodos se mostraram precisos para a maioria dos AG, contudo inexato no leite de égua para o AG C18:0, possivelmente devido ao baixo teor no leite. Nas amostras de leites de ruminantes (cabra e vaca), os AG C18:3 n3 e o Σ n3 apresentaram DPR maior que o valor especificado pelo MAPA. No leite de vaca, os AGCC também apresentaram valores que excedem o especificado pelo guia de validação, isso ocorre devido a baixa concentração desses AG nos leites de ruminantes, demonstrando que quanto menor a concentração desse AG na amostra, menor é a sua repetibilidade e reprodutibilidade.

Os valores demonstrados nas tabelas 3 e 4 indicam a adequação de todos os métodos cromatográficos para a metilação dos AG, sugerindo que estes são apropriados para a identificação e quantificação dos principais AG nas diferentes matrizes lácteas estudadas. Não houve prejuízo na reprodutibilidade qualitativa dos AG essenciais para os leites de equídeos e de ruminantes. A avaliação da reprodutibilidade das análises dos leites nas diferentes metodologias de metilação indicou adequação das técnicas para as matrizes lácteas estudadas.

A partir das diferenças observados nos perfis de AG das matrizes lácteas estudadas, os resultados do presente estudo indicam que o leite equídeo apresenta melhor perfil de AG em comparação ao leite de vaca, quando considerado para o consumo humano.

5. CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que o perfil de AG das matrizes lácteas de égua, jumenta, cabra e vaca, pode ser identificado pelos três métodos estudados. A precisão das metodologias é semelhante e estas podem ser aplicadas sem prejuízos para a determinação do perfil de AG dos leites de éguas e jumentas.

Os perfis de AG dos leites de égua e jumenta diferem do leite bovino com maiores teores de AG essenciais sendo indicados para o consumo humano.

6. REFERÊNCIA

APPOLINÁRIO, P.P.; DEROGIS, P.B.M.C.; YAMAGUTI, T.H. et al. Metabolismo, oxidação e implicações biológicas do ácido docosaheptaenoico em doenças neurodegenerativas. **Química Nova**, v.34, n.8, p.1-8, 2011.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry**; v.37, p.911-917, 1959.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica**. Brasília, DF. 2011, 78 p.

CHIOFALO B, DROGOUL C, SALIMEI E, In Nutrition and feeding of the broodmare: Other utilisation of mare's and ass's milk. **Wageningen Academy Publishers: N. Miraglia, W. Martin-Rosset**, v.37, p.133–147, 2006.

CHIOFALO B, POLIDORI M, COSTA R AND SALIMEI E, Fresh forage in dairy assration: effect on milk fatty acid composition and flavours. **Ital J Anim Sci** v.4, p.433–435 2005.

CHIOFALO B, SALIMEI E, CHIOFALO L: Acidi grassi nel latte d'asina: proprietà bio-nutrizionali ed extranutrizionali. **Large Animals Review**. v. 6, p.21–26, 2003.

CHRISTIE, W.W.; **Chromatographic and spectroscopic analysis of lipids: General principles**. v.3 p.25-49. Ed. Oxford: Pergamon Press. 1982.

CLAEYS, W. L., VERRAES, C., CARDOEN, S., DE BLOCK, J., HUYGHEBAERT, A., RAES, 327 K., & HERMAN, L. Consumption of raw or heated milk from different species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits. **Food Control**, v.42, p. 188-201, 2014.

COPPA M, CHASSAING C, FERLAY A, AGABRIEL C, LAURENT C, BORREANI G. Potential of milk fatty acid composition to predict diet composition and authenticate feeding systems and altitude origin of european bulk milk. **Journal Dairy Sci** v.98, p.1539–1551, 2015.

DI RENZO, G. C.; ALTIERI G.; GENOVESE, F. Donkey milk powder production and properties compared to other milk powders. **Dairy Science & Technology**, v. 93, n. 4,

p. 551-564, 2013.

DOREAU M, GAILLARD JM, CHOBERT JM, LÉONIL J, EGITO AS, HARTLÉ T. Composition of mare and donkey milk fatty acids and consequences on milk utilisation. Campobasso, Italy: **In Proceedings of the 4th Congress ‘New findings in equine practice**. p.51–65, 2002.

DOREAU, M.; BOULOT, S. Recent knowledge on mare milk production: a review. **Livestock Production Science**, v.22(3), p.213-235, 1989.

GASTALDI G, BERTINO E, MONTI G, BARO C, FABRIS C, LEZO A, MEDANA C, BAIOCCHI C, MUSSAP M, GALVANO F, CONTI A; Donkey’s milk detailed lipid composition. **Front Biosci**, v. E2, p.537–546. 38, 2010.

GONZALEZ, H.L. et al. Avaliação da qualidade do leite na bacia leiteira de Pelotas, RS. Efeito dos meses do ano. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 6, p. 1531-1543, 2004.

GRESTI, J., BUGAUT, M., MANIONGUI, C., & BEZARD, J. Composition of molecular species of triacylglycerols. **Journal of Dairy Science**, 1993.

HARA, A.; RADIN, N.S. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. **Analytical Biochemistry** v.90, p.420-426, 1978.

HOLANDA, M. A. C.; HOLANDA, M. C. R.; MENDONÇA JÚNIOR, A. F. Suplementação dietética de lipídios na concentração de ácido linoleico conjugado na gordura do leite. **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v.5, n.3, p.221-229, 2011.

KRAMER, J.K., FELLNER, V., DUGAN, M.E., SAUER, F.D., MOSSOBA, M.M., & YURAWECZ, M.P. Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total trans fatty acids. **Lipids**, 1997.

LARSEN, M. K., U. KIDMOSE, T. KRISTENSEN, P. BEAUMONT, AND G. MORTENSEN. Chemical composition and sensory quality of bovine milk as affected by type of forage and proportion of concentrate in the feed ration. **J. Sci. Food Agric**. 2013.

LI, Y. F., ABDUL S. S., ZHENDONG W., DONGLIANG W., HAINING T., Dezhou

donkey (*Equus asinus*) milk a potential treatment strategy for type 2 diabetes, **Journal of Ethnopharmacology**, 2020.

LIN DS, CONNOR WE, WOLF DP, NEURINGER M, HACKEY DL. Unique lipids of primate spermatozoa: desmosterol and docosahexaenoic acid. **J Lipid Res** 1993.

LINZELL JL, ANNISON F, BICKERSTAFFE R, JEFFCOTT LB. Mammary and whole-body metabolism of glucose, acetate, palmitate in the lactating horse. **Proc Nutr Soc.** v.31, p.72^A–73^a, 1972.

LIU, Z., EZERNIEKS, V., ROCHFORT, S., COCKS, B., Comparison of methylation methods for fatty acid analysis of milk fat, **Food Chemistry**, 2018,

LUNET, N., SEVERO M., BARROS H., Desvio Padrão ou Erro Padrão. **ArquiMed**, 2006.

MALACARNE M. et al. Protein and fat composition of mare's milk: some nutritional remarks with reference to human and cow's milk. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 11, p. 869-877, 2002.

MOREIRA, N.X.; CURI, R.; MANCINI FILHO, J. Fatty acids: a review. **Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.**, São Paulo, SP , v.24, p.105-123, dez., 2002.

O'FALLON, J. V.; BUSBOOM, J. R.; NELSON, M. L.; GASKINS, C. T. A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: Application to wet meat tissues, oils, and feedstuffs, **Journal of Animal Science**, v. 85, 2007.

OLIVEIRA, JED SANTOS AC, WILSON EV *Nutrição Básica*. 1 ed. São Paulo: Savier, 1982.

PALMQUIST DL, BEAULIEU AD, BARBANO DM. Feed and animal factors influencing milk fat composition. **J Dairy Sci.** v.76, p.1753–1771, 1993.

PERES, T. B. *Noções básicas de cromatografia*. Biológico, São Paulo, v. 64, n. 2, 2002.

PIKUL J, WÓJTOWSKI J; Fat and cholesterol content and fatty acid composition of mares' colostrums and milk during five lactation months. **Livest Prod Sci**, v.113, p.285–290, 2008.

SALIMEI, E., & FANTUZ, F. Equid milk for human consumption. **International Dairy Journal**, v.24(2), p. 130-142, 2012.

SALIMEI, E., FANTUZ, F., COPPOLA, R., CHIOFALO, B., POLIDORI, P., & VARISCO, G. Composition and characteristics of ass's milk. **Animal Research**, v.53(1), p. 67-78, 2014.

SUKHIJA, P.S., E D.L. PALMQUIST, Rapid Method for Determination of Total Fatty Acid Content and Composition of Feedstuffs and Feces **J. Agric. Food Chem**, 1988.

TURAN, H.; SÖNMEZ, G.; KAYA, Y. Fatty acid profile and proximate composition of the thornback ray (*Raja clavata*, L. 1758) from the Sinop coast in the Black Sea. **Journal of Fish Science**, v.1, n.2, p.97-103, 2007.

ZÁRATE, R., EL JABER-VAZDEKIS, N., TEJERA, N., PÉREZ, J.A., & RODRÍGUEZ, C. Significance of long chain polyunsaturated fatty acids in human health. **Clinical and Translational Medicine**, 2017.

ANEXO A

Tabela suplementar 1- Concentrações médias dos grupos de ácidos graxos das matrizes lácteas de jumenta, égua, cabra e vaca determinados por diferentes métodos de metilação dos ésteres metílicos.

Ácidos Graxos (g 100g ⁻¹ EMAG)*	Metodologia de metilação dos EMAG			EMP	Pvalor
	KR	OF	CB		
AGCC	4,68 ^a	3,48 ^c	4,14 ^b	0,098	<0,001
AGCM	18,6 ^{ab}	19,0 ^a	18,1 ^b	0,185	0,029
AGCL	51,7	52,5	52,0	0,228	0,934
∑n3	4,38	4,18	4,76	0,125	0,899
∑n6	9,04	8,80	8,81	0,075	0,430
AGS	53,6	53,0	53,5	0,193	0,523
AGI	46,4	47,0	46,5	0,193	0,523

*EMAG: Ésteres metílicos dos ácidos graxos; AGCC: Ácidos graxos de cadeia curta; AGCM: Ácidos graxos de cadeia média; AGCL: Ácidos graxos de cadeia longa; ∑n3: Ômega 3; ∑n6: Ômega 6; AGS: Ácidos graxos saturados; AGI- Ácidos graxos insaturados; KR: catálise ácida e básica segundo Kramer et al. (1997); OF: catálise ácida e básica segundo O’Fallon et al. (2007); CB: catálise básica segundo Liu et al. (2020). As médias nas linhas com letras diferentes diferem significativamente entre si (Tukey, P < 0,05).

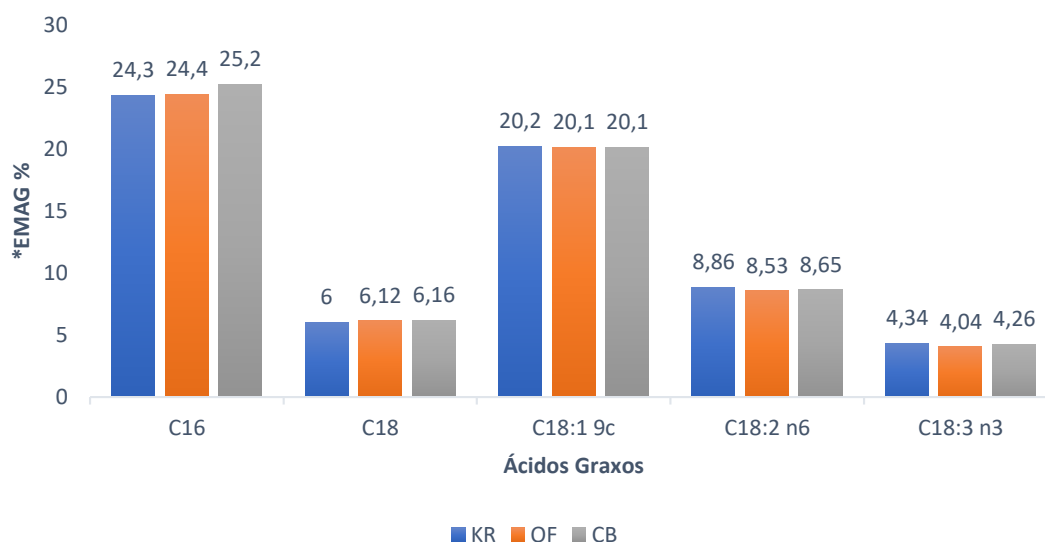


Figura suplementar 1- Perfil de ácidos graxos em leite de égua, jumenta, cabra e vaca determinados com diferentes métodos de metilação dos ésteres metílicos. *EMAG: Ésteres metílicos dos ácidos graxos. KR: catálise ácida e básica segundo Kramer et al. (1997); OF: catálise ácida e básica segundo O’Fallon et al. (2007); CB: catálise básica segundo Liu et al. (2020).

Tabela suplementar 2. Perfil de ácidos graxos dos leites de jumenta, égua e vaca (média \pm desvio padrão).

EMAG ¹ (g/100g)	Matriz láctea		
	Égua	Jumenta	Vaca
4:0	0,08 (0,02)	0,05 (0,01)	1,84 (0,17)
6:0	0,18 (0,02)	0,36 (0,03)	1,91 (0,12)
8:0	2,06 (0,02)	4,70 (0,21)	1,08 (0,03)
10:0	4,47 (0,02)	8,74 (0,17)	2,79 (0,03)
12:0	5,12 (0,02)	7,34 (0,12)	3,27 (0,002)
14:0	5,92 (0,02)	5,32 (0,04)	10,24 (0,04)
16:0	21,44 (0,02)	19,17 (0,16)	30,25 (0,06)
18:0	2,02 (0,02)	1,96 (0,08)	10,07 (0,01)
C16:1	5,96 (0,002)	2,32 (0,02)	1,98 (0,15)
C18:1 n-9	18,59 (0,002)	19,99 (0,17)	20,78 (0,09)
C18:1 n-11	0,94 (0,002)	0,85 (0,01)	0,54 (0,11)
C18:2 n-6	12,43 (0,07)	17,64 (0,14)	2,38 (0,01)
C18:3 n-3	12,78 (0,18)	3,97 (0,03)	0,41 (0,05)
C20:4 n-6	0,21 (0,03)	0,11 (0,01)	0,17 (0,05)
C20:5 n-3	0,03 (0,002)	0,07 (0,05)	0,02 (0,001)
C22:6 n-3	0,02 (0,002)	0,001 (0,001)	0,001 (0,001)

EMAG¹: Ésteres metílicos de ácidos graxos, determinados segundo Kramer et al. (1997).