



**EFEITO DA INCLUSÃO DE ORÉGANO NA DIETA DE
VACAS LEITEIRAS SOBRE A QUALIDADE DO LEITE**

ELLEN CRISTINA QUIRINO LACERDA

2012

ELLEN CRISTINA QUIRINO LACERDA

**EFEITO DA INCLUSÃO DE ORÉGANO NA DIETA DE
VACAS LEITEIRAS SOBRE A QUALIDADE DO LEITE**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação de Mestrado em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora: Julliana Izabelle Simionato

Co-orientador: Fabiano Ferreira da Silva

**ITAPETINGA
BAHIA - BRASIL**

2012

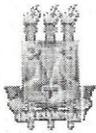
636.085	Lacerda, Ellen Cristina Quirino.
L135e	<p data-bbox="424 472 1353 600">Efeito da inclusão de orégano na dieta de vacas leiteiras sobre a qualidade do leite. / Ellen Cristina Quirino Lacerda. – Itapetinga: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2012. 80 fl..</p> <p data-bbox="424 640 1353 786">Dissertação do Programa de Pós-Graduação “<i>Strictu Senso</i>” do Curso de Especialização em Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Sob a orientação da Prof^a. D Sc. Julliana Isabelle Simionato e co-orientação do Prof. D Sc. Fabiano Ferreira da Silva.</p> <p data-bbox="424 853 1353 1021">1. Nutrição animal – Vacas leiteiras – Orégano. 2. Orégano – Inclusão – Alimentação – Vacas leiteiras. 3. Leite – Qualidade – Inclusão de orégano – Alimentação de ruminantes. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. II. Simionato, Julliana Isabelle. III. Silva, Fabiano Ferreira da. IV. Título.</p> <p data-bbox="1121 1055 1353 1088" style="text-align: right;">CDD(21): 636.085</p>

Catalogação na Fonte:

Cláudia Aparecida de Souza – CRB 1014-5ª Região
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para desdobramentos por assunto:

1. Nutrição animal : Vacas leiteiras
2. Orégano : Inclusão : Alimentação animal
3. Ruminantes : Alimentação : Orégano
4. Leite : Qualidade : Vacas leiteiras : Orégano



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS



Área de Concentração: Engenharia de Processos de Alimentos

Campus de Itapetinga-BA

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

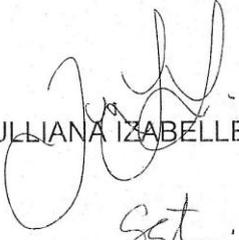
Título: “EFEITO DA INCLUSÃO DE OREGANO NA DIETA DE VACAS LEITEIRAS SOBRE A QUALIDADE DO LEITE”.

Autor: ELLEN CRISTINA QUIRINO LACERDA

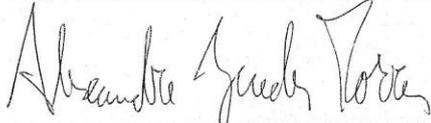
Orientadora: Prof^a. Dr^a. JULIANA IZABELLE SIMIONATO

Co-Orientador: Prof. Dr. FABIANO FERREIRA DA SILVA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENGENHARIA DE PROCESSOS DE ALIMENTOS, pela Banca Examinadora.


Prof^a. Dr^a. JULIANA IZABELLE SIMIONATO, DSc., UESB


Prof^a. Dr^a. SIMONE ANDRADE GUALBERTO, DSc., UESB


Prof. Dr. ALEXANDRE GUEDES TORRES, DSc., UFRJ

Data da Realização: 29 de fevereiro de 2012.

*Pensa! O pensamento tem poder.
Mas não adianta só pensar.
Você também tem que dizer! Diz!
Porque as palavras têm poder.
Mas não adianta só falar.
Você também tem que fazer! Faz!
Porque você só vai saber se o final vai ser feliz depois que tudo acontecer.
(Se Liga Aí - Gabriel O Pensador)*

AGRADECIMENTOS

À DEUS, por está sempre comigo, dando-me forças, coragem, determinação e perseverança na busca por meus ideais.

Aos meus pais (M^a Helena e Gildemar), meu irmão (Gugu), meus tios (Valtim e Ana) e meus primos (Juan, Renan e Anne) que mesmo sem compreender muito bem o que eu estava fazendo me apoiaram em minhas decisões.

Agradeço a minha orientadora, Julliana Simionato, pela confiança, ensinamentos, responsabilidade, amizade, paciência e orientação.

Ao Prof. Fabiano Ferreira pela co-orientação e pela grande colaboração para o desenvolvimento deste trabalho.

À Prof^a. Normane Mirele pelo incentivo, apoio e conhecimento, se não fosse ela não teria tentado o mestrado, obrigada pelo conselho certo.

À Prof^a. Silmara Carvalho, Prof^a. Simone Gualberto, Prof^a. Mara Lúcia e Prof^a. Sibelli Passini por terem disponibilizados os laboratórios que coordenam e auxílio.

Ao Prof. Paulo Bonomo pelo auxílio na estatística, desde a graduação até os dias atuais.

Ao pessoal da Bovinocultura, em especial à Julinessa Oliveira, pelo trabalho em equipe, atenção e por ter dividido comigo as preocupações do experimento.

À minha querida Viviane Figueiredo que mais uma vez me ajudou sem medir esforços na execução deste experimento, juntamente com Duca (Laticínio Rocha), pessoa simples e dedicada.

Ao Laticínio Pitty e aos meus provadores da análise sensorial das amostras de leite.

Aos Funcionários da UESB, em especial, Luciano, Aristides, D. Elza e ao Setor de transporte e a UINFO, obrigada pela atenção e educação.

As minhas companheiras de laboratório Luciana, Débora, Maísa e as alunas de IC Jeanny, Fabíola, Marianne, Arlyane, Suian, Carilan, Marcelle e Tatiana, muito obrigada por terem passado todo esse tempo me auxiliando e torcendo.

Às minhas amigas e “irmãs” Mirelle Pignata e Adrielle Leão que há mais de 6 anos dividem junto comigo momentos felizes e tristes, estando presentes nas horas necessárias.

À Jamile Rubim e família, Layana Brito e Thaís Batista, que mesmo longe sempre estiveram presentes em minha vida, obrigada pela preocupação, dedicação e admiração. Sem dúvidas vocês são como uma família para mim, Amo vocês!!!!

À Lara, Pitty, Chelle, Nina, Bruna, Isis, Juliana, Crisna, Sheilla e Nêssa, obrigada pela diversão, palavras de conforto, amizade e carinho! A Rodrigo por ter se feito presente em meu dia-a-dia, dividindo preocupações e momentos especiais.

Aos meus Colegas do mestrado, em especial, Edvaldo, Rúbner, Wilson, Janmile e Aninha por terem dividido os momentos de tensão junto comigo.

Aos colegas de zootecnia Elizângela Liz, Lívia Costa, em especial, à Pablo Viana, por terem esclarecidos minhas dúvidas sobre os mais diferentes assuntos, pela amizade e carinho.

À Janclei Coutinho pelo carinho e torcida mesmo de longe.

Aos professores que fizeram parte da banca, Simone Gualberto e Alexandre Torres, que contribuíram da melhor forma para melhoria deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho!

Sem dúvidas, todos vocês são especiais e fizeram parte deste momento!!!!

OBRIGADA!

RESUMO

LACERDA, E. C. Q. **Efeito da Inclusão de Orégano na Dieta de Vacas Leiteiras sobre a Qualidade do Leite.** Itapetinga – BA: UESB, 2012. 80 p. (Dissertação - Mestrado em Engenharia de Alimentos – Ciência de Alimentos).*

As modificações na dieta dos ruminantes influem diretamente na composição e características dos seus produtos. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da inclusão de orégano na alimentação de vacas leiteiras sobre a qualidade química do leite *in natura* e pasteurizado e atributos sensoriais do leite pasteurizado. Doze vacas mestiças Holandês x Zebu foram alimentadas com volumoso de cana-de-açúcar adicionado de 1% de uréia e sulfato de amônio e concentrado à base de farelo de soja, milho, farelo de trigo, premix vitamínico e mineral, além da inclusão de diferentes níveis de orégano na dieta. As análises de ácidos graxos da gordura do leite *in natura* e pasteurizado foram realizadas através de cromatografia em fase gasosa e os picos identificados por comparação dos tempos de retenção de padrões com o das amostras. Para o leite *in natura*, foram realizadas as análises físico-químicas de densidade, índice crioscópico, proteína, gordura, lactose, extrato seco total e extrato seco desengordurado. As características sensoriais das amostras de leite pasteurizado foram avaliadas através do teste de preferência de comparação múltipla e perfil de sabor. Os dados obtidos foram avaliados através de análise de variância e regressão ao nível de 5% de significância. A partir da avaliação dos resultados para os ácidos graxos do leite verificou-se que as dietas influenciaram na redução do teor de ácido mirístico (14:0) e somatório de ácidos graxos ômega-6, e no aumento das concentrações do ácido miristoléico (14:1); 18:2t10,c12; ácido alfa-linolênico (18:3n-3) e somatório de ácidos graxos poli-insaturados. A qualidade nutricional da fração lipídica também foi afetada, apresentando redução do índice de aterogenicidade e aumento da razão de AGPI e AGS. Além, de promover o aumento da atividade da enzima Δ^9 -dessaturase em 27% para o ácido miristoléico (14:1n-9c). O tratamento térmico aplicado influenciou apenas os ácidos graxos Behênico (22:0) e Di-homo-gama-linolênico (20:3n-6), que não foram detectados após a pasteurização lenta, enquanto para os demais ácidos graxos, não foram observadas modificações. Os teores de lactose, extrato seco desengordurado e densidade foram influenciados pela inclusão de orégano, apresentando efeito de ordem quadrática. Todas as amostras foram consideradas aptas para o consumo mantendo-se dentro dos padrões da legislação, sendo permitida a realização da análise sensorial. As características sensoriais não foram modificadas com os tratamentos quanto à preferência, sendo observado através do perfil descritivo uma pequena diferença entre os tratamentos para o atributo de sabor cozido. Quanto aos demais atributos todos tiveram a mesma intensidade. A inclusão de orégano na dieta mostrou-se válida sobre os ácidos graxos e as características sensoriais do leite *in natura*, observando que foram conservadas as características de um leite normal.

Palavras-Chave: ácidos graxos, características sensoriais, erva aromática e ruminantes.

*Orientador: Julliana Izabelle Simionato, D.Sc., UESB e Co-orientador: Fabiano Ferreira da Silva, D.Sc., UESB.

ABSTRACT

LACERDA, E. C. Q. Effect of Dietary Inclusion of Oregano Dairy Cows on Milk Quality. Itapetinga – BA: UESB, 2012. 80 p. (Dissertation - Master in Food Engineering - Food Science).*

The changes in the diet of ruminants directly influence the composition and characteristics of their products. The objective of this study was to evaluate the effect of inclusion of oregano in dairy cows on the chemical quality of raw milk and pasteurized and sensory attributes of pasteurized milk. Twelve crossbred Holstein x Zebu cows were fed roughage of cane sugar by adding 1% urea and ammonium sulfate and concentrate based on soybean meal, corn, wheat, vitamin and mineral premix, and the inclusion of different levels of dietary oregano. The analysis of fatty acid and pasteurized fresh milk were conducted by gas chromatography and the peaks identified by comparison of retention times of the samples with standards. For fresh milk, analyzes were carried out physico-chemical density, cryoscopic index, protein, fat, lactose, total solids and solids nonfat. The sensory characteristics of pasteurized milk samples were evaluated using a preference test for multiple comparisons and flavor profile. The data were evaluated using analysis of variance and regression at 5% significance level. From the evaluation results for the milk fatty acid it was found that diets influence in reducing the amount of myristic acid (14:0) and the sum of omega-6 and increasing concentrations of myristoleic acid (14:1); 18:2 t10, c12; alpha-linolenic acid (18:3 n-3) and sum of polyunsaturated fatty acids. The nutritional quality of lipid fraction was also affected, with reduced atherogenicity index and increased the ratio of PUFA and SFA. In addition, to promote increased activity of Δ^9 -desaturase enzyme in 27% to myristoleic acid (14:1 n-9c). The heat treatment applied only influenced behenic acids (22:0) and di-homo-gamma-linolenic acid (20:3 n-6), which were not detected after pasteurization, while other fatty acids were not observed modifications. The contents of lactose, and nonfat dry density were influenced by the inclusion of oregano, with effect of quadratic order. All samples were considered suitable for consumption while remaining within the standards of the legislation, which allowed the realization of the sensory analysis. The sensory characteristics were not modified treatments for the preference, being observed through a descriptive profile of the small difference between the treatments for the attribute of cooked flavor. As for the other attributes all had the same intensity. The inclusion of dietary oregano proved to be valid on the fatty acids and sensory characteristics of fresh milk, noting that were preserved the features of a normal milk.

Keywords: fatty acids, sensory characteristics, aromatic herb and ruminants.

* Adviser: Julliana Izabelle Simionato, *D.Sc.*, UESB e Co-Adviser: Fabiano Ferreira da Silva, *D.Sc.*, UESB.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Proporção dos ingredientes da dieta nos concentrados e volumoso, com base na matéria seca (%). 30
- Tabela 2.** Composição química (%) da cana-de-açúcar e dos concentrados e seus respectivos desvios padrão..... 31
- Tabela 3.** Composição química e de ácidos graxos das dietas utilizadas nos diferentes tratamentos, com base na matéria seca (%). 32
- Tabela 4.** Quantidade de ácidos Graxos, em mg.g^{-1} de lipídios, presentes nas amostras de leite *in natura* das vacas alimentadas com diferentes níveis de inclusão de orégano..... 43
- Tabela 5.** Valores médios relativos aos somatórios de ácidos graxos, índices de qualidade nutricional e de atividade da enzima Δ^9 -dessaturase para as amostras de leite *in natura*..... 48
- Tabela 6.** Comparação do Percentual de Ácidos Graxos presentes no leite *in natura* e Pasteurizado das vacas alimentadas com diferentes percentuais de orégano..... 53
- Tabela 7.** Comparação do Percentual dos somatórios e razões dos Ácidos Graxos presentes no leite *in natura* e Pasteurizado das vacas alimentadas com diferentes percentuais de orégano..... 54
- Tabela 8.** Resultados médios das análises físico-químicas do leite *in natura* de vacas alimentadas com diferentes níveis de orégano..... 55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Valores efetivos para a produção brasileira de leite por regiões da federação.....	16
Figura 2. Orégano (<i>Origanum Vulgare</i>).....	22
Figura 3. Ficha de avaliação utilizada no teste de preferência por comparação múltipla.....	38
Figura 4. Ficha de avaliação para o teste triangular.....	39
Figura 5. Ficha de avaliação para o perfil de sabor.....	39
Figura 6. Cromatogramas obtido para as amostras de leite <i>in natura</i> (—) e leite pasteurizado (—).....	42
Figura 7. Escores médios obtidos pelo teste de preferência de comparação múltipla para as amostras de leite das vacas alimentadas com diferentes percentuais de orégano.....	59
Figura 8. Perfil Sensorial em gráfico-aranha para as amostras de leite pasteurizado.....	60

LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
°D	Graus Dornic
°H	Graus Hortvet
%	Porcentagem
Σ	Somatório
μL	Microlitros
AA	Ácido araquidônico
ADQ	Análise Descritiva Quantitativa
AG	Ácidos Graxos
AGI	Ácidos Graxos Insaturados
AGM	Ácidos Graxos Monoinsaturados
AGPI	Ácidos Graxos Poli-insaturados
AGS	Ácidos Graxos Saturados
BHA	Hidroxianisol Butilado
BHT	Hidroxitolueno Butilado
CLA	<i>Conjugated Linoleic Acid</i>
CNF	Carboidrato Não Fibrosos
CV	Coefficiente de Variação
DHA	Ácido Docosahexaenóico
DIC	Detector de Ionização de Chama
ECL	<i>Equivalent Chain Length</i>
EE	Extrato Etéreo
EPA	Ácido Eicosapentaenóico
ESD	Extrato Seco Desengordurado
EST	Extrato Seco Total
FC	Fator de Conversão
FDA	Fibra em Detergente Ácido
FDN	Fibra em Detergente Neutro
FDN _{cp}	Fibra Detergente Neutro Livre de Cinzas e Proteínas
FR	Fator de Resposta
g	Gramas
g/mL	Gramas por mililitros
H ₂	Hidrogênio
HDL	<i>High Density Lipoproteins</i>
HEM	Hemicelulose
HTST	<i>High Temperature, Short Time</i>
IA	Índice de Aterogenicidade
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IT	Índice de Trombogenicidade
kg	Quilograma

KOH	Hidróxido de Potássio
L	Litro
LDL	<i>Low Density Lipoproteins</i>
Lig	Lignina
LTLT	<i>Low Temperature, Long Time</i>
m	Metro
m ²	Metro quadrado
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mg.g ⁻¹	Miligrama por grama
mL	Mililitro
MO	Matéria Orgânica
MS	Matéria Seca
n.d.	Não detectado
n.s.	Não significativo
N ₂	Nitrogênio
n-3	Ômega 3
n-6	Ômega 6
PB	Proteína Bruta
PG	Galato de Propila
R ²	Coefficiente de Determinação
RPM	Rotação por minuto
TBHQ	Terc-Butil-Hidroquinona
UAT	Ultra Alta Temperatura
UESB	Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
UFC	Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1 Cadeia Produtiva do Leite Bovino.....	16
2.2 Componentes do Leite.....	17
2.3 Prevenção Contra a Oxidação Lipídica.....	20
2.4 Orégano.....	22
2.5 Influência do tratamento térmico sobre os ácidos graxos do leite.....	24
2.6 Análise Sensorial.....	25
3. OBJETIVO.....	28
3.1. Objetivo Geral.....	28
3.2 Objetivos Específicos.....	28
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1 Local do Experimento.....	29
4.2 Delineamento Experimental para Obtenção do Leite.....	29
4.3 Composição Química e Perfil de Ácidos Graxos da Dieta.....	30
4.4 Amostragem.....	32
4.5 Procedimento Experimental.....	33
4.5.1 Análise de Ácidos Graxos.....	33
4.5.1.1 <i>Extração dos Lipídios Totais</i>	33
4.5.1.2 <i>Preparação de Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos</i>	33
4.5.1.3 <i>Análise Cromatográfica dos Ésteres de Ácidos Graxos</i>	33
4.5.1.4 <i>Identificação dos Ésteres Metílicos de ácidos graxos</i>	34
4.5.1.5 <i>Avaliação da Resposta do Detector de Ionização de Chama</i>	34
4.5.1.6 <i>Análise Quantitativa dos Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos</i>	35
4.5.1.7 <i>Índice de Qualidade Nutricional dos Lipídios do Leite</i>	35
4.5.1.8 <i>Índice de Atividade da Enzima Δ^9-Dessaturase</i>	36
4.5.2 Análise Físico-Química.....	36
4.5.3. Análises Microbiológicas.....	37

4.5.4 Análise Sensorial.....	37
4.5.4.1 <i>Teste de Preferência de Comparação Múltipla</i>	37
4.5.4.2 <i>Perfil Descritivo</i>	38
4.6 Análises Estatísticas.....	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
5.1 Análise de Ácidos Graxos.....	41
5.1.1 <i>Composição de ácidos graxos da gordura do leite in natura</i>	41
5.1.2 <i>Influência do Tratamento Térmico sobre os Ácidos Graxos presentes no Leite</i>	52
5.2 Análises Físico-Químicas.....	55
5.3 Análises Microbiológicas.....	57
5.4. Análise Sensorial.....	58
5.4.1 <i>Teste de Preferência de Comparação Múltipla</i>	58
5.4.1 <i>Perfil de Sabor</i>	59
6 CONCLUSÃO.....	62
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

1 INTRODUÇÃO

Devido à crescente preocupação com os hábitos alimentares, o consumidor tem-se tornado cada vez mais exigente em relação à qualidade nutricional e a durabilidade dos alimentos. Conseqüentemente, a indústria tem procurado melhorar e inovar a qualidade destes, agregando valor aos mais diferentes tipos de alimentos, até mesmo aqueles considerados saudáveis nutricionalmente.

O leite é um dos alimentos mais completos da natureza e sua importância é baseada em seu elevado valor nutritivo, como riqueza em proteínas, vitaminas, gorduras e sais minerais (ALMEIDA *et al.*, 1999; TAMANINI *et al.*, 2007), cálcio, altos teores de tiamina, niacina e magnésio (GARCIA *et al.*, 2000; PASCHOA, 1997). Nos últimos anos, a indústria de laticínios tem potencializado o valor nutritivo do produto, colocando no mercado produtos enriquecidos com vitaminas, minerais e alguns ácidos graxos da família ômega-3 (n-3) e ômega-6 (n-6).

A composição química e sensorial dos lácteos é fortemente influenciada pela natureza da dieta ingerida pelas vacas, e como a qualidade dos produtos está se tornando um critério cada vez mais importante na percepção do consumidor, em certos países, produtos lácteos provenientes de animais alimentados com dietas à base de ervas são aceitos de forma positiva. Isso por quê, além de transmitirem uma "imagem limpa e verde", têm sido demonstradas possíveis relações com compostos específicos de interesse nutricional ou sensorial, ou seja, certos ácidos graxos e micronutrientes lipossolúveis. Assim, tem ocorrido um crescente interesse nos últimos anos no uso de manejo alimentar para controlar a composição da fração solúvel em gordura no leite e derivados lácteos (MARTIN *et al.*, 2005).

Nas últimas duas décadas a cadeia produtiva do leite tem se mostrado um dos setores agroalimentares brasileiros mais dinâmicos. Nesse período, um conjunto substancial de alterações envolvendo maior abertura ao mercado externo, desregulamentação pública do mercado, crescimento do capital estrangeiro, evolução de grades e *standars* privados e inovações técnicas e organizacionais provocaram uma verdadeira revolução no setor (CHADDAD, 2007). Este cenário, aliado ao custo de produção cada vez maior, obriga os produtores a buscarem alternativas alimentares que diminuam os custos da produção, e agreguem valor ao produto, melhorando suas características e conseqüentemente sua remuneração.

Dentre essas alternativas alimentares encontram-se os antioxidantes naturais que podem ser incluídos na alimentação das vacas na tentativa de melhorar as características nutricionais do leite e aumentar sua resistência a oxidação. Além de evitar a oxidação lipídica, os antioxidantes quando presentes na dieta podem prevenir doenças degenerativas. Assim, a ingestão de alimentos naturalmente ricos nessas substâncias, ou ainda, aqueles enriquecidos com essas espécies, são benéficos para a saúde. Neste sentido vários pesquisadores têm investigado o enriquecimento de alimentos a partir de plantas (TORRES *et al.*; 2007, BORNEO & AGUIRRE, 2008; PRABHASANKAR *et al.*, 2009).

De acordo com revisão realizada por Bortoli (2007) vários são os óleos essenciais com potencial de comercialização, extraídos de diferentes partes da planta, tais como o thymol (extraído do tomilho – *Thymus vulgaris*), carvacrol (extraído do orégano – *Origanum sativum*), aliina e alicina (extraídos do alho – *Allium sativum*) e menthol (extraído da menta – *Mentha piperita*).

O óleo de orégano contém antioxidantes fenólicos que reagem com lipídios e radicais hidroxila e os convertem em produtos estáveis (JADHAV *et al.*, 1996; POKORNY *et al.*, 2001). Contudo, antes desta pesquisa, não haviam ainda sido conduzidos estudos relativos ao efeito da suplementação na alimentação de bovinos com orégano desidratado e a influência sobre o leite. Todavia, efeitos relacionados à proteção oxidativa de lipídios foram reportados após estocagem a 4 e 20°C de frangos (BOTSOGLOU *et al.*, 2002; GIANNENAS *et al.*, 2005), perus (GOVARIS *et al.*, 2004) e coelhos (BOTSOGLOU *et al.*, 2004). Além disso, outros estudos comprovam o efeito protetor do orégano em relação à oxidação lipídica de gemas de ovo de galinhas poedeiras alimentadas com este condimento (GÓMEZ, *et al.* 2003) e a redução da peroxidação plasmática de lipídios em frangos de corte (TRAESEL *et al.*, 2011).

Diante do exposto acima, tornasse evidente a necessidade de estudos que aprofundem conhecimentos de como a formulação de dietas altera a composição do leite em uma determinada característica. Assim, o objetivo deste experimento foi investigar o efeito da inclusão de orégano na alimentação de vacas leiteiras sobre a qualidade química do leite *in natura* e características sensoriais do leite pasteurizado.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cadeia Produtiva do Leite Bovino

A criação de bovinos no Brasil é, de longe, a atividade econômica que ocupa a maior extensão de terras no país. De acordo com o censo agropecuário de 2009 o rebanho bovino brasileiro foi estimado em 214,3 bilhões de cabeças (IBGE, 2009).

O Brasil ocupa a 5ª posição na produção leiteira no *ranking* mundial, tendo produzido aproximadamente 31 mil toneladas de leite em 2011, o que representa um aumento de 5,3% em relação ao ano de 2010 com uma produção de 29.085,5 milhões de litros de leite (IBGE, 2011).

Em dados divulgados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística do total de litros produzidos, a região Norte concentra 5,7%, a região Nordeste 13,0%, a região Sudeste 35,5 %, a região Sul 31,3%, e a região Centro-oeste 14,5% (Figura 1). A Bahia ocupa a 6ª posição no *ranking* nacional, além de ser o maior estado produtor da região Nordeste com produção de 1,24 bilhões de litros de leite por ano, sendo observado um crescimento na produção de 4,5% quando comparado ao ano de 2010, com produtividade média de 1,18 bilhões de litros de leite por ano (IBGE, 2011).

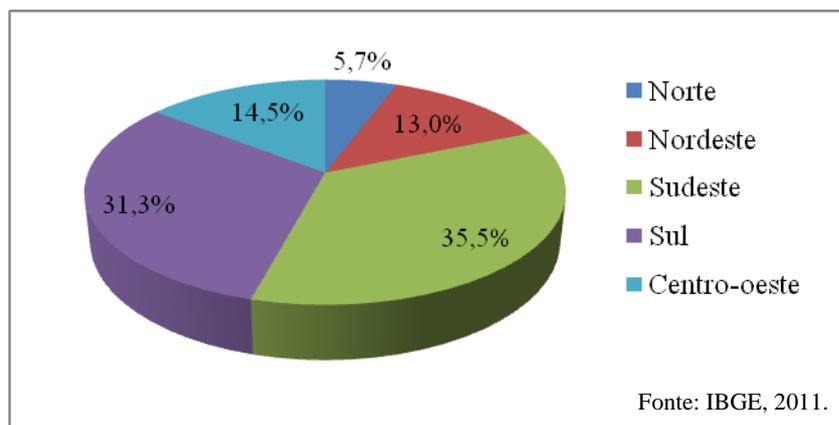


Figura 1. Valores efetivos para a produção brasileira de leite por regiões da Federação.

O consumo de leite fluido no Brasil atingiu em 2007, o valor médio de 77 kg/habitante/ano (EMBRAPA, 2008), entretanto, esse consumo está em expansão com um crescimento de ordem de 2,6% ao ano (SCHUBERT & NIERDELE, 2009), o avanço ano a ano do consumo de leite está diretamente ligado ao aumento de renda,

dessa forma tradicionalmente quanto maior a renda de uma família, maior o consumo de leite e seus derivados. Segundo Marcelo Pereira de Carvalho, diretor da AgriPoint, empresa de informação especializada em cadeias do agronegócio, em média, para cada 1% de aumento da renda, o consumo de lácteos no Brasil aumenta 0,5%. As famílias podem não aumentar a quantidade consumida de leite fluido, mas podem passar a consumir mais derivados (OLIVEIRA & CARVALHO, 2012).

Embora no Brasil, o consumo de leite seja grande, comparativamente a outros países como Argentina, México e Egito, ainda está bem distante da recomendação do Ministério da Saúde, que estabelece três porções diárias, equivalentes a 220 kg/pessoa/ano (LÁCTEA BRASIL, 2010). Isso talvez ocorra porque dietas baseadas em produtos lácteos, as quais contêm altos níveis de ácidos graxos saturados, sempre foram associadas a doenças cardiovasculares (SIMIONATO, 2008). Porém, existem ácidos graxos com potencial efeito positivo para a saúde humana, que são encontrados predominantemente na gordura dos ruminantes, como por exemplo, o CLA (*Conjugated Linoleic Acid* ou Ácido Linoléico Conjugado). Inúmeras pesquisas trazem também as tentativas em modificações da dieta com o objetivo de reduzir os teores de Ácidos graxos Saturados (AGS) e aumentar os ácidos graxos insaturados.

2.2 Componentes do Leite

Segundo a Instrução Normativa nº 62, Regulamento de Identidade e Qualidade de Leite Cru, “entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outras espécies deve denominar-se segundo a espécie da qual proceda”. A legislação estabelece padrões físico-químicos em relação a qualidade do leite, este deve apresentar no mínimo 3% de gordura, 2,9% de proteína, 8,4% de Extrato Seco Desengordurado (ESD) e 11,5% de Extrato Seco Total (EST); densidade relativa entre 1,028 a 1,034 e índice crioscópico de $-0,530$ à $-0,550$ °H (BRASIL, 2011).

O leite é composto por mais de 100.000 tipos de moléculas, cada uma delas apresenta funções específicas, o que faz do leite um dos alimentos mais complexos e completos encontrados na natureza (HURLEY, 2006). O leite é uma combinação de várias substâncias na água podendo ser classificado como uma emulsão de glóbulos de gordura dispersos na fase aquosa, estabilizada por uma dispersão coloidal de proteínas

em uma solução de sais, vitaminas, peptídeos, lactose, oligossacarídeos, caseínas e outras proteínas (SANTOS & FONSECA, 2000).

A biossíntese do leite ocorre na glândula mamária, sob controle hormonal, a partir de nutrientes fornecidos pelo sangue e epitélio glandular. Estes nutrientes são provenientes diretamente da dieta ou são produtos modificados nos tecidos dos animais antes de alcançar a glândula mamária (FRANDSOM *et al.*, 2003; BEHMER, 1991). Alguns componentes do leite, como as proteínas e os ácidos graxos, originam-se, em pequena parte, do plasma sanguíneo em condição pré-formada, sendo a maior proporção sintetizada na glândula mamária, a partir de precursores. As vitaminas e os minerais são obtidos diretamente do plasma sanguíneo, enquanto a lactose é sintetizada exclusivamente na glândula mamária (WALSTRA *et al.*, 2001).

Os principais constituintes deste alimento encontram-se distribuídos nas proporções de 87,5% de água; 4,5% de lactose; 3,6% de proteínas; 3,6% de gordura e 0,8% de sais minerais, essa composição pode variar devido a uma série de fatores os quais envolvem a raça, características individuais, alimentação, período de lactação, idade, clima, estação do ano, intervalos entre as ordenhas, estresse e ação de antibióticos (FOX & MCSWEENEY, 1998; BARROS, 2007).

A lactose é um dissacarídeo composto de glicose e galactose, sendo este último de origem da própria glicose. O açúcar do leite é sintetizado a partir da glicose produzida no fígado pelo aproveitamento do ácido propiônico absorvido no rúmen e pela transformação de certos aminoácidos. A secreção da lactose dentro do lúmen alveolar causa a entrada de água, exercendo importante controle do volume de leite (OLIVEIRA, 2004). O teor de lactose varia pouco por estar sujeita à regulação endócrina e, principalmente, por ser o principal agente osmótico envolvido na secreção do leite (ABUGHAZALEH *et al.*, 2002).

As proteínas do leite são de fácil digestão e de alto valor biológico, contém os aminoácidos essenciais em quantidade e proporções adequadas. As principais proteínas do leite são as caseínas, mas existe outro grupo que são as proteínas solúveis ou proteínas do soro. Estas estão constituídas por proteínas globulares, tais como β -lactoglobulina, α -lactoalbumina, imunoglobulinas, proteose-peptonas, lactoferrina, transferrina e enzimas. Os 5% restantes compõem o nitrogênio de compostos não protéicos, representado por uréia, amônia, ácido úrico, aminoácidos e outros (SGARBIERI, 1996).

A gordura possui importantes funções e características específicas no leite, sendo considerada a maior fonte de energia do leite e responsável por boa parte das características sensoriais do leite, além de possuir inúmeras propriedades que permitem diversificação nas indústrias lácteas (SANTOS & FONSECA, 2001). Sob o ponto de vista nutricional, a gordura pode apresentar níveis consideráveis de ácidos graxos da família ômega-3 (n-3) e ômega-6 (n-6), além de isômeros do ácido linoléico, como o ácido rumênico (CLA) e seu precursor ácido vacênico, sendo a carne e o leite provenientes de animais ruminantes a principal fonte natural de CLA para o homem (ALLOCATI *et al.*, 2007). O ácido linoléico não é sintetizado pelo organismo humano, enquanto que o linolênico e o araquidônico são sintetizados, a partir do ácido linoléico. A proporção de Ácidos Graxos Saturados (AGS) e Ácidos Graxos Poli-insaturados (AGPI) de 6:4 na gordura do leite é considerada nutricionalmente aceitável (HMSO, 1994).

O ácido graxo vacênico é formado pela biohidrogenização do CLA (18:2*cis*9, *trans*11 e 18:2*cis*12, *trans*10). Muitas vezes, a biohidrogenização do ácido graxo linoléico não chega a completar-se, assim, quantidades significativas de ácido graxo conjugado e de *trans*-monoinsaturados, como o ácido graxo vacênico, alcançam o duodeno e são absorvidas, ficando no leite ou no tecido (BEORLEGUI, 2004).

O CLA também pode ser formado endogenamente pela dessaturação do ácido graxo vaccênico por uma enzima presente na glândula mamária e no tecido adiposo, a Δ^9 -dessaturase (MEDEIROS, 2002). A Δ^9 -dessaturase também é encontrada em tecidos humanos, por isso, aumentos no consumo de ácido graxo vaccênico poderiam ter os mesmos efeitos benéficos associados à ingestão de CLA (BEORLEGUI, 2004).

O leite é composto por 70% de ácidos graxos saturados, 25% de ácidos graxos monoinsaturados e 5% de ácidos graxos poli-insaturados. Quanto ao tamanho da cadeia carbônica pode-se dizer que cerca de 30% dos ácidos graxos são de cadeia longa e o restante corresponde a ácidos graxos de cadeias curta e média (GRUMMER, 1991).

Os ácidos graxos da gordura do leite podem ser derivados basicamente de quatro vias principais: dieta, glândula mamária (síntese de novo), rúmen (degradação, biohidrogenação, bacterianas e síntese), e a mobilização de gordura corporal (STOOP *et al.*, 2009). Sua composição está ligada a muitos fatores, tanto intrínsecos (raça, genótipo, estágio de lactação) e extrínsecos (ambientais) (PALMQUIST & BEAULIEU, 1993).

2.3 Prevenção Contra a Oxidação Lipídica

Os lipídios são constituídos por uma mistura de tri, di e monoacilgliceróis, ácidos graxos livres, glicolipídios, fosfolipídios, esteróis e outras substâncias. A maior parte destes constituintes é oxidável em diferentes graus (BERSET & CUVELIER, 1996), sendo que os ácidos graxos insaturados são as estruturas mais susceptíveis aos processos oxidativos, uma vez que a velocidade desta reação é dependente do número de duplas ligações presentes na molécula (COSGROVE *et al.*, 1987).

A degradação oxidativa dos ácidos graxos insaturados pode ocorrer por várias vias, em função do meio e dos agentes catalisadores. A auto-oxidação é o principal mecanismo de oxidação dos lipídios e está associada à reação do oxigênio com ácidos graxos insaturados, envolve reações de iniciação, propagação e terminação. A iniciação da oxidação está relacionada com a formação de radicais livres e é seguida pela formação de hidroperóxidos; esses compostos são relativamente instáveis, sobretudo a altas temperaturas e em presença de metais de transição. O processo oxidativo é autocatalítico, requerendo apenas um radical inicial para produção de hidroperóxidos lipídicos (FRANKEL, 1991).

A oxidação lipídica é responsável pelo desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis tornando os alimentos impróprios para o consumo, além de também provocar outras alterações que irão afetar não só a qualidade nutricional, devido à degradação de vitaminas lipossolúveis e de ácidos graxos essenciais, mas também a integridade e segurança dos alimentos, através da formação de compostos potencialmente tóxicos (KUBOW, 1993; SILVA, 1999).

Os lipídios do leite podem sofrer auto-oxidação, o que pode levar a mudanças na sua qualidade. Os mecanismos envolvidos incluem uma complexa interação de pró e antioxidantes que consiste tanto em compostos de baixo peso molecular, como em vitaminas e proteínas. Além disso, a composição físico-química dos diferentes componentes do leite, tem uma acentuada influência (LINDMARK-MANSSON & AKESSON, 2000).

O aumento da suscetibilidade do leite a esse tipo de reação se deve basicamente à redução no seu teor de antioxidantes, principalmente a vitamina E. Uma vez desencadeado, o processo de oxidação da gordura aumenta progressivamente em intensidade. As alterações no sabor podem não estar perceptíveis no leite, mas, sim, em seus derivados, as principais causas estão relacionadas a higienização inadequada de

equipamentos; presença de minerais na água, como cobre e ferro; água ácida e tubulações de cobre; uso de sanitizantes à base de cloro; uso de alimentos pobres em vitamina E; fornecimento de altos teores de gordura vegetal (grãos de soja, semente de algodão, semente de linhaça) e exposição do leite à luz solar ou fluorescente (ACURI *et al.*, 2005).

Os antioxidantes presentes no leite podem funcionar por meio de inúmeros mecanismos. Diferentes enzimas podem impedir a formação de radicais ou sequestrar os radicais de peróxido de hidrogênio e outros peróxidos, outras enzimas catalisam a síntese ou a regeneração de antioxidantes não-enzimáticos, entre estas, podem ser encontradas no leite a superóxido dismutase e catalase, outra família de enzimas com funções antioxidantes são a glutathione contendo selênio peroxidase (LINDMARK-MANSSON & AKESSON, 2000).

Antioxidantes não enzimáticos podem ser formados no organismo do animal ou serem incluídos nas dietas como nutrientes essenciais, entre estes podem ser citados a proteína lactoferrina, vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E (tocoferóis e tocotrienóis) e alguns carotenóides. Vários antioxidantes não enzimáticos atuam como captadores de radicais na fase lipídica, tais como vitamina E, carotenóides e ubiquinol enquanto que a vitamina C atua na fase aquosa. Outros podem reagir em ambas as fases, lipídica e aquosa, tais como alguns flavonóides, que operam tanto como sequestradores de radicais e ligantes de íons metálicos. Além disso, o fornecimento alimentar de algumas vitaminas B e elementos traços são importantes para a atividade ótima de vários enzimas antioxidantes (LINDMARK-MANSSON & AKESSON, 2000).

Os antioxidantes são definidos como substâncias capazes de diminuir ou prevenir a oxidação de outras moléculas presentes em baixas concentrações quando comparadas ao substrato oxidável (HALLIWEL *et al.*, 1995). Estes podem estar presentes naturalmente ou serem adicionados intencionalmente nos alimentos, mantendo intactas suas características sensoriais, além de não causar efeitos fisiológicos negativos, serem lipossolúveis, resistentes aos processos de conservação dos alimentos e ativos em baixas temperaturas (ORDÓÑEZ *et al.*, 2005).

O principal tipo de antioxidante utilizado na indústria de alimentos é o sintético, com destaque para o BHA (hidroxianisol butilado), o BHT (hidroxitolueno butilado), o PG (galato de propila), e o TBHQ (terc-butil-hidroquinona) (SHAHIDI, 2000). Pesquisadores apontam os possíveis malefícios à saúde decorrentes do efeito acumulativo dos antioxidantes sintéticos (ARABSHAHI-DELOUEE & UROOJ, 2007),

consequentemente novas alternativas têm sido buscadas para a substituição destes. Há um número crescente de pesquisas para o desenvolvimento e utilização de antioxidantes de fontes naturais. Desde tempos pré-históricos, ervas e especiarias têm sido usadas não apenas como aromas alimentares, mas também por suas propriedades medicinais e anti-sépticas. Efeitos conservante sugeriram a presença de constituintes antimicrobianos e antioxidantes (ADEGOKE *et al.*, 1998).

Os antioxidantes naturais podem ser extraídos de vegetais e plantas. Muitas ervas e especiarias utilizadas como condimentos em alguns pratos, são excelentes fontes de compostos fenólicos, tais substâncias têm demonstrado alto potencial antioxidante, podendo ser usadas como conservantes naturais para alimentos (RICE-EVANS *et al.*, 1996; ZHENG & WANG, 2001). O alecrim (RHEE, 1987) tem sido sem dúvida um dos mais estudados antioxidantes naturais, porém outros também têm sido alvos de investigação, entre eles o orégano (GOVARIS *et al.*, 2004) que é outra especiaria muito utilizada em alimentos e que apresenta um bom potencial antioxidante (GRÜN *et al.*, 2006).

2.4 Orégano

O orégano (*Origanum vulgare*) é uma planta perene que se adapta bem em solos secos e calcários (Figura 2). A grande maioria das espécies de *Origanum* é nativa do Mediterrâneo, mas também são cultivadas por toda Europa, ao leste e centro da Ásia e Taiwan. Também é encontrada nas Américas, onde foi introduzida pelo homem como tempero, na América do Sul o principal produtor é o Chile, seguido pela Bolívia e Peru (CLEFF *et al.*, 2009).



Figura 2. Orégano (*Origanum Vulgare*). Fonte: O autor.

A denominação orégano engloba várias espécies, a mais comum está presente no gênero *Origanum*. Sua composição química varia dependendo da espécie, clima, altitude, tempo de colheita e estágio de crescimento. As folhas secas e o óleo essencial de *Origanum vulgare* têm sido usados medicinalmente por vários séculos em diferentes partes do mundo, e seu efeito positivo sobre a saúde humana tem sido atribuído à presença de compostos antioxidantes na erva e conseqüentemente em seus produtos derivados (PEAK *et al.*, 1991; CERVATO *et al.*, 2000). Além de possuírem propriedades bactericidas e efeito estimulante, eles também são antiespasmódico, antinfecioso, antiséptico, vasoconstritor (TSINAS, 1999).

Vários estudos estão focando as capacidades químicas do extrato desse gênero devido a suas diversas propriedades e ao alto interesse na substituição dos aditivos sintéticos na conservação de alimentos (LOZANO *et al.*, 2004). As propriedades do orégano são atribuídas, principalmente, a presença de compostos fenólicos, estes possuem grande quantidade de propriedades fisiológicas (como antialérgica, antiaterogênica, anti-inflamatória, antimicrobiana, antitrombótica e vasodilatadora). Mas o principal efeito dos compostos fenólicos tem sido atribuído à sua ação antioxidante em alimentos (BALASUNDRAM *et al.*, 2006).

Compostos fenólicos englobam moléculas simples até outras com alto grau de polimerização (BRAVO, 1998). Estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligado a açúcares (glicosídeos) e proteínas (CROFT, 1998). Os fenólicos estão divididos em dois grande grupos: os flavonóides e os ácidos fenólicos. Antioxidantes fenólicos atuam como sequestradores de radicais e algumas vezes como quelantes de metais (SHAHIDI *et al.*, 1992), agindo, nas etapas de iniciação e propagação do processo oxidativo. Os principais compostos fenólicos identificados no orégano são: glicosídeos fenólicos; ácido caféico, ácido protocatecuico, apigena, eriodictol, diidro-quercetina e diidro-kaempferol (CINTRA, 1999).

Na literatura, existem diversos estudos sobre os efeitos relacionados à proteção oxidativa de lipídios através da suplementação de animais monogástricos com orégano. Foram verificados efeitos em frangos de corte, perus e coelhos após estocagem a 4 e 20°C (BOTSOGLOU *et al.*, 2002; GIANNEMAS *et al.*, 2005; GOVARIS *et al.*, 2004; BOTSOGLOU *et al.*, 2004), além do efeito protetor sob gemas de ovos de galinhas poedeiras e a redução na peroxidação de lipídios plasmáticos de em frangos de corte (GÓMEZ *et al.*, 2003; TRAESEL *et al.*, 2011).

Além da atividade antioxidante, o estudo da atividade antibacteriana do orégano e de seus diferentes extratos e óleo essencial tem sido executado sobre bactérias e fungos patogênicos e deteriorantes. Sahin *et al.* (2003) conduziram um estudo para avaliar a efetividade antibacteriana do extrato metanólico e do óleo essencial de orégano sobre uma série de bactérias de interesse em alimentos e observaram que o óleo essencial foi efetivo na inibição da grande maioria das bactérias ensaiadas, em destaque as bactérias patogênicas *E. coli* O157: H7, *Salmonella spp.* e *S. aureus*. Marino *et al.* (2001) analisando o efeito antimicrobiano de várias especiarias notaram que o óleo essencial de orégano foi o mais efetivo na inibição de bactérias Gram positivas e Gram negativas. Também foram verificados efeitos sobre a inibição da população de *Salmonella enteridis* em refeição tipo salada (KOUTSOUMANIS *et al.*, 1999) e a redução inicial da população de *Salmonella tiphymurium* para filés bovinos através da combinação do óleo e embalagens modificadas (SKANDAMIS *et al.*, 2002).

Com a comprovação da atividade antimicrobiana de diversos óleos essenciais, inclusive do orégano, os pesquisadores examinaram o potencial destes para modificar populações microbianas do rúmen, a fim de aumentar a eficiência da fermentação ruminal e melhorar a utilização de nutrientes (BENCHAAR & GREATHEAD, 2011). Estudos *in vitro* foram conduzidos e com base nos resultados observaram que os compostos fenólicos (timol, eugenol, carvacrol) ou óleos essenciais com altas concentrações desses compostos fenólicos podem ser eficazes, pelo menos *in vitro*, na redução de produção de metano pelos ruminantes (MACHEBOEUF *et al.*, 2008).

2.5 Influência do tratamento térmico sobre os ácidos graxos do leite

Os métodos de conservação, que utilizam o calor, visam principalmente à eliminação dos microrganismos indesejáveis, que se encontram no alimento. A aplicação dos processos de conservação pelo calor está condicionada ao grau adequado de temperatura, ao tempo de sua exposição, às diferentes características dos produtos a serem submetidos aos tratamentos, como também a resistência térmica dos microrganismos a serem destruídos. A intensidade e o tempo de exposição ao calor, além de sua vigorosa ação sobre os microrganismos, podem alterar também o valor nutritivo e modificar a natureza histológica, física e química do alimento, reduzindo as suas qualidades sensoriais e nutricionais, tornando-o inadequado ao consumo humano e conseqüentemente, reduzindo o seu valor comercial. Portanto, a aplicação do calor

como método de conservação necessita de um rigoroso controle, sob pena de destruir ou modificar diversos componentes dos alimentos, ao invés de contribuir para a sua conservação (SILVA, 2000).

Com relação ao tempo e a temperatura a ser utilizado, o processo de conservação pode ser realizado de duas maneiras, a esterilização comercial e a pasteurização. A chamada esterilização comercial do leite é o processo de Ultra Alta Temperatura (UAT), que segundo a Tetra Pak (1996) é uma técnica para a preservação de alimentos líquidos por meio da sua exposição ao calor intenso por um rápido período de tempo, destruindo os microrganismos do produto, e que para o leite deve ser conduzido da seguinte forma, o produto homogeneizado deve ser submetido, durante 2 a 4 segundos, a uma temperatura entre 130°C e 150°C, mediante um processo térmico de fluxo contínuo, imediatamente resfriado a uma temperatura inferior a 32°C e envasado, sob condições assépticas, em embalagens esterilizadas e hermeticamente fechadas (BRASIL, 1997).

O processo de pasteurização pode ser realizado de duas formas diferentes, a pasteurização lenta, na faixa de 62 a 65°C durante 30 a 35 minutos, também conhecida como pasteurização LTLT (*Low Temperature, Long Time* ou temperatura baixa, tempo longo) e a pasteurização rápida, na faixa de 72 a 75°C, durante 15 a 20 segundos, também conhecida como pasteurização HTST (*High Temperature, Short Time*, ou alta temperatura, tempo curto) (SANVIDO, 2007).

A pasteurização lenta é um processo de pouca utilização industrial, continua sendo empregada a nível laboratorial e pelos pequenos produtores rurais, na pasteurização do leite (SILVA, 2000), além de ser prática comum e indicada para conservação de leite materno em bancos de leite humano (NASCIMENTO & ISSLER, 2004).

O comportamento do leite submetido ao aquecimento é função não somente da temperatura alcançada, mas também da duração do aquecimento. O aquecimento do leite acarreta numerosas consequências, entre as quais pode se citar por sua maior importância, modificação da estabilidade da solução coloidal e da emulsão graxa e a modificação de cor e sabor. Estas transformações são o resultado de ações complexas do calor sobre os diversos componentes do leite, sendo que os componentes da gordura são pouco sensíveis aos tratamentos térmicos moderados, é preciso alcançar temperaturas muito superiores a 100°C ou realizar um aquecimento prolongado durante várias horas a 70-80°C para detectar uma degradação (VEISSEYRE, 1988), situação

que é comprovados pelos resultados de Souza (2003) e Costa *et al.* (2011b) que estudaram a influência dos diferentes tratamentos térmicos sobre o perfil lipídico dos leites *in natura* e termicamente tratados.

2.6 Análise Sensorial

Um alimento além de seu valor nutritivo deve produzir satisfação e ser agradável ao consumidor, sendo isto, resultado do equilíbrio de diferentes parâmetros de qualidade sensorial (BARBOZA *et al.*, 2003). O consumidor tende a se tornar mais seletivo e exigente na hora de optar pelas marcas à sua disposição, em virtude disso, as indústrias precisam inovar ou desenvolver produtos que antecipem essas necessidades para surpreender o consumidor e ganhar mercado na frente da concorrência (ATHAYDE, 1999). A partir dos avanços ocorridos na produção de alimentos tornou-se necessária a criação de métodos que descrevessem as interações entre o homem e sua percepção em relação às características do produto. Assim, a análise sensorial vem se desenvolvendo juntamente com as tecnologias de fabricação de alimentos (MANFUGÁS, 2007).

A análise sensorial é uma ciência que utiliza como ferramenta principal o consumidor, em seus aspectos psicológicos e fisiológicos. Esta avalia as características dos alimentos através das percepções identificadas pelos sentidos da visão, olfato, gosto, tato e audição. Tais percepções são respostas frente às características dos produtos que podem ser mais ou menos representativas, a depender da aplicação ou não de métodos de análise destas respostas (MANFUGÁS, 2007). O objetivo da avaliação sensorial é detectar diferenças entre os produtos baseado nas diferenças perceptíveis na intensidade de alguns atributos (FERREIRA *et al.*, 2000), contudo, conforme o produto, o atributo sensorial e a finalidade do estudo existem recomendações de métodos, estes são classificados em discriminativos, descritivos e afetivos (ABNT, 1993).

Os testes descritivos são utilizados em avaliações em que são necessários a seleção e/ou treinamento da equipe sensorial e em que é exigida uma avaliação objetiva, ou seja, na qual não são consideradas as preferências ou opiniões pessoais dos membros da equipe, como no caso dos testes afetivos (FERREIRA *et al.*, 2000).

Os métodos descritivos podem ser testes de avaliação de atributos (por meio de escalas), perfil de sabor, perfil de textura, Análise Descritiva Quantitativa (ADQ) e teste de tempo-intensidade (ABNT, 1993). Neste tipo de método sensorial procura-se definir as propriedades do alimento e medi-las da maneira mais objetiva possível, as

preferências ou aversões dos julgadores não são importantes neste teste, o objetivo é detectar a magnitude ou intensidade dos atributos do alimento (ANZALDÚA-MORALES, 1994).

O perfil de atributos é um teste que avalia a aparência, cor, odor, sabor e textura de um produto comercializado ou em desenvolvimento, amplamente recomendado em desenvolvimento de novos produtos, para estabelecer a natureza das diferenças entre amostras ou produtos, em controle da qualidade (TEIXEIRA *et al.*, 1987).

Os testes afetivos são uma importante ferramenta de análise sensorial, por acessar diretamente a opinião de consumidores efetivos e potenciais (MORETTI, 2007). Estes podem ser utilizados para aperfeiçoar produtos e/ou processos, buscando-se a melhoria da qualidade e a redução dos custos de produção e de distribuição. Podem determinar a preferência geral ou aceitação dos consumidores por vários aspectos das propriedades sensoriais de produtos como aparência, aroma, sabor e textura. Esse tipo de teste pode permitir a compreensão dos fatores que afetam a preferência geral ou a aceitação do produto, podendo ser usado para avaliar as respostas de um grande número de consumidores de 50 a 400, com respeito as suas preferências, gostos, opiniões e atributos sensoriais dos produtos (MEILGAARD *et al.*, 1991).

Os métodos afetivos de preferência têm por objetivo avaliar a preferência do consumidor quando ele compara dois ou mais produtos entre si. Estes são normalmente comparativos, não fornecendo medida de aceitação do produto, a menos que a preferência seja manifestada em relação a um produto de aceitação conhecida (CHAVES, 1993).

Existem diversos testes de preferência, dentre eles cita-se o de comparação múltipla (MINIM, 2006). Pela técnica de comparação múltipla uma amostra-referência ou padrão, identificada com a letra R ou P, é apresentada aos julgadores juntamente com uma série de amostras-teste, codificadas. Ao julgador é solicitado avaliar as amostras e comparar cada amostra-teste com a referência (R) em relação a alguma característica específica de qualidade sensorial ou pela qualidade sensorial global ou ainda pela preferência. Essa comparação é realizada utilizando-se uma escala preestabelecida e os julgadores devem ser orientados quanto à utilização da técnica. Se o teste for de diferença se faz necessário o treinamento deste em relação aos atributos avaliados (CHAVES, 2001).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da inclusão de orégano na alimentação de vacas leiteiras sobre a qualidade química do leite *in natura* e pasteurizado e características sensoriais do leite pasteurizado.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Analisar o efeito das dietas sobre as características físico-químicas do leite *in natura* a partir das análises de densidade, índice crioscópico, gordura, proteína, lactose, EST e ESD;
- b) Investigar o efeito da inclusão de níveis crescentes de orégano na alimentação das vacas sobre a composição de ácidos graxos, qualidade nutricional e atividade da enzima Δ^9 -dessaturase para as amostras de leite *in natura*;
- c) Determinar o efeito da pasteurização lenta sobre a composição de ácidos graxos do leite;
- d) Verificar se as amostras de leite *in natura* após o tratamento térmico encontravam-se aptas para o consumo através das análises microbiológicas de coliformes totais e fecais (*Escherichia coli*);
- e) Avaliar a influência da suplementação com orégano sobre as características sensoriais dos leites através de teste de preferência de comparação múltipla e perfil descritivo de sabor.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local do Experimento

O experimento foi conduzido na fazenda Paulistinha, na cidade de Macarani-BA, no período de outubro de 2010 a janeiro de 2011. Todos os procedimentos experimentais foram realizados na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) no *campus* de Itapetinga-BA.

As análises químico-bromatológicas referentes à alimentação fornecida foram realizadas no Laboratório de Bovinocultura de Leite. Para as amostras de leite as análises físico-químicas, sensoriais, microbiológicas e de ácidos graxos foram realizadas no Laboratório de Processamento de Leite e Derivados, Laboratório de Análise Sensorial, Laboratório de Microbiologia e Centro de Análises Cromatográficas, respectivamente.

4.2 Delineamento Experimental para Obtenção do Leite

Foram utilizadas 12 vacas mestiças Holandês x Zebu (grau de sangue variando de $\frac{1}{2}$ a $\frac{3}{4}$ de sangue H x Z), de terceira ou quarta lactação, com produção anterior entre 2.500 e 3.000 kg, ajustada para 300 dias, manejadas a pasto na época das águas, e com 110 dias, em média, de lactação no início do período experimental.

As 12 vacas lactantes foram distribuídas em três Quadrados Latinos 4 x 4. O experimento foi constituído de quatro períodos experimentais, com duração de 21 dias cada, sendo os primeiros 18 considerados de adaptação e os 3 restantes para coleta de dados, conforme recomendado por Oliveira (2000).

Os animais foram alojados em baias individuais, providas de cocho e bebedouros automáticos, com uma área de quatro metros quadrados. O alimento foi oferecido na forma de mistura completa, duas vezes ao dia, às 6 e às 15 horas, à vontade, de modo a permitir de 5 a 10% de sobras.

Os quatro tratamentos foram constituídos de diferentes níveis de suplementação concentrada, tendo como volumoso a cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), variedade RB 72-454, tratada com 1% de uma mistura de uréia e sulfato de amônia (9:1 partes), na fase experimental, após um período de adaptação, de uma semana, de todos

os animais com cana e 0,5% desta mistura. Os níveis de suplementação concentrada foram definidos pelo balanceamento das dietas para conter nutrientes suficientes para manutenção e produção de 15 Kg.dia⁻¹ de leite, de acordo com o NRC (2001), com base nos dados da análise bromatológica da cana-de-açúcar, previamente feita no início do período de adaptação. As proporções estimadas dos ingredientes nos concentrados são apresentadas na Tabela 1, na base de matéria seca (MS). A relação volumoso:concentrado foi de 60:40, na base da MS. Os níveis de inclusão de orégano, na forma seca, foram determinados com base no nível de inclusão do óleo essencial na dieta de cordeiros, 0,055% da dieta, conforme Simitzis *et al.* (2008).

Tabela 1. Proporção dos ingredientes da dieta nos concentrados e volumoso, com base na matéria seca (%).

Item (%)	Níveis de inclusão de orégano			
	0 %	0,8 %	1,6 %	2,4%
Cana-de-açúcar	64,93	64,93	64,93	64,93
Milho	20,96	20,09	19,22	18,35
Soja	12,06	12,08	12,10	12,12
Orégano	0,00	0,84	1,69	2,54
Sal mineral ¹	0,90	0,90	0,90	0,90
Fosfato bicálcico	0,75	0,75	0,75	0,75
Calcário	0,41	0,41	0,41	0,41

¹Composição: Cálcio, 20,5%; Fósforo, 10%; Magnésio, 15 g; Enxofre, 12g; Sódio, 68 g; Selênio, 32mg; Cobre, 1.650 mg; Zinco, 6285 mg; Manganês, 1960 mg; Iodo, 195 mg; Ferro, 560 mg; Cobalto, 200 mg.

Do 19^o ao 21^o dia de cada período experimental, amostras do alimento oferecido foram congeladas. Ao final do período experimental, as amostras do alimento oferecido, cana-de-açúcar e concentrado, foram pré-secas e compostas, por animal e período, na base do peso. Posteriormente, foram moídas, em moinho com peneira de malha de 1 mm, acondicionadas em vidro com tampa e armazenadas para realização das análises.

4.3 Composição Químico-Bromatológica e Perfil de Ácidos Graxos da Dieta

As análises de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), fibra detergente neutro livre de cinzas e proteínas (FDNcp), carboidratos não

fibrosos (CNF), hemicelulose (HEM) e lignina (Lig) das dietas, concentrado e volumoso foram realizadas conforme Silva & Queiroz (2002).

As amostras de alimentos foram acondicionadas em sacos de fibra sintética TNT, gramatura de 100, com dimensão de 7 x 7 cm, na quantidade de 2,5 g de MS/saco, a fim de manter 20 g de MS/cm² de área superficial do saco (NOCEK, 1988) para incubação e determinação da FDN. O teor de carboidratos não fibrosos, devido à presença de uréia nas dietas, foi estimado segundo Hall (2001): CNF = 100 - ((%PB - %PB derivado da uréia + peso da uréia) + % FDN + % EE + % Cinzas). Na Tabela 2 estão apresentadas as composições da cana-de-açúcar e dos concentrados.

Tabela 2. Composição químico-bromatológica dos ingredientes da dieta com base na matéria seca (MS).

Item (%)	Cana-de-açúcar	Milho	Farelo de soja	Orégano
MS	24,81	85,81	86,08	80,45
MO	96,35	98,70	91,20	91,9
PB	13,63	7,11	44,50	10,48
EE	1,36	3,00	3,40	3,27
FDN	56,20	23,40	14,30	38,65
FDA	37,90	6,63	9,65	19,85
HEM	18,29	16,72	4,65	18,78
Lig	7,91	1,12	4,00	6,24

MS- Matéria Seca, MO- Matéria Orgânica, PB- Proteína Bruta, EE- Extrato Etéreo, FDN- Fibra em Detergente Neutro, FDA - Fibra em Detergente Ácido, HEM – Hemicelulose e Lig – Lignina.

Para obtenção do perfil de ácidos graxos das dietas, os lipídios das amostras foram extraídos de acordo com metodologia proposta por Folch *et al.* (1957) com clorofórmio, metanol e água (2:1:1). O preparo dos ésteres metílicos foi realizado conforme o método 5509 da ISO (1978). Em um tubo de tampa rosqueável, foram adicionados à matéria lipídica extraída, 2,0 mL de n-heptano e 2,0 mL de KOH 2,0 mol.L⁻¹ em metanol com posterior agitação vigorosa. Após separação das fases, o sobrenadante foi transferido e armazenado sob refrigeração. As análises cromatográficas foram realizadas conforme descrito no item 4.5.1.3 e a identificação dos ésteres metílicos de acordo com o item 4.5.1.4. A composição químico-bromatológica e de ácidos graxos, em percentual, para as dietas estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Composição químico-bromatológica e de ácidos graxos das dietas utilizadas nos diferentes tratamentos, com base na matéria seca (%).

Item	Níveis de inclusão de orégano			
	0 %	0,8 %	1,6 %	2,4%
Químico-Bromatológica (%)				
MS	46,20	46,20	46,19	46,22
MO	93,08	93,43	93,56	93,74
FDN	49,92	50,05	50,06	49,98
FDA	27,50	28,01	28,41	27,43
FDNcp	44,09	44,27	44,27	44,13
PB	16,84	16,88	16,80	16,82
EE	2,03	2,12	2,12	2,16
CNF	33,72	34,10	33,42	33,37
Ácidos Graxos (%)				
Saturados				
14:0	0,06	0,06	0,09	0,10
16:0	17,2	16,96	16,58	16,3
18:0	3,86	3,19	3,16	3,09
20:0	0,80	0,68	0,65	0,59
22:0	0,06	0,07	0,09	0,10
Insaturados				
16:1	0,10	0,11	0,11	0,12
17:1	0,05	0,06	0,06	0,06
18:1n-9c	40,59	36,31	33,19	31,63
18:2n-6	35,56	41,11	42,55	43,69
18:3n-3	1,33	1,67	2,39	3,10
20:2	n.d.	0,02	0,36	0,41
20:3n-6	n.d.	n.d.	0,04	0,06

*n.d. – não detectado; MS - Matéria Seca, MO - Matéria Orgânica, FDN - Fibra em Detergente Neutro, FDA - Fibra em Detergente Ácido, FDNcp - Fibra Detergente Neutro Livre de Cinzas e Proteínas, PB - Proteína Bruta, EE - Extrato Etéreo, CNF - Carboidrato Não Fibrosos.

4.4 Amostragem

As coletas de amostras individuais de leite de cada animal foram realizadas no 19^o e 20^o dias do período experimental. As amostras eram compostas do leite das ordenhas da manhã e da tarde, sendo a proporção determinada pela produção nas respectivas ordenhas.

Após ordenha, parte das amostras de leite *in natura* foram imediatamente congeladas e aproximadamente 10 L de leite foram encaminhados para o *campus* da universidade para pasteurização.

O leite *in natura* foi submetido à pasteurização lenta à 65°C/30 minutos sob agitação constante, sendo em seguida resfriado até ~ 4°C. Amostras de leite

pasteurizado foram conduzidas para o Laboratório de Análise Sensorial e outra parcela congelada para realização das análises.

4.5 Procedimento Experimental

4.5.1 Análise de Ácidos Graxos

4.5.1.1 Extração dos Lipídios Totais

Para a extração dos lipídios totais do leite *in natura* e pasteurizado, 50,0 mL de cada amostra descongelada foram centrifugados a 12.000 rpm por 30 min a 4°C, em Micro-Centrífuga de Alta Rotação Himac CF-16RX II. A camada sólida formada na parte superior foi coletada e armazenada em frascos eppendorfs para posterior análise (REVENEAU, 2008).

4.5.1.2 Preparação de Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos

Os lipídios extraídos do leite *in natura* e pasteurizado foram submetidos à preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos, conforme procedimento descrito por Bannon *et al.* (1982) com modificações descritas por Simionato *et al.* (2010).

Foram adicionados 5,0 mL de solução de metóxido de sódio 0,25 mol.L⁻¹ em metanol-dietil éter (1:1), em um tubo de tampa rosqueável com aproximadamente 150 mg de lipídios, agitando por 3 minutos. À mistura, foram adicionados 2,0 mL de iso-octano e 10,0 mL de solução saturada de cloreto de sódio. O tubo foi novamente agitado e deixado em repouso para separação das fases, o sobrenadante foi transferido para frascos eppendorf devidamente identificados, para posterior análise cromatográfica.

4.5.1.3 Análise Cromatográfica dos Ésteres de Ácidos Graxos

Os ésteres de ácidos graxos foram analisados por um cromatógrafo à gás Thermo Finnigan, modelo Trace-GC-Ultra, equipado com Detector de Ionização de Chama (DIC) e coluna capilar de sílica fundida BPX-70 (120m, 0,25mm d.i). As vazões dos gases (White Martins) foram de 6,5 mL.min⁻¹ para o gás de arraste (H₂); 30 mL.min⁻¹

¹ para o gás auxiliar (N₂); 30 mL.min⁻¹ para o H₂ e 250 mL.min⁻¹ para o ar sintético da chama. A razão da divisão da amostra foi de 90:10.

Os parâmetros de funcionamento foram estabelecidos após verificação da condição de melhor resolução. As temperaturas do injetor e detector foram 250°C e 280°C, respectivamente. A temperatura da coluna foi programada a 140°C por 10 minutos, seguido por uma primeira rampa de 15°C/min até atingir 200°C, permanecendo por 1 minuto. A segunda rampa foi de 10°C/min até atingir 230°C, permanecendo 1 minuto nesta temperatura. A terceira rampa de 0,4°C/min até atingir 233°C por 3 minutos. A última rampa foi de 0,5°C/min até atingir 238°C por 2 minutos. O tempo total de análise foi de 41,50 minutos.

As injeções foram realizadas em duplicata e os volumes das injeções foram de 1,2 µL. As áreas dos picos dos ésteres metílicos de ácidos graxos foram determinadas através do software ChromQuest 4.1.

4.5.1.4 Identificação dos Ésteres Metílicos de ácidos graxos

A identificação dos ésteres metílicos de ácidos graxos foi realizada após verificação do Comprimento Equivalente de Cadeia (ECL - *Equivalent Length of Chain*) dos picos (Visentainer & Franco, 2006) e comparação dos tempos de retenção de padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos contendo os isômeros *cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12 do ácido linoléico (189-19, O-5632 e O-5626, Sigma, EUA).

4.5.1.5 Avaliação da Resposta do Detector de Ionização de Chama

Para avaliar a resposta do DIC foi utilizada uma solução constituída de uma mistura de padrões (Sigma) de ésteres metílicos de ácidos graxos com concentração conhecida. O fator de resposta foi calculado em relação ao tricosanoato de metila (23:0), através da Equação 1, conforme método proposto por Ackman (1972). Os fatores foram obtidos a partir da média de quatro repetições.

$$F_R = \frac{A_{23:0} \cdot C_x}{A_x \cdot C_{23:0}} \quad (1)$$

Onde:

A_{23:0}= Área do tricosanoato de metila;

C_x = Concentração de ésteres metílicos de ácidos graxos;

A_x = Área do éster metílico de ácido graxos;

$C_{23:0}$ = Concentração tricosenoato de metila.

4.5.1.6 Análise Quantitativa dos Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos

Para as amostras de leite *in natura* foi realizada a quantificação dos ácidos graxos, em $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de lipídios totais, utilizando o padrão interno tricosenoato de metila (23:0) (Sigma, EUA). Após a pesagem dos lipídios (~ 150 mg) para transesterificação foram adicionados a todas as amostras, com auxílio de uma micropipeta, 1000 μL da solução de padrão interno com concentração conhecida ($1,00 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Para a quantificação foram utilizados os fatores de resposta experimental, após verificação da concordância destes valores com os teóricos (COSTA *et al.*, 2011b).

As concentrações dos ácidos graxos presentes na amostra foram obtidas conforme Joseph & Ackman (1992), através da Equação 2.

$$C_x = \frac{A_x \cdot M_P \cdot F_R}{A_P \cdot M_a \cdot F_C} \quad (2)$$

Onde:

A_x = área dos ésteres metílicos dos ácidos graxos;

A_P = área do padrão interno;

M_P = massa do padrão interno adicionado a amostra (mg);

M_a = massa da amostra (g);

FR = Fator de Resposta;

FC = Fator de Conversão Éster Metílico para ácidos graxos.

A quantificação dos ácidos graxos do leite pasteurizado baseou-se no método da normalização de área (VISENTAINER & FRANCO, 2006), em que expressa-se a concentração dos mesmos em porcentagem relativa de lipídios totais.

4.5.1.7 Índice de Qualidade Nutricional dos Lipídios do Leite In Natura

A qualidade nutricional da fração lipídica do leite *in natura* foi avaliada através do Índice de Aterogenicidade (IA) e Índice de Trombogenicidade (IT), a partir dos

resultados obtidos para os ácidos graxos encontrados nas amostras. Os cálculos foram realizados segundo Ulbricht & Southgate (1991), através das seguintes equações:

$$IA = \frac{12 : 0 + (4 \cdot 14 : 0) + 16 : 0}{\Sigma AGM + \Sigma n - 6 + \Sigma n - 3} \quad (3)$$

$$IT = \frac{14 : 0 + 16 : 0 + 18 : 0}{(0,5 \cdot \Sigma AGM) + (0,5 \cdot \Sigma n - 6) + (3 \cdot \Sigma n - 3) + (\Sigma n - 3 / \Sigma n - 6)} \quad (4)$$

Onde:

$\Sigma AGMI$ = Somatório de Ácidos Graxos Monoinsaturados;

$\Sigma n-6$ = somatório dos ácidos graxos da família ômega-6;

$\Sigma n-3$ = somatório dos ácidos graxos da família ômega-3;

$\Sigma n-3/\Sigma n-6$ = relação dos ácidos graxos da família ômega 6 e 3.

4.5.1.8 Índices de Atividade da Enzima Δ^9 -Dessaturase

Na ausência de medidas diretas, razões do produto e substrato da gordura do leite têm sido utilizados para estimar a atividade da enzima Δ^9 -dessaturase na glândula mamária (GRIINARI *et al.*, 2000), e ainda existem estudos que apontaram que estas razões de ácidos graxos do leite estão relacionadas positivamente com a atividade mamária da Δ^9 -dessaturase (SINGH *et al.*, 2004; BERNARD *et al.*, 2005).

O índice da Δ^9 -dessaturase foi definido como o produto da Δ^9 -dessaturase em razão da soma do produto da Δ^9 -dessaturase com substrato da Δ^9 -dessaturase (KELSEY *et al.*, 2003). O índice de dessaturase foi calculado para quatro pares de ácidos graxos que representam produtos e substratos para a Δ^9 -dessaturase, estes pares de ácidos graxos foram 14:1n-9c/14:0; 16:1n-9c/16:0; 18:1n-9c/18:0; 18:2c9t11/18:1n-7t. Por exemplo o índice de CLA-dessaturase seria calculado como: (18:2c9t11)/(18:2c9t11 + 18:1n-7t).

4.5.2 Análises Físico-químicas

As análises de composição físico-química do leite foram feitas em triplicata, para densidade (g.mL⁻¹) a 15°C, pelo termolactodensímetro de Quevenne; índice

crioscópio (°H), utilizando crioscópio eletrônico LAKTRON 312-L (BRASIL, 2011). Os percentuais de gordura, proteína, lactose e Extrato Seco Total (EST) foram determinados em analisador de leite por ultra-som, Lactoscan LA. O Extrato Seco Desengordurado (ESD) foi estimado pela diferença entre o EST e o percentual de gordura.

4.5.3 Análises Microbiológicas

A qualidade microbiológica das amostras de leite pasteurizado foi avaliada por meio de análises para coliformes totais e fecais (*Escherichia coli*), no Laboratório de Microbiologia da UESB.

Placas Petrifilm™ EC (3M Company, St. Paul, MN, EUA) foram inoculadas com alíquotas de 1,0 mL de amostra e incubadas por 24h e 48h a uma temperatura de 35°C. Após o período de incubação a leitura dos resultados foi realizada em 24h para coliformes totais e 48h para coliformes fecais de acordo com os procedimentos determinados pelo fabricante e indicadas para análises de leite seguindo metodologia descrita pela APHA (2001). As análises foram realizadas em duplicata e os resultados expressos em UFC.mL⁻¹.

4.5.4 Análise Sensorial

4.5.4.1 Teste de Preferência de Comparação Múltipla

As amostras de leite pasteurizado foram submetidas ao teste de preferência de comparação múltipla para avaliação dos atributos sensoriais sabor e aroma, sendo servidas à temperatura de 10°C para 50 provadores não treinados, entre professores, alunos e servidores da UESB. Para cada período, as amostras foram apresentadas em três sessões e de forma aleatória, sob luz vermelha e em cabines individuais do Laboratório de Análise Sensorial da UESB, de acordo com Minim (2006). Entre cada sessão foi fornecido aos provadores torradas, biscoitos tipo cream cracker e água para limpeza do palato, além destas serem realizadas após intervalos de no mínimo 2h (FERREIRA *et al.*, 2000).

Teste de Comparação Múltipla - Leite Pasteurizado

Nome: _____ Data: _____

Você recebeu uma amostra-padrão (P) e 4 amostras codificadas. Compare cada amostra com o padrão em relação a sua preferência, avaliando o grau de preferência de acordo com a escala abaixo.

- 1 Extremamente MENOS PREFERIDA que o padrão
- 2 Regularmente MENOS PREFERIDA que o padrão
- 3 Ligeiramente MENOS PREFERIDA que o padrão
- 4 Igual ao padrão
- 5 Ligeiramente MAIS PREFERIDA que o padrão
- 6 Regularmente MAIS PREFERIDA que o padrão
- 7 Extremamente MAIS PREFERIDA que o padrão

Código da amostra	Aroma	Sabor
	Intensidade da preferência	Intensidade da preferência

Comentários: _____

Figura 3. Ficha de avaliação utilizada no teste de preferência por comparação múltipla.

Foram apresentadas aos julgadores, uma amostra-padrão identificada com a letra P, juntamente com as amostras a serem avaliadas, devidamente codificadas com números de três dígitos aleatórios. A amostra-padrão foi considerada a amostra de leite proveniente das vacas que receberam as dietas sem orégano naquele determinado período. Os julgadores avaliaram as amostras quanto à preferência, identificando através da escala de intensidade a preferência de cada uma em relação a amostra-padrão. Após a realização do teste, as fichas de avaliação (Figura 3) foram organizadas e separadas por julgador (CHAVES, 2001).

4.5.4.2 Perfil Descritivo

As amostras de leite pasteurizado foram avaliadas sensorialmente quanto aos atributos de sabor e aroma através de um perfil descritivo. Para realização do perfil de sabor foram recrutados 10 julgadores com disponibilidade e afinidade com o produto a ser testado. Estes realizaram um teste triangular (Figura 4) com o objetivo de medir a acuidade e após o teste foi realizado um treinamento para a familiarização dos procedimentos da análise a ser realizada, além do melhoramento das habilidades em reconhecer e identificar os atributos sensoriais, sensibilidade e memória.

Teste Triangular	
Nome: _____	Data: _____
<p>Duas das três amostras apresentadas são idênticas. Por favor, prova as amostras da esquerda para a direita e circule o código daquela que lhe pareça diferente da série apresentada. Enxágüe a boca após cada avaliação e espere 30 segundos.</p>	
_____	_____
Comentários: _____	

Figura 4. Ficha de avaliação para o teste triangular.

Para levantamento dos termos descritivos quanto ao sabor e aroma foram apresentadas amostras com características possivelmente próximas a do leite pasteurizado. Os termos mais utilizados estavam inclusos na ficha de avaliação (Figura 5), onde os provadores, durante as degustações, atribuíram notas em escalas de intensidade de 1 a 5 a cada um dos atributos sensoriais levantados anteriormente. Após avaliação sensorial, em grupo, com ajuda do líder da equipe, foram discutidas as sensações percebidas com o objetivo de obter-se consenso quanto à intensidade dos atributos. Os resultados foram representados, graficamente, por meio de uma forma típica desse método, chamada de “gráfico-aranha”, onde destaca-se a intensidade de cada atributo, sendo o ponto central, zero (DUTCOSKI, 1996).

Perfil de Sabor	
Nome: _____	Data: _____
Código da amostra: _____	
Aroma	
<i>Nota Característica</i>	Intensidade
Aroma Característico	_____
Aroma Adocicado	_____
Sabor	
<i>Nota Característica</i>	Intensidade
Sabor Cozido	_____
Sabor Característico	_____
Sabor Adocicado	_____

Figura 5. Ficha de avaliação para o perfil de sabor.

4.6 Análises Estatísticas

Os dados obtidos a partir das análises físico-químicas, sensoriais e de ácidos graxos foram avaliados por meio de Análise de Variância (ANOVA) e análise de regressão, utilizando-se Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG), versão 9.1 (RIBEIRO JÚNIOR, 2007). Os modelos estatísticos foram escolhidos de acordo com a significância dos coeficientes de regressão, utilizando-se o Teste F a nível de 5%, de determinação (R^2) e com o parâmetro estudado. Para comparação do teor de ácidos graxos entre os tratamentos térmicos foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com 2 tratamentos e 12 repetições para cada um dos níveis de orégano, os dados foram submetidos à ANOVA e teste Tukey a 5% de probabilidade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise de Ácidos Graxos

Os ácidos graxos presentes nas amostras de leite *in natura* e pasteurizado das vacas alimentadas com diferentes níveis de orégano na dieta foram tentativamente identificados com base no comprimento equivalente da cadeia e comparação com padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos.

5.1.1 Composição de ácidos graxos da gordura do leite *in natura*

Foram identificados e quantificados 25 ácidos graxos presentes na gordura do leite *in natura* das amostras (Figura 6), os valores médios obtidos para os ácidos graxos das amostras foram agrupados de acordo com o grau de saturação em saturados, monoinsaturados e poli-insaturados (Tabela 4). Os ácidos graxos encontrados em maiores quantidades nas amostras de leite foram o ácido mirístico (14:0), ácido palmítico (16:0) e ácido oléico (18:1n-9c), que apresentaram percentuais de 15,0; 44,0 e 16,0%, respectivamente, em relação ao conteúdo de gordura do leite.

Em relação aos Ácidos Graxos Saturados (AGS), observou-se efeito do tratamento ($P < 0,05$) sobre o ácido tridecílico (13:0), ácido mirístico (14:0), ácido pentadecílico (15:0) e ácido araquídico (20:0). Com exceção do ácido mirístico (14:0), que apresentou efeito linear para os tratamentos, os demais AGS citados apresentaram efeito quadrático.

As concentrações médias de ácido mirístico (14:0) foram influenciadas de forma linear e decrescente pelos tratamentos, apresentando valores de $91,83 \text{ mg.g}^{-1}$ e $82,51 \text{ mg.g}^{-1}$ para a dieta controle e de 2,4% de orégano, respectivamente. O mesmo efeito foi verificado por Bell *et al.* (2006) ao suplementar a dieta de vacas com óleo de cártamo e Paschoal *et al.* (2007) ao alimentar com soja extrusada adicionada de selênio. A ingestão de ácido mirístico está relacionada ao aumento dos níveis de colesterol total e das Lipoproteínas de Baixa Densidade (LDL – *Low Density Lipoproteins*) (HU *et al.*, 2001; FRENCH *et al.*, 2003), dessa forma a redução do teor de ácido mirístico nas amostras de leite pode ser considerada um fator positivo em relação a suplementação das vacas leiteiras com orégano.

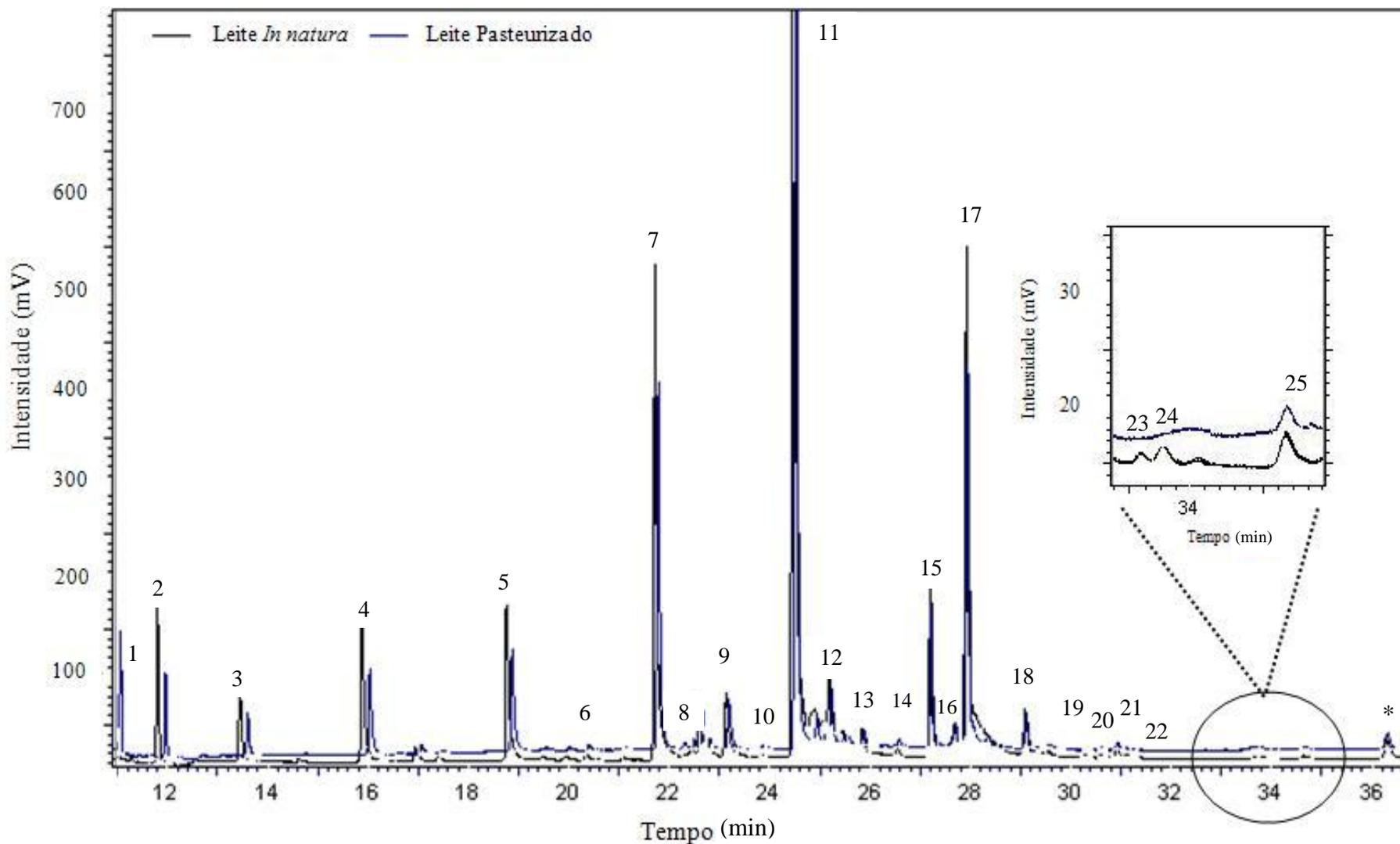


Figura 6. Cromatograma obtido para as amostras de leite *in natura* (—) e leite pasteurizado (—), obtendo os seguintes ácidos graxos: (1) 4:0, (2) 6:0, (3) 8:0, (4) 10:0, (5) 12:0, (6) 13:0, (7) 14:0, (8) 14:1, (9) 15:0, (10) 15:1, (11) 16:0, (12) 16:1, (13) 17:0, (14) 17:1, (15) 18:0, (16) 18:1n-7t, (17) 18:1n-9c, (18) 18:2n-6, (19) 18:3n-3, (20) 20:0, (21) 18:2 9c, 11t, (22) 18:2 10t, 12c, (23) 20:3n-6, (24) 22:0, (25) 20:3n-3 e (*) 23:0 (padrão interno).

Tabela 4. Quantidade de ácidos Graxos, em mg.g⁻¹ de lipídios, presentes nas amostras de leite *in natura* das vacas alimentadas com diferentes níveis de inclusão de orégano.

Ácidos Graxos	Níveis de Orégano				CV (%) ¹	Valor de P ²		
	0%	0,8%	1,6%	2,4%		L	Q	C
Saturados								
4:0	5,71	6,17	6,58	5,85	15,96	ns	ns	ns
6:0	7,62	9,04	8,85	8,15	16,68	ns	ns	ns
8:0	6,05	7,20	7,46	6,81	15,15	ns	ns	ns
10:0	16,88	18,13	19,43	18,14	14,59	ns	ns	ns
12:0	23,53	25,48	25,25	24,59	15,91	ns	ns	ns
13:0 ³	1,30	1,18	1,16	1,28	17,07	ns	0,0499	ns
14:0 ⁴	91,83	92,75	84,11	82,51	12,82	0,0173	ns	ns
15:0 ⁵	10,16	9,62	9,37	10,53	14,90	ns	0,0501	ns
16:0	257,58	261,41	272,30	262,56	14,13	ns	ns	ns
17:0	2,89	3,01	2,99	2,91	13,77	ns	ns	ns
18:0	33,26	36,23	38,79	35,32	13,95	ns	ns	ns
20:0 ⁶	0,61	0,61	0,55	0,70	15,26	ns	0,0940	ns
22:0	0,30	0,30	0,32	0,25	20,46	ns	ns	ns
Monoinsaturados								
14:1 ⁷	9,85	8,73	9,25	9,92	12,97	ns	0,0167	ns
15:1 ⁸	0,92	0,84	0,67	0,71	18,36	0,0002	ns	ns
16:1	14,15	13,88	12,74	12,70	15,01	ns	ns	ns
17:1 ⁹	1,42	1,58	1,70	1,57	14,66	ns	0,0377	ns
18:1n-7t	5,65	6,17	6,37	5,93	18,74	ns	ns	ns
18:1n-9c	96,15	89,36	93,76	97,86	13,55	ns	ns	ns
Poli-insaturados								
18:2n-6 ¹⁰	8,69	7,56	7,62	8,40	13,39	ns	0,0048	ns
18:2 9c, 11t	2,04	2,19	2,27	2,34	19,66	ns	ns	ns
18:2 10t, 12c ¹¹	0,52	0,60	0,75	0,79	22,23	0,0003	ns	ns
18:3n-3 ¹²	0,48	0,46	0,51	0,55	15,30	0,0228	ns	ns
20:3n-3 ¹³	0,60	0,58	0,49	0,48	12,99	0,0005	ns	ns
20:3n-6 ¹⁴	0,25	0,35	0,39	0,30	24,18	ns	0,0019	ns

¹Coefficiente de Variação; ²ns: não significativo (P > 0,05); L, Q e C: efeitos de ordem linear, quadrática e cúbica para a inclusão de orégano na dieta; ³y=0,097x²-0,2407x+1,3045 (R²=0,99); ⁴y=-4,5758x+93,293 (R²=0,81); ⁵y=0,6613x²-1,4815x+10,222 (R²=0,92); ⁶y=0,0594x²-0,1184x+0,6306 (R²=0,65); ⁷y=0,7x²-1,5892x+9,7777 (R²=0,88); ⁸y=-0,1009x+0,9121 (R²=0,81); ⁹y=-0,1131x²+0,346x+1,4109 (R²=0,94); ¹⁰y=0,7416x²-1,8815x+8,6691 (R²=0,98); ¹¹y=0,1192x+0,528 (R²=0,95); ¹²y=0,0298x+0,4672 (R²=0,6437); ¹³y=-0,0539x+0,606 (R²=0,88); ¹⁴y=-0,0755x²+0,2046x+0,2493 (R²=0,95).

Também foi observado o decréscimo nas concentrações médias do ácido tridecílico (13:0) em relação às dietas controle (0%) e de 2,4% de orégano, ocorrendo redução no conteúdo deste AG de 1,30 mg.g⁻¹ até 1,16 mg.g⁻¹ do nível 0% para o nível de 1,6%, com posterior aumento para 1,28 mg.g⁻¹, no nível de 2,4%. O ácido pentadecílico (15:0) e ácido araquídico (20:0) apresentaram comportamentos semelhantes para os tratamentos, sendo observado o decréscimo de 10,16 para 9,37 mg.g⁻¹ e de 0,61 para 0,55 mg.g⁻¹, respectivamente, até o nível de 1,6%, seguido de um pequeno aumento nas quantidades destes AG para a dieta com 2,4% de orégano, observando que o aumento em relação a dieta controle foi de 10,16 mg.g⁻¹ para 10,53 mg.g⁻¹ e 0,61 mg.g⁻¹ para 0,70 mg.g⁻¹, respectivamente. Considerando que estes AGs se encontram em baixas concentrações nas amostras de leite *in natura*, o aumento em seus valores médios não influenciou de maneira significativa no total de AGS presentes nas amostras.

O ácido miristoléico (14:1), ácido 10-pentadecenóico (15:1) e ácido 10-heptadecenóico (17:1) foram os Ácidos Graxos Monoinsaturados (AGM) que apresentaram efeito em relação à dieta. O ácido oléico (18:1n-9c), conhecido pela sua propriedade hipocolesterolêmica, foi o AGM presente em maior quantidade (94,28 mg.g⁻¹), mas não foi influenciado pela adição de orégano no concentrado (P>0,05). O ácido oléico é um produto da atividade da enzima Δ^9 -dessaturase, sendo a atividade desta enzima responsável pela dessaturação de AGS com 14 a 18 átomos de carbono, convertendo-os em seus correspondentes monoinsaturados, com uma ligação dupla no carbono 9 (BEAULIEU *et al.*, 2002).

O ácido miristoléico (14:1) apresentou efeito quadrático para a inclusão de orégano, ocorrendo redução no seu teor da dieta controle para o nível de 0,8% de orégano, seguido de um aumento até o maior nível de orégano (2,4%). O ácido 10-heptadecenóico (17:1) também apresentou efeito quadrático do tratamento, sendo observado aumento na sua concentração de 1,42 mg.g⁻¹ (controle) até 1,70 mg.g⁻¹ (1,6% de orégano), seguido de um decréscimo (1,57 mg.g⁻¹) com a inclusão de 2,4%, valor este próximo ao encontrado para o nível de 0,8% (1,58 mg.g⁻¹). O ácido 10-pentadecenóico (15:1) foi influenciado de forma linear e decrescente pelos tratamentos, apresentando diminuição da sua concentração de 0,92 mg.g⁻¹ para 0,71 mg.g⁻¹. Apesar da inclusão de orégano ter apresentado efeito significativo para alguns AGM, não foram observadas alterações no teor total desta classe de ácidos graxos para os tratamentos.

A ingestão de AGM traz benefícios à saúde humana, estudos atualizados mostram que, quando se substitui os AGS por AGM os níveis de LDL diminuem enquanto HDL (*High Density Lipoprotein*) permanecem inalterados (OLIVEIRA *et al.*, 1982; GRUNDY & DENKE, 1990; MATHERSON *et al.*, 1996; KINSELLA *et al.*, 1990). Ainda continuam as discussões em relação ao consumo dos ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados, apesar de os ácidos graxos insaturados – AGM e AGPI – serem comprovadamente benéficos, ainda há grande discussão sobre o estabelecimento de recomendações e suas respectivas proporções, pois também existem consolidadas evidências sobre a associação negativa entre a ingestão de AGM e AGPI e a incidência de doenças cardiovasculares (SIRTORI *et al.*, 1986; MENSINK & KATAN, 1989).

Os teores dos ácidos graxos da família ômega-6 (n-6) encontrados apresentaram efeito quadrático em relação aos tratamentos, observando que maiores quantidades de ácido linoléico (18:2n-6) foram encontradas para a dieta controle (8,69 mg.g⁻¹), seguidos por uma redução para o nível de 0,8% e posterior aumento até a dieta com 2,4% de orégano (8,40 mg.g⁻¹), mas ainda assim seus teores permaneceram abaixo dos obtidos para a dieta sem orégano. O ácido di-homo-gama-linolênico (20:3n-6) estava presente em maior quantidade para as amostras de leite referente a dieta com 1,6% de orégano (0,39 mg.g⁻¹) e em menor na dieta controle (0,25 mg.g⁻¹ de lipídios totais), sendo que o nível de 2,4% apresentou teores um pouco acima (0,30 mg.g⁻¹) que os encontrados para esta e abaixo quando observado a dieta controle.

Apesar dos efeitos benéficos relacionados aos AGPI, cada vez mais têm se preocupado com a manutenção de uma dieta equilibrada entre as famílias de ácidos graxos n-6 e n-3, pois um aumento de n-6 poderia reduzir o metabolismo de n-3, levando possivelmente a um déficit de seus metabólitos, sendo necessária a manutenção de uma dieta equilibrada entre essas duas famílias de ácidos graxos (SHILS *et al.*, 2003). Assim, os resultados obtidos para os ácidos graxos da família n-6 podem ser considerados positivos, já que os teores destes foram reduzidos quando observados a dieta controle e o nível máximo de inclusão de orégano (2,4%).

Os ácidos graxos da família ômega-3 (n-3) apresentaram comportamento linear em relação à inclusão de diferentes níveis de orégano na dieta. O teor de ácido alfa-linolênico (18:3n-3) apresentou aumento de 0,48 mg.g⁻¹ para 0,55 mg.g⁻¹ e o ácido di-homo-alfa linolênico (20:3n-3) decréscimo de 0,60 para 0,48 mg.g⁻¹. O aumento no teor do ácido alfa-linolênico (18:3n-3) com o aumento dos níveis de inclusão de orégano na

dieta merece ser destacado, já que este ácido graxo da família n-3 é considerado um dos mais importantes clinicamente, além de ser um ácido graxo essencial. Diversos estudos têm demonstrado os efeitos benéficos dos ácidos graxos da família n-3, no metabolismo lipídico, reduzindo os níveis plasmáticos dos triglicerídeos, colesterol total e LDL e a incidência de aterosclerose (NESTEL, 2000; MORAES & COLLA, 2006).

Em humanos, os ácidos graxos das séries n-6 e n-3 são importantes para manter sob condições normais as membranas celulares, as funções cerebrais e a transmissão de impulsos nervosos (YOUUDIM *et al.*, 2000; YEHUDA *et al.*, 2002). Os ácidos linoléico (18:2n-6) e alfa-linolênico (18:3n-3) são considerados ácidos graxos essenciais por não serem sintetizados pelo organismo, os quais devem ser obtidos por meio da alimentação, enquanto os demais ácidos graxos das famílias n-6 e n-3 além de serem obtidos através da dieta, podem ser produzidos pelo organismo a partir da síntese destes dois AG's pela ação de enzimas alongase e dessaturase (CALDER, 2003). Dentre os ácidos graxos das séries n-6 e n-3, de importante valor nutricional, destacam-se o ácido araquidônico (AA, 20:4n-6) e os ácidos eicosapentaenóico (EPA, 20:5n-3) e docosahexaenóico (DHA, 22:6n-3) (SHILS *et al.*, 2003).

Dos Ácidos Graxos Poli-insaturados (AGPI) identificados nas amostras de leite *in natura*, apenas o ácido rumênico (18:2c9t11), isômero do ácido linoléico (CLA - *Conjugated Linoleic Acid*), não apresentou efeito da inclusão de orégano na dieta ($P > 0,05$). O ácido rumênico (18:2c9t11) representou o maior conteúdo de CLA nas amostras (77%) quando comparado com o outro isômero do ácido linoléico (18:2t10c12) encontrado, o que já era esperado por este ser considerado o principal isômero encontrado em gorduras de ruminantes (LOPES *et al.*, 2009).

O ácido trans-10, cis-12-octadecadienóico (18:2t10c12) apresentou efeito linear crescente de 0,52 mg.g⁻¹ (dieta controle) para 0,79 mg.g⁻¹ (2,4% de orégano) do seu conteúdo. Existem estudos *in vitro* utilizando Cinalmadeído, componente de óleo essencial, que observa o seu efeito sobre o processo de biohidrogenação da gordura do rúmen, verificando diferenças no conteúdo de AGPI. Foi observado que ao suplementar um fermentador de cultura com Cinamaldeído houve a inibição aparente da biohidrogenação de 18:2n-6 (ácido linoléico) e 18:3n-3 (ácido linolênico) como refletido pelo acúmulo dos intermediários, 18:1n-10t, 18:2t10c12 e 18:2t11c15 (LOURENÇO *et al.*, 2008). Dessa forma, o aumento no conteúdo do CLA *trans*-10, *cis*-12 pode ser explicado devido ao possível efeito de inibição da biohidrogenação de

alguns AGPI pelos componentes do orégano, e consequente acúmulo deste intermediário.

O teor de CLA na gordura do leite geralmente se encontra entre 0,3 e 1,0%, no entanto, vários fatores podem influenciar o seu conteúdo, como as estações do ano, a alimentação e a raça do animal, o estágio de lactação e o processamento do alimento (PRANDINI *et al.*, 2007). Os isômeros dos CLA têm sido amplamente pesquisados por suas propriedades anticarcinogênicas, associadas ao isômero t9,c11, e capacidade de reduzir a gordura corporal enquanto aumenta, concomitantemente, a massa muscular, associados ao isômero t10,c12 (CAMPBELL *et al.*, 2003; MATTILA-SANDHOLM & SAARELA, 2003).

O CLA é formado no rúmen pela biohidrogenação incompleta do ácido linoléico da dieta. A maior parte, porém, é produzida endogenamente na glândula mamária através da dessaturação do ácido graxo vacênico (18:1n-7t) por uma enzima presente na glândula mamária e no tecido adiposo, a Δ^9 -dessaturase. Como o ácido vacênico também é produzido no rúmen pela biohidrogenação, pode-se dizer que este processo é o grande responsável pela formação de CLAs em ruminantes, o que explica seus produtos serem as maiores fontes deste AG (MEDEIROS, 2002). A enzima Δ^9 -dessaturase também é encontrada em tecidos humanos, por isso, aumentos no consumo de ácido graxo vacênico (18:1n-7t) poderiam ter os mesmos efeitos benéficos associados à ingestão de CLAs (BEORLEGUI, 2004).

O somatório dos Ácidos Graxos Saturados (AGS) representaram aproximadamente 80% da quantidade de ácidos graxos presentes na gordura das amostras de leite. Os AGS possuem a característica de elevar os níveis de LDL e reduzir os níveis de HDL, o que contribui para a elevação dos riscos de doença coronariana, sendo que esses ácidos não apresentam o mesmo efeito hipercolesterolêmico. Os ácidos graxos desta classe que apresentam maior poder hipercolesterolêmico ou aterogênico são os ácidos mirístico (14:0), palmítico (16:0) e láurico (12:0), em ordem decrescente de atividade, já o ácido esteárico (18:0), apesar de saturado, parece não possuir efeito sobre as lipoproteínas do sangue (MAHAN & ESCOTT-STUMP, 2005; DRISKELL, 2006).

Em relação aos somatórios dos ácidos graxos observou-se que a inclusão de orégano não causou efeito ($P > 0,05$) sobre as concentrações médias totais de AGS, AGM e CLA para o leite *in natura*, obtendo valores médios de 466,05 mg.g⁻¹, 125,49 mg.g⁻¹ e 2,88 mg.g⁻¹, respectivamente (Tabela 5). Apesar do efeito da inclusão de

orégano na dieta sobre alguns ácidos graxos das classes que não apresentaram diferença, observou-se que os valores médios totais não foram afetados, portanto o aumento ou a redução de alguns AGS e AGM não são necessariamente considerados efeitos negativos da inclusão de orégano.

Tabela 5. Valores médios relativos aos somatórios de ácidos graxos, índices de qualidade nutricional e de atividade da enzima Δ^9 -dessaturase para as amostras de leite *in natura*.

Ácidos Graxos	Níveis de Orégano (%)				CV (%)	Valor de P ¹²		
	0%	0,8%	1,6%	2,4%		L	Q	C
Somatórios (mg.g⁻¹)								
Σ AGS ¹	473,73	476,02	452,62	461,84	11,25	ns	ns	ns
Σ AGM ²	128,46	119,10	124,68	129,75	11,34	ns	ns	ns
Σ AGPI ^{3;13}	12,86	11,77	11,77	12,89	10,39	ns	0,005	ns
Σ CLA ⁴	2,82	2,82	2,74	3,15	16,13	ns	ns	ns
Σ n-6 ^{5;14}	8,94	7,91	8,02	8,70	12,84	ns	0,010	ns
Σ n-3 ⁶	1,09	1,03	1,00	1,03	10,35	ns	ns	ns
Índices de Qualidade Nutricional								
AGPI/AGS ^{7;15}	0,027	0,025	0,026	0,028	14,25	ns	0,043	ns
n-6/n-3 ⁸	8,18	7,62	7,94	8,46	13,32	ns	ns	ns
IA ^{9;16}	1,36	1,37	1,34	1,31	3,67	0,004	ns	ns
IT ¹⁰	1,60	1,61	1,60	1,61	2,08	ns	ns	ns
Índices de Dessaturase¹¹								
14:1n-9c ¹⁷	0,101	0,086	0,100	0,109	15,99	ns	0,014	ns
16:1n-9c	5,14	4,52	5,07	4,81	17,61	ns	ns	ns
18:1n-9c	73,56	71,14	72,06	72,57	4,63	ns	ns	ns
18:2 9c, 11t	0,28	0,27	0,25	0,27	15,95	ns	ns	ns

¹Somatório de Ácidos Graxos Saturados (4:0, 6:0, 8:0, 10:0, 12:0, 13:0, 14:0, 15:0, 16:0, 17:0, 18:0, 20:0 e 22:0);

²Somatório de Ácidos Graxos Monoinsaturados (14:1, 15:1, 16:1, 17:1, 18:1n-7t e 18:1n-9c);

³Somatório de Ácidos Graxos Poli-insaturados (18:2n-6, CLAc9t11, CLAt10c12, 18:3n-3, 20:3n-3 e 20:3n-6);

⁴Somatório do Ácido Linoléico Conjugado (CLAc9t11 e CLAt10c12);

⁵Somatório do Ômega-6 (18:2n-6 e 20:3n-6);

⁶Somatório do Ômega-3 (18:3n-3 e 20:3n-3);

⁷Relação entre os Ácidos Graxos Poli-insaturados e Saturados;

⁸Relação entre os ácidos graxos da família Ômega-6 e Ômega-3;

⁹Índice de Aterogenicidade;

¹⁰Índice de Trombogenicidade;

¹¹Índice de atividade da Δ^9 -dessaturase - (produto da dessaturase)/(produto da dessaturase + substrato da dessaturase);

¹²ns: não significativo ($P > 0,05$); L, Q e C: efeitos de ordem linear, quadrática e cúbica para a inclusão de orégano na dieta;

¹³ $y = 0,8637x^2 - 2,064x + 12,87$ ($R^2 = 0,99$); ¹⁴ $y = 0,6661x^2 - 1,6769x + 8,9184$ ($R^2 = 0,97$); ¹⁵ $y = 0,0018x^2 - 0,0042x + 0,0277$ ($R^2 = 0,88$); ¹⁶ $y = -0,0246x + 1,3741$ ($R^2 = 0,80$); ¹⁷ $y = 0,0093x^2 - 0,0174x + 0,0989$ ($R^2 = 0,79$).

Ferlay *et al.* (2010) encontraram valores próximos ao desta pesquisa para o somatório dos AGM ($198,4 \text{ mg.g}^{-1}$) para a dieta de silagem de milho e ao adicionar linhaça extrusada, vitamina E e extratos de plantas ricas em polifenóis (alecrim, casca e semente da uva, citros e da flor de calêndula) foi observado aumento neste valor, principalmente pela adição de uma fonte rica em gordura como a linhaça, sendo evidenciado nesta pesquisa que os extratos de plantas apresentaram efeito positivo sobre os somatórios de AGS e AGM, ocorrendo redução e aumento de seus conteúdos, respectivamente.

O somatório dos AGPI apresentaram efeito quadrático ($P < 0,05$) para os tratamentos, observando um pequeno aumento entre a concentração da dieta controle e a com nível máximo de inclusão, com valores médios, respectivamente, de $12,86 \text{ mg.g}^{-1}$ e $12,89 \text{ mg.g}^{-1}$, para os níveis intermediários as médias foram de $11,77 \text{ mg.g}^{-1}$. Petit & Gagnon (2011) observaram o aumento linear no teor de AGPI ao alimentar vacas leiteiras com casca de linho, obtendo $55,1 \text{ mg.g}^{-1}$ desta classe de ácidos graxos para a dieta com 200 g/kg, os valores elevados obtidos pelos autores quando comparados com o desta pesquisa estão relacionados com a casca de linho não funcionar apenas como antioxidante, mas também como um fonte rica em AGPI.

Para o somatório dos ácidos graxos da família n-6 com o aumento da concentração de orégano na dieta houve o decréscimo de $8,94 \text{ mg.g}^{-1}$ (controle) para $7,91 \text{ mg.g}^{-1}$ (0,8%) com posterior elevação até $8,70 \text{ mg.g}^{-1}$, observando-se o comportamento quadrático para os tratamentos. Como discutido anteriormente para os ácidos linoléico (18:2n-6) e di-homo-gama-linolênico (20:3n-6) também houve redução do conteúdo total de n-6 quando observados os teores encontrados para a dieta controle e a dieta com 2,4% de orégano. Ferlay *et al.* (2010) alcançaram níveis de n-6 de $15,6 \text{ mg.g}^{-1}$ utilizando uma dieta com silagem de milho e $12,40 \text{ mg.g}^{-1}$ para a dieta com adição de vitamina E e extratos de plantas ricas em polifenóis, não observando efeito estatístico da suplementação sobre este ácido graxo.

Não foi observado efeito das dietas sob a concentração total dos ácidos graxos n-3 ($P > 0,05$), obtendo em média $1,03 \text{ mg.g}^{-1}$ para os tratamentos. Aoki *et al.* (2010) e Ferlay *et al.* (2010) obtiveram valores de $2,90 \text{ mg.g}^{-1}$ e $4,70 \text{ mg.g}^{-1}$ para a dieta controle, respectivamente, sendo que Ferlay *et al.* (2010) observaram o efeito dos tratamentos com antioxidantes sobre as concentrações do conteúdo total de n-3, apresentando aumento até $11,0 \text{ mg.g}^{-1}$ para a dieta com extratos de plantas ricas em polifenóis (alecrim, casca e semente da uva, citros e da flor de calêndula). Após as primeiras

observações sobre os efeitos benéficos à saúde dos ácidos graxos n-3, os estudos acerca destes têm sido estendidos, relacionando sua presença em alimentos a possíveis benefícios sobre doenças como cânceres, doença inflamatória intestinal e artrite reumatóide (SIMOPOULOS, 2002).

Para avaliação da qualidade nutricional da gordura do leite *in natura* foram calculadas a razão de AGPI por AGS, razão de n-6 por n-3, Índice de Aterogenicidade (IA) e Índice de Trombogenicidade (IT), sendo observado efeito da inclusão de orégano apenas sobre a razão entre os AGPI:AGS e o IA (Tabela 5).

A relação dos AGPI e AGS apresentou efeito de ordem quadrática, ocorrendo o decréscimo dos valores de 0,027 para 0,026 da dieta controle até o nível de 1,6% de orégano, com posterior aumento para o nível de 2,4% (0,028) (Tabela 5). Segundo o Departamento de Saúde do Reino Unido, o valor ideal desta razão para um alimento ser considerado saudável deve ser de 0,40 (WOOD *et al.*, 2003), sendo que valores menores que 0,45 indicam dietas pouco saudáveis. Nos produtos lácteos, já são esperados valores baixos desta razão, pois a gordura dos ruminantes possui maior quantidade de AGS e menor razão de AGPI e AGM em função do processo de biohidrogenação dos AGPI da dieta no rúmen pela ação de microrganismos (FRENCH *et al.*, 2000).

A razão de n-6:n-3 não foi alterada com a inclusão de orégano, seus valores variaram entre 7,42 até 8,46, valores estes que se enquadram na recomendação do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (FAO, 2007), que sugere que esta deve situar-se entre 5 e 10, observando que a inclusão de orégano não prejudicou as razões destes ácidos graxos. Petit & Gagnon (2011) encontraram razões de 3,20 para a dieta controle, observando redução com o aumento da inclusão de casca de linho, já Ferlay *et al.* (2010) encontraram valores de 5,38 até 1,13 de acordo com a dieta, não observando a influência da adição dos extratos de plantas sobre a razão. A discordância dos valores das razões encontrados neste trabalho com aos dos autores citados está relacionada com o tipo de alimentação fornecida aos animais.

A relação n-6:n-3 é um importante indicador da qualidade nutricional do leite devido a sua influência sobre os fatores de risco relacionados ao aparecimento de câncer, doenças cardíacas e à formação de coágulos que podem levar a ataques cardíacos (LIMA *et al.*, 2011). Muitos estudos sugerem que a excessiva quantidade de ácidos graxos n-6 e a deficiência do n-3 na dieta, promovendo assim razão desproporcional de n-6:n-3, é que pode levar ao desenvolvimento das doenças crônicas. A necessidade de diminuir a razão n-6:n-3 tem sido sugerida em vista aos resultados de

alguns estudos clínicos realizados na última década, além de evidências dos malefícios que podem causar a razão desequilibrada deste ácido graxo e em proporções muito baixas de n-6 e n-3 (SIMOPOULOS, 2008).

Através da relação dos ácidos pró e antiaterogênicos foram calculados o Índice de Trombogenicidade (IT) e Índice de Aterogenicidade (IA), sendo observado que o IT não apresentou efeito significativo ($P > 0,05$) para os diferentes níveis de inclusão de orégano com valores médios de 1,60 e para o IA houve efeito linear decrescente de 1,36 para 1,31 de acordo com o aumento de inclusão de orégano nas dietas. Estes índices indicam o potencial de estímulo à agregação plaquetária, ou seja, quanto menores os valores de IA e IT, maior é quantidade de ácidos graxos antiaterogênicos presentes na gordura e, conseqüentemente, maior é o potencial de prevenção ao aparecimento de doenças coronarianas (TURAN *et al.*, 2007). Dessa forma, os resultados obtidos para o IA com adição de orégano na dieta foi positivo, estando relacionado diretamente com os teores de ácido mirístico (14:0) encontrados para as amostras de leite, já que a inclusão de orégano causou redução do seu conteúdo e este é o AGS com maior poder aterogênico ou hipercolesterolêmico.

A atividade da enzima Δ^9 -dessaturase pode ser avaliada indiretamente através de quatro principais índices, estes são obtidos através da relação entre os pares de ácidos graxos representados pelos produtos (14:1n-9c, 16:1n-9c, 18:1n-9c e CLA *cis*-9, *trans*-11) e substratos (14:0, 16:0, 18:0 e 18:1n7t) da enzima (FOX & McSWEENEY, 1998). Os índices de atividade da Δ^9 -dessaturase para o ácido palmitoléico (16:1), ácido oléico (18:1) e ácido rumênico (CLA *cis*-9, *trans*-11) não foram influenciados ($P > 0,05$) para a inclusão de orégano na dieta, apresentando valores médios de 4,90; 72,33 e 0,27, respectivamente.

O índice de dessaturase do ácido mirístico (14:1) apresentou efeito quadrático ($P < 0,05$) em relação às dietas, observando decréscimo de 0,101 para 0,086, da dieta controle até 0,8% de orégano, seguido de aumento até o nível máximo de inclusão de orégano, quando a enzima apresentou maior atividade (0,109). A Δ^9 -dessaturase é a enzima responsável pela retirada de moléculas de hidrogênio das cadeias carbonadas dos AGS, transformando-os em AGI, dessa forma, o aumento da atividade da enzima na glândula mamária para o ácido miristoléico (14:1) pode ser confirmada a partir da análise dos resultados obtidos para o ácido mirístico (14:0) e miristoléico (14:1), os quais apresentaram redução e aumento nos seus teores, respectivamente, ocorrendo a redução da saturação devido ao aumento da atividade da dessaturase e aumento da

produção deste AGI. Os resultados mostraram que a suplementação com 2,4% de orégano aumentou em 27% a atividade da Δ^9 -dessaturase na glândula mamária para síntese de ácido miristoléico (14:1) atuando através de algum mecanismo sobre a atividade desta enzima.

Este resultado ainda pode ser confirmado devido a razão de ácido miristoléico e ácido mirístico (14:1n-9c/14:0) ser a melhor representante da atividade da Δ^9 -dessaturase na glândula mamária, o que está relacionado com ácido mirístico origina-se quase exclusivamente através da síntese do novo na glândula mamária, e, como consequência, todo ácido miristoléico presente na gordura do leite é sintetizado na glândula mamária através da Δ^9 -dessaturase. Sendo que em contraste, a absorção de ácidos graxos a partir do trato digestivo e mobilização de reservas corporais de gordura podem ser responsáveis por uma grande e variável proporção de ácidos palmitoléico, palmítico, oléico, esteárico e vacênico, bem como de CLA, tornando proporções realizadas a partir destes ácidos graxos indicativos menos reais sobre a atividade da Δ^9 -dessaturase (PETERSON *et al.*, 2002).

5.1.2 Influência do Tratamento Térmico sobre os Ácidos Graxos presentes no Leite

Não foi observado efeito significativo ($P > 0,05$) da pasteurização lenta sobre a maioria dos ácidos graxos, sendo estatisticamente diferentes apenas os percentuais de ácidos graxos Behênico (22:0) e Di-homo-gama-linolênico (20:3n-6) para todas as amostras de leite das vacas submetidas à suplementação com orégano (Tabela 6), essas duas substâncias não foram detectadas após a pasteurização lenta (Figura 6). Os somatórios e as relações dos ácidos graxos não apresentaram efeito significativo ($P > 0,05$), fato que já era esperado devido às pequenas diferenças encontradas para cada um deles (Tabela 7).

As diferenças observadas podem ser explicadas pela influência do tratamento térmico sobre esses ácidos graxos. Algumas pesquisas evidenciam que apenas um pequeno decréscimo ocorre nos ácidos graxos do leite *in natura* em relação ao leite esterilizado comercialmente, nem mesmo o processo de Ultra Alta Temperatura (UAT) foi capaz de destruir o ácido Di-homo-gama-linolênico (20:3n-6) (SOUZA, 2003; COSTA *et al.*, 2011b), como visto neste trabalho.

Tabela 6. Comparação do Percentual de Ácidos Graxos presentes no leite *in natura* e Pasteurizado das vacas alimentadas com diferentes percentuais de orégano.

Ácidos Graxos	Amostras de Leite <i>in natura</i> e Pasteurizado para cada nível de orégano											
	0%			0,8%			1,6%			2,4%		
	IN ¹	P ²	CV ³ (%)	IN	P	CV (%)	IN	P	CV (%)	IN	P	CV (%)
Saturados												
C 4:0	2,77	2,63	11,85	2,85	2,60	10,89	2,91	2,62	12,84	2,87	2,69	10,14
C 6:0	2,30	2,34	9,00	2,40	2,29	11,99	2,33	2,35	9,50	2,35	2,37	9,88
C 8:0	1,55	1,59	10,37	1,57	1,54	15,51	1,55	1,60	12,58	1,55	1,60	13,07
C 10:0	3,93	3,99	14,83	3,87	3,82	18,60	3,85	3,99	17,74	3,80	3,94	17,16
C 12:0	5,16	5,30	17,45	4,97	5,03	19,17	5,02	5,23	18,55	4,90	5,15	16,51
C 13:0	0,19	0,19	21,15	0,20	0,17	46,23	0,19	0,18	27,28	0,17	0,18	23,69
C 14:0	14,70	14,91	8,78	14,47	14,65	8,65	14,42	14,78	9,98	14,29	14,71	9,55
C 15:0	1,64	1,63	18,91	1,52	1,61	18,13	1,55	1,64	13,37	1,51	1,68	19,1
C 16:0	40,49	40,66	8,50	40,54	40,94	8,02	40,28	40,88	7,99	40,63	40,89	10,46
C 17:0	0,46	0,46	15,03	0,45	0,47	11,01	0,46	0,46	13,20	0,46	0,49	14,11
C 18:0	5,32	5,50	12,68	5,69	5,85	13,06	5,51	5,49	11,48	5,42	5,41	9,75
C 20:0	0,09	0,09	20,50	0,09	0,10	26,14	0,09	0,09	26,01	0,10	0,10	15,99
C 22:0	0,05 ^a	n.d. ^{4,b}	79,66	0,04 ^a	n.d. ^b	91,82	0,04 ^a	n.d. ^b	93,90	0,05 ^a	n.d. ^b	57,48
Monoinsaturados												
C 14:1	1,46	1,32	19,86	1,40	1,28	20,78	1,47	1,32	19,02	1,53	1,30	19,49
C 15:1	0,14	0,14	30,11	0,15	0,15	29,88	0,11	0,13	21,35	0,12	0,14	31,13
C 16:1	2,01	2,06	25,45	1,98	2,08	18,49	2,07	2,08	19,42	2,16	2,00	22,54
C 17:1	0,23	0,25	19,39	0,23	0,25	14,83	0,25	0,26	20,55	0,23	0,30	44,23
C 18:1 n-7t	0,86	0,96	22,54	0,88	1,04	21,81	0,96	1,01	21,57	0,95	1,05	21,36
C 18:1 n-9c	13,42	14,05	12,71	13,50	14,19	12,63	13,78	14,00	9,37	13,77	14,00	14,18
Poli-insaturado												
C 18:2 n-6	1,38	1,35	24,53	1,27	1,31	21,04	1,25	1,26	19,23	1,27	1,38	29,03
C 18:2 9c, 11t	0,31	0,31	30,28	0,31	0,34	26,29	0,33	0,33	28,48	0,34	0,34	29,34
C 18:2 10t, 12c	0,09	0,10	37,43	0,10	0,11	34,08	0,11	0,09	36,16	0,11	0,11	40,96
C 18:3 n-3	0,08	0,08	48,49	0,10	0,10	45,46	0,08	0,09	26,71	0,10	0,11	31,50
C 20:3 n-3	0,10	0,10	23,73	0,09	0,10	31,39	0,10	0,09	32,07	0,09	0,09	24,95
C 20:3 n-6	0,06 ^a	n.d. ^{4,b}	87,11	0,07 ^a	n.d. ^b	45,79	0,08 ^a	n.d. ^b	125,57	0,07 ^a	n.d. ^b	70,29

*Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre si a 5% de probabilidade pelo Teste F (P<0,05); ¹ Leite In natura; ² Leite Pasteurizado; ³ Coeficiente de Variação (%); ⁴ não detectado.

Tabela 7. Comparação dos somatórios e razões dos conteúdos de Ácidos Graxos selecionados do leite *in natura* e pasteurizado da vacas alimentadas com diferentes níveis de orégano.

Ácidos Graxos	Amostras de Leite <i>in natura</i> e Pasteurizado para cada nível de orégano											
	0%			0,8%			1,6%			2,4%		
	IN ⁹	P ¹⁰	CV ¹¹ (%)	IN	P	CV (%)	IN	P	CV (%)	IN	P	CV (%)
\sum AGS ¹	78,66	79,28	2,98	78,75	79,07	3,07	78,21	79,33	2,27	78,10	79,22	3,43
\sum AGM ²	18,12	18,76	12,10	18,14	18,99	11,74	18,64	18,80	8,90	18,77	18,79	13,02
\sum AGPI ³	2,02	1,94	20,02	1,96	1,95	17,09	1,96	1,87	16,62	2,01	1,99	21,97
AGPI/AGS ⁴	0,02	0,02	21,73	0,11	0,10	13,68	0,11	0,10	14,37	0,03	0,03	23,52
\sum CLA ⁵	0,40	0,41	32,92	0,41	0,45	26,94	0,44	0,42	26,75	0,46	0,46	30,43
\sum n-6 ⁶	1,44	1,35	24,07	1,35	1,31	20,87	1,33	1,26	17,47	1,35	1,33	28,43
\sum n-3 ⁷	0,18	0,18	22,80	0,20	0,19	34,57	0,19	0,18	19,59	0,20	0,21	25,41
n-6/n-3 ⁸	7,93	7,53	13,70	7,16	7,21	18,75	7,21	6,91	13,22	6,92	6,43	12,20

¹Somatório de Ácidos Graxos Saturados (4:0, 6:0, 8:0, 10:0, 12:0, 13:0, 14:0, 15:0, 16:0, 17:0, 18:0, 20:0 e 22:0);

²Somatório de Ácidos Graxos Monoinsaturados (14:1, 15:1, 16:1, 17:1, 18:1n-7t e 18:1n-9c);

³Somatório de Ácidos Graxos Poli-insaturados (18:2n-6, CLAc9t11, CLAt10c12, 18:3n-3, 20:3n-3 e 20:3n-6);

⁴Relação entre os Ácidos Graxos Poli-insaturados e Saturados;

⁵Somatório do Ácido Linoléico Conjugado (CLAc9t11 e CLAt10c12);

⁶Somatório do Ômega-6 (18:2n-6 e 20:3n-6);

⁷Somatório do Ômega-3 (18:3n-3 e 20:3n-3);

⁸Relação entre Ômega-6 e Ômega-3;

⁹ Leite *In natura*; ¹⁰ Leite Pasteurizado; ¹¹ Coeficiente de Variação.

O comportamento do leite submetido ao aquecimento é função não somente da temperatura alcançada, mas também da duração do aquecimento, sendo possivelmente o aquecimento prolongado das amostras de leite a causa da não detecção dos ácidos Behênico (22:0) e Di-homo-gama-linolênico (20:3n-6), após a pasteurização.

Os ácidos graxos que apresentaram diferenças foram detectados apenas nas amostras de leite *in natura*, fato que foi observado para todos os percentuais de orégano, portanto, não podem ser feitas associações entre o efeito do orégano e a proteção dos ácidos graxos presentes na gordura do leite analisado.

5.2 Análises Físico-Químicas

Os teores de gordura, Extrato Seco Total (EST), proteína e o índice crioscópico não foram influenciados pela inclusão de orégano nas dietas para amostras de leite *in natura*, obtendo valores médios, respectivamente, de 3,78%; 12,60%; 3,24% e -0,535 °H (Tabela 8).

Tabela 8. Resultados médios das análises físico-químicas do leite *in natura* de vacas alimentadas com diferentes níveis de orégano.

Análises	Níveis de Orégano				CV (%) ¹	Valor de P ²		
	0%	0,8%	1,6%	2,4%		L	Q	C
Densidade ⁵ (g/mL)	1,033	1,030	1,032	1,032	0,22	ns	0,0189	ns
Crioscopia (°H)	-0,537	-0,531	-0,535	-0,538	10,23	ns	ns	ns
Gordura (%)	3,83	3,65	3,65	3,99	12,63	ns	ns	ns
EST ³ (%)	13,06	12,06	12,43	12,87	7,29	ns	ns	ns
ESD ^{4,6} (%)	9,22	8,41	8,78	8,88	8,73	ns	0,0504	ns
Proteína (%)	3,35	3,04	3,31	3,26	6,73	ns	ns	ns
Lactose ⁷ (%)	4,82	4,49	4,59	4,64	6,94	ns	0,0505	ns

¹Coefficiente de Variação; ²ns: não-significativo (P > 0,05); L, Q e C: efeitos de ordem linear, quadrática e cúbica para a inclusão de orégano na dieta; ³Extrato Seco Total; ⁴Extrato Seco Desengordurado; ⁵y = 0,0013x² - 0,0031x + 1,0326 (R² = 0,65); ⁶y = 0,3542x² - 0,9344x + 9,1519 (R²=0,68); ⁷y = 0,1478x² - 0,4112x + 4,7968 (R² = 0,81).

Vários fatores, como raça, temperatura ambiente, período de lactação e alimentação, podem interferir, principalmente, nos constituintes gordura e proteína do leite (GONZALÉZ *et al.*, 2001), fato que não foi observado neste experimento. A manutenção dos teores de gordura é um fato interessante, pois a possível redução nos percentuais de gordura poderia afetar as características sensoriais do leite, além de ser

pouco interessante em relação aos aspectos econômicos, principalmente para a indústria de lácteos visto que alguns tipos de dietas tendem a reduzir esses níveis.

Segundo Santos & Fonseca (2007), se na alimentação não houver equilíbrio entre as quantidades de concentrado e volumoso, a composição do leite é diretamente afetada. Quando se administram grandes quantidades de concentrado em relação ao volumoso, ocorre a formação em maiores proporções de ácido propiônico, em relação aos ácidos butírico e acético, o que faz com que haja diminuição da quantidade de gordura por diluição.

Bell *et al.* (2006) e Paschoal *et al.* (2007) observaram decréscimo do percentual de gordura com a suplementação das vacas com óleo de cártamo e soja extrusada com selênio, respectivamente. Ferlay *et al.* (2010) forneceram dieta com silagem de milho, linhaça extrusada, vitamina E e extratos de plantas ricas em polifenóis (alecrim, casca e semente da uva, citros e flor de calêndula) para vacas de raças distintas, observando que houve efeito para os teores de gordura e proteína para as dietas sem antioxidantes, dessa forma, estes não influenciaram na composição do leite. Os valores encontrados para gordura (3,87%) e proteína (3,21%) foram semelhantes ao do trabalho.

A partir dos valores médios obtidos observou-se efeito semelhante dos tratamentos sobre as análises físico-químicas de densidade, ESD e lactose para as amostras. Os tratamentos influenciaram de forma quadrática nas análises, quais apresentaram decréscimo nos seus valores a partir da dieta controle para o nível de 0,8% com pequeno aumento até o nível de 2,4%. Os valores para densidade variaram entre 1,033 à 1,032 g.mL⁻¹, ESD de 9,22 à 8,88% e lactose de 4,82 à 4,64% (Tabela 8).

O ESD compreende todos os elementos do leite, menos a água e a gordura, dessa forma as variações nos teores de lactose afetam os valores de ESD diretamente, o que justifica o efeito semelhante encontrado para os tratamentos sob estes parâmetros. A densidade do leite é o peso específico do leite determinado por dois grupos de substâncias, de um lado a concentração de elementos em solução e em suspensão, e de outro a porcentagem de gordura. Portanto o efeito decrescente observado para os tratamentos pode também ser explicado pelos menores teores de lactose observados (MARQUES *et al.*, 2011).

Costa *et al.* (2011a) evidenciam as contradições existentes na literatura a respeito das mudanças nos teores de lactose do leite, alguns afirmam que tais mudanças ocorrem apenas em animais subnutridos conflitando os resultados obtidos pela sua alimentação. Neste estudo, a inclusão de 0,8% de orégano reduziu o teor de lactose do leite em

comparação às demais dietas, fato que não era esperado, pois a lactose é o nutriente mais estável do leite, portanto, o menos susceptível a alterações.

A lactose varia muito pouco por estar sujeita à regulação endócrina e, principalmente, por ser o principal agente osmótico envolvido na secreção do leite, juntamente com o sódio, potássio e cloro (ABUGHAZALEH *et al.*, 2002). A redução de lactose nas amostras pode ter ocorrido devido à maior passagem dos minerais para manter a osmolaridade do leite constante, assim como ocorre na mastite ou em situações de estresse em que há redução da coesão das junções entre as células epiteliais mamárias (STELWAGEN *et al.*, 2000).

Petit & Ganon (2011) não verificaram o efeito de diferentes proporções de casca de linho nas dietas de vacas leiteiras para os teores de proteína e gordura, observando apenas o aumento linear da lactose em relação ao aumento de casca de linho nas dietas. Foram encontrados valores médios semelhantes ao do trabalho para a proteína e lactose com variações, respectivamente, de 3,11 à 3,40% e 4,51 até 4,63%. Aoki *et al.* (2010) ao alimentar vacas com os açúcares trealose e celobiose não observaram efeito do tratamento com trealose, dissacarídeo com efeito antioxidante, sobre os parâmetros físico-químicos de proteína, gordura e lactose, sendo que para a lactose foram encontrados valores médios de 4,60% que estão próximos aos deste trabalho.

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabelece padrões físico-químicos para o leite *in natura* de acordo com a Instrução Normativa nº 62, a qual estabelece que um leite de qualidade deve apresentar no mínimo 3,0% de gordura, 2,9% de proteína, 8,4% de ESD e 11,5% de EST; densidade relativa entre 1,028 a 1,034 e índice crioscópico de -0,530 à -0,550 °H (BRASIL, 2011).

Os resultados encontrados para as análises físico-químicas do leite encontram-se dentro dos padrões estabelecidos pela legislação. A concordância dos dados do trabalho com a legislação indica que o leite de vacas alimentadas com orégano nas mesmas condições propostas não possui características físicas e químicas drasticamente alteradas, sendo, portanto considerado um leite normal, com potencial de uso pelas indústrias de laticínios.

5.3 Análises Microbiológicas

O leite é um excelente meio de cultura para o crescimento de microrganismos devido a suas características intrínsecas, como a alta atividade de água, pH próximo ao

neutro e riqueza em nutrientes. Sua contaminação pode ocorrer durante a ordenha, mas as principais fontes de possíveis contaminações são os equipamentos utilizados durante a sua manipulação, o transporte, o processamento e o armazenamento. (FRANCO & LANDGRAF, 2005). As condições sanitárias dos alimentos são determinadas pelo grupo coliforme, os quais são considerados indicadores desses tipos de contaminação, além de indicar risco potencial da presença de microrganismos patogênicos.

Os resultados obtidos nas determinações de coliformes totais e fecais (*Escherichia coli*) para o leite pasteurizado encontraram-se de acordo com os padrões microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2011). Segundo a legislação o leite pasteurizado deve apresentar contagem de coliformes totais e fecais (*Escherichia Coli*) menor do que $3,0 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹ da amostra.

5.4. Análise Sensorial

5.4.1 Teste de Preferência de Comparação Múltipla

O leite das vacas alimentadas com orégano apresentou desempenho satisfatório na avaliação sensorial, mesmo para o maior nível de orégano em comparação ao controle.

Os escores médios obtidos a partir do Teste de Preferência de Comparação Múltipla indicaram que não houve ($P > 0,05$) influência nas características sensoriais do leite das vacas suplementadas com orégano para os atributos de sabor e aroma. As médias dos escores permaneceram próximas a 4 para todas as amostras e ambos os atributos, indicando, portanto, que os provadores não perceberam diferenças entre as amostras das dietas controle e com orégano (Figura 7).

Pesquisas têm referenciado a gordura como principal componente que afeta as características sensoriais do leite (FROST *et al.*, 2001). Neste trabalho não foram observadas a influência da dieta sobre os teores de gordura (Tabela 4), fato que provavelmente explica os resultados obtidos para o teste de preferência.

O teste de preferência de comparação múltipla tem por objetivo apenas avaliar a preferência do consumidor quando ele compara dois ou mais produtos entre si, não

fornecendo medida de aceitação do produto, a menos que a preferência seja manifestada em relação a um produto de aceitação conhecida (CHAVES, 1993).

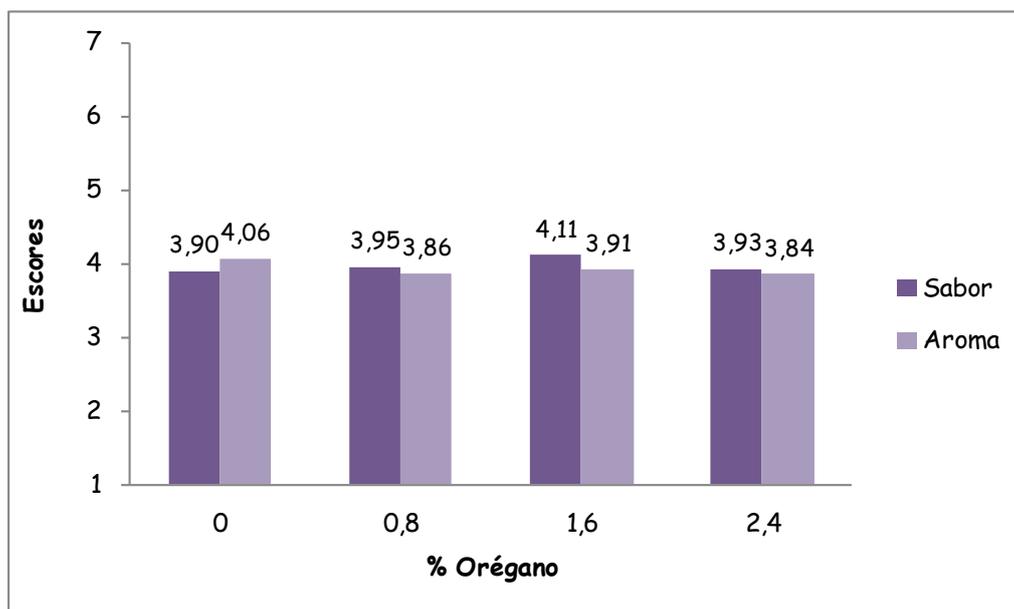


Figura 7. Escores médios obtidos pelo teste de preferência de comparação múltipla para as amostras de leite das vacas alimentadas com diferentes percentuais de orégano.

5.4.2 Perfil de Sabor

A dieta constitui-se como um dos principais fatores que afetam as características sensoriais do leite, relacionadas à presença de substâncias odoríferas que podem ser transferidas diretamente para o leite, quando inaladas ou através da ingestão da dieta (MOIO *et al.*, 1996).

A partir dos resultados da análise de perfil de sabor, representados na Figura 8, pode-se observar como as dietas influenciaram em notas características de sabor e aroma para as amostras de leite pasteurizado.

A intensidade do sabor característico e adocicado foi considerada regular (3) para todos os tratamentos. Segundo Coulon & Priolo (2002), muitos compostos formadores de sabor, presentes no leite fresco, são provavelmente produzidos durante o metabolismo animal, porém, muitos voláteis podem ser transferidos das dietas para o leite, via rúmen, além disso, sabor indesejável pode ser observado quando certos compostos são adicionados às dietas e metabolizados pelo animal. Fato que não foi observado para a adição de orégano, pois suas características foram conservadas, observando apenas diferença para o sabor cozido.

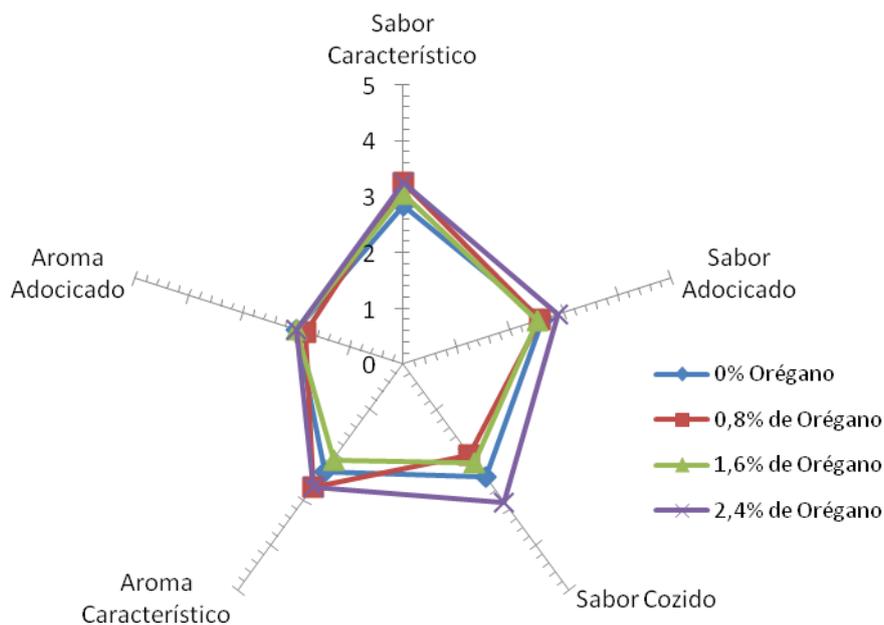


Figura 8. Perfil Sensorial em gráfico-aranha para as amostras de leite pasteurizado.

Para o atributo sabor cozido, apenas o nível de 2,4% de orégano apresentou característica regular, enquanto os demais tratamentos obtiveram notas abaixo. O sabor cozido identificado nas amostras é decorrente do tratamento térmico aplicado ao leite *in natura* a fim de reduzir a carga microbiana presente neste. De acordo com Varnam & Sutherland (1995), após a pasteurização observam-se perdas do aminoácido lisina, decorrentes da reação de *Maillard*, na qual grupamentos amina de alguns aminoácidos unem-se a lactose, que tem um paralelismo entre a sua intensidade, a temperatura do tratamento térmico e o valor nutricional do leite. Diferentes compostos voláteis podem ser formados na degradação da proteína e da lactose constituindo importantes fontes de formação do sabor do leite (QUEIROGA, 2004).

Todas as amostras apresentaram intensidade pequena para o aroma adocicado, não sendo constatadas alterações com adição de orégano na dieta. O aroma característico de leite apresentou intensidade pequena à regular, observando que o leite com 1,6% de orégano apresentou uma pequena intensidade para este atributo.

Segundo Calvo & La Hoz (1992), a formação de compostos voláteis que dão origem ao *flavour* do leite e dos seus produtos está relacionada à sua composição química, principalmente ao conteúdo de gordura do leite, onde a maioria dos ácidos graxos de cadeia curta são liberados a partir de glicerídeos por ação de lipases presentes

no leite ou de origem bacteriana (HUERTA-CONZALEZ & WILBEY, 2001; QUEIROGA, 2004).

Dessa forma, os resultados obtidos para análise sensorial reforçam os resultados para o teor de gordura (Tabela 8), ácidos graxos de cadeia curta (Tabela 4) e o teste de preferência de comparação múltipla (Figura 7), mostrando, portanto, que a dieta não influenciou as características sensoriais do leite e a suplementação com orégano poderia ser efetuada sem causar problemas perante aos consumidores.

5 CONCLUSÃO

A dieta com 2,4% de orégano reduziu os valores de ácido mirístico (14:0) e do somatório de ômega-6 (n-6) e aumentou os valores de ácido miristoléico (14:1), ácido alfa-linolênico (18:3n-3), CLA *trans*-10, *cis*-12 e somatório de AGPI. O nível máximo de orégano também afetou os índices de qualidade nutricional da fração lipídica do leite *in natura* reduzindo o Índice de Aterogenicidade (IA) e aumentando a razão de AGPI e AGS. Além, de promover o aumento da atividade da enzima Δ^9 -dessaturase em 27% para o ácido miristoléico (14:1n-9c) com a suplementação da dieta contendo 2,4% de orégano.

O tratamento térmico de pasteurização lenta não influenciou nas quantidades da maioria dos ácidos graxos. Os que apresentaram diferenças, ácido Behênico (22:0) e ácido Di-homo-gama-linolênico (20:3n-6), foram detectados apenas nas amostras de leite *in natura*.

A inclusão de orégano nas dietas das vacas não influenciaram nos teores de gordura, proteína, EST e no índice crioscópico para as amostras de leite *in natura*. Observou-se efeito semelhante dos diferentes níveis de orégano sob os resultados das demais análises físico-químicas realizadas, os quais apresentaram decréscimo nos seus teores a partir da dieta controle para o nível de 0,8% com pequeno aumento até o nível de 2,4%.

O leite pasteurizado mostrou-se apto para consumo de acordo com os padrões estabelecidos na legislação para contagem de coliformes totais e coliformes fecais (*Escherichia coli*).

A adição de orégano na dieta não influenciou nas características sensoriais entre os tratamentos, observando que a preferência para a dieta controle e os demais níveis foi igual ($P > 0,05$). Através do perfil descritivo observou-se que a intensidade dos atributos analisados permaneceram entre pequena e regular para todos os tratamentos. Os resultados obtidos na análise sensorial reforçam os resultados dos teores de gordura, proteína e ácidos graxos de cadeia curta, já que estes são considerados componentes que estão ligados à modificação no *flavour* do leite.

A inclusão de 2,4% de orégano nas dietas das vacas leiteiras influenciou positivamente os teores de ácidos graxos considerados de grande importância para saúde, promovendo o aumento da qualidade nutricional do leite e afetando a atividade da enzima Δ^9 -dessaturase na glândula mamária. As características físico-químicas e

sensoriais não apresentaram grandes variações para as dietas, dessa forma, a inclusão de orégano poderia aumentar o teor de ácidos graxos desejáveis, sem alterar as características sensoriais, mantendo-se dentro dos padrões de um leite comum.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Análise sensorial dos alimentos e bebidas**. Rio de Janeiro, NBR 12994, 1993.

ABUGHAZALEH, A. A.; SCHINGOETHE, D. J.; HIPPEN, A. R.; KALSCHEUR, K. F.; WHITLOCK, L. A. Fatty acid profiles of milk and rumen digesta from cows fed fish oil, extruded soybeans or their blend. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p.2266-2276, 2002.

ACURI, E. F.; BRITO, J. F. R.; BRITO, M. A. V. P. Sabor e aroma: como preservar. **Revista Balde Branco**, v. 489A, p. 62-64, 2005.

ADEGOKE, G. O.; KUMAR, M. V.; KRISHNA, A. G. G.; VARADARJ, M. C.; SAMBAIAH, K.; LOKESH, B. R. Antioxidants and lipid oxidation in foods: a critical appraisal. **Journal of Food Science and Technology**, v. 35, nº 4, p. 283-298, 1998.

ACKMAN, R. G. The analyses of fatty acids and related materials by gás-liquid chromatography. **Progress in the Chemistry of fats & Other lipids**, v. 12, p. 165-284, 1972.

ALMEIDA, A. C.; SILVA, G. L. M.; SILVA, D. B.; FONSECA, Y. M.; BUELTA, T. T. M.; FERNANDES, E. C. Características físico-químicas e microbiológicas do leite cru consumido na cidade de Alfenas-MG. **Revista Universitária Alfenas**, v. 5, n. 5, p. 165-168, 1999.

ALLOCATI, P. A.; CABONA, E. M.; PUHL, L. E.; GONZÁLEZ, J. H. Impacto del proceso de pasteurización 72°C 15 seg sobre el contenido de isômeros conjugados del ácido linoleico (CLA) em leche cruda bovina. **Revista Argentina de Producción Animal**, v.27, n.3, p.189-195, 2007.

ANZALDÚA-MORALES, A. **La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica**. Zaragoza: Acribia, 198p., 1994.

AOKI, N.; FURUKAWA, S.; SATO, K.; KUROKAWA, Y.; KANDA, S.; TAKAHASHI, Y.; MITSUZUMI, H.; ITABASHI, H. Supplementation of the diet of dairy cows with trehalose results in milk with low lipid peroxide and high antioxidant content. **Journal Dairy Science**, v. 93, n. 9, p. 4189-4195, 2010.

APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of methods**

for the microbiological examination of foods. 4. ed. Washington: APHA, 676 p., 2001.

ARABSHAHI-DELOUEE, S. & UROOJ, A. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica L.*) leaves. **Food Chemistry**, v. 102, n. 4, p. 1233-1240, 2007.

ATHAYDE, A. Indústrias agregam conveniências aos novos produtos. **Engenharia de Alimentos**, São Paulo, n. 24, p. 39-41, 1999.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, p. 191-203, 2006.

BANNON, C. D.; BREEN, G. J.; CRASKE, J. D.; HAI, N. T.; HARPER, N. L.; O'ROURKE, K. L. Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability. **Journal of Chromatography**, v. 247, p. 71-89, 1982.

BARBOZA, L. M. V.; FREITAS, R. J. S.; WASZCZYNSKYJ, N. Desenvolvimento de Produtos e Análise sensorial. **Brasil Alimentos**, n.18. 2003.

BARROS, M. A. F. **Dossiê Técnico- Controle de qualidade físico-químico em leite fluido.** Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas. Brasília: UNB, 20 p., 2007.

BEAULIEU, A. D.; DRACKLEY, J. K.; MERCHEN, N. R. Concentrations of conjugated linoleic acid (cis-9, trans-11 octadienoic acid) are not increased in tissue lipids of cattle fed with high concentrate diet supplemented with soybean oil. **Journal of Animal Science**, v. 80, n. 3, p. 847-861, 2002.

BEHMER, M. L. A. **Tecnologia do Leite.** São Paulo: Nobel, 15 ed., 1991.

BELL, J. A.; GRINARI, J. M.; KENNELLY, J. J. Effect of Safflower Oil, Flaxseed Oil, Monensin, and Vitamin E on Concentration of Conjugated Linoleic Acid in Bovine Milk Fat. **Journal Dairy Science**, v. 89, n. 2, p. 733-748, 2006.

BENCHAAR C. & GREATHEAD, H. Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. **Animal Feed Science Technology**, v. 166, p. 338-355, 2011.

BEORLEGUI, C. B. Cambios en el perfil de ácido grasos en productos animales en relación con la alimentación animal y humana. Importancia del ácido linoleico conjugado. 1. Rumiantes. In: CURSO DE ESPECIALIZACION FEDNA, 20, 2004, Barcelona. **Anais...** Barcelona: FEDNA, 79 p., 2004.

BERNARD, L.; ROUEL, J.; LEROUX, C.; FERLAY, A.; FAULCONNIER, Y.; LEGRAND, P.; CHILLIARD, Y. Mammary lipid metabolism and milk fatty acid secretion in alpine goats fed vegetable lipids. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 1478–1489, 2005.

BERSET, C. & CUVELIER, M. E. Méthodes d'évaluation du degré d'oxydation des lipides et de mesure du pouvoir antioxydant. **Sciences des Aliments**, v. 16, p. 219–245, 1996.

BORNEO, R. & AGUIRRE A. Chemical composition, cooking quality, and consumer acceptance of pasta made with dried amaranth leaves flour. **Food Science and Technology**, v. 41, n. 10, p. 1748–1751, 2008.

BORTOLI, A. **Influência de um aditivo fitogênico sobre o desempenho e condições metabólicas de novilhas Jersey**. 2007. 68 f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Santa Maria.

BOTSOGLOU, N. A.; FLOROU-PANERI, P.; CHRISTAKI, E. Effect of dietary oregano essential oil on performance of chickens and on iron-induced lipid oxidation of breast, thigh and abdominal fat tissues. **British Poultry Science**, v. 43, p. 223–230, 2002.

BOTSOGLOU, N. A.; CHRISTAKI, E.; FLOROU-PANERI P.; GIANNENAS I.; PAPAGEORGIOU, G.; SPAIS, A. B. The effect of a mixture of herbal essential oils or alfa tocopheryl acetate on performance parameters and oxidation of body lipid in broilers. **South African Journal of Animal Science**, v. 34, p. 52–61, 2004.

BRASIL. Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 370 de 4 de setembro de 1997. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do leite UHT (UAT). **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília-DF, n. 172, 8 set. 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº 62 de 29 de dezembro de 2011. Aprova e oficializa o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite cru refrigerado. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília-DF, 2011.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. **Nutrition**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

CALDER, P. C. Long-chain n-3 fatty acids and inflammation: potential application in surgical and trauma patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n° 4, p.433-446, 2003.

CALVO, M. M. & LA HOZ, L. *Flavour* of heated milks: A review. **International Dairy Journal**, v. 2, p. 69-81, 1992.

CAMPBELL, W.; DRAKE, M. A.; LARICK, D. K. The impact of fortification with Conjugated Linoleic Acids (CLA) on the quality of fluid milk. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 1, p. 43-51, 2003.

CERVATO, C.; CARABELLI, M.; GERVASIO, S.; CITTERA, A.; CAZZOLA, R.; CESTARO, B. Antioxidant properties of oregano [*Origanum vulgare*] leaf extracts. **Journal Food Biochemistry**, v. 24, p. 453-465, 2000.

CHADDAD, F. Cooperativas no agronegócio do leite: mudanças organizacionais e estratégicas em resposta à globalização. **Organizações Rurais e Agroindustriais**, v. 9, p. 69-78, 2007.

CHAVES, J. B. P. **Análise sensorial: histórico e desenvolvimento**. Viçosa: UFV, 31p., 1993.

CHAVES, J. B. P. **Métodos de diferença em avaliação sensorial de alimentos e bebidas**. Viçosa: UFV, 91 p., 2001.

CINTRA, R. M. G. C. **Efeito antioxidante de especiarias: avaliação da salsa (*Petroselinum sativum Hoffm*) cebolinha verde (*Allium schoenoprasum L.*), orégano (*Origanum vulgare L.*) e alecrim (*Allium schoenoprasum L.*)**. 1999. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

CLEFF, M. B.; MEINERZ A. R. & LUND, R. G. Fitoterapia aplicada a Medicina Veterinária. In: Meireles, M. C. A. & Nascente, P. S. **Micologia Veterinária**. Pelotas: Universitária/UFPel, p. 385-400, 2009.

COSGROVE, J. P.; CHURCH, D. F.; PRYOR, W. A. The kinetics of autoxidation of polyunsaturated fatty acids. **Lipids**, v. 22, n. 5, p. 299-304, 1987.

COSTA, D. A.; CARNEIRO, J. C.; LOPES, F. C. F.; GAMA, M. A. S.; SALIBA, E. O. S.; REBOUÇAS, G. M. N. Produção e composição do leite de vacas submetidas à dieta contendo diferentes níveis de caroço de algodão. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 1, p. 2001-2010, 2011a.

COSTA, E. N.; LACERDA, E. C. Q.; SANTOS, S. M. S.; SANTOS, C. M. S.; FRANCO, M.; SILVA, R. R.; SIMIONATO, J. I. Action of successive heat treatments in bovine milk fatty acids. **Journal Brazilian Chemical Society**, vol. 0, n. 0, p. 1-6, 2011b.

COULON, J. B. & PRIOLO, A. La qualité sensorielle des produits laitiers et de la viande depend des fourrages consommés par les animaux. **INRA Productions Animales**, v. 15, n. 5, p. 333-342, 2002.

CROFT, K. D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 854, p. 435-442, 1998.

DRISKELL, J. A. **Sports nutrition: fats and proteins**. Boca Raton: CRC, 2006. 383p.

DUTCOSKY, S. D. **Análise sensorial de alimentos**. Curitiba: Champagnat, 123 p., 1996.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Consumo per capita mundial de leite fluido 2000/2008**. Disponível em: <<http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/consumo/tabela0703.php>>. Acesso em: dez. 2011.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nation. **Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação**, 2007. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/601/default.aspx>>. Acesso em: fev. 2008.

FERLAY, A.; MARTIN, B.; LERCH, M.; GOBERT, M.; PRADEL, P.; CHILLIARD, Y. Effects of supplementation of maize silage diets with extruded linseed, vitamin E and plant extracts rich in polyphenols, and morning v. evening milking on milk fatty acid profiles in Holstein and Montbe´liarde cows. **Animal**, v. 4, n. 4, p. 627–640, 2010.

FERREIRA, V. L. P.; ALMEIDA, T. C. A.; PETTINELLI, M. L. C. V.; SILVA, M. A. A. P.; CHAVES, J. B. P.; BARBOSA, E. M. **Análise sensorial: testes discriminativos e afetivos. Manual: série qualidade.** Campinas, SBCTA, 127p., 2000.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.

FOX, P. F. & McSWEENEY, P. L. H. **Dairy chemistry and biochemistry.** London: Blackie Academic & Professional, 478 p. 1998.

FRANCO, B.D.G.M. & LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos.** São Paulo: Atheneu, 182 p., 2005.

FRANDSOM, R.D.; WILKE, W.L. & FAILS, A.D. **Anatomia e Fisiologia dos Animais de Fazenda.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 6ª ed., 454 p., 2003.

FRANKEL, E.N. Review. Recent advances in lipid oxidation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 54, n. 4, p. 495–511, 1991.

FRENCH, P.; STANTON, C.; LAWLESS, F.; O'RIORDAN, E. G.; MONAHAN, F. J.; CAFFREY, P. J.; Fatty acid composition, including conjugated linoleic acid, of intramuscular fat from steers offered grazed grass, grass silage, or concentrate-based diets. **Journal Animal Science**, v. 78, p. 2849-2855, 2000.

FRENCH, P.; O'RIORDAN, E. G.; MONAHAN, F. J.; MOLONEY, A. P.; LAWLESS, F. Fatty acid composition of intra-muscular triacylglycerols of steers fed autumn grass and concentrates. **Livestock Production Science**, v. 81, p. 307-317, 2003.

FROST, M. B.; DIJKSTERHUIS, G.; MARTENS, M. Sensory perception of fat in milk. **Food Quality and Preference**, v. 12, p. 327-336, 2001.

GARCIA, C. A.; SILVA, N. R.; LUQUETTI B. C.; SILVA, R. T.; MARTINS, I. P.; VIEIRA, R. C. Influência do ozônio sobre a microbiota do leite “*in natura*”. **Revista Higiene Alimentar**, v. 14, n. 70, p. 36-50, 2000.

GIANNENAS, I. A.; FLOROU-PANERI, P.; BOTSOGLOU, N. A.; CHRISTAKI, E.; SPAIS, A. B. Effect of supplementing feed with oregano and(or) alpha-tocopheryl acetate on growth of broiler chickens and oxidative stability of meat. **Journal Animal Science**, v. 14, p. 521–535, 2005.

GÓMEZ, M. E. B.; MENDONÇA-JÚNIOR, C. X.; MANCINI-FILHO, J. Estabilidad oxidativa de huevos enriquecidos con ácidos grasos poliinsaturados omega 3, frente a antioxidants naturals. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 4, p. 425-432, 2003.

GONZÁLEZ, F. H. D.; DÜRR, J. W.; FONTANELI, R. S.; PERES, J. R.; BARROS, L.; CEBALLO, P. **Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras**. Porto Alegre: UFRGS, 77 p., 2001.

GOVARIS, A.; BOTSOGLOU, N.; PAPAGEORGIOU, G.; BOTSOGLOU, E.; AMBROSIADIS, I. Dietary versus post-mortem use of oregano oil and (or) alpha-tocopherol in turkeys to inhibit development of lipid oxidation in meat during refrigerated storage. **International Journal of Food Sciences Nutrition**, v. 55, p. 115-123, 2004.

GRIINARI, J. M.; CORL, B. A.; LACY, S. H.; CHOUINARD, P. Y.; NURMELA, K. V. V.; BAUMAN, D. E. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by $\Delta 9$ -desaturase. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 2285–2291, 2000.

GRUMMER, R.R. Effect of Feed on the Composition of Milk Fat. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 9, p. 3244-3257, 1991.

GRÜN, I.U.; AHN, J.; CLARKE, A.D.; LORENZEN, C.L. Reducing Oxidation of Meat. **Food Technology**, v. 60, n. 1, p. 37-43, 2006.

GRUNDY, S. M. & DENKE, M. A. Dietary influences on serum lipids and lipoproteins. **Journal Lipid Research**, v. 31, n. 11, p. 49-72, 1990.

HALL, M.B. Recent advanced in non-ndf carbohydrates for the nutrition of lactating cows, In: Simpósio Internacional em Bovinos de Leite, 2, 2001, Lavras. **Anais... Lavras: UFLA-FAEPE**, p.139-148, 2001.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LÖLIGER, J.; ARUOMA, O. I. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, p. 601-617, 1995.

HMSO. England Departament of Health. **Nutritional aspects of cardiovascular disease 16 Report on Health and Social Subjects**. London: HMSO, n. 46, p. 1-15, 1994.

HU, F.B.; MANSON, J.E.; WILLETT, W.C. Types of dietary fat and risk of coronary heart disease: a critical review. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 20, nº 1, p. 5-19, 2001.

HUERTA-CONZÁLEZ, L. & WILBEY, R.A. Determination of free fatty acids produced in filled-milk emulsion as result of the lipolytic activity of lactic acid bacteria. **Food Chemistry**, v. 72, p. 301-307, 2001.

HURLEY, W.L. **Milk composition & synthesis: physicochemical properties**. Resource Library, University of Illinois, 2006. Disponível em: <<http://classes.aces.uiuc.edu/AnSci308/Milkcompsynth/milkcompsynthresources.html>>. Acesso em: 15 jan. 2012.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção Pecuária Municipal. **IBGE**, Rio de Janeiro, v. 37, p.1-55, 2009.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção brasileira de leite por Unidades da Federação (em milhões de litros). Pesquisa Pecuária Municipal (2011). **Milk Point**. Disponível em: <http://www.milkpoint.com.br/estatisticas/Producao_Estad_o.htm>. Acesso em: jan. 2012.

ISO. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Animal and vegetable fats and oils preparation of methyl esters of fatty acids**. Geneve: ISO. Method ISO 5509, p.1-6, 1978.

JADHAV, S.J.; NIMBALKAR, S.S.; KULKARNI, A.D.; MADHAVI, D.L. Lipid Oxidation in Biological and Food System. In: Madhavi, D.L., Deshpande, S. S. and Salunkhe, D.K. Eds. **Food Antioxidants**. London and New York: Elsevier Applied Science, p. 5-63, 1996.

JOSEPH, J. D. & ACKMAN, R. G. Capillary column gas-chromatographic method for analysis of encapsulated fish oils and fish oil ethyl-esters - Collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 75, n. 3, p. 488-506, 1992.

KELSEY, J. A.; CORL, B. A.; COLLIER, R. J.; BAUMAN, D. E. The effect of breed, parity, and stage of lactation on Conjugated Linoleic Acid (CLA) in milk fat from dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 2588–2597, 2003.

KINSELLA, J. E.; LOKESH, B.; STONE, R. A. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and amelioration of cardiovascular disease: possible mechanisms. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 52, p. 1-28, 1990.

KOUTSOUMANIS, K.; LAMBROPOULOU, K.; NYCHAS, G. J. E. A predictive model for the non-thermal inactivation of *Salmonella enteridis* in a food model system supplemented with a natural antimicrobial. **International Journal of Food Microbiology**. v. 49, p. 63-74, 1999.

KUBOW, S. Lipid oxidation products in food and atherogenesis. **Nutrition Reviews**, v. 51, n. 2, p. 33-40, 1993.

LÁCTEA BRASIL. Disponível em <http://www.lacteabrasil.org.br>. Acesso em: maio de 2008.

LIMA, L. S.; OLIVEIRA, R. L.; BAGALDO, A. R.; GARCEZ, A. F.; RIBEIRO, C. V. M.; LANNA, D. P. D. Composition and fatty acid profile of milk from cows on pasture subjected to licuri oil supplement. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 12, p. 2858-2865, 2011.

LINDMARK-MANSSON, H & AKESSON, B. Antioxidative factors in milk. **Journal of Nutrition**, v. 84, n. 1, p. 103-110, 2000.

LOPES, C. N.; SCARPA, A. B.; CAPPELLOZZA, B. I.; COOKE, R. F.; VASCONCELOS, J. L. M. Effects of rumen-protected polyunsaturated fatty acid supplementation on reproductive performance of *Bos indicus* beef cows. **Journal Animal Science**, v. 87, n. 123, p. 935-943, 2009.

LOURENÇO, M.; CARDOZO, P. W.; CALSAMIGLIA, S.; FIEVEZ, V. Effects of saponins, quercetin, eugenol and cinnamaldehyde on fatty acid biohydrogenation of forage polyunsaturated fatty acids in dual-flow continuous culture fermenters. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. 3045-3053.

LOZANO, C. C. A.; PIÑA, G. L.; URIBE, S. L.; MEJÍA, E. G. El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, vol.54, n. 1, p. 100-111, 2004.

MACHEBOEUF, D., MORGAVI, D. P., PAPON, Y., MOUSSET, J. L., ARTURO-SCHAAN, M. Dose response effects of essential oils on in vitro fermentation activity of the rumen microbial population. **Animal Feed Science Technology**, v. 145, p. 335-350, 2008.

MANFUGÁS, J. E. **Evaluación sensorial de los alimentos**. Ciudad de La Haban: Editorial Universitaria, 116p., 2007.

MAHAN, L. K. & ESCOTT-STUMP, S. **KRAUSE**: alimentos, nutrição & dietoterapia. 11ª ed. São Paulo: Roca, 2005. 60p.

MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. **International Journal of Food Microbiology**, v.67, p.187-95, 2001.

MARQUES, L. T.; FISCHER, V.; ZANELA, M. B.; RIBEIRO, M. E. R.; JÚNIOR, W. S.; RODRIGUES, C. M. Produção leiteira, composição do leite e perfil bioquímico sanguíneo de vacas lactantes sob suplementação com sal aniônico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 5, p. 1088-1094, 2011.

MARTIN, B.; CORNU, A.; KONDOYAN, N.; FERLAY, A.; VERDIER-METZ, I.; PRADEL, P.; ROCK, E.; CHILLIARD, Y.; COULON, J.B.; BERDAGUE, J.L. Milk indicators for recognizing the types of forages eaten by dairy cows. Bled, Slovenia: **European Association of Animal Production**, p. 127–136, 2005.

MATHERSON, B.; WALKER, K.Z.; TAYLOR, D.M.; PETERKIN, R.; LUGG, D.; DEA, K. Effects serum lipids of monounsaturated oil and margarine in the diet of an Antarctic expedition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 63, n. 9, p. 33-41, 1996.

MATTILA-SANDHOLM, T. & SAARELA, M. **Functional dairy products**. Boca Raton: CRC Press; Cambridge: Woodhead Publising, 395 p., 2003.

MEDEIROS, S.R. **Ácido linoléico conjugado**: teores nos alimentos e seu uso no aumento da produção de leite com maior teor de proteína e perfil de ácidos graxos modificado. 2002, 114f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2002.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. **Sensory Evaluation Techniques**. Florida-USA: CRC Press, 2ª ed., 354p., 1991.

MENSINK, R. P. & KATAN, M. B. Effects of a diet enriched with monounsaturated or polyunsaturated fatty acids on level of low density and high density lipoproteins

cholesterol in health women and men. **Journal of Medicine**, v. 321, n. 7, p. 436-441, 1989.

MINIM, V.P.R. **Análise Sensorial: estudos com consumidores**. Viçosa-MG: UFV, 225p., 2006.

MOIO, L.; RILLO, L.; LEDDA, A.; ADDEO, F. Odorous constituents of ovine milk in relationship to diet. **Jornal of Dairy Science**, v. 79, p. 1322-1331, 1996.

MORAES, F. P. & COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica Farmacêutica**, v. 3, n. 2, p. 109-122, 2006.

MORETTI, C. L. **Manual de processamento mínimo de frutas e hortaliças**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 531p., 2007.

NASCIMENTO, M. B. R. & ISSLER, H. Aleitamento materno em prematuros: manejo clínico hospitalar. **Jornal de Pediatria**, v. 80, n. 5, p. 163-172, 2004.

NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. Washington: Ed. National Academy Press, 7^a ed., 387p., 2001.

NESTEL, P. J. Fish oil and cardiovascular disease: lipids and arterial function. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, n. 1, p. 228-231, 2000.

NOCEK, J. E. *In situ* and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility: A review. **Journal of dairy science**, v. 71, n. 5, p. 2069, 1988.

OLIVEIRA, J. E. D.; SANTOS, A. C.; WILSON, E. V. **Nutrição Básica**. 1^a ed. São Paulo: Savier, 1982.

OLIVEIRA, A. S. **Consumo, digestibilidade, produção e composição do leite, produção de proteína microbiana e estimativas das excreções de derivados de purinas e de uréia em vacas lactantes alimentadas com rações contendo diferentes teores de uréia**. 2000, 98 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Viçosa.

OLIVEIRA, A. N. Características de Composição do Leite e Métodos de Análise. In: Curso sobre a qualidade do leite, 2. **Palestras...** Goiânia: UFG, 17 p., 2004.

OLIVEIRA, A. F. & CARVALHO, G. R. A renda do brasileiro e seus gastos com lácteos. **Agripoint**. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/mercado/espaco-aberto/a-renda-do-brasileiro-e-seus-gastos-com-lacteos-31342n.aspx>>. Acesso em: jan. 2012.

ORDÓÑEZ, J. A.; RODRÍGUEZ, M. I. C.; ÁLVAREZ, L. F.; SANZ, M. L.; MINGUILLÓN, G. D. G. F.; PERALES, L. H.; CORTECERO, M. D. S. **Tecnología de alimentos: componentes dos alimentos e processos**. São Paulo: Artmed, v. 1, p. 294, 2005.

PALMQUIST, D. L. & BEAULIEU, A. D. Feed and Animal Factors Influencing Milk Fat Composition. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 6, P. 1753–1771, 1993.

PASCHOA, M. F. A importância de se ferver o leite pasteurizado tipo “C” antes do consumo. **Higiene Alimentar**, v. 11, n. 52, p. 24-28, 1997.

PASCHOAL, J. J.; ZANETTI, M. A.; DEL CLARO, G. R.; MELO, M. P.; PUGINE, S. P.; CUNHA, J. A. Perfil de ácidos graxos e estabilidade oxidativa do leite de vacas holandesas alimentadas com soja extrusada e selênio orgânico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 12, p. 1793-1799, 2007.

PEAK, P. W.; PUSSEL, B. A.; MARTYN, P.; TIMMERMANS, V.; CHARLESWORTH, J. A. The inhibitory effect of rosmarinic acid on complements involves the 5 convertase. **Internacional Journal of Immunopharmacology**, v. 13, p. 853-857, 1991.

PETERSON, D. G.; KELSEY, J. A.; BAUMAN, D. E. Analysis of Variation in *cis*-9, *trans*-11 Conjugated Linoleic Acid (CLA) in Milk Fat of Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 9, 2002.

PETIT, H. V. & GAGNON, N. Production performance and milk composition of dairy cows fed different concentrations of flax hulls. **Animal Feed Science and Technology**, v. 169, p. 46– 52, 2011.

POKORNY, J.; YANISHLIERA, N. & GORDON, M. **Antioxidant in Food: Practical Application**. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd. Abington, p. 331-372, 2001.

PRABHASANKAR, P.; GANESAN, P.; BHASKAR, N.; HIROSE, A.; NIMISHMOL S.; GOWDA, L. R.; HOSOKAWA, M.; MIYASHITA, K. Edible Japanese seaweed,

wakame (*Undaria pinnatifida*) as an ingredient in pasta: Chemical, functional and structural evaluation. **Food Chemistry**, v. 115, n. 2, p.501–508, 2009.

PRANDINI, A.; BROGNA, N.; PIVA, G. Different level of conjugated linoleic acid (CLA) in dairy products from Italy. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, n. 6, p. 472-479, 2007.

QUEIROGA, R. C. R. E. **Caracterização nutricional, microbiológica, sensorial e aromática do leite de cabras Saanen, em função do manejo do rebanho, higiene da ordenha e fase de lactação**. 2004. 148 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Pernambuco, 2004.

REVENEAU, C. **Dietary source and availability of fatty acids to manipulate ruminal protozoa, metabolism of fat, and milk fatty acid profile in lactating dairy cows**. 2008, 152 f. Tese (Doutor em Fisiologia), Ohio State University.

RHEE, K.S. Natural antioxidants for meat products. In: St. ANGELO, A.J.; BAILEY, M.E. (Ed.). **Warmed-Over Flavour of Meat**. Orlando: Academic Press, p. 267-289, 1987.

RIBEIRO JÚNIOR, J. I. *Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG); Versão 9.1*; Universidade Federal de Viçosa, Brasil, 2007.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 20, n. 7, p. 933- 956, 1996.

ŞAHİN, F.; GÜLLÜCE, M.; DAFERERA, D.; SÖKMEN, A.; SÖKMEN, M.; POLISSIOU, M.; AGAR, G.; ÖZER, H. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. in the Eastern Anatolia region of Turkey. **Food Control**, v. 56, p. 2-9, 2003.

SANTOS, M. V & FONSECA, L. F. L. **Qualidade do Leite e Controle de Mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000.

SANTOS, M. V & FONSECA, L. F. L. Importância e efeito de bactérias psicotróficas sobre a qualidade do leite. **Higiene Alimentar**, p. 13-19, 2001.

SANTOS, M. V. & FONSECA, L. F. L. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. Barueri, SP: Manole, 314 p., 2007.

SANVIDO, G. B. **Efeito do tempo de armazenamento do leite cru e da temperatura de estocagem do leite pasteurizado sobre sua vida de prateleira**. 2007. Dissertação (Mestrado), Campinas, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

SCHUBERT, M. N. & NIERDELE, P. A. Estratégias competitivas do cooperativismo na cadeia produtiva do leite: O caso da ASCOOPER, SC. *In: 47º Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural*, Porto Alegre, 2009.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em Alimentos Protéicos: propriedades-degradacoesmodificacoes**. Sao Paulo; Varela, p. 517, 1996.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P.K., WANASUNDARA, P.D. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 32, n. 1, p. 67-103, 1992.

SHAHIDI, F. Antioxidants in food and food antioxidants. **Nahrung**, v. 44, p. 158-163, 2000.

SHILS, M. E.; OLSON, J. A.; SHIKE, M.; ROSS, A. C. **Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença**. 9 ed. São Paulo: Manole, v. 2, 2122 p., 2003.

SILVA, D. J. & QUEIROZ, A. C. **Análises de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3 ed. Viçosa: UFV, 235p., 2002.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, n. 94, 1999.

SILVA, J. A. **Tópicos da tecnologia dos alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 325 p., 2000.

SIMIONATO, J. I. **Composição química e quantificação de ácidos graxos com ênfase ao ácido linoléico conjugado (CLA) em leite e derivados**. 2008. 130 f. Tese (Doutorado), Maringá, Universidade Estadual de Maringá.

SIMIONATO, J. I.; GARCIA, J. C.; DOS SANTOS, G. T.; OLIVEIRA, C. C.; VISENTAINER, J. V.; SOUZA, N. E. Validation of the Determination of Fatty Acids in Milk by Gas Chromatography. **Journal Brazilian Chemical Society**, 21, 520, 2010.

SIMITZIS, P. E., DELIGEORGIS, S. G., BIZELIS, J. A., DARDAMANI, A., THEODOSIOU, I.; FEGEROS, K. Effect of dietary oregano oil supplementation on lamb meat characteristics. **Meat Science**, v.79, n.2, p. 217-223, 2008.

SIMOPOULOS, A. P. Omega-3 fatty acids in inflammation an autoimmune diseases. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 21, n. 6, p. 495–505, 2002.

SIMOPOULOS, A. P. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. **Experimental Biology and Medicine**, v. 233, n. 6, p. 674-688, 2008.

SINGH, K.; HARTLEY, D. G.; MCFADDEN, T. B.; MACKENZIE, D. D. S. Dietary fat regulates mammary stearoyl CoA desaturase expression and activity in lactating mice. **Journal of Dairy Research**, v. 71, p. 1–6, 2004.

SIRTORI, C. R.; TREMOLI, E.; GATTI, E.; MONTANARI, G.; SIRTORI, M.; COLLI, S.; GIANFRANCESCHI, G.; MADERNA, P.; DENTONE, C. Z.; TESTOLIN, G. Controlled evaluation of fat intake in the mediterrane an diet: comparative activities of olive oil and corn oil on plasma lipids and platelets in high risk patients. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 44, n. 5, p.635-642, 1986

SKANDAMIS, P. N.; TSIGARIDA, E.; NYCHAS, G. J. E. The effect of oregano essential oil on survival/death of *Salmonella typhimurium* in meat stored at 5 °C under aerobic, VP/MAP conditions. **Food Microbiology**, v. 19, p. 97-103, 2002.

SOUZA, L. G. Avaliação da composição e do perfil de ácidos graxos do leite de vaca cru e pasteurizado em minilaticínios. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 25, n. 2, p. 331-337, 2003.

STELWAGEN, K.; HOPSTER, H.; VAN DER WERF, J. T. N.; BLOKHUIS, H. J. Short Communication: Effects of isolation stress on mammary tight junctions in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 48-51, 2000.

STOOP, W. M.; BOVENHUIS, H.; HECK, J. M. L.; ARENDONK, J. A. M. Effect of lactation stage and energy status on milk fat composition of Holstein-Friesian cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 4, p. 1469–1478, 2009.

TAMANINI, R.; SILVA, L. C. C.; MONTEIRO, A. A.; MAGNANI, D. F.; BARROS, M. A. F.; BELOTI, V. Avaliação da qualidade microbiológica e dos parâmetros enzimáticos da pasteurização de leite tipo “C” produzido na região norte do Paraná. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 3, p. 449-454, 2007.

TEIXEIRA, E.; MEINERT, E. M.; BARBETTA, P. A. **Análise sensorial de alimentos**. Florianópolis: UFSC, 180 p., 1987.

TETRA PAK. **Dairy processing handbook**. Tetra Pak Processing Systems AB, Lund, Sweden, 1996.

TORRES, A.; FRIAS, J.; GRANITO, M.; VIDAL-VALVERDE, C. Germinated *Cajanus cajan* seeds as ingredients in pasta products: Chemical, biological and sensory evaluation. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 202–211, 2007.

TRAESEL, C. K.; LOPES, S. T. A.; WOLKMER, P.; SCHMIDT, C.; SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H. Óleos essenciais como substituintes de antibióticos promotores de crescimento em frangos de corte: perfil de soroproteínas e peroxidação lipídica. **Ciência Rural**, v. 41, n. 2, p. 278-284, 2011.

TSINAS, A. C. The art of oregano. **Grain Feed & Milling Technology**, v. 1, n.1 p. 25-26, 1999.

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 Fish Science**, v. 1, n. 2, p. 97-103, 2007.

ULBRICHT, T. L. V. & SOUTHGATE, D. A. T. Coronary heart disease: seven dietary factors. **The Lancet**, v. 338, n. 8773, p. 985-92, 1991.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Leche y productos lácteos: tecnología, química y microbiología**. Zaragoza: Acribia, 1995.

VEISSEYRE, R. **Lactologia técnica: composición, recogida, tratamiento y transformación de la leche**. 2ª ed. Zaragoza: Acribia, 629 p., 1988.

VISENTAINER, J. V. & FRANCO, M. R. B. **Ácidos Graxos em óleos e gorduras: identificação e quantificação**. São Paulo: Varela, 2006.

WALSTRA, P.; GEURTS, T. J.; NOOMEN, A.; JELLEMA, A.; BOEKEL, M. A. J. S. **Ciência de la leche y tecnología de los productos lácteos**. Zaragoza: Editorial Acribia, 729 p., 2001.

WOOD, J. D.; RICHARDSON, G. R.; NUTE, G. R.; FISHER, A.V.; CAMPO, M. M.; KASAPIDOU, E.; SHEARD, P. R.; ENSER, M. Effects of fatty acids on meat quality; a review. **Meat Science**, v. 66, p. 21-32, 2003.

YEHUDA, S.; RABINOVITZ, S.; CARASSO, R.L.; MOSTOFSKY, D.I. The role of polyunsaturated fatty acids in restoring the aging neuronal membrane. **Neurobiol Aging**, vol. 23, n. 5, p. 843-53, 2002.

YOUDIM, K.A.; MARTIN, A.; JOSEPH, J.A. Essential fatty acids and the brain: possible health implications. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 18, n. 4/5, p. 383-99, 2000.

ZHENG, W. & WANG, S. Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 5165–5170, 2001.