

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E**  
**TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**ARYANE RIBEIRO DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL E**  
**BIOATIVIDADE DE LEITE ASININO DO ECÓTIPO**  
**NORDESTINO OBTIDO DE DIFERENTES FASES DE**  
**LACTAÇÃO**

João Pessoa – PB  
2021

ARYANE RIBEIRO DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL E  
BIOATIVIDADE DE LEITE ASININO DO ECÓTIPO  
NORDESTINO OBTIDO DE DIFERENTES FASES DE LACTAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre.  
Área de Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Taliana Kênia Alencar Bezerra

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Yasmim Regis Formiga de Sousa.

João Pessoa – PB  
2021

SS86a Silva, Aryane Ribeiro da.

Avaliação da composição nutricional e bioatividade  
de leite asinino do ecótipo nordestino obtido de  
diferentes fases de lactação / Aryane Ribeiro da Silva.

- João Pessoa, 2021.  
58 f. : il.

Orientação: Taliana Kênia Alencar Bezerra.

Coorientação: Yasmim Regis Formiga de Sousa.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CT.

1. Tecnologia de alimentos. 2. Leite de jumenta. 3.  
Lisozima. 4. Fases de lactação. 5. Leite asinino. I.  
Bezerra, Taliana Kênia Alencar. II. Sousa, Yasmim Regis  
Formiga de. III. Título.

UFPB/BC

CDU 664(043)

ARYANE RIBEIRO DA SILVA

AVALIAÇÃO DE BIOATIVIDADES EM LEITE ASININO EM DIFERENTE FASES  
DE LACTAÇÃO

Defesa da Dissertação em 26 de novembro de 2021

BANCA EXAMINADORA



**Prof<sup>a</sup>. Dra Taliana Kênia Alencar Bezerra - DEA/CT/ UFPB**

**Presidente da banca  
Orientadora**



**Prof<sup>a</sup>. Dra. Yasmim Regis Formiga de Sousa - UTA/CCTA/ UFCG**

**Coorientadora**



**Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Elieidy Gomes de Oliveira - DN/CCS/UFPB**

**Examinador interno**



**Prof. Dr. Jorge Eduardo Cavalcante Lucena - UFAPE**

**Examinador externo**

## RESUMO

---

Os asininos foram essenciais para a economia rural, em diversas civilizações, há milhares de anos, devido à sua rusticidade e capacidade de carga, sendo na antiguidade utilizados como animal de tração e na produção de leite. Entretanto, devido ao processo de mecanização no meio rural foram perdendo sua importância. Recentemente, o leite de jumenta vem ganhando destaque, visto que diversos estudos demonstram a similaridade ao leite humano quanto a composição química, a palatabilidade, ao alto valor nutritivo, e a possibilidade de ser consumido como alternativa ao leite humano na alimentação de neonatos e crianças com intolerância à proteína do leite de vaca ou alergias alimentares. Devido à escassez de estudos relacionados à composição do leite de jumenta do ecótipo Nordeste, este estudo teve como objetivo avaliar as características física – química, atividade de lisozima e antioxidante do leite de jumenta do ecótipo Nordeste, no período de 180 dias da fase lactação. As amostras de leites utilizadas no experimento foram obtidas durante 180 dias pós-parto (1, 3, 15, 30, 60, 90, 120, 150 e 180) de um rebanho de 10 fêmeas, com idades variando de 3,5 a 6,5 anos, sadias, alocadas na região do Agreste Pernambucano. Os experimentos envolveram análises para os parâmetros de proteína total, gordura e lactose. Além de ensaios para avaliar atividade da lisozima e capacidade da atividade antioxidante (ABTS e ORAC). Observou-se no colostro um alto teor de proteína e lipídios, enquanto no leite maduro apresentou maiores valores para lactose e pH neutro (7,0). Os teores encontrados para atividade de lisozima demonstram uma excelente atividade dessa enzima, com maiores valores no início do período de lactação (colostro 4040,01 U/mL). Na atividade antioxidante foi verificado comportamentos distintos entre os métodos utilizados para verificar a capacidade antioxidante; entretanto, o período entre 60 e 90 dias pós-parto os resultados expressam valores significativos para método de ORAC (1,58,6 e 143,7  $\mu\text{mol}$  trolox TEAC/100 mL, respectivamente). Considerando tais resultados, o estágio de lactação influencia significativamente a composição, atividade de lisozima, capacidade antioxidantes, também estão relacionados a modificações da composição do leite.

**Palavras-chaves:** componentes bioativos, leite de jumenta, lisozima, fase de lactação.

## ABSTRACT

---

Donkeys were essential for the rural economy, in several civilizations, thousands of years ago, due to their rusticity and carrying capacity, being used in antiquity as a draft animal and in the production of milk. However, due to the mechanization process in rural areas, they lost their importance. Recently, donkey milk has gained prominence, as several studies have shown the similarity to human milk in terms of chemical composition, palatability, high nutritional value, and the possibility of being consumed as an alternative to human milk in the feeding of neonates and children. with cow's milk protein intolerance or food allergies. Due to the scarcity of studies related to the composition of donkey milk from the Nordeste ecotype, this study aimed to evaluate the physical-chemical characteristics, lysozyme and antioxidant activity of the milk of donkey from the Nordeste ecotype, in the period of 180 days of the lactation phase. The milk samples used in the experiment were obtained during 180 days postpartum (1, 3, 15, 30, 60, 90, 120, 150 and 180) from a herd of 10 females, with ages ranging from 3.5 to 6.5 years old, healthy, allocated in the Agreste region of Pernambuco. The experiments involved analyzes for the parameters of total protein, fat and lactose. In addition to assays to assess lysozyme activity and antioxidant activity capacity (ABTS and ORAC). A high content of protein and lipids was observed in colostrum, while in mature milk it presented higher values for lactose and neutral pH (7.0). The levels found for lysozyme activity demonstrate an excellent activity of this enzyme, with higher values at the beginning of the lactation period (colostrum 4040.01 U/mL). In the antioxidant activity, different behaviors were observed between the methods used to verify the antioxidant capacity; however, the period between 60 and 90 days postpartum the results express significant values for the ORAC method (1,58,6 and 143,7  $\mu\text{mol trolox TEAC}/100 \text{ mL}$ , respectively). Considering these results, the lactation stage significantly influences the composition, lysozyme activity, antioxidant capacity, are also related to changes in milk composition.

**Keywords:** bioactive components, donkey, lysozyme, lactation stage.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|                                                                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Fêmeas do ecótipo Nordestino .....                                                                            | 13 |
| <b>Figura 2.</b> Delineamento experimental da obtenção, caracterização e de marcadores de bioatividades do leite asinino ..... | 24 |
| <br><b>Artigo</b>                                                                                                              |    |
| <b>Figura 1.</b> Protein content of donkey milk from the Brazilian Northeastern ecotype at 180 days of lactation.....          | 59 |

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Composição química e nutricional do leite de diferentes espécies ..... 17

**Tabela 2.** Estudos sobre a avaliação do potencial nutricional e funcional do leite asinino..... 22

### Artigo

**Tabela 1.** Physicochemical composition of donkey milk of the Brazilian Northeastern ecotype during 180 days of lactation..... 57

**Tabela 2.** Lysozyme concentration, antioxidant activity against ABTS radical and oxygen radical absorption capacity (ORAC) of asinine milk of the Nordeste ecotype during 180 days of lactation ..... 58

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>                                                                                                       | <b>10</b> |
| <b>2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>                                                                                            | <b>12</b> |
| 2.1 PRODUÇÃO DO LEITE ASININO.....                                                                                             | 12        |
| 2.2 ASININO DO ECÓTIPO NORDESTINO.....                                                                                         | 13        |
| 2.3 ASPECTOS GERAIS DA FASE DE LACTAÇÃO.....                                                                                   | 14        |
| 2.4 COMPOSIÇÃO DO LEITE ANINO.....                                                                                             | 16        |
| 2.5 BIOATIVIDADE DO LEITE ASININO .....                                                                                        | 18        |
| 2.5.1 Propriedades antimicrobianas: atividade da lisozima.....                                                                 | 19        |
| 2.5.2 Propriedades antioxidantes.....                                                                                          | 20        |
| 2.6 POTENCIALIDADES DO LEITE ASININO.....                                                                                      | 21        |
| <b>3 METODOLOGIA.....</b>                                                                                                      | <b>24</b> |
| 3.1 AMOSTRAGEM E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....                                                                                | 24        |
| 3.2 MANEJO NUTRICIONAL DOS ANIMAIS.....                                                                                        | 25        |
| 3.3 ANÁLISES FÍSICAS - QUÍMICAS.....                                                                                           | 26        |
| 3.4 CAPACIDADE DA ATIVIDADE DE LISOZIMA.....                                                                                   | 26        |
| 3.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....                                                                                                | 27        |
| 3.5.1 Preparo dos extratos.....                                                                                                | 27        |
| 3.5.2 Atividade sequestradora do radical 2,2- azino-bis(3-etilbezotiazolina)-6-<br>ácido sulfônico (ABTS <sup>•+</sup> ) ..... | 27        |
| 3.5.3 Capacidade de absorção de radical de oxigênio (ORAC) .....                                                               | 28        |
| 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....                                                                                                   | 28        |
| REFERÊNCIAS.....                                                                                                               | 29        |
| <b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                                                                                           | <b>38</b> |
| Artigo: Composition and bioactivity markers of asinine milk from the northeast<br>brazilian ecotype .....                      | 39        |
| <b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>                                                                                             | <b>61</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

Os asininos desempenham papel importante como animais de trabalho em muitas economias rurais, sendo usados em terapia assistida e atividades sociais recreativas. São utilizados ainda para produção de carne, bem como a obtenção de gelatina da sua pele para utilização em medicamentos tradicionais asiáticos e para a produção de leite destinado à alimentação humana e cosméticos (VANDENPLAS et al., 2014; ALTOMONTE et al., 2019).

O rebanho mundial de asininos é estimado em 46 milhões de animais dos quais 6,7 milhões estão nas Américas, segundo dados da agência da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FOASTAT), no Brasil, a população total de jumentos ultrapassava 800 mil em 2018. Somente a região Nordeste abrigaria 86,7% desses animais, de acordo com dados de 2017 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Contudo, a mudança em atividades agrícolas, com mecanização, gerou abandono o abandono e desvalorização dos asininos.

Recentemente, o leite asinino ganhou interesse no campo científico a partir do seu papel na nutrição humana, principalmente voltado para crianças que sofrem de alergia à proteína do leite de vaca (VANDENPLAS et al., 2014; BARNI et al., 2018; SARTI et al., 2019). Em estudo realizado por Monte et al. (2018), os autores afirmam o sucesso da utilização desse leite como uma alternativa às fórmulas hipoalergênicas disponíveis para bebês que sofrem de alergia à proteína do leite de vaca. Recentemente, foi demonstrado *in vivo* que a suplementação dietética com leite asinino em substituição ao leite humano quando necessário está associada a uma diminuição do estado inflamatório e, por sua vez, relacionada a uma melhora no metabolismo de lipídios e glicose, em comparação com uma dieta com suplementação de leite de vaca (TRINCHESE et al., 2015).

Estudo realizado por Piovesana et al. (2015), 13 peptídeos foram identificados em amostras de leite asinino comercial sem nenhum tratamento e a determinação de atividades biológicas esses peptídeos demonstraram atividade anti-hipertensiva e antioxidante de 67 e 35%, respectivamente, demonstrando o potencial do leite asinino para fins nutracêuticos.

Trata-se de uma matriz alimentar muito semelhante ao leite humano, especialmente em termos de perfil proteico e teor de lactose, o que aumenta a sua palatabilidade, estimula a absorção intestinal de cálcio, e fornece um excelente substrato para o desenvolvimento da flora entérica (ALTOMONTE et al., 2019). Ainda, apresenta

excelente quantidade de ácidos graxos insaturados, fundamentais para prevenção de doenças inflamatórias e cardiovasculares (CHIOFALO et al., 2011; COSENTINO et al., 2015).

Apresenta também compostos bioativos como ácidos graxos, aminoácidos, vitaminas e minerais, com excelente capacidade antioxidante, o que faz do leite asinino uma matriz de grande interesse para proporcionar efeitos benéficos a saúde do consumidor (COSENTINO et al., 2013). Em soma, destaca-se o alto conteúdo de lisozima, um agente antimicrobiano natural, que o torna um alimento com reduzida contaminação microbiana podendo diminuir a incidência de infecções gastrointestinais (BUSINCO et al., 2000; COSENTINO et al., 2015; ASPRI et al. 2018). Em modelos animais, a lisozima demonstrou limitar as infecções bacterianas e promover o crescimento de bactérias probióticas associadas à saúde intestinal (HUANG et al., 2018). O teor de lisozima no leite asinino oscila de acordo com a raça das jumentas, e pode variar de 1 a 3,7 g/L (MARTINI et al. 2019).

Entretanto, as características físico-químicas e bioativas do leite de jumenta dependem de uma combinação de diferentes fatores, incluindo espécie animal, período de lactação, estação do ano, dieta, estado fisiológico, entre outros (RANGEL, 2015). Embora se confirme a presença de componentes bioativos no leite asinino, não existe relatos quanto ao ecótipo Nordeste de asnos no Brasil e suas variações durante o período de lactação. Diante do exposto, nesta pesquisa objetivou-se avaliar a composição nutricional, a atividade de lisozima e a capacidade antioxidante do leite asinino do ecótipo Nordeste durante 180 dias de lactação.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 PRODUÇÃO DE LEITE ASININO

O Asno (*Equus asinus*) é um membro da família dos equídeos, que também inclui cavalos e zebras, e descende do pequeno asno cinzento do norte da África (*Equus africanus*), foi domesticado na bacia do Mediterrâneo e utilizada há mais de 5000 anos, e ao longo dos séculos, se espalharam pela Ásia, Índia, Sul da Europa e para as Américas (CAMILLO et al., 2017; MCLEAN; GONZALEZ, 2018). Tinham como função principal o transporte de cargas e pessoas, mas também para produção do leite (VILA et al., 2001; ICZN, 2003; DIAS; MASSARA; BOCCHIGLIERI, 2019).

Nos últimos 10 anos, a criação de asnos para a produção de leite aumentou, assim com o número de trabalhos de pesquisa publicados sobre o uso de leite (VALLE et al., 2017). O consumo de leite asinino está centralizado na região do Mediterrâneo e a produção da União Europeia (UE) é estimada em cerca de 300.000 litros por ano (EUROLACTIS, 2016). Na Itália, o número de fazendas especializadas na produção de leite asinino é estimado entre 100 e 200 unidades, sendo em sua maioria pequenos produtores, com menos de 50 animais, tendo as raças Ragusano e Martina Franca dentre as mais criadas (BORDONARO et al., 2012).

A produção de leite de jumento pode variar dependendo de fatores genéticos, ambientais, fisiológicos e nutricionais com produção e composição do leite influenciadas por fatores relacionados ao regime de manejo, ordem de entrega e fisiologia (MARTINI et al., 2014; RANGEL et al., 2015). Segundo D'Alessandro e Martemucci (2012), em comparação com os ruminantes, os equídeos têm menor capacidade de armazenamento. Em comparação, a produção de leite asinino pode ser considerada relativamente menor, produzindo em média apenas 100-150 litros de leite em cada período de lactação (colostro, leite de transição e leite maduro) (MARTINI et al., 2014; Li et al, 2018). As fêmeas asininas na Itália são ordenhadas uma vez ao dia, por ordenhadeiras mecânicas adaptadas de equipamentos utilizados em cabras e vacas; as jumentas produzem cerca de 1,5 litros por ordenha. A baixa produção por ordenha é decorrente da característica do úbere das fêmeas asininas que, assim como o restante dos equídeos, apresentam a cisterna do úbere com capacidade máxima de armazenamento de até 2,5 litros das glândulas

mamárias, que apresentam produção de no máximo; por isso, devem ser estimuladas por ordenha para uma maior produção de leite (SALIMEI; FANTUZ, 2012).

No Brasil, ainda não há sistemas de produção claramente definidos voltados à exploração racional das espécies asinina, o que dificulta a organização da cadeia produtiva do leite e seus derivados. Há também escassez de informações técnicas científicas, particularmente na literatura brasileira (MESIAS et al., 2021). Contudo, destacam-se três raças de asininos, originárias de animais trazidos pelos colonizadores e do processo de seleção natural: o assino Nordestino (ecótipo), o asno Brasileiro e o asno Pêga (MARIANTE; CAVALCANTE, 2006; ALMEIDA, 2009).

## 2. 2 ASININO DO ECÓTIPO NORDESTINO

Conhecido por seu porte pequeno, grande rusticidade e adaptação às condições impostas pelo o bioma Caatiga, o jumento do ecótipo Nordestino (figura 1A e 1B) encontra-se amplamente distribuído na região semiárida do Nordeste brasileiro (MESSIAS et al., 2021). Este processo adaptativo se deve por meio de seleção natural que esses animais passaram ao longo de anos, e desenvolveram características específicas de adaptação, através de acasalamentos aleatórios; assim surgiu o ecótipo “Nordestino”, sendo utilizados na região em diferentes atividades (CARNEIRO et al., 2018).

**Figura 1.** Fêmeas do ecótipo Nordestino (A e B).



Fonte: Próprio autor (2020).

Devido sua rusticidade os asininos são comumente criados no semiárido, com base em pastagens nativas, que se compõe uma fonte alimentar para os animais da região (SANT'ANA et al., 2019). Considerados por muitos mais resistentes que os cavalos, os asininos podem sobreviver com poucos recursos, sendo adaptáveis a ambientes mais áridos. Além disso, são mais tolerantes ao calor e a desidratação, sendo esse animal adequando para regiões do Semiárido (MICLEAN; GONZALEZ, 2018).

A adaptação a estes ambientes é uma peculiaridade obtida através do controle da temperatura corporal, do metabolismo de água e outras características nutricionais e anatômicas inerentes aos asininos. Por mecanismos compensatórios, eles são capazes de manter a homeotermia nos trópicos, possuem grande habilidade em tolerar sede, de reidratação rápida e de manutenção do apetite. Animais em restrição hídrica (2 a 3 dias), por exemplo, perdem menos água através das fezes do que aqueles com acesso à água *ad libitum*; o que é interessante, porque a perda de água via fezes é responsável por 50% de toda água perdida pelo animal (NRC, 2007).

### 2.3 ASPECTOS GERAIS DA LACTAÇÃO

A lactação é o processo de produção do leite destinado a fornecer os nutrientes e fatores de defesas (imunoglobulinas) necessários para o desenvolvimento dos filhotes dos mamíferos. Assim, uma vez concluído o desenvolvimento gestacional do feto, a glândula mamária irá substituir, a função nutritiva e protetora da placenta durante a gestação (SILVA, 2020).

A lactogênese, é o processo pelo qual ocorre a síntese e secreção do leite pela glândula mamária, começa no final da gestação coincidindo com o desencadeamento do parto (NEVILLE et al., 2002). O colostro é a primeira secreção formada na glândula mamária coincidindo com o parto. Isto deve-se ao fato de que o processo de lactação resulta de uma interação complexa de hormonal que preparam a glândula mamária para a secreção do leite (SVENNERSTEN-SJAUNJA; OLSSON, 2005).

A ingestão de colostro por recém-nascidos é de grande importância para a sua sobrevivência, não só pelo seu elevado valor nutritivo, mas também pelo seu teor de imunoglobulinas que lhe confere a imunização passiva necessária para o proteger contra patologias. Em algumas espécies (homem, coelho e cobaia) grande parte dos anticorpos passam para a circulação do feto através da placenta durante a gestação. Nos animais

domésticos (vaca, égua, ovelha, cabra, jumentas) as características da placenta (número de camadas entre a circulação materna e fetal) não permitem a passagem destas proteínas. Como resultado, a imunização das crias nestas espécies animais vai depender da transferência das imunoglobulinas através do colostro (ANDRADE et al., 2010; MURRAY; LESLIE, 2013; MALDONADO; NADER-MACIAS, 2016). O epitélio intestinal dos recém-nascidos permite a passagem destas imunoglobulinas durante as primeiras 24 a 48 horas de vida. Passado este tempo, o epitélio torna-se impermeável à passagem dos anticorpos, fato que põe em evidência a importância que tem para os animais recém-nascidos e desprovidos de defesas a ingestão do colostro durante os primeiros dias. A composição do colostro caracteriza-se (em relação ao leite maduro) por um teor mais elevado de proteínas, gordura e vitaminas, minerais e uma menor concentração de lactose (FRANDSON et al., 2011).

A composição do colostro muda gradualmente durante os primeiros três dias após esse intervalo o leite passa por um processo transição, podendo durar até 15 dias pós-parto para então atingir o estágio final e definitiva o leite maduro. O leite maduro tem como principal característica fornecer nutrientes em quantidades adequadas de acordo com a necessidade de cada espécie, garantindo boas condições para o pleno desenvolvimento durante os primeiros meses de vida. Diferente do colostro, o leite maduro apresenta um equilíbrio perfeito entre macronutrientes (proteínas, lipídios e carboidratos) e micronutrientes (vitaminas, como a vitamina A e C, e minerais, como ferro, cálcio e zinco) (AZEVEDO et al., 2013).

O período de lactação em asininos tem uma duração entre 45 e 200 dias (MADHUSUDAN et al., 2017). No entanto, a composição do leite pode sofrer modificações ao longo do período de lactação. A alimentação do animal, também, apresenta papel relevante na produção e composição do leite e aspectos relacionados à absorção de nutrientes. Em sistemas extensivos, observa-se aumento no teor de gordura e na concentração de vitaminas lipossolúveis, bem como, perfil de ácidos graxos mais favorável para a nutrição humana (VALLE et al., 2018). O estágio de lactação pode afetar a composição deste leite, quanto ao teor de gordura e proteína, bem como, minerais (Ca, Mg, K e P), enquanto, o teor de lactose e sólidos totais permanecem quase inalterados. O perfil de ácidos graxos apresenta-se, também, influenciado pela fase de lactação, com diminuição de ácidos graxos saturados e aumento de ácidos insaturados, ao longo do período de lactação destacando-se uma baixa razão  $n-6/n-3$  (2:1) (MASSOURAS; TRIANTAPHYLLOPOULOS; THEODOSSIOU, 2017).

## 2.4 COMPOSIÇÃO DO LEITE ASININO

O leite é um líquido secretado por fêmeas mamíferas, das quais existem cerca de 4.500 espécies em todo o mundo. É produzido para atender as necessidades nutricionais dos neonatos, como fonte de energia, aminoácidos essenciais e grupos amina para a biossíntese dos não-essenciais, ácidos graxos, vitaminas, elementos inorgânicos e outros fatores nutricionais, como taurina e água (O'MAHONY; FOX, 2013)

O leite asinino é branco, com textura fina e leitosa, com aroma e sabor ligeiramente doce e agradável (MADHUSUDAN et al., 2017). Quando comparado ao leite humano, o leite asinino apresenta composição semelhante quanto ao teor total de sólidos, proteína bruta, lactose e cinzas, sua consistência fluida, provavelmente devido à baixa concentração de sólidos totais e apresenta valores médios em mg/100mL para os minerais cálcio (88,3), potássio (75,5), fósforo (56,2), sódio (31,9), manganês (8,9) e zinco (0,24) (MESSIAS et al., 2021).

Em termos de composição proteica, o leite asinino é excepcionalmente semelhante ao leite humano e significativamente diferente de vaca. A fração de proteínas de soro de leite asinino contém seis proteínas principais: lactoferrina, albumina sérica,  $\beta$ -lactoglobulina, lisozima,  $\alpha$ -lactalbumina e imunoglobulinas. Os baixos teores de  $\beta$ -lactoglobulina e de caseína, provavelmente, estão relacionados com as características hipoalergênicas relatadas para o leite de assino (ASPRI et al., 2018; MADHUSUDAN et al., 2017). O constituinte mais interessante das proteínas desse leite é lisozima, que está presente em um nível similar no leite humano (BUSINCO et al., 2000; CARROCCIO et al., 2000).

A lactose do leite asinino varia entre 6,0 e 7,0% e é superior ao do leite de vaca (4,1 a 4,4%), este conteúdo é responsável pelo sabor agradável deste leite. O alto teor de lactose promove os processos de osteogênese, facilita a absorção intestinal de cálcio e fósforo, e influencia a acumulação mineral na estrutura óssea, o que ajuda na prevenção da osteoporose, além disso, a lactose pode promover o desenvolvimento de probióticos intestinais, inibir o crescimento de bactérias deteriorantes e ainda e participa da composição dos tecidos e órgãos, sintetizando glicolípídeo, um dos materiais básicos para

**Tabela 1** – Composição química e nutricional do leite de diferentes espécies.

| <b>Espécie</b>           | <b>Matéria Seca</b> | <b>Gordura</b> | <b>Proteína</b> | <b>Lactose</b> | <b>Cinzas</b> | <b>Energia</b> |
|--------------------------|---------------------|----------------|-----------------|----------------|---------------|----------------|
|                          |                     |                | (g/L)           |                |               | (kJ/L)         |
| Humana <sup>1</sup>      | 108-152             | 34-48          | 7-35            | 67-78          | 1,7-2,1       | 2518-3698      |
| Equina <sup>2,3</sup>    | 93-116              | 16-42          | 14-32           | 56-72          | 3-5           | 1636-2050      |
| Asinina <sup>1</sup>     | 85-118              | 1-38           | 15-22           | 61-73          | 3-4           | 1309-1732      |
| Bovina <sup>2</sup>      | 118-130             | 33-54          | 30-39           | 44-56          | 7-8           | 2709-2843      |
| Ovina <sup>2,3</sup>     | 170-200             | 50-90          | 45-70           | 41-59          | 8-10          | 4038-4439      |
| Caprina <sup>2</sup>     | 119-163             | 30-72          | 30-52           | 32-50          | 7-9           | 2802-2894      |
| Bubalina <sup>2,3</sup>  | 157-174             | 53-90          | 27-47           | 32-49          | 8-9           | 4244-4779      |
| Camelídeo <sup>4,5</sup> | 86-160              | 2,8-64         | 21-5            | 24-58          | 6-10,5        | 2090-2784      |

Fonte: <sup>1</sup>Altomonte et al. (2019); <sup>2</sup>Rangel et al. (2015); <sup>3</sup>Elbagermi et al. (2020); <sup>4</sup>Izadi et al. (2019); <sup>5</sup>Singh et al. (2017).

o tecido neural. (LI; LIU; GUO, 2018; MALISSIOVA et al., 2016). O teor de gordura do leite asinino é menor do que o teor de gordura do leite humano, como observado na Tabela 1.

Essa diferença pode estar associada ao baixo conteúdo energético deste leite, dados encontrados D'Alessandro e Martemucci (2012); Martini et al. (2014); Salimei e Fantuz (2013) e Santillo et al. (2018) destacaram ainda na fração lipídica do leite asinino uma composição de ácidos graxos mais favorável, por ser esta mais rica em ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) e possuir menor concentração de ácidos graxos saturados (SFA) e monoinsaturados (MUFA), quando comparado com o leite de outras espécies.

Os dados sobre as vitaminas presentes no leite asinino são escassos, contudo, sabe-se que as concentrações das vitaminas A e E são menores do que o leite humano e isso se deve principalmente pelo menor teor de gordura no leite asinino. Esse leite possui ainda alta concentração das vitaminas B1, B2 e B12, entretanto o conteúdo de vitamina B3 é cerca de metade daquele encontrado no leite humano (SALIMEI; FANTUZ, 2012).

## 2.5 BIOATIVIDADE DO LEITE ASININO

O grande interesse pelo leite asinino se deve às suas propriedades nutricionais e potenciais funcionais/terapêuticas. Além disso, as propriedades bioativas têm sido atribuídas ao leite, por apresentar atividades antimicrobiana, antioxidante, antiviral, imunomoduladoras, bem como uma hipoalergenicidade. Essas propriedades estão relacionadas à presença de constituintes do leite em quantidades substanciais, como imunoglobulinas, lisozima, lactoferrina, ácidos graxos  $\omega$ -3, peptídeos bioativos e uma relação com a caseína e as proteínas do soro do leite (TIDONA et al. 2011; PIOVESANA et al., 2015; ASPRIN et al., 2018).

### 2.5.1 Propriedades antimicrobianas: atividade da lisozima

O leite asinino apresenta um rico conteúdo de peptídeos bioativos, como a lisozima, lactoferrina e lactoperoxidase, que conferem ao mesmo, ação antimicrobiana, bacteriostática, em especial na flora intestinal, favorecendo ao desenvolvimento de bactérias benéficas e dificultando ou inibindo as patogênicas. A ação integrada desses peptídeos funciona contra possíveis infecções e causas de inflamação intestinal, uma vez que é um ambiente de ampla diversidade de microrganismos que atuam de forma

simbiótica para um perfeito desempenho do sistema gastrointestinal (PESSIONE; CIRRINCIONE, 2016).

A atividade de lisozima está ligada à capacidade de catalisar a hidrólise das ligações 1,4- $\beta$  entre o ácido N-acetilmurâmico e N-acetilglucosamina em peptidoglicano, que é o principal componente da parede celular bacteriana Gram-positiva, causando lise bacteriana (ALHAZMI; STEVENSON; AMARTEY; 2014; CAPPANNELLA et al., 2016). Esta enzima destaca-se quanto a sua atuação e faz parte do sistema imunológico inato e está presente nas secreções (lágrimas, saliva, urina, muco e leite) e também é produzida por macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (RAGLAND; CRISS, 2017).

Murua et al. (2013), demonstraram o poder bactericida do leite asinino, contra várias bactérias patogênicas (*Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*), através de isolados de *L. plantarum* do leite asinino que produzia uma bacteriocina (LP08AD) que inibiu também o crescimento de *L. monocytogenes*, *E. faecium*, e *L. curvatus*.

Foram relatadas concentrações de lisozima entre 0,3 a 1,1 g/L no leite humano e apenas em quantidades traço em ruminantes (ALTOMONTI et al., 2019), tais como no leite da vaca (0,18  $\mu\text{g/mL}$ ), búfala (0,15  $\mu\text{g/mL}$ ) e cabra (0,25  $\mu\text{g/mL}$ ) (KUMARI; MATHUR, 1981; SCHARFEN et al., 2007). Por outro lado, em estudo realizado por Gubić et al. (2015) foi observada uma concentração no leite asinino de até 50 vezes maior do que no leite humano. Martini et al. (2019), avaliaram atividade de lisozima do leite asinino, da raça Amanita, com relação a fase de lactação e utilização de tratamentos térmicos com pasteurização, e observaram que os maiores valores de atividade da lisozima foram encontrados no início da lactação, assim como o processo de pasteurização, à baixa temperatura e prologado tempo, não interferiu na atividade.

Como os compostos antimicrobianos naturais são preferidos pelos consumidores, novas fontes naturais e benéficas à saúde são necessárias para produtos industriais. Quantidades limitadas de lisozima e lactoferrina são produzidas a partir de clara de ovo e leite de vaca, respectivamente, mas podem causar reações alérgicas em alguns pacientes (NIRO et al., 2017). Devo leite asinino ter um alto teor de lisozima, essa proteína vem sendo estudada como uma nova fonte natural e funcional desses conservantes antimicrobianos em queijos (OZTURKOGLU-BUDAK et al., 2021).

### 2.5.2 Propriedades antioxidantes

A oxidação está cada vez mais sendo objeto de estudo, devido a sua grande relevância, por estar relacionada a doenças como estresse oxidativo, câncer, diabetes, aterosclerose, doenças neurodegenerativas, inflamatórias e o envelhecimento celular (LEE et al., 2013).

A oxidação ocorre quando alguma molécula perde elétron, como consequência da transferência para outra molécula, gerando os radicais livres. Estes radicais livres podem ser formados em moléculas importantes para o funcionamento do nosso corpo e assim provocar disfunções (estresse oxidativo). Com isto é necessário a utilização de moléculas antioxidantes para impedir reações oxidativas no organismo. A utilização de peptídeos com ação antioxidantes tem a capacidade de cessar reações de peroxidação desencadeadas, através da doação de um par de elétrons para os radicais livres (DUAN et al., 2014).

Uma célula saudável tem um equilíbrio pró-oxidante-antioxidante. Embora este equilíbrio possa ser alterado em relação aos pró-oxidantes quando a produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS) aumenta enormemente ou quando os níveis de antioxidantes diminuem. Essa fase é denominada estresse oxidativo. O antioxidante é um composto que previne ou retarda a oxidação de substratos, mesmo se este composto estiver disponível em concentração substancialmente mais baixa do que os substratos oxidados. Além disso, possuem características que protegem a pessoa dos radicais livres e dos efeitos das ROS (SHAHIDI; ZHONG, 2015).

A avaliação do *in vivo* do potencial antioxidante é avaliado principalmente pelos efeitos em diferentes parâmetros bioquímicos diretamente envolvidos na manutenção de um estado antioxidante equilibrado / correto, tais como: malondialdeído (MDA), CAT, SOD, glutathione (GSH), GSH-Px, GST, GR, xantina oxidase (XOD), peroxidase (Px), alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), lactato desidrogenase (LDH), fosfatase alcalina (ALP), c-Glutamil transpeptidase (c-GT), poder antioxidante redutor FRAP), 2,2'-azobis (2-amidino-propano) dicloridrato (APPH) - hemólise, carbonilação de proteínas (PC), conjugados de dieno, glicação de colágeno, capacidade antioxidante total (TAOC), monoamina oxidase (MAO), capacidade de absorção de radical de oxigênio (ORAC), gama glutamil transferase (GGT), transaminases de glutamato oxaloacetato (GOT), glutamato piruvato transaminases (GPT) e 2,2-azino-bis (3-etil-benzotiazolína-6-sulfonato) (ABTS).

O leite asinino apresenta capacidade antioxidante devido à composição química. Li et al. (2018) avaliaram a atividade antioxidante do leite asinino em pó, pela capacidade de remover o OH *in vitro* e verificaram a atividade antioxidante numa faixa de 13,93 a 16,578 U/mL. Essa capacidade está relacionada a composição dos ácidos graxos poliinsaturados como ômega 3 e 6, além do leite de apresentar proporções adequadas de cálcio e fósforo os quais apresenta boa capacidade quelante e resistência a oxidação, os peptídeos derivados da caseína e do soro do leite, e por fim o alto teor de vitaminas C e E (SIMOS et al., 2011).

A proteína e peptídeos apresentam ampla atuação antioxidante em leites e devido a isto são utilizadas como objeto de estudo de pesquisadores. A lactoferrina, por exemplo, atua como antioxidante, devido a sua capacidade de quelar o ferro, tornando-o indisponível para reações de oxidação (PIOVESANA et al., 2015). Bucevic et al. (2014), ao realizarem testes *in vitro*, observaram que o soro de leite asinino apresentou a maior atividade antioxidante, após a digestão intestinal simulada, quando comparado ao leite de outras espécies.

Em soma, os peptídeos antioxidantes atuam no mecanismo de controle da peroxidação enzimática e não enzimática de ácidos graxos, atuando como sequestradores diretos de radicais livres, supressores de oxigênio não radicais ou quelantes de metais, também podem eliminar precursores de radicais, controlando assim os danos das espécies reativas de oxigênio (EROs) às células e tecidos, resultando em uma ação benéfica em todo o organismo (ZHANG et al., 2015).

Consideravelmente, a capacidade antioxidante do leite depende da origem animal, tipo genético (raça), nutrição (em termos de composição, quantidade e qualidade dos complementos de gordura na ração, bem como a condição da pastagem) (FARDET; ROCK, 2017).

## 2.6 POTENCIALIDADES DO LEITE ASININO

Na Roma Antiga o uso do leite de jumenta era reconhecido comumente como um remédio e destinado elaboração produtos lácteos (SALIMEI; FANTUZ, 2012). Assim como também era prescrito principalmente para alimentação infantil, com propriedades terapêuticas amplamente conhecidas (CUNSOLO et al., 2017). Comparado com o leite de ruminantes, responsável pela maior produção de leite do mundo, o leite asinino ainda é pouco estudado. Porém, o interesse da comunidade científica tem se renovado, visando

a recuperação da biodiversidade das diferentes raças existentes no mundo e a redescoberta do uso do leite (MESSIAS, et al.,2021), alguns estudos recentes são citados na Tabela 2.

Tabela 2. Estudos sobre a avaliação do potencial nutricional e funcional do leite asinino

| <b>Condições</b>         | <b>Raça</b> | <b>Conclusões</b>                                                                                                                                                                                                                                             | <b>Autores</b>        |
|--------------------------|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Leite cru e pasteurizado | Amiata      | Leite cru e leite pasteurizado demonstraram alto teor de vitamina D, além da pasteurização não afeta a absorção de vitamina D3.                                                                                                                               | Martin et al. (2018b) |
| Leite cru                | *           | DM é uma solução de alimentação na maioria crianças com CMPA em termos de tolerabilidade e palatabilidade.                                                                                                                                                    | Barni et al. (2018)   |
| Leite cru                | *           | O consumo de DM exerce efeito antiinflamatório em ratos, restaurando os níveis endógenos de peptídeos antimicrobianos que contribuem para reduzir desequilíbrio da microbiota.                                                                                | Yvon et al. (2018)    |
| Leite pasteurizado       | Amiata      | O DM foi considerado uma alternativa adequada para crianças com IgE-CMPA e FPIES-CMPA, pois dos 68 pacientes que fizeram o TPO apenas 1 reagiu. Portanto, pode ser uma alternativa adequada para os primeiros 6 meses de vida, se adequadamente suplementado. | Sarti et al. (2019)   |
| Leite cru                | *           | A proteômica identificou um conjunto de 94 produtos genéticos, destes, 41% têm atividade antimicrobiana documentada ou são responsáveis pela transferência de imunidade passiva.                                                                              | Spada et al. (2020)   |

|                          |                |                                                                                                                                                                                                                                                                            |                      |
|--------------------------|----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| Colostro e leite maduro  | Dezhou         | Tanto o colostro quanto o leite maduro reduziram o tamanho do tumor primário e o peso relativo dos órgãos do fígado e pulmão em camundongos 4T1 sem afetar o peso corporal dos ratos. Eles inibiram o crescimento e a metástase de tumores de ratos 4T1, induzir apoptose. | Li et al. (2020)     |
| Leite cru e pasteurizado | Martina Franca | O efeito de tratamentos HTST de fluxo contínuo mantêm quase invariáveis as vitaminas do grupo B no leite de jumenta. O conteúdo de lisozima, $\beta$ -lactoglobulina e fenólico diminuem com o aquecimento.                                                                | Matera et al. (2021) |

---

\*Dado não mencionado pelos autores.

O leite asinino também está se tornando cada vez mais comum como uma alternativa agrícola produtiva principalmente na Europa. A Itália se tornou um dos berços da pesquisa sobre as características e a qualidade nutricional do leite de jumenta; dados também estão disponíveis na literatura sobre o leite asinino de animais criados na China (JIANG et al., 2018; Li et al., 2020), Grécia (MALISSIOVA et al., 2016) e França (YVON et al., 2018). Assim, o leite asinino tem apresentado crescente demanda mundial, em um nicho de mercado existente em países asiáticos e europeus, que possui ampla variedade de produtos, como queijo, bebida láctea, leite UHT e leite em pó (POLIDORI et al., 2010).

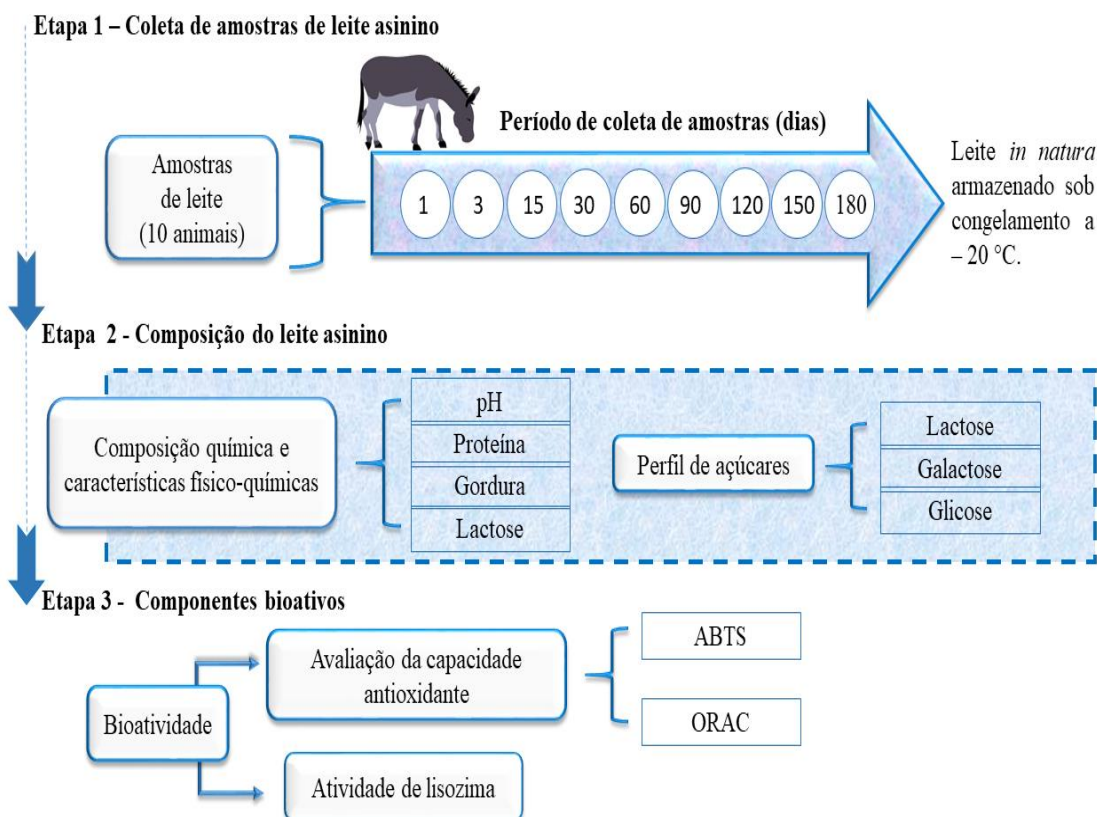
No Brasil devido dificuldade de estabelecer uma cadeia produtiva para o leite asinino, além desse leite ainda não ter um regulamento específico. A obtenção do leite ainda é por meio de projetos de pesquisas em universidades e um número pequeno de criadores (CARNEIRO et al., 2018). Tendo em vista as características encontradas na literatura sobre o leite de várias raças de asinino, evidenciar a interferência da fase de lactação sobre os componentes nutricionais e bioativos, bem como as particularidades do leite asinino do ecótipo Nordestino, se configurar como alternativa de fomentar uso e a valorização desses animais no semiárido nordestino, além perspectiva socioeconômica.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 AMOSTRAGEM E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

As amostras de leite asinino do ecótipo Nordestino Brasileiro *in natura* foram coletadas na Fazenda Experimental da Universidade Federal Rural de Pernambucano (UFRPE) no município de Garanhuns/PE. As amostras de leite asinino foram coletadas de 10 fêmeas, com idades entre 3,5 e 6,5 anos, por meio de ordenha manual com higienização prévia (*pré-dipping*). O período de coleta incluiu os três estágios da fase de lactação (colostro, transição e leite maduro), iniciando 24 horas após o parto, com a coleta do colostro, seguido de coletas nos dias 3, 15, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias após o parto. As amostras de leite foram adicionadas em frascos de polipropileno com capacidade para 100 mL, armazenadas em freezer à -20°C e transportadas congeladas para os locais de análises. A figura 2 demonstra as três etapas realizadas no experimento (Figura 2).

**Figura 2** – Delineamento experimental da obtenção, caracterização nutricional e marcadores de bioatividades do leite asinino.



Após a coleta das amostras (Etapa 1), iniciou-se a segunda etapa, caracterizada pela avaliação em triplicata, de parâmetros como, pH, proteína, gordura e perfis de açúcares (lactose, galactose e glicose). Posteriormente, foi realizada a terceira etapa, correspondendo a avaliação do potencial bioativo do leite asinino, especificamente capacidade antioxidante (ABTS e ORAC) e atividade de lisozima. As análises realizadas na etapa 2 e 3 foram desenvolvidas nos laboratórios da Universidade Federal da Paraíba no campus I e II.

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, onde cada bloco foi composto por um animal (10 fêmeas asininas) e os tratamentos corresponderam aos nove períodos de avaliação: 1, 3, 15, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias após o parto. Considerou-se como colostro as amostras coletadas no primeiro dia após o parto, o leite de transição amostras coletadas no terceiro dia após o parto, e como leite maduro amostras coletadas a partir do 15º dia após o parto. Em cada tempo de lactação as amostras foram submetidas a avaliação dos parâmetros físico-químicos, açúcares redutores e atividade antioxidante. Para avaliar a atividade de lisozima, amostras foram selecionadas dos períodos correspondentes aos 1º, 3º, 15º, 30º, 90º e 180º dias após o parto.

### 3.2 MANEJO NUTRICIONAL DOS ANIMAIS

A dieta fornecida aos animais foi composta por ração comercial para equídeos em lactação (matéria seca 900 g/kg; proteína bruta 200g/kg; fibra em detergente neutro 180 g/kg) e feno de Tifton 85 (*Cynodon dactylon*) (matéria seca 860 g/kg; proteína bruta 70g/kg; carboidrato 80 g/kg; fibra em detergente ácido 180 g/kg). A água e o sal mineralizado foram disponibilizados *ad libitum* e para controle do escore corporal as 10 fêmeas foram pesadas semanalmente.

Os animais permaneceram durante o período de lactação em área cercada de 0,5 hectare (ha) e, com sombreamento, sem cobertura vegetal do solo e foram alimentados com o feno de Tifton 85 duas vezes ao dia, de modo a suprir as necessidades de ingestão diária correspondendo 2,0% do peso vivo, com base na matéria seca (NRC, 2007). A ração concentrada para equídeos em lactação foi fracionada em duas refeições diárias, sendo fornecido 0,5 kg de ração por refeição.

## 2.3 COMPOSIÇÃO FÍSICO - QUÍMICAS

As amostras de leite asinino dos nove períodos de coleta foram analisadas quanto aos parâmetros físico-químicos. O pH foi determinado utilizando pHmetro (modelo 7110 bnc, INOLAB, Estados Unidos), de acordo com a metodologia proposta pela AOAC (2016). As determinações de proteína, gordura e lactose também foram realizadas seguindo metodologias preconizadas pela AOAC (2016).

O perfil de açúcares (lactose, glicose e galactose) foi determinado de acordo com a metodologia descrita por Zeppa, Conterno e Gerbi (2001). Para tanto, foram usados 2 mL de amostra por período de lactação seguido de diluição em 10 mL de água ultrapura, centrifugação ( $6000 \times g$ ,  $4^\circ C$ ) por 10 minutos, e filtração em filtro de celulose de  $0,45 \mu$  (Whatman®, Chicago, EUA). A quantificação do perfil de açúcares foi realizada usando um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, da Agilent, modelo 1260 Infinity LC (VARIAN, Waters, Califórnia, USA), acoplado com uma coluna Agilent Hi Plex Ca ( $7,7 \times 300$  mm,  $8 \mu$ ), a uma temperatura de  $85^\circ C$  e detector de índice de refração (Waters 2690, Califórnia, EUA) a vazão aplicada foi de  $0,6$  mL/min, com tempo de execução de 30 minutos a cada corrida. A fase móvel utilizada foi a água ultrapura. Soluções padrão foram injetadas para obter o tempo de retenção de cada composto. Os resultados foram expressos em g de açúcares/100 mL de leite.

## 3.4 CAPACIDADE DA ATIVIDADE DE LISOZIMA

A atividade de lisozima foi avaliada por meio de um método fluorimétrico comercial em microplaca utilizando o kit de ensaio EnzChek® Lysozyme Assay Kit (E22013). A análise foi conduzida como descrito no manual do kit. Para cada amostra de leite (nenhum método de desengorduramento foi utilizado para o procedimento), uma alíquota de  $50 \mu L$  foi transferida para cada poço da microplaca. Em seguida, foram adicionados  $50 \mu L$  do buffer de reação (solução neutralizante pronta do Kit) em cada poço e  $50 \mu L$  da solução trabalho do estrato de lisozima ( $1,0$  mg/mL do sub-estrato de lisozima DQ diluído em  $1,0$  mL de água deionizada ( $dH_2O$ )).

Para curva padrão, foram adicionados  $50 \mu L$  do buffer de reação em oito poços, e posteriormente foi adicionado ao primeiro poço  $50 \mu L$  solução de estoque de lisozima

a 1000 U/mL. Após homogeneização da mistura, foram transferidos 50  $\mu$ L da mistura do primeiro poço para o segundo, e repetido esse processo até o sétimo, sendo descartada a alíquota do oitavo poço. Por fim, adicionou-se uma alíquota de 50  $\mu$ L da solução trabalho do extrato de lisozima em todos os poços, a concentração da curva variou de 500 U/mL para 0 U/mL. A microplaca foi mantida em repouso a 37 °C por 30 minutos, no fluorímetro (Fluorstar Omega, BMG LABTEC, Alemanha, UE) protegido da luz até o momento da leitura. A fluorescência foi medida a  $\sim 48/530$  nm (excitação/emissão). Os resultados foram comparados a curva padrão lisozima e expressos em U/mL.

### 3.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

#### 3.5.1 Preparo do extrato

A obtenção do extrato das amostras de leite asinino para determinar a atividade antioxidante (ABTS e ORAC) seguiu metodologia descrita por Karnopp et al. (2017), com modificações. Foram pipetados 1,5 mL de leite asinino e adicionados 5 mL de álcool metílico a 80%, sendo essa mistura submetida a agitação em vórtex durante 5 min. Em seguida, a mistura foi centrifugada ( $7000 \times g$  a 20 °C) por 5 minutos a temperatura, após a fase superior foi coletada e analisada imediatamente conforme a metodologias para determinação de atividade antioxidante descritas a seguir.

#### 3.5.2 Atividade Sequestradora do Radical 2,2- azino-bis(3-etilbezotiazolina)-6-ácido sulfônico (ABTS $^{\bullet+}$ )

A atividade antioxidante pelo método ABTS $^{\bullet+}$  foi realizada conforme metodologia descrita por Re et al., (1999), com algumas modificações. O radical ABTS foi formado pela reação da solução ABTS  $^+ 7$  mM com a solução de persulfato de potássio 140 mM, incubados a temperatura de 25 °C, no escuro durante 12-16 horas. Uma vez formado o radical, este foi diluído em água destilada até obter o valor de absorvância ( $0,700 \pm 0,020$  a 734 nm). A partir de cada extrato, foram preparadas quatro diluições diferentes, em triplicatas. Em ambiente escuro, foi transferida uma alíquota de 15  $\mu$ L do extrato para tubos de ensaio contendo 1,5  $\mu$ L do radical ABTS. A leitura foi realizada após 6 minutos da reação a 734 nm em espectrofotômetro UV/VIS (SP - 22 BEL Photonics, Itália, UE). O branco da reação foi preparado conforme o procedimento

descrito acima, sem adição da amostra. Como referência, foi utilizado o Trolox e os resultados expressos em  $\mu\text{M}$  trolox/mL de amostra.

### 3.5.3 Capacidade de absorção de radical de oxigênio (ORAC)

O ensaio ORAC foi medido seguindo o método descrito por Dávalos, Gómez-Cordovés e Bartolomé (2004), com modificações. A reação foi realizada com 20  $\mu\text{L}$  de extrato, 120  $\mu\text{L}$  de 116,1 nmol/L de fluoresceínas em tampão fosfato (pH 7,4) a 75 mmol/L de e 60  $\mu\text{L}$  de APPH (108 mg/mL). O decaimento da fluorescência foi medido com excitação a 485 nm e emissão a 520 nm, a cada 80 min a 37 °C (Fluorstar Omega, BMG LABTEC, Alemanha). Os resultados da atividade antioxidante foram expressos em equivalentes em  $\mu\text{M}$  de Trolox/100 mL.

## 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados das análises físico-químicas, atividade antioxidante pelo método ORAC e atividade de lisozima foram submetidos a testes de normalidade, análises de variância (ANOVA), com as médias comparadas pelo teste de Tukey utilizando  $p < 0,05$  e análises de regressão utilizando o software estatístico SISVAR (versão 5.8). Quanto a atividade antioxidante pelo método ABTS, os resultados foram submetidos a análise não paramétrica de Kruskal-Wallis e as médias comparadas pelo teste de Dunn a 5% de probabilidade do erro, utilizando o software estatístico GraphPad InStat (versão 3.06).

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, L. D, 2009. Estudo Genético de Burros no Brasil: Diversidade genética das raças de burros criadas no Brasil, com base na análise de loci microssatélites e no MTDNA. 2009. p. 83. Dissertação de Mestrado. Universidade De Brasília, Brasília, DF, Brasil.
- ALHAZMI, A.; STEVENSON, J. W.; AMARTEY, S. W. Q. Discovery, modification and production of T4 lysozyme for industrial and medical uses **International Journal of Biology**, v. 6, p. 45-63, 2014.
- ALTOMONTE, I.; SALARI, F.; LICITRA, R.; MARTINI, M. Donkey and human milk: Insights into their compositional similarities. **International Dairy Journal**, v. 89, p. 111-118, 2019.
- ANDRADE, E. A.; ANSELMINI, R.; MENDES, C. Q. Silagem de colostro: alternativa sustentável para a bovinocultura leiteira. **SB Rural – Caderno Rural**, v. 10, n. 49, 2010.
- AOAC – Association of Official Analytical Chemists Dairy Products. In: **AOAC Official Methods of Analysis**. 19 th ed. Gaithersburg. AOAC, 2016.
- ASPRI, M.; ECONOMOU, N.; PAPADEMAS, P. Donkey milk: an overview on functionality, technology, and future prospects. **Food reviews international**, v. 33, n. 3, p. 316-333, 2018.
- AZEVEDO, R.A. de; COELHO, S.G. Efeito dos programas de nutrição, do nascimento até a puberdade sobre o desenvolvimento mamário de novilhas leiteiras. **Nutri Time Revista Eletrônica**, v. 13, n. 5, p. 4794-4799, 2016.
- BARNI, S.; LUCREZIA, S.; MORI, F.; MUSCAS, G.; BELLI, F.; PUCCI, N. Tolerability and palatability of donkey's milk in children with cow's milk allergy. **Wiley**, v. 29, n.3, p. 329-331, 2018.
- BERTINO, E. D.; GASTALDI, G.; MONTI, C.; BARO, D.; FORTUNATO, L. P. G. Detailed proteomic analysis in DM: Insights into its hypoallergenicity. **Front Biosci**, v. 2, n.2, p. 526 – 536, 2010.
- BORDONARO, S.; GUASTELLA, A. M.; CRISCIONE, A.; ZUCCARO, A. Genetic diversity and variability in endangered pantesco and two other Sicilian donkey breeds assessed by microsatellite markers. **Scientific World Journal**, v.12, p. 1-6, 2012.
- BUCEVIC-POPOVIC, V. et al. Oxidative stability and antioxidant activity of bovine, caprine, ovine and asinine milk. **International journal of dairy technology**, v. 67, n. 3, p. 394-401, 2014.
- BUENO, L.M.C. Goat milk - excellent functional food. **Revista Leite e Derivados**, v. 83, p. 52-60, 2005.

BUSINCO, L.; GIAMPIETRO, G.P.; LUCENTI, P. M. Allergenicity of mare's milk in children with cow's milk allergy. **Journal Allergy Clinical Immunology**, v. 105, n. 5, p. 1031-1034, 2000.

CAMILLO, F.; ROTA, A.; BIAGINI, L.; TESI, M.; FANELLI, D.; PANZANI, D. The Current Situation and Trend of Donkey Industry in Europe. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.65, p.44-49, 2017.

CAPPANNELLA, ELENA.; BENUCCI, ILARIA ; LOMBARDELLI, CLAUDIO ; LIBURDI, KATIA ; BAVARO, TEODORA ; ESTI, MARCO. Immobilized lysozyme for the continuous lysis of lactic bacteria in wine: Bench-scale fluidized-bed reactor study. **Food chemistry**, v.210, p.49-55, 2016.

CARNEIRO, G. F.; CAVALCANTE LUCENA, J. E.; DE OLIVEIRA B. L. The current situation and trend of the donkey industry in South America. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 65, p.106-110, 2018.

CARROCCIO, A.; CAVATAIO, F.; MONTALTO, G.; AMINCO, D.D.; ALAMINCO, L. Intolerance to hydrolysed cow's milk proteins in infants: clinical characteristics and dietary treatment. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 30, n. 11, p. 1597-1603, 2000.

CHIOFALO. B.; DUGO, P.; BONACCORSI IL, M. L. Comparison of major lipid components in human and donkey milk: new perspectives for a hypoallergenic diet in humans. **Journal of Immunopharmacology Immunotoxicology**, v.1, n. 12, p.1-13, 2011.

COSENTINO, C.; LABELLA, C.; MUSTO, M., PAOLINO, R.; PIERANGELO, F. Effect of different physical treatments on antioxidant activity of jenny milk. **International Journal of Agricultural Science**, v.5, p. 874-877, 2015.

CONTE, F.; FOTI, M.; MALVISI, M.; GIACOPELLO, G.; PICCININI, R.; Valutazione dell'azione antibatterica del lisozima del latte d'asina. Considerazioni igienico-sanitarie. **Large Animal Review**, v. 18, p. 13-16, 2012.

CONTE, F.; PANEBIANCO, A. Potential hazards associated with raw donkey milk consumption: A review. **International Journal of Food Science**, v. 219, p.11, 2019.

CUNSOLO, V. et al. Proteins and bioactive peptides from donkey milk: The molecular basis for its reduced allergenic properties. **Food Research International**, 2017.

SILVA. I. E. C. Animal reproduction: phisiology of parturition and animal lactation, 2020. Disponível em: <  
[https://www.researchgate.net/publication/340173416\\_Reproducao\\_Animal\\_Fisiologia\\_do\\_Partido\\_e\\_da\\_Lactacao\\_Animal](https://www.researchgate.net/publication/340173416_Reproducao_Animal_Fisiologia_do_Partido_e_da_Lactacao_Animal)> Acesso em: 11 out. 2021.

D'ALESSANDRO, A. G.; MARTEMUCCI, G. Lactation curve and effects of milking regimen on milk yield and quality, and udder health in Martina Franca jennies (*Equus asinus*). **Journal of Animal Science**, v. 90, n. 2, p. 669-681, 2012.

DÁVALOS, A; GÓMES-CORDOVÉS, C., & BARTOLOMÉ, B. Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC–Fluorescein) Assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 48-54, 2014.

DIAS, D. M.; MASSARA, R. L.; BOCCHIGLIERI, A. Use of habitats by donkeys and cattle within a protected area of the Caatinga dry forest biome in northeastern Brazil. **Perspectives in Ecology and Conservation**, v. 17, p. 64-70, 2019.

DUAN, X.; CHAN, K.T. ; LEE, K. K. H.; MAK, A. F. T. Oxidative Stress and Plasma Membrane Repair in Single Myoblasts After Femtosecond Laser Photoporation, **Annals of biomedical engineering**, v.43 n.11, p.2735-2744, 2015.

ELBAGERMI, M. A.; HALEEM, A. A.B.; ELSHERIF, K.M. Physicochemical properties and nutritional values of pasteurized milk and long-life milk: A comparative study. **Journal of Analytical Sciences and Applied Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 38-45, 2020.

EUROLACTS. **Donkey Milk secrets**, 2016. Disponível em: <<https://donkeymilk.shop/pages/precious-secrets> > Acesso em: 20 de jun. 2020.

FAOSTAT, 2018. Statistical Database Website, Food and Agriculture Organization. Rome Italy Available. Disponível em:<<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QA>> Acesso em: 11 nov. 2021.

FARDET, A.; ROCK, E.; In vitro and in vivo antioxidant potential of milks, yoghurts, fermented milks and cheeses: A narrative review of evidence. **Nutrition Research Reviews**, v.31, p. 52-70, 2017.

FRANDSON, R.D.; WILKE, W. L.; FAILS, A.D. In: **Anatomia e fisiologia dos animais de fazenda**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. 413p

GUBIC, J.; TOMIĆ, J.; TORBICA A. M. Characterization of several milk proteins in domestic balkan donkey breed during lactation, using labonachip capillary electrophoresis. **Chemical Industry and Chemical Engineering**, v. 22, p. 9-15, 2016.

GUO, H.Y.; PANG, K; ZHANG, X.Y.; ZHAO, L; CHEN, S.W.; DONG M. L, F.Z. Composição, propriedades físico-químicas, distribuição da fração de nitrogênio e perfil de aminoácidos do burro leite. **Journal Dairy Science** v.90, p. 1635–1643, 2007.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. **Censo Agropecuário 2017**, Disponível em: <[https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/3096/agro\\_2017\\_resultados\\_definitivos.pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/3096/agro_2017_resultados_definitivos.pdf) > Acesso em: 11 de nov. 2021.

ICZN. Usage of 17 specific names based on wild species which are pre-dated

by or contemporary with those based on domestic animals (Lepidoptera, Osteichthyes, Mammalia): Conserved. International Commission on Zoological Nomenclature Opinion 2027 (case 3010). **Bulletin of Zoological Nomenclature**, v. 60, p. 81-84, 2003.

IZADI, A.; KHEDMAT, L.; MOJTAHEDI, S. Y. Nutritional and therapeutic perspectives of camel milk and its protein hydrolysates: A review on versatile biofunctional properties. **Journal of Functional Foods**, v. 60, p. 103-113, 2019.

KARNOPP, A.R.; LIVEIRA, K.G.; ANDRADE, E.F.; POSTINGHER, G.M.; GRANATO, D. Optimization of an organic yogurt based on sensorial, nutritional, and functional perspectives. **Food Chemistry**, v. 233, p. 401-411, 2017.

KIMURA, B. et al. Ancient DNA from Nubian and Somali wild ass provides insights into donkey ancestry and domestication. **Proceedings of the royal Society**, v. 278, p.50-57, 2010.

LAMARI, F.N.; KARAMANOS, N.K. Separation methods for sialic acids and critical evaluation of their biologic relevance. **Journal Chromatography B**, v. 781, n. 2, p. 3–19, 2002.

LACOMBA, R.; SALCEDO, J.; ALEGRÍA, A.; LAGARDA, M.J.; BARBERÁ, R.; MATENCIO, E. Determination of sialic acid and gangliosides in biological samples and dairy products: A review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, n. 2, p.346–357, 2010.

LEE, C.; KO, H.; LIN, C.; CHAI, C.; CHEN, W.; YEN, F. Artocarpin attenuates ultraviolet B-induced skin damage in hairless mice by antioxidant and anti-inflammatory effect. **Food and chemical toxicology**, v.60, p.123-129, 2013.

LI, L.; LIU, X.; GUO, H.. The nutritional ingredients and antioxidant activity of donkey milk and donkey milk powder. **Food Science and Biotechnology**, v. 27, n. 2, p. 393-400, 2018.

LI, Y.; FAN, Y. ; SHAIKH, A. S.; WANG, Z. ; WANG, D.; TAN, H. Dezhou donkey (*Equus asinus*) milk a potential treatment strategy for type 2 diabetes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 246, p. 112221, 2020.

JIANG, L. et al. Donkey milk lysozyme ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis by improving intestinal barrier function and gut microbiota composition. **Journal of Functional Foods**, v. 48, p.144–152, 2018

MADHUSUDAN, N. C. et al. Composition, characteristics, nutritional value and health benefits of donkey milk-A review. **Dairy Science & Technology**, 2017.

MALISSIOVA, E.; ARSENOS,G.; PAPADEMAS,P.; FLETOURIS, D.; MANOURAS, A.; ASPRI, M.; NIKOLOPOULOU, A.;GIANNOPOULOU, A.; ARVANITOYANNIS, I. S.. Assessment of donkey milk chemical, microbiological

and sensory attributes in greece and cyprus. **International Journal of Dairy Technology**, v. 69, n. 1, p.1-8, 2016.

MASSOURAS, T.; TRIANTAPHYLLO POULOS, K. A.; THEODOSSIOU, I. Chemical composition, protein fraction and fatty acid profile of donkey milk during lactation. **International Dairy Journal**, v. 75, p. 83–90, 2017.

MALDONADO, N.C.; NADER-MACIAS, M.E.F. Production of fermented milk with autochthonous Lactobacilli for newborn calves and resistance to the dairy farm conditions. **J. Bioprocess.**, v. 6, n. 4, p. 1-5, 2016.

MARTEMUCCI, G.; D’ALESSANDRO, A.G. Fat content, energy value and fatty acid profile of donkey milk during lactation and implications for human nutrition. **Lipids in Health and Disease**, v.11, n. 111, p.113, 2012.

MARTINI, M.; ALTOMONTE, I.; SALARI, F. Amiata donkeys: fat globule characteristics, milk gross composition and fatty acids. **Italian Journal of Animal Science**, v. 13, n. 1, p.123-126, 2014.

MARTINI, M.; ALTOMONTE, I.; SALARI, F.; LICITRA, R. Nutritional and nutraceutical quality of donkey milk *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 65, p. 33-37, 2018a.

MARTINI, M.; ALTOMONTE, I.; LICITRA, R.; SALARI, F. Short communication: Technological and seasonal variations of vitamin D and other nutritional components in donkey milk. **Journal of dairy science**, v. 101, n.10, p.8721-8725, 2018b.

MARTINI, M.; SALARI, F.; LICITRA, R.; LA M, C.; ALTOMONTE, I. Lysozyme activity in donkey milk. **International dairy journal**, v.96, p.98-101, 2019.

MARTINI M.; LICITRA R.; ALTOMONTE, I.; SALARI, F. Quality of donkey mammary secretion during the first ten days of lactation, **International Dairy Journal**, v. 109, 2020.

MARIANTE A.S.; CAVALCANTE N. Animais do Descobrimento: **Raças domésticas da história do Brasil. Distrito Federal: Embrapa; 2006.**

MATERA, A.; ALTIERI, G.; GENOVESE, F.; POLIDORI, P.; VINCENZETTI, S.; PERNA, A.; SIMONETTI, A.; AVEI, M. R.; CALBI, A.; DI RENZO, G.C.; Effect of continuous flow HTST treatments on donkey milk nutritional quality, **Food Science and Technology**, v.153, 2021.

MCLEAN, A. K.; GONZALEZ, F. J. N. Can scientists influence donkey welfare? Historical perspective and a contemporary view. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.65, p.25-32, 2018.

MESSIAS, T.B.O.N.; ARAÚJO, E.D.O.M.; SANT'ANA, A M. S.; LUCENA, J.E.C.; PACHECO, M.T.B.; QUEIROGA, R.C.R.E. Challenges and perspectives for exploiting donkey milk in the Brazilian Northeast. **Ciência Rural**, v. 52, n. 3, 2021.

MONTI, G.; BERTINO, E.; MURATORE, M.C.; COSCIA, A.; CRESI, F.; SILVESTRO, L. The efficacy of donkey's milk in the treatment of highly problematic cow's milk allergic children: an in vivo. **Pediatr Allergy Immunol** v. 18, p. 258-264, 2007.

MURUA, A. et al. Isolation and identification of bacteriocinogenic strain of *Lactobacillus plantarum* with potential beneficial properties from donkey milk. **Journal of Applied Microbiology**, v.114, n.6, p. 1793–1809, 2013.

NEVILLE, M. C.; MCFADDEN, T. B.; FORSYTH, I. Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, v. 7, n. 1, p. 49-66, 2002.

NIRO, S.; FRATIANNI, A.; COLAVITA, G. ; GALASSI, L. ; ZANAZZI, M.; SALIMEI, E. Technological use of donkey milk in cheesemaking. **International Journal of Dairy Technology**, v. 70, p.439-442, 2017.

NRC. Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids, (1st ed.), **National Academy Press**, 2017.

O'MAHONY, J. A.; FOX, P. F. Milk proteins: Introduction and historical aspects. **Advanced dairy chemistry**, v. 23, p. 43-85, 2013.

OZTURKOGLU-BUDAK, S. Effect of different treatments on the stability of lysozyme, lactoferrin and b-lactoglobulin in donkey's milk. **International Journal of Dairy Technology**, v. 71, p. 36-45, 2018.

OZTURKOGLU-BUDAK, S.; AKAL, H. C. ; BERELI, N. ; CIMEN, D.; AKGONULLU, S. Use of antimicrobial proteins of donkey milk as preservative agents in Kashar cheese production. **International dairy journal**, v.120, p.105090, 2021.

PARK, Y.W. Bioactive components in goat milk. In: Park, Y.W. (Ed.), *Bioactive Components in Milk and Dairy Products*. Wiley- Blackwell/John Wiley & Sons, **Ltd. Publication**, p. 43–81, 2009.

PESSIONE, E.; CIRRINCIONE, S. Bioactive molecules released in food by lactic acid bacteria: encrypted peptides and biogenic amines. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 876, 2016.

PIOVESANA, S. CAPRIOTTI, A. L.: CAVALIERE, C.; BARBERA, G. L.; SAMPERI, R.; Chiozzi, R. Z. Peptidome characterization and bioactivity analysis of donkey milk. **Journal of Proteomics**, v.119, p. 21–29, 2015.

PROLO, L. M.; VOGEL, H.; REIMER, R. J. The lysosomal sialic acid transporter sialin

is required for normal CNS myelination. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 49, p. 15355- 15365, 2009.

RAGLAND, S. A.; CRISS, A. K. B.; JAMES, B. From bacterial killing to immune modulation: Recent insights into the functions of lysozyme. **PLoS pathogens**, v.13, n.9, p.e1006512-e1006512, 2017.

RANGEL, A. H. N.; JÚNIOR, J. G. B. G., SIMPLÍCIO, A. A., FREIRE, R. M. B., & NOVAES, L. P. Aspectos composicionais e nutricionais do leite de jumenta: uma revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 70, n. 3, p. 160-171, 2015.

RAYNAL-LJUTOVAC, K.; LAGRIFFOUL, G.; PACCARD, P.; GUILLET, I.; CHILLARD, Y. Composition of goat and sheep milk products: an update. **Small Ruminant Research**, v. 79, n. 1, p. 57-72, 2008.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26 n.1, 1231-1237.

SALLES, P. D. A.; SOUSA, L. D. O.; GOMES, L. P. B.; BARBOSA, V. V.; MEDEIROS, G. R.; DE SOUSA, C. M., & WELLER, M. Analysis of the population of equidae in semiarid region of Paraíba. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v.4, n. 3, p. 269-275, 2013.

SALIMEI, E.; FANTUZ, F.; COPPOLA, R.; CHIOFALO, B. Composition and characteristics of ass's milk. **Animal Research**, v. 53, n. 1, p. 67-78, 2004.

SALIMEI, E.; FANTUZ, F. Horse and donkey milk. **In: Milk and dairy products in human nutrition: production, composition and health**; Park Y.W., Haenlein G.F.W., Eds.; John Wiley & Sons Press: Oxford, 2013, p 594–613.

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

SANTILLO, A.; CILIBERTI, M. G.; CAROPRESE, M.; MARINO, R.; ALBENZIO, B. **Journal of Dairy Research**, v. 85, n. 2, p. 257-262, 2018.

SANT'ANA, A. M. S.; RUI J.B.; BESSA, S. P.; ALVES, A. N. MEDEIROS, R. G. C.; SOUSA, Y. R.F.; BEZERRIL, F. F.; BATISTA, A.S.M.; MADRUGA, M.S.; QUEIROGA R.C.R.E.; Fatty acid, volatile and sensory profiles of milk and cheese from goats raised on native semiarid pasture or in confinement. **International Dairy Journal**, v. 91, p. 147-154, 2019.

SARTI, L., MARTINI, M., BRAJON, G. Donkey's Milk in the Management of Children with Cow's Milk protein allergy: nutritional and hygienic aspects. **Italian Journal of Pediatrics**, v. 45, 2019.

SHAHIDI, F; ZHONG, Y. Measurement of antioxidant activity. **Journal of functional foods**, v.18, p.757-781, 2015.

SINGH, R.; Gorakh M.; Devendra K.; Patil N.V.; Pathak, K. M. L. Camel milk: an important natural adjuvant. **Agricultural research**, v. 6, n. 4, p. 327-340, 2017.

SIMOS, Y. METSIOS, A.; VERGINADIS, I. ; D'ALESSANDRO, A. G. ; LOIUDICE, P. ; JIRILLO, E.; CHARALAMPIDIS, P.; KOUIMANIS, V.; BOULAKA, A.; MARTEMUCCI, G.; KARKABOUNAS, S. Antioxidant and anti-platelet properties of milk from goat, donkey and cow: An *in vitro*, ex vivo and in vivo study. **International Dairy Journal**, v. 21, n. 11, p. 901-906, 2011.

SPADA, V. et al. Antibacterial potential of donkey milk disclosed by untargeted proteomics. **Journal of Proteomics**, v. 231, 2020.

TIDONA, F.; SEKSE, C.; CRISCIONE, A.; JACOBSEN, M. ; BORDONARO.; MARLETTA, D.; VEGARUD, G. E. Antimicrobial effect of donkeys' milk digested *in vitro* with human gastrointestinal enzymes. **International Dairy Journal**, v. 21, n.3, p. 158–165, 2011.

TRINCHESE, G.; CAVALIERE, G.; CANANI, R.B.; MATAMOROS, S.; BERGAMO, P.; DE FILIPPO, C. Humans, donkey and cow's milk differentially affect energy efficiency and inflammatory state modulating mitochondrial function and the intestinal microbiota. **Journal Nutrition Biochem**, v. 26, p. 1136-1146, 2015.

VALENTINI, V.; ALLEGRA, A.; ADDUCI, F.; LABELLA, C.; PAOLINO, R. ; COSENTINO, C. **International Journal of Dairy Technology**, v.71, p.579-584, 2018.

VALLE, E.; RASPA, F.; GIRIBALDI, M.; BARBERO, R.; BERGAGNA, S.; ANTONIAZZI, S. A functional approach for the evaluation of the body condition of lactating donkeys as a tool for the evaluation of well-being. Item J5: p.3001 2017.

VANDENPLAS, Y. E. DE GREEF, T. DEVREKER Treatment of cow's milk protein allergy. **Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition**, v.17, p. 1-5, 2014.

VILA, C., LEONARD, J. A., GOTHERSTROM, A., MARKLUND, S., SANDBERG, K., LIDEN, K. Widespread origins of domestic horse lineages. **Science**, p. 291,474, 2001.

WANG, B.; BRAND-MILLER, J. The role and potential of sialic acid in human nutrition. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 57, p. 1351-1369, 2003.

ZHANG, H.; HU, C. A.; KOVACS-NOLAN, J. ; MINE, Y. HU.; CHIEN-AN A ; WU, Z. ; WANG, J. Bioactive dietary peptides and amino acids in inflammatory bowel disease. **Amino Acids**, v. 47, p. 2127–2141, 2015.

ZEPPA, G.; CONTERNO, L.; GERBI, V. Determination of organic acids, sugars, diacetyl, and acetoin in cheese by high-performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 6, n. 10, p.49, 2001.

YOO, S. W.; MOTARI, M. G.; SUSUKI, K.; PRENDERGAST, J.; MOUNTNEY, A.; HURTADO, A.; SCHNAAR, R. L. Sialylation regulates brain structure and function. **The FASEB Journal**, v. 29, n. 7, p. 3040 -3053, 2015.

YVON, S.; Leveque, M.; Donkey milk consumption exerts anti-inflammatory properties by normalizing antimicrobial peptides levels in Paneth's cells in a model of ileitis in mice. **European Journal of Nutrition**, v. 57, p. 155-166, 2018.

#### **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados obtidos nesta dissertação estão apresentados em forma Artigo Científico submetido em periódico de impacto na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Título: **Composition and bioactivity markers of asinine milk from the northeast brazilian ecotype** (submetido no periódico Food Bioscience, fator de impacto 4,2).

COMPOSITION AND BIOACTIVITY MARKERS OF ASININE MILK FROM THE  
NORTHEAST BRAZILIAN ECOTYPE

Aryane Ribeiro da Silva<sup>a</sup>, Emanuel Ubaldino Torres Junior<sup>b</sup>, Vanessa Bordin Viera<sup>c</sup>,  
Aline Macedo Dantas<sup>a</sup>, Graciele Borges<sup>a</sup>, Juliano Martins Santiago<sup>d</sup>, Maria Elieidy  
Gomes de Oliveira<sup>a</sup>, Jorge Eduardo Cavalcante Lucena<sup>e</sup>, Yasmim Regis Formiga de  
Sousa<sup>f</sup>, Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga<sup>a</sup>, Taliana Kênia Alencar Bezerra<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Postgraduate Program in Food Science and Technology, Department of Food  
Engineering, Technology Center, Federal University of Paraíba – 58051-900, João  
Pessoa, Paraíba, Brazil.

<sup>b</sup>Department of Nutrition, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba – 58051-  
900, João Pessoa, Paraíba, Brazil.

<sup>c</sup>Education and Health Center, Federal University of Campina Grande - 58175-000 Sítio  
Olho D'água da Bica, Zona Rural, Cuité, Paraíba, Brazil.

<sup>d</sup>Serra Talhada Academic Unit, Federal Rural University of Pernambuco – 56903-900,  
Serra Talhada, Pernambuco, Brazil.

<sup>e</sup>Academic Unit of Garanhuns, Federal University of Agreste Pernambucano – 16 52296-  
901, Garanhuns, Pernambuco, Brazil.

<sup>f</sup>Academic Unit of Food Technology, Center for Agrifood Science and Technology –  
58429-900, Pombal, Paraíba, Brazil.

ABSTRACT: The aim of this study was to evaluate the physicochemical composition of donkey milk of the Northeastern Brazilian ecotype and to verify the presence and concentration of bioactive markers, such as lysozyme and antioxidants, during the first 180 days of the lactation period. Using milk samples from 10 female donkeys, pH, total protein, fat, and lactose were analyzed. Through a microplate fluorimetric assay, the lysozyme content was determined and using ABTS and ORAC radical scavenging methods, the antioxidant activity of milk was quantified. There was variation in the composition and bioactivity markers of donkey milk during the study period, with emphasis on the high activity of lysozyme in colostrum (4040,01 U/mL). It is observed that donkey milk undergoes changes in its composition as well as lysozyme activity and antioxidant activity during the 180-day period of the lactation phase.

Keywords: Antioxidants; bioactive components; donkey milk; lactation period; lysozyme;

## 1 INTRODUCTION

Donkey milk has a fluid texture, milky aroma, and a slightly sweet and pleasant taste (Madhusudan et al., 2017). Its chemical composition is similar to human milk, mainly due to its relatively low lipid and protein content and high lactose content. It is indicated as a substitute in infant feeding in cases of allergy to cow's milk protein, mainly due to the lower proportion of casein (Valentini et al., 2017; Aspri et al., 2018; Cavalcante et al., 2021).

Some constituents of donkey milk have other physiological functions in addition to nutrition, such as antimicrobial properties (immunoglobulins, lactoperoxidase, lactoferrin, and lysozyme), enzymes and enzyme inhibitors, vitamin transport proteins,

growth, and cell control factors (Fox et al., 2017). Among the proteins with antimicrobial activity, lysozyme is found in high levels in donkey milk, ranging from 1 to 3.7 g/L depending on the breed (Martini et al., 2019).

Lysozyme is part of the innate immune system, is present in secretions (tears, saliva, urine, mucus, and milk), and is also produced by macrophages, neutrophils, and dendritic cells (Ragland & Criss, 2017). Its antimicrobial action is due to its ability to catalyze the hydrolysis of 1,4- $\beta$  bonds between N-acetylmuramic acid and N-acetylglucosamine in peptidoglycan, which is the main component of the cell wall of gram-positive bacteria, causing bacterial lysis (Alhazmi et al., 2014; Cappannella et al., 2016). Furthermore, by modulating the microbiota, lysozyme ensures the healthy development of the child's gastrointestinal tract (Trinchese et al., 2015).

Donkey milk also has antioxidant properties resulting from the action of amino acids, peptides, lipids, and vitamins. These constituents exert bioactive activities in the mammary gland, at the intestinal and systemic levels (Piovesana et al., 2015; Cappannella et al., 2016). The antioxidant property is of great interest to researchers and milk consumers, as it reduces the incidence of diseases related to cellular oxidative stress, increasing immunity and, consequently, reducing damage to consumer health (Mohanty et al., 2016).

However, the chemical and bioactive components of milk can vary according to the lactation period, season, diet, physiological state, race, and genetic group (Rangel, 2015).

In the asinine species, the specimens of the Northeastern Brazilian ecotype are small and very rustic, adapting well to adverse environmental conditions. They are widely distributed in Northeastern Brazil, mainly in semi-arid regions, where the Caatinga biome predominates (Messias, 2021). In this sense, the objective was to expand the knowledge about the physicochemical composition of donkey milk of the Northeastern Brazilian

ecotype and, in a pioneering way, to highlight the bioactivity markers, with emphasis on the lysozyme and antioxidant activity, during the first 180 days of lactation.

## 2 MATERIAL AND METHODS

### 2.1 SAMPLING EXPERIMENTAL DESIGN

The in-nature Northeastern Brazilian ecotype donkey milk samples were collected at the Experimental Farm of the Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE). Asinine milk samples were collected from 10 females, aged between 3.5 and 6.5 years, through manual milking with previous hygiene (pre-dipping). The collection period included the three stages of the lactation phase (colostrum, transition, and mature milk), starting 24 hours after delivery, for colostrum collection, followed by collections on days 3, 15, 30, 60, 90, 120, 150, and 180 days after delivery. Milk samples were collected in polypropylene bottles with a capacity of 100 mL, stored at -20°C, and transported to the analysis sites.

The experimental design was in randomized blocks, where each block consisted of one animal (10 donkey females), and the treatments corresponded to the nine evaluation periods: 1, 3, 15, 30, 60, 90, 120, 150, and 180 days after delivery. Samples collected on the first day after delivery, transitional milk samples collected on the third day after delivery, and mature milk samples collected from the 15th day after delivery were considered as colostrum. All samples were submitted for evaluation of physicochemical parameters, reducing sugars, and antioxidant activity. To assess lysozyme activity,

samples were selected from periods corresponding to the 1st, 3rd, 15th, 30th, 90th, and 180th days after childbirth.

## 2.3 NUTRITIONAL MANAGEMENT OF ANIMALS

The diet provided to the animals consisted of commercial feed (dry matter 900 g/kg; crude protein 200 g/kg; neutral detergent fiber 180 g/kg) and Tifton 85 hay (*Cynodon dactylon*) (dry matter 860 g/kg ; crude protein 70 g/kg; carbohydrate 80 g/kg; acid detergent fiber 180 g/kg). Water and mineralized salt were made available ad libitum and to control the body score the 10 females were weighed weekly.

The animals remained during the lactation period in an area of about 0.5 hectares, with shading, without ground cover, and were fed Tifton 85 hay twice a day, to meet the daily intake needs 2, 0% live weight, based on dry matter (NRC, 2007). The concentrated feed for lactating horses was divided into two daily meals, with 0.5 kg of feed per meal.

## 2.4 PHYSICAL-CHEMICAL COMPOSITION

The donkey milk samples from the nine collection periods were analyzed for physicochemical parameters. The pH was determined using a pH meter ( modelo 7110 bnc, INOLAB, United States), according to the methodology proposed by the AOAC (2016). Protein and fat determinations were also carried out following methodologies recommended by the AOAC (2016).

The sugar profile (lactose, glucose, and galactose) was determined according to the methodology described by Zeppa, Conterno, and Gerbi (2001). The Agilent model 1260 Infinity LC High-Performance Liquid Chromatography system (VARIAN, Waters, California, USA) was used, coupled to an Agilent Hi Plex Ca column (7.7 x 300 mm, 8  $\mu$ ) with a detector refractive index and manual sampler with 20  $\mu$ L loop. For preparation,

2 mL of each milk sample diluted in 10 mL of ultrapure water were used. This mixture was subjected to centrifugation ( $6000 \times g$ ,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) for 10 minutes and filtered through a  $0.45\text{ }\mu\text{m}$  cellulose filter (Whatman®, Chicago, USA), then injected, with an applied flow rate of  $0.6\text{ mL/min}$  for each sample, with time 30-minute run time for each run. The mobile phase was composed only of ultrapure water, and standard solutions were injected to obtain the retention time of each compound. The results were expressed in  $\text{g/100 mL}$  of donkey milk.

## 2.5 LISOZYME ACTIVITY CAPACITY

Lysozyme activity was evaluated by a commercial microplate fluorimetric method using an EnzChek® Lysozyme Assay Kit (E22013) assay kit purchased from Dbr Biotech-Brasil. The analysis was conducted according to the instructions in the kit manual. No procedure for creaming was used. A microplate was kept at  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 30 minutes, protected from light until the moment of reading. Fluorescence was measured at  $\sim 485 / 530\text{ nm}$  (excitation / emission) (Fluorstar Omega, BMG LABTEC, Germany, UE).. The results were compared to the lysozyme standard curve and expressed in  $\text{U/mL}$ .

## 2.6 ANTIOXIDANT ACTIVITY

Antioxidant activity was determined by radical scavenging activity (ABTS) and oxygen radical absorptive capacity (ORAC) methods. For both methods, a sample extract was obtained following the methodology described by Karnopp et al. (2017), with modifications.  $1.5\text{ mL}$  of the donkey milk samples were pipetted and  $5\text{ mL}$  of 80% methyl alcohol were added, vortexing (K40-1010, Kasvi, BR) for 5 min. Then, the mixture was centrifuged at  $700 \times g/5\text{ minutes}$  and the upper phase was collected and analyzed immediately.

The radical scavenging activity method (ABTS) followed the methodology described by Re et al., (1999), with modifications. The ABTS radical was formed by the reaction of the ABTS + 7mM solution with the 140mM potassium persulfate solution, incubated at 25 °C, in the dark, for 12-16 hours. Once the radical was formed, it was diluted in distilled water until obtaining an absorbance value of  $0.700 \pm 0.020$  at 734nm. The reading was performed six minutes after the reaction at 734nm in a spectrophotometer (SP-22, BEL Photonics, Italy, UE). The reaction blank was prepared according to the procedure described above, without adding the sample. As a reference, Trolox was used and the results were expressed in  $\mu\text{M}$  Trolox/mL of sample.

The oxygen radical absorptive capacity (ORAC) assay was measured using the method described by Dávalos, Gómez-Cordovés, and Bartolomé (2004), with modifications. The reaction was carried out with 20  $\mu\text{L}$  of extract, 120  $\mu\text{L}$  of 116.1 nmol/L of fluorescein in 75 mmol/L of phosphate buffer (pH 7.4), and 60  $\mu\text{L}$  of 2,2-Azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride (108 mg/ml). Fluorescence decay was measured with excitation at 485 nm and emission at 520 nm every 80 min at 37 °C (Fluorstar Omega, BMG LABTEC, Germany, UE). The results of the antioxidant activity were expressed as equivalents in  $\mu\text{mol}$  of Trolox/100 g.

## 2.7 STATISTICAL ANALYSIS

The results of physicochemical analyses, antioxidant activity by ORAC method, and lysozyme activity were subjected to normality tests, analysis of variance (ANOVA), with means compared by Tukey test using  $p < 0.05$  and regression analysis using the SISVAR statistical software (version 5.8). As for antioxidant activity by the ABTS method, the results were submitted to non-parametric Kruskal-Wallis analysis and the means were

compared by Dunn's test at 5% probability of error, using the statistical software GraphPad Instant (version 3.06).

### 3 RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1. PHYSICAL AND CHEMICAL CHARACTERISTICS OF ASININE MILK

The analyzed donkey milk samples presented pH close to neutrality, with an increase in the value of this parameter between times 1 and 180 days of lactation ( $p < 0.05$ ) (Table 1). In the first three days, colostrum and transitional milk presented a pH variation between 6.44 and 6.34. The pH values of mature milk (15 to 180 days after delivery) ranged between 7.02 and 7.08. Martini et al. (2018) also found pH values above 7.0 in the milk of donkey females of the Amiata breed.

As for the sugar profile of the donkey milk samples, lactose was the carbohydrate that stood out. For the other sugars (glucose and galactose) only traces were identified. Lower concentrations of lactose were observed in colostrum and transitional milk, and higher values between 15 and 120 days of lactation, with a maximum recorded value of 7.91 g/100 mL ( $p < 0.05$ ). At 180 days of lactation, the lactose concentration returned to a value close to that of colostrum and transitional milk. These results indicate that the lactation phase influences the chemical composition of the milk, being associated with the needs of the offspring at different stages of development. In addition, Altomonte et al. (2019) highlighted that lactose is the component of milk that most stands out during the lactation phase, its concentrations being linked to the sweet taste of donkey milk, which provides excellent palatability. Throughout the lactation period, the protein content of the donkey milk samples progressively reduced ( $p < 0.05$ ), going from 4.47g/100 mL on the first day of lactation to 1.65

g/100 mL at 180 days after delivery (Figure 1). This result was expected, because during the lactation phases there is a reduction of the protein, mainly of casein. The composition of colostrum has higher protein concentrations, especially immunoglobulins, lactoferrin, and  $\beta$ -lactoglobulin (Ozturkoglu-Budak, 2018).

Because colostrum has a higher concentration of nitrogenous components, it is possible to relate the highest levels of protein in the first three days of lactation with the pH values below 7.0 recorded during this period. Similarly, the progressive reduction in the concentration of protein in milk contributed to the increase in pH from the 15th to the 180th day of lactation. Although the protein content of donkey milk shows a decline throughout lactation, it has been proven that this type of milk has low allergenic properties due to the casein fractions, which contributes to good digestibility, especially in infants (Martini et al., 2020). This is important from a nutritional point of view, indicating donkey milk as an alternative source for preparing infant formula for children with food restrictions.

During the lactation period, the fat content detected in donkey milk reduced from 1.49 to 0.78 g/100 mL. Regardless of the time, compared to values from other animal species, the fat content recorded in donkey milk from the Northeastern Brazilian ecotype is considered low, although it is within the expected values for the species. Higher fat content detected in colostrum (1.49 g/100 mL) corroborates the results of Martini et al. (2020), who evaluated Amiata donkey milk during the first 10 days postpartum. On the other hand, the fat contents registered in mature milk (0.43 to 0.94 g/100 g) were higher than the values found by Martini et al. (2014) in Amiata donkey milk between 30 and 300 days of lactation (0.35 to 0.46 g/100 g), by Malissiova et al. (2015) in the milk of donkey females raised on Greek and Cypriot farms (0.44 to 0.62 g/100 mL) and by Valle et al. (2018) in donkey milk from different farms in Italy (0.13 to 0.65 g/100 mL). These

differences may be associated with factors: race, type of food provided to animals, time of year, and milking protocol (Martini et al., 2018).

### 3.2 CAPACITY OF LISOZYME ACTIVITY

Reduction in the concentration of lysozyme in donkey milk between the first day after birth (404.01 U / mL) and 180 days of lactation (2399.58 U / mL) (Table 2), with a tendency to stabilize in the period when it is called “mature milk”. The higher concentration of lysozyme observed in colostrum favors the offspring's immature immune system during the first days of life. Due to its activity, a lysozyme contributes to the low bacterial count of donkey colostrum, exerting antimicrobial functions synergistically with other components of milk, such as lactoferrin, lactoperoxidase, N-acetyl- $\beta$ -d-glucosaminidase, immunoglobulins, and some fatty substances (Nazzaro et al., 2010; Brumini et al., 2016).

Given the importance of lysozyme as an antimicrobial agent, donkey milk becomes suitable for preventing intestinal infections, especially in nursing mothers (Vincenzetti et al., 2005). The high concentration of this enzyme can also be a differential in the conservation of fresh donkey milk, as well as contributing to the reduction of intramammary infections in females (Pilla et al. 2010; Polidori & Vincenzetti, 2012).

The average lysozyme content of donkey milk from the Northeastern Brazil ecotype (2887.45 U/mL) was higher than that reported by Martini et al. (2019), who obtained a concentration of 1842.32 U/mL in female donkeys of the Amiata breed in the third month of lactation. On the other hand, Conte et al. (2012) verified lysozyme activity corresponding to 3400.00 U/mL in Ragusano donkey milk, and Pilla et al. (2010) recorded lysozyme concentration in donkey milk between 4000 and 5000 U/mL between 60 and 180 days postpartum in animals of the Amiata breed. Lysozyme concentrations

between 0.3 and 1.1 g/L in human milk and only trace amounts in ruminant milk have been reported (ALTOMONTI et al., 2019), 0.18 µg/mL in cow's milk, 0.15 µg/mL in buffalo milk and 0.25 µg/mL in goat milk (Kumari & Mathur, 1981; Scharfen et al., 2007). In a study by Gubić et al. (2015) showed a concentration of lysozyme in donkey milk up to 50 times higher than in human milk.

Observing the aforementioned studies, the variation in lysozyme values may be related to physiological factors, the breed of the animal and the method used to determine this antimicrobial enzyme. Furthermore, Martini et al. (2019) related the lysozyme content of donkey milk with the age of the animal and observed that in females older than 10 years the concentrations of lysozyme in milk were higher than in females younger than 10 years. In the present study, it was not possible to make this association, as the donkey females used were from the closest age groups (3.5 to 6.5 years).

### 3.3 ANTIOXIDANT CAPACITY

The assays for antioxidant capacity of donkey milk performed by the ABTS radical scavenging activity and oxygen radical absorptive capacity (ORAC) methods showed variations along the evaluated lactation period (180 days) (Table 2). The antioxidant capacity of foods is affected by the composition of the test system, substrate, and mode of inducing oxidation. For this reason, it is necessary to employ more than one method to measure total antioxidant capacity. In this case, the ABTS and ORAC tests were selected, as they are the most popular methods for assessing the levels of TEAC (total antioxidant capacity) in milk (Valetini et al., 2017).

Antioxidant activity by the ABTS assay showed greater performance between 15 and 90 days of lactation, corresponding to mature milk. The reduction in antioxidant activity after 90 days of lactation corroborates the reduction in milk components (Table 1), as protein

compounds (peptides and free amino acids) and lipids (fatty acids and fat-soluble vitamins A and E) have antioxidant action (Smet et al., 2008). According to Li et al. (2015), protein compounds, specifically peptides and lactoferrin, act by chelating metals and thus reducing the action of reactive oxygen species (ROS), resulting in a beneficial action throughout the body.

The values found for antioxidant activity by the ORAC method showed satisfactory results of antioxidant capacity even with a reduction after 120 days of lactation. This reduction is also justified due to the decrease in antioxidant compounds over time.

Based on the results of the two methods employed, it is possible to affirm that the donkey milk of the Northeastern Brazilian ecotype presented satisfactory antioxidant activity, requiring further studies to determine which compounds specifically exert antioxidant activity in the donkey milk.

## CONCLUSION

Given the above, donkey milk changes both in its composition as well as the lysozyme activity and antioxidant activity over the 180 days of the lactation phase. High lysozyme activity in colostrum and satisfactory antioxidant activity during 180 days stand out. This study to date is the first to assess the lysozyme activity and antioxidant capacity of donkey milk from the Brazilian Northeast ecotype.

## ACKNOWLEDGMENT

The development agency, National Council for Scientific and Technological Development CNPq, to which the research is included in the approved proposal "Asinine milk from the Brazilian semiarid region: nutritional profile and bioprospecting of bioactive compounds", under process number 311634/2018-4 CNPq.

## AUTHOR'S STATEMENT

All authors approved the final version of the article being submitted. The article is an original work, has not been previously published and is not being considered for publication elsewhere.

## REFERENCES

- Alhazmi, A, Stevenson, J.W, Amartei, S.W.Q. (2014). Discovery, modification and production of T4 lysozyme for industrial and medical uses *International Journal of Biology*, 6, 45-63.
- AOAC – Association of Official Analytical Chemists Dairy Products. In: *AOAC Official Methods of Analysis*. 19<sup>th</sup> ed. Gaithersburg. AOAC, 2016.
- Altomonte, I, Salari, F, Licitra, R, & Martini, M. (2019). Donkey and human milk: Insights into their compositional similarities. *International Dairy Journal*, (89), 111-118.
- Aspri, M, Economou, N, & Papademas, P. (2017). Donkey milk: an overview on functionality, technology, and future prospects. *Food reviews international*, 33 (3), 316-333.
- Brumini, D, Criscione, A, Bordonaro, S, Vegarud, G.E., & Marletta, D. (2016). Whey proteins and their antimicrobial properties in donkey milk: a brief review. *Dairy science & technology*, 96(1), 1-14.
- Cappannella, E, Benucci, I, Lombardelli, C, Liburdi, K, Bavaro, T, & Esti, M. (2016). Immobilized lysozyme for the continuous lysis of lactic bacteria in wine: Bench-scale fluidized-bed reactor study. *Food Chemistry*, 210, 49-55.
- Cavalcanti, N.S.H, Pimentel, T.C, Magnani, M, Pacheco, M.T. B, Alves, S.P, Bessa, R.J B, & do Egypto, R. D. C. R. (2021). Donkey milk and fermented donkey milk: are there differences in the nutritional value and physicochemical characteristics?. *Food science & technology*, 144, 111239.
- Conte, F., Foti, M., Malvisi, M., Giacobello, G., & Piccinini, R. (2012). Valutazione dell'azione antibatterica del lisozima del latte d'asina. Considerazioni igienico-sanitarie. *Large Animal Review*, 18, 13-16.
- Dávalos, A., Gómez-cordovés, C., & Bartolomé, B. (2014). Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC–Fluorescein) Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 48-54.
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., & McSweeney, P. L. (2017). Chemistry of milk constituents. In *Fundamentals of cheese science*, 4, 71-104.

- Gubić, J. G. (2015) Comparison of the protein and fatty acid fraction of Balkan donkey and human milk. *Mljekarstvo*, 65(3), 168–176.
- Karnopp, A.R., Oliveira, K.G., de Andrade, E.F., Postingher, G.M., & Granato, D. (2017). Optimization of an organic yogurt based on sensorial, nutritional, and functional perspectives. *Food Chemistry*, 233, 401-411.
- Kumari, K, & Mathur, M.P. Buffalo milk lysozyme. (1981). *Indian Journal of Dairy Science*, 34, 385-390.
- Li, S., Hor-Yue, T., Ning, W., Zhang-Jin, Z., Lixing, L., Chi-Woon, W., e Yibin, F. 2015. "The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases" *International Journal of Molecular Sciences*, 16(11), 26087-26124.
- Madhusudan, N.C., Ramachandra, C.D., Udaykumar, N.D., Sharnagouda, H.D., Nagraj, N.D., & Jagjivan, R.,D. (2017). Composition, characteristics, nutritional value and health benefits of donkey milk-a review. *Dairy Science & Technology*, (hal-01538532).
- Mohanty, D.P., Mohapatra, S., Misra, S., & Sahu, P.S. (2016). Milk derived bioactive peptides and their impact on human health—A review. *Saudi journal of biological sciences*, 23(5), 577-583.
- Malissiova, E., Arsenos, G., Papademas, P., Fletouris, D., Manouras, A., Aspri, M., & Arvanitoyannis, IS. (2016). Assessment of donkey milk chemical, microbiological and sensory attributes in Greece and Cyprus. *International Journal of Dairy Technology*, 69(1), 143-146.
- Martini, M., Altomonte, I., Salari, F. (2014). Amiata donkeys: fat globule characteristics, milk gross composition and fatty acids. *Italian Journal of Animal Science*, 13(1), 123-126.
- Martini, M., Altomonte, I., Licitra, R., & Salari, F. (2018). Nutritional and nutraceutical quality of donkey milk. *Journal of Equine Veterinary Science*, 65, 33-37.
- Martini, M., Salari, F., Licitra, R., La Motta, C., & Altomonte, I. (2019). Lysozyme activity in donkey milk. *International Dairy Journal*, 96, 98-101.
- Martini, M., Licitra, R, Altomonte, I., & Salari, F. (2020). Quality of donkey mammary secretion during the first ten days of lactation. *International Dairy Journal*, 109, 104781.
- Nazzaro, F., Orlando, P. Fratianni, F., & Coppola, R. (2010). Isolation of components with antimicrobial property from the donkey milk: A preliminary study. *The Open Food Science Journal*, 4(1), p 43-47.
- NRC. (2007). **Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids**, (1st ed.), *National Academy Press*.

- Messias, T.B.O.N., Araújo, E.D.O.M., Sant'Ana, A. M. S., Lucena, J.E.C., Pacheco, M.T.B., & Queiroga, R.C.R.E (2022). Challenges and perspectives for exploiting donkey milk in the Brazilian Northeast. *Ciência Rural*, 52(3).
- Ozturkoglu-Budak, S. (2018). Effect of different treatments on the stability of lysozyme, lactoferrin and b-lactoglobulin in donkey's milk. *International Journal of Dairy Technology*, 71, 36-45.
- Paraskevakis, N. (2015). Effects of dietary dried Greek Oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) supplementation on blood and milk enzymatic antioxidant indices, on milk total antioxidant capacity and on productivity in goats. *Animal Feed Science and Technology*, 209, 90-97.
- Pilla, R., Daprà, V., Zecconi, A., & Piccinini, R. (2010). Hygienic and health characteristics of donkey milk during a follow-up study. *Journal of Dairy Research*, 77(4), 392-397.
- Piovesana, S, Capriotti, A.L., Cavaliere, C, La Barbera, G, Samperi, R., Chiozzi, R.Z., & Laganà, A. (2015). Peptidome characterization and bioactivity analysis of donkey milk. *Journal of proteomics*, 119, 21-29.
- Polidori, P., & Vincenzetti, S. (2013). Use of donkey milk in children with cow's milk protein allergy. *Foods*, 2(2), 151–159.
- Ragland, S.A., & Criss, A.K. (2017). From bacterial killing to immune modulation: Recent insights into the functions of lysozyme. *PLoS pathogens*, 13(9), e1006512.
- Rangel, A.H.N., Júnior, J.G.B.G., Simplício, A. A., Freire, R.M.B., & Novaes, L.P. (2015). Aspectos composicionais e nutricionais do leite de jumenta: uma revisão. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 70(3), 160-171.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(1), 1231-1237.
- Scharfen, E.C., Mills, D.A., & Maga, E.A. (2007). Use of human lysozyme transgenic goat milk in cheese making: effects on lactic acid bacteria performance. *Journal of dairy science*, 90(9), 4084-4091.
- Smet, K., Raes, K., De Block, J., Herman, L., Dewettinck, K., & Coudijzer, K. (2008). A change in antioxidative capacity as a measure of onset to oxidation in pasteurized milk. *International Dairy Journal*, 18(5), 520-530.
- Vincenzetti, S., Polidori, P., Fantuz, F., Mariani, P.L., Cammertoni, N., Vita, A., & Polidori, F. (2005). Donkey's milk caseins characterization. *Italian Journal of Animal Science*, 4(sup2), 427-429.

Trinchese, G., Cavaliere, G., Canani, R.B., Matamoros, S., Bergamo, P., & De Filippo, C. (2015). Humans, donkey and cow's milk differentially affect energy efficiency and inflammatory state modulating mitochondrial function and the intestinal microbiota. *Journal Nutrition Biochem*, 26(11), 1136-1146.

Valle, E., Raspa, F., Giribaldi, M., Barbero, R., Bergagna, S., Antoniazzi, S., & Cavallarin, L. (2017). A functional approach to the body condition assessment of lactating donkeys as a tool for welfare evaluation. *PeerJ Organic Chemistry*, 5, e3001.

Valentini, V., Allegra, A., Adduci, F., Labella, C., Paolino, R., & Cosentino, C. (2018). Effect of cactus pear (*Opuntia ficus-indica* (L.) Miller) on the antioxidant capacity of donkey milk. *International Journal of Dairy Technology*, 71(3), 579-584.

Zeppa, G., Conterno, L., Gerbi, V. (2001). Determination of organic acids, sugars, diacetyl, and acetoin in cheese by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 6, 49.

## ANEXOS

Table 1. Physicochemical composition of donkey milk of the Brazilian Northeastern ecotype during 180 days of lactation

| Parameters         | Lactation period (days) |                    |                    |                    |                    |                    |                   |                    |                    | CV<br>(%) |
|--------------------|-------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|--------------------|--------------------|-----------|
|                    | 1                       | 3                  | 15                 | 30                 | 60                 | 90                 | 120               | 150                | 180                |           |
| pH                 | 6,44 <sup>d</sup>       | 6,34 <sup>e</sup>  | 7,08 <sup>b</sup>  | 7,02 <sup>bc</sup> | 7,02 <sup>bc</sup> | 6,98 <sup>c</sup>  | 7,18 <sup>a</sup> | 7,09 <sup>b</sup>  | 7,02 <sup>bc</sup> | 1.2       |
| Lactose*<br>(g/mL) | 6,49 <sup>e</sup>       | 6,94 <sup>d</sup>  | 7,91 <sup>a</sup>  | 7,53 <sup>bc</sup> | 7,81 <sup>ab</sup> | 7,53 <sup>bc</sup> | 7,90 <sup>a</sup> | 7,42 <sup>c</sup>  | 6,78 <sup>de</sup> | 4.5       |
| Protein (g/mL)     | 4,47 <sup>a</sup>       | 3,04 <sup>b</sup>  | 2,59 <sup>bc</sup> | 2,22 <sup>c</sup>  | 1,81 <sup>d</sup>  | 1,75 <sup>d</sup>  | 1,64 <sup>d</sup> | 1,74 <sup>d</sup>  | 1,65 <sup>d</sup>  | 26.2      |
| Fat (g/mL)         | 1,49 <sup>a</sup>       | 0,78 <sup>bc</sup> | 0,45 <sup>c</sup>  | 0,55 <sup>c</sup>  | 0,57 <sup>c</sup>  | 0,59 <sup>bc</sup> | 0,43 <sup>c</sup> | 0,72 <sup>bc</sup> | 0,94 <sup>b</sup>  | 49.0      |

Means followed by different letters indicate differences between lactation periods by Tukey's test ( $p < 0.05$ ). CV - Coefficient of variation.

\*Analyze by chromatography.

Table 2. Lysozyme concentration, antioxidant activity against ABTS radical and oxygen radical absorption capacity (ORAC) of asinine milk of the Nordeste ecotype during 180 days of lactation

| Parameters                                 | Lactation period (days) |                       |                       |                      |                                 |                      |                                 |                     |                      | CV   |
|--------------------------------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|---------------------------------|----------------------|---------------------------------|---------------------|----------------------|------|
|                                            | 1                       | 3                     | 15                    | 30                   | 60                              | 90                   | 120                             | 150                 | 180                  | (%)  |
| Lysozyme<br>(U/mL)                         | 4040,01 <sup>a</sup>    | 3096,15 <sup>ab</sup> | 3284,22 <sup>ab</sup> | 2089,19 <sup>b</sup> | -                               | 2417,42 <sup>b</sup> | -                               | -                   | 2399,58 <sup>b</sup> | 1.2  |
| ORAC<br>$\mu$ mol trolox<br>TEAC/100<br>mL | 126,4 <sup>abc</sup>    | 149,0 <sup>a</sup>    | 138,0 <sup>ab</sup>   | 135,8 <sup>abc</sup> | 158,6 <sup>a</sup>              | 143,7 <sup>a</sup>   | 95,5 <sup>cd</sup>              | 76,4 <sup>d</sup>   | 100,2 <sup>bcd</sup> | 17.7 |
| ABTS<br>$\mu$ mol trolox<br>TEAC/100<br>mL | 7,14 <sup>C</sup>       | 15,34 <sup>BC</sup>   | 31,25 <sup>CB</sup>   | 38,17 <sup>A</sup>   | 17,71 <sup>A<sup>BC</sup></sup> | 20,30 <sup>AB</sup>  | 16,63 <sup>A<sup>BC</sup></sup> | 14,34 <sup>BC</sup> | 7,09 <sup>C</sup>    | -    |

Means followed by different lowercase letters indicate a difference between the evaluation periods by the Tukey test ( $p < 0.05$ )

Means followed by distinct capital letters indicate differences between the evaluation periods by Dunn's test ( $p < 0.05$ )

CV - Coefficient of variation.

**Figure 1.** Protein content of donkey milk from the Brazilian Northeastern ecotype at 180 days of lactation

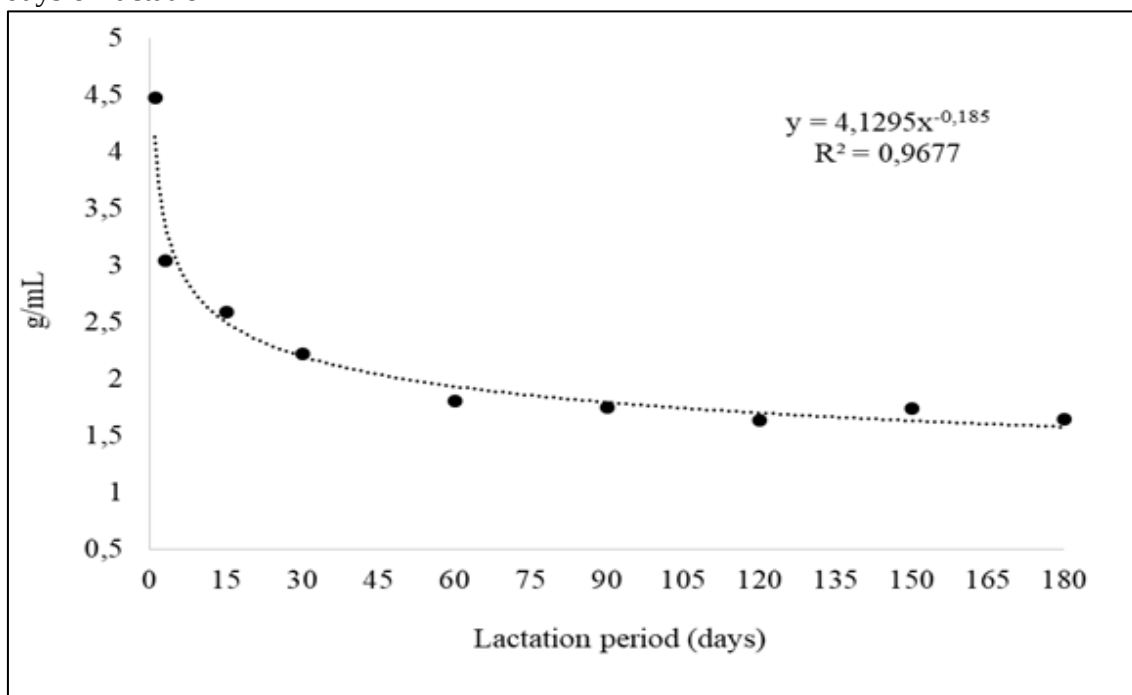


Grafico de regressão em função do teor de proteína e relação ao período de lactação em estudo.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O leite asinino estudado contém em sua composição físico-química alto conteúdo de lactose e teor de proteína semelhante ao leite humano. Apesar do baixo teor de gordura, o leite pode ser destinado para alimentação de neonatos, a partir do acréscimo de uma fonte gordura para atingir a necessidade nutricional.

Além disso, teor de lisozima encontrado no leite demonstra alta atividade antibacteriana, e atividade antioxidante satisfatória. Assim, o leite asinino pode ser considerado um alimento de alta qualidade e seguro.

A partir dos resultados obtidos nesse estudo é possível disseminar informações científicas inéditas na área do estudo do leite asinino no Brasil do ecótipo Nordestino, contribuindo para os pesquisadores do Nordeste brasileiro seja um dos pioneiros no estudo da asininocultura leiteira desse ecótipo, bem como a valorização desses animais, além de fomentar a competitividade no mercado de alimentos atual.

