

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Determinação de metais por técnicas espectroanalíticas em amostras de carne e sangue de bovinos submetidos à dieta com adição de erva-mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hilaire)

Samia Rodrigues Dib

Orientadora: Dra. Ana Rita de Araújo Nogueira

*** bolsista CAPES**

**São Carlos - SP
2016**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Determinação de metais por técnicas espectroanalíticas em amostras de carne e sangue de bovinos submetidos à dieta com adição de erva-mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hilaire)

Samia Rodrigues Dib

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA ANALÍTICA

Orientadora: Dra. Ana Rita de Araújo Nogueira

*** bolsista CAPES**

**São Carlos - SP
2016**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

D543d Dib, Samia Rodrigues
Determinação de metais por técnicas
espectroanalíticas em amostras de carne e sangue de
bovinos submetidos à dieta com adição de erva-mate
(*Ilex paraguariensis*, St. Hilaire) / Samia Rodrigues
Dib. -- São Carlos : UFSCar, 2016.
112 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de
São Carlos, 2016.

1. Determinação de metais. 2. Carne bovina. 3.
Sangue bovino. 4. Erva-mate. 5. Espectrometria. I.
Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Samia Rodrigues Dib, realizada em 23/05/2016:

Profa. Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira
Embrapa

Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha
IBB/UNESP

Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho
UFSCar

“Que poderei retribuir ao senhor Deus, por tudo aquilo que ele fez em meu favor” (Sl 115, 12).

“Porque eis que vou fazer obra nova, a qual já surge: não a vedes? Vou abrir uma via pelo deserto, e fazer correr arroyos pela estepe” (Isa 43,19).

*Aos meus pais Marly e Samir, à
minha irmã Consolia, aos
meus avós Alaíde e João e ao
Lucas Leonel.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por tamanho cuidado, zelo e por Tua providência em minha vida, em especial neste tempo.

À professora Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira, pela orientação, confiança, ensinamentos, paciência e apoio.

Ao professor Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho, pela contribuição neste trabalho e sugestões, meus sinceros agradecimentos.

A todos os funcionários da Embrapa Pecuária Sudeste de São Carlos, em especial aos pesquisadores Drs. Rymer R. Tullio, Renata T. Nassu e Waldomiro Barioni e aos analistas Drs. Gilberto B. Souza e Avelardo U. C. Ferreira, por sempre se disponibilizarem em ajudar naquilo que era necessário.

Aos meus pais por nunca medirem esforços para que eu possa realizar meus sonhos. Agradeço pelo apoio, confiança e todo amor incondicional que me oferecem.

À minha irmã Consolia, minha fiel companheira, que mesmo distante foi muito presente.

Ao Lucas Leonel, pela paciência e principalmente por estar ao meu lado. Seu apoio fez e sempre fará toda a diferença.

Aos meus avós, Alaíde e João Rodrigues, por sempre me receberem de braços abertos em suas casas e fazer dos dias em que eu estava em Ituiutaba-MG dias únicos, de tanto amor e alegria.

À todos os meus familiares, madrinha, tios e primos, por se alegrarem sempre com minhas conquistas.

À Michele e a Mayara, pelo tempo que moramos juntas, pela verdadeira amizade que construímos e por tornarem dias de luta menos desgastantes com boas conversas e convivências.

Ao Ministério Universidades Renovadas, por todos os momentos que passamos juntos. Vocês foram minha primeira família em São Carlos.

À Comunidade Católica Shalom, em especial à minha missão de Araraquara, por todo apoio e orações.

Aos meus amigos Carlos, Ana Beatriz, Cibeli e Naty por tornarem meus dias melhores. Por todos os momentos que vivemos risadas, trabalhos desenvolvidos, pelas convivências e pela fiel parceria.

À todos os integrantes do Grupo de Pesquisa em Análise Instrumental Aplicada (GAIA), em especial aos colegas mais próximos da Embrapa: Jonas, Carol, Aline, Elaine, Cibeli, Ana Beatriz, Alexandra, Carlos, Naty, Raquel e Mayumi pela troca de conhecimento e experiências nesse tempo.

Aos meus amigos de Ituiutaba-MG: Daniela, Giuliane, Patrícia, Pe. Romeu, Ivan e Maria Clara. “Continuar, até o fim, até o céu... Nem à distância, as estradas. Poderão nos separar, pois o caminho que é eterno vamos trilhar...”

A secretaria de pós-graduação que sempre trabalhou com muita seriedade e respeito com seus alunos.

Enfim, obrigada.

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

AA - Absorção atômica

ANOVA - Análise de variância

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BEC - Concentração equivalente ao sinal de fundo (*background equivalent concentration*)

CCD - Dispositivo de carga acoplada (*charge-coupled device*)

CID - Dispositivo de injeção de carga (*charge-injection device*)

CRMs - Materiais de referência certificados (*certified reference materials*)

CTDS - Dispositivo de transferência de carga (*charge-transfer device*)

Cu-TMS - Cuprotiomolibdatos

CVAS - Espectrometria de absorção atômica com vapor frio (*cold vapor atomic spectrometry*)

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DP - Desvio padrão

F - F analítico

FAAS - Espectrometria de absorção atômica com chama (*flame atomic absorption spectrometry*)

FAPESP - Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo

FBN - Nebulizador “*flow blurring*”

F_C - F crítico

XFR - Fluorescência de raios X

HDL - Lipoproteínas de alta densidade

ICP OES - Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (*inductively coupled plasma optical emission spectrometry*)

LDL - Lipoproteínas de baixa densidade

LOD - Limite de detecção

LOQ - Limite de quantificação

MIP OES - Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (*microwave inductively plasma optical emission spectrometry*)

MS - Detector de massas

MSIS - Sistema de introdução de amostra multi-modo (*multi-sample introduction system*)

OES - Espectrometria de emissão óptica (*optical emission spectrometry*)

PCAs - Análise de componentes principais (*principal component analysis*)

PDAS - Arranjos de fotodiodos (*photodiode arrays*)

PMT - Tubos fotomultiplicadores (*photomultiplier tubes*)

R^2 - Coeficiente de determinação

SDA - Adição de padrão sequencial (*standard dilution analysis*)

RSD - Desvio padrão relativo (*relative standard deviation*)

SBR - Razão sinal analítico/sinal de fundo

SCD - Dispositivo semiconductor

TMs - tiomolibdatos

UHPLC- HMRS - Cromatografia líquida de alto desempenho acoplado a espectrômetro de massa de alta resolução (*Ultra High Performance Liquid Chromatography - High Resolution MS*)

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1– Adaptado de “Interações dos elementos minerais no organismo animal”. Fonte: GEORGIEVISKII, 1982 apud MENDONÇA et al., 2011. -----28*
- Figura 2.2– Diagrama esquemático do espectrômetro MIP OES. FONTE: NIEDZIELSKI et al., (2015). -----39*
- Figura 5.1- A) Ração que o gado foi alimentado; B) A ração sendo colocada no cocho dos animais; C) A erva-mate sendo adicionada na ração; D)A ração com a adição da erva-mate E) A erva-mate sendo homogeneizada na ração E) As divisões das baias onde os animais se alimentavam. -----49*
- Figura 6.1– Efeito das diferentes quantidade de erva-mate adicionadas à ração nos teores obtidos de Ca, Cu, Fe, K, Mg e Zn (mg kg^{-1}). -----62*
- Figura 6.2- Gráficos da variação das concentrações (mg kg^{-1}) dos elementos (Ca, Cu, Fe, K, Mg e Zn) determinados nas 12 amostras de fígado em cada grupo(0; 0,5; 1,0 e 1,5) (n=3). -----77*
- Figura 6.3– Variação do peso em kg, dos animais em cada grupo de suplementação com erva-mate (0; 0,5; 1,0 e 1,5 %) (n=12). -----80*
- Figura 6.4– Gráfico de “scores” (classe selecionada: peso) obtidos pela matriz gerada através da determinação da concentração de Ca, Cu, Fe, Mg, K e Zn nas amostras de fígado após digestão assistida por radiação micro-ondas. ----82*
- Figura 6.5– Gráfico de “loadings” (classe selecionada: peso) obtidos pela matriz gerada através da determinação da concentração de Ca, Cu, Fe, Mg, K e Zn nas amostras de fígado após digestão assistida por radiação micro-ondas. 82*
- Figura 6.6– Gráfico de “scores” (classe selecionada: idade) obtidas pela matriz gerada através da determinação da concentração de Ca, Cu, Fe, Mg, K e Zn determinada em 144 amostras de fígado após digestão assistida por radiação micro-ondas. -----84*
- Figura 6.7 – Gráfico de “Loadings” (classe selecionada: idade) obtidas pela matriz gerada através da determinação da concentração de Ca, Cu, Fe, Mg, K e Zn em 144 amostras de fígado após digestão assistida por radiação micro-ondas. -----84*

Figura 6.8– Gráfico de “scores” (classe selecionada: espessura da camada de gordura) obtidas pela matriz gerada através da determinação da concentração de Ca, Cu, Fe, Mg, K e Zn nas amostras de fígado após digestão assistida por radiação micro-ondas. -----86

Figura 6.9– Gráfico de “loadings” (classe selecionada: espessura da camada de gordura) obtidas pela matriz gerada através da determinação de Ca, Cu, Fe, Mg, K e Zn nas amostras de fígado após digestão assistida por radiação micro-ondas. -----86

Figura 6.10– Gráfico de “scores” (classe selecionada: genética do pai) obtidas pela matriz gerada através da determinação da concentração de Ca, Cu, Fe, Mg, K e Zn nas amostras de fígado após digestão assistida por radiação micro-ondas. -----88

Figura 6.11– Gráfico de “loadings” (classe selecionada: genética do pai) obtidas pela matriz gerada através da determinação da concentração de Ca, Cu, Fe, Mg, K e Zn nas amostras de fígado após digestão assistida por radiação micro-ondas. -----88

Figura 6.12– Gráfico de “scores” (classe selecionada: % de erva-mate) obtidas pela matriz gerada através da determinação da concentração de Ca, Cu, Fe, Mg, K e Zn em 15 amostras referentes a 5 filhos do mesmo pai (4). -----90

Figura 6.13– – Gráfico de “loadings” (classe selecionada: % de erva-mate) obtidas pela matriz gerada através da determinação da concentração Ca, Cu, Fe, Mg, K e Zn em 15 amostras referentes a 5 filhos do mesmo pai (4).-----90

Figura 6.14– Gráfico de “scores” (classe selecionada: % de erva-mate) obtidas pela matriz gerada através da determinação de Ca, Cu, Fe, Mg, K e Zn nas amostras de fígado, após digestão assistida por radiação micro-ondas. -----92

Figura 6.15– Gráfico de “loadings” (classe selecionada: % de erva-mate) obtidas pela matriz gerada através da determinação de Ca, Cu, Fe, Mg, K e Zn nas amostras de fígado após digestão assistida por radiação micro-ondas. ----92

Figura 6.16 – Concentração de Ca determinada nas amostras de sangue (n=3), fígado (n=12) e músculo (n=3)). -----93

Figura 6.17– Concentração de Cu determinada nas amostras de sangue (n=3) e fígado (n=12).-----94

Figura 6.18– Concentração de Fe determinada nas amostras de sangue (n=3), fígado (n=12) e músculo (n=3). -----95

Figura 6.19– Concentração de K determinada nas amostras de sangue (n=3), fígado (n=12) e músculo (n=3). -----96

Figura 6.20– Concentração de Mg determinada nas amostras de sangue (n=3), fígado (n=12) e músculo (n=3). -----97

Figura 6.21– Concentração de Zn determinada nas amostras de sangue (n=3), fígado (n=12) e músculo (n=3). -----98

LISTA DE TABELAS

<i>TABELA 5. 1 - Composição básica da ração oferecida aos animais participantes do estudo. -----</i>	<i>48</i>
<i>TABELA 5.2 – Programa de aquecimento empregado na digestão ácida assistida por radiação micro-ondas para as amostras de ração. -----</i>	<i>51</i>
<i>TABELA 5. 3 – Parâmetros operacionais empregados na determinação de Ca, Cu, Fe, K, Mg e Zn por ICP OES. -----</i>	<i>52</i>
<i>TABELA 5.4 – Programa de aquecimento empregado na digestão ácida assistida por radiação micro-ondas para as amostras de sangue. -----</i>	<i>53</i>
<i>TABELA 5.5 – Comprimentos de onda empregados para análise por ICP OES. -----</i>	<i>53</i>
<i>TABELA 5.6 – Programa de aquecimento empregado na digestão ácida assistida por radiação micro-ondas para as amostras de fígado e músculo bovino. -----</i>	<i>54</i>
<i>TABELA 5.7 – Comprimentos de onda empregados para análise por ICP OES. -----</i>	<i>54</i>
<i>TABELA 5.8 – Parâmetros empregados para análise por MIP OES. -----</i>	<i>55</i>
<i>TABELA 6.1 – Figuras de mérito obtidas para a determinação de Ca, Cu, Fe, K, Mg e Zn por ICP OES presentes nas amostras de ração, erva-mate e no CRM NIST 1515, (n=3). -----</i>	<i>59</i>
<i>TABELA 6.2 – Valores certificados (média ± desvio-padrão, n = 3), determinados e porcentagem de recuperação para o CRM NIST 1515, determinados por ICP OES.-----</i>	<i>59</i>
<i>TABELA 6.3 – Concentração (média ± desvio-padrão, n = 3) de Ca, Cu, Fe, K, Mg e Zn presentes no extrato da erva-mate. -----</i>	<i>60</i>
<i>TABELA 6.4 – Concentração de Ca, Cu, Fe, K, Mg e Zn (média ± desvio-padrão, n = 3) determinados nas amostras de ração (0%) e com a adição de erva-mate (0,5; 1,0 e 1,5%). -----</i>	<i>61</i>

<i>TABELA 6.5 – Estatística da ANOVA para os valores médios das concentrações dos elementos em estudo nas amostras de ração. -----</i>	<i>63</i>
<i>TABELA 6.6 – Figuras de mérito obtidas para a determinação de Ca, Cu, Fe, K, Mg e Zn presentes nas amostras de sangue analisados por ICP OES (n=3). ---</i>	<i>65</i>
<i>TABELA 6.7 - Recuperações (%) obtidas para Ca, Cu, Fe, K, Mg e Zn a partir de experimentos de adição e recuperação realizados na amostra de sangue em três níveis (n=3).-----</i>	<i>65</i>
<i>TABELA 6.8 – Concentração de Ca, Cu, Fe, K, Mg e Zn (média ± desvio-padrão, n = 3) nas amostras de sangue dos animais alimentados com diferentes quantidades de erva-mate adicionadas à ração. -----</i>	<i>66</i>
<i>TABELA 6.9 – Estatísticas da ANOVA para os valores médios das concentrações dos elementos em estudo no sangue dos animais e seus respectivos grupos. -----</i>	<i>66</i>
<i>TABELA 6.10 - Figuras de mérito obtidas para a determinação de Ca, Cu, Fe, K, Mg e Zn por ICP OES e MIP OES. -----</i>	<i>70</i>
<i>TABELA 6.11- Valores certificados, determinados (média ± desvio-padrão, n = 3) e recuperações obtidos para o CRM NIST 1577 b por ICP OES e MIP OES. -----</i>	<i>70</i>
<i>TABELA 6.12 - Concentrações de Ca, Cu, Fe, K, Mg e Zn (média±desvio-padrão, n = 3) nas amostras de músculo de bovinos alimentados com diferentes quantidades de erva-mate adicionadas à ração. -----</i>	<i>72</i>
<i>TABELA 6.13 – Análise estatística (ANOVA) para os valores médios das concentrações de cálcio, ferro, magnésio, potássio e zinco determinadas no músculo de bovinos alimentados com diferentes teores de erva-mate. -----</i>	<i>73</i>
<i>TABELA 6.14- Concentrações de Ca, Cu, Fe, K, Mg e Zn (média ± desvio-padrão, n = 48) nas amostras de fígado bovinos alimentados com diferentes quantidades de erva-mate adicionadas à ração. -----</i>	<i>76</i>
<i>TABELA 6.15 - Estatísticas da ANOVA para os valores médios das concentrações dos elementos em estudo no fígado.-----</i>	<i>78</i>
<i>TABELA 6.16– Média do peso dos animais em kg, e seus respectivos desvios padrão (n=12).-----</i>	<i>80</i>

TABELA 6.17- ANOVA de fator único para os valores médios dos pesos (em kg) dos animais utilizados no experimento.-----81

RESUMO

DETERMINAÇÃO DE METAIS POR TÉCNICAS ESPECTROANALÍTICAS EM AMOSTRAS DE CARNE E SANGUE DE BOVINOS SUBMETIDOS À DIETA COM ADIÇÃO DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*, St. Hilaire). Tendo em vista a importância da qualidade da carne bovina e sua relação com a dieta fornecida ao animal, esta dissertação teve como proposta avaliar se houve alteração na concentração dos íons metálicos Ca, Cu, Fe, K, Mg e Zn em sangue e carne de bovinos que ingeriram ração suplementada com erva-mate. O experimento foi desenvolvido com 48 bovinos machos, que foram confinados e divididos em 4 grupos. O primeiro grupo recebeu ração sem adição da erva-mate e os demais tiveram 0,5; 1,0; e 1,5% de adição da erva-mate em relação à massa total de suas dietas. Após o abate, amostras de erva-mate e da ração fornecida aos animais, assim como do sangue, fígado e músculo dos animais abatidos foram liofilizadas, moídas e em seguida digeridas em forno por radiação micro-ondas em meio HNO₃ e H₂O₂. Os analitos Ca, Mg, K, Fe, Cu e Zn foram determinados na ração, na erva-mate e no sangue por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES). Os mesmos analitos foram determinados no músculo e no fígado por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (MIP OES). Os métodos foram validados com o emprego de materiais de referência certificados, sendo obtidos resultados estatisticamente semelhantes aos valores certificados e limites de detecção e quantificação adequados. Análise de componentes principais (PCA) foi realizada visando avaliar a influência da adição do mate e das variáveis: peso, idade, camada de gordura e genética do pai do animal nos resultados obtidos para o fígado. A quantidade de erva-mate adicionada na dieta foi a principal causa das diferenças observadas entre os resultados obtidos para os diferentes analitos, os quais aparentemente não foram afetados pelas demais variáveis. Em relação às amostras de sangue, fígado e carne, foram observadas diferenças entre os teores dos analitos obtidos nos diferentes tratamentos e os diferentes tipos de amostra. Na matriz músculo foram obtidos teores mais elevados dos analitos avaliados dos animais que receberam ração com 1,0% de mate. Nas amostras de sangue os maiores teores variaram entre os tratamentos com 0,5 e 1,5% de mate. Através da PCA realizada com as amostras de fígado, observou-se que, exceto para o Fe, a quantidade de extrato de mate adicionada causou efeito significativo quando comparados o grupo controle (0%) e o grupo

que recebeu a maior dosagem de mate (1,5%), com destaque para os teores de K, Mg e Ca.

ABSTRACT

DETERMINATION OF METALS BY SPECTROANALYTICAL TECHNIQUES IN MEAT AND BLOOD OF BOVINES SUBMITTED TO DIET WITH HERB-MATE (*Ilex paraguariensis*, St.Hilaire) ADDITION. Given the importance of quality in the bovine meat and its relationship with the diet submitted to animals, this master dissertation has the proposition to evaluate the Ca, Cu, Fe, K, Mg, and Zn concentrations changes in blood and meat of bovines that ingested feed supplemented with yerba mate. The experiment was conducted with 48 male of bovines, which were confined and shared into 4 groups. The first one was feed without the addition of yerba mate and the others had 0.5; 1.0; and 1.5% of yerba mate added to the total mass of their diets. After slaughter, samples of feed and yerba mate, and blood, liver, and muscle of slaughtered animals were freeze-dried, ground and then microwave assisted digested in HNO₃ and H₂O₂ medium. The analytes Ca, Mg, K, Fe, Cu, and Zn were quantified in the feed, yerba mate, and blood by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES). The same analytes were quantified in the muscle and in the liver by microwave inductively plasma optical emission spectrometry (MIP OES). The methods were validated with the use of certified reference materials and statistically similar results to the certified values were obtained, with appropriate limits of detection and quantification. Principal component analyses (PCA) were performed to evaluate the influence of the addition of yerba mate combined with the variables weight, age, fat layer, and animal genetic in the liver results. The amount of added yerba mate was the leading cause of differences among the analytes results, which were not affected by the other variables. Samples of blood, liver, and muscle presented differences between the analytes concentrations with the different treatments. However, the results showed variations among the different treatments and sample sorts. In muscle matrix, higher levels of evaluated analytes in animals feed diets were obtained with 1.0% mate addition. On the other hand the highest concentration varied between treatments with 0.5 and 1.5% of mate in the samples of blood. By PCA performed with the liver samples, it was observed that except for Fe, the amount of added mate extract caused significant effect compared to control group (0%) and the group receiving the highest dosage of mate (1.5%), especially for K, Mg, and Ca.

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	20
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 - DIGESTÃO DE RUMINANTES E METABOLISMO DOS MINERAIS	23
2.2 - IMPORTÂNCIA DOS MINERAIS NA DIETA DOS BOVINOS	24
2.3 - BIODISPONIBILIDADE	27
2.4 - USO DE ADITIVOS NA DIETA DE BOVINOS DE CORTE	30
2.5 - A ERVA-MATE E SUAS PROPRIEDADES	32
2.6 - ESPECTROMETRIA ÓPTICA DE EMISSÃO POR PLASMA INDUZIDO POR MICRO-ONDAS	35
3 - OBJETIVOS	42
3.1 - OBJETIVO GERAL	42
3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
4 - MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1 - INSTRUMENTAÇÃO	44
4.2 - REAGENTES E SOLUÇÕES	44
4.3 - AMOSTRAS	45
5 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	47
5.1 - DADOS E REQUISITOS PARA ABATE	47
5.2 - ALIMENTAÇÃO - RAÇÃO	47
5.3 - COLETA DE AMOSTRAS	50
<i>5.3.1 - Coleta no abate: sangue, músculo e fígado</i>	<i>50</i>
5.4 - DIGESTÃO DAS AMOSTRAS ASSISTIDAS POR RADIAÇÃO MICRO-ONDAS ..	51
5.5 - DETERMINAÇÃO DO LOD E DO LOQ	55
5.6 - ANÁLISE ESTATÍSTICA	56
6 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
6.1 - EFEITO DA ADIÇÃO DA ERVA-MATE NA RAÇÃO	58
6.2 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ADIÇÃO DA ERVA-MATE NA RAÇÃO, ESTUDO NO SANGUE DOS BOVINOS	64
6.3 - EFEITO DA ADIÇÃO DA ERVA-MATE NA RAÇÃO, ESTUDO NO FÍGADO E MÚSCULO BOVINO	67
<i>6.3.1 - Comparação das técnicas ICP OES e MIP OES</i>	<i>67</i>
<i>6.3.2 - Efeito da adição da erva-mate na ração, estudo no músculo</i>	<i>71</i>
<i>6.3.3 - Efeito da adição da erva-mate na ração, estudo no fígado</i>	<i>74</i>

6.4 - ESTUDO DA INFLUÊNCIA DAS CLASSES: PESO, IDADE, ESPESSURA DA CAMADA DE GORDURA, GENÉTICA DO PAI E PORCENTAGEM (%) DE ERVAMATE, NAS CONCENTRAÇÕES DOS METAIS ESTUDADOS.....	79
6.5 - COMPARAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÃO DE CA, CU, FE, MG, K E ZN NOS TRATAMENTOS E MATRIZES ESTUDADAS	93
7 - CONCLUSÕES.....	100
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	102

Introdução

1 - INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos mais importantes produtores mundiais de carne bovina. Além do amplo consumo interno, ocupa atualmente a posição de segundo maior exportador, rivalizando a liderança com a Índia (que exporta principalmente carne de segunda qualidade). A carne brasileira é exportada para mais de 100 países, com destaque para a China, Rússia e Egito (ABIEC, 2015).

A grande importância da carne bovina na nutrição humana deve ser destacada, principalmente como fonte de proteínas, minerais e vitaminas (GEAY, et al., 2001), sendo a determinação da sua composição essencial para a segurança alimentar e nutricional. A qualidade da carne está diretamente ligada, além da genética, à dieta alimentar fornecida ao gado durante seu desenvolvimento.

A dieta de ruminantes é formada basicamente de vitaminas, proteínas e minerais, dos quais 15 são indispensáveis para o organismo do animal, dentre eles os macrominerais: Ca, Cl, K, Mg, Na, P e S e os microminerais: Co, Cu, Fe, I, Mn, Mo, Se e Zn (TORKANIA, et al., 2000). Os minerais estão envolvidos praticamente em todas as vias metabólicas do organismo animal, tais como o desempenho reprodutivo, o metabolismo energético, a manutenção do crescimento e as funções fisiológicas (LAMB et al., 2008).

A exigência de minerais no organismo bovino vai variar de acordo com o estado fisiológico, sanitário e reprodutivo do animal (LAMB, et al., 2008; WILDE, 2006), assim como em função da forma como os minerais serão absorvidos no intestino e usados pelas células e tecidos, isto é, sua biodisponibilidade, dependendo das interações orgânicas e inorgânicas entre os componentes da dieta (O'DELL, 1984).

Para garantir um produto de qualidade, além de seu valor nutritivo, é necessário o controle de micro-organismos nocivos. Para isso são utilizados

medicamentos, dos quais mais de 70% são antibióticos. Estudos relatam que 20% dos resíduos dos medicamentos vão para a carne e para o leite, causando efeitos tóxicos e alérgicos aos consumidores (STOLKER, et al., 2007).

A busca por fontes alternativas de matéria prima para produção de aditivos gera inúmeras possibilidades as quais envolvem formulações minerais, muitas vezes produzidas a partir de novas fontes alternativas e também aditivos nutricionais, visando a melhor conversão alimentar e aumento da qualidade e do tempo de preservação da carne. Em estudo com carnes de frangos que receberam complementação alimentar com extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hilaire), foi observado que o tempo de prateleira da carne aumentou em média 7 dias, sem a necessidade da utilização de antibióticos (RACANICCI, et al., 2011).

A erva-mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hilaire) é rica em compostos fenólicos (FILIPPI et al., 2001) e demonstrou possuir propriedades antioxidantes (HECK et al., 2007). No entanto, quando adicionada aos alimentos, os compostos fenólicos podem interagir com metais e/ou metaloproteínas presentes no alimento e/ou no organismo (seja ainda na boca, no estômago, no sangue e/ou nos tecidos), podendo aumentar ou diminuir a biodisponibilidade de minerais para o animal. Os compostos fenólicos são reportados como os principais grupos presentes na parede celular, que podem complexar os cátions metálicos (MEDEIROS, et al., 2015).

Assim, o conhecimento da disponibilidade de minerais em carne e sangue de bovinos tratados com erva-mate como aditivo à dieta é relevante e foi o enfoque desta dissertação de mestrado.

Revisão Bibliográfica

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - Digestão de ruminantes e metabolismo dos minerais

O conhecimento de algumas noções básicas do aparelho digestivo dos ruminantes é importante no estudo da nutrição dos mesmos, em virtude de suas peculiaridades. O aparelho digestivo, composto por um conduto alimentar que inclui boca, faringe, esôfago, estômago, intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo), intestino grosso (ceco, colo e reto) e glândulas acessórias, formadas pelas glândulas salivares, pelo pâncreas e pelo fígado (SILVA e LEÃO, 1979) tem como principal função digerir, absorver nutrientes e excretar produtos não aproveitáveis pelo organismo.

O estômago do ruminante em particular é composto de quatro compartimentos: retículo, rúmen, omaso e abomaso. A principal característica dos ruminantes é a capacidade de regurgitar os alimentos para mastigação, que favorece maior absorção dos nutrientes presentes no alimento (LOPES, 1998).

O retículo, o rúmen e o omaso são chamados de pré-estômago, e possuem função de reter o alimento para a ação fermentativa dos micro-organismos ruminais que atuam na digestão das fibras (BERCHIELLE et al., 2006). Essa digestão ocorre durante a fermentação anaeróbica, quando cerca de 10^9 a 10^{11} bactérias e 10^4 a 10^7 protozoários produzem enzimas capazes de hidrolisar proteínas, lipídios e carboidratos (incluindo a celulose) e contam com a presença de 10^3 a 10^5 de fungos (valores fornecidos em mL de líquido ruminal) (QI et al., 2011; KRAUSE et al., 2013). A parte glandular corresponde ao abomaso (estômago verdadeiro), onde a digestão é feita por meio do suco gástrico (BERCHIELLE et al., 2006).

O metabolismo de cada nutriente tem suas especificidades. Os minerais seguem caminhos complexos nos animais, sendo divididos na forma metabolizável, similar aos componentes alimentares orgânicos. Os minerais

normalmente são transportados a partir da serosa da mucosa até o fígado em formas livres ou ligadas através da corrente sanguínea, podendo também ficar retidos na mucosa. Do fígado, são transportados pela corrente sanguínea periférica e levados a diferentes órgãos e tecidos em taxas determinadas por mecanismos transportadores nas membranas das células e organelas para atender as necessidades intracelulares. A taxa de absorção desses minerais varia de tecido para tecido, mas geralmente é elevada na mucosa intestinal e no fígado, intermediária em outros tecidos moles e lenta no osso, embora a taxa de absorção seja influenciada pelo estado fisiológico (por exemplo, lactação) e nutricional (deficiência ou sobrecarga) do animal. No metabolismo de absorção é essencial considerar que os minerais podem ser eliminados através de secreções (leite, suor e sucos digestivos) e excreção (urina e fezes). Além disso ocorre a reciclagem, com a reabsorção dos minerais, como por exemplo o fósforo, que é secretado na saliva e pode ser reabsorvido (SUTTLE, 2010).

2.2 - Importância dos minerais na dieta dos bovinos

As exigências dos animais basicamente incluem as necessidades de nutrientes para manutenção e para produção. No primeiro caso, as necessidades estão voltadas a manutenção dos processos fisiológicos normais, como circulação, respiração, digestão, etc. No caso das exigências para produção deverá ser considerado o rendimento de carcaça e o ganho de peso do animal. De maneira geral, a exigência líquida leva em consideração o que cada alimento fornece ao animal em termos de proteínas, vitaminas e minerais (SILVA e LEÃO, 1979).

Com funções importantes, os minerais estão envolvidos praticamente em todas as vias metabólicas do organismo animal (LAMB et al., 2008; WILDE, 2006; BROWN e ZERINGUE, 1994) e segundo LOPES (1998), a exigência de minerais pelos bovinos varia de acordo com seu estado sanitário,

reprodutivo e fisiológico, somando também as necessidades das diversas fases, tais como: crescimento, puberdade, gestação e lactação.

Os minerais são classificados com base na concentração e na localização no tecido ou em algum órgão específico e apresenta-se vital para diferentes funções. Os 50 minerais presentes no organismo são classificados com base na concentração como macro ou micro mineral. Desses, 15 são indispensáveis aos processos metabólicos e por esta razão devem estar presentes na alimentação, entre eles destacam-se os macrominerais: Ca, Cl, K, Mg, Na, P e S e os microminerais: Co, Cu, Fe, I, Mn, Mo, Se e Zn (TORKANIA, et al., 2000).

Segundo SUTTLE (2010), no geral, os elementos minerais podem exercer quatro funções no organismo animal: estrutura (compondo estruturas nos órgãos e tecidos do corpo); fisiológica (ocorre nos fluídos e tecidos como eletrólitos e estão envolvidos com a manutenção da pressão osmótica, do balanço ácido básico, da permeabilidade de membranas e irritabilidade dos tecidos); catalítica (agem como catalisadores nos sistemas enzimáticos e hormonais, como componentes da estrutura de metaloproteínas ou como ativadores do sistema) e reguladora (na replicação e diferenciação celular).

Os minerais que fazem parte dos tecidos se encontram em uma proporção de 2 a 5% do peso total dos animais (GONZÁLEZ, et al., 2000). Dentre os minerais essenciais, serão discutidas as funções metabólicas do cálcio, cobre, ferro, magnésio, potássio e zinco e as causas de suas deficiências ou excessos no organismo do animal.

O cálcio é o mineral mais abundante no organismo de bovinos, representando cerca de 1 a 2 % do total da massa do animal. Cerca de 99% do cálcio é encontrado nos ossos, tendo como funções a mineralização óssea, a regulação metabólica, a coagulação sanguínea, a contração muscular e a transmissão de impulsos nervosos. Sua deficiência causa doenças como

raquitismo, osteomalácia, abortos, natimortos e baixa produção de leite (no caso de fêmeas) (SPEARS, 1999).

O potássio está presente em cerca de 0,3% do organismo animal e faz parte da composição de todas as células e fluídos corporais, se encontrando principalmente no interior das células. Suas principais funções são manutenção do equilíbrio ácido-básico, regulação da pressão osmótica, transmissão de impulso nervoso e batimento cardíaco, contração muscular e o controle do equilíbrio hídrico (SPEARS, 1999). Segundo SUTTLE (2010), a deficiência de potássio é rara e os sintomas de sua deficiência não são muitos específicos, a não ser que o animal esteja confinado e receba uma dieta a base de grãos com baixos níveis de potássio.

O magnésio, com aproximadamente 0,45% da composição do organismo dos bovinos, tem como principal função ser cofator de mais de 300 enzimas, componentes de ossos e atividade neuromuscular, sendo que sua deficiência causa a tetânia (SPEARS, 1999).

O zinco, presente em concentração da ordem de 30 mg kg^{-1} , tem como principal função ser constituinte de várias metaloenzimas, estando envolvido em reações enzimáticas associadas com a síntese proteica e metabolismo de carboidratos e ácidos nucleicos essenciais em células, como as gonadais. Conseqüentemente, funções reprodutivas, como espermatogênese e desenvolvimento de órgãos sexuais em machos e todas as fases do processo reprodutivo nas fêmeas, do estro à gestação, são seriamente alteradas pela deficiência de zinco (SPEARS, 1999; SMITH e AKINBAMIJO, 2000).

O ferro, com concentração de aproximadamente 80 mg kg^{-1} , é responsável pelo transporte e armazenamento de oxigênio, sendo o principal componente de moléculas de determinadas substâncias (hemoglobina, mioglobina e citocromo), pelo transporte de elétrons e como componente de enzimas (catalase, triptofano 5-monoxigenase, fenilamina 4-monoxigenase, aconitase). A deficiência de ferro causa a anemia (SPEARS, 1999).

O cobre está presente em pequena proporção, apenas 3 mg kg^{-1} . No entanto, é componente de muitas enzimas (lisil oxidase, tirosinase, citocromo oxidase, superóxido dismutase) e sua ausência causa atraso no estro e baixa taxa de concepção, além de aborto ou mumificação do feto (SPEARS, 1999; SMITH e AKINBAMIJO, 2000).

Visto a importância das funções dos macro e microminerais e as alterações no metabolismo do animal, causados pela sua ausência ou excesso, é necessário levar em consideração a biodisponibilidade dos mesmos, devido às diferentes fontes de minerais presentes nos alimentos fornecidos durante o desenvolvimento dos bovinos (WEDEKIND et al., 1992; SPEARS et al., 2004; GENGELBACH et al., 1994).

2.3 - Biodisponibilidade

Segundo SUTTLE (2010), biodisponibilidade diz a respeito às formas como os minerais podem ser absorvidos no intestino e usados pelas células e tecidos animais, ou seja, a proporção de um nutriente presente no alimento que é absorvida pelo animal e utilizada nas funções biológicas. A biodisponibilidade tem quatro componentes: acessibilidade, capacidade de absorção, capacidade de retenção e funcionalidade.

Muitos fatores afetam a maneira como os nutrientes são utilizados pelos animais, dentre os principais estão o excesso ou a ausência de alguns minerais (sinergismo/antagonismo) e o conteúdo de nutrientes orgânicos (proteínas, carboidratos, vitaminas) (MORAES, 2001). Normalmente, os minerais envolvidos em vários processos metabólicos têm maior facilidade de se interrelacionarem do que aqueles que estão envolvidos numa simples ou única função (DYER, 1969). Neste enfoque se destacam o Cu, Fe, Zn e o Se, por serem íons polivalentes. A Figura 2.1, retrata as principais interações inorgânicas entre os minerais no organismo animal.

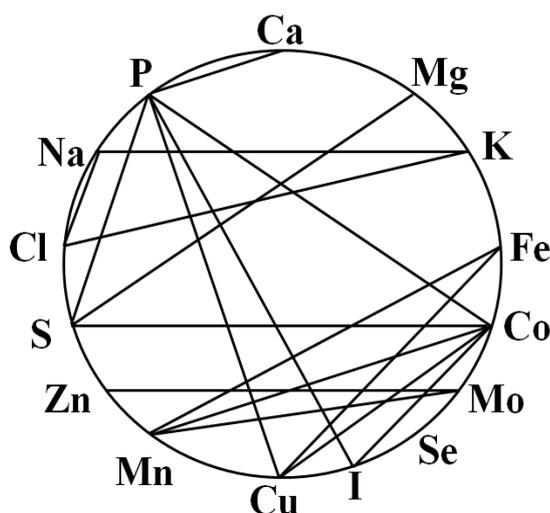


Figura 2.1– Adaptado de “Interações dos elementos minerais no organismo animal”. Fonte: GEORGIEVSKII, 1982 apud MENDONÇA et al., 2011.

A absorção, disponibilidade e utilização dos minerais são suscetíveis às interações orgânicas e inorgânicas entre componentes da dieta. A absorção do cálcio ocorre grande parte no intestino delgado e uma pequena parte é absorvida no rúmem (SMITH, 1962). Utilizando técnicas isotópicas foi comprovado que ocorre uma diminuição da absorção de cálcio com a idade, sendo que em bezerros a absorção chega a 99%, enquanto em bovinos de 12-15 anos apenas cerca de 23% do cálcio é absorvido (HANSARD et al., 1954). A relação entre as concentrações de Ca:P nos alimentos também apresenta interação; experimentos relatam que a proporção correta seria 2:1 (STEEVENS et al., 1971). Outro exemplo é o magnésio, que por possuir características químicas e fisiológicas semelhantes à do cálcio, se ingerido em excesso, interfere na absorção de cálcio por competição, podendo substituí-lo (CARE e VAN'T KLOOSTER, 1965). A suplementação excessiva de vitamina D₃ aumenta a absorção de cálcio (HEANEY, 2008).

O magnésio é absorvido no intestino mediante um sistema de transporte ativo (SUTTLE, 2010) que pode ser interferido pela relação Na:K. O potássio muitas vezes está em excesso e esse excesso inibe a absorção intestinal de magnésio (MOSEL et al., 1991). A capacidade de o animal assimilar o

magnésio dietético decresce sensivelmente com aumento da idade. Isto tem sido atribuído à redução na capacidade de absorção no intestino grosso (SILVA e LEÃO, 1979).

A absorção do zinco ocorre no rúmem (NRC, 2001). A quantidade absorvida nos ruminantes é de 20 a 40%, podendo ser afetada pela interação exercida por outros elementos, tais como o cobre, que em excesso interfere em sua absorção (VAN CAMPEN, 1969), além de magnésio, fosfatos e vitaminas D que favorecem sua absorção (McDOWELL, 2000). O excesso de ácido fítico, presente principalmente nas forrageiras, nos cereais e nas sementes oleaginosas (soja, algodão) diminui a absorção do zinco devido à formação de um complexo insolúvel de fitato (GRACE et al., 1981; MORRIS e ELLI, 1981). A excreção de zinco ocorre predominantemente em secreções pancreáticas e nas fezes, sendo uma pequena porção eliminada na urina (UNDERWOOD e SUTTLE, 1999).

Cerca de 1 a 3% de cobre oferecido aos ruminantes é absorvido principalmente pelo intestino (McDOWELL, 2000). Assim como descrito para o Zn, a taxa de absorção está influenciada pela necessidade do organismo, pela forma química do elemento e pela quantidade de outros minerais, que podem exercer efeitos antagônicos. O Mo é um importante fator na biodisponibilidade do Cu, pois dependendo de sua concentração causará interferência na absorção intestinal do Cu devido à formação tiomolibdatos (TMs) no ambiente ruminal rico em sulfeto, os TMs ligam-se ao cobre no rúmen para formar cupro-tiomolibdatos (Cu-TMs), que são insolúveis e indisponíveis para a absorção. Enxofre inorgânico e ainda o excesso de aminoácidos sulfurados, de cálcio e de proteína total também limitam a absorção do cobre. (VÁSQUEZ et al., 2001; HUBER e PRICE, 1971).

Mais de 50% do K ingerido pelos ruminantes é absorvido no rumem, no omaso e na porção final do intestino (SUTTLE, 2010). O K é altamente reciclado, pois a saliva dos ruminantes é rica em potássio e é a maior

fonte de potássio para a microbiota ruminal. O K, juntamente com Na deve estar sempre presente na saliva dos ruminantes e deve ter uma relação constante para que as condições ambientais do rumem sejam as mais adequadas possíveis para a multiplicação dos micro-organismos ruminais. O potássio é eliminado principalmente pela urina, sudorese e pelas fezes. Geralmente está em excesso, no entanto, em processos inflamatórios que causem danos na mucosa intestinal sua absorção fica comprometida (CARVALHO, 2013).

O ferro na forma férrico (Fe^{3+}) é fracamente absorvido no trato intestinal. Grande parte do ferro que está presente nos alimentos está na forma férrica, podendo ser reduzido para a forma ferrosa (Fe^{2+}) mediante a reação com o ácido que está presente no obomaso (WOLLENBERG e RUMMEL, 1987). Durante o processo de digestão o ferro não-heme normalmente se liga a um quelante, aumentando assim sua solubilização. Se os níveis de ferro no corpo estão adequados, o ferro que entra no enterócito não é transportado para a membrana basolateral e é ligado a ferritina. Uma vez ligado é excretado juntamente com as fezes (NRC, 2001). A absorção aumenta na presença de ácido ascórbico (GREENBERG et al., 1957) e demais compostos orgânicos que formam quelatos solúveis e por outro lado o excesso de zinco (YARDICK et al., 1989) e cálcio (WHITING e WOOD, 1997) diminui a biodisponibilidade do ferro.

2.4 - Uso de aditivos na dieta de bovinos de corte

Levando em consideração a importância nutricional da carne bovina, além dos minerais serem responsáveis por várias funções no organismo dos bovinos, juntamente com as vitaminas e proteínas, eles garantem uma boa qualidade da carne que chegará até os consumidores (LAWRIE, 2005).

A qualidade da carne consumida pela população deve apresentar valor nutritivo e estar isenta de qualquer substância que possa gerar problemas de saúde aos consumidores. Pode estar comprometida quando exposta a

contaminações químicas, como por exemplo, medicamentos e sanitizantes (MOTA et al., 2005).

Vários suplementos alimentares e medicamentos podem contribuir para o melhor desempenho dos animais em crescimento e terminação. Poucos países dispõem de estatísticas abrangentes a respeito das quantidades de fármacos veterinários utilizados nas criações animais (DÍAZ-CRUZ e BARCELÓ, 2007). No entanto, estima-se que mais de 70% desses compostos sejam antibióticos (THIELE-BRUHN, 2003). Apenas 20% dos antibióticos são utilizados para medicar os animais doentes, enquanto 80% são usados como ferramentas de produção: ou para prevenir doenças que surgem a partir da forma como os animais são tratados durante a reprodução (as chamadas "doenças de produção") ou para o crescimento (CHIESA et al., 2012). O uso intensivo dos antibióticos para fins terapêuticos leva ao acúmulo de 20% de resíduos (GEWEHR e LAWISCH, 2003) em matrizes de alimentos como leite (ZHAN et al., 2012) ou carne (STUBBINGS e BIGWOOD, 2009). Esses resíduos podem incluir os compostos de origem, bem como metabólitos, tendo efeitos tóxicos diretos ou indiretos sobre os consumidores. Esses compostos são excretados pelos animais através das fezes e urina, ocasionando conseqüentemente problemas ambientais (CHIESA et al., 2012).

Visto que o emprego de antibióticos reflete na saúde dos consumidores assim como no meio ambiente, a busca crescente por produtos naturais, que não deixem resíduos e que não representem qualquer risco à saúde do consumidor ou ao meio ambiente abre espaço para o estudo de novos aditivos. Destaque deve ser dado aos extratos naturais de plantas que possuem diversos compostos secundários, produzidos como mecanismo de defesa contra fungos, bactérias e insetos, com potencial para alterar a fermentação ruminal. Seus compostos são classificados de acordo com sua estrutura e propriedades químicas.

No geral, plantas, ervas e especiarias e seus compostos secundários isolados possuem grande número de substâncias capazes de inibir a atividade metabólica de micro-organismos. Como exemplo, podem ser citados os compostos fenólicos, que têm sido relacionados com atividade antimicrobiana e antioxidativa de fontes naturais (CHANDRA e MEJIA, 2004; IVANONA et al., 2005; BASTOS et al., 2006), dentre eles pode-se mencionar os taninos (HASLAM, 1996), que são compostos polifenólicos que podem ser encontrados na casca, nas folhas ou nos frutos de espécies vegetais; saponinas (XIAO et al., 2011), que são glicosídeos de grande variedade estrutural presentes em espécies vegetais.

2.5 - A erva-mate e suas propriedades

Conhecida popularmente como erva-mate a *Ilex paraguariensis* St. Hil. Var. *paraguariensis* (Aquifoliaceae), é uma espécie nativa da América do Sul, em uma região que se estende ao leste do Paraguai, ao norte de Missões na Argentina, para os estados do Paraná e Santa Catarina, no Brasil, (BURTNIK, 2006; FILIP et al., 2001) onde a região Sul é a maior produtora. No país, 596 municípios desenvolvem a atividade ervateira, envolvendo um total de aproximadamente, 710.000 pessoas, para produção anual aproximada de 650.000 toneladas de folhas (MACCARI e MAZUCHOWSKI, 2000).

Segundo LINHARES (1969) o continente Americano nasceu bebendo mate. Em anos passados o seu uso já era difundido entre os indígenas. Existem relatos de que na América pré-colombiana a erva-mate era elemento básico na alimentação dos guaranis, cuja tribo se localizava pelo vasto território banhado pelos rios Paraná, Uruguai e Paraguai.

No início do século XVI, o sistema produtivo começou a se aperfeiçoar na presença dos jesuítas, que visaram oportunidades lucrativas que poderiam ser alcançadas com a comercialização do mate. A pesquisa dos

missionários levou à racionalização do cultivo, tornando os jesuítas precursores do cultivo sistemático, da coleta de sementes, da produção de mudas e da condução de erveiras (MAZUCHOWSKI, 1997).

A *Ilex paraguariensis* é uma espécie de árvore perene dioica, cujo ciclo de vida é longo e os sexos estão em indivíduos diferentes. Seu tamanho pode variar de 8 a 15 metros e 40 centímetros de diâmetro de tronco. Suas folhas são longas, de coloração verde-oliva, podendo variar de 5 a 8 centímetros. A floração ocorre na primavera, com flores brancas, unissexuais, e bagas vermelhas, contendo em torno de 4 a 5 sementes (SCHULTZ, 1985).

Segundo a ANVISA (1998), o produto erva-mate, também designado mate é o constituído pelas folhas, hastes pecíolos e pedúnculos da *Ilex paraguariensis*, que são dessecados, ligeiramente queimados (ou não) e partidos ou moídos.

O valor nutritivo da erva-mate é um aspecto relevante, uma vez que o produto possui compostos orgânicos e minerais de grande importância nutricional. Sua composição se baseia em nutrientes, minerais e vitaminas solúveis em água. Também é caracterizada pela presença de compostos fitoquímicos, dentre eles os polifenóis (ácidos fenólicos, flavonóides), alcalóides (metilxantinas incluindo cafeína, teobromina, teofillina) e terpenos (carotenóides, saponinas) (HECK e MEJIA, 2007).

Os primeiros estudos sobre a composição química e bioquímica da erva-mate foram realizados no século XIX (BURGSTALLER, 1994) (Apud, MACCARI JÚNIOR, 2005). No entanto, nos últimos anos ocorreu um aumento de trabalhos na literatura que estudam as propriedades da *Ilex paraguariensis*.

A erva-mate tem demonstrado efeitos como antimicrobiano contra bactérias patogênicas (ratos) (EL-SONBATY e ARABY, 2014); ansiolíticos, estimulantes e neoroprotetores (ratos) (SANTOS, et al., 2015); efeitos no metabolismo de lipídeos; na obesidade e na oxidação: anti-dipogênicos (in vitro e em ratos), regulando a expressão de genes que estão envolvidos na

adipogênese, sendo observada uma redução no peso corporal e de gordura epididimal, (ARÇARI et al., 2013), anti-obesidade sobre o metabolismo lipídico (ratos) (RESENDE et al., 2015), redução de colesterol e triglicérides (ratos) (FERNANDES et al., 2016), efeitos-cardiovasculares, diminuindo os risco de doenças cardiovasculares (ratos) (BRAVO et al., 2014), diminuição no LDL e aumento no HDL (seres humanos) (MORAIS et al., 2009), inibição da lipase pancreática (in vitro) (MARTINS et al., 2010), diminuição na oxidação de ácidos graxos insaturados no fígado (ratos) (MARTINS et al., 2009) e aumento nos níveis totais de antioxidantes no plasma (seres humanos) (MATSUMOTO et al., 2009); efeitos anti-inflamatórios: melhoria nos marcadores inflamatórios (hipotálamo e adipócitos) (LIMA et al., 2014), inibição de elastase de neutrófilos (in vitro) (XU et al., 2009) e redução da inflamação pulmonar (ratos) (LANZETTI et al., 2008), propriedades angiogênicas, bem como crescimento embrionário (aves) (STRASSMANN et al., 2008), atividade antifúngica, inibindo o crescimento de *Malassezia furfur* (in vitro) (FILIP et al., 2010b) e efeitos mutagênicos: demonstrou efeito antimutagênico e protetor de DNA (ratos) (MIRANDA et al., 2008).

A partir dos estudos realizados em experimentos in vitro, animal ou humano em relação aos efeitos da erva-mate nos diversos metabolismos, a erva também vem sendo utilizada em formulações de alimento para consumo humano, demonstrando aumento no valor nutricional e diminuindo os teores de gordura quando adicionada nas formulações de barra de cereais (CHIESA et al., 2012); apresentando caráter antioxidante quando adicionada na composição de iogurte light (PRECI et al., 2011); reduzindo a oxidação de sobrecoxas assadas quando armazenadas e reaquecidas, reduzindo significativamente a oxidação lipídica (CAMEL et al., 2012); diminuindo a velocidade da oxidação lipídica e o teor de colesterol nas amostras de carne de frango, indicando caráter antioxidante natural de erva-mate na conservação de carne de frango in vivo (PADILHA, 2007).

Em estudo com carnes de frangos que receberam uma complementação alimentar com extrato de erva-mate (*Ilex Paraguariensis*) adicionado na água potável que os frangos consumiam, foi observado melhoria na estabilidade oxidativa da carne de frango, aumentando o tempo de prateleira da carne em média 7 dias sem a necessidade da utilização de antibióticos (RACANICCI et al.,2011).

2.6 - Espectrometria óptica de emissão por plasma induzido por micro-ondas

A espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES) é uma técnica multielementar muito empregada para determinação de macro e micronutrientes em uma ampla variedade de matrizes, sendo suas propriedades: como capacidade multielementar, bons LODs e ampla faixa linear assim como suas aplicabilidades bem conhecidas e estabelecidas.

Recentemente, a versão comercial de um espectrômetro de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (MIP OES) foi desenvolvida, utilizando nitrogênio como gás do plasma, atribuindo a este um menor custo operacional quando comparado ao uso do plasma de argônio no ICP OES. Além de multielementar, essa técnica possui sensibilidade adequada para determinação sequencial de macro e micronutriente tornando-a competitiva frente ao uso de técnicas consolidadas como espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) e ICP OES (LI et al., 2013).

O uso de N₂ como gás do plasma atribui ao MIP OES características bem distintas do ICP OES e a mais importante está relacionada à temperatura do plasma (BROEKAERT e SIEMENS, 2004; DOUGLAS e FRENCH, 1981(Apud, GRAY e DATE, 1983)). No ICP OES o argônio, gás com energia de ionização de 15,75 eV, é utilizado como gás formador do plasma e opera a aproximadamente 7500°C e no MIP OES, o plasma de N₂ possui uma energia de ionização relativamente menor (14,53 eV), com potência fixa de 1kW

e sua temperatura pode atingir cerca de 5000°C (GONÇALVES et al., 2016) Essas características do plasma de nitrogênio podem influenciar a capacidade do MIP OES na determinação de elementos com elevadas energias de ionização e, principalmente, levar à efeitos de matriz pronunciados em análise de matrizes complexas (KARLSSON et al., 2015) e a formação de espécies refratárias estáveis(GONÇALVES et al., 2016). Para os analitos mencionados anteriormente (macro e micronutrientes), as linhas atômicas são isentas de interferências espectrais e podem ser utilizadas para as determinações (KARLSSON et al., 2015).

Além das diferenças mencionadas, é importante salientar ainda que o processo de geração do plasma no ICP OES também se diferencia da forma como ocorre no MIP OES. No primeiro, o plasma é gerado a partir da rádio-frequência eletromagnética e uma bobina de indução (GINÉ, 1998) e no segundo o plasma é gerado a partir de um campo eletromagnético que é induzido por radiação micro-ondas, proveniente de um magnetron e de um guia de ondas (JANKOWSKI e RESZKE, 2011).

O MIP OES teve a sua primeira aplicação analítica em 1963 (MAVRODINEANU e HUGHES, 1963) e mesmo antes do desenvolvimento de sua versão comercial, vários elementos já haviam sido determinados em protótipos: Na (JANKOWSKI, 2001), Au, Cd, Cu, Cr, Fe, Mn, Ni Fe, Cd, Zn e Ni (BROWN et al., 1987), Ag, Pd, Pt (JANKOWSKI et al., 2005), Hg (MURILLO et al., 2001), Ca, K, Mg e Sr (MATUSIEWICZ e GOLIK, 2004) e As, Hg, Sb, Se e Sn (MATUSIEWICZ e ŚLACHCIŃSKI, 2006).

Com a comercialização do MIP OES, novos trabalhos passaram a serem desenvolvidos e reportados na literatura. LI et al. (2013), realizaram a determinação de Cu, Fe, Mn e Zn, em amostras de ração animal e fertilizantes utilizando o MIP OES, após a digestão assistida por radiação micro-ondas. A fim de avaliar a exatidão, os resultados obtidos foram comparados aos obtidos por espectroscopia de absorção atômica (AA) e ICP OES, de modo que o MIP

OES apresentou desempenho comparável, ou superior quando comparado com as técnicas mencionadas.

No trabalho realizado por AMAIS et al. (2013), um MIP OES com nebulizador flow blurring (FBN) foi utilizado para determinação de Si em amostra de diesel e biodiesel. Os autores realizaram um procedimento de diluição simples com etanol e compararam os resultados com os obtidos empregando outros dois procedimentos: digestão assistida por radiação micro-ondas e a preparação de uma micro-emulsão em n-propanol. Observou-se que resultados satisfatórios foram obtidos para ambas as formas de prepare de amostras, podendo-se destacar a diluição simples como estratégia efetiva para determinação de Si em combustível, permitindo realizar calibração externa com padrões inorgânicos com soluções aquosas. O MIP OES não demonstrou perda de desempenho instrumental, mesmo o plasma possuindo uma temperatura mais baixa e sofrendo a introdução de uma micro-emulsão.

NIEDZIELSKIA et al. (2015) utilizaram o MIP OES para determinar Ag, Al, B, Ba, Bi, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Ga, Na, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Sr, Tl e Zn em amostras geológicas. Utilizaram três procedimentos experimentais: digestão da amostra com a utilização de ácido fluorídrico para determinação do teor total de elementos, extração com água régia para determinação parcial e extração com ácido clorídrico para determinar os elementos em fração de lixiviação ácida. Os limites de detecção variaram entre 0,010-0,10 ou 1,2-12 mg kg⁻¹, para os micro e macroelementos, respectivamente, dependendo do preparo da amostra. As recuperações para os analitos determinados variaram entre 85-115%. A fim de comparar os resultados obtidos por MIP OES, os autores determinaram os analitos por fluorescência de raios-X (XRF) e espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) e concluíram que o uso do MIP OES foi adequado para a determinação dos analitos em questão.

LIMA, et al (2016) apresentaram um método rápido e eficiente para extração de metais em fertilizantes inorgânicos por meio da combinação de aquecimento e sonicação, empregando um banho ultra-sônico, sendo determinado Cd, Cu, Cr, Mn, Pb e Zn por MIP OES. A maior eficiência de extração dos metais foi alcançada usando 150 mg de fertilizante, 4 mL de HCl 50% (v/v) e 10 min de sonicação com aquecimento a 85 °C, sendo os resultados comparáveis ao método oficial (BRASIL, 2016).

LIMA e colaboradores (2015) realizaram extração de Hg em fertilizantes inorgânicos, utilizando ultrassom, sendo a determinação realizada por espectrometria de absorção atômica com vapor frio (CV-ASS) e MIP OES, com o emprego de 10 % (m/v) de SnCl₂ como agente redutor. Sistema de introdução de amostras multi-modo (MSIS) foi acoplado ao equipamento de MIP OES para tornar possível a geração de vapor de mercúrio. O procedimento otimizado utilizou 150 mg de fertilizante e 4 mL de HCl 30% (v/v) em banho de ultrassom convencional durante 5 min. Os resultados obtidos para o MIP OES e CV-AAS foram comparáveis, no entanto o MIP OES apresentou melhores limites de detecção.

GONÇALVES et al. (2016) empregaram a adição de padrão sequencial (SDA) para determinar Al, Co, Cr, Cu, Mn, Ni e Zn por MIP OES em amostras de café, chá, bebida energética, cerveja, whisky e cachaça. Nesse trabalho, as amostras foram diluídas em HNO₃ 1% (v v⁻¹). O método SDA combinado com a quantificação dos elementos por MIP OES foi efetivo e aumentou a exatidão das análises, além ser menos laborioso.

O arranjo instrumental de um MIP OES é bem semelhante ao de um ICP OES. Consiste em três componentes principais: uma fonte de excitação acoplada com sistema de introdução de amostras e um sistema de alimentação do gás do plasma; um espectrômetro e um sistema eletrônico de processamento de sinal e de aquisição de dados e controle do instrumento, como demonstrado na FIGURA 2.2.

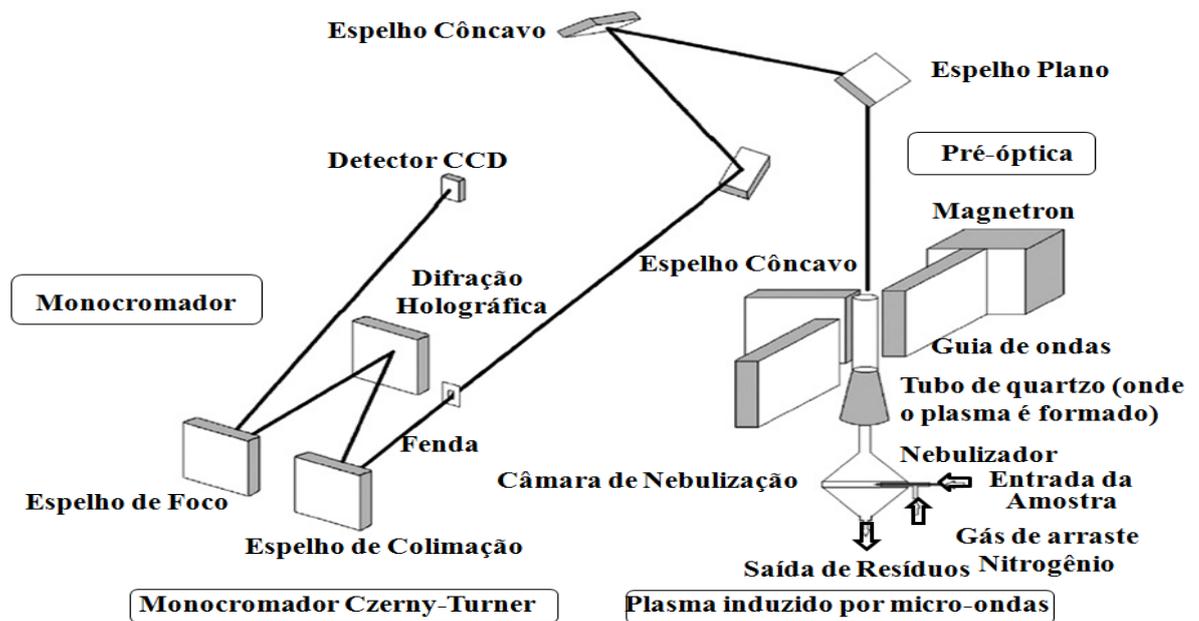


Figura 2.2– Diagrama esquemático do espectrômetro MIP OES. FONTE: NIEDZIELSKI et al., (2015).

A fonte de excitação do MIP OES consiste em um gerador de potência de micro-ondas, um dispositivo de acoplamento para transferir a potência do gerador para a carga, um regulador de potência e da cavidade de micro-ondas, geralmente magnetrons que possuem a alta frequência necessária. A caixa de ressonância é uma estrutura para focar a energia das micro-ondas no interior do tubo de descarga, como uma onda estacionária, assegurando a máxima utilização de energia e evitando a emissão de radiação para o ambiente.

O sistema de introdução de amostra tem como função levar uma fração dos analitos até o plasma em condições que tanto a estabilidade quanto a geração do sinal na fonte de excitação são as mais adequadas. Normalmente os sistemas de introdução de amostras do MIP OES são construídos para a análise de amostras líquidas (soluções), mas também é possível a utilização de técnicas de amostragem de gases ou sólidos. O sistema de introdução de amostra consiste em uma bomba peristáltica, que levará a solução até o nebulizador, local em que ocorrerá a conversão do líquido em aerossol. As finas gotículas do aerossol são

separadas numa câmara de nebulização e introduzidas por meio de um gás de arraste diretamente para a região do plasma.

A radiação emitida pela fonte do MIP é normalmente recolhida por uma lente convexa ou um espelho côncavo. Nesse enfoque, em seguida concentra-se a imagem do plasma sobre a fenda de entrada do dispositivo de dispersão de comprimento de onda do espectrômetro.

Três diferentes tipos de detectores são predominantemente utilizados nos espectrômetros ópticos de emissão: foto-emissiva (tubos fotomultiplicadores, PMT), fotocondutor (agrupamentos de fotodiodos PDAs) e de armazenamento, “fotocarga” (dispositivos carga-injeção) CTDs, incluindo dispositivos de carga acoplada (CCDs) e dispositivos de taxa de injeção (CIDs). Os CCDs oferecem a flexibilidade na seleção de comprimento de onda e a possibilidade da utilização de várias linhas (comprimentos de onda) para o mesmo elemento, a fim de alargar a faixa dinâmica linear e o potencial para a análise qualitativa, incluindo algumas melhorias na identificação de interferências espectrais (JANKOWSHI e RESZKE, 2011).

No MIP OES, outra característica que é importante enfatizar é o posicionamento da tocha; nessa versão comercial, a tocha é posicionada verticalmente para garantir maior robustez ao plasma, embora o modo de visão seja axial, permitindo que as medidas sejam mais sensíveis e que os limites de detecção obtidos sejam menores.

Objetivos

3 - OBJETIVOS

3.1 - Objetivo geral

Avaliar a influência da dieta contendo ração suplementada com erva-mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hilaire) sobre a concentração dos íons Ca, Cu, Fe, K, Mg e Zn no sangue e carne de bovinos.

3.2 - Objetivos específicos

- ✓ Desenvolver procedimentos visando o preparo de amostras de ração, carne e sangue de bovinos para a determinação de Ca, Cu, Fe, K, Mg e Zn em técnicas analíticas de emissão com plasma (MIP OES e ICP OES);
- ✓ Otimizar e avaliar os parâmetros instrumentais do MIP OES visando obter melhores respostas na quantificação dos analitos;
- ✓ Avaliar se há alteração na concentração dos íons metálicos de interesse em sangue e carne de bovinos que ingeriram ração suplementada com erva-mate.

Materiais e métodos

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Instrumentação

As amostras de ração, músculo, sangue e fígado foram liofilizadas em um liofilizador (Liobrás, L108-LIOTOP, São Carlos, Brasil). As amostras foram moídas em moinho criogênico. O músculo e o fígado em moinho IKA (modelo A11 basic, EUA) e a ração foi moída em moinho Marconi (modelo MA 775, Piracicaba SP, Brasil), ambos empregando nitrogênio líquido.

Para o preparo das amostras de sangue, músculo e ração, foi utilizado forno com radiação micro-ondas com cavidade (Ethos 1, Milestone, Sorisole, Itália) contendo rotores de 10 e de 41 frascos de TFM[®], esse último utilizado na decomposição das amostras de fígado.

Para a pesagem das amostras foi utilizada balança analítica com precisão 10^{-4} g (Mettler, AE200, Suíça).

A determinação da concentração dos elementos nas matrizes sangue e ração foi realizada por ICP OES (iCAP 6500 Duo, Thermo Scientific, China) e no fígado e músculo por MIP OES (4200, Agilent, Austrália), cujos parâmetros operacionais são descritos nas Tabelas 5.3 e 5.8.

4.2 - Reagentes e soluções

Reagentes de grau analítico e água deionizada a $18\text{M}\Omega$ cm em sistema Milli-Q[®] (Millipore) foram empregados para o preparo das soluções.

Ácido nítrico (Merk, Darmstadt, Alemanha) purificado a partir de um sistema de destilação ácida que ocorre abaixo do ponto de ebulição (Milestone) e peróxido de hidrogênio (Synth, Diadema, SP, Brasil) 30% m m^{-1} foram usados na digestão das amostras.

As soluções utilizadas para a construção da curva analítica foram preparadas a partir da diluição de soluções padrão comerciais de 1000 mg L⁻¹ de Ca, Cu, Fe, K, Mg e Zn 1000 mg L⁻¹ (Quemis, Santa Catarina, Brasil).

O extrato de mate (*Ilex Paraguariensis*. Saint-Hillaire) utilizado na suplementação animal foi grau farmacêutico, isto é, com alto nível de pureza (segundo a ANVISA, 98 %), fornecido pela empresa Centroflora (Botucatu, SP, Brasil).

4.3 - Amostras

As amostras utilizadas no desenvolvimento desse trabalho são provenientes de um projeto desenvolvido em colaboração entre o Instituto de Química de São Carlos, a Universidade de São Paulo, a Embrapa, e a Universidade da Dinamarca “Better meat for healthier living”, financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Foram fornecidas pelo Laboratório de Qualidade de Carnes (LQC) da Embrapa Pecuária Sudeste, coletadas por técnicos seguindo normas (para alimentação, coleta de amostras de sangue, rumem e abate) já estabelecidas e aprovadas pelo comitê de ética animal da Embrapa Pecuária Sudeste.

Para avaliar a exatidão do método desenvolvido, foram utilizados os materiais de referência certificados CRM NIST 1577b (Bovine Liver, NIST, National Institute of Standards and Technology, EUA) e 1515 (Apple Leaves, NIST, EUA).

Procedimento Experimental

5 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

5.1 - Dados e requisitos para abate

Sessenta bovinos nelore, machos castrados, nascidos entre setembro de 2011 e janeiro de 2012, foram divididos em quatro lotes que foram tratados com diferentes porcentagens de extrato de erva-mate, sendo um deles obrigatoriamente zero (controle) e confinados, a partir de julho de 2013, em baias individuais. O peso vivo dos animais foi obtido a cada 28 dias, sem jejum e ao início e antes do abate, com jejum prévio de 16 h de alimentos. A duração do período de confinamento de cada animal foi variável, de forma a permitir acabamento de carcaça semelhante. Os animais confinados foram escolhidos para abate com base nas imagens de ultrassonografia com valor acima de 5 mm de espessura de gordura externa, utilizando-se para isso aparelho Aquila, marca PieMedical, com sonda específica para a obtenção de imagens (na região do contrafilé, entre a 12^a e a 13^a costelas), para as medidas da espessura de gordura externa e da área do olho de lombo isto é, três quartos do comprimento para o lado do osso da vértebra e comparação com avaliações visuais do acabamento de carcaça.

5.2 - Alimentação - ração

A dieta dos animais foi formulada contendo 13,1% de proteína bruta e 71,0% de nutrientes digestíveis totais, constituída de 60,0% de silagem de milho, 22,8% de milho em grão moído, 8,0% de farelo de soja, 7,0% de farelo de trigo, 0,5% de uréia, 0,7% de calcário calcítico, 1% de mistura mineral e 0,03% de monensina sódica, na base seca, acrescido de níveis de extrato de erva-mate equivalentes a 0,0; 0,5; 1,0 e 1,5%, definidos após o teste in vitro. A

ração dos animais foi preparada em batelada de 1000 kg, conforme procedimento padrão da Embrapa Pecuária Sudeste (Tabela 5.1).

TABELA 5. 1 - Composição básica da ração oferecida aos animais participantes do estudo.

Componente	Massa (kg)
Grão de milho moído	876
Farelo de soja	68
Bicarbonato	16
Núcleo mineral	24
Ureia	16
Monensina	0,3

Para a adição do mate, a ração (Figura 5.1A) de cada animal era pesada, adicionada aos cochos (Figura 5.1 B) e a quantidade de mate relativa a cada tratamento era adicionada diretamente no cocho (Figura 5.1 C e D). Somente após o mate ser misturado à ração (Figura 5.1 E), era permitido ao animal se alimentar, cada um em sua baia (Figura 5.1 F). A dieta foi fornecida diariamente, em duas refeições, uma pela manhã e outra à tarde, ajustando as sobras para 5 a 10% do oferecido, permitindo consumo *ad libitum*.

A ração foi coletada em quatro diferentes dias e períodos: 2 vezes pela manhã e 2 à tarde. Para a coleta, utilizou-se béquer de 250 mL de plástico. As rações foram coletadas logo após serem postas no cocho e o extrato de mate ser misturado. Foram coletadas amostras de ração dos 4 tratamentos (0; 0,5, 1,0 e 1,5% [$m\ m^{-1}$] de extrato de mate) e acondicionadas em sacos de papel pardo (um para cada tratamento). A homogeneização da ração foi feita com agitação manual dos sacos por período de 10 a 15 min. Logo após, uma alíquota de 100 g de cada amostra foi pesada e liofilizada. As amostras moídas foram acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em freezer biológico ($- 80\ ^\circ C$) até necessidade de uso.



Figura 5.1- A) Ração que o gado foi alimentado; B) A ração sendo colocada no cocho dos animais; C) A erva-mate sendo adicionada na ração; D) A ração com a adição da erva-mate E) A erva-mate sendo homogeneizada na ração E) As divisões das baias onde os animais se alimentavam.

5.3 - Coleta de amostras

5.3.1 - Coleta no abate: sangue, músculo e fígado

O abate deu-se com 90 dias após o início do tratamento com extrato de mate. Os animais foram selecionados com base na espessura da gordura externa. Somente animais com valor acima de 5 mm de espessura foram abatidos. Antes do abate, os animais ficaram em jejum de alimento por 16 h. O abate deu-se no frigorífico Fribordogue, na cidade de Bariri/SP. Foram coletados sangue, músculo e fígado.

A coleta do sangue foi realizada no momento da sangria. Devido ao grande volume e fluxo de sangue, utilizou-se 4 tubos tipo Falcon de 50 mL para facilitar a coleta. Os tubos identificados foram colocados em recipiente com gelo. No entanto, devido às condições no momento da coleta, não foi possível centrifugar o sangue imediatamente e, portanto, houve coagulação, não sendo possível separar as fases (soro e células).

As outras matrizes (músculo e fígado) coletadas imediatamente após o abate foram transferidas para sacos de polietileno, etiquetadas e colocadas em recipiente com gelo. O músculo (*Longissimus dorsi*) foi coletado em sua integridade. O fígado foi cortado entre 8 e 10 cm a partir da parte mais delgada.

No retorno ao laboratório em São Carlos, os tubos com sangue foram armazenados em freezer biológico até momento de uso. O músculo foi cortado em pedaços de cerca de 1 cm de espessura. Cada pedaço foi colocado em embalagem de polietileno (especial para vácuo) e a seguir o ar foi retirado em equipamento para vácuo e selado. A seguir as embalagens foram armazenadas a -80 °C. As amostras de fígados inteiros também foram embaladas a vácuo e armazenadas a -80 °C.

As amostras de músculo e fígado foram cortadas com facas de cerâmica, liofilizadas e moídas em moinho criogênico. As demais amostras, como a ração também foram moídas em moinho criogênico e as amostras de sangue foram liofilizadas. Em seguida foram armazenadas a vácuo em sacos plásticos e novamente estocadas em freezer a -80°C .

5.4 - Digestão das amostras assistidas por radiação micro-ondas

As amostras de ração (0; 0,5;1,0 e 1,5 % de extrato de mate) previamente moídas no moinho criogênico, do extrato da erva-mate e do material de referência certificado 1515, utilizado para avaliar a exatidão do método, foram digeridas em triplicata, em forno micro-ondas com sistema fechado em rotor de 10 frascos. Foram utilizados 250 mg de amostra, 1,5 mL de HNO_3 (14 mol L^{-1}), 2,0 mL de H_2O_2 30% (m m^{-1}) e 4,5 mL de água deionizada. O programa de aquecimento empregado está descrito na Tabela 5.2. Após o término da digestão, os digeridos foram transferidos para tubos de polietileno e o volume final foi completado para 15 mL com água ultra-purificada. Na Tabela 5.3 são apresentados os parâmetros operacionais empregados na análise por ICP OES com visões axial e radial para determinação de Ca, Cu, Fe, K, Mg e Zn nas amostras de ração e de CRMs utilizados para o estudo.

TABELA 5.2 – Programa de aquecimento empregado na digestão ácida assistida por radiação micro-ondas para as amostras de ração.

Tempo (min)	Potência(W)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
15	1300	120
35	1500	180
20	1500	180

TABELA 5. 3 – Parâmetros operacionais empregados na determinação de Ca, Cu, Fe, K, Mg e Zn por ICP OES.

Características	Parâmetros
Sistema Óptico	Echelle
Modo de visão	Axial/ Radial
Potência de radio frequência	1,55 kW
Vazão do gás do plasma	12
Vazão do gás auxiliar	0,5 L min ⁻¹
Vazão do gás nebulização	0,7 L min ⁻¹
Nebulizador	Concêntrico
Câmera de nebulização	Ciclônica
Altura de observação	8 mm
Comprimento de Onda (nm)	Ca - 317,9 (Axial)
	Fe - 238,2 (Radial)
	K - 404,4(Axial)
	Mg - 285,2(Radial)
	Cu - 224,7 (Radial)
	Zn - 202,5(Radial)

Para as amostras de sangue (liofilizadas) foram realizadas as digestões das amostras em triplicatas, em forno com radiação micro-ondas e rotor 10 frascos. Foram utilizados 300 mg de amostra, 3,0 mL de HNO₃ (14 mol L⁻¹), 2,0 mL de H₂O₂ 30% (m m⁻¹) e 3 mL de água deionizada. O programa de aquecimento empregado está descrito na Tabela 5.4. Após o final das digestões, os digeridos foram transferidos para tubos de polietileno e o volume final completado para 15 mL.

Para verificar a exatidão do método, devido à ausência de material de referência certificado, foram realizados experimentos de adição e recuperação em três níveis, 50, 100 e 150 % do valor da concentração dos elementos na amostra. A faixa de concentração dos analitos adicionados foi baseada nos valores da literatura. Na Tabela 5.5 são apresentados os comprimentos de onda empregados na determinação de Ca Cu, Fe, K, Mg e Zn por ICP OES nas amostras de sangue. Os demais parâmetros são os mesmos descritos na Tabela 5.3.

TABELA 5.4 – Programa de aquecimento empregado na digestão ácida assistida por radiação micro-ondas para as amostras de sangue.

Tempo (min)	Potência(W)	Temperatura (°C)
15	1300	120
10	1300	200
10	1300	200
15	1300	120

TABELA 5.5 – Comprimentos de onda empregados para análise por ICP OES.

Elementos	Comprimento de Onda (nm)
Ca	317,9*
Fe	238,2**
K	766,4*
Mg	280,2*
Cu	324,7*
Zn	202,5*

*Visão radial; **Visão axial

Para a decomposição foram feitas triplicatas das 48 amostras de fígado moídas e liofilizadas, referentes aos diferentes tratamentos com mate (0; 0,5; 1,0 e 1,5 % adicionados à ração). Para as amostras de músculo, a decomposição foi realizada após as amostras serem agrupadas em grupos de 12 animais referentes a cada tratamento com o mate, totalizando 4 amostras. As decomposições foram feitas em triplicata.

O material de referência “bovine liver” (NIST 1577b) foi utilizado para verificar a exatidão do método. A decomposição foi realizada em forno de radiação micro-ondas com rotor de 41 frascos. Foram utilizados 0,100 g de amostra, 2,0 mL de HNO₃ (14 mol L⁻¹), 2,0 mL de H₂O₂ 30% (m m⁻¹) e 6,0 mL de água deionizada. O programa de aquecimento utilizado pode ser observado na Tabela 5.6. Após o término das digestões, os digeridos foram transferidos para tubos de polietileno e o volume final foi completado para 20 mL.

TABELA 5.6 – Programa de aquecimento empregado na digestão ácida assistida por radiação micro-ondas para as amostras de fígado e músculo bovino.

Tempo (min)	Potência(W)	Temperatura (°C)
10	1300	120
15	1500	170
35	1500	170

Para um estudo envolvendo as técnicas ICP OES e MIP OES, os digeridos dos CRMs foram analisados por ICP OES e também por MIP OES. Após a otimização dos comprimentos de onda do MIP OES, as determinações nas amostras de fígado e músculo foram realizadas. Os parâmetros utilizados para a leitura no ICP OES estão representados na tabela 5.7, os demais parâmetros foram os mesmos apresentados na Tabela 5.3 Os parâmetros operacionais utilizados para a determinação por MIP OES estão apresentados na Tabela 5.8.

TABELA 5.7 – Comprimentos de onda empregados para análise por ICP OES.

Elementos	Comprimento de Onda (nm)
Ca	422,6**
Fe	259,9**
K	769,8*
Mg	279,5**
Cu	324,7*
Zn	213,8*

*Visão radial; **Visão axial

TABELA 5.8 – Parâmetros empregados para análise por MIP OES.

Parâmetros	Elementos/ Valores					
	Ca	Fe	K	Mg	Cu	Zn
Comprimento de onda (nm)	422,67	259,94	769,89	279,55	324,75	213,85
Tempo de leitura (s)	3					
Posição de visualização	0	10	20	10	0	10
Nebulizador	OneNeb					
Fluxo do gás de Nebulização (L/min)	0,95	0,55	1	0,5	0,7	0,5
Velocidade da bomba (rpm)	15					
Número de réplicas	3					
Correção de fundo	Auto					
Tempo de absorção (s)	15					
Tempo de estabilização (s)	15					
Gás de arraste	Nitrogênio					

5.5 - Determinação do LOD e do LOQ

Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram determinados utilizando o sinal da concentração equivalente ao sinal de fundo (BEC) e o desvio padrão relativo (RSD). Assim, as equações a seguir indicam como os LODs e os LOQs foram calculados:

$$BEC = \frac{C_{sr}}{SBR}$$

$$SBR = \frac{I_{SR} - I_{branco}}{I_{branco}}$$

$$LOD = \frac{3 \times BEC \times RSD}{100}$$

$$LOQ = \frac{10 \times BEC \times RSD}{100}$$

SBR= Razão sinal analítico/sinal de fundo

RSD= Desvios padrão relativo

C_{sr} = Concentração da solução de referência

I_{sr} = Intensidade do sinal para a solução de referência

I_{branco} = Intensidade do sinal para o branco

LOD= Limite de detecção

LOQ = Limite de quantificação

5.6 - Análise estatística

Os resultados obtidos no trabalho foram tratados empregando planilhas do Excel com o suplemento MultiBase2015, Origin 9.0 e o software SAS University Edition .

Foi utilizada análise de componentes principais (PCAs) para julgar as variáveis originais com maior peso (*loadings*) na combinação linear dos primeiros componentes principais que são as mais importantes.

Resultados e Discussão

6 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 - Efeito da adição da erva-mate na ração

Visando estabelecer as condições instrumentais mais adequadas e avaliar a exatidão do método utilizado para a determinação de Ca, Cu, Fe, K, Mg e Zn nas amostras de ração e erva-mate, o procedimento de preparo de amostras e determinação por ICP OES foi primeiramente aplicado ao material de referência certificado “Apple Leaves” (NIST CRM 1515). Foram avaliadas três linhas de emissão no ICP OES para cada analito, além da orientação da tocha (radial ou axial), sendo estabelecidas as condições que apresentaram as melhores exatidões pelo CRM. A faixa linear utilizada foi de 0,05-5,0 mg L⁻¹ para o Cu, Fe e Zn e de 2-80 mg L⁻¹ para K, Mg e Ca. Os limites de detecção e quantificação, BEC e os coeficientes de determinação (R²) são apresentados na Tabela 6.1, sendo os valores obtidos considerados adequados para o método aplicado em relação à faixa de concentração dos analitos nas amostras. Na Tabela 6.2 são apresentados os resultados obtidos a partir do método desenvolvido, que se apresentaram estatisticamente semelhantes em relação aos valores certificados, após aplicação do teste *t* não pareado (Student), a um nível de confiança de 95 %.

TABELA 6.1 – Figuras de mérito obtidas para a determinação de Ca, Cu, Fe, K, Mg e Zn por ICP OES presentes nas amostras de ração, erva-mate e no CRM NIST 1515, (n=3).

Elementos	λ (nm)	R ²	BEC (mg L ⁻¹)	LOD (mg kg ⁻¹)	LOQ (mg kg ⁻¹)
Ca	317,9**	0,999	0,10	1,2	3,0
Cu	224,7*	0,999	0,002	0,18	0,54
Fe	238,2*	0,999	0,04	0,12	0,36
K	440,4**	0,997	2,3	36,0	126,0
Mg	285,2*	0,999	0,1	3,0	12,0
Zn	202,5*	0,993	0,009	0,6	1,8

*Visão radial; **Visão axial.

TABELA 6.2 – Valores certificados (média \pm desvio-padrão, n = 3), determinados e porcentagem de recuperação para o CRM NIST 1515, determinados por ICP OES.

Analito	Valor Certificado	Valor Determinado	Unidade	Recuperação (%)
Ca	1,526 \pm 0,015	1,697 \pm 0,122	%	111
Cu	5,64 \pm 0,24	5,9 \pm 0,10	mg kg ⁻¹	104
Fe	83 \pm 5	74 \pm 4	mg kg ⁻¹	89
K	1,61 \pm 0,02	1,58 \pm 0,13	%	98
Mg	0,271 \pm 0,008	0,275 \pm 0,003	%	101
Zn	12,5 \pm 0,3	13,1 \pm 0,1	mg kg ⁻¹	104

Após verificada a exatidão, o método foi aplicado na determinação dos analitos nas amostras de extrato de erva-mate (grau farmacêutico) e de ração. Foram analisadas as amostras de ração fornecidas aos animais, que continham 0% (testemunha), 0,5; 1,0; e 1,5 % de erva-mate. Os resultados obtidos para a amostra de erva-mate são apresentados na Tabela 6.3 e para as amostras de ração são apresentados na Tabela 6.4 e na Figura 6.1.

TABELA 6.3 – Concentração (média \pm desvio-padrão, n = 3) de Ca, Cu, Fe, K, Mg e Zn presentes no extrato da erva-mate.

Elementos	Concentrações (mg kg ⁻¹)
Ca	9582,70 \pm 195,68
Cu	1,35 \pm 0,02
Fe	87,28 \pm 0,92
K	13244,27 \pm 633,01
Mg	16594,79 \pm 373,9
Zn	92,05 \pm 0,80

Por meio da Tabela 6.3, observou-se a presença na amostra de erva-mate dos macrominerais (Ca, Mg e K) e dos microminerais (Cu, Fe e Zn), considerados elementos essenciais para nutrição animal. Dessa forma, além da atividade antioxidante, pode-se considerar a erva-mate como fonte alternativa de suplementação mineral.

Paralelo a esses experimentos, foi desenvolvido um estudo de interação de polifenóis do mate (*Ilex paraguariensis*) com Ca, Cu, Co, Fe, Mg e Zn e (metalo) proteínas. O método desenvolvido foi aplicado para as mesmas amostras de ração utilizadas no presente projeto. A extração das espécies foi efetuada com solução de isopropanol contendo 2% de ácido tricloroacético e as determinações em UHPLC-HRMS (Ultra High Performance Liquid Chromatography - High Resolution MS). Foram determinados os polifenóis cumárico, chiquimico, cafeíco, quínico, ácidos clorogênicos e dicaffeoilquínico. Os resultados indicaram que na amostra de ração utilizada como testemunha (sem adição da erva-mate) não foi possível a determinação dos polifenóis, pois as concentrações estão abaixo dos limites de detecção. Por outro lado, nas amostras com adições crescentes de erva-mate foi possível observar perfil crescente dos valores dos polifenóis avaliados (com exceção do cumárico), sendo confirmado que adição crescente de erva-mate na ração implica na adição de maior quantidade de polifenóis na dieta (CATAI, 2015).

De forma similar ao observado para os polifenóis, foi avaliado o efeito da adição de teores crescentes de erva-mate na ração em relação aos minerais aqui estudados, Ca, Cu, Fe, K, Mg e Zn, sendo os resultados apresentados na Tabela 6.4 e na Figura 6.1.

Diferentemente do que foi observado em relação ao comportamento dos polifenóis, com exceção para K e Mg, não foi observado comportamento linear quando comparados os teores dos demais minerais avaliados e da quantidade de erva-mate adicionada (Tabela 6.4). Para Ca e Cu valores mais elevados foram obtidos na amostra cuja adição de erva-mate foi de 0,5%, enquanto que para o Fe, o maior valor encontrado foi no grupo de 1,0% e para o Zn o maior valor prevaleceu no grupo controle (0% de adição). No entanto, de maneira geral, os valores se apresentam na mesma ordem de grandeza (Tabela 6.4 e Figura 6.1), provavelmente devido à elevada presença desses minerais nos constituintes da ração. Além disso, podem ter ocorrido problemas em relação à homogeneidade da mistura e consequente amostragem, em função da diferença entre o tamanho das partículas da erva-mate e da ração (em grãos).

TABELA 6.4 – Concentração de Ca, Cu, Fe, K, Mg e Zn (média \pm desvio-padrão, n = 3) determinados nas amostras de ração (0%) e com a adição de erva-mate (0,5; 1,0 e 1,5%).

Elementos	Concentrações (mg kg ⁻¹)			
	0%	0,5 %	1,0 %	1,5 %
Ca	3547,10 \pm 45,78	3994,15 \pm 80,70	3658,45 \pm 42,00	3028,68 \pm 136,10
Cu	18,16 \pm 0,02	18,67 \pm 0,13	17,49 \pm 0,22	17,51 \pm 0,16
Fe	515,05 \pm 10,07	497,67 \pm 17,23	544,55 \pm 2,46	520,78 \pm 11,83
K	6135,86 \pm 141,45	6898,90 \pm 193,59	6429,46 \pm 153,19	7769,02 \pm 74,24
Mg	1477,51 \pm 8,15	1658,12 \pm 33,82	1636,48 \pm 16,48	1863,87 \pm 24,89
Zn	69,31 \pm 0,23	67,89 \pm 0,64	61,99 \pm 0,49	65,15 \pm 0,58

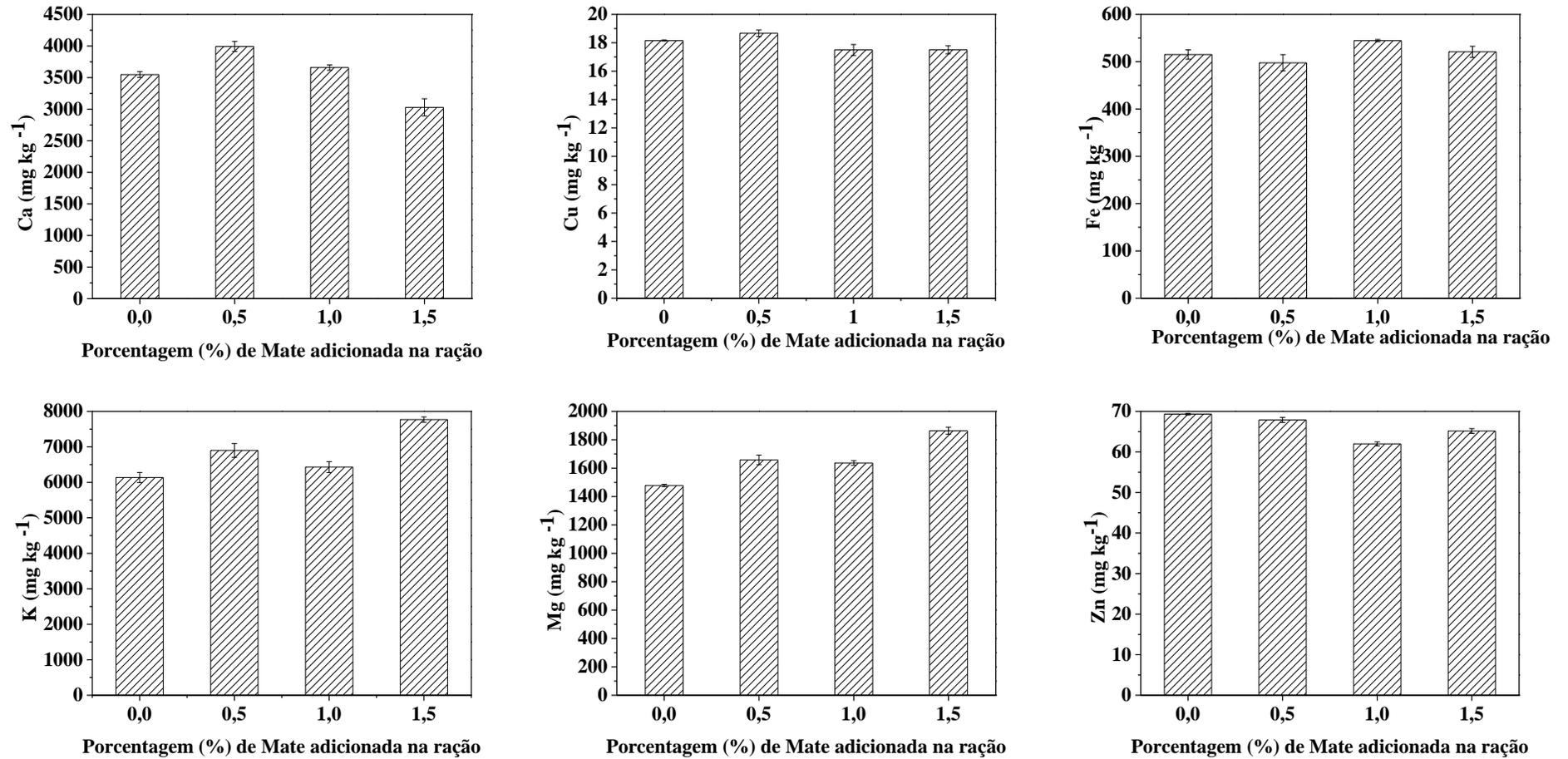


Figura 6.1– Efeito das diferentes quantidade de erva-mate adicionadas à ração nos teores obtidos de Ca, Cu, Fe, K, Mg e Zn (mg kg⁻¹).

Para verificar se houve diferença estatística entre os resultados obtidos nas amostras de ração foi aplicada a análise de variância ANOVA de fator único, sendo comparados os valores do $F_{\text{crítico}}$ (F_c) em relação ao valor do $F_{\text{analítico}}$ (F) para cada elemento. Os resultados obtidos para Ca, Mg, K, Cu e Zn apresentaram variação estatisticamente significativa entre os valores encontrados para as médias quando comparados entre os grupos, conforme pode ser observado na Tabela 6.5. Os resultados obtidos para o Fe não se mostraram estatisticamente diferentes.

TABELA 6.5 – Estatística da ANOVA para os valores médios das concentrações dos elementos em estudo nas amostras de ração.

Variáveis	Fonte de Variação	Graus de liberdade	Média Quadrática	F	F_c^a
Ca	Entre	3	480611,5	22,17806	4,066181
	Dentro	8	21670,59		
Cu	Entre	3	0,959027	13,75513	4,066181
	Dentro	8	0,069721		
Fe	Entre	3	1125,498	2,757112	4,066181
	Dentro	8	408,2163		
K	Entre	3	1526886	23,5334	4,066181
	Dentro	8	64881,66		
Mg	Entre	3	75418	47,85604	4,066181
	Dentro	8	1575,935		
Zn	Entre	3	31,23231	39,78867	4,066181
	Dentro	8	0,784955		

F_c^a para $\alpha=0,05$

6.2 - Avaliação do efeito da adição da erva-mate na ração, estudo no sangue dos bovinos

Para a avaliação da exatidão do método desenvolvido para determinação Ca, Cu, Fe, K, Mg e Zn nas amostras de sangue, foram realizados experimentos de adição e recuperação dos elementos em três níveis. Os valores adicionados foram equivalentes a 50, 100 e 150 % dos valores observados na literatura para Ca, Cu, Fe, K, Mg e Zn em amostras de sangue bovino.

Os analitos foram adicionados a uma amostra de sangue previamente liofilizada, nos três níveis mencionados e, em seguida, foi realizada a digestão de acordo com o descrito no item materiais e métodos. Após as digestões e diluição dos digeridos, foram escolhidas três linhas de emissão no ICP OES para cada elemento, além da orientação da tocha (radial e axial). Considerando as recuperações obtidas pelo experimento de adição e recuperação (que variaram entre 80 e 120%), foram escolhidas as linhas de emissão e, a partir daí, calculados os limites de detecção e quantificação. Na Tabela 6.6 são apresentadas as figuras de mérito para a determinação das concentrações de Ca, Cu, Fe, K, Mg e Zn nas amostras de sangue, incluindo o comprimento de onda escolhido, a linearidade e os limites de determinação e quantificação. A faixa linear utilizada foi de 2-60 mg L⁻¹ para K, Fe e Ca e de 0,1-3,0 mg L⁻¹ para o Cu, Mg e Zn. Na Tabela 6.7 podem ser observadas as recuperações, que variaram de 97 a 119%, para cada analito, nos diferentes níveis estudados.

TABELA 6.6 – Figuras de mérito obtidas para a determinação de Ca, Cu, Fe, K, Mg e Zn presentes nas amostras de sangue analisados por ICP OES (n=3).

Analito	λ (nm)	R²	BEC	LOD (mg kg⁻¹)	LOQ (mg kg⁻¹)
Ca	317,9*	0,999	0,011	0,05	0,25
Cu	324,7*	1,000	0,039	0,15	0,50
Fe	238,2**	0,996	0,050	0,4	1,4
K	766,4*	1,000	1,933	2,45	8,20
Mg	280,2*	1,000	0,722	12,25	40,9
Zn	202,5*	0,999	0,038	0,20	0,65

*Visão radial; ** Visão axial

TABELA 6.7 - Recuperações (%) obtidas para Ca, Cu, Fe, K, Mg e Zn a partir de experimentos de adição e recuperação realizados na amostra de sangue em três níveis (n=3).

Analito	% de Recuperação nas amostras		
	Nível 1	Nível 2	Nível 3
Ca	118,3	97,1	105,4
Cu	106,5	97,7	97,4
Fe	110,1	97,0	96,9
K	110,6	99,2	96,5
Mg	118,9	108,1	114,1
Zn	107,0	98,2	102,2

Após o estabelecimento das condições instrumentais e de preparo para as amostras de sangue o método foi aplicado para as amostras de sangue dos animais em estudo. As amostras foram agrupadas em função dos tratamentos (animais que receberam a ração testemunha – sem adição de erva-mate e dos animais que receberam 0,5; 1,0; e 1,5 % de erva-mate adicionada na ração). Os resultados estão apresentados na Tabela 6.8.

TABELA 6.8 – Concentração de Ca, Cu, Fe, K, Mg e Zn (média \pm desvio-padrão, n = 3) nas amostras de sangue dos animais alimentados com diferentes quantidades de erva-mate adicionadas à ração.

Elementos	Concentrações (mg kg ⁻¹)			
	0%	0,5 %	1,0 %	1,5%
Ca	241,1 \pm 6,6	248,7 \pm 4,0	253,2 \pm 9,7	267,1 \pm 7,5
Cu	1,6 \pm 0,3	1,30 \pm 0,01	1,2 \pm 0,1	1,5 \pm 0,1
Fe	2061,9 \pm 64,5	2244,3 \pm 11,6	2249,7 \pm 50,8	2279,1 \pm 31,6
K	1435,7 \pm 86,0	1442,3 \pm 31,4	1267,9 \pm 50,1	1289,6 \pm 24,0
Mg	84,8 \pm 2,4	94,4 \pm 1,1	88,3 \pm 2,9	100,4 \pm 5,1
Zn	11,5 \pm 0,16	16,9 \pm 0,1	13,2 \pm 0,9	15,2 \pm 1,0

Para verificar as diferenças estatísticas entre os resultados obtidos nas amostras de sangue foi aplicada a análise de variância ANOVA de fator único, sendo comparados os valores do $F_{\text{crítico}}$ (F_c) em relação ao valor do $F_{\text{analítico}}$ (F) para cada elemento. Com exceção do Cu, que não apresentou diferença estatística, foram observadas diferenças estatisticamente significativas para Ca, Mg, K, Fe e Zn, como demonstrado na Tabela 6.9.

TABELA 6.9 – Estatísticas da ANOVA para os valores médios das concentrações dos elementos em estudo no sangue dos animais e seus respectivos grupos.

Variáveis	Fonte de Variação	Graus de liberdade	Média Quadrática	F	F_c^a
Ca	Entre	3	413,0901	8,869075	4,066181
	Dentro	8	46,57646		
Cu	Entre	3	0,085907	2,781535	4,066181
	Dentro	8	0,030885		
Fe	Entre	3	29446,5	14,96728	4,066181
	Dentro	8	1967,392		
K	Entre	3	25947,38	9,044241	4,066181
	Dentro	8	2868,939		
Mg	Entre	3	141,8016	12,54411	4,066181
	Dentro	8	11,30424		
Zn	Entre	3	16,63518	32,73844	4,066181
	Dentro	8	0,508124		

F_c^a para $\alpha=0,05$

Para interpretação dos resultados apresentados nas Tabelas 6.8 e 6.9 referentes aos teores de Ca, Cu, Fe, Mg e Zn encontrados no sangue dos animais que receberam os diferentes tratamentos com erva-mate, deve ser considerado que antes da coleta do sangue, feita imediatamente após o abate, o animal permaneceu em jejum durante 24 h, podendo-se descartar a possibilidade de complexação dos metais com os polifenóis, que possivelmente foram metabolizados pela microflora presente no rumem, o que pode ser confirmado pelos resultados obtidos em relação à quantificação dos polifenóis feitos por CATAI (2015), que não detectou a presença dos polifenóis no sangue. Desta forma os resultados não se referem à complexação entre metais e polifenóis, não sendo essa a razão das variações observadas entre os teores dos elementos avaliados. Pode-se, no entanto, observar uma tendência entre os valores dos analitos e os tratamentos. Para Fe, Ca e Mg os maiores valores foram encontrados nas amostras provenientes dos animais que receberam em sua dieta 1,5% de erva-mate, para K e Zn os maiores valores foram encontrados nas amostras provenientes dos animais do grupo 0,5 % e para Cu o tratamento sem adição de erva-mate (0%) apresentou os maiores valores (porém nesse caso, não houve diferença estatística).

6.3 - Efeito da adição da erva-mate na ração, estudo no fígado e músculo bovino

6.3.1 - Comparação das técnicas ICP OES e MIP OES

Para avaliar a exatidão do método de determinação de Ca, Cu, Fe, K, Mg e Zn em amostras de músculo e fígado bovino, utilizou-se o CRM NIST 1577b e, partir dos resultados obtidos com essa amostra foram selecionados o comprimento de onda e a orientação da tocha, de acordo com a concordância dos valores certificados e determinados e das recuperações obtidas para as medidas realizadas em ICP OES e MIP OES. Na Tabela 6.10 são apresentadas

as figuras de mérito linearidade e limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ). Na Tabela 6.11 são apresentados os valores certificados e determinados para Ca, Cu, Fe, K, Mg e Zn, que se apresentaram estatisticamente semelhantes a um nível de confiança de 95 %, com a aplicação do teste *t* (Student) não pareado e dos resultados referentes às recuperações obtidas para cada analito. A faixa linear utilizada foi de 3-270 mg L⁻¹ para K, Mg e Ca e de 0,1-9,0 mg L⁻¹ para Cu, Fe e Zn. Após a definição das condições operacionais para ICP OES e MIP OES, os analitos foram determinados nas amostras em estudo. Os resultados entre as duas técnicas, com exceção do Fe, apresentaram-se concordantes entre si e com os valores certificados, a um nível de confiança de 95 % (teste *t* pareado).

O princípio das técnicas do MIP OES e do ICP OES é similar, como já mencionado na revisão bibliográfica. A maior diferença entre as técnicas é a temperatura do plasma; o plasma de argônio favorece a produção de um maior número de íons da espécie a ser analisada e no plasma de nitrogênio. Devido à menor temperatura, boa parte dos analitos é atomizada e apenas uma menor parcela é ionizada. Na Tabela 5.8 são apresentadas as linhas espectrais selecionadas para cada elemento, de acordo com suas sensibilidades. No entanto não foi possível escolher as mesmas linhas para os dois equipamentos, sendo selecionadas as linhas cujos resultados obtidos se mostraram mais próximos dos valores certificados para ambas as técnicas.

Alguns trabalhos na literatura reportam a determinação dos elementos aqui avaliados por MIP OES, sendo que as linhas espectrais empregadas são condizentes com as que foram selecionadas no presente trabalho. Como exemplo, Fe 259,940 nm; Zn 213,857 nm; e Cu 324,754 nm (HAMMER, 2008; LI et al., 2013); segundo HAMMER (2008), para o K a melhor linha seria 766,491 nm, sendo que nas condições aqui descritas foi selecionada uma linha próxima, 769,89 nm, mesma linha selecionada por NIEDZIELSKI e colaboradores (2015). Para a determinação de Ca,

MATUSIEWICZ e GOLIK (2004) utilizaram a linha 393,37 nm, semelhante à linha selecionada para a determinação de Ca por ICP OES. No entanto no presente trabalho a linha 422,673 apresentou resultados mais sensíveis. Deve ser ressaltado que MATUSIEWICZ e GOLIK utilizaram equipamento experimental, com plasma de argônio induzido por radiação micro-ondas, mais reativo que o plasma de nitrogênio, utilizado no presente trabalho e no trabalho desenvolvido por NIEDZIELSKI e colaboradores. Para o Mg, são citadas as linhas 383,829 nm (NIEDZIELSKI et al., 2015) e 285,21 nm (MATUSIEWICZ e GOLIK, 2004). A linha selecionada no presente trabalho foi 279,553 nm, próxima mas não as mesmas descritas anteriormente.

Os valores dos coeficientes de determinação (R^2), BEC, LOD e LOQ são apresentados na Tabela 6.10. Para ambas as técnicas, houve boa correlação entre os pontos da curva, sendo os valores de R^2 muito próximos a 1. Comparando os valores de LODs e LOQs, o ICP OES apresentou maior sensibilidade para os elementos Ca, Mg e K e para Fe, Cu e Zn, o MIP OES apresentou maior sensibilidade. Os resultados apresentam-se bastante promissores, considerando as amostras analisadas, uma vez que o Fe, Cu e Zn estão presentes como micronutrientes (em menores teores). Por meio da análise estatística (teste t), dos valores determinados para as concentrações dos elementos nos CRMs, dos LODs, dos LOQs e na comparação com a literatura, pode-se concluir que a técnica MIP OES apresentou boa exatidão para o método proposto e foi então aplicada para as amostras em estudo.

TABELA 6.10 - Figuras de mérito obtidas para a determinação de Ca, Cu, Fe, K, Mg e Zn por ICP OES e MIP OES.

Analitos	ICP OES				MIP OES			
	R ²	BEC	LOD (mg kg ⁻¹)	LOQ (mg kg ⁻¹)	R ²	BEC	LOD (mg kg ⁻¹)	LOQ (mg kg ⁻¹)
Ca	0,999	0,1061	1,6	5,0	0,998	0,391	8,4	28,0
Cu	1,0	0,0348	5,2	17,2	0,999	0,001	0,2	0,8
Fe	0,999	0,078	20,2	67,0	0,999	0,047	1,8	6,0
Mg	0,995	0,014	0,4	1,6	0,999	0,004	0,6	1,8
K	1,0	2,100	0,4	1,2	0,998	0,08	15,8	52,6
Zn	1,0	0,018	0,4	1,4	0,997	0,001	0,2	1,0

TABELA 6.11- Valores certificados, determinados (média ± desvio-padrão, n = 3) e recuperações obtidos para o CRM NIST 1577 b por ICP OES e MIP OES.

Analito	Valor Certificado	Unidade	ICP OES		MIP OES	
			Valor Encontrado	Recuperação (%)	Valor Encontrado	Recuperação (%)
Ca	116 ± 4	mg kg ⁻¹	113,3 ± 10,6	97,7	109,2 ± 6,2	94,2
Cu	160 ± 8	mg kg ⁻¹	146,7 ± 2,6	91,7	158,8 ± 3,0	99,2
Fe	184 ± 15	mg kg ⁻¹	172,5 ± 4,8	93,8	184,3 ± 4,2	100,1
K	0,994 ± 0,002	%	0,9617 ± 0,007	96,8	1,093 ± 0,055	109,9
Mg	601 ± 28	mg kg ⁻¹	604,3 ± 32,6	100,5	603,7 ± 9,7	100,5
Zn	127 ± 16	mg kg ⁻¹	100,3 ± 5,6	79,0	115,7 ± 3,1	91,1

6.3.2 - Efeito da adição da erva-mate não ração, estudo no músculo

As concentrações de Ca, Cu, Fe, K, Mg e Zn obtidas nas amostras de músculo, em função da adição da erva-mate são apresentadas na Tabela 6.13. A determinação foi feita por MIP OES, utilizando os parâmetros otimizados descritos no item anterior.

Com base nos valores apresentados na Tabela 6.12, observou-se que não foi possível determinar Cu, pois sua concentração é $< LOD$. Quanto ao Fe determinado no músculo, os animais que receberam adição de 0,5 % da erva-mate na dieta apresentaram resultados bastante elevados quando comparados aos demais. Isso pode estar relacionado com uma provável contaminação da amostra, uma vez que a diferença entre as concentrações é bastante pronunciada. Apesar disso, o experimento não foi repetido, pois as triplicatas apresentaram valores semelhantes, concluindo-se que a contaminação pode ter ocorrido durante a etapa de moagem ou homogeneização da amostra, que deve apresentar contaminação de ferro.

Para verificar se os resultados encontrados apresentam valores médios diferentes para cada elemento estudado nas amostras de músculo foi aplicada a análise de variância ANOVA de fator único, comparando-se os valores de $F_{\text{crítico}}$ (F_c) em relação aos valores de $F_{\text{analítico}}$ (F) para cada elemento. Considerando o comentário feito anteriormente, a adição de 0,5% de erva-mate não foi considerada nas análises do Fe.

TABELA 6.12 - Concentrações de Ca, Cu, Fe, K, Mg e Zn (média±desvio-padrão, n = 3) nas amostras de músculo de bovinos alimentados com diferentes quantidades de erva-mate adicionadas à ração.

Elementos	Concentrações (mg kg ⁻¹)			
	0%	0,5 %	1,0 %	1,5 %
Ca	306,7 ± 8,1	256,3 ± 30,7	313,9 ± 7,0	280,4 ± 9,8
Cu	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
Fe	46,3 ± 7,2	73,3 ± 3,0*	41,5 ± 1,8	41,4 ± 4,6
K	14280,3 ± 810,0	13981,2 ± 618,9	15498,1 ± 687,8	14451,0 ± 280,9
Mg	728,6 ± 31,7	717,4 ± 14,0	798,9 ± 10,9	745,2 ± 8,8
Zn	156,5 ± 9,7	149,8 ± 3,1	176,1 ± 8,0	151,4 ± 1,1

*valor não considerado nas análises estatísticas, em função de possível contaminação da amostra.

A estatística da ANOVA representada na Tabela 6.13 demonstra que os resultados obtidos para o K não se apresentam estatisticamente diferentes. No entanto podem ser observados teores mais elevados nas amostras de carne provenientes dos animais que receberam 1,0% de adição de erva-mate em sua dieta. Para o Fe não houve diferença entre as médias dos grupos (0; 1,0 e 1,5%).

Para os demais elementos o $F_{\text{analítico}}$ foi maior que o $F_{\text{crítico}}$, demonstrando que houve diferença significativa das concentrações dos elementos encontradas nos diferentes grupos. O grupo de animais que receberam em sua dieta 1,0% de erva-mate se destacou, resultando em concentrações mais elevadas para Ca, Mg e Zn.

TABELA 6.13 – Análise estatística (ANOVA) para os valores médios das concentrações de cálcio, ferro, magnésio, potássio e zinco determinadas no músculo de bovinos alimentados com diferentes teores de erva-mate.

Variáveis	Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	F_c^a
Zn	Entre	3	439,2793	10,45752	4,066181
	Dentro	8	42,00606		
Mg	Entre	3	3907,056	11,16161	4,066181
	Dentro	8	350,0442		
Fe	Entre	3	23,16958	0,913264	5,143253
	Dentro	8	25,37008		
Ca	Entre	3	2079,257	7,20688	4,066181
	Dentro	8	288,51		
K	Entre	3	1304994	3,280439	4,066181
	Dentro	8	397810,7		

F_c^a para $\alpha=0,05$

6.3.3 - Efeito da adição da erva-mate na ração, estudo no fígado

Para a avaliação do efeito da adição da erva-mate nos teores de metais no fígado dos animais em estudo, os parâmetros foram avaliados e são descritos no item 6.3.1. As concentrações obtidas são apresentadas na Tabela 6.14. As determinações foram feitas em triplicata para os 12 animais (4 tratamentos, 3 repetições), totalizando 36 respostas para cada grupo, representados na Figura 6.2. Os resultados obtidos são apresentados em forma de “box plot”, sendo possível ver a faixa da variância da concentração para cada elemento em estudo.

Foi aplicada a análise de variância ANOVA fator único para a avaliação estatística dos resultados e comparou-se os valores do $F_{\text{crítico}}$ (F_c) em relação aos valores do $F_{\text{analítico}}$ (F) para cada elemento. Esses resultados estão representados na Tabela 6.15 e, para todos os elementos estudados, o F_c foi maior que o F , demonstrando assim que há diferença estatística no valor das médias das concentrações dentro dos grupos.

Foi realizado o teste de Tukey (1949), que utiliza um algoritmo baseado na obtenção de um único valor a ser calculado. Sua aplicação está restrita ao resultado da análise de variância (ANOVA), que dectará a existência ou não de diferença entre os pares de médias dos tratamentos testadas por F .

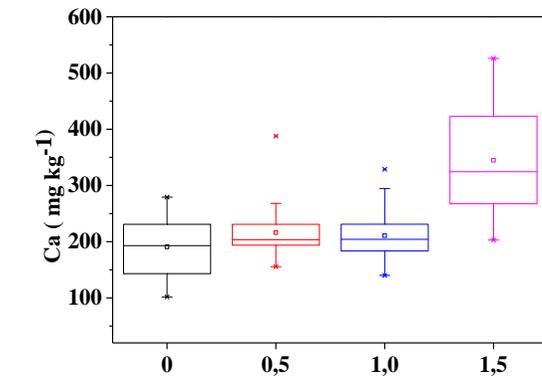
Os resultados do teste de Tuckey estão apresentados na Tabela 6.15 e podem ser observadas as diferenças ou não entre os pares de médias estudados. Para o Ca, os maiores valores de concentração são observados no grupo de animais que recebeu 1,5% de erva-mate, sendo que esse grupo se diferencia dos demais. Para o Cu, os grupos que receberam 0; 0,5 e 1,0% de erva-mate possuem valores de concentrações que podem ser considerados semelhantes. Por outro lado, houve diminuição dos teores de Cu quando comparado aos demais no grupo de animais que recebeu 1,5% de erva-mate. Para o Fe, o grupo dos animais que não recebeu 0,5% de erva-mate e o que recebeu 1,5%, assim como o grupo que não recebeu erva-mate (testemunha) e o que recebeu 1,0% de erva-

mate apresentaram resultados semelhantes, sendo que os últimos apresentaram os maiores valores de concentração. Em relação ao K, o grupo dos animais que se alimentaram com 1,5 % de erva-mate se destacou em relação aos demais, seguido pelo grupo 0,5%, 1,0% e por último o grupo testemunha (0%). A média encontrada para o K no grupo 1,0% se assemelha aos valores do grupo 0 e 0,5%; para o Mg os valores encontrados tanto para o grupo 0% quanto para o grupo 1,0% são mais elevados e considerados semelhantes estatisticamente. Já os grupos que receberam 0,5% e 1,5% de erva-mate apresentaram menores concentrações de Mg e se mostraram estatisticamente semelhantes. O grupo que recebeu 1,5% de erva-mate em sua dieta apresentou maiores teores de Zn. No entanto os resultados são estatisticamente semelhantes aos animais que não receberam erva-mate (grupo testemunha). Os grupos que receberam 0,5% e 1,0% de erva-mate apresentaram resultados estatisticamente semelhantes, com os menores teores de Zn.

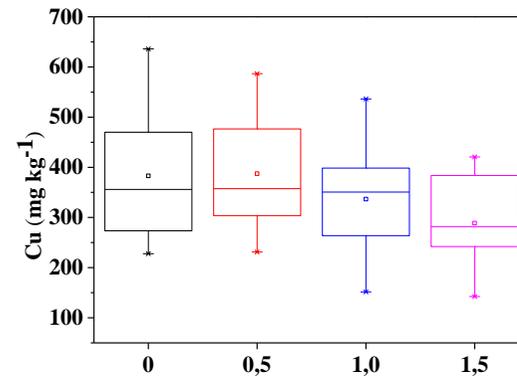
TABELA 6.14- Concentrações de Ca, Cu, Fe, K, Mg e Zn (média \pm desvio-padrão, n = 48) nas amostras de fígado bovinos alimentados com diferentes quantidades de erva-mate adicionadas à ração.

Elementos	Concentrações (mg kg ⁻¹)			
	0%	0,5%	1,0%	1,5%
Ca	190,89 ^b \pm 8,58	216,17 ^b \pm 6,78	210,67 ^b \pm 7,06	344,7 ^a \pm 16,43
Cu	382,90 ^a \pm 21,38	387,30 ^a \pm 18,76	336,62 ^{ab} \pm 17,58	288,81 ^b \pm 14,71
Fe	293,09 ^a \pm 14,69	213,60 ^c \pm 7,19	254,62 ^{ba} \pm 10,72	238,61 ^{bc} \pm 7,75
K	16078,2 ^c \pm 164,54	17197,06 ^b \pm 137,34	16692,70 ^{cb} \pm 256,15	18271,24 ^a \pm 108,26
Mg	668,93 ^a \pm 8,22	594,47 ^b \pm 7,83	664,62 ^a \pm 9,28	611,98 ^b \pm 6,41
Zn	96,15 ^{ab} \pm 2,31	88,88 ^{bc} \pm 2,57	86,79 ^c \pm 1,65	100,15 ^a \pm 3,17

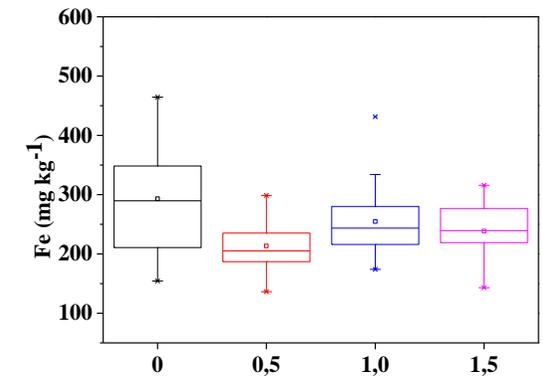
Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes a nível de 95% (Tuckey).



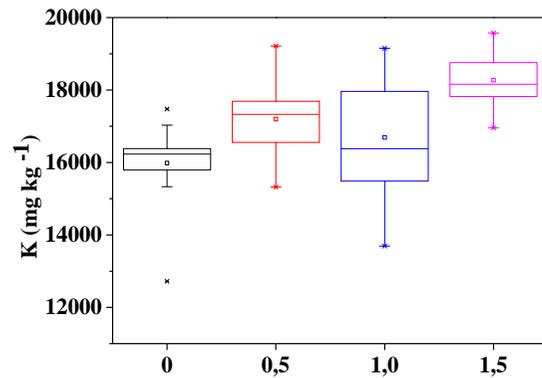
Porcentagem (%) de Mate adicionada na dieta dos animais



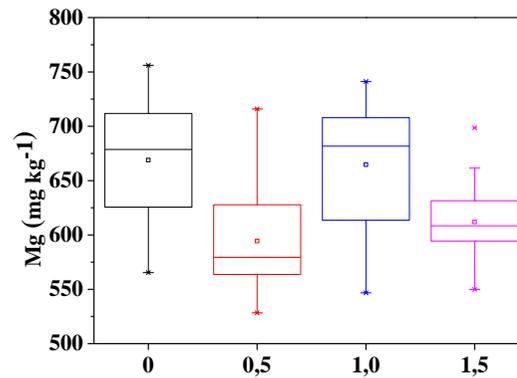
Porcentagem (%) de Mate adicionada na dieta dos animais



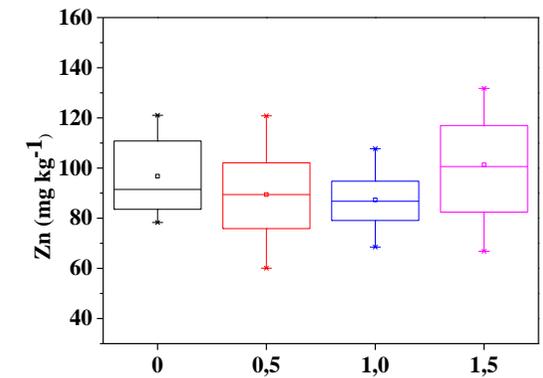
Porcentagem (%) de Mate adicionada na dieta dos animais



Porcentagem (%) de Mate adicionada na dieta dos animais



Porcentagem (%) de Mate adicionada na dieta dos animais



Porcentagem (%) de Mate adicionada na dieta dos animais

Figura 6.2- Gráficos da variação das concentrações (mg kg^{-1}) dos elementos (Ca, Cu, Fe, K, Mg e Zn) determinados nas 12 amostras de fígado em cada grupo(0; 0,5; 1,0 e 1,5) (n=3).

TABELA 6.15 - Estatísticas da ANOVA para os valores médios das concentrações dos elementos em estudo no fígado.

Variáveis	Fonte de Variação	Graus de liberdade	Média Quadrática	F	F_c^a
Ca	Entre	3	177634,3	44,93	2,67
	Dentro	140	3953,345		
Cu	Entre	3	76710,31	6,39	2,67
	Dentro	140	12010,03		
Fe	Entre	3	39996,24	10,04	2,67
	Dentro	140	3982,549		
K	Entre	3	33291747,49	30,01	2,67
	Dentro	140	1109439,96		
Mg	Entre	3	50420,56	21,89	2,67
	Dentro	140	2303,736		
Zn	Entre	3	1399,397	6,28	2,67
	Dentro	140	222,8732		

F_c^a para $\alpha=0,05$

6.4 - Estudo da influência das classes: peso, idade, espessura da camada de gordura, genética do pai e porcentagem (%) de erva-mate, nas concentrações dos metais estudados

Segundo LOPES (1998), a exigência de minerais pelos bovinos varia de acordo com seu estado sanitário, reprodutivo e fisiológico, somando também as necessidades de diversas características, tais como crescimento, puberdade, gestação e lactação. Desta forma, mesmo que os animais que foram escolhidos para o desenvolvimento dos experimentos apresentassem a maior homogeneidade possível, podem existir diferenças que não foram totalmente controladas. Assim, no sentido de estudar a influência destes fatores, foram realizados diversos cálculos empregando a ferramenta quimiométrica “Análise de componentes principais” (PCA). O objetivo principal desta análise foi verificar se a alteração na concentração dos metais encontrados na amostra de fígado tem relação com diversas características relacionadas aos animais, nos grupos estudados, ou se foram oriundas da suplementação com erva-mate. Os valores de concentrações foram obtidos em triplicata para cada analito presente nos 48 animais do experimento.

A primeira classe estudada foi o peso dos animais. Esse parâmetro variou de 455 a 605 kg e a Figura 6.3 (box plot) mostra a distribuição dos pesos nos quatro níveis de suplementação com erva-mate. No gráfico do box plot, o quadrado pequeno no centro dos retângulos representa a média, a linha representa a mediana (valor que fica no meio) e o tamanho do retângulo é proporcional à média \pm 1 desvio padrão. Os limites representam 95% dos dados e os asteriscos o menor e o maior valor respectivamente.

Quando analisamos o gráfico da Figura 6.3, é perceptível a variação do peso dos animais do grupo 1,5 % dos demais. Entretanto, com o resultado da ANOVA demonstrado na Tabela 6.17, o $F_{\text{calculado}}$ foi menor que o $F_{\text{crítico}}$ com 95% de confiança, mostrando que não há diferença estatística entre os valores das médias em nenhum dos grupos. Para confirmar que realmente não existe

diferença significativa entre os pares de médias dos pesos dos grupos uns com os outros, foi realizado o teste de Tukey, sendo as médias dos pesos para cada grupo e o resultado do teste aplicado representados na Tabela 6.16. Mesmo apresentando variações entre os pesos dos animais em cada grupo estudado, o teste de Tukey demonstrou não haver diferença significativa entre os pares de médias dos grupos (mesma letra para todas as médias).

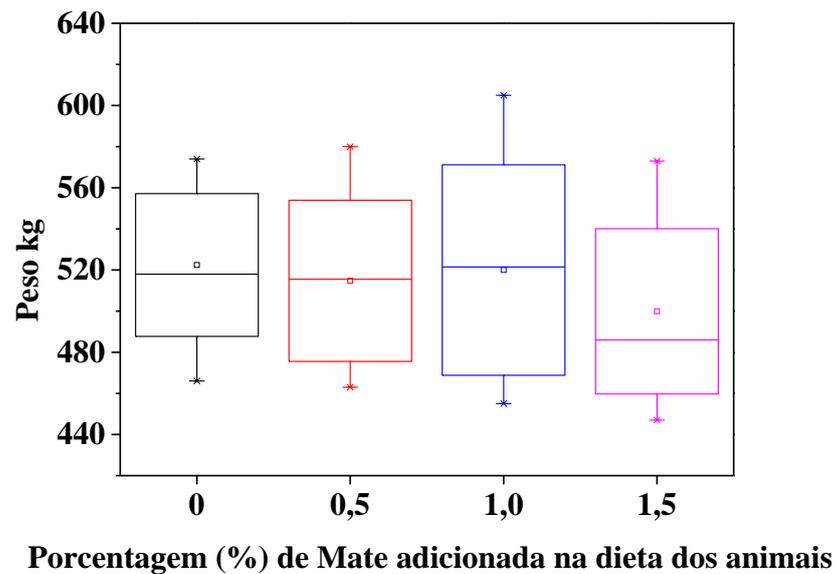


Figura 6.3– Variação do peso em kg, dos animais em cada grupo de suplementação com erva-mate (0; 0,5; 1,0 e 1,5 %) (n=12).

TABELA 6.16– Média do peso dos animais em kg, e seus respectivos desvios padrão (n=12).

(%) de Erva-mate	Peso (kg) \pm DP
0	522,42 ^a \pm 5,78
0,5	514,70 ^a \pm 6,53
1,0	520,00 ^a \pm 8,53
1,5	499,92 ^a \pm 6,70

Letras iguais indicam não haver diferença estatística entre os valores a nível de 95% (Tuckey).

TABELA 6.17- ANOVA de fator único para os valores médios dos pesos (em kg) dos animais utilizados no experimento.

Variáveis	Fonte de Variação	Graus de liberdade	Média Quadrática	F	F _c
Peso	Entre	3	3665,396	2,10	2,67
	Dentro	140	1744,416		

F_c^a para $\alpha=0,05$

Visto que o peso não foi uma classe determinante para os resultados encontrados das concentrações dos metais, foi realizada a PCA com os dados auto-escalados. Assim, foram avaliados dois níveis para a classe peso: animais que possuíam peso de 447-500 kg (nível 1) e animais que possuíam 501-605 kg (nível 2). Nas Figuras 6.4 e 6.5 estão representados seus “scores” e “loadings”. Analisando os gráficos de “scores” e com base nos testes estatísticos realizados é possível concluir que o peso dos animais não influenciou nas concentrações encontradas dos elementos.

Na avaliação dos *scores e loadings*, as duas primeiras componentes principais (PCs) foram utilizadas para a visualização dos dados e são responsáveis por 55 % da variância total dos dados. A primeira componente (PC1) reteve 33,2% enquanto a segunda componente (PC2) correspondeu a 21,8%.

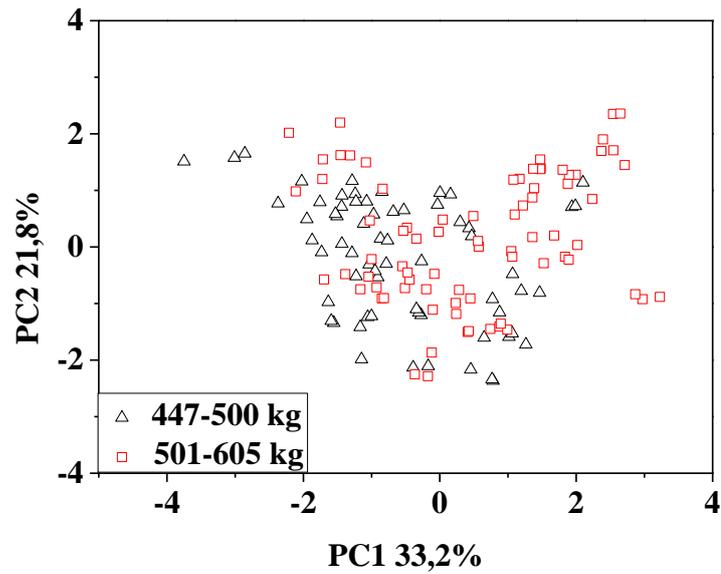


Figura 6.4– Gráfico de “scores” (classe selecionada: peso) obtidos pela matriz gerada através da determinação da concentração de Ca, Cu, Fe, Mg, K e Zn nas amostras de fígado após digestão assistida por radiação micro-ondas.

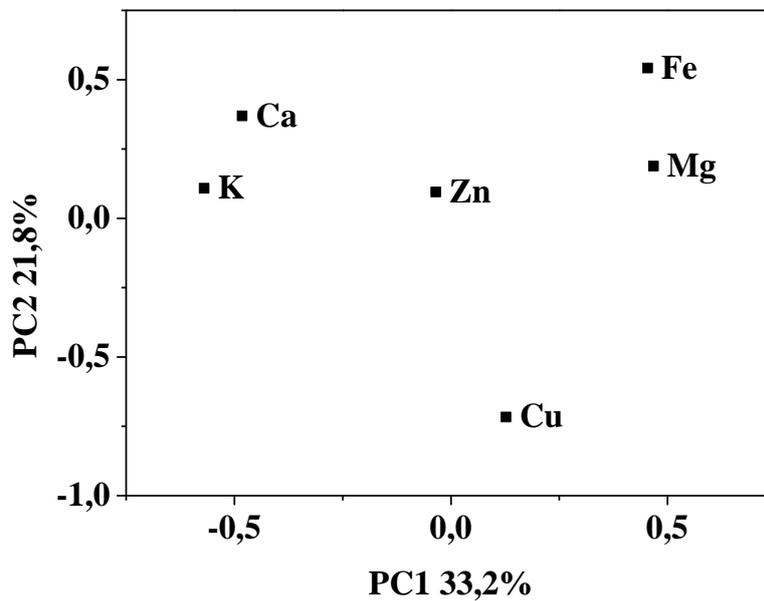


Figura 6.5– Gráfico de “loadings” (classe selecionada: peso) obtidos pela matriz gerada através da determinação da concentração de Ca, Cu, Fe, Mg, K e Zn nas amostras de fígado após digestão assistida por radiação micro-ondas.

Assim, a PCA calculada foi concordante com demais testes estatísticos realizados, ou seja, o peso não é uma classe determinante no valor

das concentrações dos metais encontrados. Como demonstrado na Figura 6.4, não há separação dos grupos dos animais de maior peso com os de menor peso e eles se confundem. Entretanto o grupo dos animais com pesos menores tende a ficar do lado negativo da PC1, podendo ser relacionado com altas concentrações de K e Ca e os de maior peso do lado positivo da PC1, relacionados pelas concentrações de Fe e Mg, como pode ser observado nos loadings (Figura 6.5).

Os animais utilizados no experimento nasceram em setembro, outubro, novembro e dezembro de 2011 e janeiro de 2012 e devido à maioria ter nascido em dezembro, foi avaliado se essa diferença de idade iria interferir nos resultados das concentrações dos metais no fígado. Para isso foi realizada uma segunda PCA (Figuras 6.6), porém desta vez a classe mês de nascimento foi avaliada em 5 níveis diferentes (os 5 meses de nascimento).

Na avaliação dos *scores e loadings*, as duas primeiras componentes principais (PCs) foram utilizadas para a análise dos dados e são responsáveis por explicar 55% da variância. A primeira componente (PC1) explica 33,2%, enquanto a segunda componente (PC2) corresponde a 21,8%. Através do gráfico (Figura 6.6) de “scores” é possível observar que não houve separação, principalmente dos animais referentes ao mês de dezembro, que foram maioria. Os dados se confundem com os dos demais animais que nasceram nos demais meses, não interferindo nos valores das concentrações encontradas na matriz fígado.

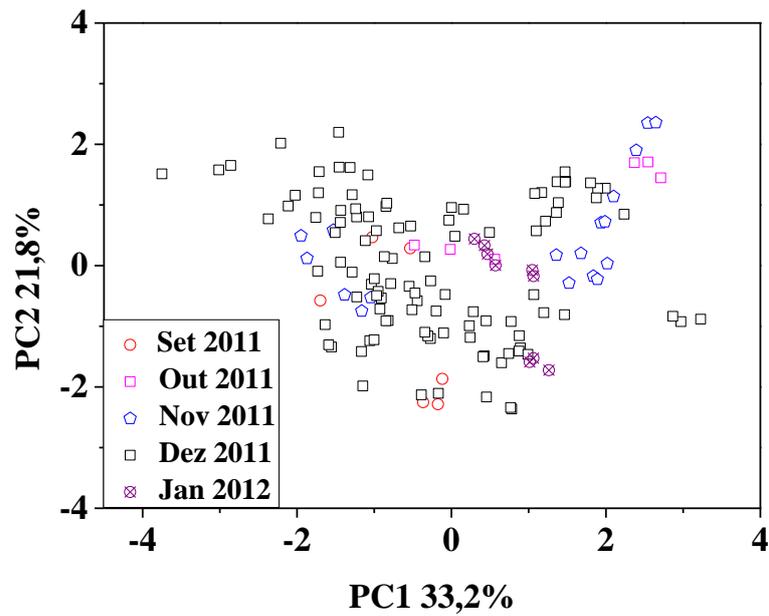


Figura 6.6– Gráfico de “scores” (classe selecionada: idade) obtidas pela matriz gerada através da determinação da concentração de Ca, Cu, Fe, Mg, K e Zn determinada em 144 amostras de fígado após digestão assistida por radiação micro-ondas.

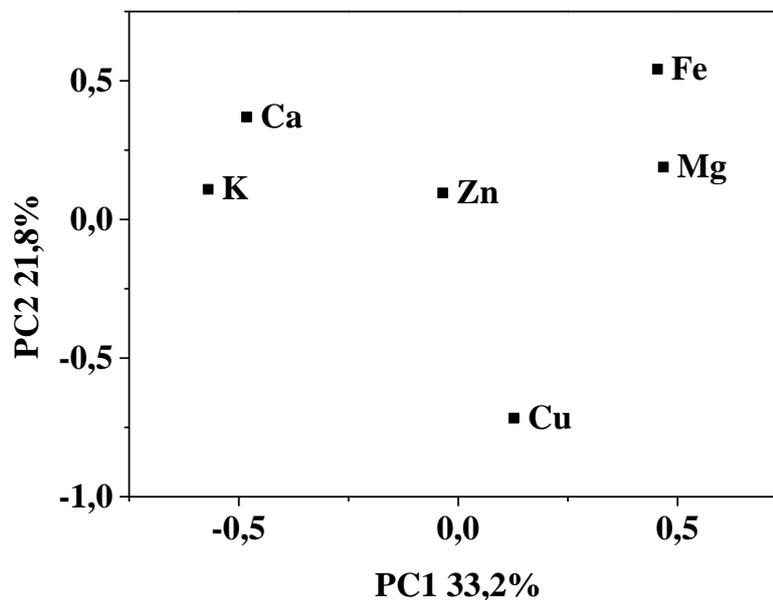


Figura 6.7 – Gráfico de “Loadings” (classe selecionada: idade) obtidas pela matriz gerada através da determinação da concentração de Ca, Cu, Fe, Mg, K e Zn em 144 amostras de fígado após digestão assistida por radiação micro-ondas.

Foi realizado um experimento em que a camada de gordura dos animais foi medida em milímetros (mm). No processo fisiológico do animal, o fato de se ter uma camada de gordura maior ou menor pode interferir na absorção dos minerais pelos tecidos, neste caso específico o fígado. Com base neste fato foi realizada uma PCA separando os animais por três classes sendo estes referentes aos animais que possuíam camada de gordura entre (4 e 10) mm, entre (11 e 17) mm e entre (18 e 25) mm. Os resultados dos “scores” e dos “loadings” estão representados respectivamente nas figuras (6.8 e 6.9).

Na avaliação dos “scores” e “loadings”, as duas primeiras componentes principais (PC) foram utilizadas para a análise dos dados e são responsáveis por explicar 55% da variância. A primeira componente (PC1) explica 33,2% enquanto a segunda componente (PC2) corresponde a 21,8%. Por meio do gráfico (Figura 6.8) de “scores” é possível observar que não houve separação, mas pode-se observar que os animais que estão na classe entre (18 e 25 mm) ficam próximos. Apenas um animal e sua respectiva triplicata se diferenciam, sendo considerado um *outlier* em relação a resposta do grupo. Analisando o gráfico de “loadings” (Figura 6.9) é possível ver a relação entre o Cu e o Zn, que explica a concentração deste grupo, sendo que na PC1 eles estão bem próximos do zero, isto é, não têm influência nem positiva nem negativa nos valores encontrados. Grande parte do grupo entre (11 e 17) mm se encontra do lado positivo da PC1, podendo ser explicado pelas concentrações de K e de Ca (Figura 6.9). Porém, o grupo entre (4 e 10) mm tem um perfil muito disperso na PC, não sendo possível associa-lo a um elemento específico.

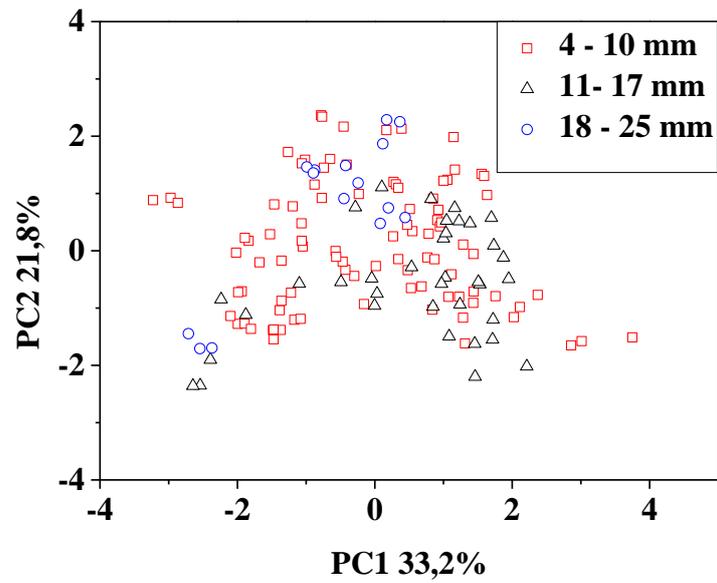


Figura 6.8– Gráfico de “scores” (classe selecionada: espessura da camada de gordura) obtidas pela matriz gerada através da determinação da concentração de Ca, Cu, Fe, Mg, K e Zn nas amostras de fígado após digestão assistida por radiação micro-ondas.

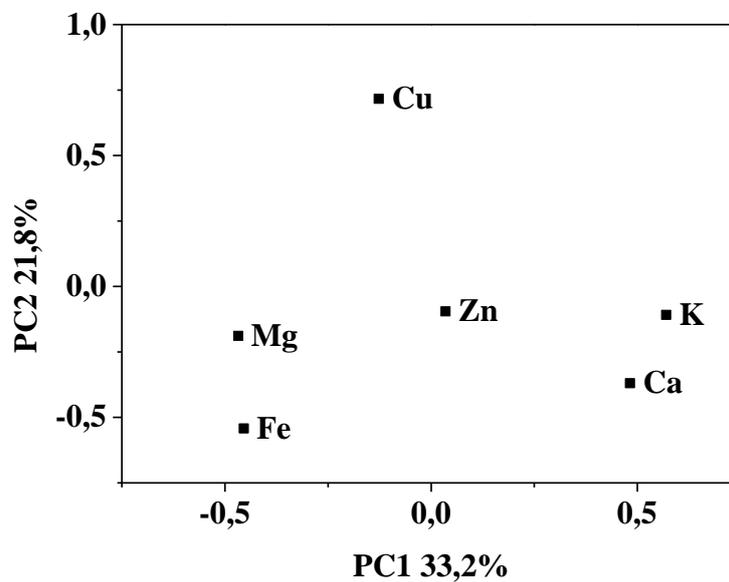


Figura 6.9– Gráfico de “loadings” (classe selecionada: espessura da camada de gordura) obtidas pela matriz gerada através da determinação de Ca, Cu, Fe, Mg, K e Zn nas amostras de fígado após digestão assistida por radiação micro-ondas.

Os animais que foram utilizados nos experimentos possuíam no total 15 pais diferentes. Tendo em vista que as mães eram todas diferentes, foi realizado um estudo para avaliar a influência genética do pai, na tentativa de ser observada alguma característica semelhante em relação à capacidade de absorver os metais no fígado devido à característica genética. Para isso foram realizadas as PCs (“*scores*” e “*loadings*”), com a classe dos pais (Figuras 6.10 e 6.11).

Na avaliação dos *scores e loadings*, as duas primeiras componentes principais (PC) foram utilizadas para a análise dos dados e são responsáveis por explicar 55% da variância. A primeira componente (PC1) explica 33,2% enquanto a segunda componente (PC2) corresponde a 21,8%. Na figura 6.10 é possível observar que não houve separação nítida das amostras dos animais que eram filhos do mesmo pai, como já era esperado devido à grande variação dentro da classe. As respostas referentes a alguns pais ficaram mais próximas, como o Pai número 8. No entanto outras amostras de mesmo pai se dispersaram, como por exemplo o Pai número 4 e o Pai número 3. Através destas informações é perceptível que o pai não foi um fator que influenciou nos resultados obtidos nas concentrações dos elementos avaliados.

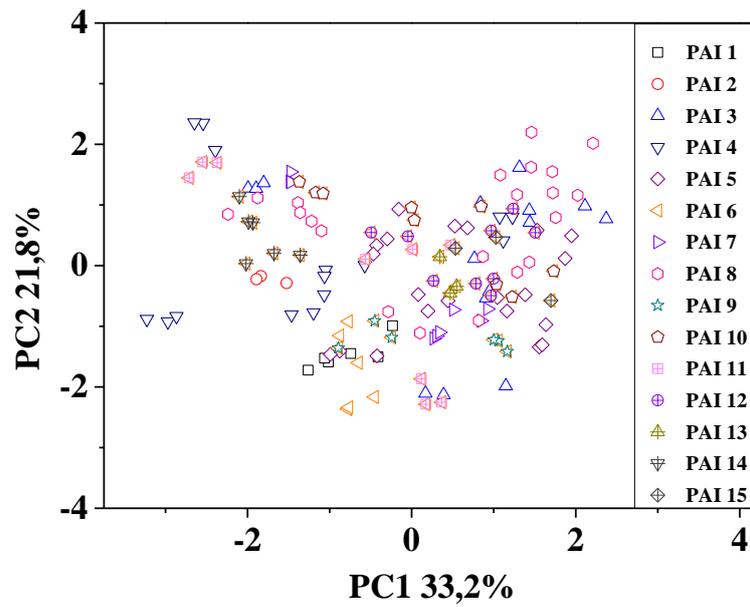


Figura 6.10– Gráfico de “scores” (classe selecionada: genética do pai) obtidas pela matriz gerada através da determinação da concentração de Ca, Cu, Fe, Mg, K e Zn nas amostras de fígado após digestão assistida por radiação micro-ondas.

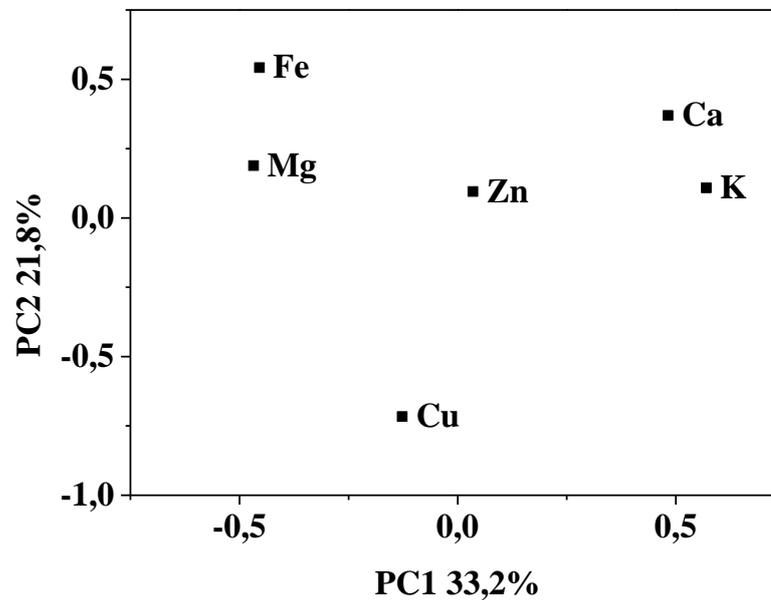


Figura 6.11– Gráfico de “loadings” (classe selecionada: genética do pai) obtidas pela matriz gerada através da determinação da concentração de Ca, Cu, Fe, Mg, K e Zn nas amostras de fígado após digestão assistida por radiação micro-ondas.

Outra avaliação feita para se tentar verificar a influência da genética, foi separar os resultados obtidos com amostras provenientes de um mesmo pai (pai 4) que receberam os diferentes tratamentos com erva-mate (0; 0,5 e 1,5%). Na avaliação dos *scores e loadings*, as duas primeiras componentes principais (PC) foram utilizadas para a análise dos dados e são responsáveis por explicar 70% da variância. A primeira componente (PC1) explica 43%, enquanto a segunda componente (PC2) corresponde 27%. Os gráficos dos “scores” e “loadings” estão representados, respectivamente nas Figuras (6.12 e 6.13).

Através da Figura 6.12 pode-se concluir que a quantidade de erva-mate adicionada na dieta dos animais teve um peso superior à genética, sendo observada uma nítida separação entre os animais que foram alimentados com as diferentes porcentagens de mate adicionadas na sua dieta. Podem ser associados os animais que não receberam tratamento (grupo 0%) com os teores de Zn e Fe, que também se encontram do lado negativo da PC1, enquanto que os animais alimentados com as maiores quantidades de erva-mate (1,5%) seriam explicados pelos teores de K e Ca, que se encontram do lado positivo da PC1. Os teores de Cu e Mg ficam bem próximas de 0 na PC1. No entanto, enquanto os teores de K e Ca aumentam com a adição do mate os teores de Zn e Fe diminuem, como pode ser observado pelo posicionamento na PCA (Figura 6.13).

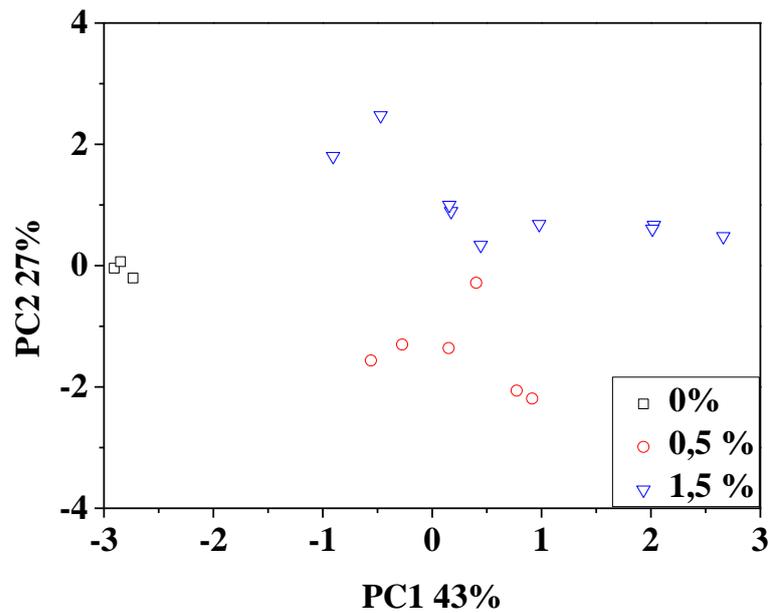


Figura 6.12– Gráfico de “scores” (classe selecionada: % de erva-mate) obtidas pela matriz gerada através da determinação da concentração de Ca, Cu, Fe, Mg, K e Zn em 15 amostras referentes a 5 filhos do mesmo pai (4).

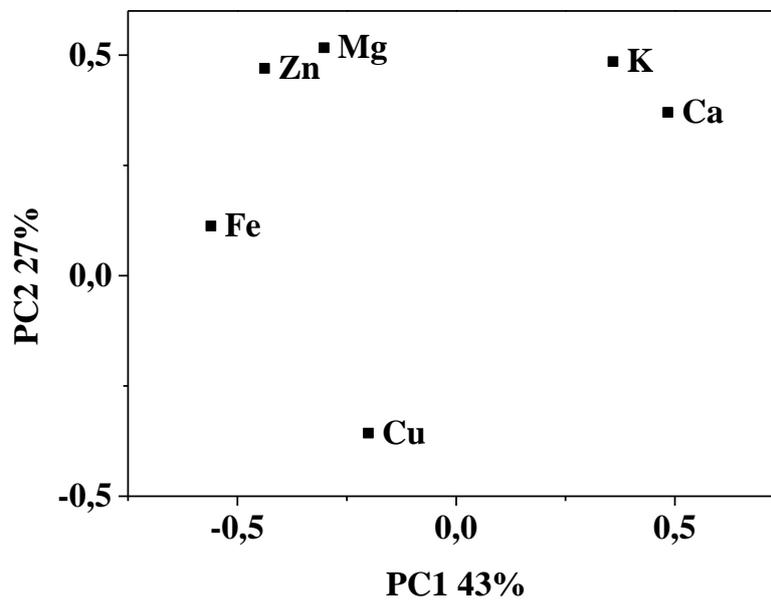


Figura 6.13– – Gráfico de “loadings” (classe selecionada: % de erva-mate) obtidas pela matriz gerada através da determinação da concentração Ca, Cu, Fe, Mg, K e Zn em 15 amostras referentes a 5 filhos do mesmo pai (4).

Por meio das concentrações dos elementos avaliados encontrados na amostra de fígado e dos testes estatísticos realizados, fica claro que existe diferença entre os tratamentos. Para uma melhor interpretação destes resultados, foram realizadas as análises de componentes principais. Na avaliação dos *scores*, as duas primeiras componentes principais (PCs) foram utilizadas para a análise dos dados e são responsáveis por explicar 55% da variância. A primeira componente (PC1) explica 33,2%, enquanto a segunda componente (PC2) corresponde 21,8%. Os gráficos dos “scores” e “loadings” estão representados, respectivamente nas Figuras (6.14 e 6.15).

Na avaliação dos “scores” e “loadings”, a separação não é tão nítida, podendo outros fatores estar contribuindo para uma melhor separação; ainda assim, é possível observar uma separação do grupo 1,5% dos demais, que se apresentam sobrepostos (0,5%, 1,0% e 0%). O grupo dos animais que foi alimentado com a adição de 1,5% da erva-mate em sua alimentação é influenciado pelas concentrações de Ca e K, macroelementos presentes no fígado. Isto demonstra que a influência nas concentrações dos elementos no fígado foi mais significativa para os dois elementos.

O tratamento com 0,5% influenciou a concentração de Zn e a testemunha e o tratamento com 1,0% de adição de mate proporcionou variação nas concentrações de Mg, Fe e Cu. No entanto Zn e Cu encontram-se bem próximos do 0 da PC1, indicando não influenciar na separação dos grupos. Enquanto as concentrações de K e Ca aumentam com o aumento da erva-mate, o Fe e o Mg diminuem, estando em lados opostos no gráfico dos “loadings” (Figura 6.15).

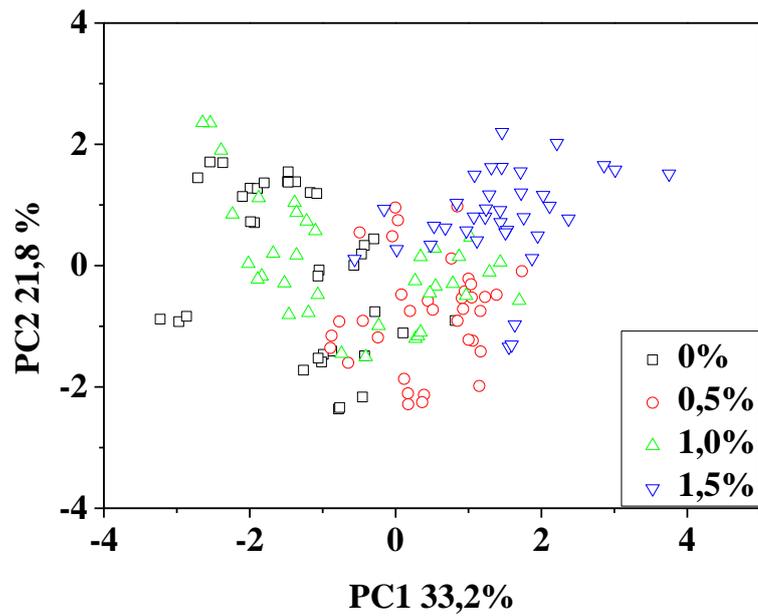


Figura 6.14– Gráfico de “scores” (classe selecionada: % de erva-mate) obtidas pela matriz gerada através da determinação de Ca, Cu, Fe, Mg, K e Zn nas amostras de fígado, após digestão assistida por radiação micro-ondas.

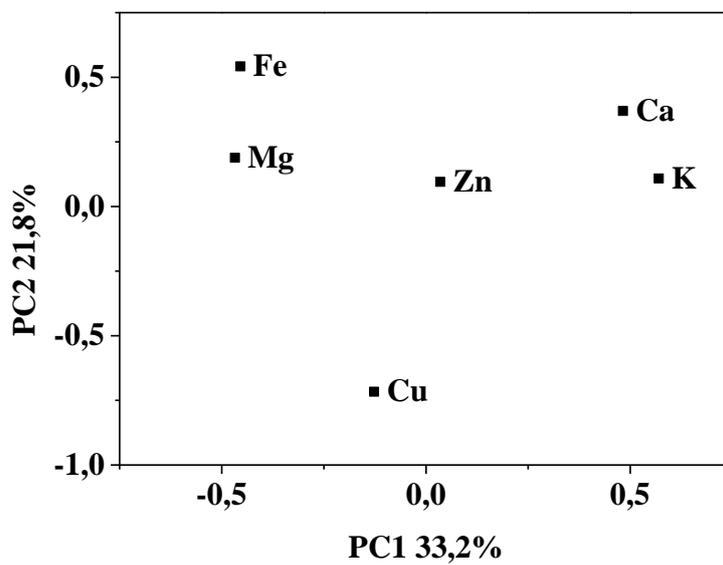


Figura 6.15– Gráfico de “loadings” (classe selecionada: % de erva-mate) obtidas pela matriz gerada através da determinação de Ca, Cu, Fe, Mg, K e Zn nas amostras de fígado após digestão assistida por radiação micro-ondas.

6.5 - Comparação entre as concentração de Ca, Cu, Fe, Mg, K e Zn nos tratamentos e matrizes estudadas

Um dos principais objetivos do trabalho foi avaliar o perfil das concentrações dos metais nas diferentes matrizes estudadas (sangue, músculo e fígado) após adição de erva-mate na alimentação dos bovinos, considerando a possibilidade de ocorrer complexos entre os polifenóis presentes na erva-mate com os metais, deixando-os indisponíveis para serem absorvidos. Assim, para uma melhor visualização e discussão, os resultados são apresentados em forma de Figuras (6.16; 6.17; 6.18; 6.19, 6.20 e 6.21), sendo representadas as matrizes e as concentrações obtidas em função dos diferentes tratamentos. Na Figura 6.16 estão representadas as concentrações do cálcio nas matrizes sangue, músculo e fígado.

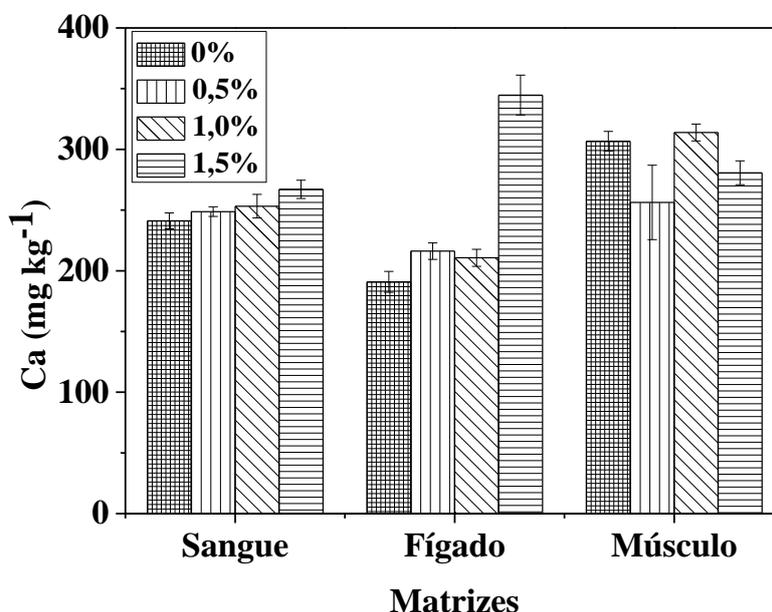


Figura 6.16 – Concentração de Ca determinada nas amostras de sangue (n=3), fígado (n=12) e músculo (n=3)).

Analisando as três matrizes (Figura 6.16), pode ser verificada a relativamente constante distribuição dos teores de Ca, com exceção dos teores

observados nas amostras de fígado dos animais que receberam 1,5% de erva-mate na ração. Considerando que 99% do Ca está localizado nos ossos (SPEARS, 1999), os resultados observados poderiam indicar algum comportamento, porém infelizmente os ossos não foram separados durante o abate dos animais. Os teores de Ca nas amostras de sangue apresentaram um perfil crescente do grupo 0 até o 1,5%, sendo a maior concentração encontrada no grupo 1,5%. Já no fígado foi observada maior concentração de Ca no tratamento com 1,5% de erva-mate, com crescimento de 0 para o 0,5%, pequeno decaimento do grupo 0,5 para o grupo 1,0% e do 1,0 para o 1,5% houve expressiva elevação dos teores de Ca. Já para o músculo os grupos 0 (testemunha) e 1,0% apresentaram valores próximos, ocorrendo um decréscimo nos grupos 1,5% e 0,5%.

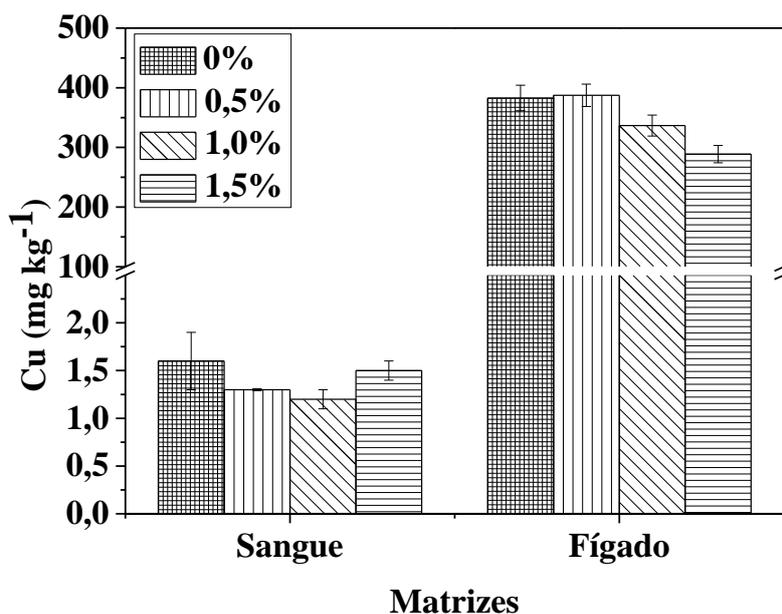


Figura 6.17– Concentração de Cu determinada nas amostras de sangue (n=3) e fígado (n=12).

Como já esperado, grande parte do Cu se encontra no fígado (Figura 6.17). Como já mencionado os teores de Cu presentes no músculo se apresentaram abaixo do LODs. Na amostra de sangue, a concentração de Cu foi maior nos grupos 0 e 1,5%, os dois extremos, decrescendo do 0% para 0,5% e

para 1,0% e apresentando aumento no grupo que recebeu o tratamento com 1,5% de erva-mate. Como demonstrado na Tabela 6.9, a avaliação estatística (ANOVA) dos resultados obtidos para Cu no sangue não apresentou diferenças significativas. Na amostra de fígado, os teores de Cu diminuíram de 0 para 0,5%, mas como já discutido em relação a Tabela 6.15, pelo teste de Tukey os teores obtidos para os tratamentos 0 e 0,5% podem ser considerados estatisticamente semelhantes, ocorrendo diminuição de 0,5% até 1,5%.

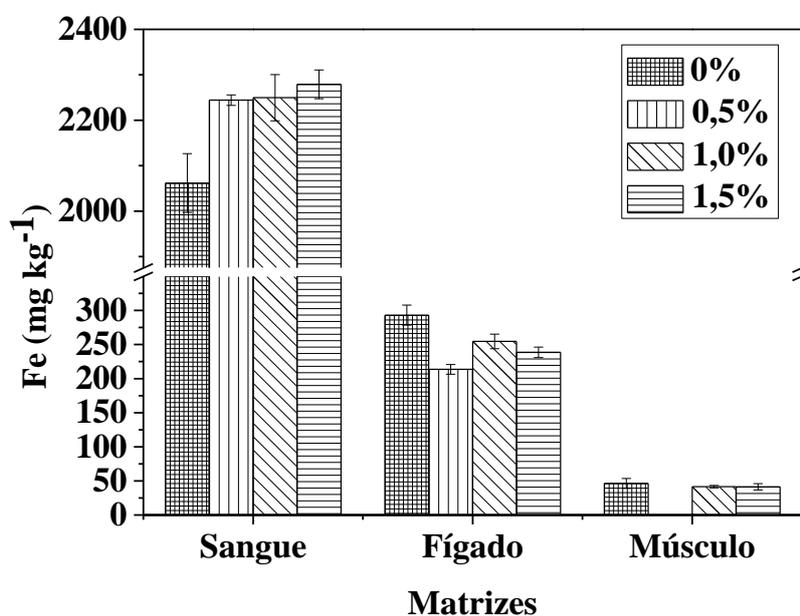


Figura 6.18– Concentração de Fe determinada nas amostras de sangue (n=3), fígado (n=12) e músculo (n=3).

O Fe é um dos principais componentes de moléculas de determinadas substâncias (hemoglobina, mioglobina e citocromo), estando presente em grande concentração no sangue (SPEARS, 1999). Como demonstrado na Figura 6.18, estando na faixa de 2000 mg kg⁻¹, as concentrações de Fe obtidas nas amostras de sangue apresentaram valores crescentes em relação aos tratamentos (do grupo 0 até o 1,5%). Na amostra de fígado, a concentração de Fe diminuiu do 0 % até 0,5%, aumentando do 0,5 % até o 1,0%

e diminuiu do grupo 1,0% até 1,5%. No músculo, como demonstrado na Tabela 6.14, não foram observadas diferenças estatísticas significativas para o Fe em relação aos diferentes tratamentos, podendo também ser observado na Figura 6.18. Os resultados referentes ao grupo 0,5% não foram considerados devido à possível contaminação nesta amostra, o que resultou em valores discrepantes quando comparados aos obtidos pelas demais amostras.

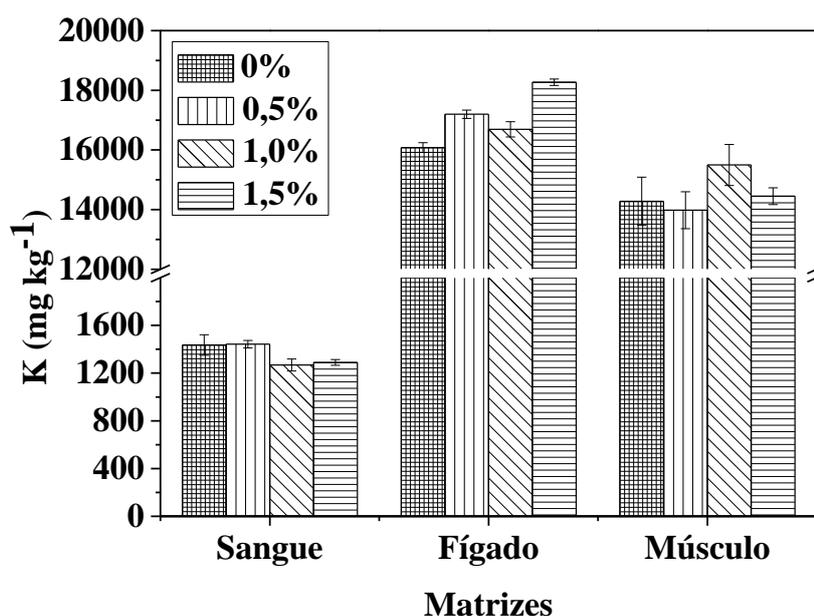


Figura 6.19– Concentração de K determinada nas amostras de sangue (n=3), fígado (n=12) e músculo (n=3).

Segundo SUTTLE (2010), a deficiência de K em bovinos é muito rara e os sintomas de deficiência não são muitos específicos, a não ser que o animal esteja confinado e receba uma dieta a base de grãos, sendo também um macromineral presente nas matrizes estudadas, como demonstrado na Figura 6.19, estando uma maior porcentagem presente no fígado. Os teores de K nas amostras de sangue apresentaram um pequeno aumento do tratamento com 0,5% de erva-mate para 1,0%, diminuindo e aumentando muito pouco novamente de 1,0% para 1,5%, sendo que no grupo de animais testemunha (0%) foram observados os maiores teores de K. Nas amostras de fígado os maiores teores de K foram obtidos no grupo que recebeu 1,5% de erva-mate; de 0% para 0,5%

ocorreu uma elevação da concentração obtida para o K e de 0,5% para 1,0% ocorreu uma diminuição, aumentando a seguir. Nas amostras de músculo ocorreu uma grande variação, sendo os maiores teores encontrados no grupo 1,0%; para os demais tratamentos foram observados teores similares de K.

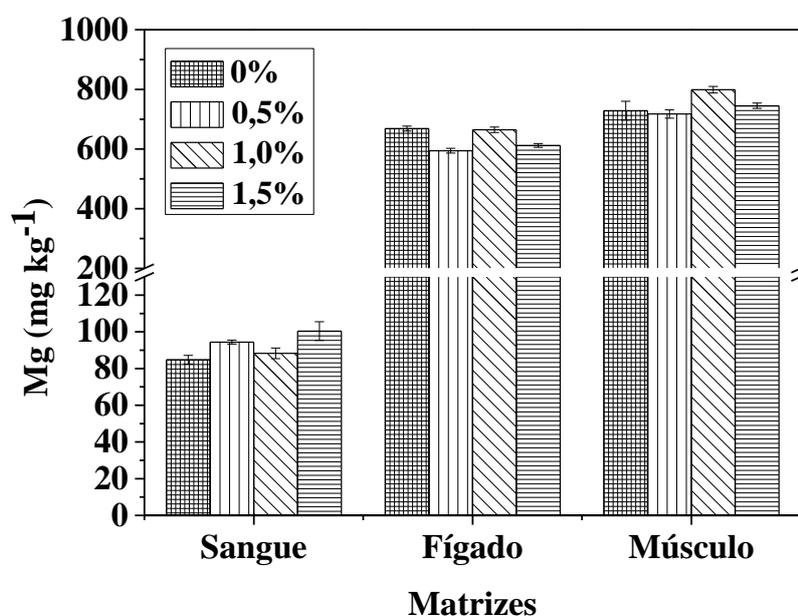


Figura 6.20– Concentração de Mg determinada nas amostras de sangue (n=3), fígado (n=12) e músculo (n=3).

O Mg está presente em maior porcentagem nas amostras de fígado e músculo. Como demonstrado na Figura 6.20, as amostras de sangue contém menor quantidade de Mg, sendo a maior concentração pertencente ao grupo 1,5%. O perfil da concentração de Mg no sangue aumentou do grupo 0% para o 0,5%. Nas amostras de fígado, a variação é muito pequena, no entanto pela ANOVA essa diferença é significativa, diminuindo de 0% para o 0,5%, aumentando de 0,5% para o 1,0% e diminuindo novamente para o grupo 1,5%, sendo o maior valor observado no grupo testemunha (0%). No músculo de 0 para o 0,5% não há diferença, de 0,5% para o 1,0 % aumenta e de 1,0% para o 1,5% diminui, sendo o maior valor encontrado igual a 1,0%.

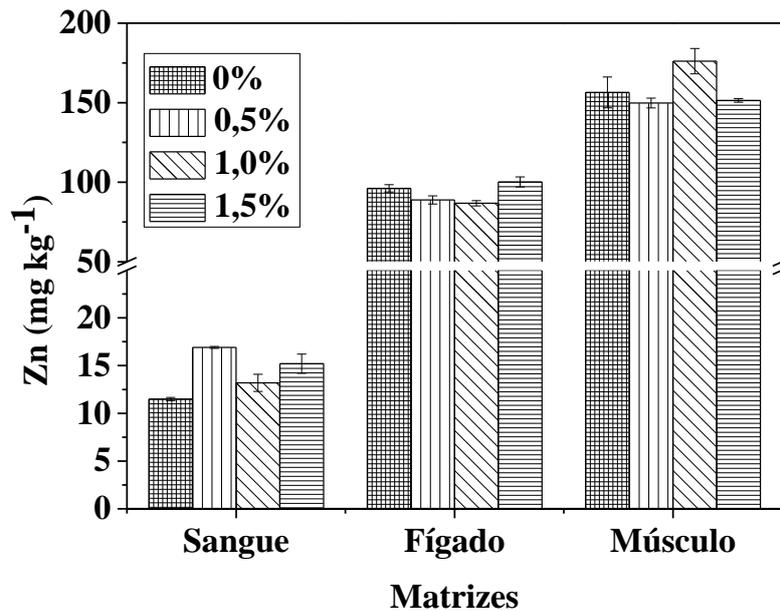


Figura 6.21– Concentração de Zn determinada nas amostras de sangue (n=3), fígado (n=12) e músculo (n=3).

O Zn está presente em maior quantidade nas amostras de fígado e músculo, como é demonstrado na figura 6.21. Nas amostras de sangue, pode ser observado que houve aumento de 0% para o 0,5%, diminuição de 0,5% para 1,0% e nova elevação do tratamento com 1,0% para 1,5%. Nas amostras de fígado as variações são muito pequenas, observando-se uma diminuição entre os resultados observados com a testemunha (0%) e as amostras que receberam 0,5% e 1,0%, sendo que em seguida ocorreu uma pequena elevação entre os tratamentos 1,0% e 1,5%. Nas amostras de músculo, houve variação entre os tratamentos, sendo os maiores valores observados no tratamento com 1,0% de erva-mate.

Conclusões

7 - CONCLUSÕES

O procedimento de preparo das amostras, que empregou radiação assistida por radiação micro-ondas em meio de ácido nítrico diluído foi efetivo para a decomposição das amostras de ração, erva-mate e sangue e carne (músculo e fígado) de bovinos.

O MIP OES mostrou-se adequado para a determinação de Ca, Cu, Fe, K, Mg e Zn nas amostras mencionadas, com exatidão e precisão necessários e também com resultados concordantes com uma técnica já estabelecida, o ICP OES.

Avaliou-se o efeito da adição de diferentes porcentagens de erva-mate (0; 0,5; 1,0 e 1,5 %) na dieta do gado sobre os teores de Ca, Cu, Fe, K, Mg e Zn nas amostras de sangue, músculo e fígado. Concentrações mais elevadas desses analitos foram obtidas para amostras de músculo dos animais que receberam ração com 1,0% de mate. Por outro lado, nas amostras de sangue, as maiores concentrações variaram entre os tratamentos com 0,5 e 1,5% de mate.

Através da PCA realizada com as amostras de fígado, observou-se que a quantidade de extrato de mate adicionada causou efeito significativo quando comparados o grupo controle (0%) e o grupo que recebeu a maior dosagem de mate (1,5%), com destaque para os teores de K, Mg e Ca. As demais classes avaliadas: peso, idade, camada de gordura e genética do pai não influenciaram nas concentrações encontradas, sendo assim a erva-mate pode ser candidata para ser utilizada como fonte alternativa de suplementação animal.

Referências Bibliográficas

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIEC . Exportações brasileira de carne bovina – Relatório Anual de Dezembro de 2015. Disponível em: <<http://www.abiec.com.br/download/relatorio-anual-2015.pdf> > Acesso: em 5 de mar. 2016.

AMAI, R. S.; DONATI, G. L.; SCHIAVO, D.; NÓBREGA, J. A. A simple dilute-and-shoot procedure for Si determination in diesel and biodiesel by microwave-induced plasma optical emission spectrometry. *Microchem J.* 106, 318-322.

ANVISA Disponível em:

<http://www.anvisa.gov.br/anvisaegis/resol/12_78.htm > Acesso em 26 de mar. 2016.

ARÇARI, D. P.; SANTOS, J. C.; GAMBERO, A.; RIBEIRO, M. L. The in vitro and in vivo effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extract on adipogenesis. *Food Chem.* 141, 809-815, 2013.

BASTOS, D. H. M.; FORNARI, A. C.; QUEIROZ, Y. S.; TORRES, E. A. F. S. Bioactive compounds content of chimarrão infusions related to the moisture of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) leaves. *Braz Arch Biol techn*, 49, 399–404, 2006.

BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. Nutrição de Ruminantes. Jaboticabal- FUNEP, 2006.

BRASIL, Ministério De Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, DECRETO Nº 4.954 DE 14 DE JANEIRO DE 2004. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=5473> > Acesso: em 28 de mar. 2016.

BRAVO, L.; MATEOS, R.; SARRIÁ, B.; BAEZA, G. LECUMBERRI, E.; RAMOS, S.; GOYA, L. Hypocholesterolaemic and antioxidant effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) in high-cholesterol fed rats. *Fitoterapia.* 92, 219-229, 2014.

BROEKAERT, J. A. C.; SIEMENS, V. Recent trends in atomic spectrometry with microwave-induced plasmas. *Spectrochim Acta B.* 59, 1823-1839, 2004.

BROWN, P. G.; HAAS, D. L.; WORKMAN, J. M.; CARUSO, J. A. Moderate-Power Argon Microwave-Induced Plasma for the Detection of Metal Ions in Aqueous Samples of Complex Matrix. *Anal. Chem.* 59, 1433-1436, 1987.

BROWN, T. F.; ZERINGUE L. K. Laboratory evaluations of solubility and structural integrity of complexed and chelated trace mineral supplements. *J Dairy Sci.* 77, 181-189, 1994.

BURTNIK, O. J. Yerba mate: Manual de producción. *Yerba Mate: Manual de Producción.* INTA, AER Santo Tomé, Corrientes, Argentina. 52 p.

CAMEL, M.; BECEGATTO, M. G.; VALDUGA, A. T.; CICHOSKI, A. J.; TONIAZZO, G.; VALDUGA, E.; CANSIAN, R. L.; OLIVEIRA, D. Influência do potencial antioxidante de extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis* st. hil) em frango assado, armazenado e reaquecido. *Alim. Nutr.* 23,297-305, 2012.

CARE, A. D.; VAN'T KLOOSTER, A. T. In vivo transport of magnesium and other cations across the wall of the gastro-intestinal tract of sheep. *J. Physiol.* 177, 174-191, 1965.

CARVALHO, F. A. N. A história da suplementação Mineral no Brasil. v1. Presidente Prudente- UNOEST, 2013.

CATAI, R. J. Desenvolvimento de métodos para estudos de interação de polifenóis do mate (*Ilex paraguariensis*) com Ca, Cu, Co, Fe, Mg e Zn e (metalo)proteínas. São Carlos. Pós Doutorado em Química – Embrapa Pecuária Sudeste, 2015. Relatório Científico de pós-doutorado. Processo nº 2012/23452-1, 2-59p.

CHANDRA, S.; MEJIA, E.G. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. *J. Agric. Food Chem.* 52, 3583–3589, 2004.

CHIESA, L.; SCHLABITZ, C.; SOUZA, C. F. V. Efeito da adição de erva-mate nas características sensoriais e físico-químicas de barras de cereais. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 71, 105-110, 2012.

DÍAZ-CRUZ, M. S. BARCELO, D. Recent advances in LC-MS residue analysis of veterinary medicines in the terrestrial environment. *Trac-Trend Anal Chem.* 26, 638-646, 2007.

DYER, I. Mineral requirements. In: HAFEZ, E.; DYER, I. *Animal growth and nutrition.* Philadelphia: Lea e Febiger, 1969.

EL-SONBATY, S. M. ARABY. E. Microbial regulation and protective effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) in gamma-irradiated mice intestine. *J Radiat Res.* 7, 64-73, 2014.

FERNANDES, C. E. F.; KUHN, F.; SCAPINELLO, J.; LAZAROTTO, M.; BOHN, A.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L. ; ZANATTA, M. S.; ZANATTA, L.; MAGRO, J. D.; OLIVEIRA, J. V. Phytochemical profile, antioxidant and hypolipemiant potential of *Ilex paraguariensis* fruit extracts. *Ind Crop Prod.* 81, 139-146, 2016.

FILIP, R.; DAVICINO, R.; ANESINI, C. Antifungal activity of the aqueous extract of *Ilex Paraguariensis* against *malassezia furfur*. *Phytother Res.* 24, 715-719, 2010b.

FILIP, R.; LÓPEZ, P.; GIBERTI, G.; COUSSIO, J.; FERRARO, G. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. *Fitoterapia.* 72,774-778, 2001.

GEAY, Y.; BAUCHART, D.; HOCQUETTE, J. F.; CULIOLI, F. Effect of nutritional factors on biochemical, structural and metabolic characteristics of muscles in ruminants, consequences on dietetic value and sensorial qualities of meat. *Reprod Nutr Dev.* 41, 1-26, 2001.

GENGELBACH, G. P.; WARD, J. D.; SPEARS, J. W. Effect of dietary copper, iron, and molybdenum on growth and copper status of beef cows and calves. *J. Anim. Sci.* 72, 2722-2727, 1994.

GEWEHR, C. E.; LAWISCH, A. A. Antibióticos na nutrição animal. *Agropecuária Catarinense, Florianópolis,* 16, 43-46, 2003.

GINÉ, M. F. R. Espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente (ICP-AES), Piracicaba - CENA, 1998.

GONÇALVES, D. A.; MCSWEENEY, T.; DONATI, G. Characteristics of a resonant iris microwave-induced nitrogen plasma. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry.* 31, 1097–1104, 2016.

GONÇALVES, D. A.; MCSWEENEY, T.; SANTOS, M. C.; JONES, B. T.; DONATI, G. L. Standard dilution analysis of beverages by microwave-induced plasma optical emission spectrometry. *Analytica Chimica Acta.* 909, 24–29, 2016.

GONZÁLEZ, F. H. D.; BARCELLOS, J. O.; OSPINA, H., RIBEIRO, L. A. O. Perfil metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais.

Porto Alegre, Brasil, Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000, 31p.

GRACE, L.; STEVE, L, S, S.; FRED, H. S.; ANDDANIE, T. H. Effect of phytate:zinc molar ratio and isolated soybean protein on zinc bioavailability. *J Nutr.* 111, 2223-2235, 1981.

GRAY, A. L.; DATE, A. R. Plasm source mass spectrometry of inorganic samples - recent developments of the techniqli. *Int J Mass Spectrom.* 46,7-10,1983.

GREENBEEG, S. M.; TUCKER, R. G.; HEMING, A. E.; MATHUES, J. K. Iron absorption and metabolism – Interrelation ship of ascorbic acid and vitamin e. *J. Nutr.* 63,19-31,1957.

HANSARD, S. L.; PLUMPLEE, M. P. Effects of age upon calcium utilization and maintenance requirements in the bovine. *J Anim Sci.* 13, 25-36, 1954.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *J. Nat. Prod.* 59, 205-215, 1996.

HEANEY, R. P. Vitamin D and calcium interactions: functional outcomes. *Am J Clin Nutr.* 88, 541S-544S, 2008.

HECK, C. I.; MEJIA, E. G. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *J Food Sci.* 72, R138-R151, 2007.

HUBER, J. T.; PRICE, N. O. Influence of high dietary calcium and phosphorus and ca'p ratio on liver copper and iron stores in lactating cows. *J Dairy Sci.* 54, 429-432, 1971.

IVANONA, D.; GEROVA, D.; CHERVENKOV, T.; YANKOVA, T. Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* 96, 145-150, 2005.

JANKOWSKI, K. Direct determination of trace amounts of sodium in water-soluble organic pharmaceuticals by microwave induced plasma atomic emission spectrometry. *Talanta.* 54, 855-862, 2001.

JANKOWSKI, K. J.; RESZKE, E. Microwave induced plasma analytical spectrometry. Cambridge: RSC Publishing, 2011.

JANKOWSKI, K.; JACKOWSKA, A.; ŁUKASIAK, P. Determination of precious metals in geological samples by continuous powder introduction microwave induced plasma atomic emission spectrometry after preconcentration on activated carbon. *Anal Chim Acta.* 540, 197-205, 2005.

KARLSSON, S.; SJÖBERG, V.; OGAR, A. Comparison of MP AES and ICP-MS for analysis of principal and selected trace elements in nitric acid digests of Sunflower (*Helianthus annuus*). *Talanta*, 135, 124-132, 2015.

KRAUSE, D. O.; NAGARAJA, T. G.; WRIGHT, A. D. G.; CALLAWAY, T. R. Board-invited review: rumen microbiology: leading the way in microbial ecology. *J. Anim. Sci.* 91, 331-341, 2013.

LAMB, G. C.; BROWN, D. R.; LARSON, J. E.; DAHLEN, C. R.; DILORENZO, N.; ARTHINGTON, J. D.; DICOSTANZO, A. Effect of organic or inorganic trace mineral supplementation on follicular response, ovulation, and embryo production in superovulated angus heifers. *Anim Reprod Sci.* 106, 221-231, 2008.

LANZETTI, M. R. D.; BEZERRA, F. S.; SOUZA, B. R.; LIMA, A. C. B.; KOATZ, V. L. G.; PORTO, L. C. P.; VALENCA, S. S. Mate tea reduced acute lung inflammation in mice exposed to cigarette smoke. *Nutrition.* 24, 375-381, 2008.

LAWRIE, R. A. *Ciência da Carne*. 6ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

LI, W.; SIMMONS, P.; SHRADER, D.; HERMAN, T. J.; DAI, S. Y. Microwave plasma-atomic emission spectroscopy as a tool for the determination of copper, iron, manganese and zinc in animal feed and fertilizer. *Talanta.* 112, 43-48, 2013.

LIMA, A. F.; MIGUEL, C. C.; DEUSMAQUE, C. F.; RICHTER, E. M.; Munoz, R. A. A. Fast ultrasound-assisted treatment of inorganic fertilizers for Mercury determination by atomic absorption spectrometry and microwave-induced plasma spectrometry with the aid of the cold-vapor technique. *Microchem J.* 118, 40-44, 2015.

LIMA, A. F.; MIGUEL, C. C.; DEUSMAQUE, C. F.; RICHTER, E. M.; Munoz, R. A. A. Combination of sonication and heating for metal extraction from inorganic fertilizers prior to microwave-induced plasma spectrometry determinations. *Microchem J.* 103, 124-128, 2016.

LIMA, N. S.; OLIVEIRA, E. O.; SILVA, A. P. S.; MAIA, L. A.; MOURA, E. G.; LISBOA, P. C. Effects of *Ilex paraguariensis* (yerba mate) treatment on

leptin resistance and inflammatory parameters in obese rats primed by early weaning. *Life Sci.* 115, 29-35, 2014.

LINHARES, T. *História Econômica do Mate*. Rio de Janeiro: J. Olympio, 1969.

LOPES, H. O. S. *Suplementação de baixo custo para bovinos: Mineral e Alimentar*. Embrapa: Brasília, 1998.

MACCARI JÚNIOR, A. *Análise do pré-processamento da erva-mate para chimarrão*. Campinas. Engenharia Agrícola, na Área de Concentração Tecnologia Pós- Colheita. UNICAMP. Tese de Doutorado, 2005, 8p.

MACCARI JÚNIOR. A.; MAZUCHOWSKI, J. Z. *Produtos alternativos e desenvolvimento da tecnologia industrial na cadeia produtiva da erva-mate*. Curitiba: Câmara Setorial Produtiva da Erva-Mate do Paraná, 2000. 160p

MARTINS, F.; NOSSO, T. M.; PORTO, V. B.; CURIEL, A.; GAMBERO, A.; BASTOS, D. H. M.; RIBEIRO, M. R.; CARVALHO, P. O. *Maté tea inhibits in vitro pancreatic lipase activity and has hypolipidemic effect on high-fat diet-induced obese mice*. *Obesity*. 18, 42-47, 2010.

MARTINS, F.; SUZAN, A. J.; CERUTTI, S. M.; ARÇARI, D. P.; RIBEIRO, M. L.; BASTOS, D. H. M.; CARVALHO, P. O. *Consumption of mate tea (*Ilex paraguariensis*) decreases the oxidation of unsaturated fatty acids in mouse liver*. *Brit J Nutr.* 101, 527-532, 2009.

MATSUMOTO, R. T.; BASTOS, D. H. M. *Effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) ingestion on mRNA expression of antioxidant enzymes, lipid peroxidation, and total antioxidant status in healthy young women*. *J. Agric. Food Chem.* 57, 1775-1780, 2009.

MATUSIEWICZ, H.; GOLIK, B. *Determination of major and trace elements in biological materials by microwave induced plasma optical emission spectrometry (MIP-OES) following tetramethylammonium hydroxide (TMAH) solubilization*. *Microchem J.* 76, 23-29, 2004.

MATUSIEWICZ, H.; SLASCHCIŃSKI, M. *Simultaneous determination of hydride forming elements (As, Sb, Se, Sn) and Hg in sonicate slurries of biological and environmental reference materials by hydride generation microwave induced plasma optical emission spectrometry (SS-HG-MIP-OES)*. *Microchem J.* 82, 78-85, 2006.

MAVRODINEANU, R.; HUGHES, R. C. *Excitation in radio-frequency discharges*. *Spectrochim Acta.* 19, 1309-1317, 1963.

- MAZUCHOWSKI, J. Z.; RUCKER, N. G. A. Erva-mate: Prospecção tecnológica da cadeia produtiva. Documento Executivo. Curitiba: SEAB, 1997. 27 p.
- McDOWELL, L.R. Minerals in animal and human nutrition. San Diego: Academic Press, 2000.
- MEDEIROS, S. R.; GOMES, R. C.; BUNGENSTAB, D. J. Nutrição de bovinos de corte. Brasília: Distrito Federal, 2015.
- MENDONÇA, A. F. J.; BRAGA, A. P.; RODRIGUES, A. P. M. S.; SALES, L. E. M.; MESQUITA, H. C. Minerais: importância de uso na dieta de ruminantes. ACSA. 7, 1-13, 2011.
- MIRANDA, D. D. C.; ARÇARI, D. P.; PEDRAZZOLI, J.; CARVALHO, P. O.; CERUTTI, S. M.; BASTOS, D. H. M.; RIBEIRO, M. L. Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H₂O₂ - induced DNA damage and DNA repair in mice. *Mutagenesis*. 23, 261-265, 2008.
- MORAES, S. S. Importância da suplementação mineral para bovinos de corte. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001.
- MORAIS, E. C.; STEFANUTO, A.; KLEIN, G. A.; BOAVENTURA, B. C. B. ANDRADE, F.; WAZLAWIK, E.; DI PIETRO, P. F.; MARASCHIN, M.; SILVA, E. L. Consumption of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) Improves Serum Lipid Parameters in Healthy Dyslipidemic Subjects and Provides an Additional LDL-Cholesterol Reduction in Individuals on Statin Therapy. *J. Agric. Food Chem*. 57, 8316-8324, 2009.
- MORRIS, E. R.; ELLIU, U. S. R. Phytate-zinc molar ratio of breakfast cereals and its bioavailability of zinc to rats. *Cereal Chem*. 58, 363-366, 1981.
- MOSEL, M. V.; VAN 'T KLOOSTER, A. T.; WOUTERSE, H. S. Effects of a deficient magnesium supply during the dry period on bone turnover of dairy cows at parturition. *The Veterinary Quarterly*. 13, 199-208, 1991.
- MOTA, R. A. ; SILVA, K. P. C.; FREITAS, M. F. L.; PORTO, W. J. N.; SILVA, L. B. G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 42, 465-470, 2005.

MURILLO, M.; CARRIÓNS, N.; CHIRINOS, J.; GAMMIERO, A.; EDMONDO, F. Optimization of experimental parameters for the determination of mercury by MIP:AES. *Talanta*. 54, 389-395, 2001.

NIEDZIELSKI, P.; KOZAK L.; WACHELKA, M.; JAKUBOWSKI, K.; WYBIERALSKA, J. The microwave induced plasma with optical emission spectrometry (MIP-OES) in 23 elements determination in geological samples. *Talanta*, 132, 591-599, 2015.

NRC – NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrient requirements of dairy cattle. 7. Ed., National Academy Press: Washington D.C, 2001.

O'DELL, B.L. Bioavailability of trace elements. *Nutr Rev.* 42, 301-308, 1984.

PADILHA, A. D. G. Antioxidante natural de erva-mate na conservação da carne de frango in vivo. Santa Maria. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Área de Concentração em Tecnologia de Carnes – UFSM, 2007. Dissertação de Mestrado, 1-96p.

PRECI, D.; CICHOSKI, A. J.; VALDUGA, A. T.; OLIVEIRA, D.; VALDUGA, E.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; CANSIAN, R. L. Desenvolvimento de iogurte light com extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis* st. Hil) e adição de probióticos. *Alim. Nutr.* 22, 27-38, 2011.

QI, M.; WANG, P.; O'TOOLE, N.; BARBOZA, P. S.; UNGERFELD, E.; LEIGH, M. B.; SELINGER, L. B.; BUTLER, G.; TSANG, A.; McALLISTER, T.A; FORSTER, R. J. Snapshot of the eukaryotic gene expression in muskoxen rumen-a metatranscriptomic approach. *Plos One.* 6, 1-12, 2011.*

RACANICCI, A. M. C.; MENTEM, J. F. M.; SEVERINO, M. A.; BUISSA, R.S.; SKIBSTED, L. H. Mate (*Ilex paraguariensis*) as dietary additive for broilers: performance and oxidative stability of meat. *Eur Food Res Technol.* 232, 655–661, 2011

RESENDE, P. E.; KAISER, S.; PITTOL, V.; HOEFEL, A. L.; SILVA, R. D.; MARQUES, C. V.; KUCHARSKI, L. C.; ORTEGA, G. G. Influence of crude extract and bioactive fractions of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (yerba mate) on the Wistar rat lipid metabolism. *J Funct Foods.* 15, 440-451, 2015.

SANTOS, E. C. S.; BICCA, M. A.; BLUM-SILVA, C. H.; COSTA, A. P. R.; SANTOS, A. A.; SCHENKEL, E. P.; FARINA, M.; REGINATTO, F. H.; LIMA, T. C. M. Anxiolytic-like, stimulant and neuroprotective effects of *Ilex paraguariensis* extracts in mice. *Neuroscience.* 292, 13–21, 2015.

SCHULTZ, A. Introdução à Botânica Sistemática. 5. Ed. Ver. Porto Alegre. Editora da UFRGS, 1985.

SILVA, J. F. C.; LEÃO, M. I. Fundamentos de Nutrição de Ruminantes. Piracicaba: Licroceres, 1979.

SMITH, R. H. Net exchange of certain inorganic ions and water in the alimentary tract of the milk-fed calf. *Bio Chem. J.* 83, 151-163, 1962.

SMITH, O. B.; AKINBAMIJO, O. O. Micronutrients and reproduction in farm animals. *Anim Reprod Sci.* 60-61, 549-560, 2000.

SPEARS, J. W. Reevaluation of the metabolic essentiality of the minerals. Review. *J. Anim. Sci.* 12, 1002-1008, 1999.

SPEARS, J. W.; KEGLEY E. B.; MULLIS L. A. Bioavailability of copper from tribasic copper chloride and copper sulfate in growing cattle. *Anim Feed Sci Tech.* 116, 1–13, 2004.

STEEVENS, B. J.; BUSH, L. J.; STOUT, J. D. WILLIAMS, E. I. Effects of varying amounts of calcium and phosphorus in rations for dairy cow. *J. Dairy Sci.* 54, 655-661, 1971.

STOLKER, A. A.; ZUIDEMA, T.; NIELEN, M. W. F. Residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents. *Trac-Trend Anal Chem.* 26, 967-979, 2007.

STRASSMANN, B. B.; VIEIRA, A. R.; PEDROTTI, E. L.; MORAIS, H. N. F.; DIAS, P. F.; MARASCHIN, M. Quantitation of Methylxanthinic Alkaloids and Phenolic Compounds in Mate (*Ilex paraguariensis*) and Their Effects on Blood Vessel Formation in Chick Embryos. *J. Agric. Food Chem.* 56, 8348-8353, 2008.

STUBBINGS, G.; BIGWOOD, T. The development and validation of a multiclass liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) procedure for the determination of veterinary drug residues in animal tissue using a QuEChERS (QUick, Easy, CHEap, Effective, Rugged and Safe) approach. *Anal Chim Acta.* 637, 68-78, 2009.

SUTTLE, N.F. Mineral Nutrition of Livestock. 4 ed. Cambridge: CABI Publishing, 2010.

THIELE-BRUHN, S. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils – a review. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 166, 145-157, 2003.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V. Deficiências minerais em animais de fazenda, principalmente bovinos em regime de campo. *Pesq. Vet. Bras.* 20, 127-138, 2000.

UNDERWOOD, A.J.; SUTTLE, N.F. *The mineral Nutrition of Livestock*. 3, Cambridge: CABI Publishing, 1999.

VAN CAMPEN, D. R. Copper interference with the intestinal absorption of zinc-65 by rats. *J Nutr.* 97,104-108, 1969.

VÁSQUEZ, F. A. V.; HERRERA, A. N.; GENARIO, S.S. Copper, molybdenum and sulphur interaction in ruminant nutrition. *Ciência Rural.* 31, 1101-1106, 2001.

WEDEKIND, K. J. HORTIN, A. E. BAKER, D. H. J. Methodology for assessing zinc bioavailability: efficacy estimates for zinc-methionine zinc sulfate, and zinc oxide. *Anim. Sci.* 70, 178-187, 1992.

WHITING, S. J., WOOD, R. J. Adverse effects of high calcium diets in humans. *Nutrition Reviews*, New York, 55, 1-9, 1997.

WILDE, D. Influence of macro and micro minerals in the peri-parturient period on fertility in dairy cattle. *Anim Reprod Sci.* 96, 240-249, 2006.

WOLLENBERG, P.; RUMMEL, W. Dependence of intestinal iron absorption on the valency state of iron. *N-S Arch Pharmacol.* 336, 578-582, 1987.

XIAO, J. B.; KAI, G.; YANG, F.; LIU, C.; XU, X.; KOICHIRO, Y. Molecular structure-affinity relationship of natural polyphenols for bovine c-globulin. *Mol Nutr Food Res.* 55: 86-92, 2011.

XU, G. H.; KIM, Y.H.; CHOO, S. J; RYOO, I. J; YOO, J. K.; AHN, J. S.; YOO, I. D. Chemical constituents from the leaves of *ilex paraguariensis* inhibit human neutrophil elastase. *Arch Pharm Res.* 32, 1215-1220, 2009.

YADRICK, M. K.; KATHLEEN, M.; KENNEY, M. A.; WINTERFELDT. E. A. Iron, copper, and zinc status: response to supplementation with zinc or zinc and iron in adult females. *Am J Clin Nutr.* 49, 145-150,1989.

ZHANA, J.; YU, X.; ZHONG, Y.; ZHANG, Z.; CUI, X.; PENG, J.; FENG, R.; LIU, X.; ZHU, Y. Generic and rapid determination of veterinary drug residues and other contaminants in raw milk by ultra performance liquid

chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* 906, 48-57, 2012.