UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

Vitória Leite Di Domenico

MONITORAMENTO DA QUALIDADE DO LEITE DE BÚFALA (*Bubalus bubalis*) PRODUZIDO NA ESTAÇÃO EXPERIMENTAL AGRONÔMICA DA UFRGS E DESENVOLVIMENTO DO QUEIJO COLONIAL BUBALINO

Porto Alegre
2023

Vitoria Leite Di Domenico

MONITORAMENTO DA QUALIDADE DO LEITE DE BÚFALA (*Bubalus bubalis*) PRODUZIDO NA ESTAÇÃO EXPERIMENTAL AGRONÔMICA DA UFRGS E DESENVOLVIMENTO DO QUEIJO COLONIAL BUBALINO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestra em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientadora: Profª Drª Amanda de Souza da Motta

Porto Alegre

2023

CIP - Catalogação na Publicação

Di Domenico, Vitória Leite
Monitoramento da qualidade do leite de búfala (Bubalus bubalis) produzido na Estação Experimental Agronômica da UFRGS e desenvolvimento do queijo Colonial bubalino / Vitória Leite Di Domenico. -- 2023.
88 f.
Orientadora: Amanda de Souza da Motta.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. búfalo. 2. boas práticas agropecuárias. 3. queijo artesanal. 4. orégano. 5. microbiologia. I. Motta, Amanda de Souza da, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

Durante esta caminhada, tive ao meu lado pessoas que representam uma importante contribuição no desenvolvimento deste projeto. Primeiramente agradeço à minha **família**, por todo apoio e incentivo. Em especial, aos meus pais **Joice e André**, e aos meus irmãos **Andressa e Pedro**, que sempre me incentivaram e acreditaram na minha capacidade, servindo de alicerce para as minhas realizações. Ao meu namorado, **Samuel**, que acima de tudo é um grande amigo, sempre presente nos momentos me apoiando, agradeço por toda ajuda e incentivo. Obrigada pela compreensão e paciência durante o período do projeto. Vocês foram essenciais!

Agradeço à minha orientadora, **Profª. Amanda de Souza da Motta**, que me orientou nesta jornada de construção da trajetória acadêmica. Obrigada pela oportunidade e pelas contribuições dadas durante todo o processo!

Agradeço à toda equipe da **Estação Experimental Agronômica da UFRGS**, que sempre foi muito acolhedora neste lugar que se tornou minha segunda casa durante o mestrado. Em especial ao Diretor **Prof. Rafael Dionello** e à Médica Veterinária **Drª. Verônica Rolim**, por todo apoio e assistência prestada ao longo deste projeto.

Agradeço à **Ana Raisa Paiva do ICTA**, por ter me recebido tão bem e auxiliado na produção dos queijos, mas também pela colaboração para a análise dos ácidos graxos. Agradeço também à **equipe do LFDA/RS-MAPA**, em especial à **Louise Jank** e a **Caroline Andrade Tomaszewski**, por colaborarem nas análises de resíduos.

Agradeço ao meu grupo de trabalho, **Franciele Fernandes**, **Júlia Bopp**, **Henrique Rodrigues** e **Fábio Costa**, que juntamente ao **Samuel**, me acompanharam no último ano em todos os manejos, sob sol ou chuva, e sempre foram incansáveis. Juntos conseguimos crescer, ultrapassando todos os obstáculos! Agradeço também à todas amigas e amigos que me acompanharam ao longo dessa trajetória, com palavras de afeto, e compreendendo as minhas ausências.

Agradeço às meninas do laboratório (antigo 222-C, e agora 538), em especial à **Priscila Jankoski**, **Andreia Lermen**, **Nathasha Noronha** e **Fernanda Genehr**, que muito além de colegas, se tornaram minhas amigas. Obrigada pela troca de experiências e parceria de sempre!

Aos professores do **PPGMAA**, e a secretária **Eladir Rodrigues**, que

sempre me auxiliou quando precisei!

A **Associação Sulina de Criadores de Búfalos (ASCRIBU)** por toda parceria, e apoio. Obrigada por acreditarem no trabalho da Universidade!

Por fim, agradeço à **Universidade Federal do Rio Grande do Sul** e à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** (CAPES) pela concessão da bolsa.

MONITORAMENTO DA QUALIDADE DO LEITE DE BÚFALA (*Bubalus bubalis*) PRODUZIDO NA EEA-UFRGS E DESENVOLVIMENTO DO QUEIJO COLONIAL BUBALINO[1]

Autora: Vitória Leite Di Domenico

Orientadora: Profª Drª Amanda de Souza da Motta

RESUMO

No Brasil e em vários países, o leite de búfala se destina à fabricação de derivados como a mozzarella, mas ainda se carece de um regulamento técnico que estabeleça padrões de identidade e qualidade para o leite bubalino. O objetivo deste estudo foi monitorar a qualidade do leite bubalino produzido na Estação Experimental Agronômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, bem como desenvolver um queijo Colonial bubalino. Em um primeiro momento, foi realizado o monitoramento da qualidade do leite na Estação Experimental Agronômica da UFRGS, que possibilitou a produção do queijo Colonial com leite bubalino. A partir das especiarias utilizadas na produção dos queijos, foram realizados experimentos afim de estudar o potencial antimicrobiano dos mesmos. As médias obtidas para gordura, proteína, lactose, sólidos totais, sólidos não gordurosos, acidez, densidade, índice crioscópico, contagem de células somáticas e contagem padrão em placa foram 4,84 g/100 g, 4,64 g/100 g, 5,06 g/100g, 15,26 g/100 g, 10,42 g/100g, 0,18 g ácido lático/100 mL de leite, 1,037 g/cm³, -0,533°C, 3,5 x10^5 cél/mL e 8,0 x10^3 UFC/ml, respectivamente. Não foram identificados resíduos de antibióticos e antiparasitários, e foi observada a predominância dos ácidos graxos palmítico (C16:0) e oleico (C18:1- cis (n9)). A produção do queijo Colonial a partir do leite bubalino apresentou uma boa viabilidade, além de estar em conformidade com a legislação vigente. Através da adição do uso de especiarias, foi possível obter variações do produto, além de estudar o potencial antimicrobiano do orégano, que demonstrou a capacidade de inibir bactérias patogênicas de alimentos, como o *Staphylococcus aureus*. Portanto o leite de búfala foi identificado como uma matéria prima atrativa para a prospecção de queijo Colonial, bem como uso do orégano proporcionou não apenas uma diferenciação no produto final, mas também a conservação do mesmo.

Palavras chave: boas práticas agropecuárias, *Bubalus bubalis*, búfalo, Colonial, leite cru, microbiologia, orégano.

[1]Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (88 p.) Março, 2023.

MONITORING THE QUALITY OF BUFFALO MILK (*Bubalus bubalis*) PRODUCED IN THE EEA-UFRGS AND DEVELOPMENT OF COLONIAL BUFFALO CHEESE[1]

Author: Vitória Leite Di Domenico

Advisor: Profª Drª Amanda de Souza da Motta

ABSTRACT

In Brazil and in several countries, buffalo milk is used to manufacture derivatives such as mozzarella, but there is still a lack of a technical regulation that establishes identity and quality standards for buffalo milk. The aim of this study was to monitor the quality of buffalo milk produced at the Experimental Agronomic Station of the Federal University of Rio Grande do Sul, as well as to develop a buffalo Colonial cheese. At first, milk quality was monitored at the UFRGS Agronomic Experimental Station, which enabled the production of Colonial cheese with buffalo milk. From the spices used in cheese production, experiments were carried out to study their antimicrobial potential. The averages obtained for fat, protein, lactose, total solids, non-fat solids, acidity, density, cryoscopic index, somatic cell count and standard plate count were 4.84 g/100 g, 4.64 g/100 g, 5.06 g/100g, 15.26 g/100 g, 10.42 g/100g, 0.18 g lactic acid/100 mL, 1.037 g/cm^3, -0.533°C, 3.5 x10^5 cél/mL e 8.0 x10^3 CFU/ml. Residues of antibiotics and antiparasitics were not identified, and the predominance of palmitic (C16:0) and oleic (C18:1- cis (n9)) fatty acids was observed. The production of Colonial cheese from buffalo milk showed good viability. Through the addition of spices, it was possible to obtain product variations, in addition to studying the antimicrobial potential of oregano, which demonstrated the ability to inhibit foodborne pathogenic bacteria, such as *Staphylococcus aureus*. Therefore, buffalo milk was identified as an attractive raw material for prospecting Colonial cheese, as well as the use of oregano provided not only a differentiation in the final product, but also its conservation.

Keywords: good agricultural practices, *Bubalus bubalis*, buffalo, colonial, raw milk, microbiology, oregano.

[1]Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (88 p.) March, 2023.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO **1**
2. OBJETIVOS **3**
2.1 Objetivo Geral 3
2.2 Objetivos Específicos 3
3. REVISÃO DA LITERATURA **4**
3.1 Bubalinocultura 4
3.2 Leite bubalino 4
3.3 Fatores que influenciam na qualidade do leite bubalino 6
3.4 Produção de derivados com leite bubalino 9
3.4.1 Queijo colonial 10
3.5 Uso de especiarias na indústria de alimentos 12
4. MATERIAL E MÉTODOS **15**
4.1 Monitoramento da qualidade do leite de búfala produzido na EEA-UFRGS. 15
4.1.1 Local de estudo e manejo do rebanho experimental 15
4.1.2 Coleta de amostras de leite bubalino 15
4.1.2.1 Sanidade da glândula mamária 16
4.1.2.2 Análises de leite individuais: Contagem de Células Somáticas e composição centesimal 17
4.1.2.3 Análises do leite de conjunto: Físico-químico e Contagem Padrão em Placa 18
4.1.2.4 Resíduos de antibióticos e antiparasitários 18
4.1.2.5 Perfil de ácidos graxos 18
4.1.3 Coleta e análise microbiológica das amostras de água 19
4.2 Desenvolvimento e caracterização do queijo Colonial bubalino 19
4.2.1 Produção dos queijos Coloniais bubalinos 19
4.2.2 Preparo das amostras dos queijos 22
4.2.2.1 Análises bromatológicas dos queijos artesanais tipo Colonial bubalino 22
4.2.2.2 Análises microbiológicas dos queijos coloniais bubalinos 23
4.3 Potencial antimicrobiano das especiarias 25
4.3.1 Culturas indicadoras 25
4.3.2 Produção dos extratos aquosos das especiarias 26
4.3.3 Teste *in vitro* com extrato aquoso das especiarias 26
4.3.4 Teste em matriz alimentar leite com o orégano desidratado 27

4.4 Análise estatística 28
5. RESULTADOS 30
5.1 Monitoramento da qualidade do leite de búfala (*Bubalus bubalis*) produzido na Estação Experimental Agronômica da UFRGS 30
5.1.1 Rebanho bubalino 30
5.1.2 Sanidade da glândula mamária 30
5.1.3 Análises de leite individuais: Contagem de Células Somáticas e composição centesimal 32
5.1.4 Análises do leite de conjunto: Físico-químico e Contagem Padrão em Placa 36
5.1.5 Resíduos de antimicrobianos e antiparasitários 36
5.1.6 Perfil de ácidos graxos 36
5.1.7 Análise microbiológica das amostras de água 39
5.2 Desenvolvimento e caracterização do queijo Colonial bubalino 40
5.2.1 Produção dos queijos Coloniais bubalinos 40
5.2.2 Análises bromatológicas dos queijos Coloniais bubalinos 42
5.2.3 Análises microbiológicas dos queijos Coloniais bubalinos 42
5.3 Potencial antimicrobiano das especiarias 43
5.3.1 Teste *in vitro* com extrato aquoso das especiarias 43
5.3.2 Teste em matriz alimentar leite com orégano desidratado 45
6. DISCUSSÃO 48
7. CONCLUSÕES 59
8. REFERÊNCIAS 60
9. APÊNDICES 69
9.1 Manual de Boas Práticas Agropecuárias 69
9.2 Submissão do Artigo 71
10. ANEXOS 74
10.1 Carta de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) 74
10.2 Aplicativo de gestão de bubalinos 75

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Valores médios da composição do leite de búfala na literatura..... **5**

Tabela 2. Legislação para leite cru bovino e bubalino..... **6**

Tabela 3. Tratamentos com extrato aquoso das especiarias utilizados nos testes in vitro..... **27**

Tabela 4. Tratamentos e condições de incubação das amostras de leite de búfala para o teste em matriz alimentar..... **28**

Tabela 5. Resultados do teste da caneca de fundo preto e do California Mastitis Test (CMT) realizados como parte do protocolo para manejo da saúde da glândula mamária..... **31**

Tabela 6. Médias mensais das análises individuais para CCS, composição centesimal e produção de leite bubalino na EEA/UFRGS..... **33**

Tabela 7. Média individual das búfalas A, B, C, D e E durante a lactação para CCS, composição centesimal e produção de leite na EEA/UFRGS..... **35**

Tabela 8. Médias mensais dos resultados físico-químicos e de CPP do leite bubalino de conjunto produzido na EEA/UFRGS..... **36**

Tabela 9. Ácidos graxos livres (AGL) do leite de bubalino produzido de conjunto na EEA-UFRGS..... **37**

Tabela 10. Resultado das análises de água realizadas no Tambo da EEA-UFRGS..... **39**

Tabela 11. Análises bromatológicas dos queijos coloniais bubalinos..... **42**

Tabela 12. Contagens microbiológicas dos queijos coloniais bubalinos..... **42**

Tabela 13. Média e desvio padrão dos halos de inibição obtidos através dos testes in vitro com extrato aquoso das especiarias nos microrganismos indicadores e microrganismos isolados a partir de amostras de queijo artesanal no Rio Grande do Sul em 10^6 UFC/mL..... **44**

Tabela 14. Média das contagens de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 para o teste do orégano na matriz alimentar leite incubado em temperatura ambiente e sob refrigeração por 48 horas..... **46**

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Fluxograma de produção dos queijos coloniais bubalinos..... **20**

Figura 2. Pingo, ou fermento lácteo natural, liofilizado..... **21**

Figura 3. Leite bubalino durante o processo de coagulação..... **21**

Figura 4A. Corte da massa após a coagulação..... **21**

Figura 4B. Processo de dessoragem após o corte da massa..... **21**

Figura 5A. Queijo Colonial bubalino (CB) durante a salga a seco..... **41**

Figura 5B. Queijo Colonial bubalino (CB) após 28 dia de maturação..... **41**

Figura 6A. Queijo Colonial bubalino com tomate seco (CTS) após produção..... **41**

Figura 6B. Queijo Colonial com tomate seco (CTS) após 28 dia de maturação..... **41**

Figura 7A. Queijo Colonial bubalino com orégano e pimenta calabresa (COP) após produção..... **41**

Figura 7B. Queijo Colonial com orégano e pimenta calabresa (COP) após 28 dia de maturação..... **41**

Figura 8. Curva de crescimento do *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 em matriz alimentar leite nos tratamentos com adição de orégano 0,25% e controles sem orégano em duas temperaturas de incubação por um período de 48 horas..... **47**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CB	Queijo Colonial bubalino
CBT	Contagem Bacteriana Total
CCS	Contagem de Células Somáticas
CMT	California Matitis Test
COP	Queijo Colonial bubalino com orégano e pimenta calabresa
CTS	Queijo Colonial bubalino com tomate seco
EEA	Estação Experimental Agronômica
g	Grama
ICBS	Instituto de Ciências Básicas da Saúde
ICTA	Instituto de Ciência e Tecnologia dos Alimentos
L	Litro
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MS	Matéria seca
RTIQ	Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade
SNG	Sólidos não gordurosos
ST	Sólidos totais
UA	Unidade Animal
UFC	Unidades formadoras de colônias
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul

1. INTRODUÇÃO

A exploração leiteira dos bubalinos é uma atividade que tem crescido nos últimos anos e atualmente é o segundo mais produzido no mundo, ficando atrás apenas do leite bovino. Isto ocorre principalmente devido às características físico-químicas apresentadas pelo leite, que possui teores de gordura, proteína e sólidos totais maiores quando comparado ao leite bovino. Apesar de apresentar mais gordura, a concentração total de colesterol do leite bubalino é inferior a encontrada no leite das vacas bovinas, além de possuir valores elevados de ácidos graxos de cadeia longa, como o ácido linoleico conjugado (CLA), conhecido como Ômega 3, que atua contra a obesidade e possui efeito anti-inflamatório.

Entretanto, a qualidade do leite cru de búfala pode variar devido a alguns fatores ambientais que influenciam cada um de seus componentes, como por exemplo a nutrição animal, o estágio da lactação e a estação do ano; sendo que os teores de gordura, proteína e sólidos totais são os mais susceptíveis a influência desses fatores. Além disso, ainda pode estar exposto a fontes de contaminação microbiológica provenientes do ambiente produtivo, através de fatores como o manejo, a higiene da ordenha, e a qualidade da água, que contribuem de modo importante para as condições microbiológicas do leite como produto. Dessa forma, torna-se importante a adequação do manejo de ordenha às Boas Práticas Agropecuárias (BPA), que são processos que devem ocorrer em todas as etapas da produção para assegurar a inocuidade do leite e de seus derivados.

Pelas características apresentadas, o leite de búfala torna-se uma matéria prima de qualidade para a elaboração de queijos e outros derivados. Todas as suas propriedades refletem nos produtos derivados, que além de possuírem inúmeros benefícios para a saúde, ainda demonstram um rendimento quase 50% superior ao do leite bovino. No Brasil, o leite de búfala destina-se principalmente ao mercado de derivados como a mozzarella, entretanto, prospectar o desenvolvimento de outros produtos como um queijo Colonial com leite bubalino, poderá ser uma alternativa importante, considerando o atual cenário de desenvolvimento de produtos artesanais e seu respaldo legal. O queijo Colonial, produzido pela coagulação e fermentação do leite bovino, tem na sua origem relação com a colonização italiana no Estado do Rio Grande do Sul, sendo considerado um patrimônio das comunidades que o produzem. A importância regional do queijo Colonial, associada às características apresentadas pelo leite bubalino, indicam um mercado em potencial a ser explorado.

Assim, este estudo foi motivado pela busca da consolidação do rebanho bubalino leiteiro da Estação Experimental Agronômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (EEA-UFRGS), através do monitoramento dos padrões de identidade e qualidade do leite bubalino produzido durante a implantação do sistema de produção, possibilitando o estabelecimento de um controle mais profícuo, com perspectiva de expansão do rebanho experimental e desenvolvimento de produtos derivados em pesquisas futuras.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Os objetivos deste estudo foram monitorar a qualidade do leite bubalino produzido na Estação Experimental da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (EEA-UFRGS), bem como desenvolver e caracterizar um queijo Colonial a partir do leite bubalino.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Realizar o manejo da sanidade da ordenha e da glândula mamária;

2.2.2 Estudar a qualidade do leite bubalino produzido na EEA-UFRGS;

2.2.3 Desenvolver e caracterizar um queijo Colonial a partir do leite bubalino;

2.2.4 Estudar o potencial antimicrobiano de especiarias utilizadas na produção do queijo frente a bactérias patogênicas de alimentos.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Bubalinocultura

Os búfalos são animais da família Bovidae, subfamília Bovinae e espécie *Bubalus bubalis*, que vêm sendo utilizados como recurso animal de grande importância em muitos países da Ásia, Europa e na América Latina (Perera, 2011), sendo o Brasil um dos maiores centros de criação de bubalinos fora da Ásia (Neto et al., 2020). No ano de 2020, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2020), o efetivo de bubalinos contabilizados no Brasil foi de 1.502.482 cabeças no Brasil e 48.883 cabeças no Rio Grande do Sul.

A criação de búfalos foi difundida mundialmente, devido à superioridade econômica que pode apresentar em relação a outros ruminantes domésticos, principalmente no que diz respeito à rusticidade e adaptação às várias condições climáticas e manejo (Lourenço Junior, 2005). Segundo Mirmahmoudi e Prakash (2012) a importância econômica na exploração desses animais reside também, nas vantagens proporcionadas quanto à fertilidade, longevidade, eficiência de conversão alimentar e aptidão para a produção de leite, carne e trabalho. O búfalo é considerado um animal de dupla aptidão, pois possui capacidade de produzir leite e carne, e se apresenta como uma importante fonte alternativa de produção de alimentos para suprir as demandas dos países em desenvolvimento (Sales, 1995), por aproveitarem melhor as forrageiras de reduzido valor nutritivo, em áreas de difícil utilização por outras espécies e pela agricultura, como áreas inundadas ou de relevo acidentado (Ohly & Hund, 1996).

3.2 Leite bubalino

A exploração leiteira dos bubalinos é uma atividade que tem crescido no mundo nos últimos anos e entre 2010 e 2020 esse crescimento foi de aproximadamente 45% (FAO, 2021). Isto ocorreu principalmente às características apresentadas pelo leite, que possui níveis elevados de proteína, gordura e minerais quando comparado ao leite da vaca bovina (Zanela, 2011; Pignata et al., 2014; Godinho et al., 2020), conforme descrito na Tabela 1. No Rio Grande do Sul, em um estudo realizado por Godinho et al. (2020), foi possível realizar um mapeamento de 100% dos produtores de leite bubalino no Estado, estabelecendo os padrões de identidade e qualidade do leite produzido.

Tabela 1. Valores médios da composição do leite de búfala na literatura

Autor	Estado	Gordura (g/100 g)	Proteína (g/100 g)	Lactose (g/100 g)	Sólidos Totais (g/100 g)
Amaral et al. (2004)	Minas Gerais	6,83	4,19	4,93	17,19
Godinho et al. (2020)	Rio Grande do Sul	5,5	4,06	5,07	15,5

O Brasil concentra o maior rebanho de búfalos do Ocidente, o que mostra um grande potencial de mercado e atualmente, aproximadamente 30% das criações são destinadas à produção de leite (ABCB, 2021). O leite bubalino é o segundo mais produzido no mundo, ficando atrás apenas do leite bovino, e em 2019 representava aproximadamente 15% da produção mundial de leite (FAO, 2021). De acordo com a OECD/FAO (2021), uma colaboração entre a Organização para o Desenvolvimento da Cooperação Econômica (OECD) e a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), essa produção deve aumentar 1.7% ao ano na próxima década para atender ao aumento do consumo mundial de produtos lácteos, impulsionado pelo aumento da população e da renda em países em desenvolvimento.

Apesar de ser mais calórico, a concentração total de colesterol por 100 gramas de lipídeos no leite de búfala é inferior a encontrada no leite das vacas bovinas (275 mg versus 330 mg por 100 g de gordura) (Franciscis & Di Palo, 1994). Os resultados apresentados por Verruma & Salgado (1994) indicaram valores elevados de ácidos graxos de cadeia longa, como o ácido linoleico conjugado (CLA), popularmente conhecido como Ômega 3, que atua contra a obesidade, possui efeito anti-inflamatório e diminui os níveis de triglicerídeos do sangue. Em um estudo comparativo realizado por Pignata et al. (2014), foram constatados resultados semelhantes com menores teores de colesterol e menor razão entre os ácidos graxos Ômega 6/Ômega 3 em relação ao leite de bovino.

As proteínas do leite são divididas em caseínas e proteínas do soro (albumina, globulinas e imunoglobulinas), sendo que as caseínas representam aproximadamente 20% do total das proteínas presentes. Um aspecto importante com relação às caseínas, é que em um estudo de caso realizado em Harvard (Sheehan & Phipatanakul, 2009), foi verificado que pessoas que possuíam alergia às proteínas do leite bovino não demonstravam as mesmas reações quando consumiam leite bubalino. Isso se deve ao fato de que o leite de búfala possui apenas a beta-caseína

A2 e não a beta-caseína A1, proteína que está ligada ao surgimento de inflamações intestinais, excesso de contrações, e responsável pelo desencadeamento de alergias no consumo de leite bovino (Mishra et al., 2009).

O leite de búfala é ainda uma importante fonte das vitaminas, como a B2 (riboflavina), A (retinol), C (ácido ascórbico) e D, cuja principal função é regular o fornecimento de cálcio e fósforo no organismo. Também rico em minerais, se destaca pelos teores de cálcio e ferro, apresentando uma relação Ca:P de 1,71, enquanto no leite bovino é de 1,31 (Franciscis & Di Palo, 1994).

No Brasil, o leite de búfala destina-se principalmente ao mercado de derivados, que está em ascensão (Ricci & Domingues, 2012) entretanto, ainda carece de um regulamento técnico que estabeleça os seus padrões de identidade e qualidade. Como o Brasil não possui legislação federal específica para o leite bubalino, deve-se atender o estabelecido na Instrução Normativa n° 76 de 26 de novembro de 2018 (Brasil, 2018b), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), e apenas o Estado de São Paulo possui limites específicos para o leite de búfala, estabelecidos na Resolução SAA – 03 (São Paulo, 2008), ambas descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Legislação para leite cru bovino e bubalino

Legislação	Gordura (g/100g)	Proteína (g/100g)	Lactose (g/100g)	SNG (g/100g)	ST (g/100 g)	Acidez (g ácido/100 mL)	Densidade (g/cm3)	IC (°C)
In 76 (Brasil, 2018b)	3,0	2,9	4,3	8,4	11,4	0,14 à 0,18	1,028 à 1,034	-0,512 à -0,536
SAA-03 (São Paulo, 2008)	4,5	-	-	8,57	13,07	0,14 à 0,23	1,028 à 1,034	-0,520 à -0,570

In: instrução normativa. SAA: resolução da Secretaria de Agricultura e Abastecimento. SNG: sólidos não gordurosos. ST: sólidos totais. IC: índice crioscópico.

3.3 Fatores que influenciam na qualidade do leite bubalino

Muitos parâmetros podem ser usados para avaliar a qualidade do leite; entre elas estão características físico-químicas, nutricionais, higiênicas e sanitárias. As principais características físico-químicas geralmente consideradas como parâmetros de qualidade do leite são: proteínas, gorduras, lactose, cálcio e sólidos desengordurados. Para a avaliação sanitária é importante verificar, além da contaminação microbiológica, a presença de células somáticas (Jorge et al., 2005; Pasquini et al., 2018). Mas apesar de possuir inúmeros benefícios, a qualidade do leite

pode variar devido a diversos fatores que influenciam cada um de seus componentes, como fatores ambientais, nutrição, estágio da lactação e qualidade da ordenha.

Em um estudo desenvolvido por Amaral et al. (2004), os autores demonstraram que os níveis de gordura, proteína e sólidos totais são os mais susceptíveis à influência desses fatores. Foram reportados maiores percentuais de gordura na primavera e menores no outono e no verão; enquanto que para a proteína, há teores mais elevados no verão e os menores no inverno. As variações dos sólidos totais acompanharam as dos níveis de gordura, devido a este ser o teor que sofre maior alteração. Estes resultados estão de acordo com os reportados por Godinho et al. (2020) em um estudo realizado com os produtores bubalinos do Rio Grande do Sul, em que no verão, a média de proteína e SNG no leite bubalino produzido no Rio Grande do Sul foi de 4.27 g/100 g e 10.17 g/100 g, respectivamente, enquanto no inverno a proteína reduziu para 3.9 g/100 g e os SNG para 9.83 g/100g.

Essas variações que ocorrem na qualidade do leite referente as estações também podem ser explicadas, em parte, devido ao comportamento reprodutivo das búfalas. O fotoperíodo é o principal regulador desse comportamento, pois as búfalas são poliéstricas sazonais de dias curtos, ou seja, possuem como estímulo para a reprodução a diminuição da luminosidade (Torres-Jr, 2016). Dessa forma, com a estação de monta estabelecida nos meses de outono, há a concentração das parições nos meses de verão, com um consequente aumento no número de animais em início de lactação.

Os componentes do leite ainda estão sujeitos a variações nutricionais, como a relação entre volumoso e concentrado, quantidade e qualidade da fibra, e tipo de concentrado. De uma forma geral, as búfalas em lactação produzem bem quando o alimento é fornecido em quantidade suficiente para cobrir as exigências de mantença e produção (Bernardes, 2010). Entretanto, a adequação das exigências das búfalas tem sido uma dificuldade para os produtores, devido à escassez de informações específicas, que muitas vezes são baseadas nas exigências de vacas bovinas e em algumas situações, mal atendem a mantença durante o inverno.

Além disso, variações na contagem de células somáticas (CCS) também devem ser monitoradas com atenção, já que a mesma pode ser considerada um indicador da sanidade do rebanho. A presença de elevadas contagens no leite infere o risco de contaminação por patógenos, enquanto uma baixa CCS pode ser considerada reflexo do bom estado sanitário do rebanho (Smith, 2001). A mastite, que

provoca o aumento da contagem de células somática, pode promover também alterações na composição do leite, como a gordura, proteína e lactose. Isto ocorre porque a inflamação gera uma alteração na permeabilidade dos vasos sanguíneos, prejudicando a síntese do leite pelo tecido secretor da glândula mamária, além da ação direta dos microrganismos patogênicos e de suas enzimas (Machado et al., 2000). Devido às penalidades aplicadas pelos laticínios, redução na produção e gastos com medicamentos, a alta CCS representa, portanto, um menor retorno financeiro para o produtor (García, 2014). O limite estabelecido para a CCS em leite cru, de acordo com a Instrução Normativa nº 76 de 26 de novembro de 2018 (Brasil. 2018b), é de 500.000 cel/mL, enquanto o valor médio obtido por Godinho et al. (2020) para leite bubalino no Rio Grande do Sul foi de 95.000 cel/mL.

O leite cru pode conter ainda uma alta contaminação microbiológica proveniente do ambiente produtivo, devido a fatores como a qualidade da água e higienização de utensílios, que contribuem de modo importante para as condições microbiológicas do leite como produto e seus derivados. De acordo com Perin et al. (2012), o principal método utilizado para armazenamento de leite afim de controlar o crescimento bacteriano, é a refrigeração em uma temperatura de ideal de 4°C. Entretanto, o manejo da ordenha pode predispor o leite à contaminação por microrganismos patogênicos ou deteriorantes, e a ausência de condições ideais de refrigeração e armazenamento possibilitam o desenvolvimento de microrganismos mesófilos (entre os 20 e os 45 °C), como por exemplo, os coliformes. Além disso, há também os microrganismos psicrotróficos que, mesmo possuindo temperatura de crescimento ótimo que varia de 20°C a 30°C, se desenvolvem bem em temperaturas iguais ou inferiores a 7°C (Perin et al., 2012).

Para se adequar a um padrão de qualidade do leite, o mesmo deve ser ordenhado e armazenado sob condições higiênicas, seguindo as Boas Práticas Agropecuárias (BPAs), pois a qualidade final dos derivados lácteos pode ser reduzida devido ao crescimento de diferentes tipos de bactérias, resultando na deterioração causada por enzimas produzidas. Como resultado da ação destas enzimas, há o amargor e rancificação do leite (Teh et al., 2011), redução da vida de prateleira, e uma consequente rejeição do produto final pelo consumidor.

Conforme o guia publicado pela FAO & IDF (2013), as Boas Práticas Agropecuárias (BPAs) tratam da implementação de procedimentos adequados em todas as etapas da produção de leite nas propriedades rurais, que devem assegurar

que o leite e os seus derivados sejam seguros e adequados para o uso a que se destinam. Através da adequação às BPAs, é possível garantir que a ordenha seja realizada em condições higiênicas, minimizando a contaminação e o crescimento de microrganismos. O limite de microrganismos para Contagem Padrão em Placas (CPP), estabelecido pela IN nº 76 (Brasil, 2018b) é de até 300.000 UFC/mL, valor acima do encontrado entre os produtores bubalinos do Estado, de 90.000 UFC/mL (Godinho et al., 2020).

3.4 Produção de derivados com leite bubalino

O mercado para os derivados do leite de búfala apresenta expansão no Brasil. Todas as propriedades anteriormente citadas, que conferem características físico-químicas e nutricionais ao leite bubalino, refletem também nos produtos derivados. Estes, além de possuírem inúmeros benefícios para a saúde, ainda possuem um rendimento elevado por apresentar teores superiores de gordura, proteína e sólidos totais (Pignata et al., 2014; Silva et al., 2020; Godinho et al., 2020). Em um estudo realizado por Bittante et al. (2022) sobre a aptidão do leite de diversas espécies de animais para a fabricação de queijo, o leite bubalino, assim como o caprino, demonstrou melhores aptidões queijeiras em comparação ao leite bovino e ovino, por apresentar melhor teor de nutrientes, propriedades de coagulação, firmeza da coalhada, e rendimento do queijo.

Além do teor de sólidos totais, o rendimento do leite em queijo também se deve ao tamanho das micelas de caseína, que são maiores que as de leite de vaca, e dessa forma a coalhada elaborada retém menos água (Ganguli, 1979). Logo, enquanto que para a fabricação de 1 kg de queijo tipo mussarela de leite bovino são necessários de 10 a 12 litros de leite, para a produção do mesmo queijo a partir do leite bubalino são necessários até 50% menos, apenas de 5 a 8 litros (Silva et al., 2003). Assim, a indústria pode atingir entre 20 e 22 kg de mussarela no processamento de 100 litros de leite bubalino (Sales et al., 2018).

No Brasil, o leite de búfala destina-se principalmente ao mercado de derivados, como a mozzarella (ou mussarela), originalmente produzida a partir do leite de búfala, e que na Itália possui Denominação de Origem Protegida (DOP), sendo altamente valorizado internacionalmente (Napolitano et al., 2021). Entretanto, a disponibilidade e o preço dos os derivados lácteos de búfalas são os principais fatores que interferem no consumo desses produtos, dificultando a sua aquisição por

potenciais consumidores (Zanela et al., 2015). Além disso, existem outros fatores que prejudicam o pleno desenvolvimento no consumo e comercialização dos derivados de leite de búfala no Brasil, principalmente devido a organização de sua cadeia produtiva (Coelho, 2019), como também a ausência de uma legislação específica na padronização desses produtos no mercado.

Dessa forma, prospectar o desenvolvimento de outros produtos como um queijo Colonial bubalino, poderá ser uma alternativa importante, considerando o atual cenário de desenvolvimento de produtos coloniais e artesanais e seu respaldo legal.

3.4.1 Queijo colonial

O queijo artesanal brasileiro é apreciado em diversas regiões do Brasil, e por mais de 200 anos, foram feitos em condições artesanais de fabricação, resultando em produtos com características únicas (Penna et al., 2021). O queijo Colonial, que é um tipo de queijo artesanal, teve sua origem na colonização italiana no Estado do Rio Grande do Sul, em que as propriedades eram praticamente autossuficientes (Dorigon e Renk, 2011). O leite utilizado para a fazer o queijo Colonial era produzido pela família, e o gado era alimentado a pasto, mas também suplementados com subprodutos das atividades agrícolas. Logo, nesse sistema de produção, o queijo Colonial era destinado ao autoconsumo (Ambrosini, 2022).

A denominação queijo Colonial somente foi empregada a partir do momento em que os produtos coloniais passaram a ser importantes no abastecimento da região metropolitana de Porto Alegre. Inicialmente, o produto era chamado de *Formaio*, palavra derivada do italiano *Formaggio*, que significa queijo. O queijo Colonial aparenta ter origem no queijo Asiago região do Vêneto, na Itália, que era feito originalmente de leite de ovelha, e depois passou a ser feito de leite não pasteurizado de vaca, apresentando um sabor suave, massa semidura, e com maturação de cerca de 20 dias (Ambrosini, 2022).

De acordo com o Relatório Socioeconômico da Cadeia Produtiva do Leite no Rio Grande do Sul, estima-se que em 2019 havia um total de 187 agroindústrias familiares legalizadas, responsáveis por uma produção de 2,7 toneladas anuais de queijo Colonial. Além destas, 30 indústrias com inspeção estadual produzindo o Queijo Colonial, que é vendido com a denominação “Queijo Tipo Colônia”; e quatro indústrias com inspeção federal, cujos produtos estão registrados como “Queijo Colonial” (Ries, 2019).

O queijo Colonial é produzido pela coagulação e fermentação do leite bovino, um processo que historicamente dependeu da presença da microbiota no leite cru. A presença de microrganismos e suas interações desempenham um papel importante na produção do queijo, que dão origem a diferentes texturas, aromas e sabores (Gonzalez-Cordova et al., 2016; Blaya, Barzideh & LaPointe, 2018). Além disso, fatores como o ambiente de produção, o clima e o tipo de alimentação do gado também influenciam significativamente as características do queijo (Licitra, 2010). Entretanto, o controle da microbiota do leite através da pasteurização, é essencial para obter um produto seguro, visto que queijos feitos com leite cru estão associados a riscos para a saúde humana saúde pela presença de microrganismos patogênicos, como *Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Escherichia coli, Salmonella* spp., entre outros (Yoon, Lee, & Choi, 2016).

Até 2019 não existia no Brasil uma definição para queijos artesanais, assim não havia um consenso entre quais os parâmetros que definiam a produção artesanal. Entretanto, em resposta às críticas que apontavam necessidade de regulamentação específica de produtos agroalimentares artesanais, nos últimos 5 anos houve a publicação de diversos regulamentos voltados ao setor da produção artensanal. Em 2018, a Lei n° 13.680, que altera a Lei n°1.283, de 18 de dezembro de 1950 (RIISPOA), trouxe pela primeira vez uma definição de produção artesanal, como sendo os “produtos alimentícios produzidos de forma artesanal, com características e métodos tradicionais ou regionais próprios, empregadas boas práticas agropecuárias e de fabricação”, bem como a identificação dos mesmos pelo selo ARTE (Brasil, 1950; 2018a). Já em 2019, o Decreto n° 9.918, que regulamentou esta Lei, trouxe a seguinte definição para produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal: “produtos comestíveis elaborados com predominância de matérias primas de origem animal de produção própria ou de origem determinada, resultantes de técnicas predominantemente manuais adotadas por indivíduo que detenha o domínio integral do processo produtivo, submetidos ao controle do serviço de inspeção oficial, cujo produto final é individualizado, genuíno e mantém a singularidade e as características tradicionais, culturais ou regionais do produto” (Brasil, 2019b).

A definição de queijo artesanal somente foi dada pela Lei n° 13.860, de 18 de julho de 2019, que considera como queijo artesanal “aquele elaborado por métodos tradicionais, com vinculação e valorização territorial, regional ou cultural, conforme protocolo de elaboração específico estabelecido para cada tipo e variedade, e com

emprego de boas práticas agropecuárias e de fabricação” (Brasil, 2019c). Em 2022, a legislação para queijos artesanais foi atualizada através da Portaria do MAPA nº 531, de 16 de dezembro de 2022, que estabelece requisitos para concessão dos selos ARTE e Queijo Artesanal. De acordo com esta Portaria, para a concessão do selo, as matérias-primas de origem animal devem ser de produção própria ou com origem determinada, com utilização de técnicas e utensílios predominantemente manuais, e o produto final deverá manter a singularidade e as características próprias, culturais, regionais ou tradicionais do produto, além do uso de ingredientes industrializados restrito ao mínimo necessário (Brasil, 2022).

Na ausência de um Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) para o Queijo Colonial, o mesmo deve atender aos limites exigidos pela Portaria nº 146 de 07 de março de 1996, que fixa a identidade e os requisitos mínimos de qualidade que deverão apresentar os queijos (Brasil, 1996). O queijo Colonial, classificado pelo seu teor de gordura e umidade, deve atender a padrões microbiológicos de Contagem de coliformes e Contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, bem como Pesquisa de *Salmonella* spp. e Pesquisa de *Listeria monocytogenes* em 25 g de queijo. Apesar de se tratar de um produto tradicional, com alto volume de produção e demanda, ainda há carência de estudos sobre o Queijo Colonial, além da inexistência de legislação específica com padrões de produção e de caracterização de parâmetros físicos e microbiológicos.

O conceito de queijo artesanal está relacionado à pequena escala de produção, ao processamento manual e ao não uso de aditivos químicos. Assim, são considerados artesanais tanto os queijos chamados de tradicionais, relacionados à sua origem geográfica com receitas passadas de geração em geração, como aqueles queijos que surgem a partir da inovação (Roldan e Revillion, 2019). Não foram encontrados estudos que tenham desenvolvido queijo colonial com o leite de búfala, entretanto, a importância regional do queijo Colonial, associada às características apresentadas pelo leite bubalino, indicam um mercado em potencial à ser explorado.

3.5 Uso de especiarias na indústria de alimentos

As especiarias têm sido aplicadas na indústria de alimentos como agentes provedores de características, sendo utilizadas com a finalidade de realçar propriedades, como cor e sabor que podem ser perdidas durante o processamento; além de proporcionar uma diferenciação no produto final. Segundo a definição da

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (RDC nº 276 de 22 de setembro de 2005), as especiarias são produtos formados de partes de uma ou mais espécies de vegetais, utilizadas para conferir sabor ou aroma a alimentos e bebidas. Já os temperos são obtidos da mistura de especiarias e de outros ingredientes, fermentados ou não, e possuem a mesma finalidade das especiarias.

Nos últimos anos, tem havido uma grande procura dos consumidores por produtos que utilizam essências naturais, afim de substituir os aditivos sintéticos em ação antimicrobiana e antioxidante (Cutrim, 2017). Juntamente, houve uma notável modificação dos hábitos alimentares e, dentre algumas medidas adotadas, está a troca dos temperos industrializados por opções mais naturais como as ervas condimentares (Malachias et al., 2016). Além do sabor que estas especiarias conferem às preparações, ainda possuem compostos de importância farmacológica como terpenos ou óleos essenciais, compostos fenólicos e flavonoides, além de apresentarem propriedades antimicrobianas e antioxidantes. (Mendes; Rodrigues-das-Dores; Campideli, 2015).

Com isso, as indústrias têm se adaptado às exigências dos consumidores, buscado substâncias naturais que tenham o poder de substituir os conservantes químicos sintéticos (Almeida et al., 2021). A partir de especiarias e ervas que são comuns para elaboração de pratos, podem ser extraídos compostos bioativos de diversas partes das plantas como folhas, flores, sementes, raízes, cascas e tubérculos (Andreo e Jorge, 2006; Silva, Teixeira e Passos, 2012). A adição de extratos naturais tem mostrado um alto poder de inibição contra patógenos em queijos sem afetar as propriedades químicas, através de vários mecanismos. Alguns deles são o aumento da condutividade, da atividade do metabolismo celular e o efeito sobre a síntese de material genético (Rangel-Ortega et al., 2013).

O orégano, *Origanum vulgare*, que tem sido alvo de diversas pesquisas relacionadas ao seu potencial antimicrobiano, é uma erva aromática pertencente à família *Lamiaceae*, nativa da Europa e Ásia, cultivada no mundo todo, utilizada na culinária e para fins medicinais (Yi et al., 2016). Pesquisas realizadas com óleo essencial de *O. vulgare* mostram que esse óleo apresenta ação antibacteriana sobre as cepas de *E. coli*, *S. aureus* e *Salmonella* spp., exibindo como componentes químicos majoritários o 4-terpineol, timol e carvacrol, indicando que essa planta apresenta potencial antimicrobiano natural (Araujo et al., 2015). De acordo com Cui et al. (2019), o potencial antimicrobiano do óleo essencial produzido a partir do orégano

se dá, principalmente através de danos à membrana celular, já que o mesmo tem a capacidade de afetar a permeabilidade da membrana.

Em pesquisa desenvolvida por Hernandez-Hernandez et al. (2014) com óleo essencial das folhas de orégano para determinar sua atividade antimicrobiana frente a bactérias patógenas comumente encontrados em alimentos frescos, observou-se ação contra os microrganismos *Brochothrix thermosphacta*, *Pseudomonas fragi*, *Salmonella* sp. e *Micrococcus luteus*, tendo o timol e carvacrol como os principais compostos químicos, o que lhes confere propriedades antimicrobianas (Murielgalet et al., 2012). Segundo estudos de Bhargava et al. (2015), a aplicação de nanoemulsões de óleo de orégano em produtos frescos poderia ser uma estratégia eficaz no controle antimicrobiano.

No entanto, em um estudo realizado com óleo de orégano nanoemulsificado, foi observado que as formulações que apresentavam potencial antifúngico nos testes in vitro, não foram efetivas quando aplicadas nos queijos na mesma concentração (Serna e Pinho, 2015). Na aplicação de 0,002% de óleo de orégano na produção de ricota, foi observado que a adição de óleo de orégano não influenciou diretamente na composição centesimal dos queijos e apresentou um índice de aceitação relativamente alto, entretanto, com relação à análise microbiológica não houve diferença significativa quando comparado ao queijo sem adição do óleo (Hafemann et al., 2015). Já com a adição de 0,01% e 0,02% de óleo de orégano em queijo Minas frescal, observou-se uma redução da contagem microbiana para coliformes totais, mesófilos e psicrotróficos (Farias, Rezende e Pinho, 2017). Com relação à aceitação do consumidor, de acordo com Azevedo et al. (2012), a adição de 0,25% de microcápsulas de óleo de orégano em queijo quark proporcionou a maior aceitação entre as formulações, e que 0,45% é a máxima concentração para a aceitação dos consumidores.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Monitoramento da qualidade do leite de búfala produzido na EEA-UFRGS

4.1.1 Local de estudo e manejo do rebanho experimental

A ordenha foi realizada no Tambo da Estação Experimental Agronômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (EEA-UFRGS), localizada no KM 146 da BR 290, no município de Eldorado do Sul, Rio Grande do Sul (latitude sul 30º 05'32" e longitude oeste 51º40'37"). No ano de 2021, para a implantação do sistema de ordenha do rebanho bubalino da EEA-UFRGS, cinco fêmeas bubalinas (*Bubalus bubalis*) multíparas com média de 60 dias de lactação, das raças Murrah e Mediterrâneo, com peso médio de 583,7 ± 47,12 kg e idade entre 5 e 20 anos foram submetidas ao manejo de ordenha uma vez por semana com a presença do terneiro, realizada em um sistema de ordenha mecânica balde ao pé com um conjunto de teteiras. As búfalas foram mantidas em Campo Nativo (1,65 ha por UA), com acesso à sal mineral, 0,9% do peso vivo em silagem de milho ofertada duas vezes por semana e concentrado à base de milho e soja durante a ordenha. Nos meses de setembro e outubro, as búfalas tiveram acesso à pastagem cultivada (0,6 ha por UA), composta por aveia-preta e azevém, bem como passaram a receber o dobro da silagem duas vezes por semana (1,8% do peso vivo).

A partir do Guia de Boas Práticas na Pecuária de Leite (FAO & IDF, 2013), foram desenvolvidos protocolos para a rotina de ordenha, bem como para a higienização dos utensílios e do ambiente, com o objetivo de padronizar o trabalho a ser realizado.

4.1.2 Coleta de amostras de leite bubalino

As coletas de leite bubalino foram realizadas quinzenalmente, para que fosse possível acompanhar a lactação do rebanho, entre abril e dezembro de 2021 totalizando 10 coletas com 9 amostras cada (5 amostras individuais e 4 amostras de leite de conjunto em cada coleta). As coletas foram realizadas de forma higiênica, após a lavagem das mãos, e todas as amostras foram imediatamente acondicionadas sob refrigeração em caixa térmica. Não houve estresse dos animais, pois a coleta fazia parte do processo de rotina da ordenha. Tratando-se de um projeto envolvendo animais, o mesmo foi enviado para o Comitê de Ética para Uso de Animais da UFRGS (CEUA) e foi aprovado sob o número 40325 (Anexo 1). Para cada coleta foram obtidos

cinco frascos:

- Frasco I: 50 mL de leite individual (sendo 5 frascos em cada coleta) em frasco estéril com conservante Bronopol para análise de CCS e composição centesimal;
- Frasco II: 50 mL de leite de conjunto em frasco estéril com conservante Azidiol para CPP;
- Frasco III: 1000 mL de leite de conjunto em frasco estéril para análises físico-químicas;
- Frasco IV: 50 mL de leite de conjunto em frasco estéril para resíduos de antibiótico e antiparasitários;
- Frasco V: 50 mL de leite de conjunto em frasco estéril para perfil de ácidos graxos;

A partir da coleta, as amostras foram identificadas com data, número da coleta e brinco da búfala (Frasco I), acondicionadas sob refrigeração em caixa térmica e transportadas sob refrigeração até o Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), para então serem destinadas da seguinte forma: Frascos I, II e III para o Laboratório Credenciado de Qualidade do Leite da Univates (certificado Cgcre - Inmetro número CRL 0754); Frasco IV congelado para ser encaminhado ao Laboratório Federal de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (LFDA/RS-MAPA); e Frasco V também congelado para ser encaminhado ao Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

4.1.2.1 Sanidade da glândula mamária

O teste da caneca de fundo preto foi realizado em todas as ordenhas com os três primeiros jatos de cada teto. Quinzenalmente, após a realização do teste da caneca, foi realizado o California Mastitis Test (CMT), através da homogeneização de 2 mL de leite de cada teto com 2 mL de reagente violeta de Bromocresol 0,02% (Tadabras). Coletas individuais de leite foram realizadas de forma asséptica nos tetos que apresentaram algum grau de reação ao CMT através da formação de gel. Os frascos foram identificados com data, número do brinco da búfala e teto coletado, acondicionados em caixa isotérmica com gelo e encaminhados para o Laboratório de

Microbiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS.

Para identificação do agente causador da mastite, após a homogeneização da amostra de leite, a mesma foi inoculada com o auxílio de um suabe estéril. A inoculação foi realizada em placas AccuMast® Plus, que foram incubadas à 37ºC por 24 horas, para que então fosse realizada a leitura. A interpretação do resultado se deu por meio de alteração da cor do crescimento dos microrganismos no meio de cultura da placa, através da comparação de semelhança por cor em relação à coloração na placa e a régua de leitura AccuMast® e antibiograma para a eleição da melhor alternativa antibiótica. Animais com agente isolados foram, então, tratados, e as amostras que não apresentaram crescimento, não instituíram no tratamento do animal. Para o antibiograma, os antimicrobianos selecionados e os critérios de interpretação dos mesmos foram estabelecidos pela European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing (BrCAST-EUCAST, 2022). Foi preparada uma suspensão bacteriana com turbidez correspondendo ao 0,5 da escala de Macfarland (10^8 UFC/mL). Com um suabe estéril foi coletada amostra da suspensão bacteriana e realizada a semeadura nas placas de Petri em meio de cultura Mueller-Hinton. Os discos contendo antimicrobianos foram depositados e as placas foram incubadas à 37ºC por 24 horas. Foi realizada a leitura do diâmetro dos halos de inibição (mm), classificando o isolado como suscetível ou resistente de acordo com os critérios interpretativos da BrCAST-EUCAST (2022). Foram utilizados o total de oito agentes antimicrobianos: Penicilina G (10 UI), Clindamicina (2µg), Eritromicina (15 µg), Ciprofloxacina (5 µg), Cloranfenicol (30 µg), Gentamicina (10 µg), Tetraciclina (30 µg), Cefoxitina (30 µg).

4.1.2.2 Análises de leite individuais: Contagem de Células Somáticas e composição centesimal

As análises de CCS foram realizadas por citometria de fluxo (ISO 13366-2). A análise da composição centesimal para gordura (g/100 g), proteína (g/100 g), lactose (g/100 g), SNG (g/100 g) e ST (g/100 g) foram realizadas de acordo com à metodologia ISO 9622 da Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite, indicada pela IN nº 77 de 26 de novembro de 2018, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

4.1.2.3 Análises do leite de conjunto: Físico-químico e Contagem Padrão em Placa

Foram analisados os seguintes parâmetros físico-químicos: acidez, densidade e índice crioscópico. A acidez titulável foi feita através da titulação, com o indicador fenolftaleína, de uma porção da amostra por uma solução alcalina de concentração conhecida, conforme o Método 2.2 do Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal (2019), e a densidade através do modelo massa-mola de um oscilador, de acordo com o Método 2.12 do mesmo manual. O índice crioscópico foi obtido por crioscopia eletrônica digital pela metodologia ISO 5764 (2009). Para análise microbiológica, foi realizada a Contagem Padrão em Placas em meio de cultura ágar para contagem (PCA) e incubada em condições aeróbicas à 37°C por 48 horas, de acordo com a metodologia ISO 4833-1 (2013).

4.1.2.4 Resíduos de antibióticos e antiparasitários

A análise de resíduos de antibióticos e antiparasitários no leite de conjunto foi realizada através de um método de triagem de 46 resíduos de antimicrobianos e antiparasitários pertencentes a diferentes classes, usando cromatografia líquida-eletrospray-espectrometria de massa em tandem (LC-ESI-MS / MS), conforme descrito anteriormente (Rübensam et al., 2011; Jank et al., 2015; Barreto et al., 2016). Os resíduos analisadas foram: a tetraciclina, oxitetraciclina, clortetraciclina, doxiciclina, sulfadiazina, sulfatiazol, sulfametazina, sulfametoxazol, sulfaquinoxalina, sulfadimetoxina, sulfadoxina, sulfapiridazina, sulfamerazina, sulfisoxazol, ácido nalidíxico, ácido ozonyl, flumequina, ciprofloxacina, enrofloxacina, difloxacina, sarafloxacina, danofloxacina, norfloxacina, penicilina G, penicilina V, ampicilina, amoxicilina, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina, ceftiofur, cefapirina, cefoperazona, nafcilina, cefquinoma, cefalônio, cefalexina, eritromicina, espiramicina, tilmicosina, azitromicina, tilosina, lincomicina, clindamicina, trimetoprim, bromexina, cloranfenicol, tianfenicol, florfenicol, abamectina, doramectina, eprinomectina, ivermectina, monensina, moxidectina e albendazol.

4.1.2.5 Perfil de ácidos graxos

Para a análise do perfil de ácidos graxos livres (AGL) no leite de conjunto, a quantificação de ácidos graxos das amostras de leite foi realizada por meio de cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC-FID Modelo GC 2010,

Shimadzu, Kyoto, Japão), equipado com uma coluna capilar de sílica fundida (Rtx-Wax, Restek, 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm), de acordo com a AOCS (2009). As amostras foram previamente esterificadas para permitir a análise pelo GC-FID. Os ácidos graxos foram identificados por comparação do tempo de retenção dos componentes com uma mistura padrão de referência de ácidos graxos FAME mix (Supelco 37 Component FAME Mix; Supelco Inc., Bellefonte, PA, EUA).

4.1.3 Coleta e análise microbiológica das amostras de água

A amostragem da água utilizada no tambo da EEA/UFRGS foi realizada no ponto de uso para ordenha (torneira), para contagem de Coliformes Totais, Coliformes Termotolerantes e *Escherichia coli*. Para a coleta, com as mãos higienizadas, a torneira foi limpa com álcool 70° externa e internamente. A água foi ligada em vazão máxima por quatro minutos, e após, a torneira foi flambada. A coleta da amostra foi realizada em vazão baixa, até ¾ da capacidade do frasco, ou aproximadamente 200 mL em frasco estéril vedável com conservante tiossulfato de sódio em pastilha. A amostra foi identificada com data, ponto de coleta e origem da água, e acondicionada em uma caixa térmica com gelo, para ser transportada ao Laboratório da Univates. As análises foram realizadas através da técnica do número mais provável (NMP), de acordo com a ISO 9308-2 (2012).

4.2 Desenvolvimento e caracterização do queijo Colonial bubalino

4.2.1 Produção dos queijos Coloniais bubalinos

Os queijos foram produzidos entre os meses de outubro e novembro de 2021 com o leite bubalino produzido pelo rebanho bubalino da EEA-UFRGS. O leite foi transportado até o Laboratório Planta Laticínio do Instituto Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) em caixa térmica com gelo, e para cada batelada de queijo foram utilizados 5 L de leite de búfala. Na Figura 1 há o fluxograma da produção dos queijos artesanais tipo Colonial com leite bubalino, realizado no ICTA.

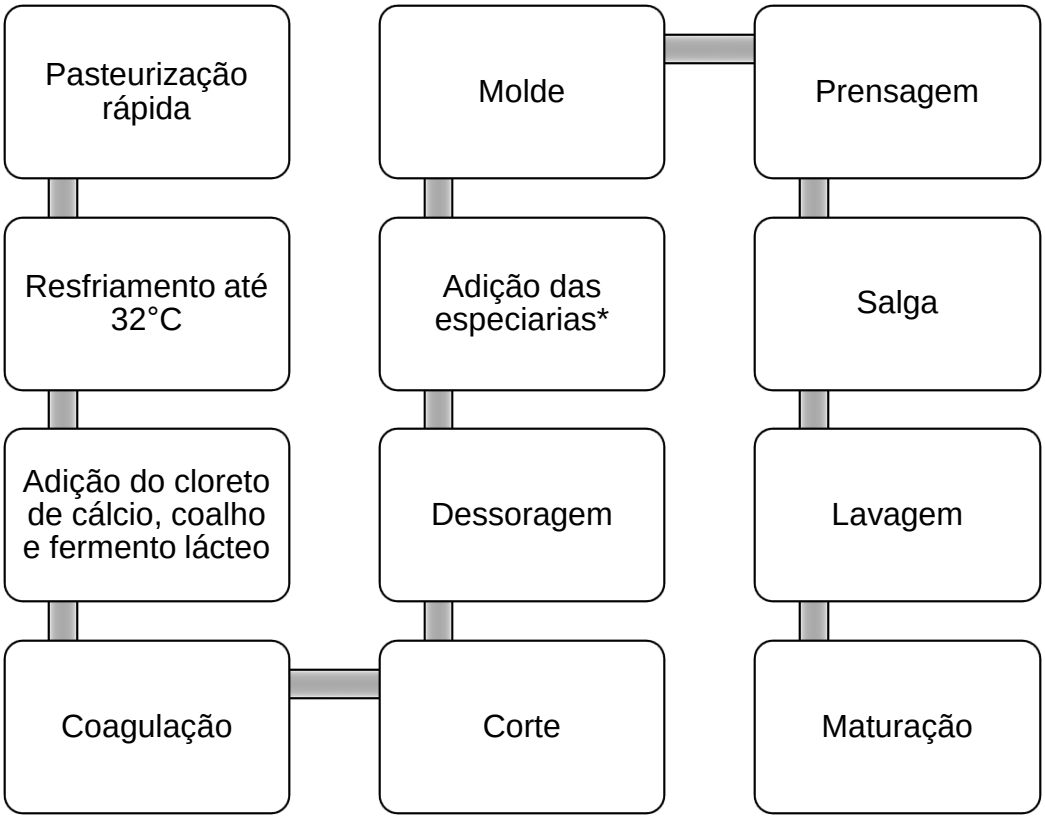


Figura 1. Fluxograma de produção dos queijos coloniais bubalinos.

Fonte: a autora.

*Esta etapa ocorreu apenas nos queijos com especiarias.

O leite de búfala foi pasteurizado através do método de pasteurização rápida, sendo aquecido até a temperatura de 72°C por 15 segundos, e foi resfriado em banho de água até atingir 32°C. Para cada batelada de 5 L de leite bubalino foram adicionados: 2,5 g de cloreto de cálcio diluído em 40 mL de água destilada, 4 mL de coalho diluído em 40 mL de água destilada, e o Pingo liofilizado (Figura 2), também chamado de fermento lácteo natural (adaptado de Silva, 2013), ressuspendido em água destilada. Os ingredientes foram homogeneizados ao leite e aguardou-se o período de 50 minutos para coagulação completa (Figura 3).

Após a coagulação, o coalho foi cortado (Figura 4A) com a lira em quadrados de aproximadamente um dedo de largura/altura, e a temperatura foi elevada até 42°C para favorecer a dessoragem (Figura 4B) por mais 10 minutos. O coalho foi torcido em voal, moldado e prensado nas formas.

Para os queijos com especiarias, após a etapa de dessoramento, o coalho foi torcido em voal e pesado para que fosse feita a adição dos das especiarias nas

proporções indicadas pela indústria para orégano e pimenta (0,25%) e de tomate seco (2,7%). Após, os queijos foram moldados nas formas. Foram produzidos três tipos de queijos artesanais: Colonial Bubalino (CB), Colonial Bubalino com Tomate Seco (CTS) e Colonial Bubalino com Orégano e Pimenta Calabresa (COP).

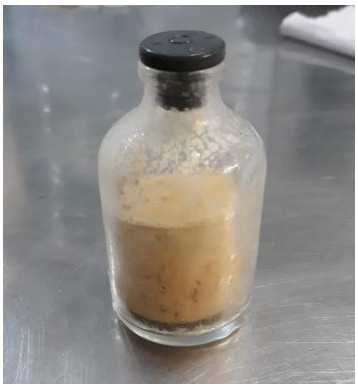


Figura 2. Fermento lácteo natural, ou Pingo, liofilizado

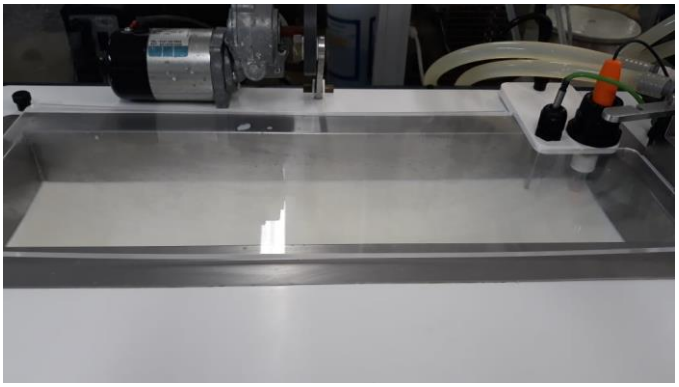


Figura 3. Leite bubalino durante o processo de coagulação

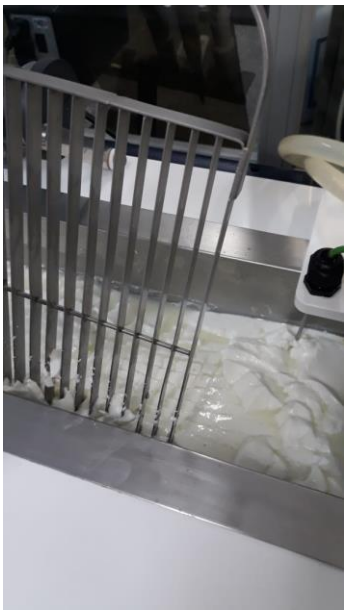


Figura 4A. Corte da massa após a coagulação



Figura 4B. Processo de dessoragem após o corte

Foram produzidos três queijos de cada variedade, totalizando nove queijos, que foram levados à câmara de maturação, à uma temperatura de 13°C. Os queijos permaneceram enformados por um período de 16 horas, em que foram prensados

com um peso de aproximadamente 1,1 kg/queijo. No dia seguinte as peças foram retiradas das formas e foi realizada a salga a seco, com 2% do peso dos queijos em sal. Os queijos foram lavados após 24 horas de salga a seco, e foram observados durante o período de maturação de 28 dias, sendo virados a cada dois dias. Os queijos artesanais foram identificados da seguinte forma:

- Colonial Bubalino: CB;
- Colonial Bubalino com Tomate Seco: CTS;
- Colonial Bubalino com Orégano e Pimenta Calabresa: COP.

4.2.2 Preparo das amostras dos queijos

Considerando que foram produzidas três peças de queijo de cada variedade (CB, CTS e COP) para que as análises fossem realizadas em triplicata, de cada peça de queijo foram coletadas de forma asséptica com o uso de luvas:

- Três amostras de 2 - 2,5 g para as análises bromatológica (uma para matéria seca, uma para gordura e uma para proteína);
- Três amostras de 25 g para as análises microbiológicas (25 g para a Contagem Bacteriana Total, Contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva e Contagem de Coliformes Totais e Termotolerantes; 25 g para Pesquisa de *Salmonella* spp.; e 25 g para Pesquisa de *Listeria monocytogenes*).

4.2.2.1 Análises bromatológicas dos queijos artesanais tipo Colonial bubalino

As análises bromatológicas dos queijos bubalinos foram realizadas em triplicata. De acordo com o com o RTIQ de produtos lácteos, o queijo deve ser analisado e classificado de acordo com seu teor de matéria seca, ou umidade, e teor de gordura. Neste estudo ainda foi obtido o teor de proteína dos queijos Coloniais bubalinos.

Os teores percentuais de umidade para determinação da matéria seca foram obtidos por método gravimétrico em estufa a 102 ± 2°C, até peso constante (Brasil, 2006).

Os teores de lipídios totais foram analisados de acordo com a metodologia de Bligh e Dyer (1959). Foram pesados aproximadamente 2 - 2,5 g de cada amostra, e foi adicionado 8 mL de clorofórmio, 16 mL de metanol e 6,4 mL de água destilada.

Após a homogeneização, foi adicionado mais 8 mL de clorofórmio e 8 mL de solução de sulfato de sódio 1,5% a fim de promover separação total do clorofórmio que carrega os lipídeos. Aguardou-se a separação das fases, e então foi retirado 10 mL da fase inferior com pipeta graduada e adicionado em um tubo com tampa contendo aproximadamente 1 g de sulfato de sódio anidro. Foi então filtrada a camada contendo o clorofórmio em papel filtro, recebendo o filtrado em um recipiente de vidro com tampa, em que 5 mL do filtrado foi transferido para um becker previamente seco em estufa por 2 horas, resfriado em dessecador e pesado. O solvente foi evaporado em estufa a 100 – 105°C, esfriado em dessecador e então pesado.

A determinação do teor de nitrogênio total foi realizada pelo método Kjeldahl, conforme descrito por Silva e Queiroz (2009), através do qual a amostra foi digerida com ácido sulfúrico concentrado sob aquecimento em tubo digestor micro-Kjeldahl, transformando o nitrogênio orgânico em íon amônio. A solução obtida foi alcalinizada com hidróxido de sódio concentrado e a amônia produzida nessa etapa foi destilada e captada por uma solução de ácido bórico, que então foi titulada com ácido padronizado. Para a determinação da proteína, o teor de nitrogênio foi multiplicado pelo fator F, que converte nitrogênio em proteínas, que é igual a 6,38 para leite e derivados.

4.2.2.2 Análises microbiológicas dos queijos coloniais bubalinos

De acordo com o RTIQ de produtos lácteos, os requisitos microbiológicos são definidos de acordo com o conteúdo de umidade da massa. Por se tratar de um queijo de média umidade, foram definidos pelo RTIQ limites para Contagem de *Staphyloccocus* coagulase positivo, Contagem de Coliformes Totais e Termotolerantes, Pesquisa de *Salmonella* spp. e Pesquisa de *Listeria monocytogenes*. Neste estudo também foi feita a Contagem Bacteriana Total (CBT) dos queijos, e todas as análises microbiológicas foram realizadas em triplicata para cada queijo.

As análises microbiológicas foram realizadas de acordo com metodologia indicada na Instrução Normativa da Secretaria de Defesa Agropecuária nº 62 de 26 de agosto de 2003, que estabelece os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água (Brasil, 2003), e todas as análises foram realizadas em triplicata.

Uma amostra de 25 g de cada queijo foi homogeneizada em 225 mL de

solução salina 0,85% por 60 segundos para a realização das contagens microbiológicas, onde obteve-se a diluição 10^{-1}. Posteriormente, foram realizadas diluições até 10^{-5}, em que 1 mL da diluição anterior era adicionada à 9 mL de solução salina 0.85% e homogeneizada. Para a Contagem padrão em placa (CPP), foi semeado 0,1 mL de cada diluição em ágar padrão para contagem (PCA), espalhado com a alça de Drigalski e incubado à 37°C por 48 h. Foram consideradas para fins de contagens as placas com número de colônias entre 25 e 250.

Para a contagem de *Staphyloccocus* coagulase positivo, foi realizado o mesmo procedimento, porém até a diluição 10^{-3} e em meio de cultura Baird Parker. Foi realizada a contagem de colônias atípicas (AT) e de colônias típicas (T) quando presentes, e foram consideradas para fins de contagens as placas com número de colônias entre 20 e 200. As colônias T de *S. aureus* apresentaram coloração enegrecida, aspecto brilhante, com presença de dois halos, sendo um de aspecto opaco, na periferia da colônia, e outro de aspecto claro transparente no ágar, enquanto as AT apresentaram cor acinzentada ou negra brilhante, mas sem a presença do halo claro. Para a seleção das colônias, seguiu-se a metodologia da IN 62/2003, adaptada com as seguintes alterações: nas placas que continham apenas colônias AT, não foram selecionadas colônias, e nestas foi realizada apenas a contagem de *Staphylococcus* spp. (ou coagulase negativa) expressa em UFC/g. Já no caso das que apresentaram colônias T, foram selecionadas de três à cinco colônias T e AT destas placas (Brasil, 2003). Após a seleção das colônias, estas foram submetidas a prova confirmativa da coagulase.

Para a Contagem de Coliformes, realizou-se a prova presuntiva através da semeadura por profundidade, em que 1 mL da diluição (até 10^{-3}) foi pipetada em placa de Petri, então foi adicionado 20 mL de ágar bile vermelho violeta (VRBA), homogeneizado e incubado à 37°C por 48 h. Após este período, foram selecionadas as placas que apresentavam entre 15 e 150 UFC, e foi realizada a contagem de colônias vermelhas ou violetas, redondas, com a formação ou não de halo, como suspeitas de coliformes totais e termotolerantes. De acordo com metodologia da IN 62/2003, na presença de colônias típicas características, procedeu-se à prova confirmativa para coliformes totais, por meio da inoculação das colônias suspeitas em caldo verde brilhante bile 2% lactose e posterior incubação a 36 ± 1ºC e coliformes termotolerantes, por meio da inoculação das colônias suspeitas em caldo *Escherichia coli* (EC) e posterior incubação em temperatura seletiva de 45 ± 0,2ºC, em banho de

água. Em ambos os casos, a presença de gás nos tubos de Durhan evidencia a fermentação da lactose presente no meio, representando positividade.

Os resultados das contagens foram expressos em UFC/g, obtidos com a média das contagens multiplicada pelo fator de diluição utilizado e pelo fator de correção para mL quando necessário.

Para a Pesquisa de *Salmonella* spp., uma amostra de 25 g de cada queijo foi homogeneizada em 225 mL de água peptonada 1% tamponada e incubada à 37°C por 24 horas. Após esse período, 0,1 mL da amostra foi transferida para 10 mL do caldo enriquecedor Rappaport e 1 mL para 10 mL de caldo enriquecedor Selenito Cistina, e incubada à 37°C por 24 horas. Com a alça de platina, a amostra foi repicada do caldo Rapapport e do caldo Selenito Cistina para dois meios: XLD e cromogênico para *Salmonella* spp. (LaborClin). Passado o período de incubação de 24 horas à 37°C, foi observado o crescimento ou a ausência de colônias pretas típicas no meio XLD e colônias de coloração magenta no meio cromogênico, características de *Salmonella* spp.

Para a Pesquisa de *Listeria monocytogenes*, uma amostra de 25 g de cada queijo foi homogeneizada em 225 mL de caldo de enriquecimento para listeria UVM e incubada à 30°C por 24 horas. 0,1 mL da amostra pré-enriquecida foi pipetada em 10 mL de caldo Fraser e novamente incubada à 30°C por 24 horas. Com a alça de platina, a amostra foi repicada do caldo Fraser para o ágar Oxford, que foi incubado à 30°C por 48h para que fosse feita a observação de presencia ou ausência de colônias típicas de *Listeria monocytogenes* (colônias pretas com halo escuro).

4.3 Potencial antimicrobiano das especiarias

4.3.1 Culturas indicadoras

Foram utilizadas quatro cepas de bactérias indicadoras ATCC (American Type Culture Collection): *Escherichia coli* ATCC 10536, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; e seis microrganismos previamente isolados a partir de amostras de queijo Colonial comercializados no Rio Grande do Sul: *Citrobacter freundii* F30, *Enterobacter aerogenes* B01, *Listeria innocua* C08, *Proteus hauseri* BJX, *Proteus vulgaris* C30 e *Staphylococcus sciuri* A0902. Os isolados foram mantidos em Ágar Triptona Soja (TSA) com repiques semanais incubados à 37°C durante 24 horas e após,

armazenados sob refrigeração. Essas bactérias foram escolhidas devido à sua disponibilidade na bacterioteca do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS.

4.3.2 Produção dos extratos aquosos das especiarias

Foram produzidos extratos aquosos a partir do orégano, pimenta e tomate seco utilizados na produção dos queijos coloniais. Os extratos aquosos foram obtidos a partir da maceração e homogeneização da especiaria desidratada em água destilada, na proporção de 10 g para 100 ml, para a produção de um extrato bruto à 10%. A mistura foi mantida em frasco fechado por 1 hora, e após esse período, foi filtrada em papel filtro para remover as partículas maiores. A esterilização foi realizada em filtro seringa 0.22. A partir desses extratos diluídos em água destilada autoclavada à 121°C por 15 minutos, obteve-se as concentrações menores anteriormente utilizadas nos queijos (0,25% para orégano e pimenta, e 2,7% para tomate seco).

4.3.3 Teste *in vitro* com extrato aquoso das especiarias

Para a realização do teste do potencial antimicrobiano das especiarias frente aos isolados patogênicos de alimentos, a partir da cultura em meio TSA, a padronização da densidade do inóculo foi feita através do método de suspensão direta de colônias (CLSI, 2012). Para cada microrganismo indicado no item 4.4.1, obteve-se uma suspensão em 5 mL de solução salina estéril 0,85%, com turvação semelhante ao tubo 0,5 da escala padrão de McFarland (concentração equivalente a 1,5 x 10^8 UFC/mL) (CLSI, 2012). Após, através do método da microdiluição seriada, a suspensão foi diluída até 10^6 UFC/mL.

A partir destas duas suspensões (10^6 UFC/mL e 10^8 UFC/mL), com o auxílio de um suabe estéril, foram semeadas em quatro direções em ágar Müller-Hinton. Aguardou-se a secagem por 15 minutos com a placa invertida. O potencial antimicrobiano das especiarias foi testado através do método de difusão de gota. Em triplicata, uma alíquota de 20 µL de cada um dos tratamentos descritos na tabela abaixo (Tabela 3) foi adicionada à placa, e para o controle negativo foi utilizada água destilada autoclavada. A leitura das placas ocorreu após 24 à 48 horas de incubação à 37°C, através da medição dos halos de inibição de crescimento bacteriano em milímetros de diâmetro (mm).

Tabela 3. Tratamentos com extrato aquoso das especiarias utilizados nos testes *in vitro*

Tratamento	Composição do tratamento	Abreviatura
Controle	Água destilada	CONT
T1	Extrato aquoso de orégano 0,25%	OR 0,25%
T2	Extrato aquoso de pimenta 0,25%	PIM 0,25%
T3	Extrato aquoso de orégano 0,25% + pimenta 0,25%	OR+PIM 0,25%
T4	Extrato aquoso de tomate seco 2,7%	TS 2,7%
T5	Extrato aquoso de orégano 10%	OR 10%
T6	Extrato aquoso de pimenta 10%	PIM 10%
T7	Extrato aquoso de orégano 10% + pimenta 10%	OR+PIM 10%
T8	Extrato aquoso de tomate seco 10%	TS 10%

T: tratamento.

4.3.4 Teste em matriz alimentar leite com o orégano desidratado

Para o teste em matriz alimentar leite, foi selecionado o isolado de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, por se tratar de uma cepa padrão American Type Culture Collection (ATCC) de grande importância tanto na produção de leite quanto na indústria, para a produção de derivados.

O leite bubalino foi autoclavado à 110°C por 15 min para esterilização, e aguardou-se o tempo de resfriamento do mesmo até temperatura ambiente. O orégano foi previamente pesado na proporção de 0,25 g para cada 100 mL de leite (0,25%) em tubos de vidro com tampa de rosca e autoclavado à 121°C por 15 minutos para esterilização.

Para a preparação do inóculo, foi feita uma suspensão da bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 através do método de suspensão direta de colônias (CLSI, 2012). Obteve-se uma suspensão em 5 mL de solução salina esterilizada, com turvação semelhante ao tubo 0,5 da escala padrão de McFarland (concentração equivalente a 1,5 x 10^8 UFC/mL) (CLSI, 2012). A suspensão bacteriana foi diluída até 10^3 UFC/mL em leite bubalino estéril. Após, foi feita a homogeneização dos controles (C1 e C2) e dos tubos de tratamento com adição de orégano 0,25% (T1 e T2) e a incubação em duas temperaturas diferentes: temperatura ambiente (26 °C ± 1,87) e de refrigeração (6,2°C ± 0,83), para simular as condições de maturação e armazenamento do queijo, conforme descrito na Tabela 2.

Para as contagens de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, nos tempos 0, 4, 10, 24 e 48 horas, uma alíquota de 0,1 mL foi retirada de cada triplicata dos tratamentos e diluída em solução salina 0,85% de 10^{-1} até 10^{-6}. O plaqueamento da amostra foi realizado em meio PCA. As placas foram incubadas à 37°C por 48 horas. Os tratamentos e condições de cultivo estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Tratamentos e condições de incubação das amostras de leite de búfala para o teste em matriz alimentar

Tratamento	Descrição	Temperatura de cultivo
C1	Leite bubalino + *S. aureus* ATCC 25923 10^3 UFC/mL	Ambiente
T1	Leite bubalino + *S. aureus* ATCC 25923 10^3 UFC/mL + 0,25% de orégano desidratado	Ambiente
C2	Leite bubalino + *S. aureus* ATCC 25923 10^3 UFC/mL	Refrigeração
T2	Leite bubalino + *S. aureus* ATCC 25923 10^3 UFC/mL + 0,25% de orégano desidratado	Refrigeração

T: tratamento. C: controle.

4.4 Análise estatística

Os dados referentes ao monitoramento da qualidade do leite, com as devidas identificações de amostra, foram transferidos e organizados em planilhas do programa Microsoft Excel 2013 para a obtenção de médias, elaboração de gráficos e de tabelas. Foi utilizado o delineamento inteiramente Casualizado (DIC) com medidas repetidas no tempo, e após a realização de análise de variância (ANOVA), foi aplicado o teste de Tukey com nível de significância 5%, como forma de comparação entre os resultados obtidos mensalmente, tendo os animais como unidade experimental.

$$y_{ij} = \mu + t_i + e_{ij}$$

y_{ij}: parâmetro observado relativo ao mês e observação (CCS, gordura, proteína, lactose, ST, SNG, produção, CPP, acidez, densidade, índice crioscópico);
μ: média geral;
t_i: efeito do tempo nos parâmetros;
e_{ij}: erro experimental associado à observação do parâmetro y_{ij}.

Para a análise dos dados referentes ao queijo produzido, os mesmos foram

organizados em grupos: Colonial Bubalino, Colonial Bubalino com Orégano e Pimenta Calabresa e Colonial Bubalino com Tomate Seco. Os mesmos foram organizados em planilhas do programa Microsoft Excel 2013 para a obtenção de médias, elaboração de gráficos e de tabelas. Foi utilizado o delineamento inteiramente Casualizado (DIC) sendo atribuido aos tipos de queijos (CB, CTS e COP) as variações nos parâmetros. Após a realização de análise de variância (ANOVA), foi aplicado o teste de Tukey com nível de significância 5%, como forma de comparação entre os resultados obtidos para cada queijo.

$$y_{ij} = \mu + t_i + e_{ij}$$

y_{ij}: parâmetro observado relativo ao queijo na triplicata (matéria seca, gordura, proteína e parâmetros microbiológicos);
μ: média geral;
t_i: efeito das variações de queijos (CB, CTS e COP) nos parâmetros;
e_{ij}: erro experimental associado à observação do parâmetro y_{ij}.

Os dados referentes ao potencial antimicrobiano das especiarias foram organizados em planilhas do programa Microsoft Excel 2013 para a obtenção de médias, desvios, elaboração de tabelas e de gráficos. Foi utilizado o delineamento inteiramente Casualizado (DIC), considerando o efeito de inibição do extrato entre os microrganismos testados no primeiro experimento para obter o maior halo de inibição, e os tratamentos (orégano/temperatura) no segundo. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey com nível de significância 5%, como forma de comparação entre os resultados obtidos entre os microrganismos submetidos aos testes no primeiro experimento, e entre os tratamentos no segundo.

$$y_{ij} = \mu + t_i + e_{ij}$$

y_{ij}: halo de inibição observado entre os microrganismos no primeiro experimento e contagem bacteriana entre os tratamentos no segundo experimento;
μ: média geral;
t_i: efeito dos extratos no primeiro experimento e dos tratamentos (orégano/temperatura) no segundo experimento;
e_{ij}: erro experimental associado à observação do parâmetro y_{ij}.

5. RESULTADOS

5.1 Monitoramento da qualidade do leite de búfala (*Bubalus bubalis*) produzido na Estação Experimental Agronômica da UFRGS

5.1.1 Rebanho bubalino

Como o sistema produtivo do setor de bubalinocultura da EEA-UFRGS trata-se de um sistema extensivo, a frequência de ordenha foi de uma ordenha diária realizada no turno da manhã, uma vez na semana, enquanto nos demais dias os terneiros permaneceram com as búfalas no campo. Para que ocorresse a ordenha, no dia anterior os terneiros eram separados das vacas e permaneciam durante a noite em um curral no Tambo com uma ama de leite, onde receberam silagem e concentrado. Esse sistema de ordenha semi-intensivo visou a adequação à mão de obra disponível e o escoamento da produção, além disso, foi um manejo que possibilitou oferecer melhores condições de desenvolvimento dos terneiros, com um maior período de aleitamento.

O manejo de ordenha das búfalas foi realizado entre abril e dezembro de 2021, totalizando oito meses de lactação. Por se tratar de um rebanho experimental em seu primeiro ano em sistema da ordenha, cinco fêmeas bubalinas multíparas foram ordenhadas durante o período de coletas, identificadas como búfalas A, B, C, D e E. Durante toda a lactação foi seguida uma linha de ordenha, em que as búfalas saudáveis, que apresentavam resultado negativo no CMT e CCS abaixo de 5.0 $x10^5$ cél./mL (Brasil, 2018) eram ordenhadas primeiro, enquanto as que apresentavam casos de mastite em seu histórico ou mesmo resultado duvidoso no CMT, eram ordenhadas por último e seu leite era descartado

Com relação às coletas, as amostras foram recebidas nos respectivos laboratórios em até 48 horas, com uma média de temperatura de 6,16 ± 2,30°C.

5.1.2 Sanidade da glândula mamária

Conforme descrito na Tabela 4, em um total de dez coletas realizadas ao longo da lactação, apenas a partir da sétima foi observada a presença de grumos no leite no teste da caneca de fundo preto, em 15% dos quartos mamários testados. Esse resultado foi obtido a partir de duas búfalas, A e D, e foi o único tipo de alteração visual observada do leite. Estas mesmas búfalas apresentaram resultados positivos no CMT, sendo a búfala A nas dez coletas e a búfala D em seis coletas (Tabela 5).

Tabela 5. Resultados do teste da caneca de fundo preto e do California Mastitis Test (CMT) realizados como parte do protocolo para manejo da saúde da glândula mamária

	Búfala A			Búfala D		
Coleta	**Teto**	**Caneca**	**CMT**	**Teto**	**Caneca**	**CMT**
1	AE/PD	SA	Duvidoso	SA	SA	SA
2	AE/AD/PD	SA	Duvidoso	SA	SA	SA
3	PD	SA	Duvidoso	SA	SA	SA
4	PD	SA	++	SA	SA	SA
5	AD/AE	SA	++	AE	SA	+
6	AD/AE	SA	++	AE	SA	+
7	AD/AE	SA	++	AE	PE/AE	+
8	AD/AE	SA	++	AE	PD/PE/AE	+
9	AD/AE	AE	++	AD/AE/PD/PE	AD	+
10	AD/AE	AD/AE	++	AD/AE/PD/PE	SA	+

AE: teto anterior esquerdo; AD: teto anterior direito; PE: teto posterior esquerdo; PD: teto posterior direito; SA: sem alteração; +: reação fracamente positiva; ++: reação positiva.

Esse resultado corresponde à um CMT positivo em 17,5% dos quartos mamários testados. Apesar do resultado positivo em todos CMTs, a búfala A apresentou CCS acima de 5,0 x10^5 cél./mL (Brasil, 2018b) apenas em 50% das coletas. Já para a búfala D, apresentou reação positiva ou fracamente positiva no CMT, e CCS acima do limite estabelecido pela IN 76, em 60% das coletas.

Destas, apenas em uma (búfala A) foi possível realizar o isolamento do microrganismo causador da mastite subclínica, *Streptococcus agalacticae*, isolado a partir dos dois tetos anteriores direito e esquerdo (AD e AE). Já para a búfala D, não foi possível realizar o isolamento do microrganismo pois não houve crescimento em placa após 48 horas de incubação, mesmo que esta tenha apresentado reação positiva ou fracamente positiva no CMT, e CCS acima do limite estabelecido pela IN 76 (Brasil, 2018b), em 60% das coletas.

Dessa forma, apenas a búfala A foi submetida ao tratamento com antibiótico intramamário Promastic® (cloridrato de oxitetraciclina, sulfato de neomicina e predinisolona) para mastite causada por *Streptococcus agalacticae*, respeitando o período de carência de 72 horas após a última aplicação para a ordenha. Entretanto, mesmo após o tratamento esta búfala seguiu apresentando resultado positivo no CMT e CCS elevada, indicando uma possível mastite crônica.

5.1.3 Análises de leite individuais: Contagem de Células Somáticas e composição centesimal

Os resultados para CCS, proteína, gordura, lactose, SNG, ST, bem como as produções médias do leite cru bubalino produzido pelo rebanho da EEA-UFRGS estão apresentados na Tabela 6. A CCS média do rebanho foi 4,88 $x10^5$ cél./mL, variando entre 6,7 $x10^4$ cél./mL e 9,8 $x10^5$ cél./mL, sendo que o menor valor foi obtido no início da lactação. Foi possível observar que houve diferença estatística significativa durante o período avaliado para gordura, proteína, SNG, ST, e produção, sendo as melhores médias obtidas no mês de outubro. Apenas a lactose se manteve sem alteração significativa ao longo da lactação, com uma média de 5,13 g/100g.

Tabela 6. Médias mensais das análises individuais para CCS, composição centesimal e produção de leite bubalino na EEA/UFRGS

Análise	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Média
CCS (x 10^5 cél/mL)	6,68 ^{f} ± 15,36	60,43 ^{b} ± 101,99	44,97 ^{d} ± 87,29	98,28 ^{a} ± 139,67	47,28 ^{c} ± 62,56	35,62 ^{e} ± 48,06	48,87 ± 29,89
Gordura (g/100 g)	2,09 ^{c} ± 1,07	3,09 ^{abc} ± 1,38	3,04 ^{bc} ± 1,17	3,91 ^{abc} ± 2,59	5,32 ^{a} ± 2,75	4,84 ^{ab} ± 3,31	3,71 ± 1,24
Proteína (g/100 g)	3,71 ^{bc} ± 0,33	3,51 ^{c} ± 0,42	3,82 ^{bc} ± 0,30	4,00 ^{b} ± 0,20	4,68 ^{a} ± 0,27	4,64 ^{a} ± 0,37	4,06 ± 0,49
Lactose (g/100 g)	5,42 ^{a} ± 0,15	5,00 ^{a} ± 0,54	5,23 ^{a} ± 0,16	5,06 ^{a} ± 0,35	5,04 ^{a} ± 0,15	5,06 ^{a} ± 0,24	5,13 ± 0,15
SNG (g/100 g)	9,94 ^{ab} ± 0,37	9,4 ^{b} ± 0,65	9,87 ^{ab} ± 0,25	9,87 ^{ab} ± 0,29	10,51 ^{a} ± 0,22	10,42 ^{a} ± 0,15	10,00 ± 0,41
ST (g/100 g)	12,03 ^{c} ± 1,28	12,49 ^{c} ± 1,59	12,91 ^{c} ± 1,29	13,79 ^{bc} ± 2,53	15,84 ^{a} ± 2,78	15,26 ^{ab} ± 3,42	13,72 ± 1,57
Produção (kg/animal)	4,00 ^{bc} ± 0,70	3,43 ^{c} ± 0,29	3,80 ^{bc} ± 0,52	5,05 ^{ab} ± 0,67	5,97 ^{a} ± 0,72	4,94 ^{ab} ± 0,60	4,53 ± 0,95

Uma ordenha após 18 horas de separação dos terneiros. CCS: contagem de células somáticas; ST: sólidos totais; SNG: sólidos não gordurosos. Letras iguais na mesma linha indicam a ausência de diferença estatística ($p<0.05$).

A média para gordura do leite bubalino produzido pelo rebanho experimental foi de 3,71 g/100 g, e o teor variou entre 1,71 g/100 g e 5,32 g/100 g. Já para a proteína, a média no período avaliado foi de 4,06 g/100 g, variando entre 3,45 g/100 g e 4,68 g/100 g. Os ST variaram de 11,54 g/100g a 15,84 g/100g, com uma média de 13,72 g/100g; enquanto que para SNG, neste estudo, a média foi de 10,00 g/100g, com valores variando de 9,09 g/100g a 10,51 g/100g. A menor média produtiva por búfala ocorreu no mês de julho, com 3,43 kg de leite por animal na ordenha, e o pico de produção foi no mês de outubro, com 5,97 kg de leite por animal.

As médias para composição centesimal individual e composição do leite das búfalas estão descritas na Tabela 7. É possível observar que as búfalas A e D apresentaram maior CCS, e também demonstraram uma redução significativa nos componentes do leite, como gordura e sólidos totais, além de produção significativamente menor quando comparadas as demais búfalas.

Tabela 7. Média individual das búfalas A, B, C, D e E durante a lactação para CCS, composição centesimal e produção de leite na EEA/UFRGS

Análise	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**
CCS (x 10^4 cél/mL)	124,36 ^{a} ± 141,73	12,97 ^{b} ± 31,11	3,39 ^{b} ± 4,65	77,42 ^{ab} ± 52,78	29,76 ^{ab} ± 110,03
Gordura (g/100 g)	3,15 ^{abc} ± 1,28	5,81 ^{a} ± 2,54	5,06 ^{ab} ± 1,99	1,82 ^{c} ± 1,34	2,49 ^{bc} ± 1,58
Proteína (g/100 g)	3,91 ^{a} ± 0,48	4,10 ^{a} ± 0,62	4,38 ^{a} ± 0,52	3,89 ^{a} ± 0,53	3,91 ^{a} ± 0,42
Lactose (g/100 g)	5,23 ^{a} ± 0,10	4,92 ^{a} ± 0,42	5,20 ^{a} ± 0,26	5,12 ^{a} ± 0,26	5,13 ^{a} ± 0,45
SNG (g/100 g)	10,01 ^{a} ± 0,45	9,86 ^{a} ± 0,73	10,33 ^{a} ± 0,29	9,82 ^{a} ± 0,57	9,87 ^{a} ± 0,36
ST (g/100 g)	13,17 ^{ab} ± 1,64	15,68 ^{a} ± 2,92	15,40 ^{a} ± 2,17	11,65 ^{b} ± 1,33	12,37 ^{ab} ± 1,64
Produção (kg/animal)	3,42 ^{b} ± 0,85	5,79 ^{a} ± 1,11	5,82 ^{a} ± 1,44	3,21 ^{b} ± 1,25	3,85 ^{a} ± 1,21

CCS: contagem de células somáticas; ST: sólidos totais; SNG: sólidos não gordurosos. Letras iguais na mesma linha indicam a ausência de diferença estatística ($p<0.05$).

5.1.4 Análises do leite de conjunto: Físico-químico e Contagem Padrão em Placa

Na Tabela 8, estão descritos os resultados de densidade, índice crioscópico (IC) e acidez titulável do leite bubalino. Assim como na composição centesimal, os resultados apresentaram uma diferença significativa entre os meses de agosto e setembro, com um aumento na acidez e na densidade.

Tabela 8. Médias mensais dos resultados físico-químicos e de CPP do leite bubalino produzido na EEA/UFRGS

Análise	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro
Densidade (g/cm³)	1,039 [a]	1,035 [d]	1,035 [cd]	1,037 [bc]	1,037 [ab]	1,037 [ab]
Acidez (g ácido lático/100 mL)	0,13 [b]	0,14 [b]	0,15 [ab]	0,16 [ab]	0,18 [a]	0,18 [a]
Índice Crioscópico (°C)	-0,527 [ab]	-0,524 [b]	-0,523 [b]	-0,528 [ab]	-0,536 [a]	-0.533 [ab]
CPP (x 10^3 UFC/mL)	<8 [b]	19 [b]	139,5 [a]	9,5 [b]	17 [b]	<8 [b]

CPP: contagem padrão em placa. Letras iguais na mesma linha indicam a ausência de diferença estatística ($p<0.05$).

A média obtida para densidade no leite produzido na Estação Experimental foi de 1,037 g/cm³, variando de 1,035 g/cm³ a 1,039 g/cm³. Para acidez titulável foi de 0,16 g ácido lático/100 mL, variando de 0,13 g ácido lático/100 mL a 0,18 g ácido lático/100 mL, em que foi possível observar um aumento da acidez titulável quando o leite aumenta seus outros componentes, enquanto que, a média foi de -0,528ºC, variando de 0,523ºC a -0,536ºC.

Com relação à qualidade microbiológica da ordenha, a média para a CPP foi de 3,35 x10^4 UFC/mL, sendo o valor mais elevado obtido nas coletas de agosto com 1,39 x10^5 UFC/mL.

5.1.5 Resíduos de antimicrobianos e antiparasitários

Nas amostras de leite de búfala analisadas, não foram identificados nenhum dos 46 resíduos de antimicrobianos ou antiparasitários pesquisados.

5.1.6 Perfil de ácidos graxos

Os resultados apresentados neste estudo fornecem uma avaliação nutricional do perfil de AGL do leite de búfala produzido na EEA-UFRGS por meio de análise de cromatografia gasosa. Suas concentrações foram expressas mg/100 mg de gordura, conforme relatado na Tabela 9 os resultados para análise cromatográfica de Ácidos Graxos Livres (AGL).

Tabela 9. Ácidos graxos livres (AGL) do leite de bubalino produzido na EEA-UFRGS

Ácidos Graxos (mg de AGL/100 mg gordura)		Junho	Junho	Julho	Julho	Agosto	Agosto	Setembro	Setembro	Outubro	Novembro
Ácido Capróico	C10:0	0,268	0	0,312	0	0	0,333	0	0	0,236	0,122
Ácido Láurico	C12:0	0,802	0,475	1,136	0,89	0,710	0,759	0,849	1,295	0,946	0,67
Ácido Tridecilico	C13:0	0,406	3,36	1,856	2,243	4,006	0,674	2,935	2,584	3,003	1,102
Ácido Mirístico	C14:0	4,816	4,075	5,26	4,143	4,665	4,664	3,586	6,817	4,349	5,035
Ácido Miristoleico	C14:1	0,218	0,183	0,322	0,25	0,516	0,471	0,397	0,428	0,519	0,232
Ácido Pentadecanoico	C15:0	0,431	0,447	0,511	0,404	0,668	0,487	0,353	0,653	0,449	0,495
	C15:1	0,104	0,074	0,076	0,079	0,118	0,082	0,063	0,117	0,092	0,115
Ácido Palmítico	C16:0	18,031	16,302	17,294	14,718	25,653	16,662	10,107	21,525	16,857	25,134
Ácido Palmitoleico	C16:1	0,82	0,624	0,845	0,795	1,202	0,975	1,328	1,049	1,204	0,892
Ácido Margárico	C17:0	0,328	0,335	0,29	0,254	0,497	0,209	0,174	0,285	0,294	0,359
	C17:1	0,899	0,485	0,244	0,324	0,199	0,085	0,329	0,371	0,314	0,094
Ácido Esteárico	C18:0	3,851	4,042	3,487	2,952	9,438	2,839	3,401	6,025	3,645	5,466
Ácido Oleico	C18:1- cis (n9)	11,844	7,846	9,659	8,545	16,134	10,462	7,089	12,61	8,688	13,455
Ácido Elaídico	C18:1- trans (n9)	1,029	0,768	0,866	0,719	2,770	0,115	0,951	1,768	1,211	1,287
Ácido Linoleico	C18:2 - cis (n6)	0,435	0,299	0,432	0,382	0,254	1,06	2,364	0,63	1,408	0,671
Ácido Linolelaídico	C18:2 - trans (n6)	0,107	0	0,095	0	0,721	0,359	0,217	0,242	0,335	0,129

Ácido α-Linolênico	C18:3 (n3)	0,243	0,089	0,244	0,17	0,332	0,229	0	0,363	0,137	0,222
Ácido γ-Linolênico	C18:3 (n6)	0,36	0,435	0,362	0,306	0,299	0,558	0	0	0,427	0,435
Ácido Araquídico	C20:0	0,051	0	0,053	0	0,170	0,094	0	0	0	0
	C20:2 (n6)	0,188	0	0,276	1,584	0,067	8,105	11,668	0,155	5,826	0,739
	C20:3 (n3)	0	0	0	0	0,076	0,458	0,488	0	0,261	0
Ácido dihomo-γ-linolénico	C20:3 (n6)	0	0	0	0	0,059	0,397	0,634	0	0,495	0
Ácido Araquidônico	C20:4 (n6)	0	0	0	0	0	0,889	1,043	2,63	0,459	0
Ácido Heneicosílico	C21:0	0	0	0	0	0	0,286	0,215	0	0	0
	C22:2	0,601	0	0,741	4,726	0,141	30,915	23,726	0,38	12,496	0
Ácido Tricosanóico	C23:0	0	0	0	0	0,092	1,365	1,234	0	0,602	0
Total (mg de AGL/100 mg de gordura)		45,83	39,839	44,361	43,485	56,657	69,234	83,534	73,15	59,928	64,253

Considerando-se os AGL analisados, foi possível observar a predominância de Ácidos Palmítico (C16:0) e Oleico (C18:1- cis (n9)) em quase todas as amostras. Nestes parâmetros, a amostra 2, correspondente ao mês de junho, teve o menor teor de AGL (<40 mg/g de gordura) e menor frequência (16 dos 26 AGL analisados), enquanto a amostra 7, coletada no mês de setembro, foi a mais abundante (83,5 mg/g de gordura) e também teve maior frequência (26 dos 26 AGL analisados). Houve aumento da proporção de ácidos graxos polinsaturados e diminuição dos monoinsaturados nas coletas 7, 8 e 10, enquanto a maior quantidade de ácidos graxos saturados ocorre nas coletas 6 e 9. Observou-se que a coleta 2 foi a de menor frequência de AGL (16 dos 26 analisados) e que a proporção de ácidos graxos saturados foi a mais alta (29,0 dos 39,9 mg de ácido graxo por 100g de gordura).

5.1.7 Análise microbiológica das amostras de água

Foram realizadas duas coletas de água, sendo uma juntamente às primeiras coletas de água em junho, e a segunda após o fim das coletas em fevereiro do ano seguinte. Os resultados obtidos na análise microbiológica da água do ponto de uso da ordenha na EEA-UFRGS estão descritos na tabela abaixo (Tabela 10).

Tabela 10. Resultado das análises de água realizadas no Tambo da EEA-UFRGS

Análise microbiológica	**Junho/2021**	**Fevereiro/2022**
Coliformes Totais (NMP/100 mL)	>8,0	>8,0
Coliformes Termotolerantes (NMP/100 mL)	>8,0	>8,0
Escherichia coli (NMP/100 mL)	>8,0	>8,0

NMP: número mais provável.

Foi possível observar que, apesar de ter ocorrido a limpeza da caixa d'água entre as coletas, não houve diferença entre os resultados obtidos.

5.2 Desenvolvimento e caracterização do queijo Colonial bubalino

5.2.1 Produção dos queijos Coloniais bubalinos

Para a produção dos queijos com leite bubalino, o leite empregado no presente estudo se encontrava com padrões de composição centesimal média do de 5,1 g/100 g de gordura, 4,6 g/100 g de proteína, 15,5 g/100 g de ST e 10,5 g/100 g de SNG. Foram desenvolvidas três variedades de queijos coloniais bubalinos, apresentadas nas figuras abaixo (Figuras 5, 6 e 7). Para cada tipo de queijo foram utilizados 5 kg de leite, sendo possível produzir três peças com peso médio de 236,4 g ± 10,03 cada. Dessa forma, o rendimento médio obtido para a produção dos queijos foi de 18,9%.

Os queijos maturaram durante 28 dias, em câmara fria à uma temperatura média de 13°C, sendo virados a cada dois dias. A partir de 21 dias os queijos apresentaram uma redução da umidade e, após os 28 dias de maturação, apresentaram a formação de uma casca levemente amarelada, enquanto o seu interior se manteve branco, preservando a característica do leite bubalino.



Figura 5A. Queijo Colonial bubalino (CB) durante a salga a seco



Figura 5B. Queijo Colonial bubalino (CB) após 28 dias de maturação



Figura 6A. Queijo Colonial bubalino com tomate seco (CB) após produção



Figura 6B. Queijo Colonial bubalino com tomate seco (CTS) após 28 dias de maturação



Figura 7A. Queijo Colonial bubalino com orégano e pimenta calabresa (COP) após produção



Figura 7B. Queijo Colonial bubalino com orégano e pimenta calabresa (COP) após 28 dias de maturação

5.2.2 Análises bromatológicas dos queijos coloniais bubalinos

As análises bromatológicas de cada uma das três variedades foram realizadas em triplicata, e na Tabela 11 estão descritos os resultados das análises bromatológicas dos queijos coloniais bubalinos. Foi possível observar que o queijo colonial bubalino (CB) apresentou uma matéria seca média de 57,45 g/100g, e não houve diferença estatística significativa quando comparado ao CTS, que apresentou uma média de 65,80%. Entretanto, o COP apresentou a matéria seca significativamente maior, e consequentemente menos umidade que os demais com a adição do orégano e da pimenta, e o resultado se repetiu na gordura. A mesma tendência foi observada nos resultados de gordura no extrato seco, de 59,48 g/100 g ± 1,36 para o CB, 58,94 g/100 g ± 2,48 para o CTS e 60,63 g/100 g ± 1,23 para o COP. Não houve diferença estatística significativa entre os queijos para o teor de proteína com a adição das especiarias.

Tabela 11. Análises bromatológicas dos queijos coloniais bubalinos.

Análise bromatológica	CB	CTS	COP
Matéria seca (g/100 g)	57,45 ^{b} ± 2,01	58,08 ^{b} ± 1,08	65,80 ^{a} ± 3,35
Gordura (g/100 g)	34,11 ^{b} ± 0,78	33,95 ^{b} ± 1,43	39,06 ^{a} ± 0,79
Proteína (g/100 g)	17,85 ^{a} ± 0,62	20,73 ^{a} ± 0,51	21,38 ^{a} ± 1,75

CB: queijo colonial bubalino; CTS: queijo colonial bubalino com tomate seco; COP: queijo colonial bubalino com orégano e pimenta calabresa. Letras iguais na mesma linha indicam a ausência de diferença estatística ($p<0.05$).

5.2.3 Análises microbiológicas dos queijos coloniais bubalinos

De acordo com as análises microbiológicas realizadas em triplicata, o queijo bubalino apresentou Contagens semelhantes entre as variedades de queijos. Na Tabela 12 estão descritos os resultados das contagens microbiológicas para Contagem Bacteriana Total, Contagem de *Staphylococcus* spp. e Contagem de Coliformes Totais nos queijos coloniais bubalinos.

Tabela 12. Contagens microbiológicas dos queijos coloniais bubalinos

Análise microbiológica	CB	CTS	COP
Contagem Bacteriana Total (x 10^{7} UFC/g)	1,61 ^{b}	2,78 ^{a}	1,77 ^{b}
Contagem *Staphylococcus* coagulase positiva (UFC/g)	<10	<10	<10
Contagem Coliformes Termotolerantes (UFC/g)	<10	<10	<10

CB: queijo colonial bubalino; CTS: queijo colonial bubalino com tomate seco; COP: queijo colonial bubalino com orégano e pimenta calabresa. Letras iguais na mesma linha indicam a ausência de diferença estatística ($p<0.05$).

A CBT apresentou valor semelhante entre os queijos, entretanto, o CTS apresentou uma contagem significativamente maior que o CB e o COP.

Na Contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, foi observada a ausência de crescimento de colônias típicas em Ágar Baird Parker após as 48 horas de incubação para todos os queijos testados. Dentro das limitações da técnica, o resultado foi expresso em <10 UFC/mL. Logo, foi realizada apenas a contagem de colônias atípicas, ou seja, que não apresentaram a formação de halo ao redor da colônia. Foi possível constatar que o COP apresentou uma contagem significativamente menor de colônias atípicas, com 4,48 $x10^3$ UFC/g, enquanto o CB e o CTS apresentaram 1,92 e 3,12 $x10^4$ UFC/g, respectivamente.

Para a Contagem de Coliformes Totais, houve ausência de colônias típicas de coliformes em Ágar VRB, sendo realizada a contagem das colônias atípicas. O CB apresentou uma contagem de colônias atípicas de 3,36 $x10^3$ UFC/g, resultado superior aos demais queijos CTS (5,65 $x10^2$ UFC/g) e COP (6,12 $x10^2$ UFC/g).

Nas Pesquisas, foi observada a ausência em todos os queijos do gênero *Salmonella* spp. em ágar XLD e ágar cromogênico para *Salmonella* spp. (LaborClin), bem como ausência de *Listeria monocytogenes* em ágar Oxford.

5.3 Potencial antimicrobiano das especiarias

5.3.1 Teste *in vitro* com extrato aquoso das especiarias

Afim de estudar o potencial antimicrobiano das especiarias utilizadas nos queijos, testes *in vitro* foram realizados com o orégano, a pimenta calabresa e o tomate seco. Foram produzidos extratos aquosos a partir de cada uma das especiarias adquiridas já desidratadas, para que os testes de inibição fossem realizados através do método de difusão de gota em ágar Mueller Hinton.

Nos testes realizados *in vitro* com extrato aquoso na concentração semelhante à utilizada das especiarias desidratadas nos queijos, de orégano (0,25%), pimenta calabresa (0,25%) e tomate seco (2,7%), não foi observada a formação de halo de inibição de crescimento microbiano frente a nenhum microrganismo testado em 10^6 e 10^8 UFC/mL. No entanto, quando o extrato foi utilizado sem diluição, na contração de 10% de orégano e pimenta calabresa, houve inibição do crescimento em placa de 60% dos microrganismos testados. Na Tabela 13, estão apresentadas as médias (mm) e desvio padrão dos halos de inibição observados.

Tabela 13. Média e desvio padrão dos halos de inibição obtidos através dos testes *in vitro* com extrato aquoso das especiarias nos microrganismos indicadores e microrganismos isolados a partir de amostras de queijo Colonial no Rio Grande do Sul em 10^6 UFC/mL.

Microrganismo	CONT	OR 10%	PIM 10%	OR 10% + PIM 10%	TS 10%
L. innocua C08	0 mm	12,33 ^{b} mm ± 0,58	0 mm	0 mm	0 mm
L. monocytogenes ATCC 7644	0 mm	8,66 ^{c} mm ± 0,58	0 mm	0 mm	0 mm
P. hauseri BJX	0 mm	6,66 ^{d} mm ± 0,58	0 mm	6,0 ^{ab} mm ± 1,0	0 mm
P. vulgaris C30	0 mm	7,66 ^{cd} mm ± 0,58	0 mm	5,33 ^{b} mm ± 0,58	0 mm
S. aureus ATCC 25923	0 mm	12,66 ^{b} mm ± 0,58	0 mm	7,66 ^{a} mm ± 0,58	0 mm
S. sciuri A0902	0 mm	14,66 ^{a} mm ± 0,58	0 mm	0 mm	0 mm

CONT: controle com água destilada; OR: orégano; PIM: pimenta calabresa; TS: tomate seco. Letras iguais na mesma coluna indicam a ausência de diferença estatística ($p<0.05$).

Foi possível observar que dois microrganismos indicadores ATCC (*L. monocytogenes* ATCC 7644 e *S. aureus* ATCC 25923) e quatro microrganismos isolados em amostras de queijo Colonial comercializado no Estado do Rio Grande do Sul (*L. innocua* C08, *P. hauseri* BJX, *P. vulgaris* C30 e *S. sciuri* A0902) em 10^6 UFC/mL foram inibidos pelo extrato aquoso de orégano 10% (OR 10%). Além disso, o extrato aquoso de orégano 10% juntamente ao de pimenta calabresa também 10% (OR 10% + PIM 10%) apresentaram a formação de halo de inibição de crescimento bacteriano frente a um microrganismo indicador ATCC (*S. aureus* ATCC 25923) e dois isolados de queijo Colonial (*P. hauseri* BJX, *P. vulgaris* C30). Entretanto, foi possível observar que os halos de inibição formados pelo extrato bruto OR 10% + PIM 10% foram de 9,9 até 39,5% menores que os do OR 10%. A pimenta calabresa (PIM 10%) sozinha, assim como o tomate seco (TS 10%) não foram capazes de inibir o crescimento de nenhum microrganismo testado.

Para os demais microrganismos, *E. coli* ATCC 10536, *S.* Enteritidis ATCC 13076, *C. freundii* F30 e *E. aerogenes* B01, não houve inibição de crescimento microbiano em placa pelos extratos aquosos das especiarias em 10^6 UFC/mL neste experimento.

Em 10^8 UFC/mL, apenas os seguintes microrganismos foram inibidos pelo extrato aquoso bruto de orégano 10%: *S. aureus* ATCC 25923 (4mm ± 1), na *L.*

innocua C08 (5,33 mm ± 0,58) e *S. sciuri* A0902 (8 mm ± 1). Os demais tratamentos (PIM 10%, OR 10% + PIM 10% e TS 10%) não foram capazes de inibir o crescimento de nenhum microrganismo em 10^8 UFC/mL.

5.3.2 Teste em matriz alimentar leite com orégano desidratado

Nos resultados anteriores, foi constatado que a concentração de orégano desidratado utilizada na produção dos queijos (0,25 g de orégano para cada 100 g de queijo) apresentou diferença na contagem (UFC/g) de colônias atípicas de *Staphylococcus* coagulase positiva em ágar Baird Parker, mas não nos testes *in vitro* através do método de difusão de gota com a utilização do extrato aquoso das especiarias na mesma concentração. Portanto, objetivou-se nesse experimento reproduzir algumas condições dos queijos, como a presença do tempero desidratado, a temperatura de armazenamento e a inoculação da bactéria na concentração exigida pela legislação para alimentos. Como os melhores resultados de inibição de crescimento microbiano foram obtidos com o gênero *Staphylococcus* spp. em 10^6 e 10^8 UFC/mL (*S. aureus* ATCC 25923 e *S. sciuri* A0902), a bactéria indicadora *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi inoculada em matriz alimentar em 10^3 UFC/mL para a pesquisa do potencial antimicrobiano do orégano desidratado. Para isto, foi utilizada a matriz alimentar leite, matéria prima do queijo, devido a maior viabilidade para aliquotar e fazer os testes e contagens.

Após a inoculação do *S. aureus* ATCC 25923 nas amostras de leite com orégano (T1 e T2) e controle (C1 e C2), as mesmas foram incubadas em duas temperaturas, simulando o armazenamento de um queijo em temperatura ambiente (26 °C ± 1,87) e refrigerada (6,2°C ± 0,83). Os resultados obtidos nas contagens iniciais, bem como realizadas nos tempos de armazenamento de 4, 10, 24 e 48 horas estão descritas na Tabela 14.

Tabela 14. Média das contagens de *S. aureus* ATCC 25923 para o teste das especiarias na matriz alimentar leite incubado em temperatura ambiente e sob refrigeração por 48 horas

Contagem	C1	T1	C2	T2
Inicial (x 10^3 UFC/mL)	6,00 ^{a}	3,50 ^{b}	5,00 ^{ab}	3,66 ^{b}
4 horas (x 10^3 UFC/mL)	5,83 ^{a}	1,33 ^{b}	4,50 ^{a}	2,16 ^{b}
10 horas (x 10^2 UFC/mL)	248,33 ^{a}	35,00 ^{bc}	61,66 ^{b}	3,33 ^{c}
24 horas (x 10^3 UFC/mL)	1666,66 ^{a}	40,00 ^{b}	8,5 ^{b}	1,66 ^{b}
48 horas (x 10^3 UFC/mL)	17333,33 ^{a}	1516,66 ^{b}	9,50 ^{b}	1,00 ^{b}

C1: controle em temperatura ambiente; T1: tratamento em temperatura ambiente; C2: controle sob refrigeração; T2: tratamento sob refrigeração. Letras iguais na mesma linha indicam a ausência de diferença estatística ($p<0.05$).

É possível observar que todas as amostras de controle e tratamento, submetidas a ambas temperaturas, apresentavam na contagem inicial o valor de 10^3 UFC/mL. Nas primeiras 4 horas, todas as amostras permanecem em 10^3 UFC/mL, assim como na contagem inicial, entretanto já é possível observar que houve um maior declínio na contagem do *S. aureus* ATCC 25923 nas amostras com a adição de 0,25% de orégano desidratado.

Com 10 horas de incubação, a menor contagem de *S. aureus* ATCC 25923 ocorreu na amostra com adição de 0,25% de orégano desidratado e que estava sob refrigeração (6,2°C ± 0,83), enquanto a maior foi no controle em temperatura ambiente (26 °C ± 1,87).

Nas contagens de 24 e de 48 horas, a amostra controle em temperatura ambiente ainda apresentava a maior contagem, com 1,66 x10^6 UFC/mL e 1,73 x10^7 UFC/mL de *S. aureus* ATCC 25923, assim como a amostra com orégano refrigerada apresentava a menor contagem, com à 1,66 e 1,00 x10^3 UFC/mL, respectivamente. Apesar de o tratamento com orégano refrigerado ter apresentado valores significativamente menores que o controle e o tratamento sob temperatura ambiente, as contagens não apresentaram diferença estatística em relação ao controle refrigerado, que manteve durante todo o experimento a contagem inicial, de 10^3 UFC/mL. Na Figura 5, foi possível observar a curva de crescimento do *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 nas amostras de leite com e sem a adição de 0,25% de orégano em duas temperaturas de armazenamento.

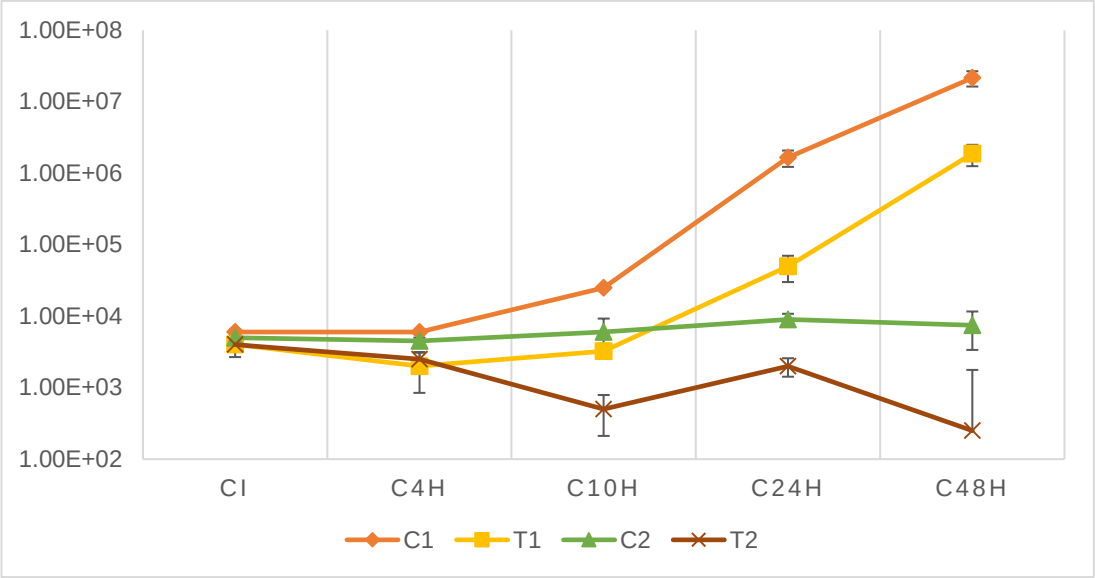


Figura 8. Curva de crescimento do *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 em matriz alimentar leite nos tratamentos com adição de orégano 0,25% e controles sem orégano, em temperatura ambiente (C1 e T1) e refrigeração (C2 e T2) por um período de 48 horas

É constatado que no C1 houve um crescimento bacteriano superior aos demais, seguido pelo T1. Entretanto, a diferença entre as curvas demonstra que o orégano foi capaz de reduzir a multiplicação do *S. aureus* ATCC 25923. A amostra sem adição de orégano refrigerada (C2) manteve a contagem próxima à que foi inicialmente inoculada, enquanto que a amostra refrigerada com orégano (T2) apresentou variações entre as avaliações.

Neste experimento, a adição de orégano desidratado em uma proporção de 0,25% sob armazenamento refrigerado se apresentou como a melhor alternativa afim de inibir o crescimento de *S. aureus* ATCC 25923. Além disso, foi possível observar que mesmo em temperatura ambiente, o orégano também foi capaz de reduzir significativamente a multiplicação do *S. aureus* ATCC 25923 em relação ao tratamento controle, sem a adição de orégano.

6. DISCUSSÃO

Embora algumas características da composição do leite bubalino produzido na Estação Experimental da UFRGS difiram um pouco daquelas encontradas na literatura, sabe-se que muitos desses rebanhos bubalinos estão estabelecidos a mais tempo e em um estágio de seleção produtiva mais avançado, possibilitando então a obtenção de resultados de composição mais estáveis. No entanto, os dados obtidos neste estudo, através da implantação do sistema e com a adoção de medidas corretivas, visaram o estabelecimento da produção deste rebanho bubalino, embasando o desenvolvimento de outras pesquisas, bem como a produção de derivados, que refletem a qualidade da matéria prima utilizada.

O Brasil não possui legislação federal específica para o leite bubalino, dessa forma, deve-se atender o estabelecido na Instrução Normativa n° 76 de 26 de novembro de 2018 (Brasil, 2018b), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), e apenas o Estado de São Paulo possui limites específicos para o leite de búfala, estabelecidos na Resolução SAA – 03 (São Paulo, 2008).

Um dos parâmetros para avaliação da qualidade do leite é a CCS, que pode ser elevada em casos de mastite, uma inflamação na glândula mamária que pode promover também outras alterações na composição do leite, como a gordura, proteína e lactose, levando à redução destes componentes (Thakur et al., 2018). Com exceção dos meses de julho e setembro, nos demais meses os resultados obtidos para CCS apresentaram-se abaixo do estabelecido pela IN 76 de 5.0 $x10^5$ cél./mL (Brasil, 2018b). Entretanto, foram superiores ao reportado por Godinho et al. (2020) para leite bubalino no Rio Grande do Sul, bem como aos valores observados em pesquisas anteriores no Brasil (Filho et al., 2014; Pasquini et al., 2018). De acordo com um estudo realizado com rebanhos de búfalas leiteiras na Itália por Tripaldi et. al (2010), a CCS de 2,0 $x10^5$ cél/mL deve ser utilizado como um ponto de corte para mastite subclínica, pois pode ser associado com alterações na composição do leite, influenciando diretamente na produção de derivados. Esse resultado reforça o observado por Medeiros et al. (2011), em que as amostras que eram positivas ao CMT e aos exames microbiológicos apresentaram CCS acima de 2,80 $x10^5$ cel/mL. Essas variações na CCS devem ser monitoradas, já que a mesma pode ser considerada um indicador da sanidade do rebanho. É preciso ressaltar que, essa elevação na CCS durante o período avaliado, ocorreu devido às duas búfalas (A e D) descritas anteriormente, que apresentaram contagens de células somáticas elevadas, as quais

também demonstraram uma redução significativa nos componentes do leite, como gordura e sólidos totais, além de baixa produção quando comparadas as demais búfalas que estavam sob as mesmas condições. Ao desconsiderar da média estes dois casos em que o leite era descartado e não integrado ao conjunto, a CCS média do rebanho está de acordo com o reportado em pesquisas anteriores (Filho et al., 2014; Pasquini et al., 2018; Godinho et al., 2020), bem como abaixo do limite estabelecido pela IN 76 (Brasil, 2018b) para leite cru bovino, sendo considerado adequado. O *S. agalactiae*, agente causador de mastite isolado no quarto mamário de uma das búfalas, é o um dos principais agentes causadores de mastite, e está associado a casos de mastite crônica (Thakur et al., 2018). Baseado nisso, o controle na ordenha com teste da caneca de fundo preto, o CMT e a implementação de uma linha de ordenha evitaram casos de mastite por contaminação cruzada nas demais búfalas do rebanho, além do monitoramento da CCS que se mostrou uma ferramenta importante no manejo da ordenha para a produção de um leite de qualidade, possibilitando também o tratamento adequado a esses animais.

Os valores de gordura obtidos nas primeiras coletas, variando de 2,09 à 3,09 g/100 g, se apresentaram abaixo tanto do exigido na IN 76 (Brasil, 2018b) para leite cru quanto na Resolução SAA – 03 (São Paulo, 2008) para leite bubalino. Os valores de gordura também foram inferiores aos relatados em estudos realizados com rebanhos bubalinos na Itália (Pasquini et al., 2018) e na Índia (Balusami et al., 2015). Os valores de proteína foram semelhantes aos estudos acima referidos. O teor de SNG representa parte do resíduo deixado após a evaporação completa da água do leite, como proteínas, lactose e minerais, e é considerado um dos melhores fatores a serem analisados para a garantia da qualidade do leite; já os ST englobam também a gordura, e indicam o rendimento na fabricação de queijos, iogurtes e outros derivados (Bassbasi el al., 2014). A média de SNG e ST foi muito próxima de outros estudos realizados com leite bubalino (Costa et al., 2014; Balusami et al., 2015; Bailone et al., 2017). Para a produção média, foi possível observar uma diferença significativa nos níveis produtivos, principalmente a partir do mês em que as bubalinas tiveram acesso à pastagem cultivada, com o pico produtivo no mês de outubro, em que as búfalas estavam com seis meses de lactação, em média. Nos meses de outubro e novembro, quando foram obtidas as maiores médias para composição do leite, os resultados foram semelhantes aos reportados para o leite bubalino produzido no Estado do Rio Grande do Sul (Godinho et al., 2020) e em outros Estados do Brasil (Filho et. al, 2014;

Bailone et al., 2017), bem como superiores aos reportados por Pignata et al. (2014) para a Bahia. Nesse mesmo período, a composição do leite estava adequada aos valores estabelecidos pela IN 76 (Brasil, 2018b) para leite cru bovino, e pela a SAA – 03 (São Paulo, 2008) para leite cru bubalino. Essa melhora na qualidade do leite foi uma consequência de ações corretivas que foram estabelecidas a partir do recebimento dos resultados das primeiras coletas, em que foi possível observar que haviam deficiências nutricionais neste rebanho. Foram providenciadas adequações referentes ao fornecimento de alimento para o rebanho através da suplementação de fibra, com o aumento do fornecimento de silagem de 0.9% para 1.8% do peso vivo, em uma maior frequência semanal, que juntamente ao acesso à pastagem cultivada de aveia-preta e azevém a partir do mês de setembro, possibilitou a obtenção de uma melhora na qualidade do leite.

Nas avaliações do leite bubalino da EEA-UFRGS, os parâmetros físico-químicos foram avaliados através das análises de densidade, IC e acidez. Uma elevação da densidade do leite foi observada com o aumento da gordura e dos sólidos totais do leite, e se apresentou superior aos limites da legislação vigente para o leite bovino, e inclusive superior ao limite estabelecido pela legislação estadual específica para leite bubalino (São Paulo, 2008). Entretanto, os valores obtidos estão de acordo com o observado na literatura para leite bubalino (Godinho et al., 2020), que apresenta essa elevada densidade devido à conformação dos seus glóbulos de gordura, que são maiores que os do leite de vaca bovina, apresentando maior densidade (Huhn et al., 1992). O leite bubalino produzido pelo rebanho experimental apresentou valores de acidez e IC em conformidade com o estabelecido pela legislação para leite cru bovino (Brasil, 2018), com exceção da média do primeiro mês que estava baixo. Foi possível observar uma elevação na acidez quando o leite aumentou os demais componentes, reforçando a correlação observada entre a acidez e o teor de SNG no leite bubalino por Hofi et al. (1966). O IC, que é a medida do ponto de congelamento do leite em relação ao da água, é uma prova utilizada na indústria para detectar se houve fraude no leite por adição de água (Brasil, 2011). A média obtida para IC do leite produzido na Estação Experimental foi semelhante aos resultados obtidos para rebanhos da Itália (Pesce et al., 2016), e está dentro do exigido na legislação para leite cru (Brasil, 2018).

A CPP se manteve abaixo do limite de 3.0 $x10^5$ UFC/mL estabelecido pela IN 76 (Brasil, 2018b) durante todo o período avaliado no presente estudo. Esses

resultados demonstram uma boa qualidade higiênica na manipulação e na higienização dos materiais, e são indicativos de um efeito positivo da adequação aos protocolos de Boas Práticas Agropecuárias na ordenha.

Os limites máximos de resíduos (LMR), ingestão diária aceitável (IDA) e dose de referência aguda (DRfA) para insumos farmacêuticos ativos (IFA) de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal são estabelecidos pela Instrução Normativa n° 51 de 19 de dezembro de 2019 (Brasil, 2019a), que exige a pesquisa periódica de resíduos no leite em realizadas em laboratórios da Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários, composta pelos Laboratórios Federais de Defesa Agropecuária – LFDAs e pelos laboratórios credenciados pelo MAPA. Neste estudo foi possível observar que os resultados estavam em conformidade, pois não foi detectado resíduos dos princípios ativos pesquisados mesmo quando uma das búfalas estava em tratamento para mastite com antibiótico intramamário, indicando que foi respeitado o período de carência indicado pelo fabricante do medicamento.

Como o perfil de AGL do leite de ruminantes é influenciado pela alimentação, especialmente gramíneas e leguminosas (Kalač e Samková, 2010; Bauman et al., 2011), é possível correlacionar as alterações observadas com a nutrição das búfalas. Sendo a base da alimentação do rebanho composta por fibras, como a pastagem e da silagem, a partir da melhora do aporte nutricional do rebanho dessas fontes, observou-se um aumento no teor e na frequência dos AGL entre as amostras 2 e 7, assim como ocorreu com os demais parâmetros de composição do leite bubalino. Os resultados encontrados para C16:0 e C18:1- cis (n9) estão de acordo com o encontrado por Ahmad et al., (2013) e Gagliostro et al. (2015), sendo que os últimos também observaram que AGL de cadeia longa (>= C18) são frequentes em amostras de leite de búfala. Enquanto AGL de cadeias curtas contribuem para aroma dos derivados de leite, aqueles de cadeias longas são fatores importantes para características tecnológicas destes produtos. Não foi encontrado na literatura resultados semelhantes para os Ácidos cis-11,14-Eicosadienóico e cis-13,16-Docosadienóico, embora a presença destes AGLs tenha sido documentada em plantas da família *Limnanthaceae*, sendo possível, portanto, que estes resultados tenham origem alimentar (Balcao & Malcata, 1998). Ahmad et al., (2013) também relatou que a proporção de ácidos graxos saturados seria mais que o dobro daquela dos insaturados (70,8 e 29,2%, respectivamente). No entanto, neste estudo a proporção semelhante ocorreu apenas na coleta 2 de junho (72,9 e 27%). Nas coletas

7 e 8 houve, inclusive, prevalência de ácidos graxos polinsaturados. Ácidos graxos insaturados são extremamente relevantes para a saúde humana, principalmente por seu papel na redução do colesterol total e lipoproteínas de baixo peso molecular sem prejuízo àquelas de alta densidade (Mihaylova & Peeva, 2007).

No entanto, apesar de o leite estar de acordo com os padrões microbiológicos estabelecidos pela IN 76 (Brasil, 2018b), os resultados observados nas análises de água para Coliformes Totais e Termotolerantes, e *Escherichia coli* não estavam em conformidade com a legislação vigente, que estabelece que a água para consumo deve ser isenta de bactérias do grupo Coliformes, bem como *E. coli* (BRASIL, 2011). Apesar das ações corretivas que foram estabelecidas no recebimento dos primeiros resultados em junho, com a higienização e cloração da caixa d'água, na realização da segunda coleta os resultados de não conformidade se mantiveram. A água utilizada no Tambo da EEA-UFRGS é proveniente de uma nascente, e é armazenada em uma cisterna antes de passar pelo encanamento que chega até a caixa d'água. Dessa forma, essa pode ser a justificativa a ser considerada para que não tenha sido observada melhora na qualidade da água mesmo com as ações realizadas. Neste estudo não foi observada associação entre a qualidade do leite e a qualidade microbiológica da água utilizada para higienização dos equipamentos.

O leite empregado na produção dos queijos artesanais tipo Colonial bubalino no presente estudo, produzido entre os meses de outubro e novembro, se encontrava com padrões de qualidade e identidade de acordo com os estabelecidos pela IN 76 para leite cru bovino (Brasil, 2018b), além de parâmetros semelhantes aos obtidos por Godinho et al. (2020) em um estudo realizado com os produtores de leite bubalino do Estado do Rio Grande do Sul. O rendimento obtido na produção dos queijos a partir deste leite foi superior ao obtido por Mattiello et al. (2018), que relatou a utilização de 8,72 L de leite bovino para produzir 1 kg de queijo Colonial, bem como Gracioli et al. (2013), que utilizou 8,9 L de leite bovino para obter 1 kg do mesmo queijo. Com relação as características, o queijo Colonial bovino trata-se de um queijo de coloração amarelo-palha, com textura aberta no interior, com massa lisa e, eventualmente, com algumas pequenas olhaduras, que pode ser maturado por até 30 dias (Tesser et al., 2016). Sendo assim, visualmente o queijo Colonial bubalino se apresentou com características semelhantes ao bovino, entretanto apesar da

formação de casca levemente amarela, o seu interior permaneceu com a coloração branca característica dos derivados bubalinos.

Até a conclusão deste estudo, não havia um RTIQ específico para o queijo Colonial que estabeleça os parâmetros bromatológicos. Entretanto, através da Portaria nº 146/1996 (BRASIL, 1996), os queijos podem ser classificados quanto ao teor de gordura no extrato seco em: magros (< 10 a 24,9%); semigordos (25,0% a 44,9%); gordos (45,0% a 54,9%) e extra gordos ou duplo creme (> 60,0%). Além disso, também podem ser classificados de acordo com o conteúdo de umidade em: queijos de baixa umidade ou massa dura (< 35,9%); média umidade ou massa semidura (36,0% a 45,9%); alta umidade ou massa branda macia (46,0% a 54,9%); e muito alta umidade ou de massa branda mole (> 55,0%). Dessa forma, de acordo com os resultados obtidos nas análises bromatológicas do presente estudo, os queijos artesanais tipo Colonial bubalino são classificados como gordos com massa semidura de umidade média. Os teores de matéria seca obtidos neste estudo foram semelhantes aos apresentados por Rekowsky et al. (2021) para queijo coalho de massa semidura produzido com a inclusão de 45% leite de vaca. No entanto, a gordura foi superior, provavelmente devido ao fato de que este queijo Colonial foi produzido com 100% de leite bubalino. Além disto, também foi possível observar que o queijo com adição de orégano e pimenta apresentou a gordura superior aos demais queijos produzidos. Este resultado é diferente do observado por Bezerra (2022) com queijo coalho bovino, em que a adição de óleo essencial de orégano reduziu os teores de gordura dos queijos. Os resultados de composição para gordura, matéria seca e proteína obtidos para a produção de queijo Colonial bubalino foram superiores aos teores relatados para a produção do mesmo queijo com leite bovino (Tavares et al., 2019; Mattiello et al., 2018; Funk et al., 2015). A menor umidade observada no COP foi semelhante ao observado em um estudo com a aplicação de microcápsulas de óleo essencial de orégano em queijo quark, onde o aumento da concentração de microcápsulas no queijo quark promoveu a redução da umidade e aumento do teor de extrato seco total (Azevedo et al., 2012). A proteína observada foi inferior à média relatada por Castilho et al. (2019) para queijos artesanais produzidos no Paraná, entretanto o queijo bubalino apresentou um teor de gordura superior. A adição das especiarias nos queijos não trouxe grandes alterações nos parâmetros de composição dos mesmos, pois apesar de o queijo Colonial bubalino com orégano e pimenta

calabresa ter apresentado menos umidade que os demais, e consequentemente mais gordura, todos se mantiveram dentro da mesma classificação.

Além de atender a padrões de composição, o estudo da qualidade microbiológica dos queijos é de vital importância, pois os microrganismos existentes em produtos de origem animal podem causar graves doenças ao consumidor, além de perdas para a indústria. Os queijos foram produzidos a partir de uma matéria-prima muito rica em nutrientes e água, que propicia ambiente favorável para a multiplicação bacteriana. Dessa forma, os queijos Coloniais bubalinos foram submetidos a análises microbiológicas de acordo com a Portaria nº 146/96 específica para queijo de umidade média, afim de assegurar sua qualidade higiênico sanitária. A legislação brasileira não apresenta limites de Contagem de mesófilos em queijos, mas altas quantidades podem indicar que os mesmos foram preparados com matéria prima contaminada, em um processo higienicamente insatisfatório, ou que os alimentos foram armazenados em condições inadequadas. As variações observadas na Contagem Bacteriana Total nos diferentes tipos de queijo Coloniais analisados, poderiam estar relacionadas com a qualidade microbiológica dos condimentos adicionados, visto que tal aspecto não foi monitorado. A CBT obtida no presente estudo foi inferior à reportada por Benincá et al (2022) em um estudo sobre a qualidade microbiológica e Boas Práticas de Fabricação (BPF) na produção de queijo Colonial no Sul do Brasil, porém superior ao reportado para queijos coloniais na região Sudoeste do Paraná (Casaril et al., 2017). De acordo com os padrões exigidos pela Portaria nº 146 de 07 de março de 1996 (Brasil, 1996), por se tratar de um queijo de umidade média, o queijo Colonial deve atender aos seguintes padrões microbiológicos: limite de 10^3 UFC/g de *Staphylococcus* coagulase positiva, $5x10^3$ UFC/g de Coliformes Totais e $5\ x10^2$ UFC/g de Coliformes Termotolerantes, além de ausência de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* em 25 g de queijo. Sendo assim, dado que a ausência de crescimento de colônias características de *Staphylococcus* coagulase positiva e coliformes termotolerantes nos testes presuntivos para todas as amostras testadas, bem como ausência de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, os queijos Coloniais produzidos neste estudo encontram-se dentro dos padrões microbiológicos exigidos. Os queijos Coloniais bubalinos também estão de acordo com os limites estabelecidos pela Instrução Normativa nº 161, de 1º de julho de 2022 (Anvisa, 2022), que estabelece os padrões microbiológicos de alimentos. Estes resultados demonstraram que os queijos, foram fabricados seguindo as BPFs durante seu processamento, com

qualidade microbiológica superior aos resultados obtidos para queijos coloniais comercializados no Estado do Rio Grande do Sul (Tavares et al., 2019; Ausani et al., 2019). O grupo dos *Staphylococcus* coagulase positiva é composto por diversas espécies, sendo uma delas o *S. aureus*. As demais espécies que não produzem essa enzima são denominadas de *Staphylococcus* coagulase negativa (Feitosa et al., 2017). De acordo com Andrade et al. (2019), a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva em alimentos é considerado um fator preocupante quando atingem contagens superiores a 10^5 UFC/g, pois considera-se que a partir deste valor a quantidade de enterotoxina produzida será suficiente para causar sintomas de gastroenterite, uma das doenças alimentares mais comuns no mundo. As enterotoxinas estafilocócicas são proteínas extracelulares pertencentes a família das toxinas pirogênicas, que são produzidas por 30% a 50% das cepas de *S. aureus*. Essas toxinas, que tem como característica a termorresistência, ou seja, não são eliminadas em processos de pasteurização, podem causar modificações histológicas no estômago e jejuno, resistindo também aos processos de hidrólise propiciados por enzimas gástricas e intestinais. (Andrade et al., 2019). Lisboa et al. (2022) relataram que 100% das amostras estudadas de queijo Minas Frescal Artesanal de feiras livres do município de Ipatinga-MG apresentaram contaminação em relação à contagem e análise presuntiva de *Staphylococcus* coagulase positiva em 10^7 UFC/mL, sendo que apenas uma das amostras era coagulase negativa. Tavares et al. (2019) observaram em seu estudo que 18 das 30 amostras de queijo artesanal produzidos na região sul do Rio Grande do Sul apresentaram contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva acima de 10^5 UFC/g. Erhardt et al. (2022) relataram que 100% das amostras de queijos coloniais artesanais analisados apresentaram população de *S. aureus* acima do permitido pela legislação. Nestes casos, as amostras de queijo Colonial artesanal demonstraram problemas com as condições higiênico-sanitárias de processamento, uma vez que *S. aureus* tem o ser humano e os animais como reservatórios naturais (Erhardt et al., 2022). Entretanto, apesar de a legislação brasileira estabelecer limites apenas para a Contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, e não para a Contagem de *Staphylococcus* spp. (coagulase negativa), este parâmetro deve ser monitorado. De acordo com Gonçalves et. al (2020), as espécies coagulase negativa possuem capacidade de formar biofilme em diferentes superfícies de equipamentos e materiais utilizados em instalações industriais, podendo ser fonte de contaminação para alimentos e gerar prejuízos para a indústria e risco à saúde pública. Mendes

(2018) menciona em sua pesquisa que a presença em grandes quantidades do grupo de *Staphylococcus* coagulase negativa são de grande relevância para a saúde alimentar, pois já existem relatos que esses microrganismos também podem produzir a toxina da Sídrome de Choque Tóxico, tendo como consequência, uma intoxicação alimentar. A redução na Contagem de *Staphylococcus* spp. observada neste estudo também foi reportada em ricota de leite bovino com adição de óleo essencial de orégano (Hafemann et al., 2015), indicando que a aplicação do óleo de orégano ou do orégano desidratado pode funcionar como conservante natural nos queijos, sendo uma alternativa ao uso de aditivos químicos. Com relação às Pesquisas realizadas neste estudo, as bactérias patogênicas *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes*, de acordo com a Portaria nº 146 de 07 de março de 1996 (Brasil, 1996), devem ser ausentes nos queijos para consumo. As bactérias do gênero *Salmonella* são pertencentes à ordem *Enterobacterales*, e consideradas umas das doenças transmitidas por alimentos mais prevalentes no mundo. A sua presença em alimentos é de grande preocupação, pois trazem problemas à saúde caracterizados por náuseas, febre, dor abdominal, vômitos ligados à desidratação, podendo desencadear sequelas crônicas como a artrite (Luz et al., 2020). Já a *Listeria monocytogenes* é considerada um dos principais patógenos que geram preocupações a saúde, capaz de causar problemas como meningite e septicemia. Sendo sua contaminação associada a alimentos prontos para o consumo que não sofreram tratamento térmico, está disseminada no meio ambiente, podendo fazer parte da microbiota intestinal de animais, e ser isolado do úbere de vacas saudáveis ou das mãos dos operadores, podem facilmente contaminar o leite durante o processo de ordenha e ser passado para o queijo (Campagnollo et al., 2018; Costanzo et al., 2020).

Ainda, nas análises microbiológicas dos queijos Coloniais bubalinos, foi observada diferença na contagem de colônias atípicas de *Staphylococcus* coagulase positiva entre os queijos, sendo que o queijo Colonial com adição de orégano e pimenta calabresa (COP) apresentou uma menor contagem. Testes *in vitro* foram realizados com as especiarias utilizadas nos queijos para estudo do potencial antimicrobiano das mesmas, através do método de difusão de gota. Os resultados observados com o uso do extrato aquoso de orégano 10% na inibição do *S. aureus* ATCC 25923 foram inferiores aos reportados para o óleo essencial de orégano em menores concentrações (Helal et al., 2019; Kryvtsova et al., 2020; Altun et al., 2022). Entretanto, foram semelhantes aos halos (mm) observados com uso do óleo essencial

de orégano 1% para *S. aureus* e *L. monocytogenes* por Reis et al. (2020), que também reportaram a presença de halos de inibição para *E. coli* e *Salmonella* spp, ao contrário do observado neste experimento. Os resultados obtidos no presente estudo também foram semelhantes aos halos (mm) obtidos com o uso do óleo essencial de orégano na concentração de 10 µL/mL, em um estudo que identificou que as bactérias Gram positivas, e especialmente o *S. aureus*, se mostraram mais sensíveis (Pombo et. al., 2018). Nesta mesma pesquisa, foi relatado que as bactérias Gram-negativas *E. coli* e *S.* Enteritidis se mostraram mais resistentes, sendo inibidas somente com o dobro da concentração de óleo de orégano. Esse resultado, obtido também no presente estudo através ausência de inibição de crescimento dessas bactérias pelas especiarias, pode ser justificado devido ao mecanismo de ação dos componentes do orégano, visto que o potencial antimicrobiano do mesmo se dá, principalmente através de danos à membrana celular, afetando a permeabilidade da membrana (Cui et al., 2019). As bactérias Gram-negativas apresentam uma maior complexidade estrutural da parede celular, pois possuem uma membrana externa composta por lipopolissacarídeos, responsável por envolver a parede celular e proporcionar uma maior resistência, restringindo a difusão e acúmulo do óleo essencial na célula bacteriana em menores concentrações (Guimarães et. al, 2017; Santos et al., 2017). Os halos de inibição (mm) para *S. aureus* ATCC 25923 e *S. sciuri* A0902, bem como para a *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e *Listeria innocua* C08, foram semelhantes à medida de halo padrão indicado para ausência de resistência dos isolados ao uso de antibióticos, de >14 mm para uso de Sulfametoxazol-trimetoprima em *Staphylococcus* spp. e de >13 mm para Benzilpenicilina em *Listeria monocytogenes* (BrCAST-EUCAST, 2022). Os resultados de inibição ainda foram superiores ao do uso de extrato aquoso de alecrim e cravo-da-índia 25% frente as cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, pois os extratos aquosos dessas espécies de plantas não apresentaram efeito inibitório com os microrganismos em 10^8 UFC/mL (Guimarães et al., 2017). Não foram encontrados na literatura outros trabalhos com teste de inibição que relatasse os efeitos do extrato aquoso de orégano sobre isolados bacterianos, bem como estudos sobre inibição do gênero *Proteus* spp.

De acordo com os resultados obtidos do potencial de inibição do orégano, e baseado nas análises microbiológicas dos queijos com especiarias, foi realizado um experimento com a aplicação da mesma proporção de orégano utilizado no queijo (0,25%), porém aplicado em leite experimentalmente contaminado com *S. aureus*

ATCC 25923. Ainda não foram reportados na literatura os efeitos da aplicação do orégano desidratado ou do óleo de orégano em leite experimentalmente contaminado com *Staphylococcus aureus.* Alguns autores, no entanto, realizaram experimentos semelhantes com algumas variações, como outro tipo de matriz alimentar e outras bactérias. Em um estudo com aplicação de orégano em massa de embutido cárneo com inoculação de *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN), foi observado durantes três dias que a aplicação do óleo essencial de orégano na massa nas concentrações de 1 e 1,5% foi capaz de reduzir significativamente as contagens de SCN no segundo dia (Rosa, 2021). Silva (2010) verificou o efeito do óleo essencial de *O. vulgare* incorporado à massa de hambúrguer bovino experimentalmente contaminado por *S. aureus*, constatando que 1% desse óleo foi capaz de reduzir de forma significativa a contagem dessa bactéria. Betta et al. (2013) também constataram o efeito bacteriostático do *O. vulgare* a 2% em carne moída bovina contaminada por *S. aureus*. Apesar das diferenças relativas à matriz alimentar, os resultados do nosso estudo reforçado por estes, indicam que a ação inibitória do *O. vulgare* frente ao *S. aureus* em alimentos é efetiva. Vivian et al. (2020) relataram que o óleo essencial de *O. vulgare* na concentração 0,5% e 1,0% não foi capaz de eliminar *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium da massa para embutido cárneo experimentalmente contaminada com 10^2 UFC/mL. Entretanto, na concentração de 1,5%, ambas foram eliminadas. Com relação à temperatura de armazenamento, foi possível observar ainda que condições de armazenagem impróprias podem favorecer a multiplicação do *S. aureus* em alimentos, apesar da utilização do orégano, e o mesmo foi observado por Rosa (2021). Além da capacidade de diminuir microrganismos indesejáveis, outro aspecto a ser considerado quando se trata da adição de especiarias em queijos é a aceitação pelos consumidores. A proporção adicionada no COP, de 0,25% de orégano, é a mesma utilizada por um Laticínio no Estado do Rio Grande do Sul para queijo Colonial bovino temperado, como forma de obter um produto com mais valor agregado, e neste experimento se apresentou como uma alternativa também para a conservação do queijo. Além disso, como se viu que a qualidade do leite bubalino melhorou com à adequação as BPAs, e o queijo Colonial bubalino desenvolvido apresentou um rendimento na superior ao do leite bovino, refletindo sua composição centesimal superior na produção de derivados, pode se concluir que a matéria prima estudada apresentou potencial para desenvolvimento de queijos coloniais com especiarias, podendo atender um novo mercado consumidor.

7. CONCLUSÕES

O manejo da saúde da glândula mamária, com acompanhamento de casos, bem como a adequação da ordenha aos protocolos de Boas Práticas Agropecuárias foram eficientes para assegurar um controle microbiológico na ordenha, evitando casos de contaminação cruzada de mastite e atendendo os limites impostos pela IN 76 para CCS e CPP do leite de conjunto.

Neste estudo também foi possível observar que, com uma nutrição adequada, além da melhora na produção média diária, também foi possível promover uma melhora na composição do leite bubalino. A gestão dos dados produtivos e de qualidade do leite possibilitaram uma elevação dos componentes do leite, como a gordura e os sólidos totais, atendendo a legislação vigente para leite cru bovino e bubalino, bem como a bibliografia para leite bubalino. O mesmo foi observado nos ácidos graxos, em que houve um aumento de concentração e frequência com a melhora da nutrição dos animais, com predominância dos ácidos palmítico (C16:0) e oleico (C18:1- cis (n9)).

Sendo o queijo Colonial um produto de grande importância cultural na região Sul do Brasil, a sua produção a partir do leite bubalino apresentou uma boa viabilidade com o desenvolvimento de um produto com composição centesimal superior ao queijo Colonial tradicional, bem como possibilitando variações do produto através da adição de condimentos como o orégano, a pimenta calabresa e o tomate seco.

Dentre as especiarias utilizadas, o orégano desidratado foi capaz de apresentar potencial antimicrobiano mesmo na concentração aplicada na produção do queijo Colonial, de 0,25%, principalmente quando associado ao armazenamento refrigerado.

Sendo assim, o monitoramento dos padrões qualidade do leite bubalino produzido na EEA-UFRGS subsidiou a possibilidade do estabelecimento de um controle mais profícuo, com perspectiva de expansão do rebanho experimental e homogeneização dos animais, além de viabilizar a produção de derivados de alto rendimento, mostrando ser uma excelente matéria-prima para a fabricação de queijos.

8. REFERÊNCIAS

ABCB. 2021. Associação Brasileira de Criadores de Búfalos. Disponível em: https://bufalo.com.br/. Acesso jan. 2022.

Ahmad S, Anjum FM, Huma N, Sameen A, Zahoor T. 2013. Composition and physico-chemical characteristics of buffalo milk with particular emphasis on lipids, proteins, minerals, enzymes and vitamins. Journal of Animal and Plant Sciences. 1;23(Suppl 1):62-74.

Almeida VS, Calil FC, Geromel MR, Fazio MLS. 2021. Atividade antimicrobiana de temperos árabes. Revista Interciência – IMES Catanduva - 1(6).

Altun M, Yapici BM. 2022. Determination of chemical compositions and antibacterial effects of selected essential oils against human pathogenic strains. Anais da Academia Brasileira de Ciências. 94(1).

Amaral FR, Carvalho LB, Silva N, Brito JRF, Souza GN. 2004. Composição e contagem de células somáticas em leite bubalino na região do Alto São Francisco, Minas Gerais, Brasil. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, 59:37-41.

Ambrosini LB. 2022. Origem histórica e contexto atual de produção dos queijos tradicionais do Rio Grande do Sul: uma análise sob a perspectiva do terroir. Revista Brasileira de Gastronomia, Florianópolis, SC – 5:01-20.

Andrade FPJ, Lima BTM, Alves TWB, Menezes MES. 2019. Fatores que propiciam o desenvolvimento de *Staphylococcus aureus* em alimentos e riscos atrelados a contaminação: uma breve revisão. Rev. Ciênc. Méd. Biol., Salvador, 18(1):89-93.

ANVISA. 2005. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução –RDC nº 276, de 22 de setembro de 2005. Regulamento Técnico para Especiarias, Temperos e Molhos. Ministério da Saúde - MS.

ANVISA. 2022. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 161, de 1 de julho de 2022. Estabelece os padrões microbiológicos dos alimentos. Diário Oficial da União, 6 jul. 2022. Seção1, p.235-238.

AOCS. 2009. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society.

Araujo LS, Araujo RS, Serra JL, Nascimento AR. 2015. Composição química e susceptibilidade do óleo essencial de orégano (Origanum vulgare L.) frente a cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella choleraesuis*. Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos, 33(1):73-78.

Ausani TC, Lopes GV, Costa EF, Corbellini LG, Cardoso M. 2019. Qualidade microbiológica de queijos coloniais comercializados em Porto Alegre-RS. Semina: Ciências Agrárias, 40(2):639–650. (https://doi.org/10.5433/1679-0359.2019v40n2p639)

Azevedo VM, da Costa JMG, Domingo EC, Carneiro JDS, Pinto SM, Borges SV. 2012. Potencial de aplicação de microcápsulas de óleo essencial de orégano em queijo quark. Rev.Inst.Latic.CândidoTostes; 386:05-12.

Bailone RL, Borra RC, Roça RO, Aguiar L and Harris M. 2017. Quality of refrigerated raw milk from buffalo cows (Bubalus bubalis bubalis) in different farms and seasons in Brazil. Ciência Animal Brasileira, 18:01-12.

Balcao VM, Malcata FX. 1998. Lipase catalyzed modification of milkfat. Biotechnology advances. 16(2):309-41.

Balusami C. 2015. Milk constituents of non-descript and graded murrah buffaloes in Tamil Nadu, India. Indian Journal of Natural Sciences, 5:2475-2479.

Barreto F, Ribeiro C, Hoff RB and Costa TD. 2016. Determination of chloramphenicol,

thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in poultry, swine, bovine and fish by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography, 1449:48-53.

Bassbasi M, Platikanov S, Tauler R and Oussama A. 2014. FTIR-ATR determination of solid non fat (SNF) in raw milk using PLS and SVM chemometric methods. Food Chemistry 146:250-254.

Bauman DE, Mcguire MA, Harvatin KJ. 2011. Mammary gland, milk biosynthesis and secretion. In: Encyclopedia of Dairy Sciences, 2:352–358.

Benincá T, Santos VZ, Sant'Anna V, Berreta MSR. 2022. Correlação entre dados microbiológicos e físicoquímicos com as boas práticas de fabricação de queijos coloniais produzidos no Sul do Brasil. Cadernos de Ciência & Tecnologia, Brasília, 39(3) (doi: 10.35977/0104-1096.cct2022.v39.27176).

Bernardes O. 2010. Necessidades nutricionais de búfalas leiteiras. 2° Encuentro Nacional de Criadores de Búfalos, Bucaramanga, Colômbia.

Betta FD, Schittler L, Pereira MG. 2013. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de orégano sobre a flora contaminante de carne moída. VIII Simpósio de alimentos.

Bezerra LR. 2022. Análise físico-química e sensorial de queijo de coalho adicionado com diferentes concentrações de óleo essencial de orégano (Origanum vulgare). Trabalho de Conclusão de Curso. UFPB, Paraíba.

Bhargava K, et al. 2015. Application of an oregano oil nanoemulsion to the control of foodborne bacteria on fresh lettuce. Food Microbiology, London, 47:69-73.

Bittante G, Amalfitano N, Bergamaschi M, Patel N, Haddi ML, Benabid H, Pazzola M, Vacca GM, Tagliapietra F, Schiavon S. 2022. Composition and aptitude for cheese making of milk from cows, buffaloes, goats, sheep, dromedary camels, and donkeys. Journal of Dairy Science, 105(3):2132-2152.

Blaya J, Barzideh Z, LaPointe G. 2018. Interaction of starter cultures and nonstarter lactic acid bacteria in the cheese environment. Journal of Dairy Science. (101. 10.3168/jds.2017-13345).

Bligh EG, Dyer WJ. 1959. A rapid method of total lipid estraction and purification. Canad. J. Bioch, 37:911-17.

Brasil. 1950. Lei nº 1.283, de 18 dezembro de 1950. Dispõe sobre a inspeção industrial e sanitária dos produtos de origem animal. Presidência da República. Casa Civil. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília.

Brasil. 1996. Diário Oficial da União e D.O.U. Portaria nº 146 de 7 de março de 1996. Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. Presidência da República. Casa Civil. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília.

Brasil. 1996. Portaria nº 146 de 7 de março de 1996. Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. Diário Oficial da União e D.O.U. Brasília.

Brasil. 2003. Instrução Normativa SDA - 62, de 26/08/2003. Oficializar os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Secretária de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária E Abastecimento. Brasilia, DF.

Brasil. 2006. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Métodos analíticos oficiais físicoquímicos, para controle de leite e produtos lácteos. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União, Brasília, p. 8.

Brasil. 2011. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Depressão do Ponto de Congelamento do Leite Fluido. MET POA (Métodos de Ensaio Produtos de

Origem Animal). Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília.
Brasil. 2011. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial da União, Brasília, Seção 1.
Brasil. 2018a. Lei n° 13.680, de 14 de junho de 2018. Dispõe sobre o processo de fiscalização de produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal. Presidência da República. Casa Civil. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília.
Brasil. 2018b. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa 76 de 26 de novembro de 2018. Dispõe sobre identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. Diário Oficial da União, Brasília.
Brasil. 2019a. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa Nº 51, de 19 de dezembro de 2019. Estabelece a lista de limites máximos de resíduos (LMR), ingestão diária aceitável (IDA) e dose de referência aguda (DRfA) para insumos farmacêuticos ativos (IFA) de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. Diário Oficial da União, Brasília.
Brasil. 2019b. Decreto nº 9.918, de 18 julho de 2019. Dispõe sobre o processo de fiscalização de produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal. Presidência da República. Casa Civil. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília.
Brasil. 2019c. Lei nº 13.860, de 18 de julho de 2019. Dispõe sobre a elaboração e a comercialização e regulamentação de queijos artesanais e queijarias produtoras desses produtos artesanais. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília.
Brasil. 2022. Portaria MAPA nº 531, de 16 de dezembro de 2022. Estabelece requisitos para concessão dos selos ARTE e Queijo Artesanal pelos órgãos de agricultura e pecuária federal, estaduais, municipais e distrital. Presidência da República. Casa Civil. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília.
BrCAST-EUCAST. 2022. Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos. Versão 12. Disponível em (https://brcast.org.br/wp-content/uploads/2022/09/Tabela-pontos-de-corte-clinicos-BrCAST-12-abr-22.pdf)
Campagnollo FB, Gonzales-Barron U, Cadavez VAP, Sant'ana AS, Schaffner DW. 2018. Quantitative risk assessment of Listeria monocytogenes in traditional Minas cheeses: The cases of artisanal semi-hard and fresh soft cheeses. Food control, 92:370-379.
Casaril KBPB, Bento CBP, Henning K, Pereira M, Dias VA. 2017. Qualidade microbiológica de salames e queijos coloniais produzidos e comercializados na região sudoeste do Paraná. Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS), 7(2):75-85.
Castilho ACB, Stafussa AP, Rodrigues LM, Ressutte JB, Pozza MSS, Madrona GS. 2019. Artisan cheese from Paraná: characterization of its proximate composition. Braz. J. of Develop., Curitiba, 5(10):21543-21567.
CLSI. 2012. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: Approved Standard - Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
Coelho AS. 2019. Cenário da bubalinocultura no Brasil. Dissertação (Trabalho de

Conclusão de Curso) – Instituto da Saúde e Produção Animal, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém-PA.

Costa MHBFo, Lima DMJr, Rangel AHN, Silva FJS, Novaes LP, Galvão JGBJr, Silva MJM, Moreno GMB. 2014. Sazonalidade e variação na qualidade do leite de búfalas no Rio Grande do Norte. Acta Veterinaria Brasilica, 8:201-208.

Costanzo N, Ceniti C, Santoro A, Clausi MT, Casalinuovo F. 2020. Foodborne pathogen assessment in raw milk cheeses. International journal of food Science.

Cui H, Zhang C, Li C, Lin L. 2019. Antibacterial mechanism of oregano essential oil. Industrial Crops and Products, 139(1). (https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111498)

Domenico VL, Motta AS. 2022. Manual de Boas Práticas Agropecuárias na Ordenha: Bubalinocultura. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Dorigon C, Renk A. 2011. Técnicas e métodos tradicionais de processamento de produtos coloniais: de "miudezas de colonos pobres" aos mercados de qualidade diferenciada. Revista de Economia Agrícola, São Paulo, 58(1):101- 13.

Erhardt MM, Fröder H, Oliveira WC, Ströher JA, Savergnini PR, Santos VZ, Richards NSPS. 2022. Avaliação físico-química e microbiológica de queijos artesanais a partir de leite cru e verificação de boas práticas em propriedades rurais no Vale do Taquari-RS. Research, Society and Development, 11. (doi: https://doi. org/10.33448/rsd-v11i13.35290).

FAO e IDF. 2013. Guia de boas práticas na pecuária de leite. Produção e Saúde Animal Diretrizes. 8. Roma.

FAOSTAT. 2021. Food And Agriculture Organization Of The United Nations Statistics <http://faostat.fao.org/>

Farias JLL, Rezende PLR, Pinto EG. 2017. Queijo minas frescal enriquecido com óleo de orégano. Colloquium Agrariae, 13:432-437 (doi: 10.5747/ca.2017.v13.nesp.000247).

Feitosa AC, Rodrigues RM, Torres EATT, Silva JFM. 2017. *Staphylococcus aureus* em alimentos. Revista Desafios, Tocantins, 4(4):15- 31.

Filho MHBC, Júnior DML, Rangel AHN, Silva FJS, Novaes LP, Júnior JGBG, Silva MJMS, Moreno GMB. 2014. Season and buffalo milk quality in Rio Grande do Norte state. Acta Veterinaria Brasílica 8:201–208.

Franciscis G, Di Palo R. 1994. Buffalo milk production. In: World Buffalo Congress, 4(1):137-146.

Funck GD, Hermanns G, Vicenzi R, Schmidt JT, Richards NSPS, Silva WP et al. 2015. Microbiological and physicochemical characterization of the raw milk and the colonial type cheese from the Northwestern Frontier region of Rio Grande do Sul, Brazil. Rev Inst Adolfo Lutz, 74(3):247-57.

Gagliostro GA, Patiño EM, Sanchez Negrette M, Sager G, Castelli L, Antonacci LE, Raco F, Gallello L, Rodríguez MA, Cañameras C, Zampatti ML. 2015. Perfil de ácidos graxos do leite de búfalas a pasto recebendo uma mistura de óleo de soja e linhaça na dieta. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 67:927-34.

Ganguli VC. 1979. Tecnologia de la leche de búfala. Revista Mundial de Zootecnia, Roma, 30:2-10.

García VA. 2014. Avaliação, isolamento e identificação dos principais microrganismos causadores de mastite subclínica em búfalas. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo. Pirassununga.

Godinho FMS, Krug M, Muller A, Jank L, Tomaszewski CA, Hillesheim DR, Kinast EJ, Frazzon APG, Motta AS. 2020. Microbiological and physicochemical

characteristics of buffalo milk used for dairy products in southern Brazil. Journal of Dairy Research.

Gonçalves TG, Timm CD. 2020. Biofilm production by coagulase-negative *Staphylococcus*: a review. Arq Inst Biol, 87. (https://doi.org/10.1590/1808-1657001382018).

González-Córdova AF, et al. 2016. Invited review: Artisanal Mexican cheeses. Journal of Dairy Science, 99(5):3250-3262 (doi: 10.3168/jds.2015-10103).

Gracioli F, Lehn DN, Souza CFV. 2013. Análise comparativa de custo e rendimento da fabricação de queijo tipo camembert e queijo colonial em pequena escala. CETEC/UNIVATES. Revista Destaques Acadêmicos, 5(4).

Guimarães, CC, Ferreira, TC, Oliveira, RCF, Simioni, PU, Ugrinovich, LA. Atividade antimicrobiana in vitro do extrato aquoso e do óleo essencial do alecrim (Rosmarinus officinalis L.) e do cravo-da-índia (Caryophyllus aromaticus L.) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Revista Brasileira de Biociência, 15(2):83–89.

Hafemann SPG, Avanço GB, Scapim MRS, Antigo JL, Pozza MSS, Madrona GS. 2015. Ricota com adição de óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare linneus*): avaliação físico-química, sensorial e microbiológica. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, 17(3):317-323.

Helal IM, El-Bessoumy A, Al-Bataineh E, Joseph MRP, Rajagopalan P, Chandramoorthy HC, Ahmed, SBH. 2019. Antimicrobial efficiency of essential oils from traditional medicinal plants of Asir region, Saudi Arabia, over drug resistant isolates.

Hernandez-Hernandez E, et al. 2014. Microencapsulation, chemical characterization and antimicrobial activity of Mexican (*Lippia graveolens H.B.K.*) and european (*Origanum vulgare L.*) oregano essential oils. The Scientific World Journal, 2014:1-12 (doi: 10.1155/2014/641814).

Hofi AA, Rifaat ID, Khorshid MA. 1966. Studies on some physico-chemical properties of Egyptian buffaloes and cows' milk. Freezing point. Indian Journal of Dairy Science. 19:113-117.

Hühn S, Guimarães MC de F, Nascimento CNB, Carvalho LODM, Moreira ED, Lourenço Junior JB. 1982. Estudo comparativo da composição química do leite de zebuínos e bubalinos. EMBRAPA-CPATU. Boletim de pesquisa, 36. Belém, PA.

IBGE. 2020. Produção da Pecuária Municipal. Rio de Janeiro: IBGE. Disponível em: https://cidades.ibge.gov.br/brasil/rs/pesquisa/18/0. Acesso em: 22 abr 2022.

ISO 13366-2. 2006. Milk – Enumeration of somatic cells – Part 2: Guidance on the operation of fluoro-opto-electronic counters. International Organization for Standardization, Geneva.

ISO 4833-1. 2013. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Part 1: Colony count at 30 degrees C by the pour plate technique. International Organization for Standardization, Geneva.

ISO 5764. 2009. Milk — Determination of freezing point — Thermistor cryoscope method (Reference method). International Organization for Standardization, Geneva.

ISO 9308-2. 2012. Water quality – Enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria – Part 2: Most probable number method. International Organization for Standardization, Geneva.

ISO 9622. 2013. Milk and liquid milk products – Guidelines for the application of mid-infrared spectrometry. International Organization for Standardization, Geneva.

Jank L, Martins MT, Arsand JB, Motta TMC, Hoff RB, Barreto F and Pizzolato TM. 2015. High-throughput method for macrolides and lincosamides antibiotics residues analysis in milk and muscle using a simple liquid–liquid extraction technique and liquid chromatography–electrospray– tandem mass spectrometry analysis (LC–MS/MS). Talanta 144:686–695.

Jorge AM., Andrighetto C., Strazza MRB., De Correa Cássia R., Kasburgo DG., Piccinin A., Victória C., Domingues PF. 2005. Correlação entre o California Mastitis Test (CMT) e a contagem de células somáticas (CCS) do leite de búfalas Murrah. Rev Bras Zootec 34:2039–2045.

Kalač P, Samková E. 2010. The effects of feeding various forages on fatty acid composition of bovine milk fat: a review. Journal of Animal Science 55: 521–537.

Kryvtsova MV, Fedkiv OK, Hrytsyna MR, Salamon I. 2020. Anty-microbial, and anty-biofilm-forming properties of *Origanum vulgare L.* essential oils on *Staphylococcus aureus* and its antioxidant action. Biologicni studii, 14(2):27–38

Legg AK, Carr AJ, Bennett RJ, Johnston KA. 2017. Chapter 26: General aspects of cheese technology, in Cheese. 4th Edn. eds. McSweeney, San Diego: Academic Press, 643–675.

Licitra, G. World wide traditional cheeses: Banned for business? Dairy Science & Technology, 90(4):357-374 (doi: 10.1051/dst/2010016).

Lisboa ACVC, Oliveira ME, Gomes ABC, Vieira DP, Ramos GF, Martins MFL, Ribeiro PHM, Pinto SCV. 2022. Isolation and presucific identification of positive coagulase and negative coagulase *Staphylococcus* in artisanal minas fresh cheesese marketed at fairs in Ipatinga - MG. Brazilian Journal of Development, 8(4):29832–29850 (https://doi.org/10.34117/bjdv8n4-462).

Lourenço Junior JB. 2005. Produção de búfalos na Amazônia. In: Simpósio do Núcleo de Estudos Em Bovinocultura, 2.

Luz DF, Silva TF, Marciel SF, Oliveira MVM. 2020. Incidência de *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus* no leite de vacas da raça Pantaneira. Brazilian Journal Of Animal And Environmental Research, 3(3):973-982.

Machado PF, Ribeiro Pereira A, Sarríes GA. 2000. Composição do leite de tanques de rebanhos brasileiros distribuídos segundo sua contagem de células somáticas. Revista Brasileira de Zootecnia, 29(6):1883-1886.

Malachias MVB, et al. 2016. 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, Rio de Janeiro, 107(3):1-104.

MAPA. 2019. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal - Método 2.12. 2ª Edição.

MAPA. 2019. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal - Método 2.2. 2ª Edição.

Mattiello CA et al. 2018. Rendimento industrial, eficiência de fabricação e características físico-químicas de queijo colonial produzido de leite com dois níveis de células somáticas. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia [online]. 70(6):1916-1924 (doi: https://doi.org/10.1590/1678-4162-9908).

Medeiros ES, Barbosa SBP, Jatobá RB, Azevedo SS, Junior JWP, Saukas TN, de Albuquerque PPF, Mota RA. 2011. Perfil da contagem de células somáticas na infecção intramamária em búfalas na Região Nordeste do Brasil. Pequisa Veterinária Brasileira, 31:219-223.

Mendes GM, Rodrigues-Das-Dores RG, Campideli LC. 2015. Avaliação do teor de antioxidantes, flavonoides e compostos fenólicos em preparações condimentares. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, Botucatu-SP,

17(2):297-304.
Mendes LAB. 2018. Avaliação da presença de estafilococos coagulase positiva em “queijo minas artesanal” comercializados na microrregião de Bom DespachoMG. Avaliação da Presença de Estafilococos Coagulase Positiva. Formiga-Mg, 13(1):18-26.
Mihaylova G, Peeva T. 2007. Trans fatty acids and conjugated linoleic acid in the buffalo milk. Italian Journal of Animal Science, 6:1056–1059.
Mirmahmoudi R, Prakash BS. 2012. The endocrine changes, the timing of ovulation and the efficacy of the Doublesynch protocol in the Murrah buffalo (*Bubalus bubalis*). Elsevier, 177:153-159.
Mishra BP, Mukesh M, Prakash B, Sodhi M, Kapila R, Kishore A, Kataria RR, Joshi BK, Bhasin V, Rassol TJ, Bujarbaruah KM. 2009. Status of milk protein, β-casein variantes among Indian milch animals. Indian Journal of Animal Sciences, 79(7):722-725.
Muriel-galet V, et al. 2012. Development of antimicrobial films for microbiological control of packaged salad. International Journal of Food Microbiology, 157(2):195-201 (doi: 10.1016/j. ijfoodmicro.2012.05.002).
Napolitano F, et al. 2021. Advances and perspectives in research on buffalo milk production and mozzarella cheese. Agro Productividad, 14(6):1-9.
Neto OJAG, Santos PAC, Almeida JR, Lima FC. 2020. Distribuição da carne de búfalos (Bubalus bubalis) no Município de São Luís–MA. Brazilian Journal of Animal and Environmental Research, 3(3):1141-1147.
OECD/FAO. 2021. OECD-FAO Agricultural Outlook 2021-2030. OECD Publishing, Paris (https://doi.org/10.1787/19428846-en)
Ohly JJ, Hund M. 1996. Pasture farming on the floodplains of Central Amazonia. Animal Research and Development, 43:53-79.
Pasquini M, Osimani A, Tavoletti S, Moreno I, Clementi F, Trombetta MF. 2018. Trends in the quality and hygiene parameters of bulk Italian Mediterranean buffalo (Bubalus bubalis) milk: A three year study. Anim Sci J, 89:176–185.
Penna ALB, Gigante ML e Todorov SD. 2021. Artisanal Brazilian Cheeses - History, Marketing, Technological and Microbiological Aspects. Foods, 10:1562. https://doi.org/10.3390/ foods10071562
Perera BMAO. 2011. Reproductive cycles of buffalo. Animal Reproduction Science, 124:194-199.
Perin LM, Moraes PM, Almeida MV, Nero LA. 2012. Intereference of storage temperatures in the development of mesophilic, psychrotrophic, lipolytic and proteolytic microbiota of raw milk. Ciências Agrárias, Londrina, 33(1):333-342.
Pesce A, Salzano C, Felice A, Garofalo F, Liguori S, Santo A, Palermo P, Guarino A. 2016. Monitoring the freezing point of buffalo milk. Italian Journal of Food Safety, 5:5691.
Pignata MC, Fernandes SAA, Ferrão SPB, Faleiro AS, Conceição DG. 2014. Estudo comparativo da composição química, ácidos graxos e colesterol de leites de búfala e vaca. Revista Caatinga, Mossoró, 27(4):226 –233.
Pombo JCP, Ribeiro ER, Pinto RL, Silva BJM. 2018. Efeito antimicrobiano e sinergístico de óleos essenciais sobre bactérias contaminantes de alimentos. Segur. Aliment. Nutr., Campinas, 25(2):108-117.
Rangel-Ortega SC, Campos-Múzquiz LG, Charles-Rodriguez AV, Chávez-Gonzalez ML, Palomo-Ligas L, Contreras-Esquivel JC, Solanilla-Duque JF, Flores-Gallegos AC, Rodríguez-Herrera R. 2013. Biological control of pathogens in artisanal cheeses. International Dairy Journal, 140.

Rekowsky BSS, Rosário AILS, Costa MP. 2021. Development of a new Brazilian semi-hard (Coalho) Buffalo cheese made with the inclusion of cow milk and functional potential. Brazilian Journal of Development, Curitiba, 7(10):96944-96959.

Ricci GD, Domingues PF. 2012. O leite de búfala (The buffalo milk). Rev Educ Contin em Med Veterinária e Zootec do CRMV-SP 10:14–19.

RIES. 2019. Relatório socioeconômico da cadeia produtiva do leite no Rio Grande do Sul. Porto Alegre: Emater/RSAscar.

Roldan BB, Revillion JP. 2019. Convenções de qualidade em queijos artesanais no Brasil, Espanha e Itália. Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, 74(2):108-122.

Rosa JF. 2021. Controle de *Staphylococcus* coagulase negativa em massa para embutido cárneo suíno pela adição de óleo essencial de *Origanum vulgare* (orégano). Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Rübensam G, Barreto F, Hoff RB, Kist TL and Pizzolato TM. 2011. A liquid-liquid extraction procedure followed by a low temperature purification step for the analysis of macrocyclic lactones in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and fluorescence detection. Analytica Chimica Acta, 705:24–29.

Sales DC, Rangel AHN, Urbano SA, Tonhati H, Galvão Júnior JGB, Guilhermino MM, Aguiar EM, Bezerra M de F. 2018. Buffalo milk composition, processing factors, whey constituents recovery and yield in manufacturing Mozzarella cheese. Food Sci Technol 38:328–334.

Sales J. 1995. Nutritional quality of meat from some alternative species. World Review of Animal Production, 30(1-2):48-55.

Santos CHS, Piccoli RH, Tebaldi VMR. 2017. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais e compostos isolados frente aos agentes patogênicos de origem clínica e alimentar. Revista do Instituto Adolfo Lutz, 76:1–8.

São Paulo (Estado). 2008. Resolução SAA nº 03 de 10 de janeiro de 2008: Normas técnicas sobre as condições higiênico-sanitárias mínimas necessárias para aprovação, funcionamento e reaparelhamento dos estabelecimentos destinados a leite e produtos lácteos. Secretaria de Agricultura e Abastecimento, São Paulo.

Serna CMB, Dacanal GC, Fernandes AM, Pinho SC. 2018. Antifungal activity of nanoemulsions encapsulating oregano (*Origanum vulgare*) essential oil: *in vitro* study and application in Minas Padrão cheese. Braz J Microbiol, 49(4):929–35 (https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.05.004).

Sheehan WJ, Phipatanakul W. 2009. Tolerance to water buffalo milk in a child with cow milk allergy. Annals of Allergy, Asthma & Immunology, 102(4):349.

Silva ATF, da Silva JG, Aragão BB, Peixoto RM, Mota RA. 2020. Occurrence of βlactam-resistant *Staphylococcus aureus* in milk from primiparous dairy cows in the northeastern region of Brazil. Trop Anim Health Prod, 52:2303–2307.

Silva CSB. 2013. Produção de fermento lático endógeno para produção de queijo coalho com características do sertão alagoano. Dissertação (Mestrado em Nutrição) - Faculdade de Nutrição, Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Universidade Federal de Alagoas, Maceió.

Silva DJ, Queiroz AC. 2009. Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos). 3.ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 235.

Silva MST, Lourenço Jr JB, Miranda HA, Erchesen R, Fonseca RFSR, Melo JA, Costa JM. 2003. Programa de incentivo a criação de búfalos por pequenos produtores – PRONAF. Belém, PA: CPATU.

Silva SR, Teixeira DMA, Passos AAC. 2012. Influência de óleos essenciais na inibição

do desenvolvimento microbiano em alimentos. In: Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação (CONNEPI), 7.

Silva TM. 2010. Aplicação de quitosana e óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare l.*) na inibição de *Staphylococcus aureus* em hambúrguer. Vitória de santo Antão: Universidade Federal de Pernambuco (Trabalho de Conclusão de Curso).

Smith KL, Hillerton E, Harmon RJ. 2001. Guidelines on Normal and Abnormal Raw Milk Based on Somatic Cell Counts and Signs of Clinical Mastitis. National Mastitis Council, Madison.

Tavares AB et al. 2019. Queijo artesanal produzido no sul do rio grande do sul: avaliação físico-química, microbiológica e suscetibilidade a antimicrobianos de isolados de staphylococcus coagulase positiva. Ciência Animal Brasileira, 20 (https://doi.org/10.1590/1089-6891v20e-47184).

Teh KH, Flint S, Palmer J, Lindsay D, Andrewes P, Bremer P. 2011. Thermo-resistant enzyme-producing bacteria isolated from the internal surfaces of raw milk tankers. International Dairy Journal, 21(10):742–747.

Tesser IC, Fariña LO, Kottwitz LBM, Sosa DEF, Pramiu DC. 2016. Fabricação artesanal de queijo Colonial analisada sob os critérios da Instrução Normativa nº 30/2013 (municípios do território da Cantuquiriguaçu, Paraná, Brasil). Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, 71(4):206-218.

Thakur S, Singh M, Aseri GK, Verma A, Khan SS. 2018. Isolation and characterization of mastitis pathogens and milk composition changes in Murrah buffaloes (Bubalus bubalis) during winter season. Indian Journal of Animal Research, 52(2) 2018:276-280.

Torres-Júnior JRS, Ribeiro DLS, Pereira HG, França IG. 2016. Sazonalidade reprodutiva de bubalinos (Bubalus bubalis) em regiões equatorial e temperada. Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, 40(4):142-147.

Tripaldi C, Palocci G, Miarelli M, Catta M, Orlandini S, Amatiste S, Bernardini R, Castillo G. 2010. Effects of mastitis on buffalo milk quality. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 23:1319–1324.

Verruma MR, Salgado JM. 1994. Análise química do leite de búfala em comparação ao leite de vaca. Sci. agric., Piracicaba, 51(1):131-137.

Vivian PG, Mello G, Porto R, Timm CD, Gandra EA, Freitag RA. 2020. Atividade antibacteriana de óleos essenciais de *Origanum vulgare* (orégano) e *Ocimum basilicum* (manjericão) e sua aplicação em massa para embutido cárneo. Brazilian Journal of Development, 6(8):62143-62156.

Yi Z, Quan H, Jun W, Jian P, Wei H. 2016. Oregano essential oil improves intestinal morphology and expression of tight junction proteins associated with modulation of selected intestinal bacteria and immune status in a pig model. Biomed Res, 1–11. (https://doi.org/10.1155/2016/5436738).

Yoon Y, Lee S, Choi KH. 2016. Microbial benefits and risks of raw milk cheese. Food Control, 63:201-215 (https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.11.013).

Zanela MB, Kolling GJ, Nörnberg JL, Ribeiro MER. 2015. Perfil de ácidos graxos no leite de búfala da raça Murrah. Circ Técnica Embrapa 164:1-4.

Zanela MB, Kolling GJ, Vazquez Fernandez VN, Ribeiro MER, Canellas LC, Lopes FPN, Pereira KP. 2011. Composição química do leite de búfala. Embrapa Clima Temperado. Conferencia Internacional sobre Leche Inestable. Colonia: Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria de Uruguay, 65.

9. APÊNDICES

9.1 Manual de Boas Práticas Agropecuárias

APÊNDICE 1A. “Manual de Boas Práticas Agropecuárias na Ordenha: Bubalinos” publicado no site da ABCB e no Lume UFRGS

Vitória Leite Di Domenico
Amanda de Souza da Motta

MANUAL DE BOAS PRÁTICAS AGROPECUÁRIAS NA ORDENHA: BUBALINOCULTURA



Porto Alegre
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
2022

APÊNDICE 1B. Ficha catalográfica do Manual de Boas Práticas Agopecuárias na Ordenha: Bubalinos

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

D536m Di Domenico, Vitória Leite

Manual de boas práticas agropecuárias na ordenha : bubalinocultura / Vitória Leite Di Domenico, Amanda de Souza da Motta. – Porto Alegre : Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2022.

1 arquivo PDF (28 f.) : Il. color.

ISBN 978-65-5973-168-8.

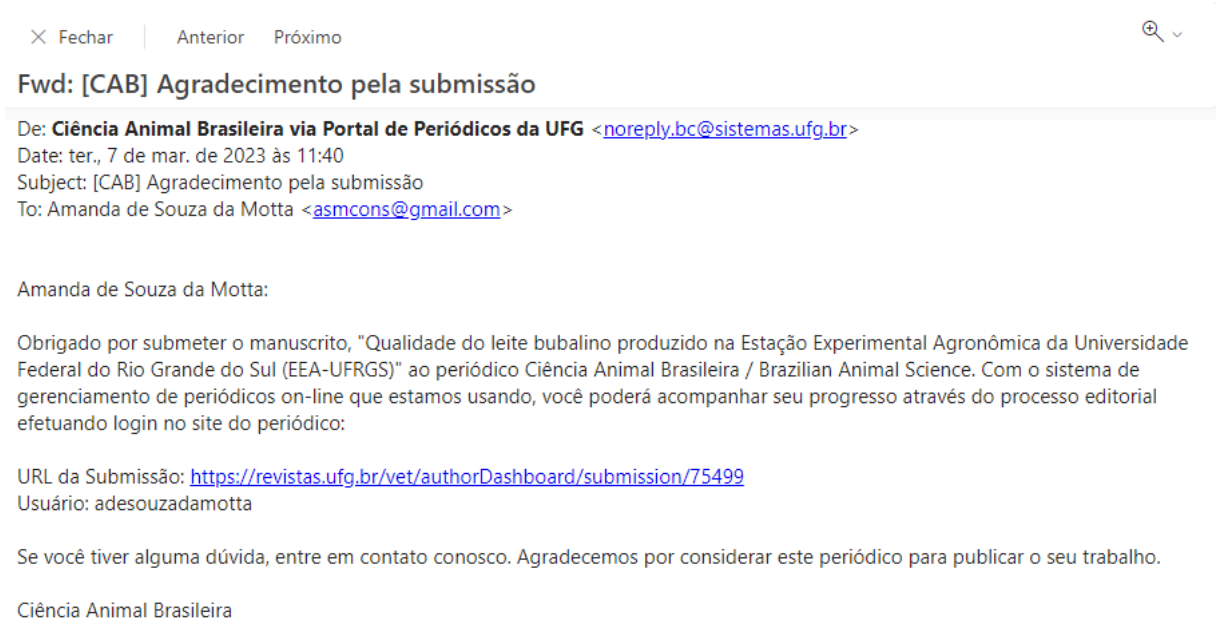
1. Ordenha. 2. Bubalina. 3. Boas práticas agropecuárias. I. Motta, Amanda de Souza da. II. Título.

CDU 636.293.2

Biblioteca do ICBS-UFRGS

9.2 Submissão do Artigo

APÊNDICE 2A. E-mail de confirmação da submissão do Artigo para a Revista Ciência Animal Brasileira



✕ Fechar | Anterior Próximo

Fwd: [CAB] Agradecimento pela submissão

De: **Ciência Animal Brasileira via Portal de Periódicos da UFG** <noreply.bc@sistemas.ufg.br>
Date: ter., 7 de mar. de 2023 às 11:40
Subject: [CAB] Agradecimento pela submissão
To: Amanda de Souza da Motta <asmcons@gmail.com>

Amanda de Souza da Motta:

Obrigado por submeter o manuscrito, "Qualidade do leite bubalino produzido na Estação Experimental Agronômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (EEA-UFRGS)" ao periódico Ciência Animal Brasileira / Brazilian Animal Science. Com o sistema de gerenciamento de periódicos on-line que estamos usando, você poderá acompanhar seu progresso através do processo editorial efetuando login no site do periódico:

URL da Submissão: https://revistas.ufg.br/vet/authorDashboard/submission/75499
Usuário: adesouzadamotta

Se você tiver alguma dúvida, entre em contato conosco. Agradecemos por considerar este periódico para publicar o seu trabalho.

Ciência Animal Brasileira

APÊNDICE 2B. Artigo submetido à Revista Ciência Animal Brasileira Qualis Zootecnia/Recursos Pesqueiros B1 (ISSN: 1809-6891)

Qualidade do leite bubalino produzido na Estação Experimental Agronômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (EEA-UFRGS)

Quality of buffalo milk produced at the Experimental Agronomic Station of the Federal University of Rio Grande do Sul

Vitória Leite Di Domenico[4], Ana Raisa Paiva[2], Louise Jank[3], Caroline Andrade Tomaszewski[3], Amanda de Souza da Motta[1*]

[1] Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente (PPGMAA) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Porto Alegre, RS, Brasil
[2] Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Alimento (PPGCTA) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Porto Alegre, RS, Brasil
[3] Laboratório Federal de Defesa Agropecuária do Rio Grande do Sul (LFDA/RS) - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Porto Alegre, RS, Brasil

V.L.D. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia - R. Ramiro Barcelos, 2600, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil. https://orcid.org/0000-0002-5822-7641
A.R.P. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos - Av. Bento Gonçalves, 9500, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil. http://orcid.org/0000-0002-0751-962
L.J. Laboratório Federal de Defesa Agropecuária do Rio Grande do Sul - Estr. Retiro da Ponta Grossa, 3036, CEP 91780-580, Porto Alegre, RS, Brasil. https://orcid.org/0000-0001-9423-2408
C.A.T. Laboratório Federal de Defesa Agropecuária do Rio Grande do Sul. Estr. Retiro da Ponta Grossa, 3036, CEP 91780-580, Porto Alegre, RS, Brasil. https://orcid.org/0000-0002-2202-8843
A.S.M. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia - R. Ramiro Barcelos, 2600, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil. https://orcid.org/0000-0001-8637-3868

*Correspondente: Amanda de Souza da Motta
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS)
Ramiro Barcelos, 2600, Laboratório 538 - Santa Cecilia
90035-003 - Porto Alegre, RS
Brasil
Telefone +55-51-991824898
E-mail: amanda.motta@ufrgs.br

Qualidade do leite bubalino produzido na Estação Experimental Agronômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (EEA-UFRGS)

Quality of buffalo milk produced at the Experimental Agronomic Station of the Federal University of Rio Grande do Sul

RESUMO

A produção de leite bubalino é uma atividade que tem crescido nos últimos anos, principalmente devido às características físico-químicas apresentadas pelo leite, que é o segundo mais produzido no mundo. O objetivo deste estudo foi monitorar os padrões de identidade e qualidade do leite bubalino produzido na Estação Experimental Agronômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Amostras foram coletadas quinzenalmente entre os meses de julho e novembro de 2021, totalizando dez coletas. As médias obtidas ao final do monitoramento, para gordura, proteína, lactose, sólidos totais, sólidos não gordurosos, acidez, densidade, índice crioscópico, contagem de células somáticas e contagem padrão em placa foram 4.84 g/100 g, 4.64 g/100 g, 5.06 g/100g, 15.26 g/100 g, 10.42 g/100g, 0.18 g ácido lático/100 mL de leite, 1.037 g/cm³, -0.533°C, 3.5 $x10^5$ cél/mL e 8.0 $x10^3$ UFC/ml, respectivamente. Não foram identificados resíduos de antibióticos e antiparasitários. Nos ácidos graxos, houve um aumento de concentração e frequência com a melhora da nutrição dos animais, além da predominância dos ácidos palmítico (C16:0) e oleico (C18:1- cis (n9)). Os resultados indicam que houve uma melhora significativa na qualidade do leite no período avaliado, decorrente das ações corretivas que foram estabelecidas com relação ao manejo nutricional, e a contagem padrão em placa demonstrou uma boa qualidade na obtenção do leite e na higienização dos materiais. O leite de búfala produzido pelo rebanho da Estação Experimental apresentou resultados físico-químicos e microbiológicos de acordo com a legislação, sendo uma matéria-prima a ser explorada na prospecção de produtos derivados.

Palavras chave: boas práticas agropecuárias; *Bubalus bubalis*; búfalo; leite cru.

10. ANEXOS

10.1 Carta de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)

ANEXO 1. Carta de Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da UFRGS

U F R G S
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais

CEUA

CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 40325
Título: Fêmeas bubalinas da raça Mediterrâneo x Murrah mantidos em Campo Nativo e MG 12 Paredão na região da Depressão Central do Rio Grande do Sul

Vigência: 10/03/2021 à 10/03/2023

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

Diogo Magnabosco - coordenador desde 10/03/2021
VITÓRIA LEITE DI DOMENICO - desde 06/04/2021
CINDY ANNE KLAUSBERGER XIMENES - desde 19/04/2021
CARLOS NABINGER - pesquisador desde 10/03/2021
THALES RENATO OCHOTORENA DE FREITAS - pesquisador desde 10/03/2021
VIVIAN FISCHER - pesquisador desde 10/03/2021
AMANDA DE SOUZA DA MOTTA - pesquisador desde 10/03/2021
Daniele Zago - pesquisador desde 10/03/2021
MARCELO PORTO NICOLA - Agrônomo desde 10/03/2021
Veronica Machado Rolim - Médico Veterinário desde 10/03/2021
BRUNA VALENZUELA GARCIA - Zootecnista desde 10/03/2021
LAURA SCOLMEISTER FANEZE - Agrônomo desde 10/03/2021
RAPHAELLA DUARTE GIMNECKI - Zootecnista desde 10/03/2021

Equipe Externa:

Elisa Cristina Modesto - pesquisador desde 10/03/2021

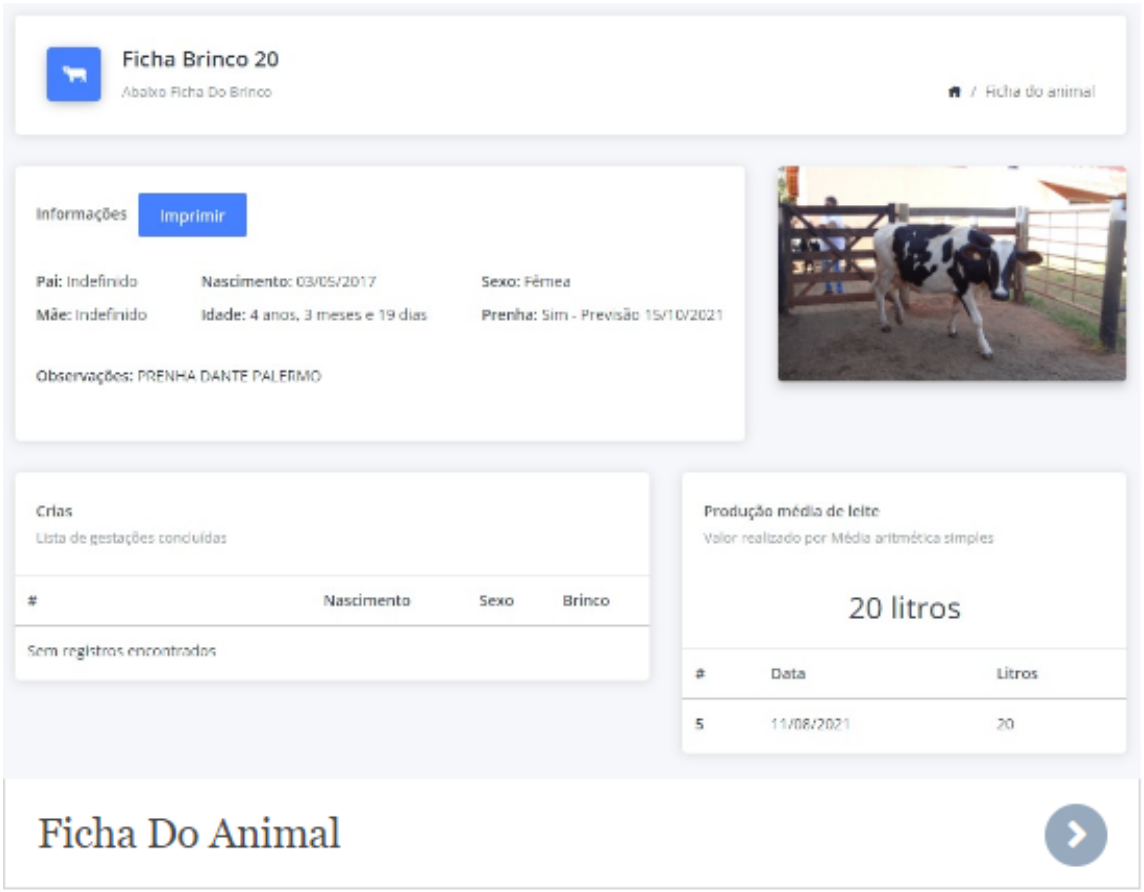
Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião remota realizada em 14/06/2021, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 16 búfalas fêmeas adultas e multíparas onde 12 serão provenientes da Estação Experimental Agronômica da UFRGS e 4 da ASCRIBU Associação Sulina de Criadores de Búfalos – CNPJ – 89.554.240/0001-41, de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Quinta-Feira, 8 de Julho de 2021

ALEXANDRE TAVARES DUARTE DE OLIVEIRA

10.2 Aplicativo de gestão de bubalinos

ANEXO 2. Imagem ilustrativa do aplicativo Gestão Plantel, o qual a interface tem sido o modelo para o desenvolvimento do aplicativo de gestão da bubalinocultura



Fonte: Gestão Plantel (http://gestaoplantel.com.br/)