

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

Fernanda Marques de Souza Godinho

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DO LEITE
BUBALINO DESTINADO À FABRICAÇÃO DE DERIVADOS NO RS, COM
ÊNFASE NA IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE ISOLADOS DE
Staphylococcus spp.**

Porto Alegre

2021

Fernanda Marques de Souza Godinho

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DO LEITE
BUBALINO DESTINADO À FABRICAÇÃO DE DERIVADOS NO RS, COM
ÊNFASE NA IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE
Staphylococcus spp.**

Tese 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 doutora em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientadora: Profa. Dra. Amanda de Souza da Motta

Coorientadora: Profa. Dra. Ana Paula Guedes Frazzon

Porto Alegre

2021

CIP - Catalogação na Publicação

Godinho, Fernanda Marques de Souza
CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DO
LEITE BUBALINO DESTINADO À FABRICAÇÃO DE DERIVADOS NO
RS, COM ÊNFASE NA IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA E
GENOTÍPICA DE ISOLADOS DE *Staphylococcus* spp. /
Fernanda Marques de Souza Godinho. -- 2021.
122 f.
Orientador: Amanda de Souza da Motta.

Coorientador: Ana Paula Guedes Frazzon.

Tese (Doutorado) -- 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, 2021.

1. leite bubalino. 2. segurança alimentar. 3.
enterotoxinas. 4. *Staphylococcus* spp.. I. da Motta,
Amanda de Souza, orient. II. Frazzon, Ana Paula
Guedes, coorient. III. Título.

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

“Science and everyday life cannot and should not be separated.”

Rosalind Franklin

“Toute réussite déguise une abdication.”

Simone de Beauvoir

AGRADECIMENTOS

O Doutorado requer um alto grau de comprometimento. Adicionalmente, a decisão de realizar o curso em paralelo com a carreira profissional exigiu muita dedicação. Foi um período longo e marcado por inúmeras mudanças, desafios, aprendizados, alegrias e tristezas. Durante esta caminhada, embora as motivações sejam internas e pessoais, associo esta conquista às pessoas que, de alguma forma, tiveram importante contribuição no desenvolvimento deste projeto.

Agradeço aos professores do PPGMAA por compartilharam seus conhecimentos. Em especial à minha orientadora, Profa. Amanda de Souza da Motta, que me aceitou nesta jornada e, brilhantemente, ofereceu os pilares sustentadores na construção desta trajetória acadêmica e na condução da presente Tese. Também agradeço à minha coorientadora, Profa. Ana Paula Guedes Frazzon, pelas contribuições e incentivo ao longo desses anos. Posso dizer que tive sorte de ter o suporte de duas pesquisadoras mulheres muito competentes e que admiro.

Agradeço ao Prof. Éder J. Kinast (UERGS) pelo amparo estatístico no primeiro artigo e às Profas Maria Tereza Friedrich (UPF) e Elisa C. Modesto que colaboraram para as análises de ácidos graxos. Agradeço às queridas e dedicadas estagiárias Melina e Renata, e ao colega Alexandre Müller pela colaboração nos ensaios.

Agradeço ao LFDA/RS-MAPA, em especial às equipes do Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas, por colaborarem nas análises de resíduos, e do Laboratório de Produtos de Origem Animal, por disponibilizarem espaço e equipamentos para as análises físico-químicas.

Agradeço aos produtores pelo fornecimento das amostras.

Agradeço aos membros da banca de defesa pela disponibilidade e contribuições para o trabalho.

Agradeço aos colegas do Laboratório 222C pela troca de experiências e aos funcionários da secretaria do PPGMAA por serem sempre prestativos.

Agradeço ainda a dois grupos da minha convivência diária (de maneira presencial e virtual): minhas colegas do CDCT e as minhas grandes amigas farmacêuticas. Esses grupos foram meu refúgio, mentores e torcida em diversos

momentos deste decurso.

Especialmente, agradeço a minha família, meu esteio, que contribuiu em toda caminhada até aqui. Dedico ao meu pai, Paulo (*in memoriam*) com todo meu amor e gratidão, por ter sido o maior incentivador da minha formação acadêmica e encorajador no início dessa trajetória do doutorado. Agradeço minha mãe, Rejane, e meus irmãos, Francisco e Felipe, pelo profundo apoio e compreensão durante esses anos. Obrigada mãe pelas comidinhas congeladas, pelas conversas e por toda disposição e amor com que cuidas de cada detalhe do que faz por nós. Agradeço também ao meu marido, Álisson, grande companheiro que tenho ao meu lado. Obrigada por me trazer ânimo e confiança nos momentos que estive mais cansada. Obrigada por se dedicar ao nosso filho e à nossa casa, quando estive ocupada.

Por fim agradeço ao meu filho Vicente, luz da minha vida, que, apesar de não entender a razão da minha ausência esses últimos meses, tornou-se meu maior motivador a não desistir. Obrigada filho por todas as noites, quando estou escrevendo, estender a mãozinha pedindo atenção com teus olhinhos brilhantes e teu sorriso contagiante, me mostrando que todas as renúncias valem a pena. Estou encerrado esse ciclo, iniciado antes da tua chegada a minha vida, com muita gratidão e orgulho por ser capaz de conciliar essa conquista com a maternidade. Vamos brincar?

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DO LEITE BUBALINO DESTINADO À FABRICAÇÃO DE DERIVADOS NO RS, COM ÊNFASE NA IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE *Staphylococcus* spp.¹

Autor: Fernanda Marques de Souza Godinho

Orientadora: Profa. Dra. Amanda de Souza da Motta

Coorientadora: Profa. Dra. Ana Paula Guedes Frazzon

RESUMO

A ascensão do mercado de derivados de leite bubalino no Rio Grande do Sul (RS) enfatiza a necessidade da caracterização e regulamentação desse produto. Visando atender esse objetivo, foram coletadas ao longo de um ano 69 amostras de leite de búfala a granel dos três produtores do RS. As médias dos resultados foram: 5,5g/100g para gordura, 4,06g/100g para proteína, 5,07g/100g para lactose, 15,5g/100g para sólidos totais, 9,96g/100g para sólidos não gordurosos, 0,161g/100g para cálcio, 1,034 g/mL para densidade, -0,527°C para índice crioscópico, 16°D para acidez, 95×10^3 cél/mL para contagem de células somáticas, $9,0 \times 10^4$ UFC/mL para contagem padrão em placas, $1,6 \times 10^2$ MPN/mL para *Escherichia coli* e $6,3 \times 10^3$ UFC/mL para *Staphylococcus* spp. Verificou-se a ausência de *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e resíduos de antimicrobianos nas amostras. O teor de ácidos graxos desejáveis das amostras mostrou relação com o manejo e alimentação dos animais. A biodiversidade de *Staphylococcus* spp. revelou 11 espécies, sendo *S. aureus* frequente em 36 (52%, n=69) amostras de leite. Além disso, 50 (47,62%, n=105) dos *S. aureus* isolados apresentaram potencial enterotoxigênico carreando *sea* (42,85%; n=45) e/ou *sed* (6,67%; n=7). Entre as 50 cepas com potencial enterotoxigênico, 11 (22%) foram sensíveis a todos os antimicrobianos e 15 (30%) foram classificadas como multirresistentes. O leite de búfala a granel no RS apresentou características físico-químicas e microbiológicas satisfatórias. A presença de cepas de *S. aureus* enterotoxigênicas e multirresistentes, importante do ponto de vista epidemiológico e sanitário, requer a redução das fontes de contaminação e a manutenção de baixas temperaturas durante o armazenamento e processamento desta matéria-prima.

¹Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (141 p.) dezembro, 2021.

**PHYSICOCHEMICAL AND MICROBIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF
BUFFALO MILK INTENDED FOR DAIRY PRODUCTS IN RS, WITH EMPHASIS ON
THE PHENOTYPIC AND GENOTYPIC IDENTIFICATION OF *Staphylococcus* spp. ¹**

Autores: Fernanda Marques de Souza Godinho
Advisor: Profa. Dra. Amanda de Souza da Motta
Co-Advisor: Profa. Dra. Ana Paula Guedes Frazzon

ABSTRACT

The rise of the buffalo milk derivatives market in Rio Grande do Sul (RS) emphasizes the need for characterization and regulation of this product. In order to meet this objective, 69 samples of bulk buffalo milk were collected over the course of a year from the three producers in RS. The mean results were: 5.5g/100g for fat, 4.06g/100g for protein, 5.07g/100g for lactose, 15.5g/100g for total solids, 9.96g/100g for non-fat solids, 0.161 g/100g for calcium, 1.034 g/mL for density, -0.527°C for freezing point, 16°D for acidity, 95×10^3 cell/mL for somatic cell count, 9.0×10^4 CFU/mL for standard plate count, 1.6×10^2 MPN/mL for *Escherichia coli* and 6.3×10^3 CFU/mL for *Staphylococcus* spp. *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and antimicrobial residues were not detected in the samples. The lipid profile showed a relationship between the desirable fatty acid content for human nutrition and the handling and feeding of the animals. Biodiversity of *Staphylococcus* spp. revealed 11 different species, with *S. aureus* frequent in 36 (52%, n=69) of the milk samples. Furthermore, 50 (47.62%, n=105) of the *S. aureus* isolated showed enterotoxigenic potential harbouring *sea* (42.85%; n=45) and/or *sed* (6.67%; n=7). Among the 50 strains with enterotoxigenic potential, 11 (22%) were sensitive to all antimicrobials and 15 (30%) were classified as multiresistant. Bulk buffalo milk in RS demonstrated satisfactory physicochemical and microbiological characteristics. The presence of enterotoxigenic and multiresistant strains of *S. aureus*, important from an epidemiological and sanitary point of view, it requires the reduction of contamination sources and the maintenance of low temperatures during the storage and processing of this raw material.

¹Doctoral Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (141 p.) dezembro, 2021.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	3
2.1.	Objetivo Geral.....	3
2.2.	Objetivos Específicos	3
3.	REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1.	Leite Bupalino.....	4
3.1.1.	Derivados do Leite Bupalino.....	5
3.1.2.	Parâmetros de Qualidade do Leite Bupalino	7
3.1.2.1.	Composição Físico-Química	7
3.1.2.2.	Contagem de Células Somáticas (CCS).....	8
3.1.2.3.	Qualidade Microbiológica	9
3.1.2.4.	Perfil Lipídico.....	10
3.1.2.5.	Resíduos de Antimicrobianos.....	11
3.1.3.	Legislação para o Leite de Búfala	11
3.2.	Doenças Transmitidas por Alimentos: Intoxicações Alimentares	12
3.2.1.	<i>Staphylococcus</i> spp.....	14
3.2.1.1.	Enterotoxina Estafilocócica (EE)	15
3.2.1.2.	Resistência antimicrobiana em <i>Staphylococcus aureus</i>	17
4.	METODOLOGIA	19
4.1.	Produtores de Leite Bupalino no RS.....	19
4.2.	Amostras de Leite.....	19
4.3.	Análises Físico-Químicas e Contagem de Células Somáticas (CCS) .	20
4.4.	Análises Microbiológicas	21
4.5.	Resíduos Antimicrobianos e Antiparasitários	21
4.6.	Análise Estatística das Avaliações Físico-Químicas e Microbiológicas	22
4.7.	Perfil Lipídico	22
4.8.	Análise Estatística do Perfil Lipídico	23
4.9.	Isolamento e identificação de <i>Staphylococcus</i> spp.....	24
4.10.	MALDI-TOF MS	24
4.11.	Extração de DNA e PCR	24

4.12.	Suscetibilidade Antimicrobiana.....	26
5.	RESULTADOS.....	27
5.1.	Artigo 1: publicado no <i>Journal of Dairy Research</i>	28
5.3.	Artigo 2: submetido ao <i>Journal of Dairy Research</i>	44
5.4.	Artigo 3: será submetido ao <i>Food Microbiology</i>	45
5.5.	Resultados não apresentados na forma de artigo	46
6.	DISCUSSÃO GERAL.....	49
7.	CONCLUSÃO	58
8.	REFERÊNCIAS.....	59
9.	APÊNDICES.....	69
9.1.	Apêndice A	69
9.2.	Apêndice B: Livro.....	70
10.	ANEXOs.....	73
10.1.	Anexo A: Submissão Artigo 2	73
10.2.	Anexo B: Normas da Revista <i>Journal of Dairy Research</i>	74
10.3.	Anexo C: Normas da Revista <i>Food Microbiology</i>	78

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Produção mundial de leite bovino e bubalino.....	5
Tabela 2. Fatores que afetam o crescimento de <i>Staphylococcus</i> spp. e a produção de enterotoxinas.....	15
Tabela 3. Produtores de leite bubalino no RS.....	19
Tabela 4. Sequências de nucleotídeos e informações para reações de amplificação de genes de virulência de <i>Staphylococcus</i> spp.....	25
Tabela 5. Agentes antimicrobianos e critérios interpretativos usados para avaliar os isolados de <i>Staphylococcus aureus</i>	26
TABELAS DO ARTIGO 1	
Supplemental File 1: <i>Characteristics of the studied farms</i>	32
Supplemental File 3: <i>Descriptive statistics for the analyzed quality parameters of all buffalo milk samples (Farms A, B and C</i>	37
Table 1: <i>Normal distribution means of buffalo milk parameters and medians of buffalo milk parameters that not follow normal distributions from each farm</i>	39
Table 2: <i>Mean measures of quality parameters of all analyzed buffalo milk samples that presented significant differences between seasons</i>	40

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Queijo mozzarella de búfala produzido no RS.....	6
Figura 2. Distribuição dos 10 agentes etiológicos mais identificados nos surtos de DTA Brasil.....	13
Figura 3. Análises das correlações dos parâmetros de qualidade do leite bubalino.....	46
Figura 4. Distribuição das determinações físico-químicas (gordura, proteína, sólidos totais e extrato seco desengordurado)	47
Figura 5. Distribuição das determinações físico-químicas (densidade e índice crioscópico)	48
Figura 6. Distribuição das determinações microbiológicas e CCS para os três produtores.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCB	Associação Brasileira de Criadores de Búfalos
Anova	Análise de Variância
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Ascribu	Associação Sulina de Criadores de Búfalos
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BP	<i>Baird-Parker</i>
BORSA	<i>Borderline Oxacillin-Resistant Staphylococcus aureus</i>
CCS	Contagem de Células Somáticas
CLA	<i>Conjugated Linoleic Acid</i>
Cooperbúfalo	Cooperativa dos Criadores de Búfalos do Rio Grande do Sul
CPP	Contagem Padrão em Placa
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOP	Denominação de Origem Protegida
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
EE	Enterotoxinas Estafilocócicas
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
ESD	Extrato Seco Desengordurado
EUA	Estados Unidos da América
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FSAI	<i>Food Safety Authority of Ireland</i>
IA	Índice de Aterogenicidade
IC	Índice Crioscópico
IDF	<i>International Dairy Federation</i>
IN	Instrução Normativa
IT	Índice de Trombogenicidade
ICBS	Instituto de Ciências Básicas da Saúde
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>

LC-MS/MS	<i>Liquid Chromatography–Electrospray–Tandem Mass Spectrometry</i>
LFDA/RS	Laboratório Federal de Defesa Agropecuária do Rio Grande do Sul
MALDI-TOF	<i>Matrix Associated Laser Desorption-Ionization - Time of Flight</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MODSA	<i>Modified-Penicillin Binding Protein Staphylococcus aureus</i>
MRSA	<i>Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus</i>
MUFA	<i>Monounsaturated Fatty Acids</i>
NMP	Número Mais Provável
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PIQ	Padrão de Identidade e Qualidade
PNQR	Plano Nacional de Controle de Resíduos
PPGMAA	Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente
PUFA	<i>Polyunsaturated Fatty Acids</i>
RBQL	Rede Brasileira de Laboratórios de Controle de Qualidade do Leite
RTIQ	Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
RS	Estado do Rio Grande do Sul
SFA	<i>Saturated Fatty Acids</i>
SSA/SP	Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
ST	Sólidos Totais
UERGS	Universidade Estadual do Rio Grande do Sul
UFA	<i>Unsaturated Fatty Acids</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul

1. INTRODUÇÃO

O leite bubalino é a segunda maior fonte de produção global de leite, e o que tem apresentado a maior taxa de crescimento na produção. No Brasil, o maior interesse em relação ao leite bubalino tem sido a produção de derivados, devido à grande procura pelo consumidor. O leite de búfala apresenta características que o diferenciam dos demais. Seus teores de lipídeos, proteínas, lactose, sólidos totais e resíduos minerais são de grande importância nutricional. Atrativamente, o teor de sólidos totais superior deste leite proporciona um rendimento quase 50% maior na produção de queijos em comparação ao leite bovino.

A qualidade do leite bubalino é o fator mais importante para o sucesso da produção de seus derivados. Um gargalo no aumento do potencial de produção tem sido a escassez de informações, sendo erroneamente presumido que as informações científicas geradas para o rebanho bovino leiteiro possam ser extrapoladas para o rebanho bubalino. É bem definido que o leite bubalino possui características próprias tanto no perfil físico-químico, quanto sanitário. Igualmente, esses parâmetros podem ser influenciados por diferenças no manejo, alimentação, raça, condições ambientais e localidade.

No contexto atual, não dispomos de legislação federal específica para determinar o Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ) do leite bubalino. Em âmbito estadual, somente o Estado de São Paulo conta com legislação que determina limites aceitáveis para alguns parâmetros de qualidade. No Estado do Rio Grande do Sul (RS) os dados disponíveis em relação ao leite bubalino cru, utilizado como matéria-prima para produção de derivados, ainda são limitados. Desta forma, análises microbiológicas e físico-químicas em amostras de três produtores, que representam 100% do mercado formal de leite bubalino no RS, realizadas de forma contínua, englobando as variações sazonais da região, aliadas aos dados de contagem de células somáticas (CCS) e perfil lipídico, podem ajudar a caracterizar tal produto nesta região.

No contexto sanitário, o gênero *Staphylococcus* tem especial relevância quanto à presença em alimentos de origem animal. Atualmente, estudos específicos para leite bubalino acerca da presença e biodiversidade desse gênero são escassos no país. A espécie *S. aureus* é um dos principais causadores de mastite nos ruminantes, um problema de ordem econômica que prejudica a processamento dos

derivados. Uma possível contaminação do leite ordenhado pode ser oriunda, principalmente, do próprio animal, dos manipuladores ou das superfícies. Uma vez no leite, cepas de *S. aureus* podem ser capazes de produzir enterotoxinas estafilocócicas (EE) termoestáveis e causadoras de intoxicação alimentar em humanos. Outra questão de preocupação em saúde pública é a presença de bactérias resistentes aos antibióticos em produtos de origem animal. Esse contexto evidencia a necessidade de caracterização da população de *S. aureus*, isolados do leite bubalino no RS, quanto ao perfil de virulência e de resistência aos antimicrobianos, para assim estimar o potencial risco de contaminações bem como a necessidade da adoção de medidas preventivas pelo produtor e pela indústria de derivados.

Assim, a motivação para esse trabalho foi fornecer subsídios para o estabelecimento de um padrão de identidade e qualidade (PIQ) do leite bubalino destinado à fabricação de derivados no RS. Ainda, através da disponibilização das características físico-químicas e microbiológicas deste produto, possibilitar futuros trabalhos visando aprimorar essa produção.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Determinar os parâmetros físico-químicos e microbiológicos, com ênfase na caracterização fenotípica e genotípica da população de *Staphylococcus* spp., a fim de fornecer subsídios para o estabelecimento de um padrão de identidade e qualidade (PIQ) do leite bubalino cru destinado à fabricação de derivados no RS.

2.2. Objetivos Específicos

- 2.2.1. Coletar quinzenalmente, durante o período de um ano, amostras de leite bubalino cru dos tanques de refrigeração das propriedades que fornecem matéria-prima para a produção de derivados no RS. (artigo 1)
- 2.2.2. A partir dessas amostras, determinar os parâmetros de qualidade microbiológica, físico-química e contagem de células somáticas, buscando correlações, bem como comparando os resultados encontrados entre os produtores e a variação sazonal dos mesmos. (artigo 1)
- 2.2.3. Determinar o perfil de ácidos graxos e avaliar a contribuição da sazonalidade, manejo e alimentação como fontes potenciais de variação das características desta matéria-prima. (artigo 2)
- 2.2.4. Enumerar e isolar colônias de *Staphylococcus* spp. para identificar a diversidade de espécies nas amostras de leite bubalino. (artigo 3)
- 2.2.5. Verificar a presença de genes de virulência, bem como o perfil de suscetibilidade a diferentes antimicrobianos em isolados de *Staphylococcus aureus* de amostras de leite bubalino. (artigo 3)

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Leite Bubalino

O leite e seus derivados podem ser denominados como alimentos funcionais, pois, além de serem fontes de energia, fornecem nutrientes essenciais em quantidades significativamente maiores do que qualquer outro alimento (Caldeira et al., 2010). Mais do que o alimento essencial durante a primeira infância do ser humano e outros mamíferos, o leite possui papel fundamental no desenvolvimento da civilização humana. É largamente consumido ao longo da vida tanto na sua forma fluida, quanto na forma de derivados lácteos (Khedkar et al., 2015).

Dentro desse contexto, o leite de búfala vem ganhando notoriedade em todo o mundo e atualmente é a segunda maior fonte de produção global de leite (IDF, 2021). Zicarelli (2020) compilou dados da produção leiteira mundial divulgada pela FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*), disponíveis desde 1961. A tabela 1 exibe os dados da quantidade de leite produzida no total de ruminantes leiteiros, incluindo bovinos, bubalinos, caprinos, ovinos, dromedários e camelos, ao longo dos anos no mundo. O leite de búfala, que representava 5,19% dessa produção em 1961, aumentou expressivamente sua importância mundial chegando a um percentual de 15,10% em 2018 (Zicarelli, 2020). Essa evolução fica ainda mais evidente quando comparamos o crescimento da produção de leite de búfala que foi cerca de sete vezes, enquanto o leite bovino que nesse mesmo período foi de cerca de duas vezes (Tabela 1).

No Brasil, o leite de búfala destina-se principalmente ao mercado de derivados, que está em ascensão (Ricci & Domingues, 2012). Fundada em 1960, a Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (ABCB) congrega hoje 80 associados em todo o território nacional e vem se fortalecendo a cada ano, com o crescimento do mercado de búfalos no País (ABCB, 2021). O rebanho bubalino hoje no Brasil conta com cerca de três milhões de animais, representando 1,4 % do rebanho bovino. No entanto, o país já concentra o maior rebanho de búfalos do Ocidente, o que mostra um grande potencial de mercado. Atualmente, aproximadamente 30% das criações são destinadas à produção de leite e, nos últimos anos, o rebanho leiteiro tem crescido a uma taxa de 45% (ABCB, 2021).

Tabela 1. Produção mundial de leite bubalino e bovino (a diferença para 100 é representada pela soma dos leites de camelo + cabra + ovelha)

Ano	Leite de búfala		Leite de vaca	
	toneladas	% leite total	toneladas	% leite total
1961	17.858.061	5,19	313.626.619	91,12
1970	19.593.886	5,00	359.280.844	91,67
1980	27.525.084	5,91	422.351.163	90,67
1990	44.076.214	8,13	478.539.902	88,22
2000	66.650.866	11,50	489.874.522	84,53
2010	92.468.193	12,78	601.868.328	83,18
2018	127.338.184	15,10	683.217.055	81,04

Fonte: FAO, citado por Zicarelli (2020)

Ao passo que no restante do país a produção leiteira tem sido o foco dos criadores de búfalos, no Estado do Rio Grande do Sul a maioria dos produtores ainda está voltada para pecuária de corte. Neste contexto, a Associação Sulina de Criadores de Búfalos (Ascribu) tem fomentado a produção leiteira apoiada pela grande demanda do mercado gaúcho. Segundo a própria Ascribu, os derivados do leite de búfala têm maior liquidez que a carne, despertando o interesse inclusive de laticínios de fora do Estado. Importante ressaltar a atuação da Cooperativa dos Criadores de Búfalos do Rio Grande do Sul (Cooperbúfalo) que visa organizar a cadeia produtiva do búfalo, atuando na produção, transporte, armazenagem, beneficiamento e comercialização de produtos bubalinos (atualmente os queijos e o hambúrguer de búfalo), além de congrega pecuaristas e desenvolver serviços associados (Cooperbúfalo, 2021).

3.1.1. Derivados do Leite Bubalino

No Brasil, o promissor mercado para leite bubalino está na sua transformação em derivados, devido ao alto teor de extrato seco que possibilita um alto rendimento industrial e maior valor agregado (Ricci & Domingues, 2012). A indústria pode atingir entre 20 e 22 kg de mussarela no processamento de 100 litros de leite bubalino, rendimento quase 50% superior ao do leite bovino (Sales et al., 2018). O principal derivado é tipicamente italiano, onde é amplamente consumido e

valorizado: a *Mozzarella di Bufala Campana DOP* (Denominação de Origem Protegida). Por possuir forte originalidade, este queijo tem um nicho de mercado bem estabelecido e um futuro promissor no Brasil. Incentivadas pela ABCB por meio de ações vinculadas ao “Selo 100% Pureza Búfalo”, as indústrias que só utilizam esse tipo de leite para obtenção de mussarela tentam seguir um sistema de produção semelhante ao italiano, assumindo a responsabilidade cuidadosa de manter o produto o mais similar possível e proteger seu valor gastronômico e histórico (ABCB, 2021). O queijo mussarela é comercializado em pedaços, fatias ou no tradicional formato de bolas, que são conservadas em uma solução de cloreto de sódio e ácido cítrico (Figura 1).



Figura 1. Queijo mussarela de búfala produzido no Rio Grande do Sul (Fonte: Cooperbúfalo)

Devido às várias diferenças na composição bioquímica dos dois tipos de leite, as tecnologias convencionais de processamento para o leite bovino são frequentemente inadequadas para a aplicação no processamento do leite bubalino. As tendências emergentes de pesquisa e desenvolvimento no processamento de leite de búfala sugerem que há um amplo escopo para adaptar a tecnologia, especialmente em países em desenvolvimento, onde os búfalos desfrutam de uma posição proeminente na produção de leite (Minervino et al., 2020).

Outros derivados lácteos também podem ser produzidos tendo como matéria-prima o leite de búfala, como doce de leite e manteiga. Este leite possibilita a formação de texturas mais firmes e cremosas, sem a necessidade da utilização de espessantes como o leite em pó, devido ao seu alto teor de gorduras, proteínas e à

elevada retenção de água dessas últimas. É o caso da fabricação, por exemplo, de iogurtes e creme de leite (Teixeira et al., 2005).

3.1.2. Parâmetros de Qualidade do Leite Bubalino

A qualidade do leite de búfalo é o fator mais importante para o sucesso de sua industrialização e produção de derivados. Esse fator gera um aumento significativo no preço do leite e benefícios para os consumidores que adquirem produtos de melhor qualidade (Figueiredo et al., 2010). Muitos parâmetros podem ser usados para avaliar a qualidade do leite; entre elas estão características físico-químicas, 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).

3.1.2.1. Composição Físico-Química

Além da ausência de β -caroteno, o leite de búfala difere do leite bovino do ponto de vista composicional: contém maiores teores de gordura, sólidos totais, proteínas, caseínas, lactose e conteúdo de cinzas (Ahmad et al., 2013). As variações na composição do leite de búfala entre localidades refletem diferenças nas raças, no manejo, na alimentação e nas condições ambientais. Essas variações afetam fortemente as condições de fabricação, qualidade sensorial e propriedades nutricionais dos produtos lácteos (Khedkar et al., 2015).

Os sólidos totais (ST) englobam todos os componentes do leite, exceto a água, incluindo as proteínas, lactose, gordura, minerais e vitaminas. O resíduo de ST, após a evaporação completa da água, é um parâmetro de qualidade fundamental que fornece informações sobre o rendimento e a adequação geral do leite para a fabricação de queijos (Bassbasi et al., 2014). Por extrato seco desengordurado (ESD) compreendem-se todos os elementos do leite, menos a água e a gordura. A gordura é o constituinte mais variável e, também, o que apresenta maior valor econômico na produção de derivados, contribuindo para o sabor característico e melhorando a textura dos mesmos (Amaral et al., 2005). A porção proteica do leite é constituída por 77 a 79% de caseína e entre 21 a 23% de

soroproteínas. As micelas de caseína são maiores que as encontradas no leite bovino, o que permite que a coalhada produzida a partir do leite bubalino retenha menos água na produção de queijos (Amaral et al., 2005; Ahmad et al., 2013; Khedkar et al., 2015). Em relação aos açúcares, a lactose é o principal carboidrato que compõe o leite, servindo de base para a obtenção dos derivados por meio da fermentação (Amaral et al., 2005; Ricci & Domingues, 2012). O leite de búfala também é caracterizado por apresentar um teor de cálcio superior ao de outros leites. A maior parte do cálcio é encontrada na forma insolúvel, principalmente devido ao alto teor de caseína deste leite (Ahmad et al., 2013). O tipo de raça, fatores ambientais e métodos analíticos influenciam o teor de cálcio (El-Salam & El-Shibiny, 2011).

O índice crioscópico (IC) do leite é um importante indicador de sua qualidade. Pelo fato de ser razoavelmente constante e determinado por sua composição, o IC é usado para detectar qualquer adulteração do leite com água (Pesce et al., 2016). A densidade do leite bubalino é geralmente maior do que a do leite bovino. Contudo, depende muito do teor de gordura, o que pode explicar as variações citadas em diferentes estudos (Khedkar et al., 2015). A dosagem da acidez é utilizada como um indicador de frescor. Um resultado elevado de acidez no leite pode ser decorrente da multiplicação de microrganismos deterioradores e/ou patogênicos. Gargouri e colaboradores (2013) verificaram que, embora o armazenamento a frio (4°C) proteja o leite contra bactérias acidificantes, a acidez do leite continua a aumentar gradativamente quando armazenado. A acidez do leite também pode estar relacionada ao fornecimento de alimentos e minerais inapropriados aos animais, além de fatores ambientais (Figueiredo et al., 2010).

3.1.2.2. Contagem de Células Somáticas (CCS)

A determinação da contagem de células somáticas do leite (CCS) é um método internacionalmente utilizado para controle sanitário do leite e do estado de saúde do úbere do animal (Schukken et al., 2003, 2013). Altos valores de CCS alteram a composição do leite, comprometendo a qualidade de seus derivados (Jorge et al., 2005). O termo CCS do leite refere-se a todas as células presentes no mesmo, incluindo as de descamação do epitélio glandular secretor e os leucócitos de origem sanguínea. No entanto, quando há infecção bacteriana, dano ao tecido ou

outros processos de inflamação que afetam o tecido mamário, a CCS aumenta dramaticamente, sendo o melhor indicador na presença de mastite subclínica (Tripaldi et al., 2010; Gargouri et al., 2013).

3.1.2.3. Qualidade Microbiológica

Os microrganismos presentes no leite provêm de diversas fontes. A primeira contaminação ocorre no momento da ordenha, sendo a carga microbiana do leite recém ordenhado relacionada ao estado de saúde do animal e às condições de higiene neste processo (Figueiredo et al., 2010). Após a ordenha, a proliferação microbiana é inevitável, a menos que o leite seja congelado. Nas propriedades, o leite ordenhado é armazenado em tanques a baixas temperaturas antes de ser enviado ao laticínio. A IN 77 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), que estabelece os critérios de produção, acondicionamento, conservação, transporte, seleção e recepção do leite cru, indica que o leite, ao ser adicionado ao tanque, deve ser coado e refrigerado à temperatura máxima de 4,0°C, em até três horas. Ainda, determina que o tempo transcorrido entre as coletas de leite nas propriedades rurais não deve ser superior a 48 horas (MAPA, 2018). Esses critérios visam desacelerar o crescimento microbiano em temperatura de resfriamento, porém não impedem que ocorram mudanças indesejáveis. Apesar dos tratamentos térmicos destruírem grande parte da carga microbiana, suas enzimas e toxinas permanecem ativas e podem originar modificações inconvenientes nos derivados. Desta forma é necessário controlar as condições de transporte e armazenamento dessa matéria-prima até a indústria de derivados (Gargouri et al., 2013).

A contagem padrão em placa (CPP) determina a concentração de microrganismos presentes no leite e é uma ferramenta adequada para testar os níveis de higiene do processo de produção de leite, desde o manejo inicial e armazenamento até a amostragem (Gargouri et al., 2013). A análise microbiológica pode também verificar a ausência de microrganismos patogênicos ou sua presença, dentro dos limites toleráveis, e mostrar se o produto é adequado para consumo humano (Facchin et al., 2013).

3.1.2.4. Perfil Lipídico

A gordura do leite de ruminantes é composta predominantemente por triglicerídeos (97-98%) e também por pequenas quantidades de esteroides, ácidos graxos livres e fosfolipídios. Parte dos ácidos graxos secretados no leite, os de cadeia curta (C4:0 - C10:0) e média (C12:0 - C16:0), são sintetizados na própria glândula mamária (síntese de novo) a partir de acetato e β -hidroxibutirato (Palmquist et al., 1993). Outra parte, incluindo os ácidos graxos de cadeia longa (C18:0 ou maiores) e cerca de 40% do ácido palmítico (C16:0), é obtida como ácidos graxos pré-formados. Esses ácidos graxos são oriundos da dieta ou da mobilização das reservas corporais do sangue, assim, sofrendo importante influência da dieta e estágio de lactação (Caldeira et al., 2010).

A maior proporção de ácidos graxos de cadeia curta (C4:0 - C10:0) e média (C12:0-C16:0) do leite conferem o seu aroma e sabor característicos, assim como, a sua fluidez (Caldeira et al., 2010). No leite de búfala, os ácidos graxos saturados (*Saturated Fatty Acids* - SFA) variam de 60% a 65% do total dos ácidos graxos, ao passo que os ácidos graxos insaturados (*Unsaturated Fatty Acids* - UFA) podem variar de 35% a 40% (Zanela et al., 2015). Enquanto os SFA (C12:0 - C16:0) e *trans* são relatados como positivamente correlacionados com a aterosclerose e doença cardíaca coronária (Molkentin, 1999), estudos recentes indicam que os ácidos linoleicos conjugados (*Conjugated Linoleic Acids* - CLA) podem ter propriedades anticancerígenas, antidiabéticas e antiateroscleróticas no humano (Koba & Yanagita, 2013).

Ácidos linoléicos conjugados (CLA) englobando um grupo de isômeros posicionais e geométricos de ácidos octadecadienóicos (C18:2) (Benjamin et al., 2015). CLAs são ácidos graxos poliinsaturados (*Poliunsaturated Fatty Acids* – PUFA) de ocorrência natural sintetizados no rúmen de ruminantes por biotransformação microbiana de ácidos graxos derivados de forragem, como ácido oleico, ácido linoléico e ácido α -linolênico em última instância em ácido esteárico saturado (Goes & Brabes, 2010; Bauman et al., 2011). O Sul do Brasil é caracterizado por campos com uma rica flora, resultante da grande variedade de solos e das características climáticas dessa região, que determinam a existência de plantas capazes de coexistir nas mais diversas condições (Nabinger & Dall'Agnol, 2020). Assim, o perfil de ácidos graxos do leite de ruminantes é influenciado pela alimentação fornecida, especialmente pastos verdes de gramíneas e leguminosas

frescas (Kalač & Samková, 2010; Bauman et al., 2011).

3.1.2.5. Resíduos de Antimicrobianos

Os antibióticos são utilizados na produção pecuária para três finalidades: uso terapêutico para tratar animais doentes, uso profilático para prevenir infecção em animais e em níveis subterapêuticos como promotores de crescimento (Singh et al., 2014; Jank et al., 2015). Se o intervalo de carência não for respeitado, o leite coletado dos animais tratados é impróprio para consumo humano e processamento (Khaniki, 2007). No Brasil, o Plano Nacional de Controle de Resíduos (PNCR) define quais resíduos devem ser monitorados e seus limites máximos, objetivando principalmente monitorar a incidência de resíduos e prevenir potenciais riscos à população exposta a esses produtos (Jank et al., 2015).

A prevenção e controle de resíduos de antibióticos no leite é um dos grandes desafios para a cadeia produtiva, pois afeta negativamente a manufatura de produtos lácteos fermentados e a saúde dos consumidores. Para ser considerado seguro e de alta qualidade, o leite deve estar isento de resíduos de drogas veterinárias. Os principais riscos à saúde, causados pela presença de resíduos de antibióticos no leite, são: toxicidade (drogas com atividade carcinogênica ou mutagênica), aumento da resistência de microrganismos aos antimicrobianos, além de reações alérgicas (Brown et al., 2020).

3.1.3. Legislação para o Leite de Búfala

Apesar do maior valor nutritivo e rendimento industrial do leite bubalino e do crescimento de sua exploração no país, pouco se tem feito para regulamentação de normas de padrão de identidade e qualidade do mesmo, o que dificulta a realização de medidas de controle e fiscalização (Amaral et al., 2005). Atualmente não dispomos de uma legislação federal específica para determinar o Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ) do leite de búfalas. Em âmbito estadual, somente a Secretaria de Abastecimento e Agricultura do Estado de São Paulo, através da publicação da Resolução SAA nº24 (SSA 24), estabeleceu alguns parâmetros de qualidade para o leite bubalino (SSA/SP 24, 1994).

No contraponto deste cenário, o leite bovino dispõe de regulamentação bem estabelecida. A Instrução Normativa nº 77 (IN 77) publicada em 26 de

novembro de 2018 pelo MAPA regulamenta que o leite cru refrigerado, estocado nos tanques de refrigeração individual ou de uso comunitário, bem como o leite recebido em latas devem ser coletados para análise em laboratório da Rede Brasileira de Laboratórios de Controle de Qualidade do Leite (RBQL), com frequência mínima de uma amostra mensal, para avaliação dos parâmetros: teor de gordura, proteína total, lactose, ESD, sólidos totais, CCS, CPP e resíduos de produtos veterinário (MAPA, 2018). Entretanto, devido as suas características próprias, o leite bubalino necessita de uma legislação específica.

A Resolução SAA 24 considera conforme o leite de búfala cru que apresente, além de características organolépticas para a espécie, teor de gordura mínima de 4,5%; acidez em graus Dornic entre 14 e 23; pH entre 6,40 e 6,90; ESD mínimo de 8,57%; densidade a 15°C entre 1,028 e 1,034; índice crioscópico entre -0,520°C e -0,570°C; satisfaça ao padrão bacteriológico de contagem padrão em placas de até 500.000 UFC/ml (SSA/SP, 1994). Ressalta-se que a SAA 24 é válida apenas para o Estado de São Paulo; igualmente, é incompleta não fazendo referência a parâmetros como lactose, proteína e sólidos totais (Amaral et al., 2005).

3.2. Doenças Transmitidas por Alimentos: Intoxicações Alimentares

As Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) são consideradas um grande problema para a saúde pública mundial (Olivier et al., 2005). Surtos são definidos como sendo a ocorrência de dois ou mais casos de uma doença, com o mesmo quadro clínico, resultante da ingestão de um alimento em comum (Le Loir et al., 2003).

A intoxicação causada pela ingestão de enterotoxinas estafilocócicas (EE) está entre as DTA mais frequentes mundialmente e é resultante do consumo de alimentos que contêm quantidades suficientes de enterotoxina pré-formada (Lira et al., 2016; Abdeen et al., 2020). As EE são produzidas e liberadas pelas bactérias do gênero *Staphylococcus*, durante sua multiplicação no alimento, podendo permanecer viáveis após tratamento térmico (Argudín et al., 2010; Chieffi et al., 2020). A forma mais comum de contaminação dos alimentos é através do contato direto do manipulador com o alimento ou indireto, por meio das superfícies contaminadas, seguido pelo armazenamento em condições que permitam o crescimento do microrganismo e a produção de suas enterotoxinas. Entre os alimentos mais frequentemente implicados em casos de intoxicação alimentar por

EE estão o leite e seus derivados ou produtos que levem incluíam na sua elaboração (Gutiérrez et al., 2012; Lira et al., 2016).

De acordo com os dados publicados pela *European Food Safety Authority* (EFSA), as toxinas bacterianas foram responsáveis por 19,5% de todas as notificações de DTA em 2015 e representaram o terceiro agente causador de origem alimentar na União Europeia (EFSA, 2016). Em 2000, no Japão, 13.420 pessoas foram envolvidas em um surto de intoxicação ao consumirem leite desnatado contaminado com enterotoxinas A e H (Ikeda et al., 2005). Na França, entre 1999 e 2000, o *S. aureus* foi apontado como o segundo maior responsável pelos casos de DTA microbiana naquele país (Le Loir et al., 2003). No Brasil, dados do Sinan (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) trazem o *Staphylococcus aureus* como o terceiro agente etiológico mais identificado nos surtos de DTA entre 2009 e 2018 no Brasil (Figura 2). Neste mesmo período, o leite e seus derivados foram responsáveis por 7,9% dos alimentos incriminados nos 2403 surtos de DTA (MS, 2018).

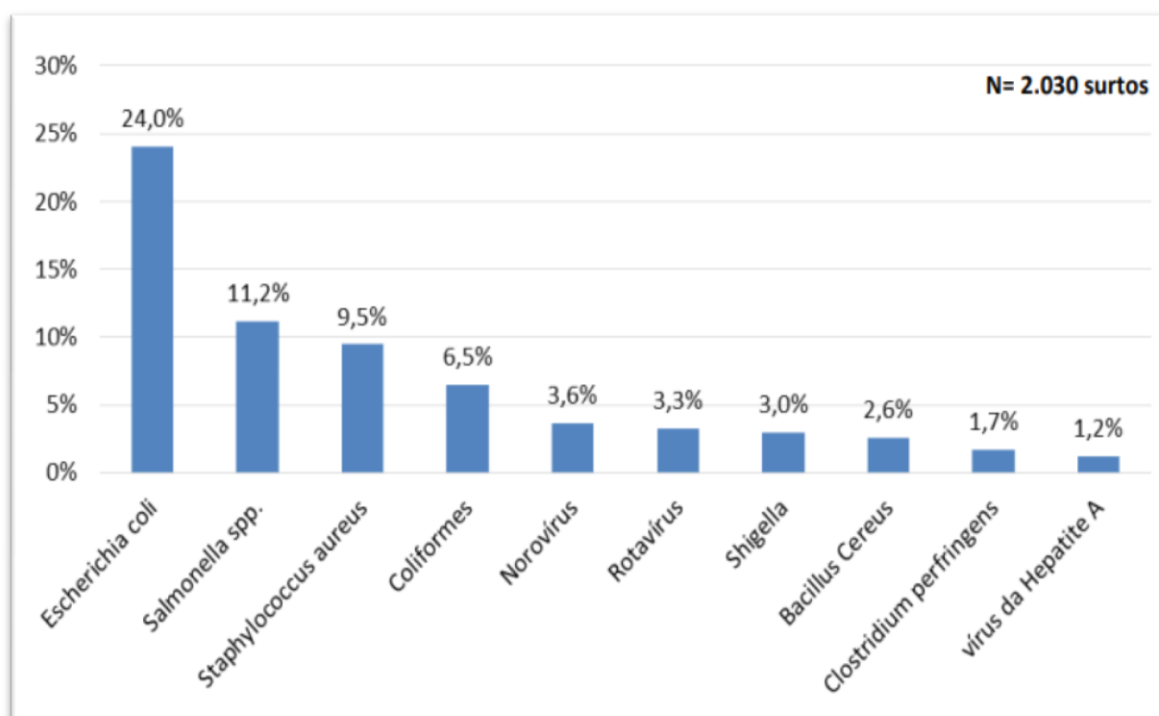


Figura 2. Distribuição dos 10 agentes etiológicos mais identificados nos surtos de DTA Brasil, 2009 a 2018 (Fonte: Sinan/SVS/Ministério da Saúde).

3.2.1. *Staphylococcus* spp.

Os *Staphylococcus* spp. são bactérias Gram-positivas, não formadoras de esporos, com morfologia esférica (cocos) que se apresentam aos pares, em pequenas cadeias ou, mais caracteristicamente, em agrupamentos formando “cachos de uva”, conhecidos como estafilococos (Le Loir et al., 2003; Kérouanton et al., 2007). Membros do gênero *Staphylococcus* possuem grande habilidade de adaptação, estando amplamente distribuídos na natureza. São os principais microrganismos residentes da pele, glândulas e mucosas de mamíferos (Le Loir et al., 2003; Rola et al., 2015; Mcmillan et al., 2016). Também são encontrados no ar, na poeira, na água, em diversos alimentos (principalmente os de origem animal), em superfícies expostas, em equipamentos de processamento e manipulação dos alimentos. Estas informações colocam o manipulador de alimentos e os animais como os principais reservatórios e fontes de contaminação para os alimentos (Kümmel et al., 2016; Lakhundi & Zhang, 2018).

A coagulase é um fator de virulência que se destaca nos estafilococos. Ela é uma proteína que possui ação enzimática e reage com a protrombina, formando um complexo denominado estafilotrombina, que converte o fibrinogênio em fibrina e coagula o plasma (Velázquez-Meza, 2005). Esta enzima extracelular é produzida por várias espécies do gênero *Staphylococcus*, incluindo, a maioria das cepas de *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. delphini*, *S. hyicus* subsp. *hyicus* e *S. scheliferi* subsp. *coagulans*, sendo usada como marcador fenotípico para a diferenciação destas espécies (Gutiérrez et al., 2012). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) reconhece que os *Staphylococcus* coagulase positiva, são os únicos produtores de EE. De fato, os surtos de intoxicação alimentar estão relacionados à contaminação de alimentos por *S. aureus* enterotoxigênicos, sendo largamente descritos na literatura (Argudín et al., 2010; Wu et al., 2016; Denayer & Delbrassinne, 2017; Chieffi et al., 2020). Conquanto, trabalhos recentes mostraram que ao analisar os *Staphylococcus* coagulase negativa foi possível identificar que estes microrganismos não só possuem genes para a produção das enterotoxinas, mas também a capacidade de produção de concentrações de enterotoxinas clinicamente importantes (Osman et al., 2017, 2020; Argemi et al., 2019).

A Tabela 2 descreve as condições consideradas ótimas e a faixa de tolerância para os fatores ambientais que afetam o crescimento de *Staphylococcus* spp. e a produção das EE. *Staphylococcus* spp. são altamente tolerantes, podendo

se multiplicar em condições ambientais bastante adversas. Porém é relevante destacar que a presença do microrganismo com potencial enterotoxigênico não obrigatoriamente configura a produção das EE, responsáveis pelo desencadeamento dos sintomas e o estabelecimento de um quadro de intoxicação alimentar estafilocócica (Le Loir et al., 2003; Argudín et al., 2010).

Tabela 2. Condições ótima e tolerável para os fatores que afetam o crescimento de *Staphylococcus* spp., bem como a produção de Enterotoxinas Estafilocócicas (EE)

Fator	<i>Staphylococcus</i> spp.		Produção de EE	
	Ótima	Tolerável	Ótima	Tolerável
Temperatura (°C)	37	7 - 48	40 - 45	10 - 48
pH	6 - 7	6 - 7	6 - 7	6 - 7
Atividade da água (a_w)	0,98	0,83 – 0,99	0,98	0,85 – 0,99
NaCl (%)	0	0 - 20	0	0 - 10
Atmosfera	Aeróbia	Aeróbia / anaeróbia	Aeróbia	Aeróbia / anaeróbia

Fonte: FSAI - *Food Safety Authority of Ireland*,(2011)

3.2.1.1. Enterotoxina Estafilocócica (EE)

As toxinas produzidas pelos estafilococos foram descritas inicialmente por Bergdoll e colaboradores, em 1973, como cinco tipos sorologicamente distintos: tipos A, B, C, D e E, também chamadas EE clássicas (Bergdoll & Robbins, 1973). Na sequência, novas EE e seus genes correspondentes foram descobertas e atualmente são 23 tipos descritos na literatura. Até o momento, apenas as EE clássicas estão bem caracterizadas e são detectáveis por ensaios disponíveis comercialmente ou métodos desenvolvidos internamente (Denayer & Delbrassinne, 2017). De fato, as EE clássicas são amplamente associadas a surtos de intoxicação alimentar, sendo o tipo A o mais frequente (Hennekinne et al., 2010).

As enterotoxinas são proteínas simples de baixo peso molecular (25,0 a 30,0 KDa) resistentes às enzimas digestivas, o que possibilita a sua passagem pelo trato gastrointestinal (Wu et al., 2016). Ademais, são altamente estáveis, resistentes ao calor e às condições ambientais estressantes, tais como congelamento e

secagem. Necidova e colaboradores (2016) testaram a resistência térmica das EE tipos A, B e C: após pasteurização a 72°C, 85°C e 92° C, as EE foram detectados em 87,5, em 52,5% e em 45,0% das amostras, respectivamente. Dessa forma, as EE ainda podem persistir no leite, mesmo quando *S. aureus* é inativado através da pasteurização.

A termoresistência das EE aumenta sua importância na indústria de alimentos, principalmente de lácteos, uma vez que a maioria deles recebe tratamento térmico. Desta maneira, se já houver EE pré-formadas antes do tratamento térmico, elas poderão permanecer viáveis no alimento pronto para o consumo. Da mesma forma, se o tratamento térmico for insuficiente pra eliminar todos microrganismos do alimento e o mesmo for posteriormente exposto a temperaturas mais elevadas as bactérias remanescentes, podem produzir EE. Em contrapartida, a manutenção dos alimentos sempre em baixas temperaturas pode ser uma forma de controle. Em temperaturas inferiores a 7° C, a multiplicação bacteriana diminui e a síntese de enterotoxinas é inibida (Le Loir et al., 2003; Argudín et al., 2010; Hennekinne et al., 2010; Schelin et al., 2011).

Dados quantitativos em termos de tipo e concentração de EE em matrizes alimentares envolvidas em surtos de intoxicação alimentar são escassos, com a menor dose suspeita de EEA relatada sendo cerca de 0,36-0,66 ng / mL em achocolatado (Evenson et al., 1988). Hennekinne e colaboradores (2012) sugerem que menos de 20–100 ng de EEA pode causar sintomas em um adulto suscetível. Investigações recentes, usando modelagem de dose-resposta de enterotoxinas estafilocócicas e dados de surto, revelaram que 6,1 ng de EEA é suficiente para induzir efeitos em 10% de uma população exposta (Guillier et al., 2016)

Os mecanismos de ação das EE ainda não são claramente esclarecidos, porém acredita-se que elas afetem diretamente o epitélio intestinal e do nervo vago, causando a estimulação do centro emético (Hu & Nakane, 2014). Os sintomas têm início rápido, entre uma e oito horas, e incluem náusea, vômito, ausência de febre, cólicas abdominais, com ou sem diarreia. O quadro é agudo, podendo também haver variações dependendo da saúde geral do hospedeiro e sensibilidade individual. A doença geralmente é autolimitada e a remissão ocorre dentro de 24 a 48 horas após o início. Ocasionalmente, pode ser grave o suficiente para justificar a hospitalização, principalmente em bebês, idosos ou pessoas debilitadas (Le Loir et al., 2003; Argudín et al., 2010; Hennekinne et al., 2010).

Através da investigação de casos de intoxicação estafilocócica, foi possível estabelecer uma relação com a quantidade de microrganismos presente no alimento: as enterotoxinas são detectáveis quando as contagens de *Staphylococcus* são de aproximadamente 10^5 unidades formadoras de colônia (UFC) por grama ou mililitro de alimento (Hennekinne et al., 2010). Entretanto, atualmente tem-se o entendimento da necessidade de investigar não somente a presença do microrganismo, mas também das EE. A Anvisa instituiu esta análise nas regulamentações publicadas em dezembro de 2019: a Resolução de Diretoria Colegiada nº331 (RDC 331), e a Instrução Normativa nº60 (IN 60), que dispõem sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos (Anvisa, 2019a, 2019b). A legislação anterior, RDC 12 de 2001, determinava a tolerância apenas em número máximo de células viáveis de *Staphylococcus* coagulase-positiva por grama ou mililitro de alimento (Anvisa, 2001). O problema da análise convencional por cultura é o fato de a detecção da presença do microrganismo não implicar, necessariamente, na presença de EE. Da mesma maneira, a ausência ou a determinação de *Staphylococcus* coagulase-positiva dentro do limite de tolerância não garante que as EE estejam ausentes ou tenham sido eliminadas. Independentemente do resultado da determinação de *Staphylococcus* coagulase-positiva, a IN 60 estabelece ausência de EE como critério de qualidade aceitável para produtos lácteos.

Até o momento, o ensaio para detecção de EE ainda é realizado em poucos laboratórios de rotina, visto que até pouco tempo não era exigido pelas autoridades sanitárias. Algumas empresas têm disponibilizado kits comerciais validados, sendo a maioria baseada na técnica de Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA), que permitem a detecção das EE clássicas.

3.2.1.2. Resistência antimicrobiana em *Staphylococcus aureus*

Os produtos de origem animal são considerados os principais reservatórios de bactérias resistentes a antibióticos, com o uso de antibióticos na indústria de produção de alimentos tendo contribuído para o desafio da saúde pública global (Founou et al., 2016). Entre os estafilococos resistentes a antibióticos, as cepas de *S. aureus* multirresistentes são de grande preocupação pública, pois as resistências tornam mais difíceis o tratamento de infecções (Liu et al., 2017; Abdi et

al., 2018).

Segundo Argudín e colaboradores (2012) alimentos de origem animal contaminados podem representar uma fonte de infecção por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (*Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* - MRSA) para humanos. Preocupação que também já foi declarada pela *European Food Safety Authority* (EFSA) (Andreoletti et al., 2008). Atualmente, apenas alguns relatórios sobre a presença e possível origem de MRSA em alimentos estão disponíveis (Doyle et al., 2012; Riva et al., 2015) Sergelidis & Angelidis (2017), em publicação mais recente, afirmam que o potencial de cepas MRSA estarem envolvidas em surtos de DTA não deve ser subestimado, porém não atribuem a gravidade do possível surto ao perfil de resistência. Para a EFSA, embora o papel dos alimentos como fonte de colonização humana e infecção por MRSA seja considerado baixo, recomenda-se o monitoramento voluntário de carnes e produtos de leite cru para MRSA (EFSA, 2012).

Portanto, o monitoramento contínuo da prevalência de MRSA bem como do perfil de suscetibilidade de *S. aureus* à outras classes de antimicrobianos pode ser útil para tratar infecções de maneira mais eficiente e também para reduzir o desenvolvimento de bactérias multirresistentes na cadeia alimentar.

4. METODOLOGIA

4.1. Produtores de Leite Bubalino no RS

Para este estudo foram selecionadas três propriedades para a coleta das amostras de leite. Essas propriedades representam 100% do leite de búfala destinado ao mercado oficial de derivados no RS. Os produtores assinaram um termo de consentimento (Apêndice A) antes da coleta das amostras. As características dessas propriedades são mostradas na tabela abaixo.

Tabela 3: Produtores de leite bubalino no RS

	Propriedade A	Propriedade B	Propriedade C
Localização	Sentinela do Sul	Pântano Grande	Gravataí
Número de animais	305	400	76
Volume (L)*	2314	5819	618
Nutrição dos animais	silagem	pasto, concentrado, silagem e sais minerais	pasto e concentrado

* volume médio de leite produzido semanalmente por cada agricultor

4.2. Amostras de Leite

As amostras de leite foram coletadas quinzenalmente durante 14 meses (junho de 2017 a agosto de 2018) pelo mesmo operador, previamente treinado para a tarefa. As amostras foram coletadas diretamente do tanque de resfriamento de cada propriedade com o cuidado de homogeneizar o conteúdo previamente. Para cada amostra foram obtidos três frascos:

- Frasco I - 40 mL em recipiente estéril com azidiol para análises microbiológicas;
- Frasco II - 40 mL em recipiente estéril com bronopol para análise de CCS;
- Frasco III - 200 mL em frasco limpo para análises físico-químicas.

A partir da coleta, as amostras foram transportadas sob-refrigeração até o Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). As amostras foram então fracionadas e destinadas conforme segue: Frasco I foi encaminhado para as análises microbiológicas no ICBS; Frasco II e alíquota do Frasco III foi encaminhado para o Laboratório de Qualidade do Leite – Univattes; duas alíquotas do Frasco III foram encaminhadas ao Laboratório Federal de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (LFDA/RS-MAPA) e uma alíquota do Frasco III foi encaminhada ao Instituto de Química da UFRGS.

Foram descartadas as amostras que não chegaram ao destino no prazo máximo de 24 horas em condições refrigeradas. Dentre as amostras coletadas um total de 69 amostras atenderam o critério de inclusão neste estudo. Os produtores também forneceram dados dos volumes semanais de produção de leite de búfala durante o período de estudo.

4.3. Análises Físico-Químicas e Contagem de Células Somáticas (CCS)

As análises de teor de gordura (g/100g), proteína (g/100g), lactose (g/100g), SD (g/100g) e sólidos totais (g/100g) foram realizadas por espectrometria de infravermelho médio, de acordo com método ISO 9622 (2013). As análises de CCS foram realizadas por citometria de fluxo, de acordo com o método ISO 13366-2 (2006). Esses métodos foram desenvolvidos para o leite bovino e adaptados para avaliar o leite de búfala. Essas análises foram realizadas pelo mesmo laboratório credenciado (Laboratório de Qualidade do Leite - Univattes, certificado número CRL 0754).

A análise do ponto de congelamento foi realizada em crioscópio microeletrônico digital (PZL 7000), de acordo com as instruções do fabricante. A densidade da amostra foi verificada com densímetro de tubo vibratório (DMA 4500, Anton Paar), de acordo com as instruções do fabricante. A acidez Dornic foi medida de acordo com as Diretrizes do Banco de Leite (Anvisa, 2008). A medição de PC, densidade e acidez Dornic de cada amostra foi a média das triplicatas. Essas análises foram realizadas no LFDA/RS-MAPA.

Os níveis de cálcio foram determinados com um espectrômetro de absorção atômica com chama Perkin Elmer (série Analyst 200) no Instituto de Química da UFRGS. As amostras foram digeridas de acordo com o método AOAC

991.25 (2002) modificado.

4.4. Análises Microbiológicas

A Contagem Padrão em Placas (CPP) foi realizada de acordo com o método padrão ISO 4833-1 (2013). O resultado foi expresso como a média das contagens multiplicada pelo fator de diluição utilizado em UFC/mL. Além da CPP, as amostras foram avaliadas quanto aos potenciais patógenos reconhecidos pela legislação brasileira. Foi realizada uma avaliação para *Staphylococcus* coagulase positiva, de acordo com o método ISO 6888-1 (1999). O método do número mais provável (NMP) foi utilizado para quantificar os coliformes termotolerantes, de acordo com a norma ISO 7251 (2005). A pesquisa da presença ou ausência de *Salmonella* spp. e *Listeria* spp. em amostras de 25 mL foi realizada usando métodos convencionais baseados em cultura, de acordo com ISO 6579 (2002) e ISO 11290-1 (2017), respectivamente. Essas análises foram realizadas no Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

4.5. Resíduos Antimicrobianos e Antiparasitários

Um método de triagem, previamente descrito, para a análise por cromatografia Líquida acoplada à espectrometria de massas em série com ionização por eletrospray (*Liquid Chromatography–Electrospray–Tandem Mass Spectrometry* - LC–ESI-MS/MS) de 46 resíduos antimicrobianos e antiparasitários pertencentes a diferentes classes, foi realizado (Rübensam et al., 2011; Jank et al., 2015; Barreto et al., 2016). Os resíduos analisados 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. Essas análises foram realizadas pelo LFDA/RS-MAPA.

4.6. Análise Estatística das Avaliações Físico-Químicas e Microbiológicas

O teste de Shapiro-Wilk foi realizado para testar a normalidade dos conjuntos de dados. O dimensionamento do número de amostras foi calculado considerando cada propriedade individualmente para um erro máximo de 1°D para acidez. A análise de variância (Anova) unilateral foi usada para comparar as médias dos parâmetros que apresentaram todos os conjuntos de dados seguindo distribuições normais. Nestes casos, comparações múltiplas foram feitas com o teste de Tukey-Kramer (Brillinger, 1984). O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar as medianas dos parâmetros que apresentavam pelo menos um conjunto de dados que não seguia a distribuição normal. Comparações múltiplas foram feitas com o procedimento sugerido por Siegel-Castellan (Siegel & Castellan, 1988). Coeficientes de correlação de Pearson foram usados para mostrar a correlação entre os parâmetros.

4.7. Perfil Lipídico

A composição de ácidos graxos do leite foi determinada por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC-FID) de acordo com AOCS (2009). Como as amostras de leite contêm PUFA, ácidos graxos monoinsaturados MUFA e SFA, que podem ser analisados por cromatografia gasosa de alta temperatura, elas foram convertidas em ésteres metílicos por esterificação com solução de NH_4Cl - H_2SO_4 -metanol para permitir a análise por GC-FID. Os ácidos graxos livres foram extraídos com uma solução de NaOH 0,5 N-metanol, seguido pela adição de hexano para realizar a separação de fase aquosa. Em seguida, a amostra (1 μL) foi injetada no GC-FID (3400 CX, Varian, CA, EUA) equipado com uma coluna capilar CP-Sil 88 (50 m \times 0,25 mm \times 0,25 μm). A análise obedeceu às seguintes condições: temperatura inicial de 140°C e temperatura final de 185°C, com taxa de aquecimento de 1°C/min; temperatura do detector de 185°C; hidrogênio como gás de arraste a uma taxa de fluxo de 1mL/min. Os ácidos graxos foram identificados pela comparação do tempo de retenção dos componentes com um mix padrão do código FA18919 (Supelco), e quantificados pela normalização das áreas, por meio do Software *Work Station*. Os resultados foram expressos em porcentagem de área (%). Essas análises foram realizadas no Centro de Pesquisa em Alimentação da Universidade de Passo Fundo (Cepa/UPF).

4.8. Análise Estatística do Perfil Lipídico

O modelo experimental utilizado foi o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial (3 x 4), e o modelo estatístico referente às variáveis foram:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + E_j + TE_{ijk} + \varepsilon_{ijk},$$

Onde; Y_{ijk} representa as variáveis dependentes (diferentes ácidos graxos); μ é a média de todas as observações; T_i é o efeito dos tratamentos (propriedades A, B e C); E_j é a estação do ano (verão, outono, inverno e primavera); TE_{ijk} é o efeito da interação dos tratamentos x estação do ano e ε_{ijk} é o efeito residual (erro). A análise dos resultados foi realizada pelo software estatístico R-project® (R Core Team, 2016).

A partir dos dados sobre a composição de ácidos graxos, os seguintes índices de qualidade lipídica foram determinados:

1) Ácidos graxos desejáveis = MUFA + PUFA + Esteárico (C18:0);

2) Índice de Aterogenicidade (IA): indica a relação entre a soma dos SFS e das principais classes de UFA, sendo os primeiros considerados pró-aterogênicos (favorecendo a adesão de lipídios às células do sistema imunológico e circulatório), e os últimos antiaterogênico (inibindo a agregação da placa e diminuindo os níveis de ácidos graxos esterificados, colesterol e fosfolipídios, evitando assim o aparecimento de doenças coronárias) (Garaffo et al., 2011). A seguinte equação foi aplicada:

$$IA = \frac{\text{Laurico (C12:0)} + [4 \times \text{Mirístico (C14:0)}] + \text{Palmítico (C16:0)}}{\Sigma \text{ MUFA} + \Sigma \text{ PUFA}}$$

3) Índice de Trombogenicidade (IT): mostra a tendência à formação de coágulos nos vasos sanguíneos. Isso é definido como a relação entre os ácidos graxos pró-trombogênicos (ou SFA) e antitrombogênicos (MUFA, PUFA ω_6 e PUFA ω_3) (Garaffo et al., 2011). A seguinte equação foi aplicada:

$$IT = \frac{[\text{Mirístico (C14:0)} + \text{Palmítico (C16:0)} + \text{Esteárico (C18:0)}]}{(0,5 \times \text{MUFA}) + (0,5 \times \omega 6) + (3 \times \omega 3) + (\omega 3 / \omega 6)}$$

Onde; $\omega 6$ e $\omega 3$ representam os ácidos graxos ômega 6 e 3, respectivamente.

4.9. Isolamento e identificação de *Staphylococcus* spp.

A detecção e contagem de *Staphylococcus* spp. das amostras foram realizadas de acordo com a ISO 6888-1 (1999). Para cada amostra foram selecionadas dez colônias, cinco típicas e cinco atípicas, as quais foram posteriormente confirmadas por procedimentos microbiológicos padrão como coloração de Gram, produção de catalase e coagulase livre com plasma de coelho liofilizado. Os isolados foram preservados em caldo de infusão de cérebro e coração (*Brain Heart Infusion* - BHI) com 20% de glicerol a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para análises posteriores.

4.10. MALDI-TOF MS

A confirmação de *Staphylococcus aureus* em nível de espécie foi realizada por meio do sistema *MALDI Bruker Biotyper* (*Bruker Daltonics Inc.*, Billerica, MA, EUA) no ICBS da UFRGS. Os resultados foram analisados usando o software *Biotyper* 3.0 que incluiu mais de 5500 espectros de referência. Para a análise de MALDI-TOF, culturas puras de isolados foram cultivadas em ágar TSA por 24 h. Uma pequena quantidade de crescimento bacteriano foi transferida para os pontos de uma placa alvo BC de aço polido MSP 96 (*Microflex LT*, *Bruker Daltonics / BD*, Alemanha, EUA) usando uma alça descartável e, em seguida, 1 μL de Matriz [ácido hidroxicinâmico (HCCA)] foi adicionado e as placas foram secas ao ar 1 a 2 minutos à temperatura ambiente. Os espectros de massa resultantes foram analisados e comparados com os espectros de referência. Como critério do fabricante, uma pontuação ≥ 2.000 foi usada para indicar o nível de espécie; pontuação de 1.700 a 1.999 para indicar o gênero.

4.11. Extração de DNA e PCR

O DNA genômico de todas as cepas confirmadas para *S. aureus* por MALDI-TOF foi extraído por método físico-químico conforme descrito anteriormente (Coenye & Lipuma, 2002). As amostras foram testadas primeiro para a presença do

gene da coagulase (*coa*). Em seguida, o DNA foi usado em ampliações por PCR de genes de virulência: clássico relacionado à enterotoxina (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*) e resistência à metilina (*mecA*). Os primers, a temperatura de anelamento e outras informações da reação de amplificação desses genes estão descritos na tabela 3.

As reações de amplificação para *coa*, *sea* e *sed* foram realizadas em um volume final de 25 µl cada uma com 1 × tampão de PCR, 4 mM MgCl₂, 1,25 U *Taq DNA polimerase* (*Invitrogen*TM, EUA), desoxinucleosídeo trifosfatos 200 µM e 10 pmol de cada *primer*. Multiplex PCR foi usado para determinar a frequência dos genes *seb*, *sec* e *see*. As reações de PCR (25 µl) foram realizadas com 1 × tampão de PCR, 4 mM MgCl₂, 1,25 U *Taq DNA polimerase* (*Invitrogen*TM, EUA), 300 µM de desoxinucleosídeo trifosfatos e 5 pmol de cada *primer*. As reações de PCR para *mecA* foram realizadas em um volume final de 25 µl, contendo 1 × tampão de PCR, 1,5 mM de MgCl₂, 1,25U de *Taq DNA polimerase* (*Invitrogen*TM, EUA), 200 µM de desoxinucleosídeo trifosfatos e 12,5 pmol de cada *primer*. Todas as reações citadas acima foram realizadas nas seguintes condições de ciclo: 5 min a 94°C; seguido por 35 ciclos de 45 s a 94°C, 45 s à temperatura de anelamento (ver tabela 1) e 45 s a 72°C; seguido por 5 min a 72°C.

Tabela 4: Sequências de nucleotídeos e informações sobre reações de amplificação de genes de virulência de *Staphylococcus* spp.

Gene alvo	Sequência de nucleotídeos (5' – 3')	TFA (pb)	TA (°C)	Controle positivo	Referência
<i>coa</i>	F: ATAGAGATGCTGGTACAGG R: GCTTCCGATTGTTTCGATGC	840	59	ATCC 13565	(Goh et al., 1992)
<i>sea</i>	F: CCTTTGGAAACGGTTAAAACG R: CTGAACCTTCCCATCAAAAAC	126	54	ATCC 13565	(Moura et al., 2012)
<i>seb</i>	F: GGTACTCTATAAGTGCCTGC R: TTCGCATCAAACGACAAAACG	475	55	ATCC 14458	(MOURA et al., 2012)
<i>sec</i>	F: AGAACTAGACATAAAAAGCTAGG R: TCAAAATCGGATTAACATTATCC	267	55	ATCC 19095	(MOURA et al., 2012)
<i>sed</i>	F: TTTGGTAATATCTCCTTTAAACG R: CTATATCTTATAGGGTAAACATC	309	54	ATCC 23235	(MOURA et al., 2012)
<i>see</i>	F: CCTATAGATAAAGTTAAAACAAGC R: TAACTTACCGTGGACCCTTC	173	55	ATCC 27664	(MOURA et al., 2012)
<i>mecA</i>	F: GTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA R: CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA	310	58	ATCC BAA-1026	(Mcclure et al., 2006)

TFA: tamanho do fragmento amplificado; TA: temperatura de anelamento

4.12. Suscetibilidade Antimicrobiana

Os testes de sensibilidade aos antibióticos foram realizados para os todos os isolados que apresentaram potencial enterotoxigênico, com a presença de pelo menos um dos genes de enterotoxinas, pelo método de disco-difusão (Bauer et al., 1966). Os antimicrobianos selecionados, bem como os critérios interpretativos para os mesmos, foram de acordo com o *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI, 2020). A turbidez do inóculo foi ajustada para os padrões de 0,5 de McFarland. Após 24h a 37°C, a zona de inibição no ágar Mueller-Hinton foi medida e comparada com as zonas padrão de suscetibilidade. Os isolados foram classificados como suscetíveis (S), intermediários (I) ou resistentes (R) de acordo com os critérios interpretativos (CLSI, 2020) a partir dos limites dos halos de inibição (Tabela 4). Um total de dez agentes antimicrobianos foram utilizados: Trimetoprim-Sulfametoxazol (1,25µg / 23,75µg), Penicilina G (10 UI), Clindamicina (2µg), Eritromicina (15 µg), Ciprofloxacina (5 µg), Cloranfenicol (30 µg), Gentamicina (10 µg), Tetraciclina (30 µg), Cefoxitina (30 µg). A cepa *S. aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle de qualidade. Os isolados foram classificados em simples, dupla ou multirresistentes, quando apresentaram resistência a um, dois e três ou mais antibióticos, respectivamente.

Tabela 5. Agentes antimicrobianos e critérios interpretativos usados para avaliar os isolados de *Staphylococcus aureus*

Agente antimicrobiano	Potência	Limites do halo de inibição (mm)		
		R	I	S
Penicillina G	10 UI	≤ 28	-	≥ 29
Cefoxitina	30 µg	≤ 21	-	≥ 22
Gentamicina	10 µg	≤ 12	13 - 14	≥ 15
Eritromicina	15 µg	≤ 13	14 - 22	≥ 23
Tetraciclina	30 µg	≤ 14	15 - 18	≥ 19
Ciprofloxacina	5 µg	≤ 15	16 - 20	≥ 21
Clindamicina	2 µg	≤ 14	15 - 20	≥ 21
Trimetoprim-Sulfametoxazol	1,25µg / 23,75µg	≤ 10	11 - 15	≥ 16
Cloranfenicol	30 µg	≤ 12	13 - 17	≥ 18

R: resistente; I: intermediário; S: suscetível. Fonte: CLSI (2020)

5. RESULTADOS

Os resultados estão apresentados e discutidos na forma de três artigos científicos, cujos títulos estão abaixo. Os manuscritos estão apresentados nesta sessão de acordo com as normas das revistas em que foram publicados ou submetidos. Ainda, os resultados, gráficos e figuras que não foram incluídos nos artigos estão apresentados na subseção 5.4.

O primeiro artigo "*Microbiological and physicochemical characteristics of buffalo Milk used for dairy products in southern Brazil*" foi publicado na revista *Journal of Dairy Research*. A versão publicada está em Apêndice B. Também está disponível em: <https://doi.org/10.1017/S002202992000093X>.

O segundo artigo "*Fatty acid profile of buffalo milk produced in southern Brazil*" foi submetido para o *Journal of Dairy Research*, O email de submissão e as normas da revista estão em Anexos A e B, respectivamente.

O terceiro artigo "*Prevalence, enteroxigenic potencial and antimicrobial resistance of Staphylococcus aureus isolated from bulk buffalo milk in Southern Brazil*" será submetido para a revista *Food Microbiology*, cujas normas da revista estão em Anexo C.

5.1. **Artigo 1:** publicado no *Journal of Dairy Research*

Microbiological and physicochemical characteristics of buffalo milk used for dairy products in southern Brazil

Fernanda M. S. Godinho^{1,3}, Melina Krug¹, Renata Figueiredo¹, Alexandre Müller², Louise Jank⁴, Caroline Andrade Tomaszewski⁴, Daniel Rodrigo Hillesheim⁴, Éder J. Kinast⁵, Ana Paula G. Frazzon¹, and Amanda S. Motta¹

¹ Postgraduate Program in Agricultural and Environmental Microbiology (PPGMAA) and ²Postgraduate Program in Chemistry (PPGQ), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

³Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT), Centro Estadual de Vigilância em Saúde (CEVS), Porto Alegre, RS, Brazil

⁴ Laboratório Federal de Defesa Agropecuária LFDA/RS, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Porto Alegre, RS, Brazil

⁵ Universidade Estadual do Rio Grande do Sul (UERGS), Unidade Porto Alegre, RS, Brazil

Short title: **Quality of buffalo milk**

Author for correspondence: Amanda de Souza da Motta

E-mail: amanda.motta@ufrgs.br

Abstract

In Brazil, the buffalo milk market has been growing. However, identity and quality standards have not been established for this raw material, nor have proper distinctions between buffalo milk and bovine milk been defined. Currently, the State of Rio Grande do Sul (RS) has only three producers that supply raw material for officially marketed derivatives. The aim of this study was to determine the identity and quality standards of raw buffalo milk in this region. Samples were obtained biweekly from three farm cooling tanks between June 2017 and August 2018, to reach a total of 69 samples. The averages for the results of the physicochemical parameters fat, protein, lactose, total solids, SNF (solids-not-fat), calcium, density, FP, acidity and SCC were 5.5g/100g, 4.06g/100g, 5.07g/100g, 15.5g/100g, 9.96g/100g, 0.161g/100g, 1.034 g/mL, -0.527°C, 16°D and 95×10^3 cells/mL, respectively. With reference to the microbiological parameters, the mean of the Standard Plate Count (SPC) and thermotolerant coliforms were $9,0 \times 10^4$ CFU/mL and 1.6×10^2 MPN/mL, respectively. Regarding coagulase-positive staphylococci, 36 samples tested positive (52% of total). Neither *Salmonella* spp. nor *Listeria monocytogenes*, nor antibiotic or antiparasitic residues were detected in any sample. In conclusion, the buffalo milk used as raw material for dairy products in southern Brazil demonstrated satisfactory physicochemical and microbiological characteristics, in accordance with recent scientific literature.

Introduction

Buffalo milk has been gaining distinct importance throughout the world. Nowadays, it is the second largest source of global milk production (Khedkar et al. 2015). Besides the absence of β -carotene, buffalo milk differs from bovine milk from a compositional point of view: it contains higher levels of fat, total solids, proteins, caseins, lactose and ash contents (Ahmad et al. 2013). In Brazil, the market for buffalo milk products is growing (Ricci & Domingues 2012). Besides the fact that buffalo milk has a higher yield in the production of derivatives, buffalo mozzarella cheese has already established a market with a promising future in Brazil. This is due to the possibility of adding greater value when compared with cheese made with cow's milk (Sales et al. 2018). Within this context, two challenges to increasing the potential of buffalo milk production has been inadequate research and a scarcity of information on the subject. It is often falsely presumed that scientific information generated on the characteristics of bovine milk can be extrapolated to buffalo milk (Khedkar et al. 2015).

Milk quality is the most important factor for the success of its industrialization and dairy products. This factor generates a significant increase in the price of milk, and benefits for consumers who acquire better quality products (Figueiredo et al. 2010). The physicochemical composition (mainly fat, protein, lactose, calcium and total solids) and the microbiological analysis of raw milk samples are important indicators of its quality. Measurement of the freezing point (FP) is used to detect any milk adulteration with water (Pesce et al. 2016). Determining the bulk milk somatic cell count (SCC) is an internationally recognized method to establish milk quality and the udder health status of the cows in the herd (Schukken et al. 2003). Microbiological analysis can verify the absence of pathogenic microorganisms (or their presence, within tolerable limits), and show if the product is suitable for human consumption. The analysis of the Standard Plate Count (SPC) determines the concentration of microorganisms present in the milk and is a suitable tool to test the levels of hygiene of the milk production process, from initial management and storage to sampling (Gargouri et al. 2013).

The presence of antimicrobials and other veterinary drugs in milk analysis is another important quality parameter which indicates that the herd has been treated for infection. Therefore, if the withdrawal period is not respected, the milk collected from them is unsuitable for human consumption and processing (Khaniki et al. 2007).

In Brazil, the National Residue Control Plan (NRCP) defines which residues must be monitored and their maximum limits, aiming mainly to monitor the incidence of residues and prevent potential risks to the population if exposed to those products (Jank et al. 2015).

Differences in the composition of buffalo milk in different localities reflect differences in breeds, management, feeding and environmental conditions (Ahmad et al. 2013). These variations would strongly affect the manufacturing conditions, sensory quality and nutritional properties of the dairy products (Khedkar et al. 2015). Despite the high nutritional value and technological importance of buffalo milk, its levels of production and consumption as well as its use in the dairy industry are still very low when compared to bovine milk. The State of Rio Grande do Sul (RS) has not yet planned specific legislation for this type of product. In Brazil, just the Secretariat of Agriculture and Supply (SAA) of the State of São Paulo has published Resolution SAA 24, which is valid only for this state (São Paulo, 1994). At present, the data regarding the microbiological and physicochemical quality of raw buffalo milk, when used as raw material for the production of derivatives in RS, are still limited. As a result, the aim of this study was to characterize samples of raw buffalo milk (whole milk collected from refrigeration tanks) from three farms that provide raw material for the production of buffalo milk derivatives in RS.

Material & Methods

Farms and milk samplings

For this study, three farms were chosen for the collection of milk samples. These properties represent 100% of the official buffalo milk market which produces dairy products in RS. The farmers signed a consent form before sample collection. The characteristics of these farms are shown in the Supplementary File 1.

For about one year (June 2017 to August 2018), milk samples were collected biweekly by the same person, who had been previously trained for the task. They collected the samples from the cooling tank of each farm after homogenizing the contents. For each sampling, three aliquots were obtained: 40 mL in a sterile container with Azidiol (for microbiological analyses), 40 mL in a sterile container with Bronopol (for SCC analyses) and 200 mL in a clean bottle (for physicochemical analyses). The samples were transported under refrigerated conditions to the laboratory. Farmers also provided weekly volume data for buffalo milk production

during the study period. A total of 69 samples of bulk milk were collected.

Supplemental File 1: Characteristics of the studied farms

	Farm A	Farm B	Farm C
State location	Sentinela do Sul (30°36'41"S, 51°34'44"W, 600 m)	Pântano Grande (30°11'29"S, 52°22'25"W, 100 m)	Gravataí (29°56'40"S, 50°59'31"W, 26 m)
Number of animals	305	400	76
Lactating animals	127	70	14
Volume (L) *	2314	5819	618
Mastitis cases	rare	rare	sometimes
Animal nutrition	silage	pasture, concentrated, silage and mineral salt	pasture and concentrated

* average volume of milk produced weekly by each farmer

Physicochemical and Somatic Cell Count (SCC) Analyses

Fat content (g/100g), protein (g/100g), lactose (g/100g), SNF (g/100g), and total solids (g/100g) analyses were performed through mid-infrared spectrometry, according to the ISO 9622 method (2013). SCC analyses were performed using flow cytometry, according to the ISO 13366-2 method (2006). These methods were developed for bovine milk and have been adapted to assess buffalo milk, following standard guidelines. These analyses were carried out by the same accredited laboratory (Milk Quality Laboratory-Univattes, certificate number CRL 0754).

The FP was performed on a digital micro-electronic cryoscope (PZL 7000), in keeping with the manufacturer's instructions. Sample density was verified with a vibrating tube densimeter (DMA 4500, Anton Paar), according to the manufacturer's instructions. Dornic acidity was measured in line with Milk Bank Guidelines (Brasil 2007). The FP, density and Dornic acidity measurement of each sample was the average of triplicate data. These analyses were performed at the National Agricultural Laboratory at the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply.

Calcium levels were determined with a Perkin Elmer flame atomic absorption spectrometer (AAAnalyst 200 series) at UFRGS' Chemistry Institute. The samples were digested according to the modified AOAC method 991.25 (2016).

Microbiological analysis

The Standard Plate Count (SPC) was performed according to the standard ISO 4833-1 method (2013). The result was expressed as the mean of the counts multiplied by the dilution factor used in CFU/mL. In addition to SPC, the dairy products were assessed for potential pathogens recognized by Brazilian legislation,. An assessment for coagulase-positive staphylococci was conducted, according to the ISO 6888-1 method (1999). The most probable number (MPN) method was used to quantify the thermotolerant coliforms, in accordance with the ISO 7251 standard (2005). Testing for *Salmonella* spp. and *Listeria* spp. in 25 mL samples was carried out using conventional culture-based methods, according to ISO 6579 (2002) and ISO 11290-1 (2017), respectively. These analyses were performed at the Institute of Basic Health Sciences at the Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Antimicrobial and Antiparasitic Residues

A screening method for the analysis of 46 antimicrobial and antiparasitic residues belonging to different classes (Supplementary File 2) was performed and analyzed using liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry (LC–ESI–MS/MS), as previously described (Barreto et al. 2016, Jank et al. 2015, Rübensam et al, 2011). These analyses were performed by the Federal Laboratory of Animal and Plant Health and Inspection, at the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply.

Supplementary File 2: Antimicrobial and Antiparasitic Residues

The residues analyzed were: Tetracycline, Oxytetracycline, Chlortetracycline, Doxycycline, Sulfadiazine, Sulfatiazole, Sulfamethazine, Sulfamethoxazole, Sulfaquinoxaline, Sulfadimethoxine, Sulfadoxine, Sulfaspyridazine, Sulfamerazine, Sulfisoxazole, Nalidixic Acid, Oxonyl Acid, Flumequine, Ciprofloxacin, Enrofloxacin, Difloxacin, Sarafloxacin, Danofloxacin, Norfloxacin, Penicillin G, Penicillin V, Ampicillin, Amoxicillin, Oxacillin, Cloxacillin, Dicloxacillin, Ceftiofur, Cefapirine, Cefoperazone, Naficilina, Cefquinoma, Cephalone,

Cephalexin, Erythromycin, Spiramycin, Tilmicosin, Azithromycin, Tylosin, Lincomycin, Clindamycin, Trimethoprim, Bromexin, Chloramphenicol, Tianfenicol, Florfenicol, Abamectin, Doramectin, Eprinomectin, Ivermectin, Monensina, Moxidectin and Albendazole.

Statistical analysis

The Shapiro-Wilk test was performed to test the normality of data sets. The sizing of the number of samples was calculated considering each farm individually to a maximum error of 1°D for acidity. One-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare the means of the parameters that presented all the data sets following normal distributions. In these cases, multiple comparisons were made with the Tukey-Kramer test (Brillinger, 1984). The Kruskal-Wallis test was used to compare the medians of the parameters that presented at least one data set that did not follow a normal distribution. Multiple comparisons were made with the procedure suggested by Siegel-Castellan (Siegel & Castellan, 1988). Pearson correlation coefficients were used to show correlation between parameters.

Results & Discussion

The composition of buffalo milk has been studied in several countries and variations have been observed. Besides distinct methods of analysis, these divergences reflect the existence of variability among herds, management, environmental conditions and seasonality.

Supplemental File 3 show the results. The mean fat measurements for all analyzed buffalo milk samples from the period of this study was 5.5g/100g, and the fat content ranged from 4.26g/100g to 9.57g/100g. The overall median for protein was calculated at 4.06g/100g with values ranging from 3.42g/100g to 4.60g/100g. The mean fat and protein contents were lower than those reported in studies conducted in Italy (Pesce et al. 2016; Pasquini et al. 2018) and the USA (Han et al. 2012), while they were similar to studies performed in Egypt (Elshaghabee 2017) or other parts of Brazil (Bailone et al. 2017, Filho et al. 2014, Sales et al. 2018). Total solids were measured at an average value of 15.5g/100g, ranging from 13.56g/100g to 19.53g/100g. This average was very close to other studies conducted in Brazil (Bailone et al. 2017, Filho et al. 2014, Sales et al. 2018), but lower than those reported by Han et al. (2012). Although some physicochemical characteristics of our samples differ somewhat from those found in international studies, it is known that

many of these herds of foreign buffalo are in a more advanced breeding stage, thus increasing total solids. However, the data established in this study are much closer to studies carried out in other parts of the country.

Not-fat solids (SNF) content is the entire residue left after the complete evaporation of water from milk and includes its protein, lactose and mineral content (Bassbasi et al., 2014). In this study, the median for SNF was 9.96g/100g with values ranging from 9.44g/100g to 10.61g/100g. SNF content is an important nutritional parameter of raw milk, and has a significant effect on the quality of milk. As such, it is one of the best factors to analyse for milk quality assurance (Bassbasi et al., 2014).

The overall median for density was 1.034 g/mL and ranged from 1.031 g/mL and 1.037 g/mL. This result is in agreement with what Ahmad et al. (2013). Sales et al. (2018) reported a density value of 1.033 g/mL in research carried out in another region of Brazil. The overall median for acidity was calculated at 16°D, with the values ranging from 13°D to 24°D. The FP of milk is related to its soluble constituents and is usually used to detect water added to milk. It has been reported that the basic FP of buffalo milk is lower than cow's milk (Pesce et al. 2016) and can be affected by seasonality and farm size (El-Salam & El-Shibiny 2011). The average result for FP was -0.527°C.

The median for lactose during the period of this study was 5.07g/100g, and the lactose content ranged from 4.80g/100g to 5.30g/100g. This result was slightly higher than findings from other studies in Egypt (Elshghabee et al. 2017) and Italy (Pesce et al. 2016; Pasquini et al. 2018). Compared with other studies within Brazil, our results were higher than those reported by Filho et al. (2014) and Bailone et al. (2017), but were very similar to those reported by Sales et al. (2018). The average calcium content found in the analyzed samples was 0.161g/100g, with a maximum value of 0.188g /100g. Buffalo milk contains high calcium content (about 1.5-fold more calcium than cow's milk), as was made apparent in several studies (Ariota et al. 2007; El-Salam & El-Shibiny 2011). Breed type, environmental factors, and analytical methods considerably affect the calcium content of buffalo milk (El-Salam & El-Shibiny 2011).

The mean SCC of all samples in this study was 95×10^3 cells/mL, ranging from 24×10^3 cells/mL to 216×10^3 cells/mL. This result was lower than what had been published in previous research (Filho et al. 2014, Pasquini et al. 2018), albeit close to findings that Bailone et al. reported (2017). To ensure the quality of manufacturing

cheese, especially coagulation, Tripaldi et al. (2010) suggest that the buffalo milk should not contain an SCC above 200×10^3 cell/mL. Considering the results found regarding the criterion of SCC, we can affirm that the quality of the milk collected for our study is excellent.

The mean SPC of the analysed samples was of 9.0×10^4 CFU/mL, with results varying between 1.1×10^3 CFU/mL and 9.4×10^5 CFU/mL. This parameter is extremely important in the manufacture of derivatives. A high SPC alters the coagulation of the mass and the texture of the cheese, generating a negative result in the product yield. Durability and sensory characteristics are also affected (Teixeira et al. 2005). Our results corroborate those of many previous studies (Chye et al. 2004; Bailone et al. 2017, Filho et al. 2004, Sales et al. 2018), and are only greater than the findings of some studies (Figueiredo et al. 2010, Pasquini et al. 2018).

In relation to the microbiological analyses of pathogenic microorganisms, neither *Salmonella* spp. nor *Listeria monocytogenes* was detected in any of the samples. Regarding coagulase-positive staphylococci, 36 (52%) of the 69 analyzed samples were positive. Samples with coagulase-positive staphylococci were linked to all three farms: 12 from farm A, 13 from farm B and 11 from farm C. For the determination of thermotolerant coliforms, the average was 1.6×10^2 MPN/mL, with a maximum value equal to 1.1×10^3 MPN/mL. The occurrence of the coliform group and *E. coli* in milk indicates poor hygiene or fecal contamination. Although this milk is subsequently processed, the dairy industry must show concern for the safety of dairy products because the entry of pathogens into processing plants may lead to the persistence of these pathogens in biofilms and the subsequent contamination of processed dairy products. Furthermore, pasteurization may fail to destroy all foodborne pathogens in milk. Meanwhile, information on health hazards associated with contaminated raw milk should be made available to the public, to help prevent the consumption of untreated raw milk.

As expected, a correlation was established between acidity values, total solids, protein and fat values. Interestingly, there was also a significant correlation between calcium values, protein and total solid values. According to Ahmad et al. (2013), most of the calcium is found in insoluble form, mainly because of the high casein contents of buffalo milk, and represents 67.6-82.6% of the total calcium. For this reason, milk that has a higher protein content also has higher associated levels of calcium.

Supplemental File 3: Descriptive statistics for the analyzed quality parameters of all buffalo milk samples (Farms A, B and C)

	Fat (g/100g)	Protein (g/100g)	Lactose (g/100g)	TS (g/100g)	NFS (g/100g)	FP (°C)	Acidity (°D)	Density (g/mL)	Calcium (g/100g)	SCC (x10 ³ cells/mL)	SPC (CFU/mL)	TC (MNP/mL)
Mean	5.5	4.057	5.068	15.5	9.964	-0.527	16.07	1.03452	0.1613	94.7	9.0x10 ⁴	1.6x10 ²
Median	5.455	4.12	5.07	15.485	9.97	-0.528	16	1.035	0.161	88	4.1x10 ⁴	2.6x10
SD	0.76	0.325	0.09	1.03	0.317	0.0128	1.9	0.00124	0.0138	53.7	1.6x10 ⁵	2.9x10 ²
n	62	63	65	64	67	68	68	69	67	67	64	66
CI95% Error	0.19	0.082	0.022	0.26	0.077	0.0031	0.46	0.0003	0.0034	13.1	3.9x10 ⁴	7.2x10
Relative Error	3.45%	2.02%	0.43%	1.68%	0.77%	0.59%	2.86%	0.03%	2.11%	13.83%	43.92%	45.85%

TS. total solids; NFS. not-fat solids; FP. freezing point; SCC. somatic cell counts; SPC. standard plate count; CFU. colony-forming unit; TC. thermotolerant coliforms; MPN. most probable number.

We compared our results with the parameters established in the SSA 224 (São Paulo, 1994), the only current legislation in Brazil for buffalo milk. The SSA 24 rules that the minimum fat content should be 4.5g/100g. While taking into account uncertainties about the method of measurement, we believe that the majority of our results satisfy this requirement. Regarding the SNF parameter, the SSA 24 rules that the minimum should be 8.57 g/100g - a score all analyzed samples obtained. The ideal SSA density range for buffalo milk is between 1,028 and 1,034, the same as stated in bovine milk legislation. Some samples in this study presented values above this range, with the average result bordering the upper limit. Nevertheless, this parameter proposed by the SSA 24 could be easily questioned because, as shown in this study, buffalo milk has its own characteristics that make it denser than bovine milk. With respect to the acidity of buffalo milk, the SSA 24 describes a range between 14°D and 23°D. Once more, while the uncertainty of the method of measurement has been taken into account, all values were within this range. Regarding the freezing point (FP), the average result of this study falls within the allowed range which, according to the SSA 24, varies between -570°C and -520°C.

Table 1 presents the means of parameters of buffalo milk from each farm that follow normal distributions and the medians of parameters where at least one measured group does not follow a normal distribution. When comparing the physicochemical results of the analyzed samples of the three sites, farm B presented a significantly higher average of fat, protein, total solids and SNF than farms A and C. Samples collected from farm B also presented higher acidity. This result matches parameters reported elsewhere, since it is known that acidity correlates to total solids and fat (Ahmad 2013). Density and FP did not present a significant difference among samples from the three farms. This similarity also occurred in the comparison of the microbiological parameter of thermotolerant coliforms. In the comparison of sites, samples from farm A demonstrated a significantly higher lactose content than those from farm B. Samples from farm B showed a higher average calcium content, followed by farm C and then farm A. Regarding the microbiological analyses, farm B showed the highest microbiological quality with the lowest significant SPC results. This parameter may be related to the SCC result, which was also lower for farm B.

Table 1: Normal distribution means of buffalo milk parameters and medians of buffalo milk parameters that do not follow normal distributions from each farm

Farm	Means								Medians			
	Fat (g/100g)	Protein (g/100g)	Lactose (g/100g)	TS (g/100g)	SNF (g/100g)	FP (°C)	Density (g/mL)	Calcium (g/100g)	Acidity (°D)	SCC (10 ³ cell/mL)	SPC (CFU/mL)	TC (MPN/mL)
A	5.03 ^b	3.844 ^b	5.11 ^a	14.89 ^b	9.773 ^b	-0.525 ^a	1.03418 ^a	0.1495 ^c	15.0 ^b	116.5 ^a	1.0×10 ^{5a}	110.0 ^a
B	6.39 ^a	4.427 ^a	5.02 ^b	16.69 ^a	10.217 ^a	-0.532 ^a	1.03483 ^a	0.1715 ^a	18.0 ^a	36.0 ^b	6.3×10 ^{3b}	19.5 ^a
C	5.13 ^b	3.950 ^b	5.08 ^{ab}	14.95 ^b	9.891 ^b	-0.526 ^a	1.03452 ^a	0.1609 ^b	15.5 ^b	104.5 ^a	4.9×10 ^{4a}	37.0 ^a

TS. total solids; SNF. not-fat solids; FP. freezing point. SCC. somatic cell counts; SPC. standard plate count; CFU. colony-forming unit; TC. thermotolerant coliforms; MPN. most probable number. Means and medians with the same superscript letter do not present a significant difference. Means and medians with different superscript letters present a significant difference ($\rho < 0.05$).

Table 2 presents the mean measures of quality parameters of all analyzed buffalo milk samples which presented significant differences between seasons. When the results of all samples were assessed according to seasons, we verified statistically significant differences for the parameters of protein, SNF, lactose and density. These results were analyzed together with the average volume of milk produced in each season. SNF and protein levels were higher ($P < 0.05$) in summer and spring and lower in autumn and winter. These results corroborate those previously found by Filho et al. (2014). It is reasonable to think that higher values of SNF (g/100g) in hotter seasons relate to lower milk production, increasing the concentration of this component in the milk (Araújo et al. 2011). For the same reason, we could explain the significantly higher density in summer when compared to autumn. Unlike other studies that did not report a significant difference in lactose levels in raw buffalo milk (Bailone et al. 2017; Pasquini et al. 2018), we observed that the summer and spring results of our samples were higher when compared to those collected in autumn. It needs to be taken into account that we were unable to account for possible stage-of-lactation effects when examining effects of season. No antibiotic or antiparasitic residues were detected in any of the samples analyzed during the research period. This suggests that the farms have followed legal recommendations.

Table 2: Mean measures of quality parameters of all analyzed buffalo milk samples that presented significant differences between seasons

	Protein (g/100g)	SNF (g/100g)	Lactose (g/100g)	Density (g/mL)	Volume (L)*
Summer	4.274 ^a	10.177 ^a	5.11 ^a	1.0351 ^a	2297.3
Spring	4.172 ^a	10.103 ^a	5.09 ^a	1.0348 ^{ab}	2472.0
Winter	3.906 ^b	9.830 ^b	5.06 ^{ab}	1.0344 ^{ab}	3335.5
Autumn	3.826 ^b	9.749 ^b	4.99 ^b	1.0338 ^b	3632.3

SNF. not-fat solids. Means with the same superscript letter do not present a significant difference. Means with different superscript letters present a significant difference ($p < 0.05$).

*average volume of milk produced weekly by the three farms

In conclusion, buffalo milk used as raw material for dairy products in southern Brazil showed satisfactory physicochemical and microbiological characteristics and presented data in accordance with the revised literature. This first study took place over one year and was subject to the range of parameters characteristic of these farms. Understanding the buffalo milk composition of this region allows the dairy industry to have greater control over efficiency and a better standardization of the physical, chemical and organoleptic characteristics of mozzarella cheese, thus ensuring stability in quality for the consumer. Moreover, such data may support the design of specific technical regulation that is not yet available in RS.

Acknowledgements

The authors sincerely thank the farms for access to the milk samples, the Laticínio Kronhardt and Cooperativa Sulriograndense de Bubalinocultores for their assistance with sample collection, and the Laboratório Nacional Agropecuário for allowing us to carry out tests at their laboratories.

References

- 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* **23** 62-74
- Araújo TPM, Rangel AHN, Soares AD, Lima TCC, Lima Júnior DM & Novaes LP 2011 Influence seasons of the year on milk composition buffaloes kept in farm milk tank, *Agropecuária Científica no Semiárido* **7** 1-5
- Ariota B, Campanile G, Potena A, Napolano R, Gasparini B, Neglia GL & Di Palo R 2007 Ca and P in buffalo milk: curd yield and milk clotting parameters, *Italian Journal of Animal Science* **6** 497-499
- AOAC 991.25 2016 Ca, Mg and P in cheese. In Official Methods of Analysis of AOAC International 20th ed, vol II, Washington
- Bailone RL, Borra RC, Roça RO, Aguiar L & 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** 1-12
- Barreto F, Ribeiro C, Hoff RB & 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 A* **1449** 48-53
- Bassbasi M, Platikanov S, Tauler R & 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
- Brazil 2007 [Human milk bank: operation, prevention and control of risks], Agência

- Nacional de Vigilância Sanitária – Ministério da Saúde, Brasília
- Brillinger, D 1984 *The Collected Works of John W. Tukey*, 1^a ed, vol II, Monterey, CA: Springer
- Chye FY, Abdullah A & Ayob MK 2004 Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia *Food Microbiology* **21** 535-541
- El-Salam MHA & El-Shibiny S 2011 A comprehensive review on the composition and properties of buffalo milk, *Dairy Science & Technology* **91** 663–699
- Elshaghabee FMF, Abdel-Hamid MI, Walte HG 2017 A survey on selected quality parameters of buffalo milk samples collected from consumer markets of three different central governorates in Egypt, *Milk Science International* **70** 25-29
- 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 Brasileira* **8** 201-208
- Figueiredo EL, Junior JBL & Toro MJU 2010 Physical-chemical and microbiological characterization of buffalo milk “in natura” produced in the state of Pará, *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial* **4** 19-28
- Gargouri A, Hamed H & Elfeki A 2013 Analysis of raw milk quality at reception and during cold storage: combined effects of somatic cell counts and psychrotrophic bacteria on lipolysis, *Journal of Food Science* **78** M1405-M1411
- Han X, Lee FL, Zhang L & Guo MR 2012 Chemical composition of water buffalo milk and its low-fat symbiotic yogurt development, *Functional Foods in Health and Disease* **2** 86-106
- ISO 6579-1 2017 Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* - Part 1: Detection of *Salmonella* spp. International Organization for Standardization, Geneva
- ISO 6888-1 1999 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) - Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium. International Organization for Standardization, Geneva
- ISO 11290-1 2017 Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. - Part 1: Detection method. International Organization for Standardization, Geneva
- ISO 7251 2005 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of presumptive *Escherichia coli* - Most probable number technique. 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 9622 2013 Milk and liquid milk products - Guidelines for the application of mid-infrared spectrometry. International Organization for Standardization, Geneva
- 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
- Jank L, Martins MT, Arsand JB, Motta TMC, Hoff RB, Barreto F & 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
- Khaniki J 2007 Chemical contaminants in milk and public health concerns: a review

- International Journal of Dairy Science* **2** 104-115.
- Khedkar CD, Kalyankar SD & Deosarkar SS 2016 Buffalo milk, *Encyclopedia of Food and health*. **1** 522-528
- Pasquini M, Osimani A, Tavoletti S, Moreno I, Clementi F & Trobetta MF 2018 Trends in the quality and hygiene parameters of bulk Italian Mediterranean buffalo (*Bubalus bubalis*) milk, *Animal Science Journal* **89** 176-185
- Pesce A, Salzano C, De Felice A, Garofalo F, Liguori S, De Santo A, Palermo P & Guarino A 2016 Monitoring the freezing point of buffalo milk, *Italian Journal of Food Safety* **5** 95-97
- Ricci GD & Domingues PF 2012 The buffalo milk, *Journal of Continuing Education in Animal Science of CRMV-SP* **10** 14-19
- Rübensam G, Barreto F, Hoff RB, Kist TL & 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 MF 2018 Buffalo milk composition, processing factors, whey constituents recovery and yield in manufacturing Mozzarella cheese, *Food Science and Technology* **38** 328-334
- São Paulo 1994 [SAA Resolution No. 24 of August 1, 1994: Lays down the technical standards for the production and classification of products of animal origin and those relating to the inspection and inspection of products of animal origin], Secretaria de Agricultura e Abastecimento, São Paulo
- Schukken YH, Wilson DJ, Welcome F, Garrison-Tikofsky L, & Gonzalez RN 2003 Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts, *Veterinary Research* **34** 579–596
- Siegel S & Castellan NJJ 1988 Nonparametric statistics for the behavioral sciences, 2^a ed, New York, NY: Mcgraw-Hill Book Company
- Teixeira LV, Bastianetto E & Oliveira DAA 2005. The water buffalo milk in milky industry, *Revista Brasileira de Reprodução Animal* **29** 96-100
- 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

5.3. **Artigo 2:** submetido ao *Journal of Dairy Research*

Fatty acid profile of buffalo milk produced in southern Brazil

Fernanda M. S. Godinho^{1,2}, Maria T. Friedrich³, Elisa C. Modesto⁴ and Amanda S. Motta^{1*}

¹ Postgraduate Program in Agricultural and Environmental Microbiology (PPGMAA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

² Scientific and Technology Development Center (CDCT), State Health Surveillance Center (CEVS), Porto Alegre, RS, Brazil

³ Research Center of Alimentation, University of Passo Fundo, CEPA/UPF, Passo Fundo, Brazil

⁴ Department of Animal Science, Faculty of Agronomy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, Provisional Exercise in Federal Rural University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

Short title: **Fatty acid profile of buffalo milk**

*Correspondence: Amanda de Souza da Motta

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS)

Sarmento Leite 500, room 216, Centro

90050-170 - Porto Alegre, RS

Brazil

phone +55-51-991824898

E-mail: amanda.motta@ufrgs.br

5.4. Artigo 3: será submetido ao *Food Microbiology*

Biodiversity of *Staphylococcus* spp. and characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from buffalo milk in Southern Brazil

Fernanda M. S. Godinho^{1,2*}, Melina Krug¹, Renata Figueiredo¹, Ana Paula G. Frazzon¹, and Amanda S. Motta¹

¹ Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente (PPGMAA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

² Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT), Centro Estadual de Vigilância em Saúde (CEVS), Porto Alegre, RS, Brazil

*Correspondence: Amanda de Souza da Motta

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS)

Sarmento Leite 500, room 216, Centro

90050-170 - Porto Alegre, RS

Brazil

phone +55-51-991824898

E-mail: amanda.motta@ufrgs.br

5.5. Resultados não apresentados na forma de artigo

Os resultados trazidos nesta subseção, são complementares aos resultados apresentados no artigo 1 e visam ilustrar as discussões a serem tratadas na sessão 6 da presente Tese.

A figura 3 ilustra as correlações entre os parâmetros físico-químicos e microbiológicos avaliados no Artigo 1. Valores em azul indicam uma correlação positiva. Valores em vermelho indicam uma correlação negativa. Ainda, a intensidade do índice é proporcional à correlação estabelecida entre os dois parâmetros.

As figuras 4, 5 e 6 trazem os gráficos de distribuição das determinações físico-químicas e microbiológicas para os três produtores.

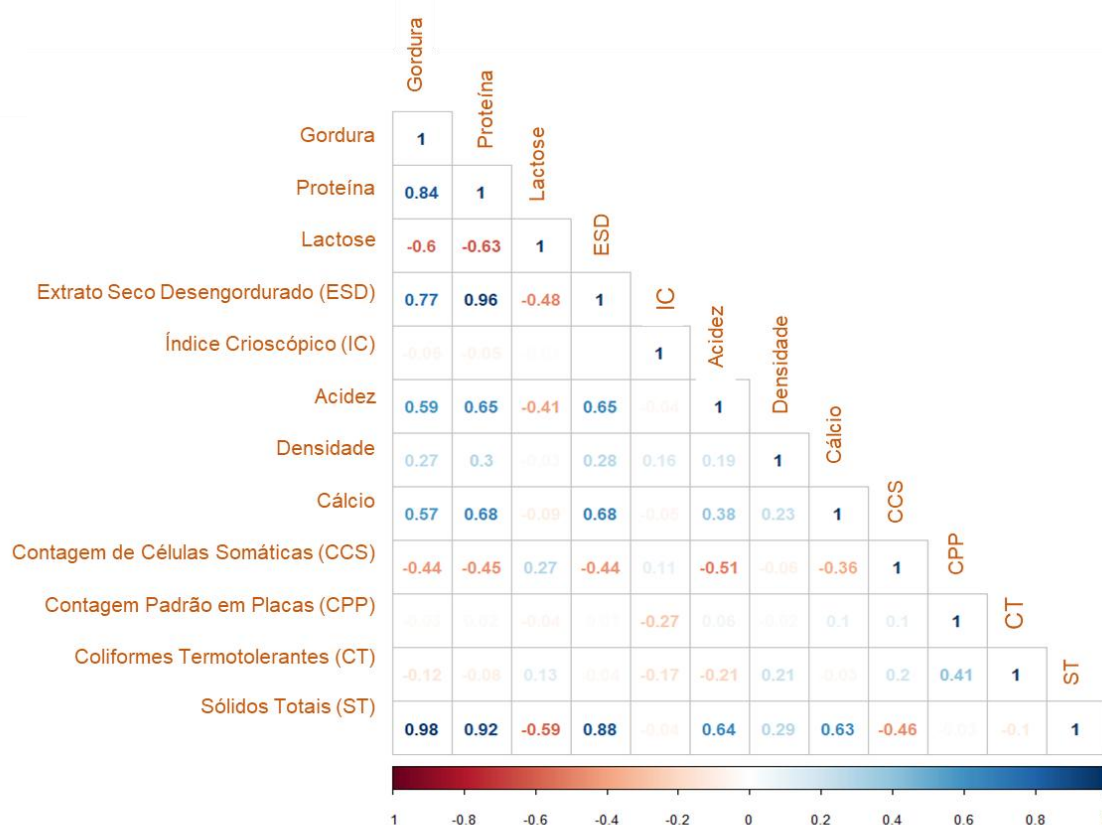


Figura 3. Análises das correlações dos parâmetros de qualidade do leite bubalino.

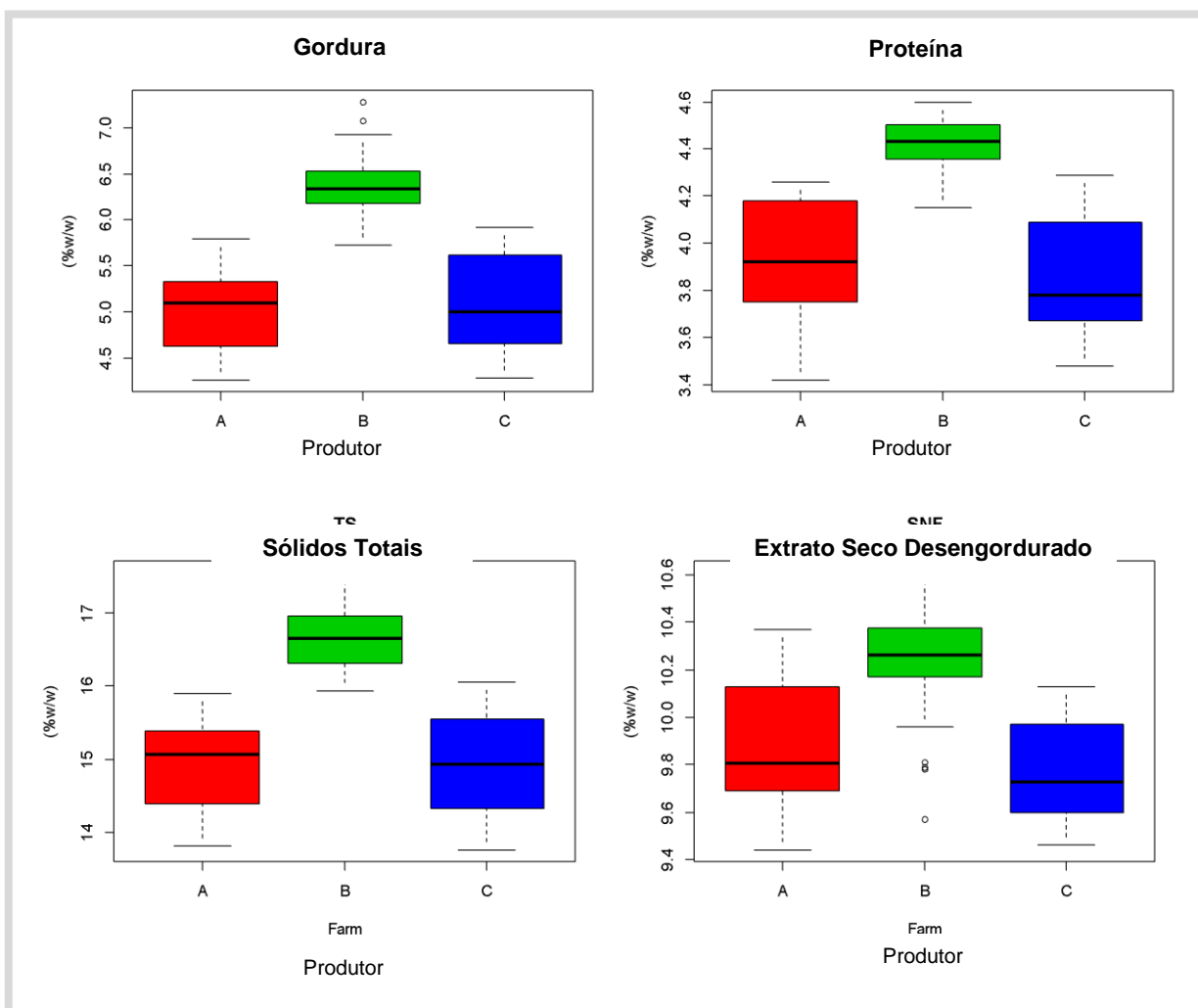


Figura 4. Distribuição das determinações físico-químicas (gordura, proteína, sólidos totais e sólidos desengordurados) em que o produtor B obteve uma média significativamente superior aos demais produtores ($p < 0,05$).

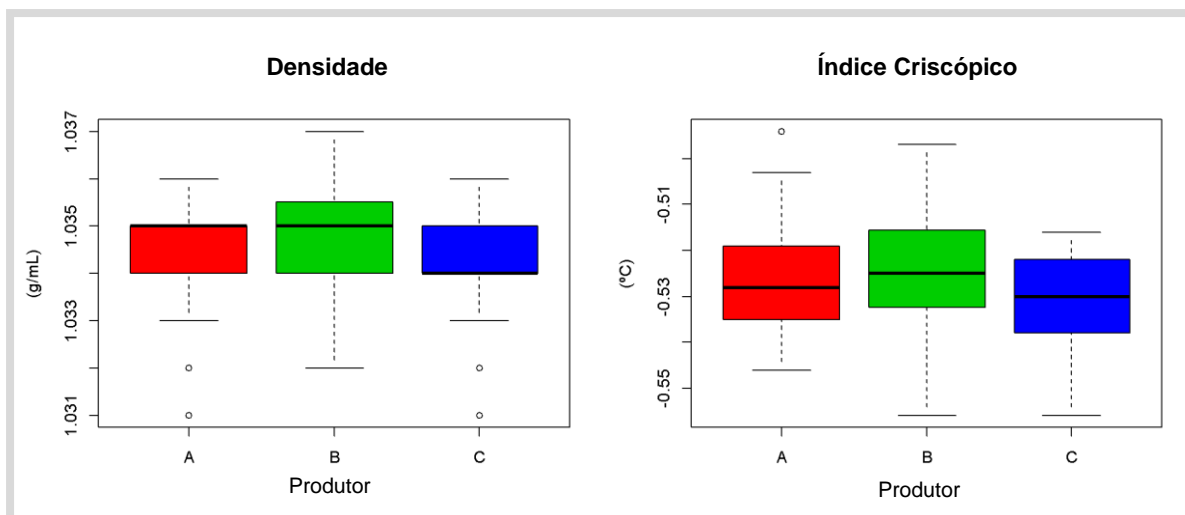


Figura 5. Distribuição das determinações físico-químicas (densidade e índice criscópico) em que não houve diferença significativa entre os três produtores ($\rho < 0,05$).

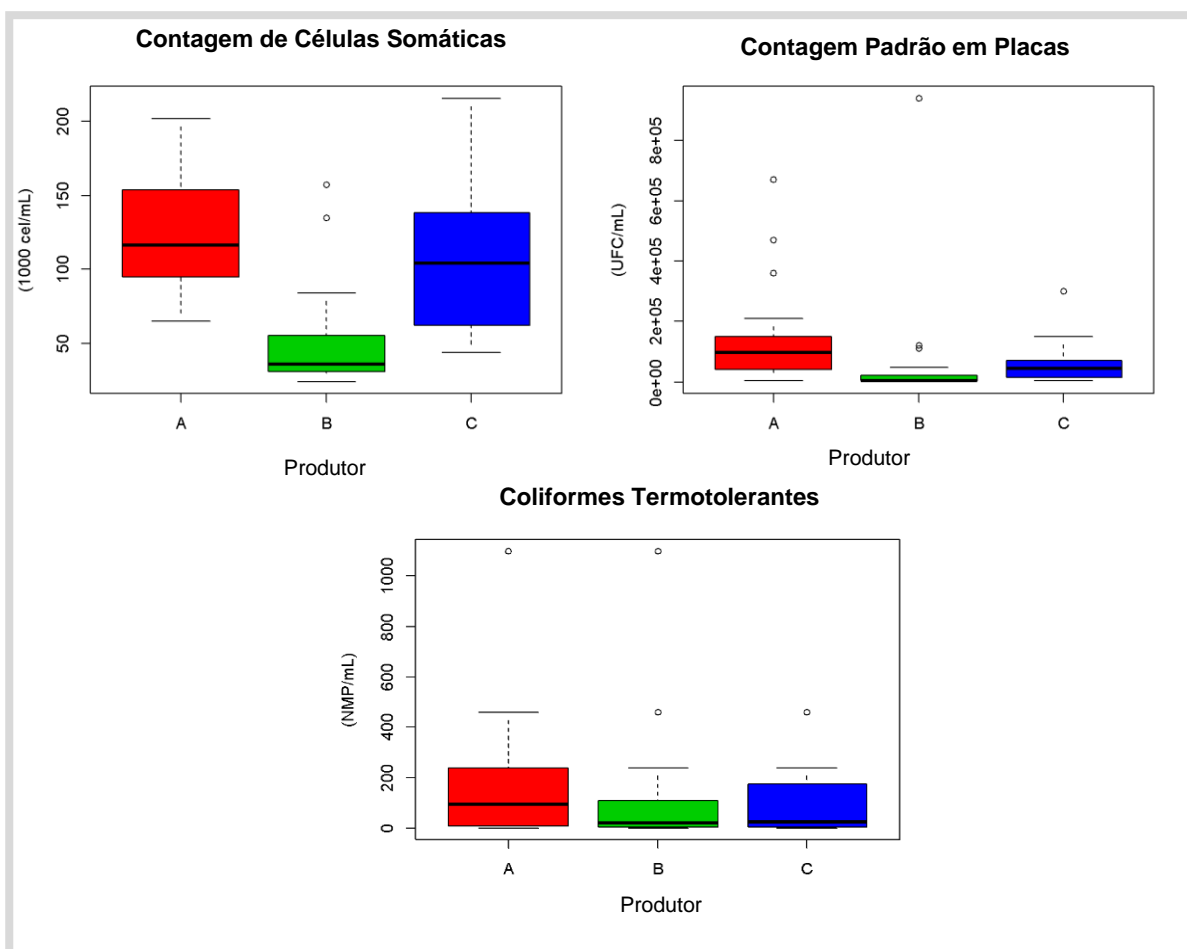


Figura 6. Distribuição das determinações microbiológicas e CCS para os três produtores ($\rho \geq 0,05$).

6. DISCUSSÃO GERAL

Esta Tese foi organizada na “forma de artigos”, conforme modelo disponibilizado pelo PPGMAA. O estudo foi dividido em três etapas, sendo cada uma delas correspondente a um artigo redigido, onde procurou-se responder aos objetivos propostos. Nesta seção de discussão geral estão apresentados os principais resultados e são discutidos os aspectos mais relevantes obtidos de cada um dos artigos.

O primeiro artigo apresentou as características físico-químicas e microbiológicas do leite de búfala destinado à produção de derivados no RS. Apesar de outros trabalhos trazerem a composição do leite bubalino, sabe-se que esses parâmetros podem variar conforme a localidade, o rebanho e as condições ambientais. O presente estudo foi o primeiro nesta região com essa abrangência de parâmetros e período de coleta. A divulgação desses dados aos produtores e ao laticínio permite maior controle sobre seus processos, buscando uma melhor padronização, qualidade e estabilidade do produto que chega ao consumidor. Além disso, tais dados podem subsidiar a formulação de um Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) específico para leite bubalino, atualmente inexistente no RS.

Neste estudo os conteúdos médios de gordura e proteína encontrados foram inferiores aos relatados em estudos realizados na Itália (Pesce et al., 2016; Pasquini et al., 2018) e nos EUA (Han et al., 2012), embora semelhantes aos estudos realizados no Egito (Elshaghabee et al., 2017) ou outras partes do Brasil (da Costa Filho et al., 2014; Bailone et al., 2017; Sales et al., 2018). A quantidade de ST foi próxima à dosagem encontrada em outros estudos no Brasil (da Costa Filho et al., 2014; Bailone et al., 2017; Sales et al., 2018), e inferior à dosagem descrito nos EUA (Han et al., 2012). Um elevado teor de ST é de grande interesse para a indústria, pois aumenta o rendimento na fabricação de derivados. Embora em expansão, a produção de leite bubalino no Brasil ainda é recente, o que justifica alguns índices de qualidade de produção inferiores (como ST, gordura e proteína) quando comparados rebanhos de búfalos estrangeiros que estão em um estágio de criação mais avançado. Os resultados para densidade, acidez e IC estão dentro do esperado e de acordo com o que já havia sido descrito em trabalhos anteriores (El-

Salam & El-Shibiny, 2011; Ahmad et al., 2013; Pesce et al., 2016; Sales et al., 2018). O teor de lactose determinado neste estudo foi ligeiramente superior aos achados em países como Egito (Elshaghabee et al., 2017) e Itália (Pesce et al., 2016; Pasquini et al., 2018). Em comparação com outros estudos no Brasil, nossos resultados foram superiores aos relatados por Bailone e colaboradores (2017) e Costa-Filho e colaboradores (2014), mas foram muito semelhantes aos relatados por Sales e colaboradores (2018). A dosagem de cálcio confirmou a alto teor de cálcio do leite bubalino descrito previamente (El-Salam & El-Shibiny, 2011; Ariota et al., 2016). Esse achado também é de interesse para a indústria, uma vez que a formação de uma massa de coalhada estruturalmente adequada depende da proporção de gordura, proteína e cálcio. Nenhum resíduo de antibiótico ou antiparasitário foi detectado nas amostras durante o período da pesquisa. Isso sugere que as propriedades seguem as recomendações legais.

Os parâmetros de CCS utilizados para bovinos podem não ser adequados para monitoramento de mastite em rebanhos de bubalinos (Amaral & Escrivão, 2005). Os baixos valores de CCS não indicaram necessariamente a ausência de infecção intramamária. Algumas particularidades relacionadas a características anatômicas do úbere e tetos, imunologia da glândula mamária e composição do leite de búfalas podem conferir maior resistência contra a mastite (Carvalho et al., 2007). Essas incluem: maior concentração de pigmentos de melanina, canal do teto com epitélio estratificado queratinoso mais espesso, camada muscular do esfíncter ao redor do canal do teto mais espessa e organizada, com maior tônus, mais rica em vasos sanguíneos e fibras nervosas, diâmetro menor do lúmen (Uppal et al., 1994), tipo de células e grau de atividade celular intramamária (Della Libera et al., 2004) maior atividade da enzima lactoperoxidase e maior concentração de lactoferrina no leite (Kapronezai, 2004). Em búfalas, Galiero & Morena, (2000) consideraram a CCS no leite normal entre 50×10^3 e 100×10^3 células/ml. Tripaldi e colaboradores (2010) sugerem que o leite de búfala não deve conter a CCS acima de 200×10^3 células/mL para garantir a qualidade da fabricação de queijos, principalmente a coagulação. O CCS médio neste estudo atendeu à essas recomendações e, comparado a outros estudos, foi semelhante ao descrito por Bailone e colaboradores (2017) e menor que o encontrado por Costa-Filho e colaboradores (2014) e por Pasquini e colaboradores (2018).

Avaliação microbiológica também afeta fabricação de derivados, uma vez que uma carga microbiana maior altera a coagulação da massa e a textura do queijo, gerando um resultado negativo no rendimento, menor durabilidade e alteração sensorial (Teixeira et al., 2005). Nossos resultados de CPP foram mais altos que alguns estudos (Figueiredo et al., 2010; Pasquini et al., 2018) ao mesmo tempo que foram semelhantes a outros trabalhos (Chye et al., 2004; da Costa Filho et al., 2014; Bailone et al., 2017; Sales et al., 2018). Em relação às análises microbiológicas de microrganismos patogênicos, não foi detectada a presença de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* em nenhuma das amostras. Em relação aos *Staphylococcus* coagulase-positivos, 36 (52%) das amostras analisadas foram positivas. Para a determinação de coliformes termotolerantes, a média foi de $1,6 \times 10^2$ NMP/mL, com valor máximo igual a $1,1 \times 10^3$ NMP/mL, alertando para a possibilidade de má higiene ou contaminação fecal. Embora esse leite seja posteriormente processado, a indústria de laticínios deve monitorar todos os processos tecnológicos, para assegurar que não ocorra a entrada de patógenos no ambiente de processamento. Esses cuidados visam garantir que não ocorra a formação de biofilmes com persistência desses patógenos, ou alguma falha na pasteurização, que poderiam resultar em subsequente contaminação dos produtos lácteos processados.

Como esperado, foi estabelecida uma correlação entre os valores de acidez, ST, valores de proteína e gordura. Curiosamente, também houve uma correlação significativa entre os valores de cálcio, proteína e sólidos totais. De acordo com Ahmad e colaboradores (2013), a maior parte do cálcio é encontrada na forma insolúvel, principalmente por causa do alto teor de caseína do leite de búfala. Por esse motivo, o leite com maior teor de proteína também apresenta maiores níveis de cálcio associados (Figura 3).

Comparamos os resultados obtidos, levando em consideração as incertezas dos métodos de análise, com os limites dos parâmetros de qualidade estabelecidos pela SSA/SP 24 (1994), única legislação para o leite de búfala disponível no Brasil. As amostras atenderam aos limites recomendados para os parâmetros ESD, acidez e índice crioscópico. Quanto ao teor de gordura, medida que mais sofre interferências e variações por fatores externos, a maioria das amostras atendeu o requisito. A faixa de densidade ideal preconizada pela SSA/SP

24 está entre 1,028 e 1,034 g/mL, a mesma descrita para o leite bovino. Algumas amostras deste estudo apresentaram valores acima dessa faixa, com o resultado médio próximo ao limite superior. No entanto, esse parâmetro proposto pelo SSA/SP 224 poderia ser facilmente questionado, pois, como mostrado neste estudo, o leite de búfala possui características próprias que o tornam mais denso que o leite bovino.

Na comparação entre a qualidade físico-química das amostras, a propriedade B apresentou média significativamente maior de gordura, proteína, ST, ESD e acidez do que as propriedades A e C (Figura 4). Este resultado é coerente, uma vez que se sabe que a acidez se correlaciona com o total de sólidos e gordura (Ahmad et al., 2013), relação que também foi demonstrada no presente trabalho (ver Figura 3). Densidade e IC não apresentaram diferença significativa entre as três propriedades (Figura 5). A propriedade B também apresentou maior qualidade higiênico-sanitária das amostras, com menores índices para CCS e CPP. O parâmetro microbiológico de coliformes termotolerantes não foi estatisticamente diferente entre as amostras (Figura 6).

Quando à sazonalidade, verificamos diferenças entre amostras para os parâmetros de proteína, ESD, lactose e densidade. Os níveis de ESD e proteína foram maiores no verão e primavera e menores no outono e inverno. Esses resultados corroboram os encontrados anteriormente por (da Costa Filho et al., 2014). Esses resultados foram analisados em conjunto com o volume médio de leite produzido em cada safra. É razoável pensar que valores mais elevados de ESD (g/100g) nas estações mais quentes estejam relacionados à menor produção de leite, aumentando a concentração desse componente no leite (Araújo et al., 2011). Pelo mesmo motivo, podemos explicar a densidade significativamente maior no verão em comparação com o outono. Ao contrário de outros estudos que não relataram uma diferença significativa nos níveis de lactose (Bailone et al., 2017; Pasquini et al., 2018), observamos que os resultados de verão e primavera de nossas amostras foram maiores que no outono. Deve-se levar em consideração que não foram considerados os possíveis efeitos do estágio de lactação.

O perfil lipídico do leite de búfala do sul do Brasil foi determinado por cromatografia gasosa, que permitiu detectar um total de nove ácidos graxos: seis SFA, dois MUFA e um PUFA. O ácido oleico (C18:1 *cis* ω9) foi o componente que

mais contribuiu para o perfil de ácidos graxos insaturados (MUFA + PUFA) e o ácido palmítico (C16:0) ao perfil de SFA em amostras de leite de búfala. O terceiro ácido graxo que mais contribuiu para o perfil geral foi o ácido esteárico (C18:0), o que pode ser atribuído à extensa biohidrogenação ruminal dos ácidos graxos C18:3, C18:2 e C18:1. Esse resultado parece ser positivo, pois parte do ácido esteárico é transformado em ácido oleico pela ação da enzima Δ -9 dessaturase, presente no leite (Corl et al., 2001).

O perfil de ácidos graxos do leite de ruminantes é influenciado pelos alimentos fornecidos aos animais, especialmente gramíneas e leguminosas frescas (Goes & Brabes, 2010; Bauman et al., 2011), bem como pelas características de solo e clima da região (Nabinger & Dall'Agnol, 2020). O RS, onde estão as três propriedades incluídas neste estudo, caracteriza-se por campos, com rica flora e variedade de solos, adaptáveis às variações no manejo animal e mudanças climáticas. Não se verificou diferença estatística para o perfil da maioria dos ácidos graxos entre as três propriedades, porém observou-se que propriedade C expressou menor IA e quantidades superiores de ácido linoleiládico. Silva & Nascimento Junior (2007) atribuem fundamental importância ao manejo de uma pastagem, o maior índice de área foliar remanescente. Assim, considerando que a base da alimentação nas três propriedades é a pastagem, rica em diferentes espécies de gramíneas e vegetais, pode-se inferir que o manejo dos animais em pastejo rotacionado, proporcionou uma melhor interação solo x planta x animal para a propriedade C. A possibilidade do uso do leite de búfala para fins de saúde, além da nutrição, abre um novo campo para os produtores e laticínio que podem explorar o controle de sua composição de ácidos graxos no leite bubalino, principalmente gerenciando a dieta dos animais.

As amostras de leite bubalino coletadas nos tanques de refrigeração quando cultivadas em meio de cultura Baird-Parker (BP) apresentaram colônias com morfologia bem diversificada. Optou-se por enumerar os estafilococos totais e não apenas os coagulase-positivos, para posteriormente isolar e confirmar as espécies. Nenhum estudo anterior enumerando estafilococos totais no leite de búfala está disponível. No entanto, nossos resultados, foram menores do que a contagem média descrita por Soares e colaboradores (2011) para leite bovino cru em Portugal. Outro estudo com leite de búfala cru na Turquia estimou contagens de estafilococos

coagulase positiva, especificamente, entre 10^2 e 10^4 UFC / mL (Saka & Gulel, 2018), intervalo semelhante ao encontrado no presente estudo para estafilococos totais. Considerando o critério de pelo menos 10^5 *S. aureus* por mL descrito por Hennekinne et al., (2012) e o fato deste leite de búfala cru ser posteriormente processado pela indústria de laticínios, estima-se um baixo risco de intoxicação alimentar no consumo de derivados. Em termos de legislação, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) não estabelece padrões microbiológicos para o leite cru, apenas para os lácteos prontos para serem oferecidos ao consumidor. Considerando o queijo como destino dessa matéria-prima, a IN 60 tolera contagens de estafilococos coagulase positiva até 10^3 UFC/g, classificando contagens de até 10^2 UFC/g como "Qualidade Aceitável" e contagens entre 10^2 e 10^3 como "Qualidade Intermediária". Além disso, a atualização recente desta legislação incluiu a necessidade de investigação clássica de EE em produtos lácteos, exigindo sua ausência (Anvisa, 2019a; 2019b).

No presente estudo, a biodiversidade da comunidade estafilocócica do leite de búfala cru no sul do Brasil foi avaliada por MALDI-TOF MS. A identificação de 304 isolados compreendeu 11 espécies diferentes. O isolado mais comum detectado no presente estudo, após *S. aureus*, foi *S. chromogenes*, também prevalente em estudos com cepas oriundas do leite de búfala (Pizauro et al., 2017) e cepas relacionadas à mastite subclínica em vacas (Thorberg et al., 2009). *S. epidermidis* e *S. warneri* são normalmente encontrados em pele sã de úberes ou nas mãos de ordenhadores e são considerados membros da microbiota bacteriana nessas regiões (Rall et al., 2014). *S. vitulinus* são colonizadores típicos de animais (Becker et al., 2014). *S. xylosus* e *S. sciuri* são considerados contaminantes ambientais (Soares et al., 2011). *S. saprophyticus* e *S. haemolyticus* são patógenos humanos que lideram as infecções do trato urinário inferior em mulheres jovens e infecções nosocomiais, respectivamente (Raz et al., 2005; Argemi et al., 2019).

A ocorrência de *S. aureus* em 36 (52%) entre 69 amostras foi superior aos 33,3% e 30% relatados anteriormente para o leite de búfala na Turquia (Pamuk et al., 2012; Saka & Gulel, 2018). Também foi superior a 17,5% relatado no Irã para leite cru de vaca, ovelha e cabra (Alian et al., 2012). Os estudos da epidemiologia molecular de *S. aureus* coletados do leite de búfala no Brasil ainda são muito escassos. No entanto, nossos resultados foram semelhantes aos encontrados por

Melo e colaboradores (2020) em leite bovino cru da região serrana de Santa Catarina. Nossos achados indicaram uma alta prevalência de *S. aureus* no leite de búfala a granel, cujas principais fontes de contaminação são o animal infectado e as condições de higiene inadequadas durante a ordenha ou armazenamento (Spanu et al., 2012).

Estimamos uma prevalência de 50 (47,62%) de isolados de *S. aureus* com potencial enterotoxigênico pela detecção de um dos genes relacionados às enterotoxinas clássicas, sendo *sea* o mais frequentemente observado. Da mesma forma, Bianchi et al. (2014) encontraram 53% de *S. aureus*, isolados de leite e laticínios na Itália, positivos para um ou mais dos 11 genes SE testados, sendo *sed* o mais frequentemente observado. Osman et al., (2020) detectaram genes relacionados à enterotoxina em 88,1% dos isolados de *S. aureus* de leite de búfala e leite de vaca no Egito, sendo *sec* o mais frequentemente observado. Asiiimwe e colaboradores (2017) encontraram uma prevalência de 90,2% de *S. aureus* carregando pelo menos um dos oito genes de enterotoxinas avaliados em amostras de leite bovino cru de Uganda, porém os genes mais frequentemente observados foram *sem*, *sei* e *sec*. Estudos anteriores no Brasil detectaram genes enterotoxigênicos em 40% (Moura et al., 2019) e 15,51% (Melo et al., 2020) de cepas de *S. aureus* isoladas de leite de búfala e seus derivados, originárias do estado do Rio Grande do Norte (RN) na região Nordeste e de Santa Catarina (SC) na região Sul, respectivamente. A prevalência de isolados de *S. aureus* produtores de enterotoxina em amostras de leite e a frequência de genes clássicos relacionados à enterotoxina difere entre os estudos. Isso pode ser devido a diferenças na fonte de amostragem e diferenças geográficas. Trabalhos em todo o mundo relatam a maior prevalência de *sea* em *S. aureus* isolados de alimentos e relacionados em surtos de intoxicação alimentar (Asao et al., 2003; Hennekinne et al., 2010; Denayer & Delbrassinne, 2017). Embora a presença de um gene de enterotoxina não seja uma indicação válida da expressão da proteína, a PCR pode ser uma ferramenta valiosa de triagem para isolados e matrizes alimentares, e pode dar uma indicação se existe uma probabilidade da presença de enterotoxina em um produto alimentar. Pereira e colaboradores (2009) encontraram uma correlação de 80% entre a detecção de toxinas. Além disso, a PCR é adequada para genes recentemente descritos para os quais nenhum método de detecção de EE existe até o momento.

O percentual determinado de cepas *S. aureus* multirresistentes isoladas (30%) é semelhante ao descritos por Alian e colaboradores (2012), para leite cru de bovinos, ovinos e caprinos (34,8%), e por Osman e colaboradores (2020), para leite cru de búfala e de vaca (35,7%). Os agentes antimicrobianos para os quais os isolados revelaram maior taxa de resistência contra penicilina G, cefoxitina, clindamicina, tetraciclina e eritromicina, semelhante ao observado por Osman e colaboradores (2020). Entre os agentes antimicrobianos que se mostraram efetivos, os resultados vão ao encontro do previamente estabelecido. As bactérias Gram-positivas são geralmente suscetíveis a cloranfenicol e ciprofloxacina, drogas menos usadas na medicina veterinária (Lee, 2003; Gündogan et al., 2006; Pereira et al., 2009). A presença de bactérias resistentes a antibióticos em alimentos de origem animal justifica investigações adicionais sobre o papel dos antibióticos quando eles são usados para fins terapêuticos ou como promotores de crescimento em animais produtores de alimentos (Andreoletti et al., 2008; EFSA, 2012; Founou et al., 2016). No entanto, nenhum resíduo de antibiótico e antiparasitário foi detectado nas mesmas amostras de leite de búfala em trabalho anterior (Godinho et al., 2020 – Artigo 1). Esses resultados indicam a que difusão de genes antimicrobianos na população bacteriana das propriedades pode resultar em bactérias resistentes aos antimicrobianos, inclusive habitando animais onde os antimicrobianos nunca são usados. Da mesma forma, o contato direto ou o consumo de leite antes do tratamento térmico aumenta a disseminação de genes resistentes a antibióticos em *S. aureus* para humanos (McKay, 2008). Esse problema de contaminação pode ser tratado melhorando as condições de higiene e o manejo cuidadoso dos animais durante a ordenha.

A resistência à oxacilina (cefotaxima) de 16 (32%, n = 50) isolados de *S. aureus* observada no presente estudo, sem o gene *mecA*, pode ser explicada por outros mecanismos de resistência (Hiramatsu et al., 2013). Trabalhos também mostraram a ausência do gene *mecA* em *S. aureus* isolado de leite de vaca na região Nordeste do Brasil (Silva et al., 2020), de queijo de ovelha cru na Itália (Spanu et al., 2012) e de vários alimentos em Portugal (Pereira et al., 2009). A primeira hipótese sugere um mecanismo menos comum de resistência à meticilina/oxacilina, o "*boderline oxacillin-resistant Staphylococcus aureus*" (BORSA), caracterizado pela hiperprodução de β -lactamases ou o "*modified*

penicillin-binding protein Staphylococcus aureus" (MODSA), que produzem proteínas modificadas de ligação à penicilina. Ambos BORSA e MORSA têm afinidade variável para beta-lactâmicos e falta do gene *mecA* (Nadarajah et al., 2006). A segunda hipótese infere que tais isolados são portadores de uma forma divergente do gene *mecA* denominado *mecC*, que também confere resistência a β -lactâmicos estáveis (Becker et al., 2014; Paterson et al., 2014). Uma terceira hipótese relatada na literatura, observa que a maioria dos isolados de *S. aureus* recuperados de humanos ou bovinos (neste caso búfalos) representam conjuntos geneticamente distintos de grupos clonais com evidência de especialização do hospedeiro, sendo os ensaios convencionais de PCR para o gene *mecA* inadequados para isolados de *S. aureus* recuperados de búfalos (Melo et al., 2014).

7. CONCLUSÃO

O presente estudo foi a primeira verificação contínua, ao longo de um ano, dessa gama de parâmetros físico-químicos e microbiológicos envolvendo os três produtores de leite bubalino cru destinado a produção de derivados no Estado do RS. A matéria prima avaliada apresentou características físico-químicas e microbiológicas satisfatórias e de acordo com a literatura revisada. A divulgação da composição característica do leite bubalino nessa região permite que a indústria de derivados tenha maior controle sobre a eficiência da produção e melhor padronização das características físicas, químicas e organolépticas do queijo produzido, garantindo assim qualidade ao consumidor. Ademais, tais dados podem subsidiar a formulação de regulamentação técnica específica ainda inexistente no estado do RS.

A análise do perfil lipídico realizada retratou que o leite de búfala representa uma boa fonte de ácidos graxos desejáveis para humanos. A utilização do leite de búfala para fins de saúde, além da nutrição, abre um novo campo para os produtores explorarem o controle de sua composição de ácidos graxos do leite bubalino, principalmente através do manejo e dieta dos animais.

Este estudo mostrou que as amostras de leite de búfala a granel estavam contaminadas com cepas de *S. aureus* enterotoxigênicas, multirresistentes, mas não portadoras do gene *mecA*. Esses achados são significativos do ponto de vista epidemiológico e enfatizam a necessidade de realizar estudos maiores para monitorar também possíveis fontes de contaminação do leite de búfala a granel. Embora nossos resultados indiquem um baixo risco de intoxicação alimentar devido ao consumo de derivados do leite de búfala produzidos no RS, é importante considerar o potencial risco à saúde. Apesar de a presença de *S. aureus* enterotoxigênico no leite cru de búfala não obrigue a ocorrência de toxinas, ele pode ser excretado no leite e permanecer estável nos laticínios para consumo. A medida chave na prevenção da intoxicação estafilocócica associada ao consumo de derivados de leite bubalino é minimizando as fontes de contaminação e evitando qualquer interrupção da cadeia de frio durante o armazenamento e processamento do leite de búfala a granel.

8. REFERÊNCIAS

- ABCB – Associação Brasileira de Criadores de Búfalos. Disponível em: <<https://bufalo.com.br/home/>>. Acesso 20 out. 2021.
- Abdeen EE., Mousa WS., Abdel Salam SY., Al-Maary KS., Mubarak AS., Moussa IM., Hemeg HA., Almuzaini AM., Alajaji Al., Alsubki RA., Elbehiry A. 2020. Antibioqram and phylogenetic diversity of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains from milk products and public health implications. Saudi J Biol Sci 27:1968–1974.
- Abdi RD., Gillespie BE., Vaughn J., Merrill C., Headrick SI., Ensermu DB., D’Souza DH., Agga GE., Almeida RA., Oliver SP., Kerro Dego O. 2018. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolates from dairy cows and genetic diversity of resistant isolates. Foodborne Pathog Dis 15:449–458.
- 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. J Anim Plant Sci 23:62–74.
- Alian F., Rahimi E., Shakerian A., Momtaz H., Riahi M., Momeni M. 2012. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine, sheep and goat raw milk. Glob Vet 8:111–114.
- de Almeida CC., Pizauro LJL., Soltes GA., Slavic D., de Ávila FA., Pizauro JM., MacInnes JI. 2018. Some coagulase negative *Staphylococcus* spp. isolated from buffalo can be misidentified as *Staphylococcus aureus* by phenotypic and Sa442 PCR methods. BMC Res Notes 11:4–9.
- Amaral FR., Carvalho LB., Silva N., Brito JRF. 2005. Qualidade do leite de búfalas: composição. Rev Bras Reprod Anim 29:106–110.
- Amaral FR., Escrivão SC. 2005. Aspectos relacionados à búfala leiteira. Rev Bras Reprodução Anim 29:111–117.
- Andreoletti O., Budka H., Buncic S., Colin P., Collins JD., De A., Griffin J., Havelaar A., Hope J., Klein G., Kruse H., Magnino S., López AM., Mclauchlin J., Nguyenthé C., Noeckler K., Noerrung B., Maradona MP., Roberts T., Vågsholm I., Vanopdenbosch E. 2008. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the European Food Safety Authority on foodborne antimicrobial resistance as a biological hazard. EFSA J 765:1–87.
- Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2001. RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Brasília: Ministério da Saúde.
- Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2008. Banco de Leite Humano: Funcionamento, Prevenção e Controle de Riscos. Brasília: Anvisa, Ministério da Saúde. 160p.
- Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2019a. IN nº60, de 23 de dezembro de 2019. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. Brasília: Ministério da Saúde.
- Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2019b. RDC nº 331, de 23 de dezembro de 2019. Dispõe sobre os padrões microbiológicos de alimentos e sua aplicação. Brasília: Ministério da Saúde.
- AOAC 991.25 - Association of Official Analytical Chemists. 2002. Ca, Mg and P in cheese. Official Methods of Analysis of AOAC International, 20^a ed. vol II. Washington, DC: AOAC International.
- AOCS – American Oil Chemists’ Society. 2009. Official methods and recommended

- practices of the American Oil Chemists' Society. Urbana, IL: AOCS Press.
- Araújo T., Rangel A., Soares A., Lima T., Júnior DL., Novaes L. 2011. Influência das estações do ano sobre a composição do leite de búfalas mantido em tanque de resfriamento. *Agrop Científ Semiárido* 7:1–5.
- Argemi X., Hansmann Y., Prola K., Prévost G. 2019. Coagulase-negative staphylococci pathogenomics. *Int J Mol Sci* 20:1–19.
- Argudín MA., Mendoza MC., González-Hevia MA., Bances M., Guerra B., Rodicio MR. 2012. Genotypes, exotoxin gene content, and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* strains recovered from foods and food handlers. *Appl Environ Microbiol* 78:2930–2935.
- Argudín MÁ., Mendoza MC., Rodicio MR. 2010. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins* 2:1751–1773.
- Ariota B., Campanile G., Potena A., Napolano R., Gasparini B., Neglia GL., Di Palo R. 2016. Ca and P in buffalo milk: curd yield and milk clotting parameters. *Ital J Anim Sci* 6:497–499.
- Asao T., Kumeda Y., Kawai T., Shibata T., Oda H., Haruki K., Nakazawa H., Kozaki S. 2003. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiol Infect* 130:33–40.
- Ascribu – Associação Sulina de Criadores de Búfalos. Disponível em: <<https://ascribu.com.br/>>. Acesso 20 out. 2021.
- Asiimwe BB., Baldan R., Trovato A., Cirillo DM. 2017. Prevalence and molecular characteristics of *Staphylococcus aureus*, including methicillin resistant strains, isolated from bulk can milk and raw milk products in pastoral communities of South-West Uganda. *BMC Infect Dis* 17:1–8.
- Bailone RL., Borra RC., Roça R de O., de Aguiar L., Harris M. 2017. Quality of refrigerated raw milk from buffalo cows (*Bubalus bubalis bubalis*) in different farms and seasons in Brazil. *Cienc Anim Bras* 18:1–12.
- Barreto F., Ribeiro C., Hoff RB., Costa TD. 2016. Determination of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in poultry, swine, bovine and fish by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1449:48–53.
- Bassbasi M., Platikanov S., Tauler R., Oussama A. 2014. FTIR-ATR determination of solid non fat (SNF) in raw milk using PLS and SVM chemometric methods. *Food Chem* 146:250–254.
- Bauer AW., Kirby WMM., Sherris JC., Turck M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 36:493–496.
- Bauman DE., McGuire MA., Harvatin KJ. 2011. Mammary Gland, Milk Biosynthesis And Secretion. *Encycl Dairy Sci*:352–358.
- Becker K., Ballhausen B., Köck R., Kriegeskorte A. 2014. Methicillin resistance in *Staphylococcus* isolates: The “mec alphabet” with specific consideration of *mecC*, a mec homolog associated with zoonotic *S. aureus* lineages. *Int J Med Microbiol* 304:794–804.
- Benjamin S., Prakasan P., Sreedharan S., Wright AG., Spener F. 2015. Pros and cons of CLA consumption: an insight from clinical evidences. *Nutrition & Metabolism* 12: 1-20.
- Bergdoll MS., Robbins RN. 1973. Characterization of types of staphylococcal enterotoxins. *J Food Milk Technol* 36:610–612.
- Bi Y., Wang YJ., Qin Y., Vallverdú RG., García JM., Sun W., Li S., Cao ZC. 2016. Prevalence of bovine mastitis pathogens in bulk tank milk in China. *PLoS One*

- 11:1–13.
- Bianchi DM., Gallina S., Bellio A., Chiesa F., Civera T., Decastelli L. 2014. Enterotoxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products in Italy. *Lett Appl Microbiol* 58:190–196.
- Brillinger D. 1984. *The Collected Works of John W. Tukey*. Monterey: Springer.
- Brown K., Mugoh M., Call DR., Omulo S. 2020. Antibiotic residues and antibiotic-resistant bacteria detected in milk marketed for human consumption in Kibera, Nairobi. *PLoS One* 15:1–8.
- Caldeira LA., Ferrão SPB., Fernandes SA de A., Magnavita APA., Tayse Dantas Rebouças Santos. 2010. Índices de qualidade nutricional da fração lipídica do leite de búfalas da raça Murrah produzido em diferentes fases de lactação. Nutritional quality indexes of lipid fraction of milk of Murrah buffalo, produced at different stages of lactation. *Rev Inst Adolfo Lutz* 69:545–554.
- Carvalho LB., Amaral FR., Brito MAVP., Lange CC., Brito JRF., Leite RC. 2007. Contagem de células somáticas e isolamento de agentes causadores de mastite em búfalas (*Bubalus bubalis*). *Arq Bras Med Veterinária e Zootec* 59:242–245.
- Castro A., Silva J., Teixeira P. 2018. *Staphylococcus aureus*, a food pathogen: virulence factors and antibiotic resistance. In: *Foodborne Diseases*. Elsevier Inc., 213–238.
- Chieffi D., Fanelli F., Cho GS., Schubert J., Blaiotta G., Franz CMAP., Bania J., Fusco V. 2020. Novel insights into the enterotoxigenic potential and genomic background of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk. *Food Microbiol* 90:103482.
- Chye FY., Abdullah A., Ayob MK. 2004. Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. *Food Microbiol* 21:535–541.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standard Institute. 2020. Performance Standard for Antimicrobial Suscetibility Testing. 30^a ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: CLSI.
- Coenye T., Lipuma JJ. 2002. Use of the *gyrB* gene for the identification of *Pandoraea* species. *FEMS Microbiol Lett* 208:15–19.
- Coperbúfalo. Disponível em <<https://cooperbufalo.com.br/>>. Acesso 20 out. 2021.
- Corl BA., Baumgard LH., Dwyer DA., Griinari JM., Phillips BS., Bauman DE. 2001. The role of $\Delta 9$ -desaturase in the production of cis-9, trans-11 CLA. *J Nutr Biochem* 12:622–630.
- da Costa Filho MH., de Lima Júnior DM., Rangel AHN., Silva FJS da., Novaes LP., Galvão Júnior JGB., Silva MJM dos S., Moreno GMB. 2014. Sazonalidade e variação na qualidade do leite de búfalas no Rio Grande do Norte. *Acta Vet Bras* 8:201–208.
- Cremonesi P., Zottola T., Locatelli C., Pollera C., Castiglioni B., Scaccabarozzi L., Moroni P. 2013. Identification of virulence factors in 16S-23S rRNA intergenic spacer genotyped *Staphylococcus aureus* isolated from water buffaloes and small ruminants. *J Dairy Sci* 96:7666–7674.
- Denayer S., Delbrassinne L. 2017. Food-borne outbreak investigation and molecular typing: high diversity of *Staphylococcus aureus* strains and importance of toxin detection. *Toxins* 9:1–13.
- Doyle ME., Hartmann FA., Wong ACL. 2012. Methicillin-resistant staphylococci: Implications for our food supply? *Anim Heal Res Rev* 13:157–180.
- EFSA - European Food Safety Authority. 2012. Technical specifications on the harmonised monitoring and reporting of antimicrobial resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in food-producing animals and food.

- EFSA - European Food Safety Authority. 2016. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and foodborne outbreaks in 2015.
- El-Salam MHA., El-Shibiny S. 2011. A comprehensive review on the composition and properties of buffalo milk. *Dairy Sci Technol* 91:663–699.
- Elshaghabee F., Abdel-Hamid MI., Walte H-G. 2017. A Survey on selected quality parameters of buffalo milk samples collected from consumer markets of three different central governorates in Egypt. *Milk dairy Prod Hum Nutr* 70:25–29.
- Evenson ML., Ward Hinds M., Bernstein RS., Bergdoll MS. 1988. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. *Int J Food Microbiol* 7:311–316.
- Facchin S., Barbosa AC., Carmo LS., Silva MCC., Oliveira AL., Morais PB., Rosa CA. 2013. Yeasts and hygienic-sanitary microbial indicators in water buffalo mozzarella produced and commercialized in Minas Gerais, Brazil. *Brazilian J Microbiol* 44:701–707.
- Figueiredo EL., Lourenço Júnior J de B., Toro MJU. 2010. Physical-chemical and microbiological characterization of buffalo milk “in natura” produced in the state of Para. *Rev Bras Tecnol Agroind* 4:19–28.
- Founou LL., Founou RC., Essack SY. 2016. Antibiotic resistance in the food chain: a developing country-perspective. *Front Microbiol* 7:1–19.
- FSAI - Food Safety Authority of Ireland. 2011. *Staphylococcus aureus*. Disponível em < <https://www.fsai.ie/Staphylococcus aureus.html>>. Acesso 20 nov 2021.
- Galiero G., Morena C. 2000. The meaning of the somatic cell count in buffalo milk. *Bubalus bubalis* 6:26–27.
- Garaffo MA., Vassallo-Agius R., Nengas Y., Lembo E., Rando R., Maisano R., Dugo G., Giuffrida D. 2011. Fatty acids profile, atherogenic (IA) and thrombogenic (IT) health lipid indices, of raw roe of blue fin tuna (*Thunnus thynnus* L.) and their salted product “bottarga.” *Food Nutr Sci* 2:736–743.
- Gargouri A., Hamed H., Elfeki A. 2013. Analysis of raw milk quality at reception and during cold storage: Combined effects of somatic cell counts and psychrotrophic bacteria on lipolysis. *J Food Sci* 78:1405–1411.
- Godinho FMS., Krug M., Figueiredo RP., Müller A., Jank L., Tomaszewski CA., Hillesheim DR., Kinast ÉJ., Frazzon APG., Motta AS. 2020. Microbiological and physicochemical characteristics of buffalo milk used for dairy products in southern Brazil. *J Dairy Res* 87:463–468.
- Goes RH de T e B de., Brabes KC da S. 2010. Ácido linoléico conjugado (CLA) e a síndrome do baixo teor de gordura do leite. *PUBVET* 4.
- Goh S-H., Byrne SK., Zhang JL., Chow AW. 1992. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* on the basis of coagulase gene polymorphisms. *J Clin Microbiol* 30:1642–1645.
- Guillier L., Bergis H., Guillier F., Noel V., Auvray F., Hennekinne J-A. 2016. Dose-response Modelling of Staphylococcal Enterotoxins Using Outbreak Data. *Procedia Food Sci* 7:129–132.
- Gündogan N., Citak S., Turan E. 2006. Slime production, DNase activity and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk, pasteurised milk and ice cream samples. *Food Control* 17:389–392.
- Gutiérrez D., Delgado S., Vázquez-Sánchez D., Martínez B., Cabo L., Rodríguez A., Herrera JJ., García P. 2012. Incidence of *Staphylococcus aureus* and Analysis of Associated. *Appl Environ Microbiol* 78:8547–8554.

- Hammad AM., Watanabe W., Fujii T., Shimamoto T. 2012. Occurrence and characteristics of methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from Japanese retail ready-to-eat raw fish. *Int J Food Microbiol* 156:286–289.
- Han X., Lee FL., Zhang L., Guo MR. 2012. Chemical composition of water buffalo milk and its low-fat symbiotic yogurt development. *Funct Foods Heal Dis* 2012 2:86–106.
- Hennekinne JA., De Buyser ML., Dragacci S. 2012. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiol Rev* 36:815–836.
- Hennekinne JA., Ostyn A., Guillier F., Herbin S., Pruger AL., Dragacci S. 2010. How should staphylococcal food poisoning outbreaks be characterized? *Toxins* 2:2106–2116.
- Hiramatsu K., Ito T., Tsubakishita S., Sasaki T., Takeuchi F., Morimoto Y., Katayama Y., Matsuo M., Kuwahara-Arai K., Hishinuma T., Baba T. 2013. Genomic basis for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Infect Chemother* 45:117–136.
- Hu DL., Nakane A. 2014. Mechanisms of staphylococcal enterotoxin-induced emesis. *Eur J Pharmacol* 722:95–107.
- IDF – International Dairy Federation. Bulletin of the IDF N° 512/2021: The World Dairy Situation 2021. Brussels, Belgium: IDF; 2021. Disponível em: <https://fil-idf.org/publications/bulletin/bulletin-of-the-idf-n-512-2021-the-world-dairy-situation-2021/>. Acesso em 20 out. 2021.
- Ikeda T., Tamate N., Yamaguchi K., Makino SI. 2005. Mass outbreak of food poisoning disease caused by small amounts of staphylococcal enterotoxins A and H. *Appl Environ Microbiol* 71:2793–2795.
- ISO 6579-1 – International Organization for Standardization. 2017. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* - Part 1: Detection of *Salmonella* spp. Geneva: Switzerland.
- ISO 6888-1 – International Organization for Standardization. 1999. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) - Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium. Geneva: Switzerland.
- ISO 11290-1 – International Organization for Standardization. 2017. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. - Part 1: Detection method. Geneva: Switzerland.
- ISO 7251 – International Organization for Standardization. 2005. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of presumptive *Escherichia coli* - Most probable number technique. Geneva: Switzerland.
- ISO 4833-1 – International Organization for Standardization. 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. Geneva: Switzerland.
- ISO 9622 – International Organization for Standardization. 2013. Milk and liquid milk products - Guidelines for the application of mid-infrared spectrometry. Geneva: Switzerland.
- ISO 13366-2 – International Organization for Standardization. 2006. Milk and liquid milk products - Enumeration of somatic cells - Part 2: Guidance on the operation

- of fluoroopto-electronic counters. Genebra: Swizerland.
- Jank L., Martins MT., Arsand JB., Campos Motta TM., Hoff RB., Barreto F., 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. *J anim Sci* 12:521–537.
- Kapronezai J. 2004. Estudo de provas microbiológicas e celulares em amostras de leite provenientes de fêmeas *bubalisnas* (*Bubalus bubalis*) no Estado de São Paulo. :84.
- Kérouanton A., Hennekinne JA., Letertre C., Petit L., Chesneau O., Brisabois A., De Buyser ML. 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *Int J Food Microbiol* 115:369–375.
- Khaniki J. 2007. Chemical Contaminants in Milk and Public Health Concerns: A Review. *Int J Dairy Sci* 2:104–115.
- Khedkar CD., Kalyankar SD., Deosarkar SS. 2015. Buffalo Milk. In: *Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier Inc., 522–528.
- Koba K., Yanagita T. 2013. Health benefits of conjugated linoleic acid (CLA). *Obes Res Clin Pract*.
- Kümmel J., Stessl B., Gonano M., Walcher G., Bereuter O., Fricker M., Grunert T., Wagner M., Ehling-Schulz M. 2016. *Staphylococcus aureus* entrance into the Dairy Chain: Tracking *S. aureus* from dairy cow to cheese. *Front Microbiol* 7:1–11.
- Lakhundi S., Zhang K. 2018. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clin Microbiol Rev* 31:1–103.
- Lee JH. 2003. Methicillin (oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *Appl Environ Microbiol* 69:6489–6494.
- Della Libera AMMP., Araujo WP de., Kitamura SS., Rosenfeld AMF., Birgel EH. 2004. Citologia do leite de búfalas (*Bubalus bubalis*) hígidas criadas no Estado de São Paulo, Brasil. *Ciência Rural* 34:1087–1092.
- Lira MC., Givisiez PEN., Sousa, Geovânia Canafístula de F., Magnani M., Souza EL de., Spricigo DA., Gebreyes WA., Oliveira CJB de. 2016. Original Article Biofilm-forming and antimicrobial resistance traits of staphylococci isolated from goat dairy plants. *J Infect Dev Ctries* 10:932–938.
- Liu H., Li S., Meng L., Dong L., Zhao S., Lan X., Wang J., Zheng N. 2017. Prevalence, antimicrobial susceptibility, and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from dairy herds in northern China. *J Dairy Sci* 100:8796–8803.
- Le Loir Y., Baron F., Gautier M. 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet Mol Res* 2:63–76.
- MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2018. IN nº 77, de 26 de novembro de 2018. Brasília: MAPA
- Mcclure J., Conly JM., Lau V., Elsayed S., Louie T., Hutchins W., Zhang K. 2006. Novel multiplex PCR assay for detection of the staphylococcal virulence marker

- panton-valentine leukocidin genes and simultaneous discrimination of methicillin-susceptible from -resistant staphylococci. *J Clin Microbiol* 44:1141–1144.
- McKay AM. 2008. Antimicrobial resistance and heat sensitivity of oxacillin-resistant, *Bubalus bubalis*-positive *Staphylococcus* spp. from unpasteurized milk. *J Food Prot* 71:186–190.
- Mcmillan K., Moore SC., Mcauley CM., Fegan N., Fox EM. 2016. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from raw milk sources in Victoria, Australia. *BMC Microbiol*:1–12.
- Melo DA de., Coelho I da S., Motta CC da., Rojas ACCM., Dubenczuk FC., Coelho SMO., Souza MMS. 2014. Impairments of mec A gene detection in bovine *Staphylococcus* spp. *Brazilian J Microbiol* 45:1075–1082.
- Melo FD., Sfaciotte RAP., Dalmina KA., Wildemann P., Parussolo L., Wosiacki SR., Da Costa UM., Ferraz SM. 2020. Enterotoxigenic potential of *Staphylococcus* spp. isolates recovered from raw milk and artisanal cheese. *An Acad Bras Cienc* 92:1–7.
- Minervino AHH., Zava M., Vecchio D., Borghese A. 2020. *Bubalus bubalis*: A Short Story. *Front. Vet. Sci.* 7: 1-15.
- Molkentin J. 1999. Bioactive lipids naturally occurring in bovine milk. *Nahrung - Food* 43:185–189.
- Monistero V., Graber HU., Pollera C., Cremonesi P., Castiglioni B., Bottini E., Ceballos-Marquez A., Lasso-Rojas L., Kroemker V., Wente N., Petzer I-M., Santisteban C., Runyan J., Santos MV dos., Alves BG., Piccinini R., Bronzo V., Abbassi MS., Said M Ben., Moroni P. 2018. *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in eight countries: genotypes, detection of genes virulence genes. *Toxins* 10:1–22.
- Moura TM., Campos FS., d’Azevedo PA., Van Der Sand ST., Franco AC., Frazzon J., Frazzon APG. 2012. Prevalence of enterotoxin-encoding genes and antimicrobial resistance in coagulase-negative and coagulase-positive *Staphylococcus* isolates from black pudding. *Rev Soc Bras Med Trop* 45:579–585.
- Moura EO., Rangel AHN., Macêdo CS., Urbano SA., Novaes LP., Lima Júnior DM. 2019. Enterotoxin-encoding genes in *Staphylococcus aureus* from buffalo milk. *Pesqui Vet Bras* 39:587–591.
- MS – Ministério da Saúde. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil – Informe 2018. Brasília: MS; 2018. Disponível em: <<https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2019/maio/17/Apresentacao-Surtos-DTA-Maio-2019.pdf>>. Acesso 20 out. 2021.
- Nabinger C., Dall’Agnol M. 2020. Guia para Reconhecimento de espécies dos Campos Sulinos. Brasília: Ibama.
- Nadarajah J., Lee MJS., Louie L., Jacob L., Simor AE., Louie M., MCGavin MJ. 2006. Identification of different clonal complexes and diverse amino acid substitutions in penicillin-binding protein 2 (PBP2) associated with borderline oxacillin resistance in Canadian *Staphylococcus aureus* isolates. *J Med Microbiol* 55:1675–1683.
- Necidova L., Bogdanovicova K., Harustiakova D., Bartova K. 2016. Short communication: Pasteurization as a means of inactivating staphylococcal enterotoxins A, B, and C in milk. *J Dairy Sci* 99:8638–8643.
- Nunes RSC., Souza CP., Pereira KS., Del Aguila EM., Paschoalin VMF. 2016. Identification and molecular phylogeny of coagulase-negative staphylococci isolates from Minas Frescal cheese in southeastern Brazil: Superantigenic toxin

- production and antibiotic resistance. *J Dairy Sci* 99:2641–2653.
- Olivier SP., Jayarao BM., Almeida RA. 2005. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. *Foodborne Pathog Dis* 2:115–137.
- Osman K., Alvarez-Ordóñez A., Ruiz L., Badr J., ElHofy F., Al-Maary KS., Moussa IMI., Hessain AM., Orabi A., Saad A., Elhadidy M. 2017. Antimicrobial resistance and virulence characterization of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci from imported beef meat. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 16:1–10.
- Osman KM., Pires ÁDS., Franco OL., Orabi A., Hanafy MH., Marzouk E., Hussien H., Alzaben FA., Almuzaini AM., Elbehiry A. 2020. Enterotoxigenicity and antibiotic resistance of coagulase-negative staphylococci isolated from raw buffalo and cow milk. *Microb Drug Resist* 26:520–530.
- Ostyn A., de Buyser ML., Guillier F., Groult J., Félix B., Salah S., Delmas G., Hennekinne JA. 2010. First evidence of a food poisoning outbreak due to staphylococcal enterotoxin type E, France, 2009. *Eurosurveillance* 15:10–13.
- Palmquist DL., Beaulieu AD., Barbano DM. 1993. Feed and animal factors influencing milk fat composition. *J Dairy Sci* 76:1753–1771.
- Pamuk S., Yildirim Y., Seker E., Gurler Z., Kara R. 2012. A survey of the occurrence and properties of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus intermedius* in water buffalo milk and dairy products in Turkey. *Int J Dairy Technol* 65:416–422.
- 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.
- Paterson GK., Harrison EM., Holmes MA. 2014. The emergence of mecC methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 22:42–47.
- Pereira V., Lopes C., Castro A., Silva J., Gibbs P., Teixeira P. 2009. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. *Food Microbiol* 26:278–282.
- Pesce A., Salzano C., De Felice A., Garofalo F., Liguori S., De Santo A., Palermo P., Guarino A. 2016. Monitoring the freezing point of buffalo milk. *Ital J Food Saf* 5:95–97.
- Pizauro L.J.L., de Almeida CC., Soltés GA., Slavic D., Rossi-Junior OD., de Ávila FA., Zafalon LF., MacInnes JI. 2017. Species level identification of coagulase negative *Staphylococcus* spp. from buffalo using matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry and cydB real-time quantitative PCR. *Vet Microbiol* 204:8–14.
- Rall VLM., Miranda ES., Castilho IG., Camargo CH., Langoni H., Guimarães FF. 2014. Diversity of *Staphylococcus* species and prevalence of enterotoxin genes isolated from milk of healthy cows and cows with subclinical mastitis. *J Dairy Sci*:1–9.
- Rapini L., Cerqueira M., Carmo L. 2005. Presence of *Staphylococcus* strains producer of enterotoxins and toxic shock toxin syndrome isolated from goat's cheese handlers. *Arq Bras Med Vet Zootec* 57:825–829.
- Raz R., Colodner R., Kunin CM. 2005. Who are you - *Staphylococcus saprophyticus*? *Clin Infect Dis* 40:896–898.
- 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.

- Riva A., Borghi E., Cirasola D., Colmegna S., Borgo F., Amato E., Pontello MM., Morace G. 2015. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in raw milk: prevalence, SCCmec typing, enterotoxin characterization, and antimicrobial resistance patterns. *J Food Prot* 78:1142–1146.
- Rola JG., Czubkowska A., Osek J. 2015. Prevalence of enterotoxin genes and antimicrobial resistance of coagulase-positive staphylococci recovered from raw cow milk. *J Dairy Sci*:1–6.
- Ronco T., Klaas IC., Stegger M., Svennesen L., Astrup LB., Farre M., Pedersen K. 2018. Genomic investigation of *Staphylococcus aureus* isolates from bulk tank milk and dairy cows with clinical mastitis. *Vet Microbiol* 215:35–42.
- Rübensam G., Barreto F., Barcellos R., Ledur T., Mara T. 2011. Analytica Chimica Acta 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. *Anal Chim Acta* 705:24–29.
- Saka E., Gulel GT. 2018. Detection of enterotoxin genes and methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from water buffalo milk and dairy products. *J Food Sci* 83:1716–1722.
- Sales DC., Rangel AH do N., 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.
- Schelin J., Wallin-Carlquist N., Thorup Cohn M., Lindqvist R., Barker GC. 2011. The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. *Virulence* 2:580–592.
- Schukken YH., Richert R., Cicconi-Hogan KM., Gamroth M., Stiglbauer KE., Ruegg PL. 2013. Associations of risk factors with somatic cell count in bulk tank milk on organic and conventional dairy farms in the United States. *J Dairy Sci* 96:3689–3702.
- Schukken Y., Wilson D., Welcome F., Garrison-tikofsky L., Schukken Y., Wilson D., Welcome F., Garrison-tikofsky L., Monitor- RG. 2003. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts To cite this version: HAL Id: hal-00902769 Review article Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts.
- Schuster CF., Bertram R. 2016. Toxin-antitoxin systems of *Staphylococcus aureus*. *Toxins* 8:1–13.
- Sergelidis D., Angelidis AS. 2017. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): A controversial food- borne pathogen. *Int J Lab Hematol* 64:42–49.
- Siegel S., Castellan N. 1988. *Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences*. New York, NY: Mcgraw-Hill Book Company.
- Silva S carneiro., Nascimento Junior D. 2007. Avanços na pesquisa com plantas forrageiras tropicais em pastagens: características morfofisiológicas e manejo do pastejo. *Rev Bras Zootec* 36:121–138.
- Silva ATF., da Silva JG., Aragão BB., Peixoto RM., Mota RA. 2020. Occurrence of β -lactam-resistant *Staphylococcus aureus* in milk from primiparous dairy cows in the northeastern region of Brazil. *Trop Anim Health Prod* 52:2303–2307.
- Singh S., Shukla S., Tandia N., Kumar N., Paliwal R. 2014. Antibiotic Residues: a Global Challenge. *Pharma Sci Monit* 5:1135–1151.
- Soares JC., Marques MR., Tavaría FK., Pereira JO., Malcata FX., Pintado MM. 2011. Biodiversity and characterization of *Staphylococcus* species isolated from a

- small manufacturing dairy plant in Portugal. *Int J Food Microbiol* 146:123–129.
- Spanu V., Spanu C., Viridis S., Cossu F., Scarano C., De Santis EPL. 2012. Virulence factors and genetic variability of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw sheep's milk cheese. *Int J Food Microbiol* 153:53–57.
- SAA/SP – Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo. Resolução SAA nº24 de 01 de agosto. 1994: Dispõe sobre as normas técnicas de produção e classificação dos produtos de origem animal e as relativas às atividades de fiscalização e inspeção dos produtos de origem animal. 2004. São Paulo: SSA/SP; 1994. Disponível em <<https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/resolucao-saa-24-de-01-8-1994,33.html>>. Acesso em 20 out. 2021
- Teixeira LV., Bastianetto E., Oliveira DAA. 2005. Leite de búfala na indústria de produtos lácteos. *Rev Bras Reprod Anim*:96–100.
- Thorberg BM., Danielsson-Tham ML., Emanuelson U., Persson Waller K. 2009. Bovine subclinical mastitis caused by different types of coagulase-negative staphylococci. *J Dairy Sci* 92:4962–4970.
- Tripaldi C., Palocci G., Miarelli M., Catta M., Orlandini S., Amatiste S., Bernardini R Di., Catillo G. 2010. Effects of mastitis on buffalo milk quality. *Asian-Australasian J Anim Sci* 23:1319–1324.
- Uppal SK., Singh KB., Roy KS., Nauriyal DC., Bansal BK. 1994. Natural defence mechanism against mastitis: A comparative histomorphology of buffalo and cow teat canal. *Buffalo J* 2:125–131.
- Velázquez-Meza M. 2005. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinorresistente. *Salud Publica Mex* 47:381–387.
- Wu S., Duan N., Gu H., Hao L., Ye H., Gong W., Wang Z. 2016. A review of the methods for detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins* 8:1–20.
- 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.
- Zicarelli L. 2020. Current trends in buffalo milk production. *J Buffalo Sci* 9:121–132.

9. APÊNDICES

9.1. Apêndice A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA FORNECEDORES DE LEITE DE BÚFALA CRU DESTINADO A PRODUÇÃO DE DERIVADOS FORMALMENTE COMERCIALIZADOS NO RIO GRANDE DO SUL

Declaro que assinando este documento estou ciente que fui selecionado (a) e convidado (a) a participar do trabalho de pesquisa intitulado “Aspectos Relacionados À Identificação Fenotípica e Genotípica, Fatores de Virulência e Suscetibilidade Antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. Isolados de Amostras de Leite Cru de Búfala Provenientes de Diferentes Produtores do Estado do Rio Grande do Sul”. A pesquisa tem como **objetivo geral**: verificar a qualidade microbiológica, com ênfase para a presença de bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. e suas enterotoxinas, do leite bubalino cru de conjunto, obtido de tanque de refrigeração de propriedades que o fornecem como matéria-prima para fabricação de derivados no estado do Rio Grande do Sul. Como **objetivos específicos**: busca-se fazer a coleta quinzenal, durante o período de um ano, das amostras de leite cru nas três propriedades que fornecem matéria-prima para a produção de derivados no estado do RS. As amostras serão coletadas diretamente no tanque de refrigeração, representando o leite de conjunto da propriedade. A partir dessas amostras, fazer as determinações dos parâmetros para a avaliação da microbiológica: contagem padrão em placas, contagem de células somáticas, contagem de estafilococos e contagem de coliformes. Avaliar a variação sazonal destes parâmetros ao longo de um ano. Realizar a verificação da presença de enterotoxinas estafilocócicas (EE) nas amostras de leite bubalino cru de conjunto, obtido de tanque de refrigeração das propriedades. Paralelamente, verificar se as EE encontradas são resistentes aos processos de pasteurização. A partir dos isolados de *Staphylococcus* spp., obtidas das análises microbiológicas prévias, realizar a técnica de MALDI-TOF para identificar as diferentes espécies do gênero *Staphylococcus* spp., determinar a suscetibilidade a diferentes antimicrobianos e detectar a presença de genes de virulência através da técnica de PCR.

Foi-me assegurado que os resultados serão tratados de forma anônima e confidencial, isto é, em nenhum momento será divulgado meu nome nem de minha propriedade em qualquer fase do estudo. E, na necessidade de exemplificar determinada situação, as privacidades do proprietário e de sua propriedade serão asseguradas. Fui informado que os dados coletados serão utilizados somente NESTA pesquisa, e os resultados divulgados em eventos e ou revistas científicas, e que a comunidade terá acesso aos resultados através da pesquisadora e da sua equipe.

Fui informado também que não haverá riscos de qualquer natureza relacionados à minha participação. O benefício relacionado à minha participação, informado pela equipe de pesquisa, refere-se ao conhecimento sobre a qualidade microbiológica do leite de búfala cru produzido na minha propriedade.

A pesquisadora me concedeu uma cópia assinada deste termo, onde consta o telefone celular/email do responsável e demais membros da equipe, possibilitando o esclarecimento de dúvidas sobre o projeto e minha participação, agora ou a qualquer momento.

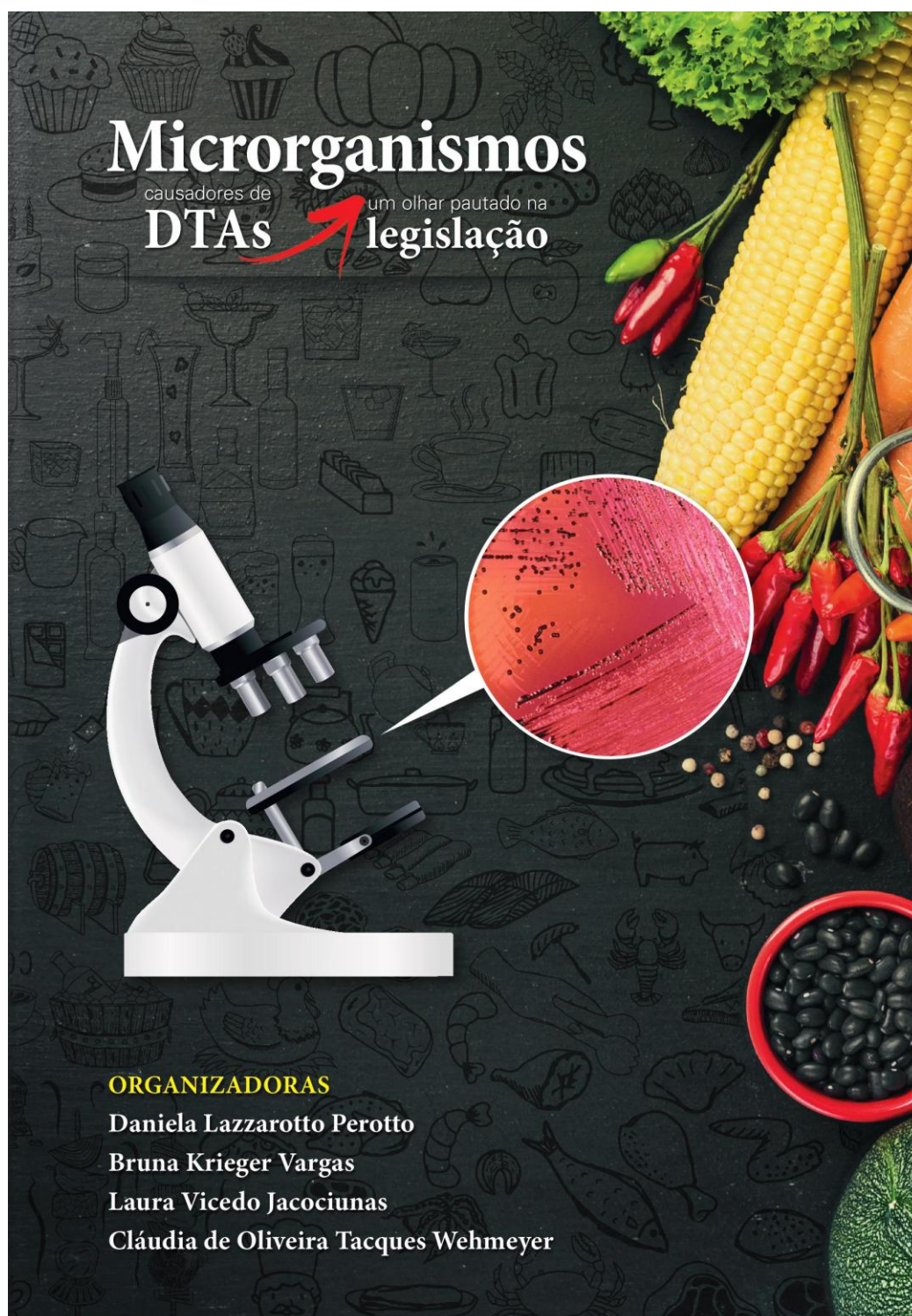
Considerando-me esclarecido em relação à proposta da pesquisa, concordo em participar da mesma.

Participante da Pesquisa: _____

Coordenador do projeto: Prof. Dr^a. Amanda Motta (Professora do Dep. Microbiologia, Imunologia e Parasitologia /ICBS/UFRGS) (99182-4898) amanda.motta@ufrgs.br

9.2. Apêndice B: Livro

Abaixo a imagem da capa do livro “Microorganismos causadores de DTAs, um olhar pautado na legislação”, publicado em 2021, no qual a autora contribuiu com a redação do “Capítulo 7: *Staphylococcus coagulase positiva*”, cuja primeira página se encontra a seguir.



Organizadoras

Daniela Lazzarotto Perotto

Bruna Krieger Vargas

Laura Vicedo Jacociunas

Cláudia de Oliveira Tacques Wehmeyer

Microrganismos

causadores de
DTAs  um olhar pautado na
legislação

**Porto Alegre**

2021

CAPÍTULO 7

Staphylococcus coagulase positiva

Amanda de Souza da Motta

Fernanda Marques de Souza Godinho

Os *Staphylococcus* são bactérias gram-positivas com morfologia esférica (cocos) que se apresentam aos pares, em pequenas cadeias ou mais caracteristicamente em agrupamentos formando “cachos de uva”, conhecidos como estafilococos. Este microrganismo foi primeiramente descrito em 1879, quando suas propriedades começaram a ser estudadas. Das espécies mais importantes dos estafilococos destaca-se o *Staphylococcus aureus*, um agente de extrema relevância por ser uma bactéria conhecida como produtora de toxinas, hoje identificada como enterotoxinas estafilocócicas (TORTORA *et al.*, 2012).

Os estafilococos encontram-se em diferentes fontes como no ar; na poeira; na água; em alimentos diversos, mas principalmente em produtos derivados de origem animal. Podem estar em superfícies expostas, nos equipamentos de processamento e manipulação dos alimentos e também nos seres humanos e animais, mais especificamente no cabelo, nas vias nasais, boca, mãos e pele de animais. Estas informações colocam o manipulador de alimentos e os animais como os principais reservatórios, e estima-se que aproximadamente 30% da população seja portadora assintomática desse agente etiológico (LAKHUNDI; ZHANG, 2018).

As condições consideradas ótimas para o crescimento dos estafilococos são em ambientes com temperatura entre 30°C e 37°C e pH entre 7 e 7,5. Porém são microrganismos altamente tolerantes e podem se multiplicar

10. ANEXOS

10.1. Anexo A: Submissão Artigo 2

20/10/2021 16:18

(3 não lidos) - femandamsq@yahoo.com.br - Yahoo Mail

Assunto: RE: New Form Entry: JDR MS Submission
 Data: 2021-08-24 06:55
 De: Chris Knight <breathescience@outlook.com>
 Para: "amanda.motta@ufrgs.br" <amanda.motta@ufrgs.br>



Dear Amanda

Thank you for submitting your research article to the Journal of Dairy Research. Your manuscript has been received and will now be evaluated promptly.

It has been given the reference: **godinho6405**

If you wish to contact us please use the online [contact form](#) and include this reference number.

JDR is an international journal that publishes original scientific research on all aspects of the biology and technology of lactating animals and the foods they produce. JDR is also a Community of dairy science researchers with the website www.journalofdairyresearch.org. Your JDR Community account is ready for you to use, with your email address as user name. If you are already a Community member and have logged in before, please continue to use the password that you set previously. If you are a new member, your password is the manuscript reference given above (please note that this password is always a combination of lower-case letters and numerals).

In the next few days your manuscript will be checked for technical and basic scientific compliance (Validation Assessment). If it passes Validation it will be uploaded to a restricted access page on our website where you will be able to track its progress through Peer Review. You will be notified of this by email. Your Validated manuscript will be assigned to an Editorial Board Member who will decide whether or not it should go forward for full Peer Review by independent referees. The process can be viewed on our website and you will be alerted by email when there are updates to your manuscript's webpage.

Please note that a significant proportion of manuscripts fail validation, either because they do not comply with our technical requirements or else the science is not considered appropriate for JDR. If your manuscript fails Validation you will be notified by email.

JDR Peer Review Policy

Peer Review is an essential part of scientific dissemination and progress, and relies on the cooperation of the scientific community. The JDR Community includes a Peer Review Pool of scientists who have indicated their willingness to contribute reviews from time to time. Although we do not insist on it, we do expect that all submitting authors should join the Pool. You can find the application link below.

With best wishes

A handwritten signature in blue ink that reads "Chris Knight" with a stylized flourish at the end.

Editor in Chief, Journal of Dairy Research

JDR relies on its Community support. Please:

- **do not contact the Editor directly, use the [Contact Form](#)**
- **help us with Community Peer Review. You can find details [here](#)**
- **follow us on Social Media:**



10.2. Anexo B: Normas da Revista *Journal of Dairy Research*

CAMBRIDGE | Instructions for Contributors

Journal of Dairy Research

General

The *Journal of Dairy Research* publishes original scientific research on all aspects of the biology and technology of lactating animals and the foods they produce. Research Papers report innovative, hypothesis-driven research that is likely to have international impact. Research Communications are shorter and intended primarily for research of regional or technical impact. Reviews and Editorials are published by invitation. Material for publication should be submitted using the online submission system at www.journalofdairyresearch.org where you will also find further details of the *Journal's* scope, advice on preparing your manuscript and access to track your manuscript through Peer Review. Submission of a manuscript will be taken to imply that it reports original unpublished work, that it is not under consideration elsewhere, and that if accepted by the *Journal* it will not be published elsewhere in any language without the consent of the Editors. You will be asked to confirm that you accept these conditions. Your manuscript will be peer reviewed. If it is accepted for publication you will be asked to assign the copyright, under certain conditions, to the *Journal* to help protect your material.

Submission of manuscripts

Submission is online via www.journalofdairyresearch.org. The Editors no longer accept emailed submissions. You should first consult the online guidance and these Instructions to Contributors to ensure that your manuscript is prepared in accordance with the *Journal's* requirements. You must submit the manuscript as a single Word document that incorporates all tables and figures. If we subsequently require higher quality original files of figures or images we will ask you for them. You will also have the option to submit supplementary files.

Journal Scope

The *Journal's* ability to cover the entire dairy foods chain is a major strength. The remit spans from animal nutritional aspects of feed input through the biology of lactating animals and the mammary gland to milk quality, technological aspects of processed dairy products and healthy nutrition for the consumer. The focus is on dairy species, but we also welcome comparative research related to human lactation and lactation in non-dairy animal species. The *Journal* does not categorize published articles. Each issue will follow the dairy foods chain, starting with feeding-related research and ending with consumer-related.

Types of manuscript and general considerations

The *Journal* publishes submitted Research Papers and Research Communications. In addition, Research Reviews and Editorials are published by invitation. Research Papers report innovative hypothesis-driven research of international impact and will not normally be appropriate for research that is purely descriptive. Research Communications are shorter. In addition to international impact research, Research Communications can also report descriptive studies of Regional Interest or Technical Interest. Within the *Journal* there is no categorisation by article type, which must be briefly stated in the first line of the summary. Page limits apply to all types of manuscript. These are reported as Text Equivalents (TEQ) where one word is one TEQ and each figure or table is 250 TEQ. Research Papers should be around 6000 TEQ and should include only figures, tables and reference citations that are essential to the understanding of the research objectives. Research Communications should be around 2500 TEQ and should include only one or two tables or figures and a maximum of around 10 citations. Manuscripts that exceed these recommendations will be returned for revision.

Reviews and Editorials

These are invited, and separate guidance will be provided with the invitation. The Editors are always interested to receive suggestions for topics, with or without possible authors.

General style of all manuscripts

Please consult the online guidance and refer to a recent issue to familiarize yourself with *Journal* conventions and layout. Attention to these and other details will speed publication. Manuscripts should be written in UK English using the spelling of the Concise Oxford Dictionary and should as far as possible be comprehensible to the non-specialist reader. They should be concise and focused on the scientific objectives. Research Papers and Research Communications must contain sufficient detail or appropriate cited methodologies to allow repetition of the work. Formatting should include double spaced and consecutively numbered lines, standard margins and an appropriate font of appropriate size. Do not hyphenate words at the end of a line unless a hyphen is to appear in the printed text.

Layout of Research Paper manuscripts

The manuscript should generally be divided as follows:

- **Cover sheet** should give the title of the article, names of the authors each with one forename, together with their affiliations, a shortened version of the title suitable as a heading, and the name, address and email of the author to whom correspondence and proofs should be sent.
- **Summary**, preferably not more than 300 words, should encapsulate the whole paper, showing clearly the new knowledge acquired. Individual results should not be given. The first line of the summary should identify the article as a Research Paper and present the objectives, preferably in the form of a hypothesis (eg *This Research Paper addresses the hypothesis that...*)
- **Keywords:** up to 5 keywords may be supplied
- **Introduction** should not have a heading. It should not contain a full review of the literature, but should help the non-specialist to understand why the subject of enquiry is interesting or important, why the authors have chosen the approach described and what the likely impact of the research will be. The objectives must be clearly stated, preferably in the form of a hypothesis.
- **Materials and Methods** section should contain adequate descriptions of procedures or appropriate references; sources of all materials (including address, with postal code) and sources or strains of animals and microorganisms should be indicated. Do not give detailed descriptions of published methods; refer to the original publication.
- **Results** should be as concise as possible, without repetition or inclusion of irrelevant material. Tables and illustrations should be used efficiently. All data reported must directly relate to the understanding of the research objectives. Supporting or confirmatory data should be presented separately as Supplementary Files.
- **Discussion** should not repeat the results but discuss their significance. Refer to existing or accepted knowledge in the present tense and the authors' work in the past tense; the difference in tense should clearly show the authors' contribution. A separate conclusion is not necessary but authors should summarize their main conclusions briefly at the end of the Discussion. A combined Results and Discussion is acceptable but not preferred.
- **Acknowledgements** of financial support, technical assistance and so on are given in a separate paragraph without heading. It is the responsibility of the authors to ensure that individuals or organizations acknowledged as providing materials or otherwise are willing to be identified.
- **References** must be consistent and must use the style described below.
- **Tables** and table legends, following the style described below.
- **Figure legends** sufficient to allow the figure to be understood without reference to the text
- **Figures** should be produced using an editable software and copied into the Word document.

Please remember that the complete manuscript should be submitted as a single document.

Layout of submitted Research Communication manuscripts

In general, follow the same format and layout as for a Research Paper. The introduction will typically be shorter and the results and discussion are more likely to be combined into one section. The number of citations will be less, and presentation of data should be restricted to one or two figures and tables. Use of Supplementary Files for the presentation of supporting data is encouraged. The Summary should start with a sentence clearly identifying the article type and presenting the objectives (eg *This Technical Research*

Communication describes)

References

Refer to a recent issue and ensure that your reference citations comply with *Journal* style. References should be given in the text as Brown & Jones (1987) or (Schmidt, 1985; Nakamura *et al.* 1989); the first author with *et al.* is used for papers with three or more authors. Where necessary, papers are distinguished as Lenoir (1988a), (Litov *et al.* 1990a, b). When several references appear together in the text, cite them in chronological order, and alphabetically within years. The Reference list at the end of the paper, which should begin on a fresh page, is given in strict alphabetical order and uses the minimum of punctuation. Each reference should contain authors' names, with initials (in capitals), the year, the title of the paper, the name of the journal in full, the volume and the page range. Titles of articles originally published in another language should be given in English translation, and this indicated by the use of square brackets. References to books should include the town of publication and the publisher, with editor(s) and volume and edition number where appropriate. Unpublished work should be given in the text (use authors' initials and surname) and not in the Reference list. You are reminded that it is your responsibility to check all references.

Data presentation

Choose the most economical form of data presentation, remembering that this could include data presented briefly in the text. For investigative research, avoid large tables and figures that are comprised mainly of data that do not differ significantly between treatments. For descriptive research, consider the use of Supplementary Files for all apart from the most important observations.

Tables

Tables should be numbered and carry headings enabling them to be understood without reference to the main text. Any abbreviations should be defined. Each Table should be typed separately at the end of the main text, but their approximate position should be indicated by a marginal mark (eg *Table 1 near here*). Symbols for footnotes should avoid use of *, **, etc, which should be used to indicate levels of significance.

Figures and Illustrations

Figures should be numbered and the combination of figure and legend should be comprehensible without reference to the main text. Figures must be prepared using an editable file format and then copied into the Word document. Data points should be indicated by clearly distinguishable symbols. Illustrations such as photographic images should be accompanied by a legend as above, with scale bars if appropriate. Colour figures and artwork submitted to the *Journal* will be published online free of charge. If you request colour figures in the printed version, you will be contacted by CCC-Rightslink who are acting on our behalf to collect Author Charges. Please follow their instructions in order to avoid any delay in the publication of your article.

Colour reproduction

To optimize the online colour reproduction, you will be given the opportunity to submit a colour graphic as either TIFF or EPS file, together with further instructions. It is your responsibility to ensure that any figures provided for colour online will reproduce well when converted to black and white for the print version.

Statistical treatment

Authors should, where possible, discuss their work with a statistician at an early stage and give attention to sample size. Individual results should not normally be given. The methods of statistical analysis should be clearly described; a suitable reference is adequate. Authors should make it clear whether they are quoting SED, SEM, SD, SE and so on. Any statement that two groups of values are different should be supported by the level of significance involved. Differences should not be claimed or implied if $P > 0.05$.

Gene Sequences

Original DNA sequences reported in the *Journal* must also be submitted to GenBank. Instructions can be found at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>

Ethics of experiments

All research published in the *Journal* must comply with the locally-applicable ethical legislation or codes for

animal or human research, and there must be a clear statement detailing that compliance.

Units

SI and commonly-used non-SI metric units should be used whenever possible. Solutions may be reported in terms of molarity (M) or as mol/l, providing there is consistency and no ambiguity. Give compositions based on mass or volume as (e.g.) mg/l or mg/kg and not percentage. Report all details of buffers etc that would be required for repetition. Normality should not be used.

Microorganisms

The organism should be described unambiguously, with genus, species and subspecies (if any) in italic and strain number or source in roman. Usage should conform to current international rules. Shortened forms or synonyms may be used after the first mention if desired.

Chemical formulae

These should be unambiguous. It is permissible but not required to use symbols for inorganic formulae.

Enzymes

The recommendations of the International Union of Biochemistry (*Enzyme Nomenclature*, 1984, London: Academic Press) should be followed, and the EC number given where known.

Other nomenclature, symbols, abbreviations and conventions

Authors should consult a current issue for guidance. Useful information on biochemical nomenclature and permitted acronyms can be found in *Biochemical Journal* **169**, 11-14 and on nutrient nomenclature in the *British Journal of Nutrition*. If authors use other abbreviations or acronyms, they should be defined at first mention, and their number restricted to ensure that the text is readable. Always use Arabic numerals with units; otherwise use words for 1-10 and figures for more than 10, (e.g. 3 weeks, three cows, 34 sheep) but avoid mixed lists. Time should be given by the 24 h clock, e.g. 14.15, without h or hours.

Revision of papers

If a paper is returned to authors for possible amendment or revision, a period of 4 months will normally be allowed. The editors are ready to consider a revised or rewritten paper at any time, but after 4 months it will be considered a new paper and given a new submission date.

Proofs

Authors will be advised when to expect proofs, which should be returned without delay following the instructions supplied at the time. Proofs are sent for the correction of any printer's or editorial errors, not for addition of new material or revision of the text. Excessive alteration may have to be disallowed or made at the authors' expense, and may delay publication. Order forms for paid offprints are sent with proofs and should be returned directly to Cambridge University Press following the instructions supplied at the time.

Cambridge Journals Language Editing Service

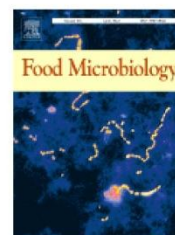
Cambridge recommends that authors have their manuscripts checked by an English language native speaker before submission; this will ensure that submissions are judged at peer review exclusively on academic merit. We list a number of third-party services specialising in language editing and / or translation, and suggest that authors contact as appropriate. Use of any of these services is voluntary, and at the author's own expense.

<http://journals.cambridge.org/action/stream?pageId=8728&level=2&menu=Authors&pageId=3608>

(Revised 1st January 2016)

10.3. Anexo C: Normas da Revista *Food Microbiology***FOOD MICROBIOLOGY****AUTHOR INFORMATION PACK****TABLE OF CONTENTS**

• Description	p.1
• Impact Factor	p.2
• Abstracting and Indexing	p.2
• Editorial Board	p.2
• Guide for Authors	p.5



ISSN: 0740-0020

DESCRIPTION

Food Microbiology publishes original research articles, short research communications, and review papers dealing with all aspects of the **microbiology of foods**. The **editors** aim to publish manuscripts of the highest quality which are both relevant and applicable to the broad field covered by the journal. Studies must be novel and have a clear connection to the microbiology of foods or food production environments. The microbiological aspects of all stages of food production, from pre- to post-harvest and throughout processing and preparation, are of interest. Studies should be of general interest to the international community of food microbiologists. The editors make every effort to ensure rapid and fair reviews, resulting in timely publication of accepted manuscripts.

Papers relating to the following topics will be considered:

- Taxonomy, Physiology, genetics, biochemistry, and behavior of microorganisms that are either used to make foods or that represent safety or quality problems
- Effects of preservatives, including bioprotectants, processes, and packaging systems on the microbiology of foods
- Methods for detection, identification and enumeration of foodborne microorganisms or microbial toxins
- Microbiology of food fermentations
- Predictive microbiology and applications to foods
- Microbial communities and ecology of foods, food production, and food processing environments
- Microbiological aspects of food safety
- Microbiological aspects of general and sensorial food quality and spoilage

Papers with a focus on the following areas will **not** be considered:

- Biotechnology or food technology, including process or product developments, optimizations, and formulations
- Development of new microbial strains for fermentations, ingredient production, or probiotic applications
- Studies involving health claims
- Surveys of microorganisms in foods, unless the surveys are research hypothesis-driven
- Development of biosensors or other analytical methods, unless efficacy is evaluated in foods or food environments

IMPACT FACTOR

2020: 5.516 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2021

ABSTRACTING AND INDEXING

Scopus
EMBiology

EDITORIAL BOARD

Editor in Chief

Frédéric F. Carlin, National Research Institute for Agriculture Food and Environment Provence-Alpes-Côte d'Azur, Avignon cedex 9, France
Food safety, quantitative microbiology, predictive microbiology, risk assessment

Contributing Editors

Javier J. Carballo, University of Vigo Faculty of Sciences, Orense, Spain
Fermented foods, Manufacturing processes, Ripening process, Starter cultures, Traditional foods
Geraldine G. Duffy, Irish Agriculture and Food Development Authority, Carlow, Ireland
Food borne microbial pathogens, shelf life, meat safety
Aline A. Lonvaud, Institute of Vine and Wine Science, Villenave d'Ornon, France
Wine microbial system, oenological environment, microbial stabilization of wine
Donald D.W. Schaffner, Rutgers The State University of New Jersey, New Brunswick, United States
Predictive microbiology, Modeling, microbial risk assessment, food safety
Sandra S. Torriani, University of Verona Department of Biotechnology, Verona, Italy
Microbial ecology of fermented foods, metagenomics, transcrigenomics, taxonomy
Keith K. Warriner, University of Guelph Department of Food Science, Guelph, Canada
Food Safety, Food Microbiology, Fresh Produce, UV-C, STEC

Editorial Board Members

Giulia Amagliani, University of Urbino, Urbino, Italy
Apostolos Angelidis, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece
Jean-Christophe Augustin, National Veterinary School of Alfort, Maisons Alfort, France
Predictive microbiology, Modeling, Quantitative microbiology
Sampathkumar Balamurugan, Agriculture and Agri-Food Canada Guelph Research and Development Centre, Guelph, Canada
Food microbiology, Food Processing, Food safety
Carmela Belloch, Institute of Agrochemistry and Food Technology Food Biotechnology Department, Burjassot, Spain
Teresa Bergholz, North Dakota State University, Fargo, United States of America
Ioannis S. Boziaris, University of Thessaly, Volos, Greece
Adriano Brandelli, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil
Leona Bunkova, Tomas Bata University in Zlín, Zlín, Czechia
Claude Champagne, Saint-Hyacinthe Research and Development Centre, Saint-Hyacinthe, Canada
lactic acid bacteria, probiotics, fermentation
Maurizio Ciani, Polytechnic University of Marche, Ancona, Italy
Fermented beverages, food microbiology, yeasts, antimicrobial compounds, biomass recycling, fermentation process, microbial metabolites
Giuseppe Comi, University of Udine, Udine, Italy
Olivier Couvert, Bretagne Occidentale University, Brest, France
Predictive Microbiology
Doris D'Souza, The University of Tennessee System, Knoxville, United States of America
virus
Philippe Dantigny, University of Western Brittany University Laboratory of Biodiversity and Microbial Ecology, Plouzane, France
Predictive mycology, Modeling, Food quality, Mycotoxins
Pascal Delaquis, Summerland Research and Development Centre, Summerland, Canada
Microbiological safety, control of bacterial pathogens, ecology of human pathogens
Steve Flint, Massey University School of Food & Advanced Technology, Albany, New Zealand
Biofilms, Food Microbiology, Food Safety, Dairy Microbiology, Molecular biology, rapid detection methods

- Elena Franciosi**, Edmund Mach Foundation Agrarian Institute of San Michele, Trento, Italy
- EFSTATHIOS GIAOURIS**, University of the Aegean, Mytilini, Greece
 biofilms, food microbiology, food safety, foodborne pathogens, Salmonella enterica, Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, natural antimicrobials, disinfection, cell-to-cell interactions, rapid methods
- Michael Gänzle**, University of Alberta Department of Agricultural Food and Nutritional Science, Edmonton, Canada
 Current research projects focus on the functional characterisation of lactic acid bacteria for use as starter cultures, protective cultures, or probiotics in food with a focus on cereal-associated lactic acid bacteria, production of oligosaccharides from sucrose or lactose by lactic acid bacteria and biological activities of oligosaccharides, novel, non-thermal preservation methods with a focus on high pressure processing and biopreservation, and intestinal microbial ecology with focus on the use of prebiotic carbohydrates and dietary fibre to improve host health.
- Fausto Gardini**, University of Bologna, Bologna, Italy
- Alexander Gill**, Health Canada, Ottawa, Canada
 Bacteriology, food safety, food borne pathogens
- Giorgio Giraffa**, Institute of Agricultural Biology and Biotechnology National Research Council Lodi Branch, Lodi Lo, Italy
 lactic acid bacteria, molecular typing
- Ramon Gonzalez**, Vine and Wine Sciences Institute, Logrono, Spain
- Sandra Guerrero**, University of Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina
- José Manuel Guillamón**, Institute of Agrochemistry and Food Technology, Paterna, Spain
 Wine biotechnology, Yeast metabolism, Bioactive molecules, Nitrogen metabolism, Low temperature adaptation
- Sandrine Guillou**, Food Safety and Microbiology (SECALIM) INRAE Oniris Joint Research Unit Veterinary medicine, Food science and engineering National College (Oniris) and National Research Institute for Agriculture, Food and Environment (INRAE), Nantes Cedex 3, France
 Food safety, Microbiological risk assessment, Food microbiota, Campylobacter
- Richard Holley**, University of Manitoba, Winnipeg, Canada
 poultry meats
- Lucilla Iacumin**, University of Udine Department of Agricultural Food Environmental and Animal Sciences, Udine, Italy
- Che OK Jeon**, Chung-Ang University, Seoul, South Korea
- Lotta Kuuliala**, Ghent University, Ghent, Belgium
- Alexandra Lianou**, University of Patras, Cell Biology and Development Department of Biology, Division of Genetics, Patras, Greece
- Shao Quan Liu**, National University of Singapore, Singapore, Singapore
- Ya-Guang Luo**, USDA-ARS Beltsville Agricultural Research Center, Beltsville, United States of America
- Yongkang Luo**, China Agricultural University, Beijing, China
- Sonia Marin Sillué**, University of Lleida, Lleida, Spain
 Food microbiology, Mycotoxins, Food preservation
- Antonio Martinez**, Institute of Agrochemistry and Food Technology, Paterna, Spain
 predictive microbiology, modeling, spores
- Lynne McLandsborough**, University of Massachusetts Amherst, Amherst, United States of America
- Matthew Moore**, University of Massachusetts Amherst Department of Food Science, Amherst, United States of America
 Applied and Environmental Virology, Food Microbiology, Norovirus, Eukaryotic Virus-Bacteria Interactions, Microbiota, Detection, Inactivation, Enteric Viruses
- Luís Augusto Nero**, Federal University of Vicosa, Vicosa, Brazil
 Foodborne pathogens, lactic acid bacteria, artisanal foods, food quality, food safety
- George -John Nychas**, Agricultural University of Athens, Athens, Greece
 Spoilage, Safety, Pathogens, Rapid methods, Meat products
- Alfredo Palop**, Polytechnic University of Cartagena School of Agronomic Engineering, Cartagena, Spain
 Heat resistance, Predictive microbiology, Natural antimicrobials
- Efstathios Panagou**, Agricultural University of Athens, Athens, Greece
- Eugenio Parente**, University of Basilicata, Potenza, Italy
 Food microbiology, Dairy microbiology, Bioinformatics
- Salina Parveen**, University of Maryland Eastern Shore, Princess Anne, United States of America
 Seafood safety, poultry safety, bacterial source tracking, antimicrobial resistance, Salmonella, vibrio, E. coli, Listeria
- Cristina Restuccia**, University of Catania, Catania, Italy
 Food yeasts, Microbiological quality of foods, Antimicrobial natural compounds for food preservation, Fermented foods, Bioprotective microbial cultures, Biocontrol yeasts
- Alicia Rodriguez**, University of Extremadura, Badajoz, Spain

Fungi, Mycotoxin, Stress, Food mycology, Gene expression
Jesus Romalde, University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain
 Fish and shellfish pathogens Characterization and identification of pathogens, development of control and preventive (vaccines) measures. Virulence factors.
Jordi Rovira, University of Burgos, Burgos, Spain
 meat fermentation, biogenic amine
Ryu, Korea University College of Science, Seoul, South Korea
Joelle Salazar, U.S. Food and Drug Administration, Bedford Park, United States of America
Elisa Salvetti, University of Verona, Verona, Italy
John Samelis, Institute of Technology of Agricultural Products, Athens, Greece
 fermentation, lactic acid bacteria, packaging
Gloria Sanchez, Institute of Agrochemistry and Food Technology Department of Preservation and Food Safety Technologies, Paterna, Spain
Ioannis Savvaidis, University of Ioannina, Ioannina, Greece
Evaristo de Souza, Paraíba Federal University Health Sciences Center, JOAO PESSOA, Brazil
 Food safety, Control of foodborne pathogens, Antimicrobial compounds, Bioactive molecules, Probiotics, Prebiotics
Giuseppe Spano, University of Foggia Department of Agricultural Food and Environmental Sciences, Foggia, Italy
 Probiotics, Vitamins producing bacteria, Antimicrobial activity, Wine microbiology
Thomas Taylor, Texas A&M University, College Station, United States of America
 Food preservatives, preservative encapsulation, produce food safety, food safety validation
Paula Christina Teixeira, Catholic University of Portugal Faculty of Biotechnology, Porto, Portugal
 Antimicrobials
Rohan Tikekar, University of Maryland, College Park, United States of America
 Produce safety, food processing, food safety, antimicrobial treatments, food processing
Mary-Lou Tortorello
Lisbeth Truelstrup Hansen, National Food Institute, Søborg, Denmark
Antonio Valero Díaz, University of Cordoba, Department of Food Science and Technology, Córdoba, Spain
 Food safety, microbial risk assessment, shelf-life, predictive microbiology
Manuel Valero Roche, Miguel Hernandez University of Elche Plant Science and Microbiology Department, Alicante, Spain
 spores, antimicrobials, predictive model
Cristian Varela, The Australian Wine Research Institute Limited, Glen Osmond, Australia
 Wine
Sabrina Inés Volentini, CONICET UNT Higher Institute of Biological Research, San Miguel De Tucuman, Argentina
Siyun Wang, The University of British Columbia Faculty of Land and Food Systems, Vancouver, Canada
 Food safety, food microbiology, microbial pathogen, bioinformatics, bacteriophage
Stefan Weckx, VUB University, Brussel, Belgium
Zheng-Hong Xu, Jiangnan University, Wuxi, China
 Microbial community, Fermented food, Metabolic engineering
Xianqin Yang, Lacombe Research and Development Centre, Lacombe, Canada
Hyun-Gyun Yuk, Korea National University of Transportation Division of Food Science and Biotechnology, Jeungpyeong-gun, South Korea
 bacterial stress response, nonthermal technology, rapid detection
Wei Zhang, National Center for Food Safety and Technology, Bedford Park, United States of America
 molecular methods

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Types of article

Original **research papers** for *Food Microbiology* should be written in English and normally not exceed 6000 words. **Short Communications** describing interesting but limited studies are welcome, but the same rigorous review process will be applied. These articles will not normally exceed 3500 words. **Reviews** and **Book Reviews** are welcome.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information on [Ethics in publishing](#).

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double anonymized) or the manuscript file (if single anonymized). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where

the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

Preprints

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

Preprint posting on SSRN

In support of [Open Science](#), this journal offers its authors a free preprint posting service. Preprints provide early registration and dissemination of your research, which facilitates early citations and collaboration.

During submission to Editorial Manager, you can choose to release your manuscript publicly as a preprint on the preprint server [SSRN](#) once it enters peer-review with the journal. Your choice will have no effect on the editorial process or outcome with the journal. Please note that the corresponding author is expected to seek approval from all co-authors before agreeing to release the manuscript publicly on SSRN.

You will be notified via email when your preprint is posted online and a Digital Object Identifier (DOI) is assigned. Your preprint will remain globally available free to read whether the journal accepts or rejects your manuscript.

For more information about posting to [SSRN](#), please consult the [SSRN Terms of Use](#) and [FAQs](#).

First Look

Please note: posted preprints for this journal will appear in a dedicated journal-branded [First Look](#) space on SSRN.

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. When coding terminology is used, we recommend to avoid offensive or exclusionary terms such as "master", "slave", "blacklist" and "whitelist". We suggest using alternatives that are more appropriate and (self-) explanatory such as "primary", "secondary", "blocklist" and "allowlist". These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Open access

Please visit our [Open Access page](#) for more information.

Elsevier Researcher Academy

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's Author Services.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Authors must provide and use an email address unique to themselves and not shared with another author registered in Editorial Manager, or a department.

Additional information

Nomenclature and Descriptions of Organisms

The correct name of the organism must be used, conforming with international rules of nomenclature: synonyms may be added in brackets when the name is first mentioned. Names of bacteria must conform with the current Bacteriological Code of Botanical Nomenclature. The species name should be underlined in the typescript and written in full at first mention, but subsequently the name of the

genus may be abbreviated, single letter abbreviations being used where they are not ambiguous. To facilitate further studies the journal supports the view that important strains should be deposited in a recognized culture collection.

PREPARATION

Queries

For questions about the editorial process (including the status of manuscripts under review) or for technical support on submissions, please visit our [Support Center](#).

Peer review

This journal operates a single anonymized review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. Editors are not involved in decisions about papers which they have written themselves or have been written by family members or colleagues or which relate to products or services in which the editor has an interest. Any such submission is subject to all of the journal's usual procedures, with peer review handled independently of the relevant editor and their research groups. [More information on types of peer review](#).

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Other than the cover page, every page of the manuscript, including the title page, references, tables etc. should be numbered; however, in the text no reference should be made to page numbers.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

The abstract should not exceed 200 words.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult [IUPAC: Nomenclature of Organic Chemistry](#) for further information.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive**

information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

Appropriate indications of replication and variability should be included.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal,

please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software.](#)

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references can be listed either first alphabetically, then chronologically, or vice versa.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999).... Or, as demonstrated (Jones, 1999; Allan, 2000)... Kramer et al. (2010) have recently shown ...'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. Mendeley Data, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Reference to software:

Coon, E., Berndt, M., Jan, A., Svyatsky, D., Atchley, A., Kikinon, E., Harp, D., Manzini, G., Shelef, E., Lipnikov, K., Garimella, R., Xu, C., Moulton, D., Karra, S., Painter, S., Jafarov, E., & Molins, S., 2020. Advanced Terrestrial Simulator (ATS) v0.88 (Version 0.88). Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3727209>.

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply

'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into a data article published in *Data in Brief*. A data article is a new kind of article that ensures that your data are actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and made publicly available

to all upon publication (watch this [video](#) describing the benefits of publishing your data in *Data in Brief*). You are encouraged to submit your data article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed, published open access and linked to your research article on ScienceDirect. Please note an [open access fee](#) is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please use [this template](#) to write your *Data in Brief* data article.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Author Services](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).

© Copyright 2018 Elsevier | <https://www.elsevier.com>