

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE AGRONOMIA

CURSO DE ZOOTECNIA

VITÓRIA LEITE DI DOMENICO

**QUALIDADE DO LEITE CRU DE BÚFALA ARMAZENADO SOB TEMPERATURA  
CONTROLADA POR UM PERÍODO DE ATÉ 7 DIAS**

Porto Alegre

2019

VITÓRIA LEITE DI DOMENICO

**QUALIDADE DO LEITE CRU DE BÚFALA ARMAZENADO SOB TEMPERATURA  
CONTROLADA POR UM PERÍODO DE ATÉ 7 DIAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito para obtenção do Grau de Bacharela em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisa Cristina Modesto

**Coorientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andrea Troller Pinto

Porto Alegre

2019

VITÓRIA LEITE DI DOMENICO

**QUALIDADE DO LEITE DE BÚFALA ARMAZENADO SOB TEMPERATURA  
CONTROLADA POR UM PERÍODO DE ATÉ 7 DIAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito para obtenção do Grau de Bacharelado em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Data de aprovação: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisa Cristina Modesto

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andréa Troller Pinto

---

Zootecnista Maiara Taiane Vieira

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, André e Joice, por serem meus exemplos, minha base e meu porto seguro. Não existem palavras no mundo com a capacidade de expressar o que vocês representam para mim. Tudo o que sou devo a vocês, que sempre estiveram comigo e batalharam pelos meus sonhos lado a lado. Obrigada por serem meus maiores apoiadores!

Aos meus irmãos, Andressa e Pedro, por tornarem a minha graduação – e a vida – mais leve, pela nossa união e pelo amor incondicional.

À Professora Elisa Modesto, pelas orientações durante os últimos 3 anos, por me apresentar ao mundo da bubalinocultura e por sempre acreditar no meu potencial me motivando a buscar o meu melhor.

À minha coorientadora, Professora Andrea Troller, pela disponibilidade e todo o auxílio com a construção deste trabalho.

À minha irmã de coração, Tuany Zani, por estar presente em todos os momentos da minha vida, com um abraço apertado e conselhos que salvam; e às minhas amigas Mahiara Ferreira e Tuane Oliveira, por todos os momentos compartilhados. Vocês são essenciais!

Às amigas que fiz na universidade: Fernanda Fontoura, por ser meu primeiro laço na zootecnia e minha dupla dos trabalhos em grupo; e às minhas “veteranas” Elis Aguirre, Thais Pereira e Dani Minuzzo, por toda parceria – e apoio psicológico – nessa caminhada pelo diploma e na vida.

Aos meus familiares, por todo apoio e incentivo, vocês são muito importantes. Em especial a bisavó Vilma, Vó Elaine, Vó Nina, Tia Bea, Tio Vandí, Dinda Simone, Louise e Eduarda.

À Látceos La Delfina pela oportunidade de estágio, por todo aprendizado proporcionado, pelo apoio com o presente trabalho – desde as amostras até a realização das análises – e por me receber tão bem no período em que fiquei na Argentina.

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi identificar por quanto tempo é possível armazenar o leite cru de búfala sob refrigeração controlada sem perder qualidade. O experimento foi desenvolvido entre os meses de setembro e outubro de 2019 na Látceos La Delfina, fazenda de búfalas leiteiras, com laticínio próprio, localizada na cidade de Las Flores, província de Buenos Aires, Argentina. As amostras de leite cru de búfala foram coletadas após a ordenha, totalizando 5 amostragens mantidas sob refrigeração controlada, com temperatura média de 5°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ). As análises dos parâmetros físico-químicos foram realizadas nos dias 1, 3, 5 e 7 de armazenamento para proteína, gordura, sólidos não gordurosos, sólidos totais e densidade no aparelho EkoMilk, além de temperatura, pH e acidez titulável em graus Dornic. Para as análises microbiológicas, amostras com 1, 3 e 6 dias de armazenamento foram encaminhadas ao laboratório na cidade de Buenos Aires. Não houve variação estatística significativa ( $p < 0.05$ ) para pH, proteína, gordura, sólidos não gordurosos e sólidos totais do leite cru durante os períodos de armazenamento refrigerado avaliados (dias 1, 3, 5 e 7). Entre os dias 5 e 7 de armazenamento ocorreu um aumento significativo ( $p < 0.05$ ) da acidez em graus Dornic e da densidade das amostras, bem como foi observada a presença de cheiro ácido. Nas análises microbiológicas, houve variação com tendência a aumento da contagem de microrganismos aeróbios mesófilos com os dias de armazenamento (dias 1, 3 e 6). Foram encontrados valores baixos para a contagem de coliformes totais, e ausência de valores significativos para *Escherichia coli*, além de baixas contagens de fungos e leveduras, e ausência dos agentes *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella spp* nos três períodos de armazenamento avaliados. Dessa forma, é possível concluir que o período ideal para armazenamento sob refrigeração controlada do leite cru de búfala sem perder qualidade é de até 5 dias.

**Palavras-chave:** Leite de búfala. Qualidade do leite. Leite cru. Armazenamento refrigerado.

## ABSTRACT

The objective of this study was to identify how long it is possible to store raw buffalo milk under controlled refrigeration without losing quality. The experiment was carried out from september to october 2019 in Lácteos La Delfina, a buffalo farm with its own dairy, located in the city of Las Flores, province of Buenos Aires, Argentina. Raw buffalo milk samples were collected after milking, totaling 5 samples kept under controlled refrigeration, with an average temperature of 5 °C ( $\pm 2$  °C). Analyzes of the physicochemical parameters were performed on days 1, 3, 5 and 7 of storage for protein, fat, non-fat solids, total solids and density in the EkoMilk, as well as temperature, pH and acidity in Dornic degrees. For microbiological analyzes, samples with 1, 3 and 6 days of storage were sent to the laboratory in the city of Buenos Aires. There was no statistically significant variation ( $p < 0.05$ ) for pH, protein, fat, non-fat solids and total solids of raw milk during the refrigerated storage periods evaluated (days 1, 3, 5 and 7). Between days 5 and 7 of storage there was a significant increase ( $p < 0.05$ ) in acidity in Dornic degrees and density of samples, as well as the presence of acid smell. In microbiological analyzes, there was variation with tendency to increase the count of mesophilic aerobic microorganisms with the storage days (days 1, 3 and 6). Low values for total coliform counts, no significant values for *Escherichia coli*, low fungal and yeast counts, and absence of *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella spp* were found in the three storage periods evaluated. Thus, it was concluded that the ideal period for controlled refrigerated storage of buffalo raw milk without losing quality is up to 5 days.

**Keywords:** Buffalo milk. Milk quality. Raw milk. Refrigerated storage.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Índices zootécnicos na bubalinocultura argentina.....	15
Tabela 2. Valores médios da composição do leite de búfalas na literatura.....	15
Tabela 3. Requisitos para características físicas e químicas do leite de acordo com o artigo 555 do Código Alimentario Argentino.....	18
Tabela 4. Resultados médios do teor de proteína, gordura, SNG e ST durante o tempo de armazenamento do leite cru refrigerado.....	24
Tabela 5. Resultados médios dos níveis de pH, acidez em graus Dornic e densidade durante o tempo de armazenamento do leite cru refrigerado.....	25
Tabela 6. Observações sobre as características físicas das amostras.....	28
Tabela 7. Resultado da análise microbiológica realizada em laboratório.....	28
Tabela 8. Resultado da análise microbiológica realizada em laboratório.....	30

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Média dos resultados de pH nas amostras de leite cru de búfala armazenadas sob refrigeração controlada por até 7 dias.....	25
Figura 2. Média dos resultados de acidez em graus Dornic nas amostras de leite cru de búfala armazenadas sob refrigeração controlada por até 7 dias.....	26
Figura 2. Média dos resultados de densidade nas amostras de leite cru de búfala armazenadas sob refrigeração controlada por até 7 dias.....	27

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. HIPÓTESE.....	12
3. OBJETIVOS .....	13
3.1. Objetivo geral	13
3.2. Objetivos específicos	13
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
4.1. Bubalinocultura na Argentina	14
4.2. Leite de búfala e suas propriedades	15
4.3. Legislação argentina para leite e seus derivados	17
4.4. Fatores que influenciam a qualidade do leite de búfala	19
4.5. Importância do armazenamento adequado do leite cru	20
5. MATERIAL E MÉTODOS .....	21
5.1. Origem da matéria prima	21
5.2. Coleta do leite de búfala e armazenamento das amostras	21
5.3. Análises físico-químicas	21
5.4. Análises microbiológicas	22
5.5. Análise estatística	22
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	24
6.1. Análise físico-química do leite cru de búfala armazenado sob refrigeração controlada por 7 dias	24
6.2. Análise microbiológica do leite cru de búfala armazenado sob refrigeração controlada por até 7 dias	28
7. CONCLUSÕES.....	31
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	32
9. ANEXO .....	36

## 1. INTRODUÇÃO

O búfalo (*Bubalus bubalis*) é um animal rústico, considerado resistente e, quando bem manejado, se adapta muito bem a rotina de ordenha e demonstra docilidade. A produção de leite bubalino atualmente se encontra em um cenário crescente, representando aproximadamente 13% do leite produzido no mundo, e esse crescimento deve-se principalmente às características físico-químicas, pois o mesmo apresenta teores de proteína, gordura, e minerais, como cálcio e fósforo, maiores quando comparado ao leite de vaca bovina (Zanela, 2011).

Em um trabalho realizado por Huhn et al. (1982), a composição de leite de bubalinos em comparação com o leite de zebuínos apresentou 43,8% mais sólidos totais, 43,6% mais gordura, 17,1% mais extrato seco desengordurado, 41,5% mais proteína, 2,4% mais lactose, 42,1% mais cálcio e 42,8% mais fósforo.

De sabor adocicado e coloração branca, devido à ausência de betacaroteno, é rico em vitaminas e minerais, e apesar de apresentar um maior teor de gordura que o leite bovino tornando-o um leite mais calórico, possui uma concentração total de colesterol menor do que a encontrada no leite de vaca (Amaral, 2005).

O leite de búfala também se destaca por possuir apenas a beta-caseína A2, e não a beta-caseína A1, proteína que está ligada ao surgimento de alergia – e que é responsável por sintomas como excesso de contrações intestinais e inflamações – demonstrando-se, assim, uma opção benéfica para as pessoas que têm sensibilidade a beta caseína A1 (Sheehan & Phipatanakul, 2009).

As propriedades já citadas do leite bubalino o tornam uma ótima matéria prima para a elaboração de derivados lácteos. O elevado teor de sólidos totais presente possui como consequência benéfica um maior rendimento final dos produtos, que acabam por refletir as propriedades do leite.

Entretanto, para manter todas essas características no produto final, é necessário que o armazenamento do leite que ainda não sofreu nenhum processamento seja feito de forma adequada. O leite cru contém uma grande variedade de bactérias provenientes do ambiente de produção (Teh et al., 2011), e o armazenamento sob condições de refrigeração, apesar de possibilitar o controle de microorganismos, quando há uma grande contaminação inicial do leite e o armazenamento é feito por períodos prolongados, pode ocorrer o favorecimento do

crescimento de microrganismos. Muitos destes podem ser eliminados com a pasteurização do leite, entretanto as enzimas lipolíticas e proteolíticas produzidas por estas bactérias são termorresistentes (Perin et al., 2012).

O presente trabalho objetivou identificar o tempo de armazenagem máximo do leite bubalino, sob refrigeração controlada sem perder qualidade.

## **2. HIPÓTESE**

Mesmo quando mantido sob refrigeração ao longo de 7 dias de armazenamento, o leite cru de búfala perde qualidade além de elevar as contagens microbiológicas.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Identificar por quanto tempo é possível armazenar o leite cru de búfala sob refrigeração sem que ele perca qualidade.

#### **3.2. Objetivos específicos**

1. Avaliar a estabilidade das propriedades físico-químicas do leite de búfala armazenado sob refrigeração por um período de até 7 dias.
2. Avaliar a multiplicação microbiana no leite de búfala armazenado sob refrigeração por um período de até 7 dias.
3. Identificar o período de armazenamento refrigerado do leite cru de búfala.

## 4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.1. Bubalinocultura na Argentina

O búfalo doméstico (*Bubalus bubalis*), também chamado de *water buffalo* – ou búfalo d'água – foi introduzido na América do Sul pela Guiana Francesa e Brasil, sendo estes animais de origem italiana (Long, 2003). Na Argentina, os búfalos foram introduzidos para o desenvolvimento de cruzamentos com bovinos para a produção leiteira, entretanto, com a ausência de sucesso devido incompatibilidade cromossômica, foi liberada a prática da caça esportiva. (Petrides, 1975; Crudeli et al., 2014).

As diversas mudanças ocorridas na Argentina, devido à expansão da agricultura, acabaram modificando o sistema de pecuário do país. A pecuária foi modificada do Norte para os trópicos, regiões em que o búfalo se apresenta superior em produtividade devido a sua rusticidade (Zava, 2007).

A Argentina é o terceiro maior produtor bubalino do continente americano, logo atrás do Brasil e Venezuela (SENASA, 2014). Em 2013 eram mais de 87 mil cabeças de búfalos, havendo a maior concentração na região Nordeste, nas províncias de Formosa, Corrientes, Chaco e Missões, das raças Mediterrâneo, Murrah e Jafarabadi, em grande parte importados do Brasil (Crudeli et al., 2014).

A maior parcela da bubalinocultura é desenvolvida para a produção de carne, em sistema extensivo com pastagem natural no nordeste do país, onde o clima é predominantemente subtropical, com condições em que a criação de gado bovino não é tão eficiente quanto ao bubalino, que apresenta índices zootécnicos mais satisfatórios conforme indica a Tabela 1 (Zava, 2007).

Tabela 1. Índices zootécnicos na bubalinocultura de corte argentina

<b>Índices zootécnicos</b>	<b>Valores</b>
Primeiro serviço das fêmeas	2/3 do peso adulto ou 2 anos
Taxa de natalidade	80-98%
Ganho de peso pré-desmama	700 g/dia
Ganho de peso pós-desmama	500 g/dia
Produção (kg/ha)	40-60 kg/ha/ano
Descarte das fêmeas	18-22 anos
Descarte dos machos	6-7 anos

Fonte: adaptado de Zava, 2007

A produção de leite bubalino iniciou-se em 1992, e até os dias atuais possui um incremento constante. Atualmente, existem estabelecimentos de produção leiteira nas províncias de Corrientes, Missões, Formosa, Santa Fé, Buenos Aires e Tucumán (Zava, 2007).

Há ainda a Associação Argentina de Criadores de Búfalos (AACB) fundada em 1983, que trabalha ativamente por melhoras, principalmente no setor de carne (Borghese, 2005). A AACB promove diversos eventos durante o ano, onde se reúnem produtores de todas as províncias, bem como de outros países como o Brasil.

#### **4.2. Leite de búfala e suas propriedades**

A exploração leiteira dos bubalinos é uma atividade que tem crescido no mundo nos últimos anos, e esse crescimento deve-se principalmente às características funcionais apresentadas pelo leite (Tabela 2), que possui níveis elevados de proteína, gordura e minerais quando comparado ao leite da vaca bovina (Zanela, 2011).

Tabela 2. Valores médios da composição do leite de búfalas na literatura

<b>Autor</b>	<b>Gordura (%)</b>	<b>Proteína (%)</b>	<b>Lactose (%)</b>	<b>Sólidos Totais (%)</b>
Verruma & Salgado (1994)	8,16	4,5	-	17,0
Amaral et al. (2004)	6,83	4,19	4,93	17,19
Patiño (2004)	7,22	3,85	4,49	16,35

Por apresentar teores superiores de gordura, o leite de búfala conseqüentemente apresenta um maior teor de sólidos totais (Verruma & Salgado, 1994), influenciando benéficamente o rendimento de derivados lácteos.

Apesar de ser mais calórico, a concentração total de colesterol por 100 gramas de lipídeos no leite de búfala é inferior a encontrada no leite das vacas bovinas (275 mg *versus* 330 mg por 100 g de gordura) (Franciscis & Di Palo, 1994). Os resultados apresentados por Verruma & Salgado (1994) também indicaram valores mais elevados de ácidos graxos de cadeia longa, como o ácido linoleico conjugado (CLA), popularmente conhecido como Ômega 3, que atua contra a obesidade, possui efeito anti-inflamatório e diminui os níveis de triglicerídeos do sangue.

De acordo com a FAO (1991), o leite bubalino apresenta teores elevados de proteína. As proteínas do leite são divididas em caseínas – as principais – e proteínas do soro (albumina, globulinas e imunoglobulinas), que representam aproximadamente 20% do total das proteínas presentes. Um aspecto importante com relação às caseínas, é que foi verificado em um estudo de caso realizado em Harvard (Sheehan & Phipatanakul, 2009) que pessoas que possuíam alergia às proteínas do leite bovino não demonstravam as mesmas reações quando consumiam leite bubalino. Isso se deve ao fato de que o leite de búfala possui apenas a beta-caseína A2 e não a beta-caseína A1, proteína que está ligada ao surgimento de inflamações intestinais, excesso de contrações, e responsável pelo desencadeamento de alergias no consumo leite de vaca (Mishra et al., 2009).

O leite de búfala é uma importante fonte das vitaminas, como a B2 (riboflavina), que atua no funcionamento do sistema nervoso e um potente antioxidante; e das vitaminas A (retinol) e C (ácido ascórbico), que também possuem função antioxidante, além de auxiliarem no funcionamento do sistema imunológico, e vitamina D, cuja principal função é regular o fornecimento de cálcio e fósforo no organismo.

Uma importante característica do leite de bubalino e de seus derivados é a cor branca, que ocorre devido à ausência de betacaroteno no leite de búfala. O betacaroteno é um carotenoide – pigmento natural – precursor da vitamina A, ou seja, ao ingerir alimentos fonte betacaroteno, como os derivados de leite bovino que possuem cor amarelada, a conversão em vitamina A (retinol) ocorre no organismo. Já no leite e derivados bubalinos, a vitamina A encontra-se prontamente disponível para a absorção, não havendo a necessidade de conversão.

Rico em minerais, se destaca pelos teores de Cálcio e Ferro, apresentando uma relação Ca:P de 1,71, enquanto no leite bovino é de 1,31 (Franciscis & Di Palo, 1994). Conforme a literatura consultada, os valores da composição mineral estão suscetíveis à variações devido a fatores como o estágio de lactação dos animais e a nutrição.

De acordo com Verruma & Salgado (1994), o leite de búfala possui 25,5% mais aminoácidos essenciais que o leite de vaca, o que é importante para a manutenção de todos os órgãos do corpo.

Todas essas propriedades refletem nos produtos derivados, que além de possuírem inúmeros benefícios para a saúde, ainda possuem um rendimento elevado. Isso se deve, além do teor de sólidos totais, ao tamanho das micelas de caseína – que são maiores que as de leite de vaca –, e dessa forma, a coalhada elaborada retém menos água (Ganguli, 1979). Enquanto que, para a fabricação de 1 kg de queijo Mozzarella de leite bovino são necessários de 10 a 12 litros de leite, para a fabricação com leite bubalino é necessário até 50% menos, apenas de 5 a 8 litros (Silva et al., 2003).

#### **4.3. Legislação argentina para leite e seus derivados**

A legislação referente ao leite e demais derivados lácteos na Argentina é o Código Alimentario Argentino do Ministerio de Agricultura, Ganaderia y Pesca Presidencia de la Nación, que se tornou vigente através da Lei 18.284 – regulamentada pelo Decreto 2126/71 (Argentina, 2006).

As normas do Código Alimentario Argentino estão divididas em vinte e dois capítulos, sendo o capítulo VIII referente aos alimentos lácteos que, de acordo com o artigo 553, se entende como: “todo o leite obtido de vacas ou de outros mamíferos, seus derivados ou subprodutos, simples ou elaborados, destinados a alimentação humana” (Argentina, 2006). De acordo com o artigo 555, o leite destinado ao consumo ou fabricação de derivados deverá atender critérios físicos e químicos descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Requisitos para características físicas e químicas do leite de acordo com o artigo 555 do Código Alimentario Argentino

<b>Requisito</b>	<b>Limites</b>
Densidade a 15°C (g/ml)	1,028 a 1,034
Acidez (°D)	14 a 18
Índice crioscópico (°C)	máx. -0,512
Gordura (%)	mín. 3
SNG (%)	mín. 8,2
Proteína (%)	mín. 2,9

Adaptado: Código Alimentar Argentino, cap. VIII, artigo 555 (Resolución Conjunta SPRyRS y SAGPyA N° 33/2006 y N° 563/2006)

Com relação aos valores dos parâmetros físico-químico apresentados na Tabela 3 e exigidos para o leite cru refrigerado, todos se encontram dentro dos limites exigidos pela legislação brasileira, com exceção dos Sólidos Não Gordurosos (SNG), que no Código Alimentar Argentino o limite mínimo é de 8,2%, enquanto na instrução normativa brasileira (IN76) o limite mínimo é de 8,4% para leite bovino (Brasil, 2018).

Com relação a Contagem Total de Bactérias (CBT), os resultados do leite cru em uma temperatura igual a 30°C, ou seja, sem tratamento térmico, não podem superar os limites de 200.000 UFC/cm<sup>3</sup>. Já para a Contagem de Células Somáticas (CCS), não deve superar o limite de 400.000 cel/cm<sup>3</sup> (Argentina, 2006).

Segundo o artigo sétimo da Instrução Normativa n°76 (Brasil, 2018), o leite cru refrigerado deve apresentar a Contagem Padrão em Placas de no máximo 300.000 UFC/mL e Contagem de Células Somáticas de no máximo 500.000 cel/mL. Esses valores apresentados pela legislação brasileira são superiores aos exigidos pelo Código Alimentar Argentino, demonstrando uma menor exigência com relação a estes parâmetros microbiológicos.

O leite, livre de impurezas, deve ser resfriado e mantido a uma temperatura inferior a 5°C logo após a ordenha, até ser submetido ao tratamento térmico. De acordo com o Código Alimentario Argentino, este leite sem tratamento prévio, com a finalidade apenas de processamento na indústria, é chamado de leite fluido a granel de uso industrial, ou seja, não poderá ser destinado diretamente ao consumidor final.

Com relação aos parâmetros microbiológicos, na Argentina não há legislação para o leite fluido a granel de uso industrial, apenas para o leite cru certificado destinado ao consumo direto e demais derivados lácteos.

Apesar dos benefícios nutricionais, do rendimento industrial e do crescimento de sua exploração no país, ainda não há legislação específica para o leite de búfala na Argentina, assim como no Brasil.

#### **4.4. Fatores que influenciam a qualidade do leite de búfala**

A qualidade do leite de búfala pode variar devido a diversos fatores que influenciam cada um de seus componentes, como fatores ambientais, nutrição, raça, ordem de parto e estágio da lactação.

Em um estudo desenvolvido por Amaral et al. (2004), foi demonstrado que os níveis de gordura, proteína e sólidos totais são os mais susceptíveis a influência desses fatores. Foram reportados maiores percentuais de gordura na primavera e menores no outono e no verão; enquanto que para a proteína, há teores mais elevados no verão e os menores no inverno. As variações dos sólidos totais acompanharam as dos níveis de gordura, devido a este ser o teor que sofre maior alteração.

Essas variações que ocorrem na qualidade do leite referente as estações do ano podem ser explicadas, em parte, devido ao comportamento reprodutivo das búfalas. O fotoperíodo é o principal regulador desse comportamento, pois as búfalas são poliéstricas sazonais de dias curtos, ou seja, possuem como estímulo para a reprodução a diminuição da luminosidade (Torres-Jr, 2016; Rocha et al., 2011). Dessa forma, com a estação de monta estabelecida nos meses de outono, há a concentração das parições nos meses de verão.

Para o padrão racial, foi observado uma certa superioridade da produção de animais da raça Murrah, que são de menor porte e, conseqüentemente, possuem um menor requerimento nutricional, em relação às demais; porém as raças mestiças apresentaram maior teor de gordura e proteína no leite (Tonhati, 1999; Faria et al., 2002).

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

#### **4.5. Importância do armazenamento adequado do leite cru**

O principal método utilizado para armazenamento de leite afim de controlar o crescimento bacteriano é a refrigeração. Entretanto, conforme Perin et al. (2012), para que ocorra um controle adequado do desenvolvimento bacteriano, a temperatura de refrigeração ideal para o leite cru é de 4°C.

A ausência de condições ideais de refrigeração e armazenamento possibilitam o desenvolvimento de microorganismos mesófilos (entre os 20 e os 45 °C), como por exemplo os coliformes. Além disso, há também os microorganismos psicrotóxicos que, mesmo possuindo temperatura de crescimento ótimo que varia de 20°C a 30°C, se desenvolvem bem em temperaturas iguais ou inferiores a 7°C (Perin et al., 2012).

Apesar de muitos desses microorganismos serem sensíveis à pasteurização, algumas espécies produzem enzimas de ação lipolítica e/ou proteolítica, capazes de resistirem ao calor, chamadas termorresistentes. Essas enzimas são consideradas os principais fatores de degradação das propriedades do leite e de produtos derivados.

No estudo desenvolvido por Teh et al. (2011), além de microorganismos produtores de enzimas termorresistentes, ainda foram identificadas bactérias que possuíam a capacidade de produzir biofilmes em superfícies de aço inoxidável, como a dos tanques de refrigeração e dos caminhões de transporte. Os biofilmes podem criar um ambiente favorável à sobrevivência microbiana, especialmente quando as condições de crescimento são adequadas, como a temperatura acima do ideal para o armazenamento do leite (Teh et al., 2011).

No leite cru, as caseínas são os componentes proteicos mais suscetíveis a bactérias psicrotóxicas (Barnes et al., 1999), que produzem proteases com a capacidade de degradar as micelas de caseína e causar a coagulação do leite (Fairbairn & Law, 1986).

A qualidade final dos derivados lácteos pode ser reduzida devido ao crescimento de diferentes tipos de bactérias, resultando na deterioração causada por enzimas produzidas (Teh et al., 2011). Como resultado da ação destas enzimas, há o amargor e rancificação do leite (Teh et al., 2011), redução da vida de prateleira, e uma consequente rejeição do produto final pelo consumidor.

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1. Origem da matéria prima**

O experimento foi realizado na Látceos La Delfina, propriedade de búfalas leiteiras com laticínio próprio, localizada no município de Las Flores, província de Buenos Aires, Argentina. A fazenda possuía, durante o período de experimento, 60 fêmeas em lactação, das raças Murrah, Mediterrâneo e cruza, alimentadas com alimento balanceado (16% de proteína bruta), silagem de milho e pastagem cultivada.

A ordenha era realizada duas vezes ao dia, às 4h da manhã e às 16h da tarde, e logo após a ordenha, o leite era transportado por aproximadamente 100 metros em tarros até o tanque resfriador, localizado na área externa do laticínio.

### **5.2. Coleta do leite de búfala e armazenamento das amostras**

As coletas e as análises foram realizadas entre os meses de setembro e outubro de 2019. O leite era coletado diretamente dos tarros logo após a ordenha, antes de ir para o tanque resfriador. Como haviam sete tarros de leite, a coleta era feita em apenas um, escolhido de forma aleatória.

Todas as amostras foram acondicionadas em frascos de vidro, totalizando 5 amostragens. Cada amostra continha 500 ml de leite cru de búfala, que foi fracionado em 5 alíquotas de 100 ml, sendo 4 alíquotas utilizadas para análise de parâmetros físico-químicos e 1 alíquota para microbiológico, escolhidas aleatoriamente. Ao fracionar as amostras em alíquotas, foi possível fazer a análise do dia sem manusear e, possivelmente, contaminar o restante da amostra.

Os frascos foram mantidos sob refrigeração controlada, com temperatura média de 5°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ) e monitorada durante o período de avaliação.

### **5.3. Análises físico-químicas e sensoriais**

As análises foram iniciadas de 12-24 horas após a coleta, de forma a simular o período médio em que o leite permanece no resfriador antes de ser processado. As mesmas foram realizadas em dias intercalados (1, 3, 5 e 7) de armazenamento, sempre em triplicata.

Os parâmetros físico-químicos analisados nas amostras de leite cru refrigerado incluem proteína, gordura, sólidos não gordurosos, sólidos totais, densidade, temperatura, pH e acidez titulável em graus Dornic.

As análises de proteína, gordura, sólidos não gordurosos, sólidos totais, ponto de congelamento e densidade foram determinadas pelo aparelho EkoMilk (Milkana KAM98-2A milk analyzer) na configuração sheep/buffalo/goat milk (leite de ovelha/búfalo/cabra).

As avaliações de temperatura foram realizadas com o termômetro do laticínio e de pH no potenciômetro modelo HANNA HI-9025, calibrado entre pH 4,0 e 7,0.

Os testes para acidez em graus Dornic foram realizados conforme a determinação usualmente utilizada no laticínio, segundo a metodologia do Instituto Nacional de Racionalización de Materiales padrão 14005 (IRAM, 1976). Para 10 ml de amostra são adicionadas 4 gotas de reagente (solução de fenoftaleína), e a mistura é titulada com solução 0.1 N de NaOH até o ponto de viragem (cor rosa).

#### **5.4. Análises microbiológicas**

Para a análise microbiológica, três alíquotas de amostras diferentes (amostras 2, 3 e 4) foram acondicionadas sob refrigeração e encaminhadas ao laboratório LACLE – Laboratorios Calidad de Leche – localizado na cidade de Buenos Aires, para caracterização microbiológica. Esta inclui: contagens de microorganismos mesófilos (FIL 100B:1991), coliformes totais (FIL-IDF 73B:1982), *Escherichia coli* (FIL 170:1994/PC), *Staphylococcus coagulase positiva* (FIL 60B:1990 / FIL 145A:1997), fungos e leveduras (FIL 94B:1990), *Salmonella spp.* (FIL-IDF 93B:1995) e *Listeria monocytogenes* (FIL 143:1990). A pesquisa e contagem de microrganismos foi realizada nos dias 1, 3 e 6, do armazenamento do leite.

#### **5.5. Análise estatística**

Os dados foram coletados com as devidas identificações de amostra, data de coleta, e data e hora de análise. Após, foram transferidos e organizados em planilhas do programa Microsoft Excel 2013 para a obtenção de médias, elaboração de gráficos e de tabelas. O delineamento estatístico utilizado foi o delineamento inteiramente casualizado, e os resultados foram avaliados no software SAS - *Statistical Analysis System 9.0*, por análise de variância (ANOVA) seguida pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Modelo estatístico:

$$P_{ij} = \mu + d_i + e_{ij}$$

$P_j$  = Resultado do tratamento i na repetição j (propriedades do leite);

$\mu$  = Média geral;

$d_i$  = Efeito do tratamento i (dias de armazenamento refrigerado);

$e_{ij}$  = Erro associado às observações.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1. Análise físico-química do leite cru de búfala armazenado sob temperatura controlada por 7 dias

Os valores médios dos resultados de proteína, gordura, sólidos não gordurosos (SNG) e sólidos totais (ST) das amostras de leite cru refrigerado armazenadas a 5°C ( $\pm$  2°C) estão apresentados na Tabela 4. Os resultados encontrados nas amostras de leite analisadas estão de acordo com a legislação estabelecida para o leite cru a granel de uso industrial, e também com os valores reportados na literatura para leite de búfala.

A Argentina e o Brasil não possuem legislação federal específica para o leite bubalino, entretanto no Estado de São Paulo são estabelecidos valores para o leite de búfala através da Resolução SAA – 24 (São Paulo, 1994), em que se considera normal o leite que apresentar no mínimo 4,5% de gordura e 8,57% de sólidos não gordurosos.

Tabela 4. Resultados médios do teor de proteína, gordura, SNG e ST durante o tempo de armazenamento do leite cru refrigerado

<b>Propriedade</b>	<b>Dia 1</b>	<b>Dia 3</b>	<b>Dia 5</b>	<b>Dia 7</b>
Proteína (%)	4,56 <i>a</i>	4,58 <i>a</i>	4,63 <i>a</i>	4,77 <i>a</i>
Gordura (%)	7,0 <i>a</i>	7,1 <i>a</i>	6,66 <i>a</i>	6,57 <i>a</i>
SNG (%)	9,68 <i>a</i>	9,7 <i>a</i>	9,7 <i>a</i>	9,89 <i>a</i>
ST (%)	16,68 <i>a</i>	16,8 <i>a</i>	16,42 <i>a</i>	16,52 <i>a</i>

As letras iguais em sobrescrito indicam ausência de diferença estatística ( $p < 0,05$ ) na mesma linha

Observa-se que não houve variação estatística significativa ( $p < 0,05$ ) para nenhuma das propriedades avaliadas durante os períodos de armazenamento refrigerado. Com base nos estudos realizados na literatura, os resultados obtidos no presente trabalho, sem variação significativa para proteína e gordura, podem ser indicativos de ausência de microorganismos psicrotróficos produtores de enzimas proteolíticas e/ou lipolíticas em quantidades expressivas, ou que não houve tempo suficiente para a sua ação.

Os valores médios dos resultados de pH, acidez em graus Dornic e densidade das amostras de leite cru refrigerado armazenadas a 5°C ( $\pm$  2°C) estão apresentados na Tabela 5. Observa-se que não houve diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) no pH (Figura 1) entre os

períodos de armazenamento refrigerado, e os mesmos estão de acordo com o reportado nas literaturas estudadas, de que o pH varia entre 6,4 a 6,8 quando fresco (Hühn et al., 1991).

Tabela 5. Resultados médios dos níveis de pH, acidez em graus Dornic e densidade durante o tempo de armazenamento do leite cru refrigerado

<b>Propriedade</b>	<b>Dia 1</b>	<b>Dia 3</b>	<b>Dia 5</b>	<b>Dia 7</b>
pH	6,78 <i>a</i>	6,53 <i>a</i>	6,49 <i>a</i>	6,46 <i>a</i>
Acidez (°D)	14,8 <i>a</i>	17,4 <i>a</i>	19,2 <i>ab</i>	23,2 <i>b</i>
Densidade	1,0279 <i>a</i>	1,0279 <i>a</i>	1,0285 <i>ab</i>	1,0294 <i>b</i>

As letras iguais em sobrescrito indicam ausência de diferença estatística ( $p < 0,05$ ) na mesma linha

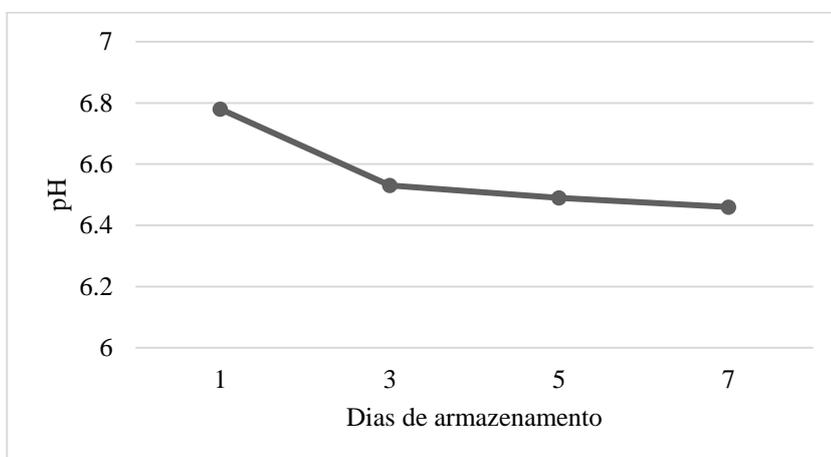


Figura 1. Média dos resultados de pH nas amostras de leite cru de búfala armazenadas sob refrigeração controlada por até 7 dias

A acidez em graus Dornic está de acordo com a legislação para leite cru a granel de uso industrial (Argentina, 2006) até o terceiro dia de armazenamento refrigerado, que estabelece um limite de 14°D a 18°D. Entretanto, entre os dias 5 e 7 ocorre um aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) da acidez nas amostras (Tabela 5). Esses resultados evidenciam uma tendência à acidificação no leite cru refrigerado (Figura 1), podendo ser resultado de contaminação microbiológica, que devido a produção de ácido lático por microorganismos, eleva a acidez do substrato.

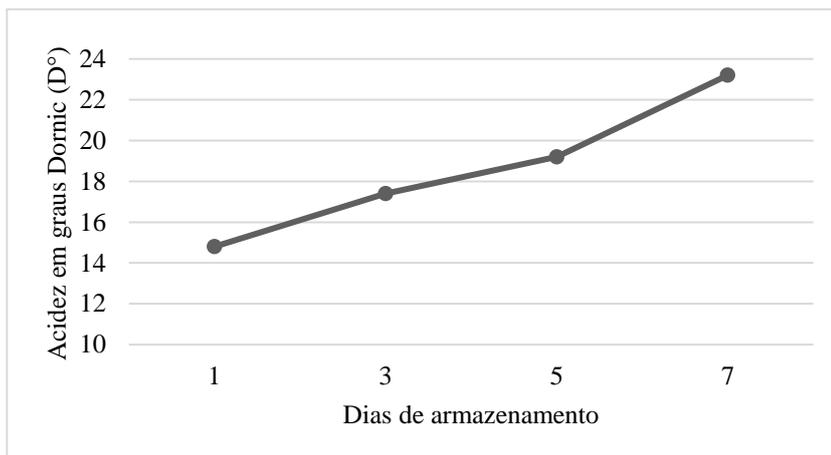


Figura 2. Média dos resultados de acidez em graus Dornic nas amostras de leite cru de búfala armazenadas sob refrigeração controlada por até 7 dias

Apesar da elevação, os valores encontrados até o dia 3 são inferiores aos encontrados na literatura para leite de búfala. Segundo Macedo et al. (2001), a acidez titulável do leite da búfala tende a ser mais elevada que a encontrada no leite bovino, por exemplo, devido ao fato de os bubalinos apresentarem maior quantidade de caseínas, e estas possuírem micelas em maior número e diâmetro. Hühn et al. (1991) identificou, nas análises de rotina, valores de acidez superiores ao presente trabalho, de 17 a 23°D, sem apresentar problemas durante o beneficiamento, e Patiño et al. (2002) reportou uma média de 19,2°D para búfalas em pastagem natural. No Estado de São Paulo, a legislação vigente (São Paulo, 1994) para leite de búfala, estabelece valores mínimos de acidez entre 14 e 23°D.

A densidade das amostras está de acordo com o estabelecido no Código Alimentario Argentino, e diferiu estatisticamente ( $p < 0.05$ ) somente entre os dias 5 e 7 de armazenamento refrigerado (Tabela 5). Apesar da tendência a elevação com os dias de armazenamento (Figura 2), os valores referentes a densidade encontrados no presente trabalho ainda são inferiores aos reportados na literatura. Os valores médios de densidade encontrados por Hühn et al. (1982), para raça Mediterrânea variaram de 1,0314 a 1,0336 g/ml, e se aproximam daqueles observados por Furtado (1980).

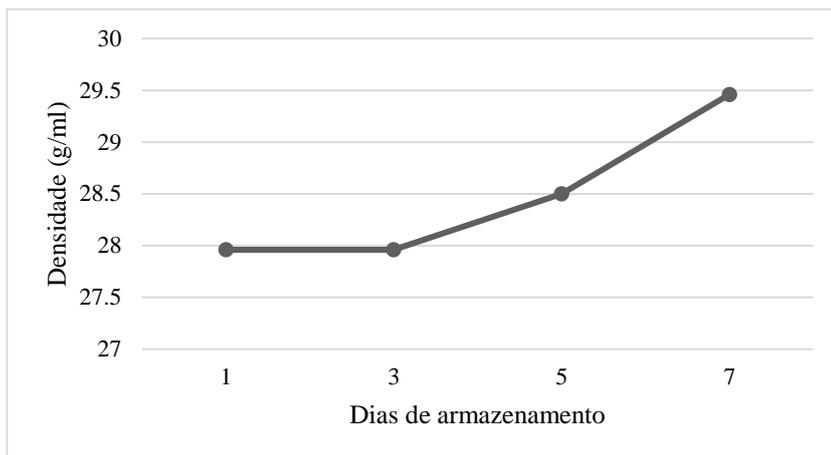


Figura 3. Média dos resultados de densidade nas amostras de leite cru de búfala armazenadas sob refrigeração controlada por até 7 dias

Durante o período experimental foram feitas observações, antes da homogeneização, sobre características físicas que as amostras apresentavam, como odor ácido e formação de película, e estão descritas na Tabela 6. Deve-se considerar que as amostras se encontravam estáveis durante o armazenamento, e não com agitação contínua como ocorre dentro de um tanque resfriador, o que pode justificar a formação de película. Na forma de armazenamento experimental também não foi possível simular o aumento de temperatura que ocorre no tanque resfriador a cada ordenha adicionada. A formação de película é originada através de um processo chamado cremificação da gordura, que ocorre porque o leite não foi homogeneizado.

Observa-se prioritariamente que, a partir do quinto dia de armazenamento, duas amostras apresentaram cheiro ácido, e no sétimo dia todas apresentavam. Esse fato está relacionado com o aumento da acidez das amostras que, expressa em graus Dornic, se apresentou estatisticamente significativa entre os dias 5 e 7 de armazenamento refrigerado.

Tabela 6. Observações sobre as características sensoriais das amostras

<b>Amostra</b>	<b>Observação</b>	<b>Dia 1</b>	<b>Dia 3</b>	<b>Dia 5</b>	<b>Dia 7</b>
1	Aroma ácido	Ausência	Presença	Presença	Presença
	Película	Ausência	Presença	Presença	Presença
2	Aroma ácido	Ausência	Ausência	Ausência	Presença
	Película	Ausência	Ausência	Ausência	Presença
3	Aroma ácido	Ausência	Ausência	Ausência	Presença
	Película	Ausência	Presença	Presença	Presença
4	Aroma ácido	Ausência	Ausência	Ausência	Presença
	Película	Ausência	Presença	Presença	Presença
5	Aroma ácido	Ausência	Ausência	Presença	Presença
	Película	Ausência	Ausência	Presença	Presença

## 6.2. Análise microbiológica do leite cru de búfala armazenado sob temperatura controlada por até 7 dias

O leite é uma matéria prima que pode ser contaminado por diversos microrganismos presentes desde a ordenha até o seu processamento. Microorganismos estes que podem estar presentes na glândula mamária, no exterior do úbere, nos equipamentos de ordenha e no tanque resfriador, assim como nas mãos do ordenhador. Dessa forma, esses fatores são determinantes para a qualidade microbiológica do leite, que também é influenciada diretamente pela temperatura e tempo de armazenagem do leite, porque estes estão ligados às condições ideais de multiplicação dos microrganismos.

Os resultados das análises laboratoriais para microrganismos aeróbios mesófilos, coliformes totais e *Escherichia coli* das amostras de leite cru refrigerado armazenadas a 5°C ( $\pm$  2°C) estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Resultado da análise microbiológica realizada em laboratório

<b>Amostra</b>	<b>Dias</b>	<b>Aeróbios mesófilos (UFC/ml)</b>	<b>Coliformes totais (UFC/ml)</b>	<b><i>Escherichia coli</i> (UFC/ml)</b>
2	6	8970	20	<1
3	3	12710	40	<1
4	1	6390	20	<1

De acordo com o Código Alimentario Argentino (Argentina, 2006), não há limites microbiológicos estabelecidos para o leite cru a granel de uso industrial, entretanto, o leite cru certificado destinado ao consumo direto deve apresentar nos seus resultados ausência de microorganismos patogênicos, conter menos de 10 bactérias coliformes/ml e conter menos de 10.000 bactérias mesófilas/ml na recepção ao consumidor. Dessa forma, o leite analisado não estaria dentro das exigências para consumo direto ainda cru.

O grupo dos microrganismos aeróbios mesófilos é capaz de se multiplicar entre 10°C e 45°C, sendo a temperatura ideal em torno de 30°C, ou seja, o resfriamento adequado do leite logo após a ordenha reduz significativamente a sua multiplicação. A quantificação desses microorganismos visa indicar a contaminação geral do leite e a qualidade higiênica (Franco & Landgraf, 1996). Avaliando os resultados encontrados, é possível acompanhar as variações ao longo do período armazenado, com tendência a aumento da contagem com o aumento dos dias de armazenamento. Observa-se que o dia 3 de armazenamento da amostra de número 3, há uma contagem mais elevada que no dia 6 de armazenamento da amostra de número 2. Por se tratarem de amostras de ordenhas diferentes, esse resultado pode estar relacionado com a higiene da ordenha especificamente no dia da coleta da amostra de número 3.

Os coliformes totais indicam a contaminação ambiental, enquanto a presença de *Escherichia coli*, um coliforme termotolerante, indica a contaminação de origem fecal (Souza, 2006). Não existe legislação determinando as quantidades de coliformes totais em leite cru, porém de acordo com a literatura, contagens acima de 100 UFC/mL de bactérias do grupo coliforme indicam falhas graves na higiene durante a ordenha (Chambers, 2002). Foram encontrados valores relativamente baixos para a contagem de coliformes totais, e ausência de valores significativos para *Escherichia coli*, indicando a existência de práticas higiênicas na ordenha.

Na Tabela 8, estão descritos os resultados das análises laboratoriais para *Staphylococcus* coagulase positiva, fungos e leveduras, *Salmonella spp.* e *Listeria monocytogenes* das amostras de leite cru refrigerado armazenadas a 5°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ).

Tabela 8. Resultado da análise microbiológica realizada em laboratório

<b>Amostra</b>	<b>Dias</b>	<b><i>Staphylococcus</i> coagulase positiva</b>	<b>Fungos e leveduras (UFC/ml)</b>	<b><i>Salmonella</i> spp. (UFC/25ml)</b>	<b><i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> (UFC/25ml)</b>
2	6	Ausência	2	Ausência	Ausência
3	3	Ausência	4	Ausência	Ausência
4	1	Ausência	1	Ausência	Ausência

O *Staphylococcus* é um indicador da sanidade do rebanho, pois é o agente causador de mastite de maior ocorrência (Zafalon et al., 2008), e pode ser causador de intoxicações de origem alimentar. A contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva nas amostras de leite cru refrigerado indicou ausência do agente *S. aureus*, sendo considerado seguro.

Os fungos e leveduras são de alta importância na conservação porque são agentes de deterioração, possuem a capacidade de degradar proteínas e lipídeos semelhante à das enzimas bacterianas, podendo influenciar nas características físico químicas do leite e seus derivados. No presente trabalho, foram identificadas baixas contagens de fungos e leveduras.

A *Listeria monocytogenes* é uma bactéria psicrotrófica patogênica, e sua ampla distribuição ambiental é favorecida pela sua capacidade de tolerar pH extremos, baixa atividade da água e concentrações de NaCl de 10% e até superiores. Estas características a tornam um objeto de grande interesse na área de alimentos, visto a dificuldade de sua eliminação, bem como o risco oferecido ao consumidor (Catão et al., 2001). O presente estudo não detectou a presença de *L. monocytogenes* nas amostras de leite cru refrigerado em nenhum dos três períodos de armazenamento em estudo, bem como a ausência do gênero *Salmonella* spp.

## 7. CONCLUSÕES

Os resultados encontrados nas amostras de leite analisadas estão de acordo com os limites estabelecidos pelo Código Alimentario Argentino. Como não houve variação significativa para pH, proteína, gordura, sólidos não gordurosos e sólidos totais durante os períodos de armazenamento refrigerado, as propriedades do leite cru de búfala demonstraram boa estabilidade frente ao armazenamento sob temperatura controlada de 5°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ).

O aumento significativo da acidez titulável em graus Dornic entre os dias 5 e 7 de armazenamento influenciaram negativamente as propriedades organolépticas do leite, através à presença de aroma ácido.

Com relação as análises microbiológicas, apesar de ter sido possível identificar uma certa tendência de elevação das contagens, devido ao baixo número de amostras utilizadas, são necessários mais testes para resultados mais conclusivos. Entretanto, o leite amostrado possui boa qualidade microbiológica, por se tratar de leite a granel de uso industrial que irá passar pelo processo térmico de pasteurização.

Dessa forma, é possível concluir no presente trabalho, que o período ideal para armazenamento sob refrigeração controlada do leite cru de búfala sem perder qualidade e, consequentemente influenciar negativamente os derivados lácteos, é de até 3 dias.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, F. R.; CARVALHO, L. B.; SILVA, N.; BRITO, J. R. F. **Qualidade do leite de búfalas: composição.** Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte, v. 29, n. 2, p. 106-110. 2005.

AMARAL, F. R.; CARVALHO, L. B.; SILVA, N.; BRITO, J. R. F.; SOUZA, G. N. **Composição e contagem de células somáticas em leite bubalino na região do Alto São Francisco, Minas Gerais, Brasil.** Rev Inst Lat Cândido Tostes, v. 59, p. 37-41. 2004.

ARGENTINA. Código Alimentario Argentino (CAA). **Cap. VIII: Alimentos lácteos.** 2006.

BARNES, L. M.; LO, M. F.; ADANS, M. R.; CHAMBERLAIN, A. H. L. **Effect of milk proteins on adhesion of bacteria to stainless steel surfaces.** Applied and Environmental Microbiology, 65, p. 4543-4548. 1999.

BERNARDES, O. **Necessidades nutricionais de búfalas leiteiras.** 2º Encuentro Nacional de Criadores de Búfalos, Bucaramanga, Colômbia. 2010.

BORGHESE, A. In: Technical Series 67. **Food and Agriculture Organization (FAO)**, Rome, Italy. 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa 76 de 26 de novembro de 2018. Dispõe sobre identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A.** Diário Oficial da União, Brasília, Seção 1, 30 nov. 2018

CATÃO, R.M.R; CEBALLOS, B.S.O. **Listeria ssp, coliformes totais, coliformes fecais e Escherichia coli no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no estado da Paraíba (BR).** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 21, n. 3, p. 281-287. 2001.

CHAMBERS, J. V. **The microbiology of raw milk.** In: ROBINSON, R. K. Dairy microbiology handbook: the microbiology of milk and milk products. 3. ed. New York: John Wiley and Sons, p. 39-90. 2002.

CRUDELI, G.A.; PATINO, E.M.; MALDONADO VARGAS, P.; KONRAD, J.L. **Pasado, presente y futuro del búfalo en Argentina.** Rev. vet. Corrientes, v. 25, n. 2, p. 140-145. 2014.

FABRO, M. A.; MILANESIO, H. V.; ROBERT, L. M.; SPERANZA, J. L.; MURPHY, M.; RODRÍGUEZ, G.; CASTAÑEDA, R. Technical Note: **Determination of Acidity in Whole**

**Raw Milk: Comparison of Results Obtained by Two Different Analytical Methods.** Journal of Dairy Science, 89(3), 859–861. 2006.

FAIRBAIRN, D. J.; LAW, B. A. **Proteinases of psychrotrophic bacteria - their production, properties, effects and control.** Journal of Dairy Research, 53, p. 139-177. 1986.

FAO. **O búfalo.** Brasília: Ministério da Agricultura, São Paulo, Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos, p. 320. 1991.

FARIA, M. H.; TONHATI, H.; CERÓN-MUÑOZ, M.; DUARTE, J. M. C.; VASCONCELOS, B. F. **Características físico-químicas do leite de búfalas ao longo da lactação.** Rev Inst Lat Cândido Tostes, v. 57, n. 324, p. 3-7. 2002.

FRANCISCIS, G.; Di PALO, R. **Buffalo milk production.** In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 4., 1994, São Paulo. v. 1, p. 137-146. 1994.

FRANCO, B. D. G. H. & LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos.** Ed. Atheneu. São Paulo, 46-50, p.182. 1996.

FURTADO, M. M. **Leite de búfala: estudo da fabricação do queijo azul.** Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes", Juiz de Fora, v.35, n.207, p.23-28. 1980.

GANGULI, V.C. **Tecnologia de la leche de búfala.** Revista Mundial de Zootecnia, Roma, v.30, p. 2-10. 1979.

HÜHN, S.; GUIMARÃES, M. C. de F.; NASCIMENTO, C. N. B. do; CARVALHO, L. O. D. de M.; MOREIRA, E. D.; LOURENÇO JUNIOR, J. de B. **Estudo comparativo da composição química do leite de zebuínos e bubalinos.** EMBRAPA-CPATU. Boletim de pesquisa, 36. Belém, PA. 1982.

HÜHN, S.; LOURENÇO JUNIOR, J. B.; MOURA CARVALHO, L. O. D.; NASCIMENTO, C. N. B.; VIEIRA, L. C. **Características, peculiaridades e tecnologia do leite de búfalas.** Belém: EMBRAPA – CPATU, 51p. (EMBRAPA - CPATU. Documentos, 57). 1991.

IRAM. Instituto Nacional de Racionalización de Materiales. **Standard no. 14005 and Standard no. 14014.** Buenos Aires, Argentina. 1976

LONG J. L. **Introduced mammals of the world: their history, distribution and influence.** Wallingford, UK: CABI Publishing, xxi + 589 pp. 2003.

MACEDO, M. P.; WECHSLER, F. S.; RAMOS, A. A.; AMARAL, J. B.; SOUZA, J. C.; RESENDE, F. D.; OLIVEIRA, J. V. **Composição físico-química e produção do leite de búfalas da raça Mediterrâneo no Oeste do Estado de São Paulo**. Revista Brasileira de Zootecnia. Viçosa. v. 30, n. 3. sup. 1. 2001.

MISHRA, B. P.; MUKESH, M.; PRAKASH, B.; SODHI, M.; KAPILA, R.; KISHORE, A.; KATARIA, R. R.; JOSHI, B. K.; BHASIN, V.; RASSOL, T. J.; BUJARBARUAH, K. M. **Status of milk protein,  $\beta$ -casein variantes among Indian milch animals**. Indian Journal of Animal Sciences, 79 (7): p. 722-725. 2009.

PATIÑO, E. M. **Factores que afectan las propiedades físicas y la composición química de la leche de búfalas (*Bubalus bubalis*) en Corrientes, Argentina**. Rev. vet. 15:1, p. 21–25. 2004.

PATIÑO, E.M.; MENDEZ, F.I.; CEDRES, J.F.; GUANZIROLI STEFANI, M.C. **Caracterización de leche de búfalas mestizas en pastizales naturales de Corrientes, Argentina**. Rev. Arg. Prod. Anim., v. 22, n. 3-4. 2002.

PERIN, L. M.; MORAES, P. M.; ALMEIDA, M. V.; NERO, L. A. **Intereference of storage temperatures in the development of mesophilic, psychrotrophic, lipolytic and proteolytic microbiota of raw milk**. Ciências Agrárias, Londrina, v. 33, n. 1, p. 333-342. 2012.

PETRIDES, G. A. **The Importation of Wild Ungulates into Latin America, with Remarks on Their Environmental Effects**. Environmental Conservation, 2(01), 47. 1975.

ROCHA, R. M. P.; MATOS, M. H. T.; LIMA, L. F.; SARAIVA, M. V. A.; ALVES, A. M. C. V.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. **Melatonina e reprodução animal: implicações na fisiologia ovariana**. Acta Veterinaria Brasilica, v. 5, n. 2, p. 147-157. 2011.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Agricultura e Abastecimento. **Resolução SAA nº 24 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. Cap.7, Artigo 134. 1994.

SENASA – Servicio Nacional de Sanidad Animal. **Bovinos y Bubalinos**. 2014.

SHEEHAN, W. J.; PHIPATANAKUL, W. **Tolerance to water buffalo milk in a child with cow milk allergy**. Annals of Allergy, Asthma & Immunology, 102(4), p. 349. 2009.

- SILVA, M. S. T.; LOURENÇO Jr, J. B.; MIRANDA, H. A.; ERCHESEN, R.; FONSECA, R. F. S. R.; MELO, J. A.; COSTA, J. M. **Programa de incentivo a criação de búfalos por pequenos produtores – PRONAF**. Belém, PA: CPATU. 2003.
- SOUZA, C. P. **Segurança alimentar e doenças veiculadas por alimentos: utilização do grupo coliforme como um dos indicadores de qualidade de alimentos**. Revista APS, v. 9, n. 1, p. 83-88. 2006.
- TEH, K. H.; FLINT, S.; PALMER, J.; LINDSAY, D.; ANDREWES, P.; BREMER, P. **Thermo-resistant enzyme-producing bacteria isolated from the internal surfaces of raw milk tankers**. International Dairy Journal, 21(10), p. 742–747. 2011.
- TONHATI, H. **Resultados do controle leiteiro em bubalinos**. In: Bubalinos: Sanidade, Reprodução e Produção, Jaboticabal, SP. Anais ... Jaboticabal: Funep, p. 90-109. 1999.
- TORRES-Jr, J. R. S.; RIBEIRO, D. L. S.; PEREIRA, H. G.; FRANÇA, I. G. **Sazonalidade reprodutiva de bubalinos (Bubalus bubalis) em regiões equatorial e temperada**. Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte, v. 40, n. 4, p. 142-147. 2016.
- VERRUMA, M. R.; SALGADO, J. M. **Análise química do leite de búfala em comparação ao leite de vaca**. Sci. agric., Piracicaba, v. 51, n. 1, p. 131-137. 1994.
- WONG, A. C. L.; BERGDOLL, M. Staphylococcal food poisoning. In: Foodborne diseases. 2. ed. Califórnia: Elsevier Science Publishers, p. 231- 248. 2002.
- ZAFALON, L. F.; LANGONI, H.; BENVENUTTO, F.; CASTELANI, L.; BROCCOLO, C. R. **Aspectos epidemiológicos da mastite bovina causada por Staphylococcus aureus**. Vet. e Zootec. v. 15, n. 1, p. 56-65. 2008.
- ZANELA, M. B.; KOLLING, G. J.; VAZQUEZ FERNANDEZ, V. N.; RIBEIRO, M. E. R.; CANELLAS, L. C.; LOPES, F. P. N.; PEREIRA, K. P. **Composição química do leite de búfala**. Embrapa Clima Temperado. CONFERENCIA INTERNACIONAL SOBRE LECHE INESTABLE. Colonia: Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria de Uruguay, p. 65. 2011.
- ZAVA, M. **The buffalo in Southern South America**. Italian Journal of Animal Science, 6:sup2, p. 172-178. 2007.

## 9. ANEXO

ANEXO 1. Resultados individuais das análises realizadas nas amostras de leite cru de búfala

<b>Amostra</b>	<b>Propriedade</b>	<b>Dia 1</b>	<b>Dia 3</b>	<b>Dia 5</b>	<b>Dia 7</b>
<b>1</b>	pH	6,95	6,25	6,15	6,07
	Acidez (°D)	14	19	25	31
	Gordura (%)	7,52	7,55	7,52	7,59
	SNG (%)	9,6	9,64	9,88	10
	ST (%)	17,2	17,21	17,4	17,59
	Proteína (%)	4,51	4,54	4,74	4,87
	Densidade	1,0272	1,0273	1,0283	1,0288
<b>2</b>	pH	6,67	6,34	6,62	6,62
	Acidez (°D)	14	17	17	18
	Gordura (%)	6,71	6,77	6,92	6,9
	SNG (%)	9,69	9,72	9,79	9,7
	ST (%)	16,41	16,49	16,71	16,8
	Proteína (%)	4,57	4,59	4,65	4,67
	Densidade	1,0282	1,0283	1,0285	1,0287
<b>3</b>	pH	6,65	6,69	6,37	6,54
	Acidez (°D)	15	18	17	19
	Gordura (%)	7,01	7,52	5,67	5,75
	SNG (%)	9,67	9,72	9,86	9,94
	ST (%)	16,7	17,24	15,54	15,68
	Proteína (%)	4,56	4,61	4,68	4,75
	Densidade	1,0279	1,0277	1,0299	1,0302
<b>4</b>	pH	6,72	6,51	6,57	6,55
	Acidez (°D)	16	16	18	24
	Gordura (%)	6,46	6,36	6,9	6,39
	SNG (%)	9,61	9,51	9,5	9,8
	ST (%)	16,04	15,87	16,39	16,22
	Proteína (%)	4,51	4,41	4,41	4,65
	Densidade	1,0282	1,0279	1,0273	1,0291
<b>5</b>	pH	6,91	6,87	6,74	6,56
	Acidez (°D)	15	17	19	24
	Gordura (%)	7,3	7,31	6,29	6,24
	SNG (%)	9,83	9,91	9,77	10,1
	ST (%)	17,9	17,22	16,06	16,34
	Proteína (%)	4,69	4,76	4,69	4,92
	Densidade	1,0283	1,0286	1,0285	1,0305