

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS
GERAIS ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA
ANIMAL

Ana Clara Costa Lopes

Leite de Búfala: influência da sazonalidade na qualidade e
avaliação da citometria de fluxo como metodologia de
análise para contagem de células somáticas

Belo Horizonte
Escola de Veterinária
2023

ANA CLARA COSTA LOPES

Leite de Búfala: influência da sazonalidade na qualidade e
avaliação da citometria de fluxo como metodologia de
análise para contagem de células somáticas

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós Graduação em Ciência Animal da
Universidade
Federal de Minas Gerais
como Requisito para obtenção do Título
de Mestre Área de Concentração:
Tecnologia e Inspeção
em Produtos de Origem Animal

Orientador: Leorges Moraes da Fonseca

Belo Horizonte
Escola de Veterinária
2023

L8641 Lopes, Ana Clara Costa ,1996-
Leite de búfala: influência da sazonalidade na qualidade e avaliação da Citometria de fluxo como metodologia de análise para contagem de células somáticas /Ana Clara Costa Lopes. – 2023.
76f. il

Orientador: Leorges Moraes da Fonseca
Dissertação (Mestrado) apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.
Área de Concentração: Tecnologia e Inspeção em Produtos de Origem Animal.
Bibliografias: f: 66 a 76

1. Leite de búfala – Análise - Teses - 2. Ciência animal - Teses – I. Fonseca, Leorges Moraes da - II. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária - III. Título.

CDD – 637

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes CRB 2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

ANA CLARA COSTA LOPES

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração TECNOLOGIA E INSPEÇÃO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL.

Aprovado(a) em 13 de fevereiro de 2023, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Leorges Moraes da Fonseca - Orientador(a)

Dr.(a). Juliana Soares Lima

Dr.(a). Elisa Helena Paz Andrade



Documento assinado eletronicamente por Leorges Moraes da Fonseca, Professor do Magistério Superior, em 13/02/2023, às 12:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Elisa Helena Paz Andrade, Professora do Magistério Superior, em 13/02/2023, às 14:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Juliana Soares Lima, Usuária Externa, em 13/02/2023, às 15:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 2051278 e o código CRC DB1A1A5B.

AGRADECIMENTOS

Á Deus, por ter me dado sabedoria, coragem para seguir meu sonho e por ter sempre estado ao meu lado me guiando em cada circunstância.

Aos meus pais, Marlene e Mário que sempre me apoiaram incondicionalmente, por serem meu porto seguro e por todos os esforços feitos para fazerem com que esse sonho se tornasse possível. Esse trabalho é de vocês também.

Ao Guilherme, por todo amor, carinho, compreensão e apoio; pela ajuda na parte escrita do trabalho.

A minha irmã Dani e meu cunhado Léo, por todo suporte, acolhimento e conselhos durante o experimento.

A Ana Elisa por trazer tanta diversão e leveza pra minha vida.

Ao meu orientador Professor Dr. Leorges, por ter confiado esse projeto a mim, pela paciência, compreensão, pela ajuda em todos os momentos.

Aos funcionários do LabUFMG: Adriana, Claudianne, Marcia, Maria, Raquel, Rose, Taynara, Wanderlan, Wendel e Professora Dra. Elisa por todo carinho, por toda contribuição e ajuda na execução do projeto.

As estagiárias Elisamara, Gabriela e Maria Eduarda por terem sido prestativas e sempre dispostas a ajudar.

Ao Marco Antônio por todos os conhecimentos passados no Laboratório de Físico Química.

A todos os professores do Departamento de Tecnologia e Inspeção em Produtos de Origem Animal que transmitem tanto conhecimento.

A professora Dra. Debora Sampaio por me acolher em seu laboratório quando mais precisei.

As agências FAPEMIG APQ 02740 - 17 e FEPE projeto 882 pelo apoio ao projeto.

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar a composição do leite de búfala por meio de espectroscopia por transformada de Fourier (FTIR), a Contagem de Células Somáticas (CCS) e Contagem Padrão em Placas (CPP) por Citometria de Fluxo e comparar a CCS entre o método eletrônico e de referência. Na primeira parte do estudo, foram feitas análises de leite de coletas mensais de 62 produtores no período de um ano (janeiro à dezembro de 2022). Para esse fim, as amostras para análise de composição e de CCS foram coletadas em frascos de 40 ml contendo conservantes Bronopol, enquanto amostras para análises de CPP foram coletadas em frasco esterelizado, contendo o conservante Azidiol. As amostras foram analisadas nos equipamentos LactoScope FTIR (Delta Instruments, Drachten, Holanda) e BactoScan FC® (Foss Electric A/S, Hillerød, Dinamarca). A composição média das amostras, expressa em g/100g foi de 5,82% de gordura, 3,95% de proteína, 4,83% de lactose, 15,62% de extrato seco total (EST) e 9,79% de extrato seco desengordurado (ESD). As médias anuais para CPP e CCS, foram, respectivamente, de 386.000 UFC/ml e 300.000 CS/ml. Em seguida, as amostras foram separadas quanto às estações do ano. Os teores foram expressos em média \pm desvio padrão de gordura apresentou maiores médias no verão (5,95%) e primavera (6,15%) quando comparados ao outono (5,52%) e inverno (5,69%). Proteína e ESD apresentaram maiores valores no verão (4,18% e 10,01%, respectivamente) seguido pela primavera (4,05% e 9,82%, respectivamente). Por outro lado, os maiores teores médios de lactose foram obtidos no inverno (4,89%) e no outono (4,88%) e os menores na primavera (4,72%). Quanto ao EST, os maiores valores foram encontrados no verão e primavera (15,96% em ambas as estações) e os menores no outono e inverno (15,18% e 15,35%). A segunda parte do estudo foi realizada em 75 amostras coletadas de tanques de refrigeração no período de novembro de 2022 à janeiro de 2023 no estado de Minas Gerais, Brasil, para realizar a comparação do método eletrônico de Citometria de Fluxo com o método tradicional de Microscopia Direta para CCS. As médias encontradas para CCS para citometria de fluxo e microscopia direta foram de 289.000 CS/ml e 307.504 CS/ml respectivamente. No entanto não houve diferença estatística significativa entre os métodos, tendo sido encontrada correlação alta e positiva ($r=0,941$).

Palavras-chave: citometria de fluxo; leite de búfala; microscopia direta; sazonalidade

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the composition of buffalo milk using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), somatic cell count (SCC), and standard plate count (SPC) using flow cytometry. Additionally, it aimed to compare SCC between the electronic and reference methods. In the first part of the study, milk samples were monthly collected from 62 producers over a one-year period (January to December 2022). For this purpose, samples for composition analysis and SCC were collected in 40 ml vials containing Bronopol as preservative, while samples for SPC analysis were collected in sterilized vials containing Azidiol as preservative. The samples were analyzed using the LactoScope FTIR equipment (Delta Instruments, Drachten, Netherlands) and BactoScan FC® (Foss Electric A/S, Hillerod, Denmark). The average composition of the samples, expressed in g/100g, was 5.82% fat, 3.95% protein, 4.83% lactose, 15.62% total solids (TS), and 9.79% non-fat solids (NFS). The annual averages for SPC and SCC were 386.000 CFU/ml and 300.000 SCC/ml, respectively. Next, the samples were separated according to the seasons of the year. The mean values \pm standard deviation of fat showed higher averages in summer (5.95%) and spring (6.15%) compared to autumn (5.52%) and winter (5.69%). Protein and NFS presented higher values in summer (4.18% and 10.01%, respectively) and the lowest during spring (4.05% and 9.82%, respectively). On the other hand, the highest average lactose contents were obtained in winter (4.89%) and autumn (4.88%), while the lowest values were found in spring (4.72%). As for TS, the highest values were found in summer and spring (15.96% in both seasons) and the lowest in autumn and winter (15.18% and 15.35%, respectively). The second part of the study was carried out on 75 samples collected from cooling tanks from November 2022 to January 2023 in the state of Minas Gerais, Brazil, to compare the electronic method of Flow Cytometry with the traditional method of Direct Microscopy for SCC. The mean values found for SCC using flow cytometry and direct microscopy were 289,000 SCC/ml and 307,504 SCC/ml, respectively. However, there was no statistical significant difference between the methods, with a high and positive correlation ($r=0.941$).

Keywords: buffalo milk; direct microscopy; flow cytometry; seasonality

Lista de tabelas

Tabela 1: População de búfalos no mundo divididos por continentes.....	15
Tabela 2: Padrões físico-químicas de qualidade do leite cru - Instrução Normativa 76.....	25
Tabela 3: Padrões físico-químicos de qualidade do leite cru de búfala SAA.....	26
Tabela 4: Média e desvio padrão dos teores dos componentes do leite de búfala, gordura, proteína, lactose, EST e ESD analisados durante o ano de 2022 por meio de análise no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) (Amostras obtidas em 62 unidades produtoras por mês).....	36
Tabela 5: Médias aritméticas e geométricas e desvio padrão de contagem de células somáticas (CCS/ml) e de contagem padrão em placas (CPP UFC/ml) em leite de búfala durante o ano de 2022 (Amostras obtidas em 62 unidades produtoras por mês).....	41
Tabela 6: Média e desvio padrão dos teores dos componentes de leite de búfalas obtidos em tanques de refrigeração e analisados durante o ano de 2022 por meio de análise de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) em diferentes estações (186 amostras de leite por estação do ano em diferentes propriedades).....	45
Tabela 7: Médias geométricas e desvio padrão das contagens de células somáticas (CCS/ml) e de contagem padrão em placas (UFC/ml) em leite de búfala no ano de 2022 analisados por citometria de fluxo por estações (186 amostras de leite por estação do ano em diferentes propriedades).....	51
Tabela 8: Teores dos componentes do leite de búfala (gordura, proteína, lactose, EST, nitrogênio ureico no leite e caseína), obtidos de tanques de refrigeração de 75 unidades produtoras no período de novembro de 2022 a janeiro de 2023 por meio de análise no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	58
Tabela 9: Valores de CPP UFC/ml de leite de búfalas obtido de tanques de refrigeração de 75 unidades produtoras no período de novembro de 2022 à janeiro de 2023 pelo método de citometria de fluxo.....	59

Tabela 10: Valores de CCS/ml de leite de búfala obtidos de tanques de refrigeração de 75 unidades produtoras de leite de búfala no período de novembro de 2022 a janeiro de 2023 pelos métodos de citometria de fluxo e microscopia direta.....60

Lista de Figuras

Figura 1: Esquema ilustrativo para o interferômetro de Michelson e do resultante da aplicação da transformada de Fourier.....	28
Figura 2: Esquema do princípio da contagem de células somáticas pela citometria de fluxo.....	31
Figura 3: : Gráfico de Colunas dos teores dos componentes do leite de búfala obtidos de leite de tanques de refrigeração, gordura (G), proteína (P) e lactose (L), analisados durante o ano de 2022 por meio de análise no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) (Amostras obtidas em 62 unidades produtoras por mês).....	37
Figura 4: Gráfico de Colunas dos teores dos componentes de extrato seco total (EST) e extrato seco desengordurado (ESD) de leite de búfala analisado durante o ano de 2022 por meio de análise no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) (Amostras obtidas em 62 unidades produtoras por mês)	39
Figura 5: Gráfico de Colunas das médias geométricas e desvio padrão de contagem de células somáticas (CCS/ml) e de contagem padrão em placas (CPP UFC/ml) em leite de búfala obtidas de tanques de refrigeração durante o ano de 2022 (Amostras obtidas em 62 unidades produtoras por mês).....	43
Figura 6: Gráfico de Colunas dos teores dos componentes do leite de búfala, gordura (G), proteína (P) e lactose (L), analisados durante o ano de 2022 por meio de análise no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) (Amostras obtidas em 186 unidades produtoras por mês).....	46
Figura 7: Gráfico de colunas dos teores dos componentes do leite de búfala EST e ESD por meio de análise no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) durante o ano de 2022 em diferentes estações (186 amostras de leite por estação do ano em diferentes propriedades).....	50
Figura 8: Gráfico de Colunas das médias geométricas e desvio padrão das contagens de células somáticas (CCS/ml) e de contagem padrão em placas (UFC/ml) em leite de búfala no ano de 2022 analisados por citometria de fluxo em	

diferentes estações (186 amostras de leite por estação do ano em diferentes propriedades).....52

Figura 9: Gráfico de dispersão das células somáticas (Log10) nos métodos Citometria de Fluxo e Microscopia Direta, com representação da reta de regressão da Citometria de fluxo em função da microscopia direta.....61

Figura 10: Gráfico de dispersão das células somáticas (Log10) nos métodos Citometria de Fluxo e Microscopia Direta, com representação da reta de regressão da Citometria de fluxo em função da microscopia direta.....62

Sumário

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3 REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 O gênero <i>Bubalus</i>	17
3.2 Qualidade do leite de búfala	18
3.2.1 Composição.....	18
3.2.2 Contagem de Células Somáticas	21
3.2.3 Contagem Padrão em Placas	23
3.3 Parâmetros da qualidade do leite de búfala	24
3.4 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) aplicada a composição do leite	26
3.5 Citometria de fluxo	28
3.5.1 DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol)	31
CAPÍTULO 1: COMPOSIÇÃO E EFEITOS DA SAZONALIDADE EM LEITE DE BÚFALAS	33
1.1 INTRODUÇÃO	33
1.2 MATERIAL E MÉTODOS	34

1.2.1 Coleta de Amostras	34
1.2.2 Métodos Analíticos	34
1.2.2.1 Análise de Composição	34
1.2.2.2 Contagem de células somáticas	35
1.2.2.3 Contagem Padrão em Placas	35
1.2.3 Análise Estatística	35
1.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
1.3 CONCLUSÃO	54
CAPITULO 2: COMPARAÇÃO DA CITOMETRIA DE FLUXO COM MÉTODOS DE REFERÊNCIA POR MICROSCOPIA DIRETA PARA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS NO LEITE	55
1 INTRODUÇÃO	55
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	55
2.2.1 Coleta de amostras	55
2.2.2 Métodos Analíticos	56
2.2.2.1 Análise de Composição	56
2.2.2.2 Contagem de Células Somáticas	56
2.2.2.3 Microscopia direta	56
2.2.2.4 Contagem Padrão em Placas	56
2.2.4 Análise Estatística	57
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
2.4 CONCLUSÃO	64

2.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
2.6 REFERÊNCIAS.....	66

1 INTRODUÇÃO

Existem aproximadamente 203 milhões de búfalos no mundo, dos quais 199 milhões estão na Ásia (98,03%), 1,67 milhões estão na África (0,82%), principalmente no Egito, aproximadamente 2 milhões estão nas Américas (0,90%). Cerca de 477 mil estão na Europa (0,23%), e a Oceania tem um rebanho de 166 búfalos registrados (0,0%) (FAO, 2020). O Brasil possui o maior rebanho de bubalinos das Américas com 81,29% do total de animais, aproximadamente 1,4 milhões (Tabela 1).

Tabela 1: População de búfalos no mundo divididos por continentes

Continente	População bubalina mundial
Ásia	98,03%
África	0,82%
América	0,90%
Europa	0,23%
Oceania	0,0%

A Índia é o país com o maior número de cabeças, com mais de 54% dos búfalos asiáticos e mais de 68% da quantidade total de leite de búfala produzido no mundo, seguida por Paquistão e China (FAO, 2020).

Segundo dados publicados pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) em 2018, os valores populacionais de búfalos distribuídos pelas cinco regiões do Brasil são: Norte: 939.415 (66,54%); Sudeste: 188.014 (13,37%); Nordeste: 127.581 (9,07%) Sul: 98.598 (7,01%) e Centro-Oeste: 52.046 (3,70%).

Os búfalos domésticos (*Bubalus bubalis*), chamados de búfalos d'água, são animais rústicos e domesticados. Eles desempenham um papel crucial na economia agrícola de nações desenvolvidas e em desenvolvimento, uma vez que são importantes fontes de leite, carne e derivados, chifres e pele (Pantoja *et al.*, 2022).

O leite de búfala ocupa a segunda posição de volume de leite produzido

mundialmente com 15%, ficando atrás apenas do leite de vaca (81%), seguido pelo de cabra (2%) e o de ovelha (1%), que ocupam o terceiro e quarto lugares respectivamente (FAO, 2020). A bubalinocultura representa uma importante atividade econômica devido à facilidade de adaptação dos animais às condições climáticas do país, potencial de rentabilidade devido à expansão comercial do mercado da carne de búfalo, características do animal (dócil e rústico) e elevada qualidade do leite e derivados (Andrighetto, 2011). Segundo a Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (ABCB), o custo da criação chega a ser 20% menor que a de bovinos e para o produtor os ganhos são maiores com o leite de búfala, devido ao alto teor de sólidos que aumenta o rendimento industrial (Sociedade Nacional da Agricultura, 2013).

Entretanto, apesar de sua importância econômica, o número de estudos sobre a qualidade do leite de búfalas, assim como a viabilidade de métodos modernos de análise dos parâmetros de qualidade são escassos. Para avaliação desse leite, ainda são utilizados parâmetros aplicados ao leite de bovinos, o que tem se mostrado ineficaz devido aos maiores teores de componentes para leite bubalino. Com isso, se faz necessário a realização de estudos para que legislações sejam criadas especificamente para leite de búfala.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os teores de gordura, proteína, lactose, extrato seco total, extrato seco desengordurado, nitrogênio ureico no leite, contagem de células somáticas e contagem padrão em placas do leite de búfalas.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Avaliar a influência da sazonalidade no teor de proteína, gordura, lactose, extrato seco, extrato desengordurado, contagem padrão em placas e contagem de células somáticas.

2.2.2 Comparar os métodos de contagem de células somáticas por citometria de fluxo e microscopia direta.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O gênero *Bubalus*

Os búfalos, como os bovinos, são classificados zologicamente como família Bovidae e subfamília Bovinae. Os bovinos pertencem à espécie *Bos taurus* e os búfalos a *Bubalus bubalis*. Dentro desta, encontram-se três subespécies, *Bubalis*, *Kerebau* ou *Carabao* e *Fulvus*. A espécie *Bubalus* também é classificada como Búfalo de água (*Bubalus bubalis bubalis*) e do pântano (*Bubalus bubalis karebau*) (Ricci *et al.*, 2012).

A primeira introdução de búfalos no Brasil ocorreu em 1890 pelo Dr. Vicente Chermont de Miranda, que consistiu na compra de búfalos Carabao ou Rosilhos para Ilha de Marajó. Em 1895, também fizeram uma importação de búfalos italianos. Nessas duas introduções deram origem ao “Búfalo Preto de Marajó” (Preto Marajoara), semelhante ao búfalo Mediterrâneo italiano. Em 1962, outros fazendeiros importaram búfalos da Itália e da Índia; os “Búfalos Pretos” – Mediterrâneo, Jafarabadi e Murrah e “Búfalo Rosilho” – Carabao (Rosa *et al.*, 2007), sendo essas as principais raças criadas no Brasil. No entanto, Murrah e Mediterrâneo são as raças que apresentam melhor aptidão genética para produção de leite, seguidas pela raça Jafarabadi (Minervino *et al.*, 2020).

Os búfalos possuem maior capacidade de conversão de alimentos com baixo valor nutricional e alta capacidade de adaptação e sobrevivência em diferentes ambientes com topografia, clima e vegetação distintos. Com relação à capacidade de produção, as búfalo costumam produzir de 600 a 4.500 litros de leite por lactação (Borghese *et al.*, 2013) e são animais altamente adaptados às várzeas quentes e úmidas, desempenhando um papel importante na economia de muitos países tropicais e subtropicais, pois são usados para produção de carne e leite e como animais de

tração. São animais menos tolerantes ao calor do que outras espécies de gado, devido à cor escura da pelagem e às glândulas sudoríparas dispersas de maneira heterogênea, o que resulta em um sistema de resfriamento evaporativo menos eficiente (Minervino *et al.*, 2020).

Os bubalinos têm maior longevidade do que os bovinos, podendo ultrapassar os 30 anos de idade e mantendo sua capacidade reprodutiva até os 18-25 anos (Minervino *et al.*, 2020). Apresentam taxa de natalidade acima de 80% e taxa de mortalidade abaixo de 3% ao ano (Moreira *et al.*, 1994). A duração da gestação na búfala corresponde, em média, a 315 dias (Fonseca, 1986).

A sazonalidade é uma das características mais notáveis do comportamento reprodutivo de búfalos. Os búfalos são animais poliéstricos estacionais, pois a latitude é determinante no comportamento reprodutivo desta espécie, pois, quanto mais baixas as latitudes, maior sua tendência à sazonalidade reprodutiva (Torres- Junior *et al.*, 2016).

A menor quantidade de luz afeta os animais de forma a coincidir a época de parto e desmame em estações climáticas favoráveis em relação à temperatura e alimento para as crias. Os animais apresentam sazonalidade reprodutiva mesmo em ambientes que ofereçam pequena variação nas quantidades de horas de luz (próximos à linha do equador), provavelmente devido a alterações no suprimento de forragens e conforto térmico (Dias, 2012).

3.2 Qualidade do leite de búfala

3.2.1 Composição

Entende-se por leite, sem outras especificações, o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que proceda (BRASIL, 2017).

O leite de búfala apresenta características que o diferenciam de qualquer outro tipo de leite. Seus teores de lipídeos, proteínas, lactose, sólidos totais e resíduo

mineral fixo são de grande importância nutricional. A ausência de β -caroteno na composição química do leite de búfala é uma das principais características, conferindo-lhe coloração branca. É mais concentrado que o leite bovino, apresentando maior teor de gordura, proteína e sólidos totais. Outra característica é o sabor bem adocicado (Ricci *et al.*, 2012). As variações de valores encontrados na literatura sobre a composição do leite de búfala ocorrem devido à influência de diversos fatores, como tipo de raças, número de lactações, estágio da lactação, alimentação e incidência de mastite (El-Salam & El-Shibiny, 2011).

Os constituintes do leite de búfala merecem destaque quando comparados com o leite bovino, principalmente em suas vantagens na fabricação de derivados lácteos. O aproveitamento industrial, do leite bubalino se destaca por propiciar produtos lácteos de boa qualidade devido as maiores concentrações em sólidos totais que o leite bovino. Quando comparado o rendimento do leite de búfala ao leite de vaca, o primeiro é superior em cerca de 40% a 50%, no processamento de queijo, manteiga, leite em pó, dentre outros derivados. Ressalta-se que, entre os derivados oriundos do leite de búfala, destaca-se a produção do queijo tipo muçarela (Andrade, 2015).

A gordura do leite apresenta maior valor econômico, sendo importante para produção de derivados e contribuindo para o sabor característico e melhoria da textura dos mesmos (Hao *et al.* 2021; Ricci *et al.* 2012). A gordura do leite de ruminantes é predominantemente formada por triglicerídeos (97-98%), composta por pequenas quantidades de esteroides, ácidos graxos livres e fosfolipídios. Os triglicerídeos são sintetizados por células epiteliais mamárias, enquanto alguns ácidos graxos usados na pré-formação desta síntese são absorvidos pela glândula mamária (Zanela *et al.*, 2015).

O leite de búfala é conhecido por seu elevado teor de gordura em comparação ao leite de vaca (Hao *et al.*, 2021), até duas vezes maior que o leite bovino e sendo este o principal responsável por sua alta densidade energética (Ahmad *et al.*, 2013). A variação pode chegar a 5,30 – 9,00% de teor de gordura (Kapadiya *et al.*, 2016; , 2012; Ahmad *et al.*, 2010).

Os glóbulos de gordura do leite de búfala são maiores quando comparados ao leite de outras espécies (Ahmad *et al.*, 2013), com diâmetro médio de 5 μ m. Os glóbulos do leite de vaca possuem diâmetro de 3,16 μ m, enquanto para cabra e ovelha os diâmetros são de 2,57 e 3,02 μ m, respectivamente (Ahmad *et al.*, 2013; El-Salam

& El-Shibiny, 2011).

No estudo de Ahmand *et al.*, (2010) a análise de ácidos graxos revelou que os teores de ácidos graxos saturados, principalmente ácido palmítico, ácidos graxos *trans*, ácido linolênico ($\omega 3$) e ácido linolênico conjugado foram maiores no leite de búfala do que no leite de vaca.

Quanto às proteínas, no leite de búfala, as principais são: $\alpha 1$ -caseína, $\alpha 2$ -caseína, β -caseína, κ -caseína, β -lactoglobulina e α -lactalbumina (El-Salam & El-Shibiny, 2011). As caseínas encontram-se unidas ao fosfato de cálcio em um complexo esférico específico altamente hidratado, conhecido como micela de caseína (Fennema *et al.*, 2010).

Ao ser comparado com o leite de vaca, o leite de búfala geralmente apresenta maiores quantidades de κ -caseína (El-Salam & El-Shibiny, 2011). A caseína encontrada no leite bubalino é menos solúvel, alterando suas características reológicas, assim o tempo de coagulação da muçarela bubalina é reduzido devido a melhor ação da quimosina na produção de coalhada mais firme e lisa (Hussain *et al.*, 2011). Aproximadamente 99% das caseínas no leite de búfala estão presentes na forma de micelas (Ahmad *et al.*, 2013), enquanto no leite bovino apenas 90-95% de caseína está na forma micelar (Khedkar *et al.*, 2016), o que influencia na coloração mais branca do leite de búfala, pelo fato das micelas apresentarem maior opacidade (Ahmad *et al.*, 2010).

O leite de búfala contém concentrações mais altas de sais do que o leite bovino. As concentrações totais de cálcio são 1,5 vezes maiores quando comparadas ao de vaca, em sua maior parte de forma insolúvel devido ao alto teor de caseína o que influencia as condições de processamento e o rendimento de certos produtos lácteos (Mejares *et al.*, 2022; El-Salam & El-Shibiny, 2011). Ahmad *et al.*, (2013) relataram que o cálcio insolúvel representa 67,6 – 82,6% do cálcio total e estimou-se que o cálcio presente nas micelas do leite de búfala é de 1,12 mM enquanto o leite de vaca apresentou 0,84 mM. As concentrações de magnésio e fosfato inorgânico foram maiores no leite de búfala do que no leite bovino (Kapadiya *et al.*, 2016 ; Murtaza *et al.*, 2017).

A lactose é o carboidrato mais abundante presente no leite. Consiste em uma unidade de glicose e galactose unidas por ligação glicosídica β -1,4 e possui dois anômeros α -lactose e β -lactose, o que difere entre elas é a orientação da hidroxila

(OH) que esta ligada ao carbono anomérico (Portnoy *et al.*, 2021; Hao *et al.*, 2021). Os teores de lactose em leite de búfalas apresentam valores que variam de 4,83 a 5,48% (Sindhu e Singhal, 1988; Duarte *et al.*, 2001).

3.2.2 Contagem de Células Somáticas

As células somáticas são representadas pelos leucócitos (glóbulos brancos do sangue) e células epiteliais de descamação da cisterna mamária e cisterna do teto que são eliminadas no leite durante o curso normal da lactação (Galiero e Morena, 2000). A glândula mamária possui um mecanismo de defesa natural em resposta às infecções causadas por patógenos e danos nos tecidos; os leucócitos migram do sangue para o úbere para combater patógenos e reparar tecidos locais danificados, o que conseqüentemente aumenta a liberação de células somáticas no leite (Sharma, 2011).

Quando acontece a invasão do úbere por microrganismos ocorre imediatamente uma resposta do sistema de defesa com o desencadeamento de resposta inflamatória. Na tentativa de eliminar essas bactérias, as células de defesa do sangue migram para a glândula mamária, com subsequente aumento destas células no leite, o que justifica o uso deste biomarcador como indicativo de infecção e/ou inflamação da glândula mamária (Sharma, 2011). A tarefa dos linfócitos é regular o início e a supressão da resposta imune, enquanto os macrófagos fagocitam bactérias e restos celulares. Além disso, os macrófagos reconhecem patógenos invasores e desencadeiam uma reação imune, pela rápida seleção de neutrófilos, os quais atacam o patógeno invasor e defendem a glândula mamária no início de uma reação inflamatória aguda (Halasa e Kirkeby, 2020).

Como as células do sistema imune têm funções diferentes, suas distribuições no leite normal e no leite de vaca com mastite diferem. Em amostras de leite obtidas de úberes saudáveis, macrófagos e linfócitos predominam, enquanto em leite obtido de glândulas mamárias infectadas ou leite com alta contagem de células somáticas (CCS) há predomínio de neutrófilos (Halasa e Kirkeby, 2020).

A predominância quanto aos tipos celulares é controverso, pois, Dhakal *et al.* (1992), relataram a predominância de células epiteliais (48,42%), seguidas pelos

linfócitos (29,28%), neutrófilos (20,98%) e monócitos (1,62%). Por outro lado, Silva e Silva (1994) verificaram os seguintes valores: neutrófilos (56%), linfócitos (28%), macrófagos (8%), células epiteliais (5%) e eosinófilos (1%); e Della Libera (2002), encontrou 61,1% de monócitos/macrófagos, 32,9% de neutrófilos, 5,3% de linfócitos e 0,7% de eosinófilos. Para búfalas previamente detectadas com mastite, Dhakal *et al.*, (1992) relataram a maior ocorrência de neutrófilos (67,33%), seguidos por linfócitos (20,40%), células epiteliais (10,80%), e monócitos (2,10%).

A CCS é um critério bem estabelecido e comumente utilizado para avaliação do estado de saúde intramamário, tanto em animais individuais quanto em tanques de leite a granel, pois existe uma correlação direta entre a qualidade do leite e a CCS (Moradi *et al.*, 2021). A CCS é considerada um componente-chave para prevalência de mastite clínica e subclínica na pecuária leiteira (Sharma *et al.*, 2013).

Apesar do impulso econômico das últimas décadas, o sistema de criação de búfalos deve ser melhorado para maximizar a eficiência da indústria de laticínios, melhorar a produção e a qualidade do leite e do queijo e trabalhar para melhorar o bem-estar animal. Para leite de búfala, não é mencionado pelos regulamentos mundiais consultados o limite máximo de CCS, evidenciando a falta de regras para esse tipo de leite (Costa *et al.*, 2020).

No Brasil, ainda não existe uma legislação que regule o padrão de CCS para búfalas e o uso de parâmetros utilizados para bovinos tem-se mostrado inadequado, pois os valores das contagens são significativamente menores em bubalinos do que nos bovinos (Medeiros, 2011).

Algumas particularidades relacionadas às características anatômicas do úbere e tetos, imunologia da glândula mamária e composição do leite de búfalas podem conferir maior resistência contra a mastite. Essas incluem maior concentração de pigmentos de melanina, canal do teto com epitélio estratificado queratinoso mais espesso que o observado na vaca, 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 (Uppal *et al.*, 1994).

As diferenças incluem ainda um diâmetro menor do lúmen do canal do teto (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). A maior atividade da lactoperoxidase

potencialmente eleva a vida útil de prateleira dos derivados lácteos produzidos com leite de búfalas, quando comparados aos derivados produzidos com leite de vacas. Por outro lado, úberes mais pendentes e tetos mais longos com maior diâmetro de teto em búfalas podem contribuir para um maior risco de mastite (Kaur *et al.*, 2018)

A CCS para bubalinos é diferente do normalmente encontrado em bovinos (Sollecito *et al.*, 2011). Biologicamente, uma menor CCS no leite de búfala também pode ser devido às diferenças na atividade fagocitária dos neutrófilos e além de indícios de maior eficácia antibacteriana dos leucócitos bubalinos (Alhussien & Dang, 2018; Araujo e Gheller 2005) ou devido à maior concentração de lisozima no leite de búfala do que no leite de vaca (Hameed, Hussain, & Akhtar, 2017).

3.2.3 Contagem Padrão em Placas

A Contagem Padrão em Placas (CPP) é expressa em Unidades Formadoras de Colônia (UFC/ml), sendo dependente da concentração bacteriana inicial e da taxa de multiplicação dos microrganismos. Estas variáveis estão relacionadas à higiene de ordenha, saúde da glândula mamária, higienização dos utensílios e equipamentos, qualidade da água e refrigeração adequada do leite (Fonseca e Santos, 2000).

Além da contaminação natural (durante a ejeção do leite) e da contaminação provocada por falha no manejo sanitário, o uso inadequado ou a não utilização das medidas profiláticas, nos equipamentos de ordenha e/ou no tanque de refrigeração, pode levar ao aumento do número de microrganismos no leite, o que também pode ser provocado pela incidência da mastite. A influência da mastite sobre a contagem bacteriana total do leite de tanque depende do microrganismo infectante envolvido, do estágio da infecção e do percentual do rebanho infectado (Lucena, 2016).

As características microbiológicas do leite de búfalas são pouco conhecidas, principalmente quando comparadas às do leite bovino. É importante ressaltar que o leite bubalino *in natura* apresenta também alta perecibilidade e está sujeito às mesmas fontes de contaminação microbiana que podem existir na bovinocultura leiteira, principalmente na ordenha e no transporte do leite até a indústria de processamento. Algumas peculiaridades do comportamento das búfalas podem contribuir para aumentar significativamente a concentração microbiana inicial do leite cru, como, a tendência natural em se banhar na água (Cunha Neto, 2003).

3.3 Parâmetros da qualidade do leite de búfala

Em 1996 o MAPA iniciou discussões visando o desenvolvimento e implementação de políticas voltadas para a qualidade do leite por todo o país. A partir dessas discussões houve a publicação da Portaria nº56/1999, que teve como principal proposta: a necessidade da refrigeração do leite na propriedade rural em tanques de refrigeração; a coleta a granel do leite e transporte aos estabelecimentos processadores e; a necessidade de acompanhamento da qualidade do leite dos produtores com análises laboratoriais para obtenção de índices de qualidade até então inexistentes para o leite cru refrigerado (BRASIL, 2021).

Em 18 de setembro de 2002 foi publicado a Instrução Normativa (IN) nº51 que aprovava os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do leite tipo B e do leite tipo C, do leite Pasteurizado e do Leite Cru e Refrigerado e seu transporte a granel. No entanto esta IN tornou-se compulsória apenas em 2005 para as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste e em 2007 para as regiões Norte e Nordeste. O leite recebido em estabelecimentos fiscalizados pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF) passou a ser amostrado para análises laboratoriais, no mínimo, mensalmente. No ano de 2011 foi publicada a IN 62 no qual foram revogados os anexos que tratavam dos leites tipo B e tipo C e foram estabelecidos novos padrões de qualidade (BRASIL, 2021).

O Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal iniciou um trabalho de reestruturação completa das legislações vigentes, por meio das IN's 76 e 77, de 26 de novembro de 2018 e revogação das instruções publicadas anteriormente.

A IN 76 trata das características e da qualidade do produto na indústria e descreve as análises que devem ser realizadas para a caracterização do leite, principalmente em laticínios (Tabela 2). Na IN 77, são definidos critérios para a obtenção do leite dentro de padrões de qualidade que incluem a organização da propriedade, as instalações e os equipamentos utilizados, a capacitação dos responsáveis pelas tarefas de manejo e o controle sistemático de mastites, brucelose e tuberculose (Zuffo, 2021).

Com o objetivo de normatizar as análises laboratoriais para fiscalização de

amostras de leite cru recolhidos em propriedades rurais e em estabelecimentos de laticínios foi criada pela IN nº37 de 18 de abril de 2002 a Rede Brasileira de Laboratórios da Qualidade do Leite – RBQL (BRASIL, 2021).

Tabela 2: Padrões físico-químicas de qualidade do leite cru - Instrução Normativa 76/2018

Características	Requisitos
Odor	Característico
Cor	Branco Opalescente homogêneo
Gordura	Teor mínimo 3,0g/100g
Proteína	Teor mínimo 2,9g/100g
Lactose	Teor mínimo 4,3g/100g
Sólidos não gordurosos	Teor mínimo de 8,4g/100g
Sólidos Totais	Teor mínimo de 11,4g/100g
Acidez Titulável	0,14 a 0,18 ácido láctico/100ml
Estabilidade Alizarol	Mínimo de 72% v/v
Densidade relativa a 15°C	1,028 a 1,034
Índice Crioscópico	-0,530°H e 0,555°H ou -0,512°C e -0,536°C
Contagem Padrão em Placas	Máximo 300.000 UFC/ml
Contagem de Células Somáticas	Máximo 500.000 CS/ml

Fonte: Instrução Normativa 76, Ministério da Agricultura de Pecuária e Abastecimento.

A análise e o monitoramento da qualidade do leite de búfala são exigidos pelos órgãos de controle no Brasil (MAPA). Entretanto, os requerimentos legais não são nacionais, a exemplo do Estado de São Paulo, que possui legislação específica para Leite de Búfala pela resolução SAA-03 de 10 de Janeiro de 2008, com os seguintes parâmetros (Tabela 3).

Tabela 3: Padrões físico-químicos de qualidade do leite cru de búfala – SAA.

Análise	Padrão
Aspecto e Cor	Normais para a espécie
Odor	Característico
Temperatura de Recebimento	7°C
Gordura	Mínimo de 4,5g/100g
Extrato Seco Desengordurado	Mínimo de 8,57g/100g
Acidez Titulável	0,14 a 0,23 em g/ml
Densidade a 15°	Entre 1,028 e 1,034g/ml
Índice Crioscópico	-0,520 a -0,570C°
Substâncias estranhas à sua composição ou corpos estranhos de qualquer natureza	Não deve apresentar

Fonte: SAA-03 de 10 de Janeiro de 2008

3.4 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) aplicada a composição do leite

A espectroscopia no infravermelho se baseia na determinação de grupos funcionais de uma amostra, sendo que cada grupo absorve energia em frequências características. Essas frequências apresentam vibrações específicas, que podem, por exemplo, ser de estiramento ou de deformação, as quais correspondem a níveis de energia da molécula. Como exemplos, os grupos carbonila (C=O) das ligações éster dos triglicerídeos absorvem radiação no comprimento de onda de 5,73 µm, os grupos amida (CONH) das ligações peptídicas das proteínas em 6,46 µm e os grupos hidroxila

(OH) da lactose em 9,53 μm (Tavares, 2019). A água contida no leite pode ser absorvida em todo o espectro infravermelho, mas é possível determinar ou remover essa absorção do espectro a fim de revelar as absorções residuais causadas por outros componentes (Van De Voort *et al.*, 1992).

Os principais componentes do leite atualmente analisados são sólidos totais, gordura, proteína, caseína, nitrogênio ureico e lactose cuja determinação por meio de métodos convencionais é bastante demorada e trabalhosa (Oliveira *et al.*, 2012).

As vantagens dos instrumentos FTIR são maior velocidade e sensibilidade, melhor aproveitamento da potência luminosa, calibração do comprimento de onda mais exata e desenho mecânico simples, além de possibilidade de detecção de mais substâncias do que equipamentos de infravermelho a base de filtro (Skoog *et al.*, 2006).

A espectrometria de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) representa uma ferramenta rápida e poderosa para melhorar a análise de espectroscopia vibracional. Sabe-se que, além de extensas capacidades de computação e manipulação de dados, o FTIR também tem uma série de outras vantagens, ou seja, melhor relação sinal-ruído, redução significativa nos tempos de varredura, maior rendimento de energia e precisão de comprimento de onda superior (Iñon *et al.*, 2004).

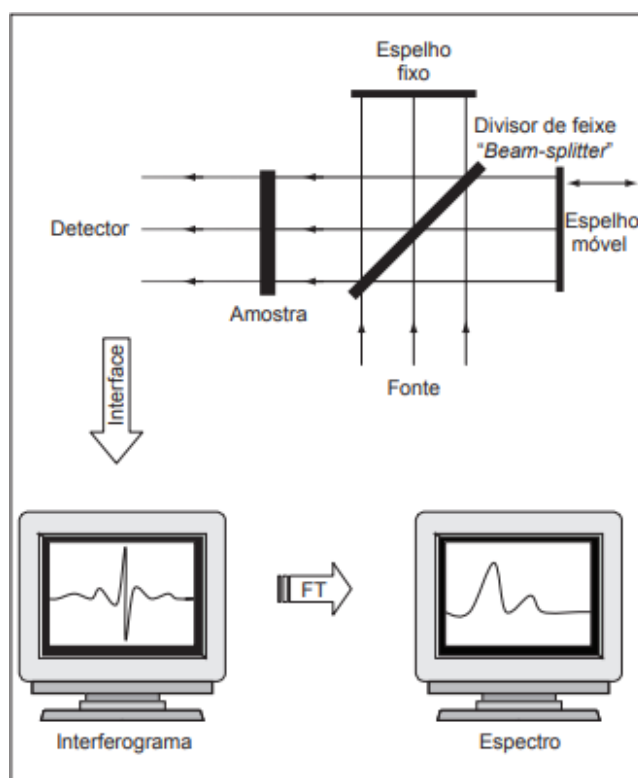
Os espectrômetros com transformada de Fourier utilizam um dispositivo denominado interferômetro de Michelson, que efetua medidas precisas do comprimento de onda da radiação eletromagnética e faz medidas de distância com elevada exatidão. Um interferômetro de Michelson consiste em uma fonte de luz colimada, um espelho estacionário acima, um espelho móvel à direita, um divisor de feixe e um detector. A fonte de luz na FTIR é uma fonte contínua transmitida (Skoog *et al.*, 2006).

O interferômetro usa o divisor de feixe para dividir da fonte de radiação em duas partes, uma refletida no espelho móvel e outra no espelho fixo. Depois de refletidas, ambas as partes se recombinam no divisor de feixes, devido a variação da diferença dos caminhos entre os dois espelhos, é nessa região que os dois feixes interagem e formam um padrão de interferência (Van de Voort *et al.*, 1992).

Os dois feixes convergem e interagem em regiões nas quais as ondas se

interferem construtivamente (Skoog, *et al.*, 2006). Sendo assim, a amplitude e frequências produzidas pelo efeito de interferência serão medidas pelo detector, digitalizado em tempo real e o resultado constará no interferograma com todas as informações espectrais da amostra. Com o resultado pronto aplica-se a transformada de Fourier (Van de Voort *et al.*, 1992).

Figura 1: Esquema ilustrativo para o interferômetro de Michelson e do resultante da aplicação da transformada de Fourier



Fonte: Helfer *et al.*, 2006

3.5 Citometria de fluxo

O método de citometria de fluxo era uma metodologia baseada em um único parâmetro, no qual se detectava apenas o tamanho das células. Atualmente, a citometria de fluxo é considerada altamente sofisticada, sendo capaz de avaliar diferentes parâmetros. O citômetro de fluxo é um instrumento que mede características de células ou partículas em um fluxo de fluido conforme elas passam por uma fonte de luz (laser) (Wikerson, 2012).

Os principais componentes dos citômetros de fluxo e classificadores de células consistem em fluidos, óptica (excitação e coleta), uma rede eletrônica e um computador. Os equipamentos baseados na citometria de fluxo tem como princípio a incidência de uma fonte de luz laser que intercepta cada partícula ou amostra em movimento, e a dispersão da luz é analisada por um sensor que mede a dispersão da luz e a fluorescência emitida, fornecendo dados relativos ao tamanho e à granularidade da partícula. O computador registra os sinais digitais dos detectores eletrônicos, permitindo ao operador analisar os dados e colocá-los em uma das várias saídas, por exemplo, histogramas, gráficos de pontos, gráficos de contorno (Adan *et al.*, 2017; Wikerson 2012).

Para o controle da qualidade do leite e aplicação em indústrias de laticínios os citômetros geralmente se baseiam na mensuração de pulsos eletrônicos após a emissão de fluorescência a partir da incidência de uma fonte de radiação *laser* em um marcador ligado ao material genético (celular ou microbiano, dependendo do objeto da análise). A intensidade e a altura dos pulsos de fluorescência são gravadas e usadas como parâmetros seletivos. Os pulsos selecionados são, então, convertidos em contagens (Ribeiro *et al.*, 2018)

Na citometria de fluxo diversos corantes podem ser utilizados para se ligar ao material genético da célula ou da microbiota, entre eles o brometo de etídio e o DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol). O líquido contendo as células coradas é distribuído na forma de um filme fino em um capilar, onde ocorre a incidência de um *laser*. A cada célula ou microrganismo um pulso é amplificado e quantificado. No caso do DNA, os corantes se ligam usualmente por sua intercalação dentro da estrutura helicoidal de cadeia dupla destas moléculas, o que resulta em aumento considerável de fluorescência em comparação com o corante puro (Suhren & Walte, 2000).

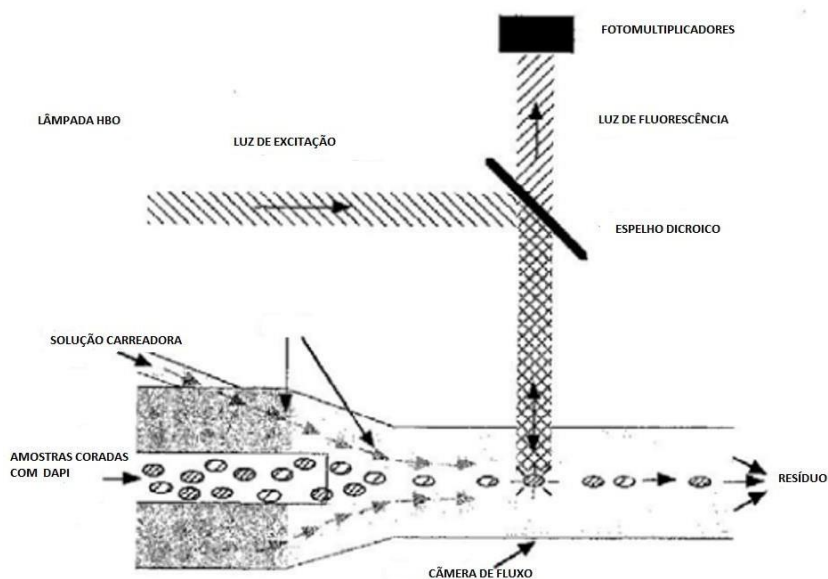
Esta tecnologia permite a determinação do número de células somáticas e da contagem bacteriana de uma amostra (Gunaskera *et al.* 2000). Para análise de CCS e CPP no leite é utilizado o citômetro do tipo classificador, que quantifica a dispersão e a fluorescência de células coradas em meio a outras células ou microrganismos usando corantes específicos na técnica. No entanto, a maior parte dos equipamentos utilizados para CCS e CPP em leite baseados em citometria de fluxo se limitam a estimar contagem bacteriana total ou a contagem de células somáticas (Zuffo, 2021). Entretanto, novos equipamentos com possibilidade da caracterização dos tipos

celulares têm surgido nos últimos anos, especialmente para CCS, como por exemplo o Fossomatic™ 7 DC da FOSS, que além da CCS, também é capaz de fazer a diferenciação dos tipos celulares.

Na citometria de fluxo para contagens microbianas ocorre a marcação do material genético, quando os microrganismos se encontram suspensos em meio fluido (Barrientos *et al.*, 2000).

Para que ocorra a entrada do corante nas células, é necessário realizar o tratamento do leite com enzimas proteolíticas para eliminação das proteínas, e com detergentes, para eliminação da gordura do leite. As enzimas também atuam na degradação das células somáticas, que são totalmente hidrolisadas durante o processo de sonificação. A radiação emitida pelas células bacterianas é coletada pelo sistema óptico, transferida para o sistema de filtros, e, posteriormente, transformada em impulso elétrico pelo sistema eletrônico (Figura 2). Os impulsos por sua vez, são transformados em número de microrganismos e estes, relacionados ao volume de leite analisado. Os resultados emitidos por estes equipamentos são expressos em número de bactérias por ml de leite e representam a contagem individual de bactérias (Cassoli, 2005). Depois são transformados estatisticamente para equivaler a contagem bacteriana em leite em UFC/ml segundo a ISO 21187:2021 (IDF 196:2021) para o estabelecimento de uma conversão entre os resultados de um método de rotina e um método padrão e sua verificação para a determinação quantitativa da qualidade bacteriológica.

Figura 2: Esquema do princípio da contagem de células somáticas pela citometria de fluxo



Fonte: Adaptado Delta, 2007

A microscopia direta é o método de referência para a determinação da contagem de células somáticas em leite cru (Murphy *et al.*, 2016).

Embora a análise por esse método forneça informações essenciais sobre a condição da matéria-prima, trata-se de um procedimento que requer trabalho intenso, com ampla variabilidade de interpretação entre diferentes observadores. Métodos clássicos de análises, como é o caso dessa técnica que durante muitos anos e tem sido referência na determinação do parâmetro exigido, são limitados por não terem sido concebidos para a análise em série de um grande número de amostras, necessitando de mão-de-obra excessiva e tendo custo elevado (Evangelista, 2002)

3.5.1 DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol)

O DAPI é um marcador fluorescente sintético, muito utilizado para marcar células vivas e DNA em experimentos de microscopia de fluorescência. Ele se liga no sulco menor do DNA rico em AT com alta afinidade.

Esse corante foi sintetizado pela primeira vez no laboratório de Otto Dann, como parte de uma pesquisa no tratamento de tripanossomíase, mas não foi bem sucedida como droga (Dann, 1971). Após outras investigações, foi notada uma forte ligação com o DNA e um aumento na fluorescência, cerca de 20 vezes mais do que o

o corante não ligado. Esse aumento na fluorescência fez com que o DAPI fosse amplamente usado em microscopia de fluorescência. O DAPI quando ligado ao DNA possui sua faixa de absorção no ultravioleta e a de emissão no azul, com uma emissão máxima em 460 nm, o DAPI se liga também ao RNA com emissão máxima em 500 nm e inferior intensidade quando comparado a ligação com o DNA (Crisafuli *et al.*, 2016).

CAPÍTULO 1: COMPOSIÇÃO E EFEITOS DA SAZONALIDADE EM LEITE DE BÚFALAS

1.1 INTRODUÇÃO

A composição do leite de búfala pode ser influenciada por diversos fatores como: a raça, idade, os fatores ambientais como estação de ano, a alimentação, manejo de ordenha e da evolução do período de lactação do animal principalmente (Amaral *et al.*, 2005). Contudo, principalmente fatores ambientais, impõem variáveis que podem modificar a composição do leite desses animais de modo considerável, alterando principalmente as características físico-químicas em proporções muito maiores do que se observa em bovinos (Costa Filho *et al.*, 2014).

A sazonalidade reprodutiva é uma das características mais notáveis do comportamento reprodutivo de búfalos, em que o estímulo a reprodução é iniciada em resposta à diminuição da luminosidade diária (final do verão e início do outono) e que pode afetar a produção de leite (Torres-Junior *et al.*, 2016).

Embora apresentem maior habilidade em se adaptarem a climas adversos, a atividade reprodutiva dos bubalinos é fortemente influenciada por questões ambientais como a disponibilidade de alimentos e o fotoperíodo. Em áreas próximas à linha do Equador, onde a duração do dia é semelhante ao longo do ano, a escassez de alimento é o fator que mais afeta a reprodução, resultando em atraso da puberdade e aumentando o intervalo entre partos. Ao contrário, regiões com latitude elevada, onde ocorre uma maior variação na duração da luminosidade diária ao longo do ano, o fotoperíodo exerce uma influência na atividade ovariana, aumentando a fertilidade em meses com dias de menor duração da luminosidade (Silva, 2020).

O presente estudo teve como objetivo avaliar a influência das estações do ano na composição e qualidade higiênico-sanitária do leite de búfalas no estado de Minas Gerais.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1 Coleta de Amostras

As amostras de leite cru de búfala foram obtidas mensalmente, de janeiro à dezembro de 2022 de tanques de refrigeração de 62 unidades produtoras no estado de Minas Gerais (MG), localizado na região sudeste do Brasil, entre as latitudes 14°13'57" e 22°55'47" e as longitudes 39°51'24" e 51°02'56" e compreende uma área de 582.586 km² (IBGE, 2006). Em MG, o verão é considerado a estação chuvosa, enquanto o inverno é estação seca (RAO *et al.*, 2015). Os frascos (40ml) utilizados para coleta de leite para análise de CCS e composição continham o conservante bronopol. Outro frasco, de 40 ml e contendo o conservante Azidiol foi usado para a coleta de leite visando a análise de CPP. As amostras foram mantidas à temperatura de 2 a 5°C e enviadas ao Laboratório de Análise da Qualidade do Leite da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (LabUFMG), credenciado pelo MAPA e acreditado pela norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017.

1.2.2 Métodos Analíticos

1.2.2.1 Análise de Composição

Para avaliar a composição foram realizadas as análises dos seguintes parâmetros: teores de proteína, gordura, lactose, extrato seco total (EST) e extrato seco desengordurado (ESD) no equipamento CombiScope™ FTIR 400® (Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier), por meio do LactoScope FTIR (Delta Instruments, Drachten, Holanda). A amostra de leite foi pré aquecida a uma temperatura de 40°C e agitada. Após pipetagem automática no equipamento, o leite foi homogeneizado para reduzir o diâmetro dos glóbulos de gordura. Posteriormente, receberam irradiação pelo feixe de luz infravermelha em uma cubeta e a diferença de energia absorvida é captada por um detector de infravermelho e em seguida, quantificada e transformada em teores de componentes, tendo como referência uma curva de calibração (Delta, 2007). Esse equipamento gera

um relatório onde se observa todos os resultados.

1.2.2.2 Contagem de células somáticas

A contagem de células somáticas (CCS) foi realizada no Somascope que é o citômetro de fluxo do equipamento CombiScope™ FTIR 400®, (Delta Instruments). Entretanto, diferente dos outros equipamentos utilizados no mercado, este utiliza fluorescência óptica, pela ligação do DAPI às células (ISO 13366/IDF 148- 2, 2006).

1.2.2.3 Contagem Padrão em Placas

A contagem padrão em placas foi realizada pelo equipamento eletrônico BactoScan FC® (Foss Electric A/S, Hillerod, Dinamarca), que tem por princípio a citometria de fluxo. Segundo a ISO 16297:2020, os resultados são obtidos em CBI, no entanto são convertidos em UFC/ml através de uma equação de transformação (ISO 21187:2021).

1.2.3 Análise Estatística

Os resultados das análises de FTIR dos teores de gordura, proteína, lactose, extrato seco total (EST) e extrato seco desengordurado (ESD) e citometria de fluxo para CCS e CPP do leite de búfala foram avaliados por meio de estatística descritiva (IBM SPSS Statistics versão 22) e análises multivariadas (JMP- SAS versão 17.0). Foram calculados os valores médios e desvio padrão para todas as variáveis. Para avaliação de significância entre as estações do ano, foi utilizado o Teste Tukey como teste de comparação múltipla no nível de significância de 5%.

1.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

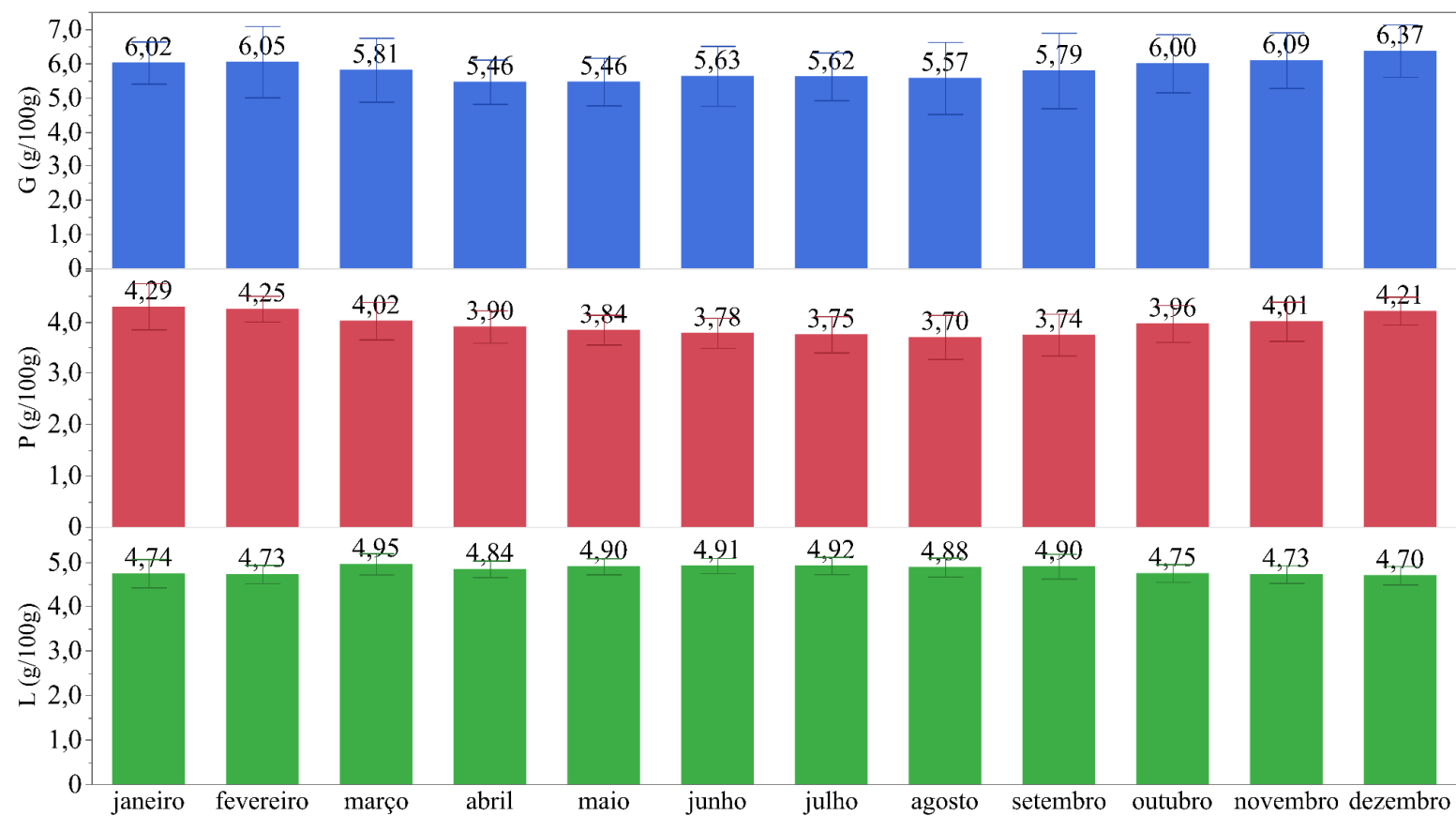
Os resultados das análises feitas por FTIR de gordura, proteína, lactose, EST e ESD entre os meses de janeiro a dezembro de 2022 foram tabulados e analisados (Tabela 4).

Tabela 4: Média e desvio padrão dos teores dos componentes do leite de búfala, gordura, proteína, lactose, EST e ESD analisados durante o ano de 2022 por meio de análise no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) (Amostras obtidas em 62 unidades produtoras por mês)

Mês	Componente g/100g				
	Gordura (g/100g)	Proteína (g/100g)	Lactose (g/100g)	EST (g/100g)	ESD (g/100g)
Janeiro	6,02±0,62	4,29± 0,45	4,74±0,32	15,99± 0,92	9,97±0,63
Fevereiro	6,04±1,05	4,25±0,25	4,73±0,21	16,04±1,02	10,00±0,25
Março	5,81±0,94	4,02±0,37	4,95±0,24	15,87±1,06	10,06±0,45
Abril	5,46±0,65	3,90±0,32	4,84±0,19	15,14±0,77	9,67±0,28
Mai	5,46±0,70	3,84±0,29	4,90±0,18	15,16± 0,76	9,70±0,28
Junho	5,63±0,88	3,78±0,29	4,91± 0,17	15,25 ± 1,00	9,62±0,24
Julho	5,62±0,70	3,75± 0,36	4,92±0,19	15,29±0,83	9,67±0,33
Agosto	5,57±1,05	3,70± 0,43	4,88±0,21	15,24±1,30	9,65±0,42
Setembro	5,79±1,11	3,74±0,41	4,90±0,28	15,53±1,24	9,74±,50
Outubro	6,00±0,85	3,96±0,36	4,75±0,20	15,74±1,03	9,74 ± 0,39
Novembro	6,09±0,82	4,01 ±0,38	4,73±0,20	15,88±1,05	9,79±0,42
Dezembro	6,37±0,77	4,21± 0,27	4,70±0,20	16,30±0,84	9,93±0,28

(média ± desvio padrão; EST= extrato seco total; ESD= extrato seco desengordurado)

Figura 3: Gráfico de Colunas dos teores dos componentes do leite de búfala obtidos de leite de tanques de refrigeração, gordura (G), proteína (P) e lactose (L), analisados durante o ano de 2022 por meio de análise no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) (Amostras obtidas em 62 unidades produtoras por mês)



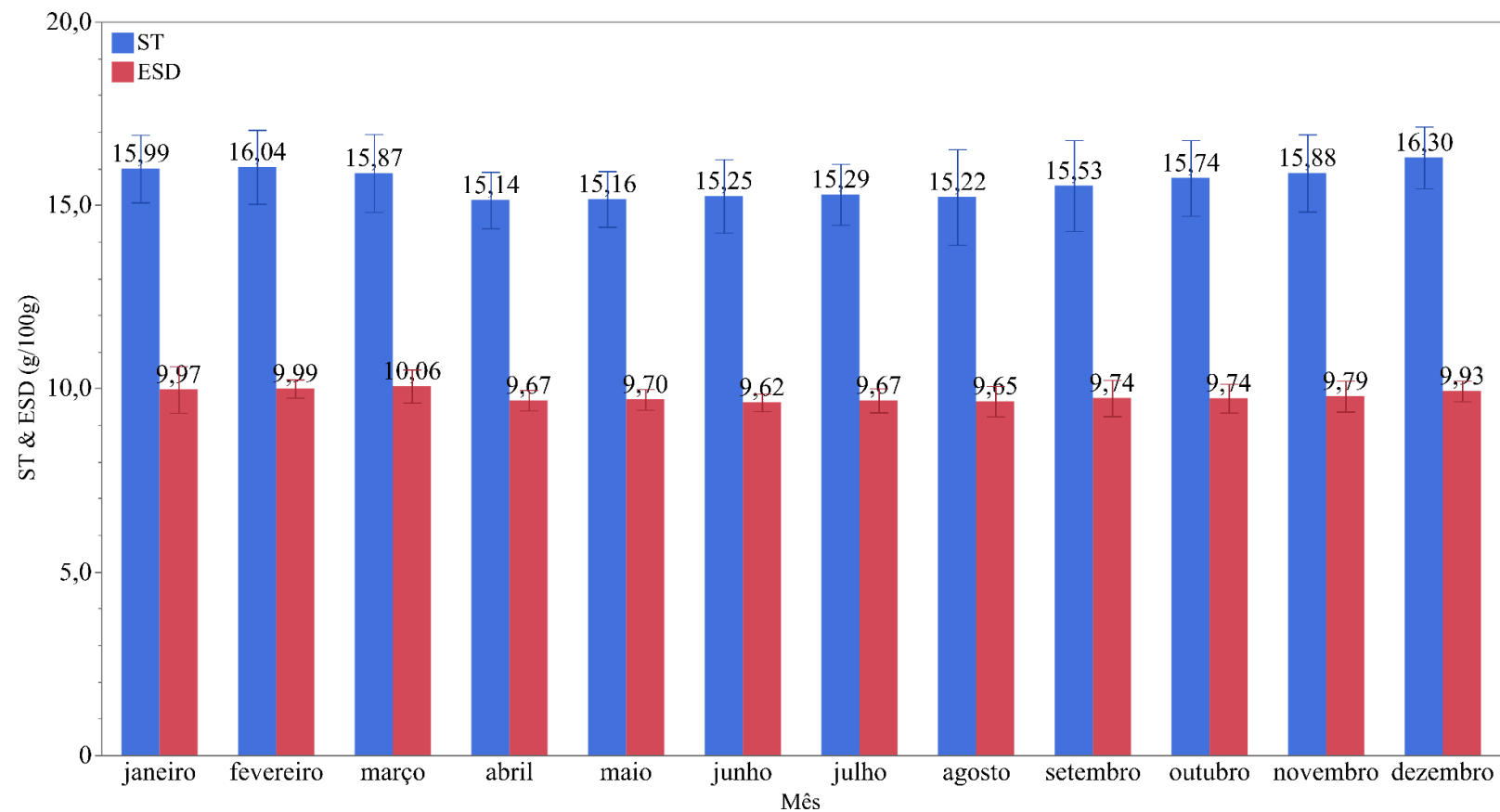
*Cada barra de erro corresponde ao desvio padrão da média

O teores de componentes foram demonstrados na Figura 3. As médias de gordura variaram entre 5,46g/100g a 6,37g/100g, e foram menores quando comparadas aos resultados obtidos por Fernandes (2004). Nesse estudo, a composição do leite bubalino de cinco fazendas no estado de São Paulo foi avaliada e o valores encontrados variaram de 6,6% a 7,5%, enquanto Araujo *et al.*, (2012) avaliaram um conjunto de dados de 514 lactações coletadas de 2004 a 2008 no estado do Rio Grande do Norte, relataram o teor de gordura médio 7,15%. Outras pesquisas indicam valores médio de 8,14% (Figueiredo *et al.*, 2010) a 5,30% (Fangmeier *et al.*, 2019). Dias (2015) relata resultados de análises individuais de rebanhos bubalinhos no Rio Grande do Norte, com média de 5,92%. A gordura se apresenta como o constituinte mais variável e valores acima de 5,5% representam os teores geralmente encontrados na espécie bubalina. Entretanto, teores de gordura de até 13% são citados na literatura (Costa Filho *et al.*, 2014).

Quanto a variável proteína, as médias encontradas no leite de búfala variaram de 3,70g/100g a 4,29g/100g, semelhante ao estudo de Fernandes (2004) que encontrou como média do teor de proteína de 4,2% e que são similares também ao encontrados por Araujo *et al.*, (2012) de 4,32% e Fangmeier *et al.*, (2019) de 4,19%. No entanto, Dias (2015) relataram que a média obtida para o teor de proteínas em leite de búfala foi de 3,05%.

A lactose apresentou a menor variação média no decorrer dos 12 meses 4,70% a 4,95%, apresentando valores próximos aos verificados por Fernandes (2004), variando de 4,9% a 5,2%, Dias, (2015) com o valor médio de 4,27% e de Figueiredo *et al.*, 2010 em que obteve-se médias de 4,43% e 4,55%. No entanto, Fangmeier *et al.*, (2019) conseguiram observar o valor de lactose de 5,33%, superior ao encontrado neste estudo

Figura 4: Gráfico de Colunas dos teores dos componentes do leite de búfala obtidas de tanques de refrigeração, extrato seco total (EST) e extrato seco desengordurado (ESD) analisado durante o ano de 2022 por meio de análise no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) (Amostras obtidas em 62 unidades produtoras por mês)



*Cada barra de erro corresponde ao desvio padrão da média

Em relação ao teor de sólidos totais (Figura 4), as médias obtidas variaram entre 15,14% a 16,30%, as quais se aproximaram ao que foi relatado por Fernandes (2004) em que foi possível observar que as médias variaram entre 16,0% e 18,0%. Verruma e Salgado (1994), tiveram como resultado o valor de de EST de 17,0% semelhante ao de Pessoa *et al.*, (2004), que apresentaram resultados de 16,6%. Os resultados encontrados por Costa Filho *et al.*, em 2014 tiveram média de 15,66%. O EST tem especial importância no leite bubalino para indústria de lácteos, pois sua proporção no leite indica melhor rendimento industrial na fabricação de queijos, iogurtes, e outros derivados lácteos (Araujo *et al.*, 2011).

O ESD é um parâmetro variável comumente usado para nivelar o teor de sólidos do leite de rebanhos em diferentes condições de manejo por desconsiderar a variação de gordura do leite (Araujo *et al.*, 2011). Os valores encontrados (Figura 4) variaram de 9,57% a 10,06%, sendo inferiores ao encontrados por Pessoa *et al.*, 2011 com média de 11,1%, mas similares aos de Rocha (2008), de 10,30% e Costa Filho *et al.*, (2014), de 9,89%.

Para CCS E CPP os resultados compilados foram relatados por números absolutos em base log de 10 (Tabela 5).

Tabela 5: Médias aritméticas e geométricas e desvio padrão de contagem de células somáticas (CCS/ml) e de contagem padrão em placas (CPP UFC/ml) em leite de búfala durante o ano de 2022 (Amostras obtidas em 62 unidades produtoras por mês)

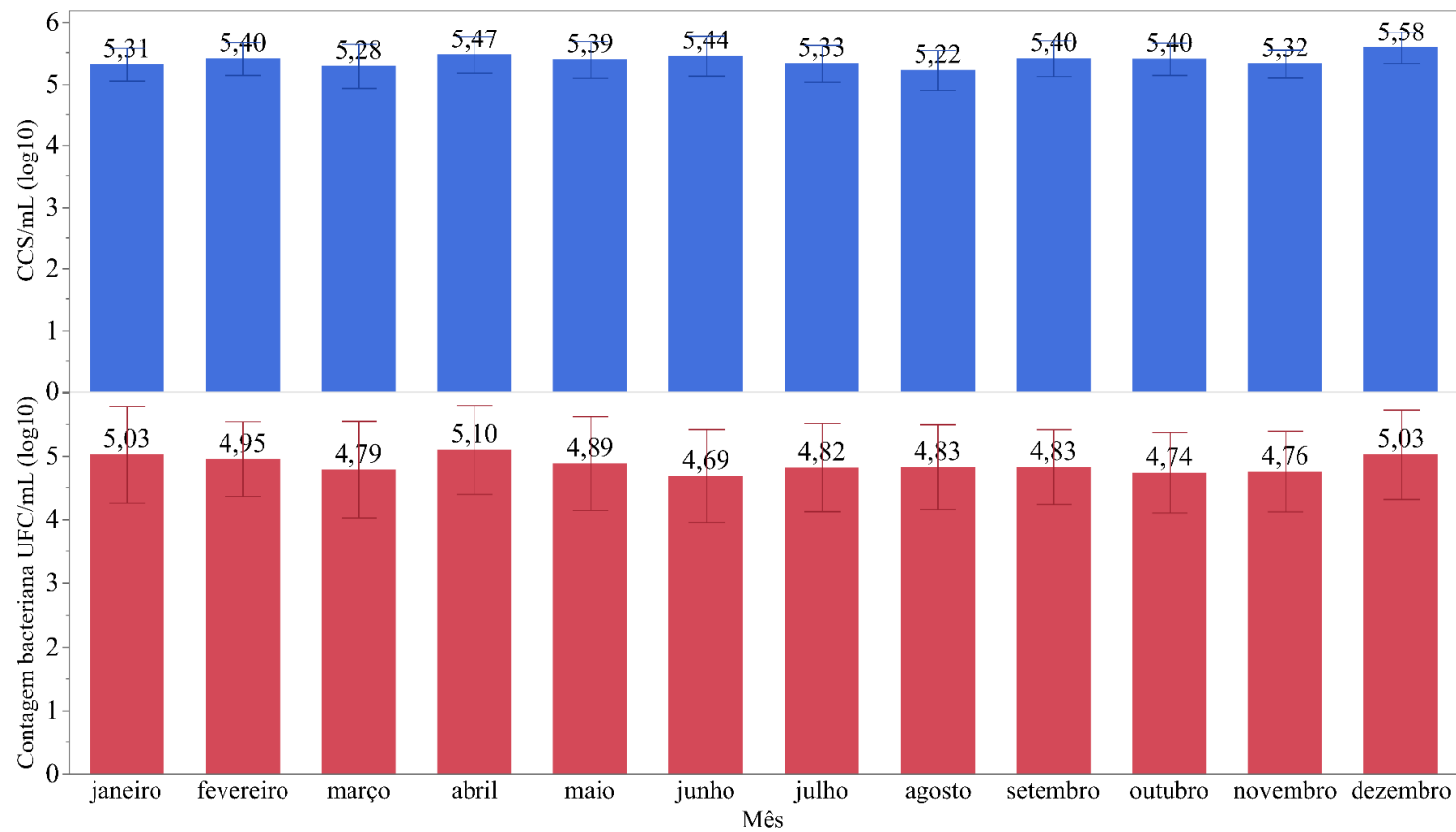
Mês	Componentes			
	CCS/ml (média aritmética)	CCS/ml (média geométrica) log10	CPP UFC/ml (média aritmética)	CPP UFC/ml (média geométrica) log10
Janeiro	243.016 ± 150.903	5,31 ± 0,26	536.500 ± 1.442.704	5,03 ± 0,76
Fevereiro	307.403 ± 245.669	5,40 ± 0,26	241.677 ± 617.585	4,95 ± 0,59
Março	261.854 ± 243.438	5,28 ± 0,35	621.758 ± 2.158.786	4,79 ± 0,76
Abril	358.096 ± 226.448	5,47 ± 0,29	488.516 ± 1.304.852	5,10 ± 0,70
Maiο	300.822 ± 200.010	5,39 ± 0,29	334.532 ± 705.752	4,89 ± 0,74
Junho	355.016 ± 261.252	5,44 ± 0,32	217.209 ± 460782	4,69 ± 0,73
Julho	263.161 ± 186.692	5,33 ± 0,29	375.500 ± 1.349.909	4,82 ± 0,69
Agosto	210.919 ± 154.554	5,22 ± 0,32	310.274 ± 874.501	4,83 ± 0,66
Setembro	306.548 ± 179.973	5,40 ± 0,29	240.258 ± 839.887	4,83 ± 0,59
Outubro	296.709 ± 184.738	5,40 ± 0,26	216.209 ± 590.514	4,74 ± 0,63
Novembro	238.500 ± 133.120	5,32 ± 0,22	370.177 ± 1.414.453	4,76 ± 0,63
Dezembro	456.177 ± 336.693	5,58 ± 0,25	679.838 ± 1.963.350	5,03 ± 0,71

(média ± desvio padrão; CCS=Contagem de células somáticas; log10=base logarítmica de 10;

CPP=contagem padrão em placas; UFC=Unidades formadoras de colônia).

Para a construção do gráfico de colunas foram utilizados os resultados das médias geométricas de CCS e CPP (Figura 5).

Figura 5: Gráfico de Colunas das médias geométricas e desvio padrão de contagem de células somáticas (CCS/ml) e de contagem padrão em placas (CPP UFC/ml) em leite de búfala obtidas de tanques de refrigeração durante o ano de 2022 (Amostras obtidas em 62 unidades produtoras por mês)



*Cada barra de erro corresponde ao desvio padrão da média

Carvalho *et al.*, (2007) relataram que valores de CCS para bubalinos são diferentes dos valores normalmente encontrados em bovinos, sendo que os baixos valores não indicam necessariamente a ausência de infecção intramamária. Os valores encontrados variaram entre 210.000 a 456.000 CCS. Os parâmetros de CCS utilizados para bovinos podem não ser adequados para monitoramento de mastite em rebanhos de bubalinos (Amaral 2005; Araújo & Gheller 2005). Os valores de CCS de búfalas manteve uma uma média de 87.433 CS/ml (Gautam *et al.*, 2023). Os valores médios para CCS encontrados em leite de búfalas saudáveis são de aproximadamente 100.000 CS/ml e 140.000 CS/ml (Silva & Silva 1994; Galiero & Morena 2000; Singh & Ludri, 2001).

Os valores médios para CPP encontrados foram de 216.000 UFC/ml à 679.000 UFC/ml, superiores aos encontrados por Rocha (2008), cujos valores médios para leite de búfala foram de 176 UFC/ml, sendo esta diretamente relacionada ao manejo, ambiente de ordenha, limpeza de utensílios e equipamento, saúde da glândula mamária e qualidade da água e em casos de má higienização esses valores podem variar em 457 UFC/ml a 826 UFC/ml.

As amostras referentes aos 12 meses foram divididas quanto à sazonalidade, segundo as estações do ano primavera, verão, outono e inverno, sendo avaliadas composição, CCS e CPP (Tabela 6). A produção e a composição do leite de búfalas são diretamente influenciadas pela estação do ano, visto que esta afeta a disponibilidade e a qualidade da forragem (Bastianetto *et al.*, 2005), além da questão de conforto e reprodutiva.

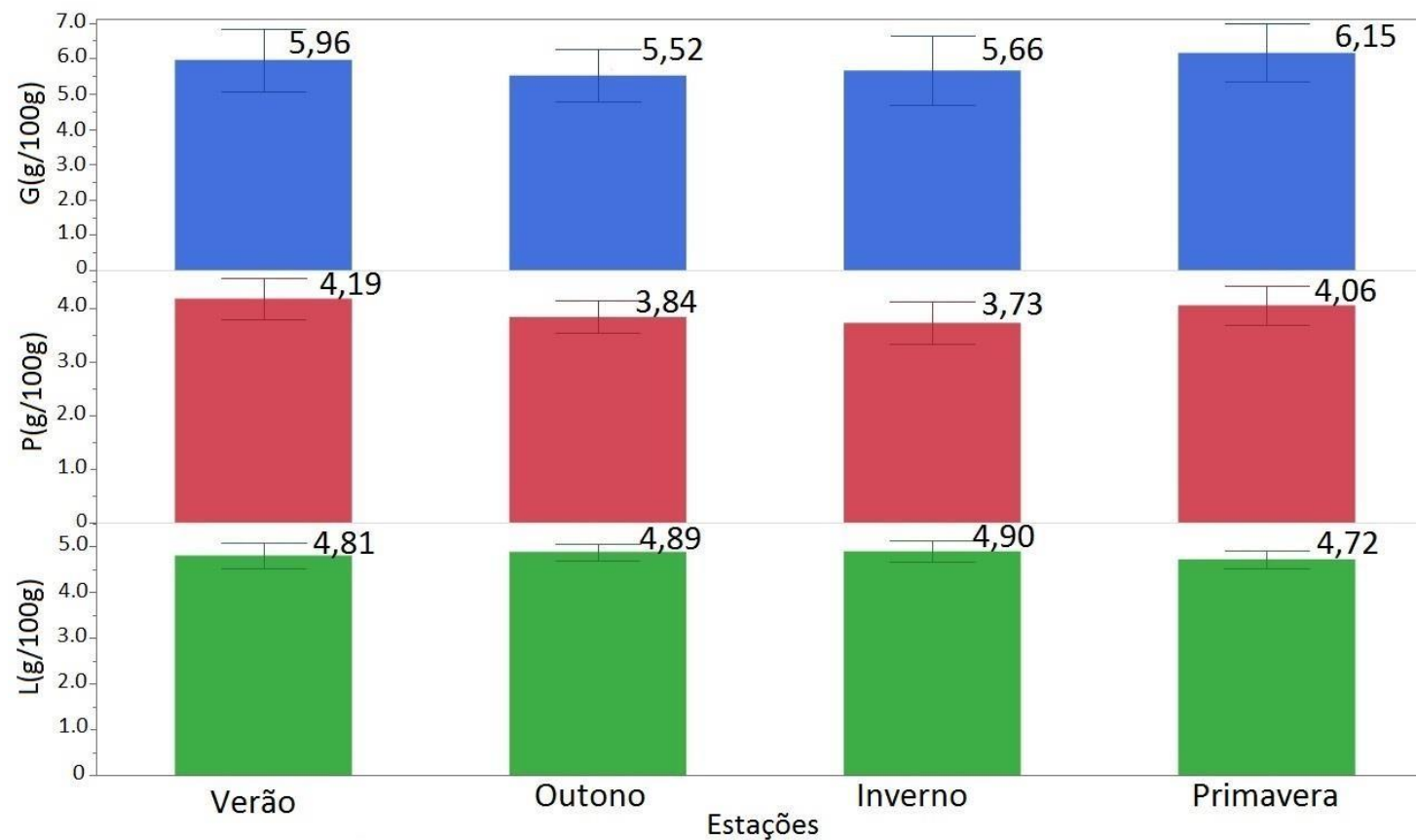
Tabela 6: Média e desvio padrão dos teores dos componentes de leite de búfalas obtidos em tanques de refrigeração e analisados durante o ano de 2022 por meio de análise de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) em diferentes estações (186 amostras de leite por estação do ano em diferentes propriedades)

Estação	Gordura	Proteína	Lactose	EST	ESD
	(g/100g)	(g/100g)	(g/100g)	(g/100g)	(g/100g)
Inverno	5,69 ± 0,96 ^b	3,73 ± 0,39 ^d	4,89 ± 0,23 ^a	15,35 ± 1,13 ^b	9,69 ± 0,41 ^c
Outono	5,52 ± 0,75 ^b	3,83 ± 0,30 ^c	4,88 ± 0,18 ^a	15,18 ± 0,85 ^b	9,66 ± 0,27 ^c
Primavera	6,15 ± 0,82 ^a	4,05 ± 0,36 ^b	4,72 ± 0,20 ^c	15,96 ± 1,00 ^a	9,82 ± 0,38 ^b
Verão	5,95 ± 0,89 ^a	4,18 ± 0,38 ^a	4,81 ± 0,28 ^b	15,96 ± 0,99 ^a	10,01 ± 0,47 ^a

(média ± desvio padrão) Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem

pelo teste de Tukey a 5%

Figura 6: Gráfico de Colunas dos teores dos componentes do leite de búfala obtidos de tanques de refrigeração, gordura (G), proteína (P) e lactose (L), analisados durante o ano de 2022 por meio análise no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) em diferentes estações (186 amostras de leite por estação do ano em diferentes propriedades)



*Cada barra de erro corresponde ao desvio padrão da média

Segundo Amaral *et al.*, (2005), grande parte das alterações na composição do leite, entre as estações, são derivadas do estágio de lactação em que os animais se encontram, devido à sazonalidade reprodutiva da espécie bubalina.

Ao relacionar a variável gordura com as estações do ano, durante o verão e primavera o valor médio não diferiu entre si, no entanto ao compará-lo com os teores médios obtidos no outono e inverno, houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). A estação chuvosa pode ter aumentado a oferta de volumoso e contribuído para o aumento dos precursores lipídicos no sangue de búfalas, favorecendo um maior teor de lipídeos no leite (Andrade *et al.*, 2011). A redução nas concentrações de gordura do leite durante o período seco é devido a menor disponibilidade de forragem de qualidade e ao aumento no fornecimento de concentrado na dieta fornecida aos animais, elevando a produção de propionato no rúmen e reduzindo as concentrações de acetato, além de reduzir o pH ruminal (Leão *et al.*, 2018). Bailone *et al.*, (2017), observaram que a maior média de gordura encontrada foi na primavera (6,5%). Entretanto a questão da sazonalidade reprodutiva foi o fator mais importante.

A média de proteína entre as estações do ano foi a que mais variou, sendo que a maior média foi observada no verão (4,19g/100g), seguido pelos valores encontrados na primavera (4,06g/100g), outono (3,84g/100g) e inverno (3,73g/100g). Resultados similares foram observados por Macedo *et al.*, (2001), com a maior média de proteína no verão (4,79 g/100g) e a menor obtida no inverno (4,13g/100g) diferente de Bailone *et al.*, (2017) em que encontraram no outono, a mediana mais baixa (3,9%) e na primavera, a mediana mais alta (4,4%). Andrade (2011) relatou resultados semelhantes, pois verificaram maiores médias nas estações verão e primavera, 4,38% e 4,24%, respectivamente corroborando com Amaral *et al.*, (2004) que relatou maiores valores de proteína também no verão e primavera.

Os teores de lactose apresentaram maiores médias no inverno (4,9g/100g) e outono (4,89g/100g), seguidos por primavera (4,72 g/100g) e verão (4,81g/100g), o que corrobora com os achado de Bailone *et al.*, (2017) em que a maior mediana ocorreu no outono (5%) e as menores (4,7%) na primavera. Búfalas em lactação sob estresse térmico aumentam a dependência da glicose como fonte de energia. As variações na composição do leite de búfalas durante o ano também podem acontecer devido ao seu comportamento reprodutivo sazonal. No caso de Minas Gerais, nos períodos de verão os dias se apresentam mais longos e no inverno mais curtos, o que

favorece o comportamento sazonal das búfalas. Em um estudo Amaral *et al.*, (2005) na região do Alto São Francisco, Minas Gerais, observaram que, no período das chuvas, houve maiores teores de proteína, sólidos totais e gordura, o que pode ser justificado pela distribuição de alimentos com melhor qualidade nutricional nesta estação, e também ao fato de que as búfalas apresentam o ciclo reprodutivo sazonal e estarem no final da lactação quando ocorre o período das chuvas.

Quanto aos teores de EST (Fig. 7), houve aumento no verão (15,97 g/100g) e primavera (15,97g/100g) em ambas. Amaral (2005) ao avaliar o leite de búfalas na região do Alto São Francisco em Minas Gerais relata que as búfalas tendem a produzir leite com maiores teores de EST no final da lactação, o que pode estar ligado a sazonalidade reprodutiva das mesmas, com concentração de partos entre janeiro a maio. A gordura é o constituinte majoritário do leite de búfalas (Cerón-Munoz *et al.*, 2006), assim qualquer modificação em suas proporções poderá influenciar o teor de sólidos totais do leite (Araujo *et al.*, 2011), o que justifica os maiores valores de gordura e EST no verão e primavera.

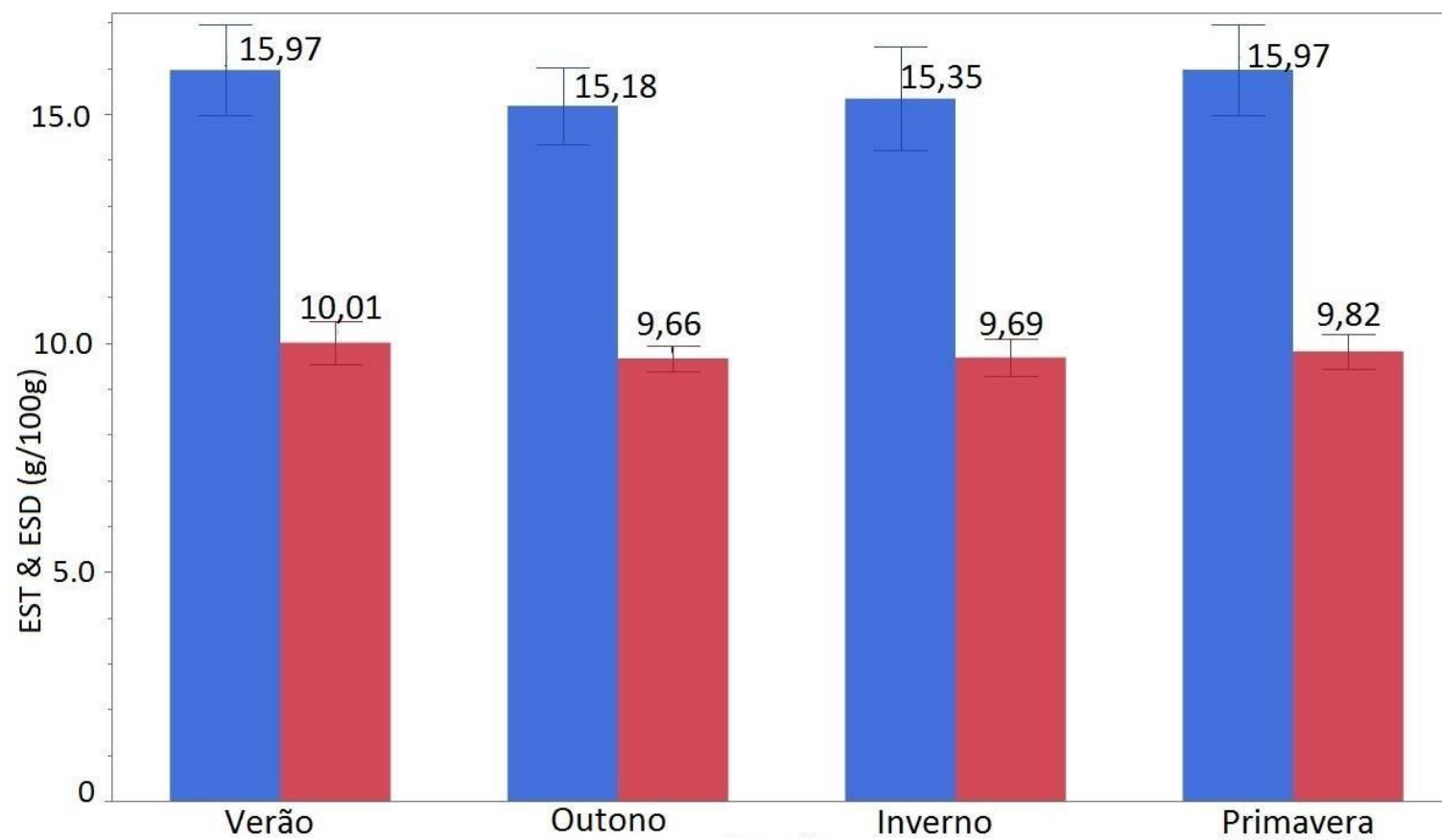
Costa Filho *et al.*, (2014) avaliaram a composição do leite de búfalas e a variação nas quatro estações do ano, no estado do Rio Grande do Norte. A média de EST foi de 16,03% relatada no verão, semelhante ao encontrado 15,97 g/100g, enquanto que, para Begum *et al.*, (2021), a maior variação ocorreu no inverno. Bailone *et al.*, 2017 em um estudo conduzido no estado de São Paulo, Brasil obtiveram maior mediana na primavera (16,6%) mas a menor foi relatada no verão (15,2%), diferente do presente estudo em que as maiores médias ocorreram na primavera e verão. Sabe-se que, em búfalas, à medida que a lactação progride, as concentrações de sólidos, proteína e gordura no leite aumentam, além da nutrição e condições climáticas, fases da lactação também influenciam a produção e composição do leite (Şekerden, 1999).

No outono, a qualidade e a quantidade da forragem estão comprometidas, pois estas tornam-se mais fibrosas e apresentam menor disponibilidade de nutrientes, enquanto que na primavera há maior oferta de forragem de melhor qualidade, isto pode levar ao aumento dos teores de lactose (Weber *et al.*, 2018). No outono as espécies forrageiras tropicais estão no final do ciclo produtivo, apresentando menores teores de carboidratos não fibrosos e maiores teores de fibra em detergente neutro, evidenciando assim, o aumento no teor de gordura no leite (Férrer *et al.*, 2018).

O ESD (Figura 7) apresentou o maior valor médio no verão, (10,01g/100g),

seguido por primavera (9,82 g/100g), inverno (9,69 g/100g) e outono (9,66 g/100g). Para Bailone *et al.*, (2017), as maiores medianas obtidas entre as estações não apresentaram diferenças estatísticas significativas. Araujo *et al.*, (2011), ao avaliarem o leite bubalino em duas épocas do ano, não observaram diferença significativa entre os períodos de chuvas e seca.

Figura 7: Gráfico de colunas dos teores dos componentes do leite de búfala EST e ESD por meio de análise no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) durante o ano de 2022 em diferentes estações (186 amostras de leite por estação do ano em diferentes propriedades)



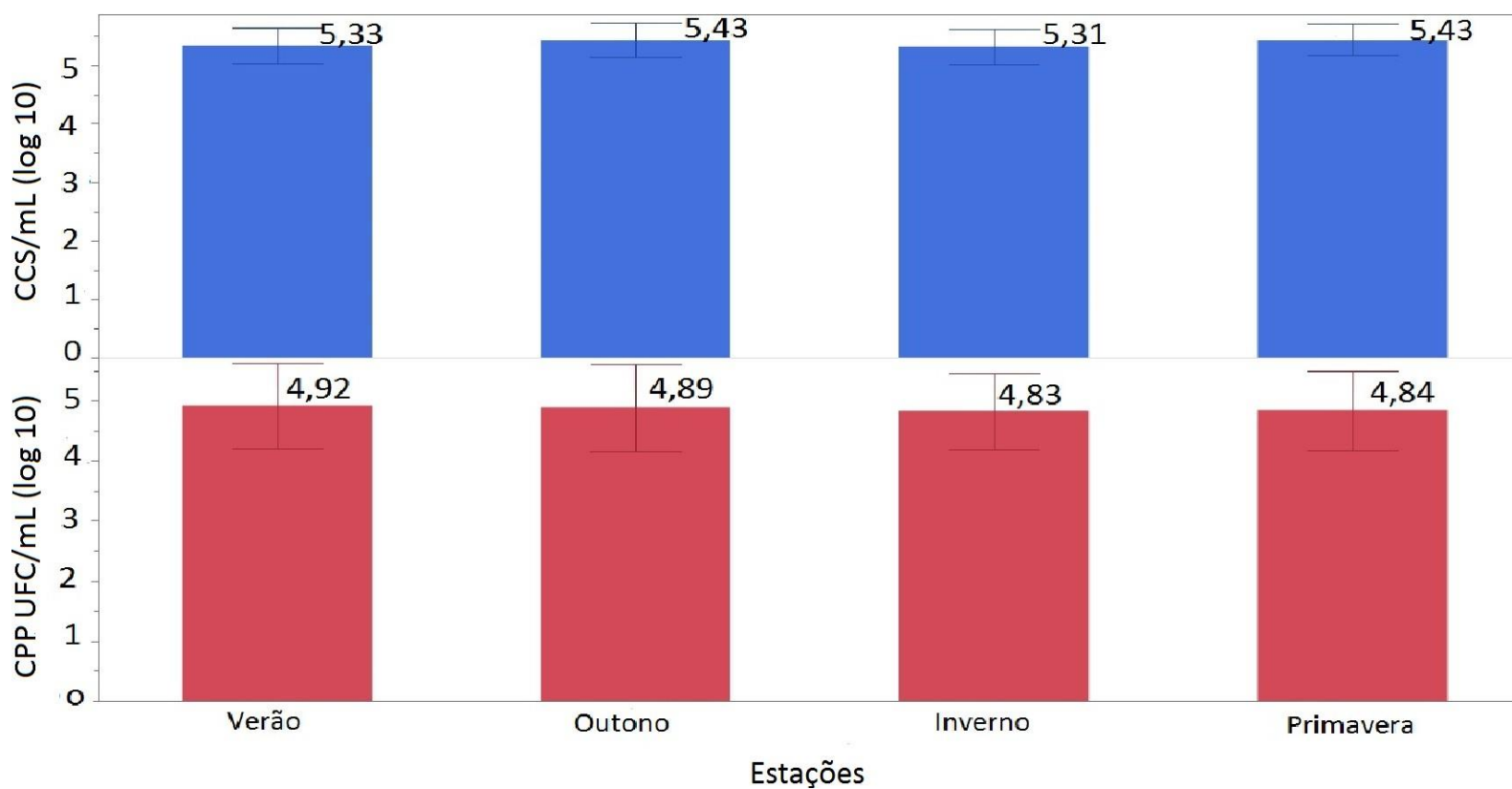
*Cada barra de erro corresponde ao desvio padrão da média

Tabela 7: Médias geométricas e desvio padrão das contagens de células somáticas (CCS/ml) e de contagem padrão em placas (UFC/ml) em leite de búfala no ano de 2022 analisados por citometria de fluxo por estações (186 amostras de leite por estação do ano em diferentes propriedades)

Estação	CCS/ml (média geométrica)	CPP UFC/ml (média geométrica)
Inverno	5,31 ± 0,31 ^b	4,83 ± 0,65 ^a
Outono	5,43 ± 0,30 ^a	4,89 ± 0,74 ^a
Primavera	5,43 ± 0,27 ^a	4,84 ± 0,67 ^a
Verão	5,33 ± 0,30 ^b	4,92 ± 0,71 ^a

(média ± desvio padrão; CCS=Contagem de células somáticas; CPP=contagem padrão em placas; UFC=Unidades formadoras de colônia) médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey a 5%.

Figura 8: Gráfico de Colunas das médias geométricas e desvio padrão das contagens de células somáticas (CCS/ml) e de contagem padrão em placas (UFC/ml) em leite de búfala no ano de 2022 analisados por citometria de fluxo em diferentes estações (186 amostras de leite por estação do ano em diferentes propriedades)



*Cada barra de erro corresponde ao desvio padrão da média

Para a comparação de CCS (Tabela 7; Figura 8), outono e primavera apresentaram as maiores médias e não diferiram entre si, entretanto com diferença significativa entre inverno e verão. Resultado semelhante foi encontrado por Costa Filho *et al.*, (2014) em que a maior média encontrada foi no outono.

A primavera é considerada uma estação chuvosa na qual o excesso de umidade cria condições favoráveis para maior número de infecções e aumento da prevalência de mastite nos rebanhos (Andrade, 2011). Amaral *et al.*, (2004) revisaram a influência da estação do ano e sua relação com a CCS e verificaram maiores valores no verão, período caracterizado por alta umidade e temperatura ambiente, semelhante ao relatado por Andrade (2011) que relatou maior média no verão e a menor no outono. Pizauro *et al.*, (2014) avaliaram búfalas que apresentaram resultados microbiológicos negativos para patógenos envolvidos na mastite, compararam a CCS em duas épocas do ano, seca e chuvas, e os resultados foram de 99.000 células/ml e 125.000 células/ml, respectivamente. Para as búfalas que apresentaram resultados microbiológicos positivos 37.720 células/ml e 190.309 células/ml, respectivamente. Ao avaliar as épocas do ano, Araujo *et al.*, (2016) não observaram diferenças significativas de CCS. Vargas *et al.*, (2019) relataram que as maiores médias foram nas estações verão e outono, com valores de 648.922 células/ml e 582.568 células/ml respectivamente. Simões *et al.*, 2014, compararam CCS em época de chuvas e seca, mas não observaram diferença significativa.

Os búfalos apresentam problemas sanitários semelhantes aos bovinos, entre eles a ocorrência de mastite (Sollecito *et al.*, 2011). É importante manter a CCS de búfalas em até 200.000 células/ml para evitar redução da produção de leite, alterações dos níveis de componentes e alterações no tempo de coagulação durante o processo de produção do queijo, o que pode comprometer a qualidade, o processamento e o rendimento industrial (Tripaldi *et al.*, 2003; CerónMuñoz *et al.*, 2002; Singh e Singh, 1981).

Quanto aos valores de CPP, não houve diferença significativa em relação às estações do ano ($p > 0,05$), semelhante ao observado por Vargas *et al.*, (2019). No entanto, Costa Filho *et al.*, 2014, observaram que primavera e outono tiveram maiores médias de CPP. No estudo de Simões *et al.*, (2014), ao avaliarem rebanhos no Pará (Brasil) e separarem em época de chuvas e secas, houve diferença estatística significativa pois, a CPP teve média maior no período chuvoso (2.320×10^5 UFC/ml)

do que no período seco (1.400×10^5 UFC/ml).

1.3 CONCLUSÃO

Ao avaliar a influência das estações na composição, CCS e CPP do leite de búfala, observou-se que as maiores médias dos teores de gordura, proteína, EST e ESD foram obtidas no verão, seguida por primavera, outono, e possivelmente devido a sazonalidade reprodutiva. No caso da lactose, os maiores teores foram obtidos no inverno e outono, seguido por verão e depois a primavera. Portanto, foi possível observar que há influência das estações do ano na composição e qualidade higiênico-sanitária do leite búfalas no estado de Minas Gerais.

CAPITULO 2: COMPARAÇÃO DA CITOMETRIA DE FLUXO COM MÉTODOS DE REFERÊNCIA POR MICROSCOPIA DIRETA PARA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS NO LEITE

1 INTRODUÇÃO

As células somáticas são principalmente células epiteliais secretoras de leite que se desprenderam do revestimento da glândula e glóbulos brancos (leucócitos) que entraram na glândula mamária em resposta a lesão ou infecção. A CCS pode ser usada para monitorar o nível ou a ocorrência de mastite subclínica em rebanhos ou vacas individuais, sendo um preditor útil de infecção intramamária e, portanto, um importante componente do leite na avaliação dos aspectos de qualidade. No entanto, além da mastite, existem diversos fatores como estágio de lactação, idade, raça, paridade, estação do ano e estresse que influenciam a CCS do leite (Patil *et al.*, 2015).

A utilização de métodos automatizados para análise do leite bubalino atualmente constitui uma realidade, mas ainda há ressalvas quanto à acurácia dos resultados, pois geralmente os laboratórios que analisam o leite de búfala calibram os equipamentos com leite bovino (Coelho *et al.*, 2004).

O objetivo do trabalho foi a citometria de fluxo aplicada a CCS do leite de búfala com o método referência por microscopia direta.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Coleta de amostras

Um total de 75 amostras de leite cru de búfala foram obtidas a partir de tanques de refrigeração de 75 fazendas localizadas em Minas Gerais nos meses de novembro de 2022 a janeiro de 2023. Para a coleta, foram utilizados frascos de 40 ml com conservante Bronopol e microscopia direta, e com conservante Azidiol para CPP. As amostras foram mantidas entre 1°C a 5°C e enviadas ao Laboratório de Análise de Qualidade do Leite da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais

(LabUFMG) credenciado pelo MAPA e acreditado pela norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017.

2.2.2 Métodos Analíticos

2.2.2.1 Análise de Composição

Para avaliar a composição do leite, proteína, gordura, lactose, EST, ESD, nitrogênio ureico no leite (NUL) e caseína, foi utilizado o equipamento CombiScope™ FTIR 400® (Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier), por meio do LactoScope FTIR (Delta Instruments, Drachten, Holanda), seguindo a norma ISO 9622 (IDF 141:2013).

2.2.2.2 Contagem de Células Somáticas

A contagem de células somáticas (CCS) também foi realizada no citômetro de fluxo do equipamento CombiScope™ FTIR 400®, (Delta Instruments) por meio do SomaScope™ seguindo diretrizes do método de referência ISO 13366-2:2006 (IDF 148-2:2006). No entanto, o equipamento para a análise de CCS por citometria de fluxo e foi calibrado com leite bovino.

2.2.2.3 Microscopia direta

A amostra de leite foi aquecida a uma temperatura de 40°C, homogeneizada e adicionada à uma lâmina com auxílio de uma micro seringa em um espaço de 1 cm², e posteriormente seco. Então, as células foram coradas pelo corante de Newman-Lampert (modificado por Lebowitz-Weber com base na ISO 13366-1/IDF 148-1:2008) e contadas por microscopia (microscópio óptico PrimeCam, modelo INTERVISION Nplus 12), utilizando objetiva de imersão e ampliação total de 1000x.

2.2.2.4 Contagem Padrão em Placas

A contagem padrão em placas foi realizada pelo equipamento eletrônico BactoScan FC® (Foss Electric A/S, Hillerod, Dinamarca), que tem por princípio a citometria de fluxo. Segundo a ISO 16297:2020 os resultados são obtidos em CBI, no entanto são convertidos em UFC através de uma equação de transformação (ISO 21187:2021).

2.2.4 Análise Estatística

A análise descritiva foi realizada para composição; CPP e CCS. Como os valores da CCS não seguem uma distribuição normal (Gaussiana), eles foram convertidos em logaritmo para expressão dos resultados. Foi utilizada a análise não-paramétrica de Kruskal-Wallis para avaliar a diferença entre dois métodos com um nível de significância de 5%.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos por meio de FTIR para teores de gordura, proteína, lactose, EST, ESD, nitrogênio ureico no leite (NUL) e caseína de amostras de leite de búfalas obtidas de 75 tanques de refrigeração foram demonstrados na tabela 8.

Tabela 8: Teores dos componentes do leite de búfala (gordura, proteína, lactose, EST, nitrogênio ureico no leite e caseína), obtidos de tanques de refrigeração de 75 unidades produtoras no período de novembro de 2022 a janeiro de 2023 por meio de análise no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

	Gordura	Proteína	Lactose	EST	ESD	NUL	Caseína
	(g/100g)	(g/100g)	(g/100g)	(g/100)	(g/100)	(g/100)	(g/100g)
Média	6,09	4,22	4,65	15,89	9,79	16,73	3,43
Mediana	6,19	4,22	4,66	15,92	9,84	15,5	3,44
Desvio padrão	0,86	0,31	0,16	0,93	0,33	6,58	0,24
Erro padrão	0,09	0,03	0,01	0,10	0,04	0,76	0,03

(EST= extrato seco total; ESD=extrato seco desengordurado; NUL=Nitrogênio ureico no leite).

Os resultados encontrados foram próximos aos obtidos para leite de búfalas no capítulo 1 desse trabalho. Foi realizado o teste de Kruskal Wallis com os dados das contagens de citometria de fluxo e microscopia direta, o resultado obtido foi de $p=0,2326$, comprovando que as medianas de todas as contagens obtidas não são estatisticamente diferentes. Os resultados obtidos através de citometria de fluxo para CPP estão demonstrados na tabela 9.

Tabela 9: Valores de CPP UFC/ml de leite de búfalas obtido de tanques de refrigeração de 75 unidades produtoras no período de novembro de 2022 à janeiro de 2023 pelo método de citometria de fluxo.

	UFC/ml	UFC/ ml (log 10)
Média	195,48	4,71
Mediana	27,00	4,43
Desvio padrão	573758,86	0,62
Erro padrão	66251,97	0,07

(UFC=unidades formadoras de colônia; log10 = base logaritimica de 10).

Os resultados encontrados de CCS por citometria de fluxo e por microscopia direta estão descritos na tabela 10.

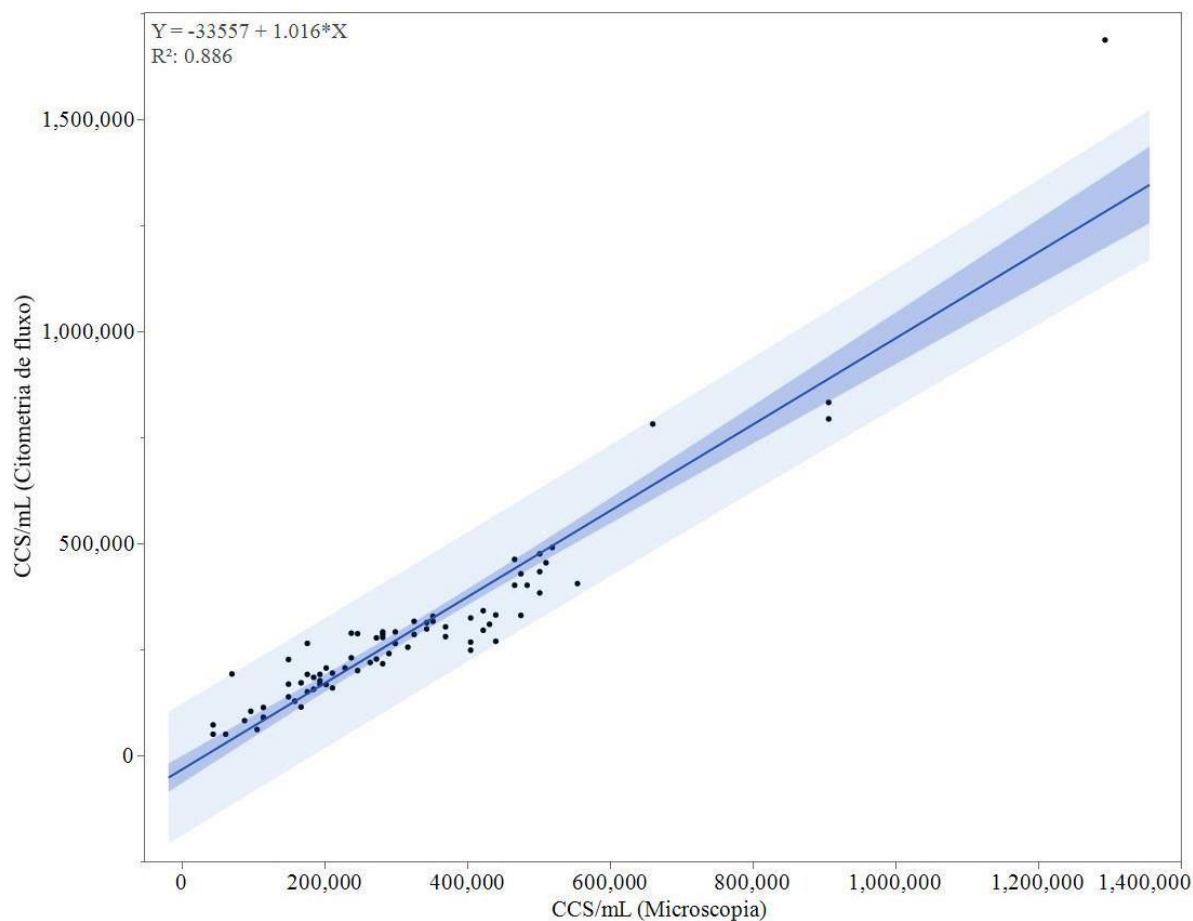
Tabela 10: Valores de CCS/ml de leite de búfala obtidos de tanques de refrigeração de 75 unidades produtoras de leite de búfala no período de novembro de 2022 a janeiro de 2023 pelos métodos de citometria de fluxo e microscopia direta

	CCS/ml Citometria de Fluxo	CCS/ ml (log 10) Citometria Fuxo	CCS/ml Microscopia Direta	CCS/ml (log 10)Microscopia Direta
Média	289.000	5,38	317.504	5.42
Mediana	264.000	5,42	281.600	5.45
Desvio padrão	222,968	0,27	205,453	0,28
Erro padrão	25746,16	0,03	23839,15	0,03

(CCS=contagem de células somáticas; log 10=logaritmo em base 10; UFC=Unidades formadoras de colônia).

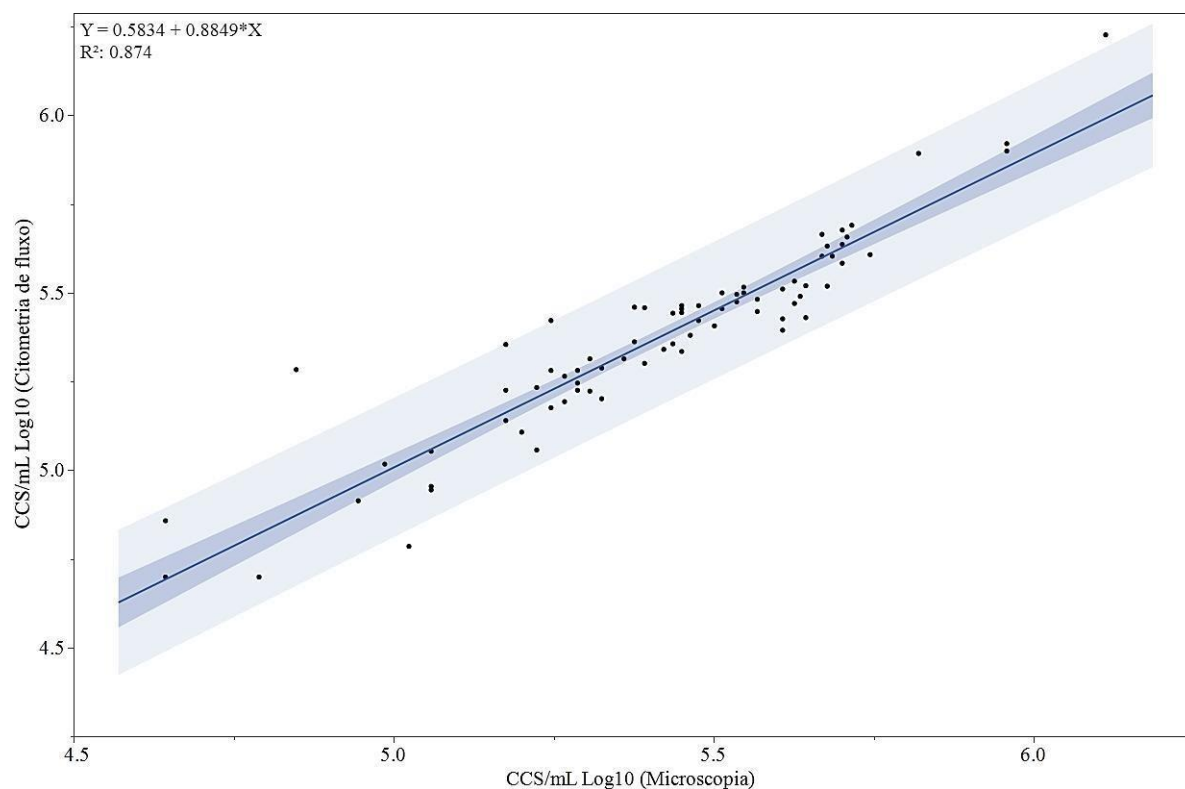
A figura 9 apresenta os resultados obtidos de CCS pelo método de citometria de fluxo comparados ao método de microscopia direta. É possível verificar a alta correlação existente entre os dois métodos e a distribuição próxima à linha de tendência. Pode-se observar o gráfico de dispersão com a linha de tendência, a equação da reta e o coeficiente de determinação de $R^2 = 0,886$. Há correlação linear positiva entre os dois métodos.

Figura 9: Gráfico de dispersão das contagens de células somáticas nos métodos de citometria de fluxo e microscopia direta, com representação da reta de regressão da citometria de fluxo em função da microscopia direta.



Para uma melhor distribuição de dados foi realizada uma transformação logarítmica em log 10, representado na figura 10.

Figura 10: Gráfico de dispersão das contagens de células somáticas (Log10) nos métodos de citometria de fluxo e microscopia direta, com representação da reta de regressão da Citometria de fluxo em função da microscopia direta.



Os intervalos de confiança são exibidos como curvas de confiança, pois fornecem uma faixa de valores para a média prevista para um determinado valor do preditor. Já os intervalos de previsão fornecem um intervalo de valores onde podemos esperar que as observações futuras caiam para um determinado valor do preditor. Intervalos de previsão são úteis quando estamos interessados em usar o modelo para prever valores individuais da resposta.

No estudo de Evangelista (2008), foi avaliada a correlação entre microscopia direta e citometria de fluxo para leite de vaca cru, pasteurizado e esterilizado. Observou-se que houve diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) entre o método de referência de microscopia direta e o método de citometria de fluxo para o leite cru e o pasteurizado. Apenas, no caso do leite esterilizado, os resultados obtidos

entre os dois métodos não revelaram diferença ($p > 0,05$). Segundo Marshall (1992) isso pode ocorrer em razão de alguns fatores: inacurácia na quantidade utilizada de amostra, falha na preparação e coloração de lâminas, irregularidade na distribuição de células somáticas nas lâminas, erros em observação e cálculo, dentre outros. Resultados obtidos a partir do uso da microscopia direta devem ser considerados como estimativa apenas, tendo em vista as limitações relacionadas, por exemplo, à falta de habilidade e prática do analista. No entanto os métodos apresentaram positiva e alta correlação entre o equipamento e a da microscopia direta para leite cru ($r = 0,83$) e para leite pasteurizado ($r = 0,89$), em leite esterilizado observou-se correlação moderada ($r = 0,52$). Gunaskera *et al.*, (2003) relataram alta correlação entre o método de citometria de fluxo e contagens microscópicas diretas para CCS em amostras de leite cru ($r = 0,98$).

A maioria dos equipamentos automáticos avalia o material genético com base na identificação fluoroóptica em vez de células intactas. No entanto, pelo método microscópico direto, as células são contadas com base na morfologia celular intacta (Vermunt *et al.* 1995). Biswas *et al.*, (2016) relataram que as CCS obtidas por microscopia direta de amostras de leite cru de vaca armazenadas por até 12 horas, foram menores quando comparados com análises feitas em leite fresco, provavelmente devido ao rompimento de estruturas celulares e efeito sobre a determinação de CCS pelo método microscópico. No que diz respeito à composição, o leite de búfala contém maior percentual de gordura em comparação com leite de vaca. Sendo que os glóbulos de gordura do leite podem dificultar a contagem precisa de células somáticas por microscopia.

Silveira *et al.*, (2002), ao avaliar amostras de leite de 48 vacas individuais e cinco tanques de resfriamento, não verificou diferença ($p > 0,05$) nas contagens de células somáticas obtidas pelo método de microscopia direta e por analisador eletrônico (Somacount 500 – Bentley Instruments®).

No estudo de Machado (2013), ao avaliar 257 amostras de leite de cabra de cada metade mamária previamente diagnosticadas com mastite subclínica, não verificou diferença estatística entre a prevalência da CCS pelo método automático e pela microscopia direta, semelhante ao encontrado por Andrade *et al.*, (2001) em que as contagens de células somáticas em leite cabra obtidas pela microscopia direta e pelo Somacount 300 calibrado com leite de vaca não foram

estatisticamente diferentes ($P > 0,05$) e a correlação entre os dois métodos foi positiva e alta ($r = 0,76$). O mesmo foi relatado por Arcuri *et al.*, (2004) ao compararem microscopia direta com citometria de fluxo pelo Somacount 300, em leite de cabra e que também não apresentaram diferença entre os métodos e concluíram que a utilização do método automatizado, padronizado com leite de vaca, é apropriado para leitura de CCS de leite de cabras. No contexto deste estudo, foi constatada uma correlação altamente significativa com o valor encontrado de $r = 0,941$.

Em um estudo em que foi avaliado leite de ovelha, Moraes (2005) relatou que não houve diferença significativa entre os métodos de citometria de fluxo e microscopia direta para avaliação de CCS, apresentando coeficiente de correlação moderada ($r = 0,5247$). O mesmo foi relatado por Petersson *et al.*, (2011), ao fazerem comparação entre os métodos utilizando leite de ovelha. Entretanto, Barbosa, *et al.*, (2012) em que ao compararem as técnicas em leite de ovelha, observaram valores maiores nas contagens realizadas por microscopia direta.

Para comparar três diferentes métodos: microscopia direta, citometria de fluxo (Guava easyCyte™ 8HT) e contador de automático de células somáticas Lactoscan SCC (Milkotronic Ltd, Bulgaria), Chengolova *et al.*, (2021) avaliaram 52 amostras de leite de vaca, e observaram uma correlação positiva de 0,96 entre os métodos de citometria de fluxo e microscopia direta.

2.4 CONCLUSÃO

A contagem de células somáticas feita por citometria de fluxo, em equipamento calibrado com amostras de leite bovino se mostrou uma alternativa viável para avaliação da CCS em leite de búfala, tendo em vista a correlação positiva e alta entre os dois métodos, sendo considerados estatisticamente iguais.

Com os resultados obtidos no presente estudo, foi possível observar que é necessário estabelecer parâmetros de qualidade de leite búfala, pois o que de bovinos que são utilizados como parâmetro para leite de búfala se mostraram ineficazes.

2.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No momento, ainda são escassos os dados e legislações referentes ao leite de búfala, sendo que muitas vezes, a calibração de equipamentos para análise, é baseada em leite de vaca e foi possível mostrar que são diferentes para CCS. Portanto, se faz necessário, novos estudos para que legislações específicas para leite de búfala possam ser desenvolvidas para uma melhora na qualidade de leite e derivados fabricados com o leite dessa espécie, que é passível de efeito da variação sazonal.

A metodologia de referência e o método de citometria de fluxo foram equivalentes para avaliação da CCS em leite de búfala com correlação positiva elevada entre ambos os métodos. Sendo assim o método automatizado é eficaz para avaliação de CCS no leite de búfala, sendo equivalentes ($p \leq 0,05$).

2.6 REFERÊNCIAS

ADAN, A.; ALIZADA, G.; KIRAZ, Y.; BARAN, Y.; NALBANT, A. Flow cytometry: basic principles and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, n. 2, p.163–176, 2016.

AHMAD, S.; MÉNARD, O.; ROUSSEAU, F.; BRIARD-BION, V.; GAUCHERSON, F.; LOPEZ, C. Buffalo vs. cow milk fat globules: Size distribution, zeta-potential, compositions in total fatty acids and in polar lipids from the milk fat globule membrane. **Food Chemistry**, v. 120, p. 544-551, 2010.

AHMAD, S.; ANJUM, F.M.; HUMA, M.; SAMEEN, A.; ZAHOOR, T. Composition and physico-chemical characteristics of buffalo milk with particular emphasis on lipids, proteins, minerals, enzymes and vitamins, **The Journal of Animal and Plants Science**, v.23, n.1, p. 62-74, 2013.

ALHUSSIEN, M.N.; DANG, K. Milk somatic cells, factors influencing their release, future prospects, and practical utility in dairy animals: An overview. **Veterinary World**, v.1, p. 562-577, 2018.

AMARAL, F.R.; CARVALHO, L.B.; SILVA, N.; BRITO, J.R.F. Composição e contagem de células somáticas em leite bubalino na região do Alto São Francisco. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 339, p.37-41, 2004.

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

ANDRADE, Kivya Dias. **Qualidade do leite de búfala (*Bubalus bubalis*) suplementada com selênio**. Orientador: Adriano Henrique do Nascimento Rangel. 2015. 50 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2015.

ANDRIGHETTO, C.; Cadeia produtiva do leite de búfala: visão da universidade. Simpósio da cadeia produtiva da bubalinocultura, *In:II SIMPÓSIO DA CADEIA PRODUTIVA DA BUBALINOCULTURA*, 2, Botucatu. Anais [...] Universidade Estadual Paulista, 2011.

ARAÚJO, D. K. G.; GHELLER, V. A. Aspectos morfológicos, celulares e moleculares da imunidade da glândula mamária de búfalas (*Bubalus bubalis*): Revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 29, n. 2, p. 77-83, 2005.

ARAÚJO, T. P. M.; RANGEL, A.H.N.; SOARES, A.D.; LIMA, T.C.C.; LIMA JUNIOR, D.M.; NOVAES, L.P. Influência das estações do ano sobre a composição do leite de búfalas mantido em tanque de resfriamento. **Agropecuária Científica no Semiárido, Campina Grande**, v.7, n.1 p.1-5, 2011.

ARAÚJO, B.S.; RANGEL, A.H.N.; FONSECA, F.C.E.; AGUIAR A, M.; SIMPLICIO, A .A.; NOVAES, L.P.; JUNIOR, D.M.L; Influence of the year and calving season on

production, composition and mozzarella cheese yield of water buffalo in the State of Rio Grande Do Norte, Brazil. **Italian Journal Science**, v.11, p. 87.91, 2012.

ARCURI, E.F.; SILVA, P.D.L.; BRITO, J.R.; SILVA, M.R.; SOUZA, G.N Emprego do Somacount 300 calibrado com leite de vaca, na contagem de células somáticas no leite de cabra, **Ciência Rural**, v.34, p.1497-1500, 2004.

BAILONE, R.L.; BORRA, R.C.; ROÇA, R.O.; AGUIAR, L.; HARRIS, M. Quality of refrigerated raw milk from buffalo cows (*Bubalus bubalis bubalis*) in diferents farms and seasons, in Brazil. **Ciência Animal Brasileira**, v.18, p.1-12, 2017.

BARBOSA, D.A.; BLAGITZ, M.G.; BATISTA, C.F.; GOMES, V.; AZEDO, M.R.; SOUZA, F.N.; BENITES, N.R.; DELLA LIBERA, A.M..M.P. Contagem automática e microscópica direta de células somáticas do leite de ovelhas santa Inês, utilizando como corantes o broadhurst-palley e a hematoxilina-eosina. **Ciência Animal**, v. 22, p. 17-23, 2012.

BARRIENTOS, A.A.; ARROYO, J.; CANTÓN, R.; NOMBELA, C. Applications of flow cytometry to clinical microbiology. **Clinical Microbiology Reviews**, v.13, n.2, p.167-195, 2000.

BASTIANETTO,E.; ESCRIVÃO, S.C.; OLIVEIRA, D.A.A. Influência das características reprodutivas da búfala na produção, composição e qualidade do leite. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.29, p. 49-52, 2005.

BHATTARAI, N. Seasonal variation in milk yeld, fat and SNF content of Murrah crossbreed buffalo in mid-western terai region of nepal. **Journal of Agriculture and Forestry University**, v. 4. p.279-284,2020.

BAUMGARD, L. H.; WHEELLOCK, B., SHWARTZ, G.; BRIEN, M. O.; VAN BAALE, M. J.; COLIER, R. J.; RHOADS, M. L.; RHOADS, R. P. Effects of Heat Stress on Nutritional Requirements of Lactating Dairy Cattle. **Proceedings of the 5th Annual Arizona Dairy Production Conference**: p. 8-17, 2006.

S.; MUKHERJEE, R.; MAHTO, R.P.; K DE, U. Effect of storage temperature on somatic cell count of buffalo milk using direct microscopic method, **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 86, p.32-34, 2016.

BORGHESE, A. Buffalo Livestock and Products. **Council Research Agriculture**, v. 511, p. 978-988, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. RIISPOA. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Diário Oficial da União, Brasília, DF, v. 42, 2017.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA. **População Bubalina no Brasil, por Unidade da Federação, em 2018**. [2018] Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/febre-aftosa/vacinacao/Populaobovina2018.pdf> Acessado em 30 março. 2023.

BRASIL, 2021. Relatório técnico: **Evolução da qualidade do leite no Brasil: amostras de leite cru avaliadas pela RBQL entre 2013 e 2020**. Brasília/DF. MAPA, 2021

CARVALHO, L. B.; AMARAL, F.R.; BRITO, M.A.V.P.; LANGE, C.C.; BRITO, J.R.F.; LEITE, R.C. Contagem de células somáticas e isolamento de agentes causadores de mastite em búfalas (*Bubalus bubalis*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte**, v. 59, p.242-245, 2007.

CASSOLI, Laerte Dagher. **Validação da metodologia de citometria de fluxo para avaliação da contagem bacteriana do leite cru**. Orientador: Paulo Fernando Machado. 2005. 46 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

CÉRON-MUNOZ, M.; TONHATI, H.; DUARTE, J.; MUNOZ-BERROCAL, M.; JURADO-GÁMEZ, H. Factors affecting somatic cell counts and their relations with milk and milk constituent yield in buffaloes. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.2885- 2889, 2002.

CHENGOLOVA, Z.; IVANOV, Y.;GRIGOROVA, G.The relationship of bovine milk somatic cell count to neutrophil level in samples of cow’s milk assessed by an automatic cell counter. **Journal of Dairy Research**, v.88, p.330–333, 2021.

CHRISTEN, G.L. Analyses. In: HUY, Y.H. **Dairy Science and Technology Handbook**. New York: VCH Publishers, v.1, p. 83-156, 1993.

COELHO, K.O.; MACHADO, P.F.; COLDEBELLA, A.; CASSOLI, L.D.; CORASSIN, C.H. Determinação do perfil físico-químico de amostras de leite de búfalas, por meio de analisadores automatizados. **Ciência Animal Brasileira**, v. 5, n.3, p. 167-170, 2004.

COSTA, A.; NEGLIA, G.; CAMPANILE, G.; DE MARCHI, M. Milk somatic cell count and its relationship with milk yield and quality traits in Italian water buffaloes. **Journal of Dairy Science**, v.103, p. 5485-5494, 2020.

COSTA FILHO, M. H. B.; LIMA JUNIOR, F.M.; RANGEL, A .H.N.; NOVAES, L.P.; GALVAO JUNIOR, J.G.B.; SILVA, M.J.M.S.; MORENO, G.M.B. Sazonalidade e variação na qualidade do leite de búfalas no Rio Grande do Norte. **Acta Veterinária Brasília**, Mossoró, v. 3, p.201-208, 2015.

CRISAFULI, Fabiano Augusto de Paula. **Caracterização das interações do DNA com as moléculas Actinomicina D e GelRed**. Orientador: Marcio Santos Rocha 2016. 116 f Tese (Doutorado em Física Aplicada) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2016.

CUNHA NETO, Otaviano Carneiro da. **Avaliação físico-química e sensorial do iogurte natural produzido com leite de búfala contendo diferentes níveis de gordura**. Orientador: Carlos Augusto Fernandes de Oliveira. 2003. 71f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos de

São Paulo. Pirassununga.

DANN, O.; BERGEN, G.; DEMANT, E.; VOLZ, G. Trypanocide damine des 2-phenyl-benzofu-rans, 2-phenyl-indens and 2-phenyl-indols, **European Journal of Organic Chemistry**, v.749, p.68-89,1971.

DELLA LIBERA, A.M.M.P.; ARAÚJO, W.P.; KITAMURA, S.S.; ROSENFELD, A.M.F.; BIRGEL, E.H. Citologia do leite de búfalas (*Bubalus bubalis*) hígidas criadas no Estado de São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**, v.34, p.1087-1092, 2004.

DHAKAL, I.P.; KAPUR, M.P.; SHARMA, A. Significance of differential somatic cell counts in milk for the diagnosis of subclinical mastitis in buffaloes using foremilk and strippings milk. **Indian Journal of Animal Health**, v.31, n.1, p.39-42, 1992.

DIAS, Sabrina da Silva. **Determinação de adulteração por adição de leite bovino em queijo bubalino**, Orientador: Ronoel Luiz de Oliveira Godoy 2012. 95 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

DUARTE, J. M. C.; TONHATI, H.; CERON MUNOZ, M.F.; BERROCA, M.M.; CANAES, T.S. Efeitos ambientais sobre a produção no dia do controle e características físico-químicas do leite em um rebanho bubalino no estado de São Paulo. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 56, p. 16- 19, 2001.

EL-SALAM, M.H.A.; EL-SHIBINY, S. A Comprehensive Review on the Composition and Properties of Buffalo Milk. **Dairy Science & Technology**, v.91, p. 663-699, 2011.

EVANGELISTA, Deborah Teixeira. **Comparação entre métodos de referência e eletrônico por citometria de fluxo na contagem bacteriana total (CBT) e de células somáticas (CCS) em leite submetido a diferentes tratamentos térmicos**. Orientador: Mônica Maria O Pinho Cerqueira. 2008. 65f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) Universidade Federal de Minas Gerais.

FANGMEIER, M.; KEMERICH, G. T.; MACHADO, B. L.; MACIEL, M. J.; SOUZA, C. F. V. Effects of cow, goat, and buffalo milk on the characteristics of cream cheese with whey retention. **Food Science and Technology**, v.39, p. 122-128, 2019.

FAO, 2020 **FAO Dairy animals** Acessado em: 04 de outubro, 2022. [https://www.fao.org/dairy-production-products/production/dairy-animals/en/ \(2022\)](https://www.fao.org/dairy-production-products/production/dairy-animals/en/ (2022))

FENNEMA, O. R.; PARKIN, K. L.; DAMODARAN, S. Química de Alimentos de Fennema, 4. ed, Porto Alegre: **Artmed**, p. 689-718, 2010.

FERNANDES, Sérgio Augusto de Albuquerque. **Levantamento exploratório da produção, composição e perfil de ácidos graxos do leite de búfalas em cinco fazendas do Estado de São Paulo**. Orientador: Wilson Roberto Soares Mattos. Tese (Doutorado em Agronomia). 2004. 98f. Universidade de São Paulo. Piracicaba.

FÉRRER, M. T.; FRANQUE, A.S.S.; MELO SANTORO, K.R. Variabilidade espacial da composição do leite cru refrigerado no estado de Alagoas e na mesorregião do

Agreste Pernambucano. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 6, p. 1925-1934, 2018.

FIGUEIREDO, E. L.; JUNIOR, J.B.L.; TORO, M.J.U. Caracterização físico-química e microbiológica do leite de búfala "In natura" produzido no estado do Pará. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial** v. 04, n. 01. p. 19-28, 2010.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000, 175p.

FONSECA, W. O búfalo, sinônimo de carne, leite, manteiga e trabalho. 4. ed. São Paulo: **Ícone, coleção Brasil agrícola**, p. 47–48, 1986.

GALIERO G.; MORENA, C. The meaning of somatic cell count in buffalo milk. **Bubalus Bubalis**, v.6, p. 26-27 2000.

GAUTAM, P.B.; SHARMA, R.; ATBHAIYA, Y. MANN, B. Activities of indigenous proteases in cow, buffalo and goat milk of Indian subcontinent and their correlation with somatic cell count. **International Dairy Journal**, v. 139, 105567, 2023.

GUNASKERA, T.S.; VEAL, D.A.; ATTFIELD, P.V. Potential for broad applications of flow cytometry and fluorescence techniques in microbiological and somatic cell analyses of milk. **International Journal of Food Microbiology**, v.85, p. 269-279, 2003.

HALASA, T. & KIRKEBY, C. Differential Somatic Cell Count: Value for Udder Health Management. **Frontiers in Veterinary Science**, v.7, 609055, 2020.

HAMEED, A.; HUSSAIN, M.; AKHTAR, S. Lactation responses toward milk indigenous enzymes. **Livestock Science**, p. 91-108, 2017.

HAO, M.; JIANG, J.; ZHANG, Y.; WANG, S.; FU, G.; ZOU, F.; XIE, Y.; ZHAO, S.; LI, W. Transcriptional profile of the mammary gland of buffaloes with different milk fat contents. **Gene**, v.802, 2021.

HUSSAIN, I.; BELL, A.E.; GRADISON, A.S. Comparison of the rheology of Mozzarella type curd made from buffalo and cow's milk. **Food Chemistry**, n. 128, p. 500-504, 2011.

IÑON, F.A.; GARRIGUES, S.; GUARDIA, M. Nutritional parameters of commercially available milk samples by FTIR and chemometric techniques. **Analytica Chimica Acta**, v. 513, p. 401–412, 2004.

IDF. International IDF Standard 148A. **Milk - Enumeration of somatic cells**. Bruxelles. International Dairy Federation, 1995, 8 p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Regiões, mesorregiões geográficas do Brasil**. Brasília: IBGE, 2006, v. 34, 62p.

ISO 21187:2021. **Milk – Quantitative determination of bacteriological quality –**

Guidance for establishing and verifying a conversion relationship between routine method results and anchor method results. Brussels, Belgium, 02/2021. 19p.

ISO 13366-1:2008. **Milk – Enumeration of somatic cells – part 1: Microscopic method (Reference method).** 2008

KAPADIYA, D.B.; PRAJAPATI, D.B.; JAIN, A.K.; MEHTA, B.M.; DARJI, V.B.; APAMATHI, K.D. Comparison of Surti goat milk with cow and buffalo milk for gross composition, nitrogen distribution, and selected minerals contents. **Veterinary World**, v.9, p. 710-716, 2016.

KAPRONEZAI, Josana. **Estudo de provas microbiológicas e celulares em amostras de leite provenientes de fêmeas bubalinas (*Bubalus bubalis*) no Estado de São Paulo.** Orientador: Nilson Roberti Benites, 2004. 82f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia 2004.

KAUR,G.; BANSAL, B.K.; SINGH, R.S.; KASHYAP, N.; SHARMA, S. Associations of teat morphometric parameters and subclinical mastitis in riverine buffaloes. **Journal of Dairy Research**, v. 85, p. 303-308, 2018.

KHEDKAR,C.D.; KALYANKAR, S.D.; DEOSARKAR, S.S.; CABALLERO,B.; FINGLAS, P.; TOLDRÁ, F. Buffalo Milk. **The Encyclopedia of Food and Health** v. 1, p. 522-528, 2016.

LEÃO, P.V.T.; SILVA, M.A.P.S.; SILVA, J.A.G.; LIMA, M.S.; FERREIRA, S.M.; CARMO, R.M.; NICOLAU, E.S.; ALVES, J.F. Efeito do período do ano sobre a qualidade do leite cru refrigerado produzido no município de Caçu – GO. **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, 27 a 30 agosto, 2018.

LUCENA, Rodrigo Barros de. **Curva de conversão de contagem bacteriana individual em contagem padrão em placa.** 2016. 91f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

MACEDO, M.P.; WECHSLER, F.S.; RAMOS, A.A.; AMARAL, J.B.; SOUZA, J.C.; RESENDE, F.D.; OLIVEIRA, J.V. Chemical composition and production of milk from Mediterranean buffalo cows raised in western of São Paulo State, Brazil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, p.1084-1088, 2001.

MACHADO, Gustavo Puglia. **Caracterização microbiológica, molecular e contagem de células somáticas por citometria de fluxo (Somacount 300®) e por contagem microscopia (Prescott e Breed, 1910) do leite caprino mastítico.** Orientador: Helio Langoni. 2013. 217f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

MARSHALL, R.T. Standard methods for examination of dairy products. Baltimore: **American Public Health Association**, p. 546, 1992.

MEDEIROS,E.S.; BARBOSA, S.B.P.; JATOBÁ, R.B.; AZEVEDO, S.S.; PINHEIRO

JUINIOT, J.N.; SAUKAS, T.N.; ALBURQUEQUE, P.P.F.; MOTA, R.A. Perfil da contagem de células somáticas na infecção intramamária em búfalas na Região Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 3, p.219-223, 2011.

MEJARES,C.T.; HUPPERTZ,T.; CHANDRAPALA, J. Thermal processing of buffalo milk – A review. **International Dairy Journal**, v. 129, 2022.

MINERVINO, A.H.H.;ZAVA, M.; VECCHIO, D.; BORGHESE, A. *Bubalus bubalis*: A short story. **Frontiers in Veterinary Science**, v.7, 2020.

MORAES, Rosa Cristiane. **Contagem de células somáticas e isolamento bacteriano em leite de ovelhas no Estado do rio Grande do sul – Brasil** Orientador: Verônica Schimidt. 2015. 73f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MOREIRA, P.; COSTA, A. L.; VALENTIM, J. F. Comportamento produtivo e reprodutivo de bubalinos mestiços Murrah-mediterrâneo em pastagem cultivada de terra firme, no Estado do Acre. **Folheto EMBRAPA ACRE**, v. 13, p. 19, 1994.

MORADI, M.; OMER A. K.; RAZAVI, R.; VALIPOUR, S.; GUIMARÃES, J.T. The relationship between milk somatic cell count and cheese production, quality and safety: A review. **International Dairy Journal**, v.113. 104884, 2021.

MURTAZA, M.A.; PANDYA, A.J.; KHAN, M.M.H. Buffalo milk utilization for dairy products, **Handbook of milk of non-bovine mammals** (2^a ed.), John Wiley & Sons, Inc, Chichester, UK, p. 284-342, 2017.

MURPHY, S. C.; MARTIN, N.H.; BARBANO, D. M.; WIEDMANN, M.. Influence of raw milk quality on processed dairy products: How do raw milk quality test results relate to product quality and yield. **Journal of Dairy Science**, v.99. n.12. p.10128- 10149, 2016.

OLIVEIRA, M. C. P. P.; SILVA, N. M. A.; BASTOS, L. P. F.; FONSECA, L. M.; CERQUEIR, M. M. O. P.; LEITE, M. O.; CONRADO, R. S. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) for MUN analysis in normal and adulterated milk. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 64, n. 5, p. 1360–1366, 2012.

PANTOJA, L.S.G.; AMANTE, E.R.;RODRIGUES, A.M.C.;SILVA, L.H.M. World scenario for the valorization of byproducts of buffalo milk production chain. **Journal of Cleaner Production**, v.364, 2022.

PATIL, M.P.; NAGVEKAR, A.S.; INGOLE, S.D.; BHARUCHA, S.B.; PALVE, V.T. Somatic cell count and alkaline phosphatase activity in milk for evaluation of mastitis in buffalo. **Veterinary World**, v.8, p. 353-366, 2015.

PEREIRA, K.F.; PESSOA, J.S.; NAHÚM, B.S.; GARCIA,.S.; LOURENÇO JUNIOR, J.F.; LIMA, S.C.G. Perfil físico-químico do leite em diferentes fases da lactação de búfalas (*Bubalus bubalis*) jovens mantidas a pasto **48^a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, 2006.

PESSOA, J.S.; NAHÚM, B.S.; GARCIA, S.; PEREIRA, K.F.; LOURENÇO JUNIOR,

J.F.; LIMA, S.C.G. Perfil físico-químico do leite em diferentes fases da lactação de búfalas (*Bubalus bubalis*) jovens mantidas a pasto 48^a **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia O Desenvolvimento da Produção Animal e a Responsabilidade Frente a Novos Desafios Belém**, 2011.

PETERSSON, K.H.; CONNOR, L.A.; PETERSSON-WOLFE, C.S.; REGO, K.A. Short communication: Evaluation of confirmatory stains used for direct microscopic somatic cell counting of sheep milk. **Journal Dairy Science**, v.94, p. 1908-1912, 2011.

PIZAURO L.J.L., SILVA D.G., SANTANA A.M., CLEMENTE V., LARA G.H.B., LISTONI F.J.P., VAZ A.C.N., VIDAL-MARTINS A.M.C., RIBEIRO M.G. & FAGLIARI J.J. Prevalence and etiology of buffalo mastitis and milk somatic cell count in dry and rainy seasons in a buffalo herd from Analândia, São Paulo State, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.66, p.1703-1710, 2014.

PORTNOY, M.; COON, C.; BARBANO, D.M.; Infrared milk analyzers: milk urea nitrogen calibration, **Journal of Dairy Science**, v.104, p.7426-7437, 2021.

RAO, V. B.; FRANCHITO, S. H.; SANTO, C. M. E; GAN, M. A. An update on the rainfall characteristics of Brazil: seasonal variations and trends in 1979-2011. **International Journal of Climatology**, v.36, n.1, p.291-302, 2015.

RIBEIRO, D.S.C.Z.; TAVARES, W.L.F.; LEITE, M.O.; CERQUEIRA, M.O.P.; LIMA, J.S.; FERREIRA, L.F.; FEIJÓ, F.A.C.; HADDAD, J.O.; FONSECA, L.M. Interferência de adulterantes na análise do leite cru por espectroscopia pela transformada de Fourier. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.70, n.5, p.1649-1654, 2018.

RICCI, G. D.; DOMINGUES, P. F. O leite de búfala **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v.10, n.1, p.14–19, 2012.

ROCHA, Luciana Albuquerque Caldeira. **Qualidade do leite de búfala e desenvolvimento de bebida láctea com diferentes níveis de iogurte e soro de queijo**. Orientador: Sibelli Passini Barbosa Ferrão. 2008. 82f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

ROSA, B.R.T.; FERREIRA, M.M.G.; AVANTE, M.L.; FILHO, D.Z.; MARTINS, I.S. Introdução de búfalos no Brasil e sua aptidão leiteira. **Revista Científica eletrônica de Medicina veterinária e zootecnia de Garça/FAMED**, n.8, 2007.

SÃO PAULO. Secretária de Agricultura e Abastecimento. **Resolução SAA n. 3, de 10 de janeiro de 2008. Altera dispositivo da Resolução SAA n. 24, de 01 de agosto de 1994.** São Paulo, 2008. Disponível em: <https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/resolucao-saa-03-de-10-01-2008,812.html>. Acesso em 21 de jan. 2023.

ŞEKERDEN, O. Factors affecting milk composition and changes in milk composition with lactation stage in Anatolian buffaloes. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v.23, p. 505-510, 1999.

SHARMA, A. Relationship of Somatic Cell Count and Mastitis: An Overview **Animal Journal of Science**, v. 24, p. 429 – 438, 2011.

SHARMA, N.; KANG, T.Y.; LESS, S.J.; KIM, J.N.; HUR, C.H.; HA, J.C.; VOHRA, V.; JEONG, D.K. Status of bovine mastitis and associated risk factors in subtropical Jeju Island, South Korea. **Tropical Animal Health**, v.8, p.1829-1832, 2013.

SILVA, I.D.; SILVA, K.F.S.T. Total and differential cell counts in buffalo (*Bubalus bubalis*) milk. **Buffalo Journal**, v.10, p.133-137, 1994.

SILVA, Julio Cesar Barbosa **Sazonalidade reprodutiva em búfalas: efeitos na produção in vitro de embriões e nas taxas de concepção utilizando embriões criopreservados**. Orientador: Felipe Perecin. 2020. 89f. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade de São Paulo. Pirassununga.

SILVEIRA, T.M.L. FONSECA, L.M.; LAGO, T.B.M.; VEIGA, D.R. Comparação dos métodos de referência e de análise eletrônica na determinação da composição e da contagem de células somáticas do leite bovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, p.128-132, 2005.

SIMÕES, M.G.; PORTAL, R.E.; RABELO, J.G.; FERREIRA, C.L.L.F. Seasonal variations affect the physicochemical composition of buffalo milk and artisanal cheeses produced in Marajó Island (PA, Brazil). **Advance Journal of Food Science and Technology**, v.5, p. 81-91, 2014.

SINGH, M.; LUDRI, R.S.; Somatic cell counts in Murrah buffaloes (*Bubalus bubalis*) during different stages of lactation, parity, and season. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, v.14, p.189-192, 2001.

SINGH, S.P.; SINGH, R.S. Influence of somatic cell count on the physico-chemical properties of buffalo milk. **Indian Journal of Dairy Science**, v.34, p.96-99, 1981.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCK S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. Editora Thomson, tradução da 8ª edição, 2006.

SOCIEDADE NACIONAL DA AGRICULTURA. 2013 Disponível em: <https://www.sna.agr.br/mercado-diferenciado-pode-atrair-interesse-para-criacao-de-bufalos/>.

SOLLECITO, N.V.; LOPES, L. B.; Leite, R. C. Contagem de células somáticas, perfil de sensibilidade antimicrobiana e microorganismos isolados de mastites em búfalos: Uma breve revisão. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.1, n.33, p.18-22, 2011.

SUHREN, G.; WALTE, H. G. First experiences with automatic flow cytometric determination of total bacterial count in raw milk. **Bulletin of the IDF**, n. 358, p-36- 48, 2000.

TAVARES, Wanessa Luciene Fonseca. **Uso de Espectrofotometria FTIR (Fourier Transform Infrared) e mineração de dados para a detecção e identificação de**

adulterantes no leite cru. Orientador: Leorges Moraes da Fonseca. 2019. 98f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais.

TRIPALDI, C.; TERRAMOCCIA, S.; BARTOCCI, M.; DANESI, V. The effects of the somatic cell count on yield, composition and coagulating properties of Mediterranean buffalo milk. **Asian-Australian Journal of Animal Science**. v. 16, p. 738-742, 2003.

TORRES-JUNIOR, J.R.S.; RIBEIRO, L.S.; PEREIRA, G.P.; FRANÇA, I.G.; Sazonalidade reprodutiva de bubalinos (*Bubalus bubalis*) em regiões equatorial e temperada. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.40, p. 142-147, 2016.

UPPAL, S.K.; SINGH, K.S.; ROY, D.C. Natural defence mechanism against mastitis: a comparative histomorphology of buffalo and cow teat canal. **Buffalo Journal**, v.10, p.125-131, 1994.

VAN DE VOORT, F.R. Fourier transform infrared spectroscopy applied to food analysis. **Food Research International**, v.25, n. 5, p.397-403, 1992.

VARGAS, D.P.; NORNBORG, J.L.; SCHEIBLER, R.B.; RIZZO, F.A.; RITT, L.A.; MILANI, M.P. Qualidade físico-química e microbiológica do leite bovino em diferentes sistemas de produção e estações do ano. **Ciência Animal Brasileira**, v.20, p. 1-11, 2019.

VERMUNT, A. E. M.; LOEFFEN, G. J. M.; VAN DER VOET, H.; NABER, M. A. A. M. Development of reference samples for calibration and quality control of somatic cell count using a Fossomatic instrument. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, v.49, p. 111–23, 1995.

VERRUMA, M.R.; SALGADO, J.M.; Análise Química do leite de búfala em comparação ao leite de vaca. **Tecnologia Agroindustrial**, v.51, p. 131-137. 1994.

WEBER, C.T.; BUSANELLO, M.; CALGARO, J.L.B.; SHNEIDER, C.L.C.; GEHRKE, C.R.; ALMEIDA, A.P.A./ CONCEIÇÃO, J.M.; HAYGERT-VELHO, I.M.P. **Composição do leite em relação as estações do ano em um rebanho leiteiro semiconfinado no Rio Grande do Sul**, 28º Congresso Brasileiro de Zootecnia, 2018.

WIKERSON, M.J. Principles and applications of flow cytometry and cell sorting in companion animal medicine. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 42, p. 53-71, 2012.

YASMIN, A.; HUMA, N.; BUTT, M.S.; ZAHOR, T.; YASIN, M. Seasonal variation in milk vitamin contents available for processing in Punjab, Pakistan. **Journal of the Saudi Society of Agriculture Sciences**, v.11, p. 99-105, 2012.

ZANELA, M.B.; KOLLING, G.J.; NORNBORG, J.L.; RIBEIRO, M.E.R. Perfil de ácidos graxos no leite de búfala da raça Murrah. **Circular Técnica Embrapa**, v. 164, p.1–4, 2015.

ZUFFO, Gian Ricardo **Espectroscopia por bioimpedância elétrica, análise em tempo real para a determinação da contagem de células somáticas no leite**

bovino. Orientador: Ana Luiza Bachmann Schogor. 2021. 65f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade do Estado de Santa Catarina.