

SANIDADE DA GLÂNDULA MAMÁRIA E MONITORAMENTO DA QUALIDADE DO LEITE DE BÚFALA PRODUZIDO NA ESTAÇÃO EXPERIMENTAL AGRONÔMICA DA UFRGS

Franciele de Moura Fernandes¹
Vitoria Di Domenico²
Amanda Souza da Motta³

RESUMO

A produção de leite de búfala direto. Com isso, este trabalho objetivou monitorar a sanidade da glândula mamária e a qualidade do leite de búfala produzido na Estação Experimental Agronômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul com a utilização de protocolos de Boas Práticas Agropecuárias na ordenha. Foram coletadas amostras de leite de quartos mamários que apresentaram reação ao *California Mastitis Test*, para isolamento e identificação do agente causador de mastite através de MALDI-TOF/MS. O teste de suscetibilidade a antimicrobianos foi realizado pelo método de *Kirby-Bauer*. A produção de leite diária se destina principalmente ao mercado de derivados, em que a qualidade do leite tem impacto foi avaliada. Amostras de leite de búfala individuais e de conjunto foram coletadas para avaliar a contagem padrão em placa, perfil de ácidos graxos, além de detecção de resíduos. A água utilizada no Tambo de Leite (instalação projetada para a produção e o manejo do gado leiteiro) foi avaliada quanto a presença de coliformes totais e coliformes termotolerantes através da técnica de tubos múltiplos, e realizada a contagem de bactérias heterotróficas mesófilas. Dos quartos mamários que apresentaram reação ao *California Mastitis Test*, foi isolado e identificado o agente *Staphylococcus aureus*, que apresentou sensibilidade a todos os antimicrobianos testados. A média diária de produção foi de 3,91 Kg/búfala/dia. A média obtida para contagem padrão em placa foi de $1,69 \times 10^4$ UFC/mL. O perfil de ácidos graxos apresentou predominância dos ácidos graxos palmítico (C16:0) e oleico (C18:1- cis (n9)). Não foram identificados resíduos de antimicrobianos e antiparasitários. A água apresentou presença de coliformes totais com média de 30,5 NMP/100 mL, ausência de coliformes termotolerantes e a média para contagem de bactérias heterotróficas mesófilas foi de $4,85 \times 10$ UFC/mL. A implementação de protocolos de Boas Práticas Agropecuárias contribuiu para a obtenção de um leite bubalino de qualidade, além de auxiliar no diagnóstico e prevenção de mastite.

Palavras-chave: Boas práticas agropecuárias. Leite. *Bubalus bubalis*. Microbiologia. Mastite.

MAMMARY GLAND HEALTH AND QUALITY MONITORING OF BUFFALO MILK PRODUCED AT THE AGRONOMIC EXPERIMENTAL STATION OF UFRGS

ABSTRACT

The production of buffalo milk is mainly intended for the dairy products market, in which the quality of the milk has a direct impact. Thus, this study aimed to monitor the health of the mammary gland and the quality of buffalo milk produced at the Agronomic Experimental

¹ Graduanda em Medicina Veterinária. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre-RS. franmferrandes1425@gmail.com

² Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGZOOT), Departamento de Zootecnia, Faculdade de Agronomia Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre-RS. vitoria.domenico@gmail.com

³ Docente Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre-RS. *Correspondência: amanda.motta@ufrgs.br.

Station of the Federal University of Rio Grande do Sul with the use of Good Agricultural Practices protocols in milking. Milk samples were collected from mammary quarters that showed a reaction to the California Mastitis Test, for isolation and identification of the causative agent of mastitis through MALDI-TOF/MS. The antimicrobial susceptibility test was performed using the Kirby-Bauer method. Daily milk production was evaluated. Individual and set buffalo milk samples were collected to evaluate standard plate count, fatty acid profile, and residue detection. The water showed the presence of total coliforms with a mean of 30.5 MPN/100 mL, absence of thermotolerant coliforms and the mean count of mesophilic heterotrophic bacteria was 4.85×10 CFU/mL. The implementation of Good Agricultural Practices protocols contributed to obtaining quality buffalo milk, in addition to assisting in the diagnosis and prevention of mastitis.

Keywords: Good agricultural practices. Milk. *Bubalus bubalis*. Microbiology. Mastitis.

MONITOREO DE LA SALUD Y CALIDAD DE LA GLÁNDULA MAMARIA DE LA LECHE DE BÚFALA PRODUCIDA EN LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL AGRONÓMICA DE LA UFRGS

RESUMEN

La producción de leche de búfala se destina principalmente al mercado de productos lácteos, en el que la calidad de la leche tiene un impacto directo. Así, este estudio tuvo como objetivo monitorear la salud de la glándula mamaria y la calidad de la leche de búfala producida en la Estación Experimental Agronómica de la Universidad Federal de Rio Grande do Sul con el uso de protocolos de Buenas Prácticas Agrícolas en el ordeño. Se colectaron muestras de leche de los cuarteles mamarios que mostraron una reacción a la prueba de mastitis de California, para el aislamiento e identificación del agente causal de la mastitis a través de MALDI-TOF/MS. La prueba de susceptibilidad antimicrobiana se realizó mediante el método de Kirby-Bauer. Se evaluó la producción diaria de leche. Se recolectaron muestras individuales y de leche de búfala para evaluar el recuento de placas estándar, el perfil de ácidos grasos y la detección de residuos. El agua presentó presencia de coliformes totales con un promedio de 30.5 NMP/100 mL, ausencia de coliformes termotolerantes y el conteo promedio de bacterias heterótrofas mesófilas fue de 4.85×10 UFC/mL. La implementación de protocolos de Buenas Prácticas Agrícolas contribuyó a la obtención de leche de búfala de calidad, además de coadyuvar en el diagnóstico y prevención de mastitis.

Palabras clave: Buenas prácticas agrícolas. Leche. *Bubalus bubalis*. Microbiología. Mastitis.

INTRODUÇÃO

O búfalo é considerado um animal de dupla aptidão, adequado tanto para a produção de leite como para produção de carne, e devido a sua rusticidade, são animais bastante adaptados a solos de baixa fertilidade, terrenos alagadiços e capazes de converter alimentos fibrosos em proteínas de alto valor (1). Além dos aspectos já mencionados, outros fatores relevantes sustentam o crescimento do rebanho bubalino, destacando-se as propriedades desejáveis do leite e da carne de búfalo; a maior resistência às infecções parasitárias, às intoxicações por plantas tóxicas e ao desenvolvimento de patologias comumente observadas em bovinos (2). Assim, a produção de búfalos se configura como uma alternativa produtiva de boa rentabilidade na pecuária brasileira (3).

O leite bubalino é o segundo mais produzido no mundo e, no ano de 2021, representava cerca de 15% da produção mundial de leite, apresentando uma taxa de crescimento de 45% em dez anos (4). O crescente aumento na exploração leiteira se dá por conta da diferente composição físico-química do leite bubalino em relação ao do bovino, permitindo assim que sejam produzidos derivados lácteos de alto valor comercial (5).

A búfala tem grande potencial para produção de leite, pois o leite bubalino apresenta maior valor nutritivo e rendimento industrial, devido aos níveis elevados de gordura, sólidos totais, proteínas, lactose e minerais quando comparado ao leite bovino (6,7). É um leite que apresenta menores concentrações de colesterol, assim como valores elevados de ácidos graxos de cadeia longa, como o ácido linoléico conjugado (CLA), que é uma substância anticancerígena que também atua sobre os efeitos secundários da obesidade, como a arteriosclerose e a diabetes (8).

A qualidade do leite é muito importante para os produtores e as indústrias, tendo impactos diretos tanto na produção de derivados lácteos quanto na segurança dos alimentos. Muitos fatores podem influenciar a qualidade do leite, destacando-se fatores ambientais, nutricionais, estado sanitário do rebanho, estágio de lactação e a qualidade higiênica da ordenha (9,10). São utilizados para avaliação da qualidade do leite parâmetros microbiológicos e higiênicos sanitários, como a contagem padrão em placa (CPP) e a contagem de células somáticas (CCS), além da composição físico-químicas, principalmente gordura, proteína, lactose, cálcio e sólidos totais (11,7).

A implantação de Boas Práticas Agropecuárias (BPAs) reduz a contaminação e a multiplicação de microrganismos, os quais estão relacionados a diversos fatores, entre eles a deficiência no manejo e higiene da ordenha, a saúde da glândula mamária, a manutenção e desinfecção inadequada dos equipamentos, a qualidade da água e a refrigeração inadequada do leite (12,13,14).

Embora as búfalas sejam consideradas menos susceptíveis à mastite do que os bovinos, este monitoramento deve ser realizado sistematicamente. A mastite causa prejuízos econômicos na cadeia produtiva leiteira, devido à queda na produtividade e redução do rendimento na produção dos derivados do leite, além das alterações qualitativas e quantitativas do leite com degradação das características organolépticas e redução da vida útil (11,15). Além das perdas econômicas, a mastite está associada à saúde pública, devido à presença de agentes que podem transmitir doenças aos seres humanos, resíduos de antimicrobianos no leite, e a presença de bactérias multirresistentes a antimicrobianos. Com isso, este trabalho objetivou monitorar a sanidade da glândula mamária e a qualidade do leite de búfala produzido na Estação Experimental Agronômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

MATERIAIS E MÉTODOS

Local de Estudo e produção de leite de búfala

A Estação Experimental Agronômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (EEA-UFRGS) localiza-se na BR 290, Km 146 no município de Eldorado do Sul-RS (coordenadas geográficas latitude sul 30° 05' 09" e longitude oeste 51° 40' 55") com altitude média de 44 m no nível do mar, temperatura média anual de 19,8 °C e precipitação média anual de 1580 mm.

As ordenhas foram realizadas entre os meses de setembro e novembro de 2022, procedimentos estes aprovados pela CEUA-UFRGS 40325. O sistema de ordenha mecânica tipo balde ao pé foi empregado. As ordenhas foram realizadas seguindo os protocolos

preconizados pelo Guia de Boas Práticas na Pecuária de Leite da FAO & IDF (14) e o Manual de Boas Práticas Agropecuárias na Ordenha: Bubalinocultura (16).

Foram submetidas à ordenha 11 búfalas em lactação, primíparas e multíparas, com idade entre 2,5 e 5 anos, e peso médio $465 \text{ kg} \pm 84 \text{ kg}$. As búfalas lactantes foram mantidas em campo nativo com acesso à sal mineral e água *ad libitum*, além da suplementação com silagem de milho quatro vezes na semana e concentrado à base de milho e soja (90% de farelo de milho e 10% de farelo de soja). Para avaliar a produção média diária de leite de búfala, foram coletados dados de produção individual de oito ordenhas realizadas no período de amostragem. A partir destes dados, foram calculadas a produção média individual, produção média por categoria de búfalas (primíparas e multíparas), assim como a produção média diária geral.

Coletas de amostra de leite bubalino

Entre os meses de setembro e novembro, semanalmente foram coletadas amostras de leite bubalino de conjunto, contendo 150 mL, totalizando oito amostras no período de amostragem. As amostras foram coletadas de forma higiênica ao final da ordenha completa e homogeneização do leite das 11 búfalas em ordenha, e posteriormente foram transportadas sob refrigeração até o Laboratório de Microbiologia e Saúde Única do Instituto de Ciências Básicas de Saúde (ICBS-UFRGS). As amostras foram armazenadas conforme análise a ser realizada, sendo 50 mL para análise microbiológica, 50 mL para análise de resíduos de antimicrobianos e antiparasitários e 50 mL para análise de perfil de ácidos graxos. Para a média diária de temperatura ambiente nos dias de ordenha, foram coletados dados através da plataforma AccuWeather ao início e fim da ordenha.

Sanidade da glândula mamária

O teste da caneca de fundo preto foi realizado a cada ordenha, desprezando os três primeiros jatos de leite. O leite de búfala foi avaliado quanto à presença de grumos, pus, sangue e alteração de cor, sinais indicativos de mastite clínica. O *California Mastitis Test* (CMT) foi realizado semanalmente, com o objetivo de detectar mastite subclínica. Para interpretação da reação observou-se o grau de viscosidade da amostra. Para os quartos mamários que apresentaram algum grau de reação no CMT, foram coletadas amostras para identificação dos possíveis agentes etiológicos de mastite.

Isolamento e identificação do agente etiológico

Foi utilizada a técnica de semeadura por esgotamento em placas de Petri com os meios ágar sangue e ágar MacConkey, incubados à $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 48 horas (17). Após as placas foram avaliadas quanto ao crescimento microbiano e as colônias suspeitas foram isoladas para identificação do agente etiológico. O isolado foi identificado através de espectrometria de massa MALDI-TOF/MS (*Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight/mass spectrometry*) pelo método da colônia direta e analisadas no aparelho MALDI Biotyper 4.0, software MBT OC (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha).

Teste de susceptibilidade a antimicrobianos

Para o teste de susceptibilidade foi empregado o método Kirby-Bauer com os seguintes antimicrobianos: penicilina G (10 UI), clindamicina (2 μg), eritromicina (15 μg), ciprofloxacina (5 μg), cloranfenicol (30 μg), gentamicina (10 μg), tetraciclina (30 μg) e cefoxitina (30 μg). Foi preparada uma suspensão bacteriana com turbidez correspondendo a Escala de McFarland 0.5

(10^8 UFC/mL) a qual foi semeada sobre o meio de cultura ágar Mueller-Hinton. Os discos contendo antimicrobianos foram inseridos sobre a superfície do meio e incubados à 37 °C por 24 horas. A leitura do diâmetro dos halos de inibição foi realizada em mm, classificando o isolado como sensível, intermediário ou resistente, de acordo com os critérios interpretativos pela European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing (EUCAST) (18).

Contagem Padrão em Placa

A contagem padrão em placa (CPP) foi realizada de acordo com a ISO 4833-1 (19). Foi homogeneizado 1 mL de leite de búfala em 9 mL de solução salina 0.85%, para obtenção de diluições de 10^{-1} até 10^{-3} . De cada diluição foram coletados 0,1 mL e semeados em meio *Plate Count Agar* (PCA). As placas foram incubadas à 37 °C por 48 horas. A contagem de microrganismos heterotróficos mesófilos foi realizada nas diluições que apresentaram entre 20 e 200 colônias e expressas em UFC/mL.

Perfil de ácidos graxos

A quantificação de ácidos graxos foi realizada por meio de cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC-FID Modelo GC 2010, Shimadzu, Kyoto, Japão), equipado com uma coluna capilar de sílica fundida (Rtx- Wax, Restek, 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm), de acordo com a AOCS (20). As amostras foram previamente esterificadas com trifluoreto de boro em metanol de acordo com Luddy et al. (21), para permitir a análise pelo GC-FID. Os ácidos graxos foram identificados por comparação do tempo de retenção dos componentes com uma mistura padrão de referência de ácidos graxos FAME mix (Supelco 37 Component FAME Mix; Supelco Inc., Bellefonte, PA, EUA).

Resíduos de antimicrobianos e antiparasitários

A análise foi realizada pelo Laboratório Federal de Defesa Agropecuária (LFDA/RS), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através de método de triagem de sessenta e dois resíduos de antimicrobianos e antiparasitários pertencentes a diferentes classes, usando cromatografia líquida-eletrospray-espectrometria de massa em tandem (LC-ESI-MS / MS) (22, 23, 24). Os resíduos analisados foram: Ampicilina, Cefalexina, Cefalônio, Cefapirina, Desatil cefapirina, Cefoperazona, Cefquinoma, Ceftiofur, Desfuroil ceftiofur, Cloxacilina, Dicloxacilina, Nafcilina, Oxacilina, Penicilina G, Penicilina V, Azitromicina, Clindamicina, Eritromicina, Espiramicina, Lincomicina, Tilosina, Tilmicosina, Bromexina, Sulfaclopiridazina, Sulfadiazina, Sulfadimetoxina, Sulfadoxina, Sulfamerazina, Sulfametazina, Sulfametoxazol, Sulfaquinoxalina, Sulfatiazol, Sulfisoxazol, Trimetoprim, Ácido nalidíxico, Ácido oxolínico, Ciprofloxacino, Danofloxacino, Difloxacino, Enrofloxacino, Flumequina, Marbofloxacino, Norfloxacino, Sarafloxacino, Clortetraciclina, Doxiciclina, Oxitetraciclina, Tetraciclina, Cloranfenicol, Florfenicol, Florfenicol amina, Tianfenicol, Abamectina, Doramectina, Eprinomectina, Ivermectina, Moxidectina, Monensina, Albendazol, Albendazol sulfona, Albendazol sulfóxido, Albendazol amino sulfona.

Coleta e análise microbiológica da água

As coletas de amostra de água foram realizadas no ponto de maior utilização na ordenha, conforme o Manual Prático de Análise de Água (25). O volume de 200 ml de água foi coletado em frasco estéril com tiosulfato de sódio a 10% e encaminhado ao Laboratório de Microbiologia e Saúde Única do ICBS-UFRGS em refrigeração. A Contagem de bactérias

heterotróficas mesófilas foi realizada através do método da semeadura em profundidade em meio *Plate Count Agar* (PCA), e a Contagem de Coliformes totais e Contagem de coliformes termotolerantes pela técnica de Tubos Múltiplos e os resultados expressos em NMP (Número Mais Provável)/100 mL de amostra (25).

Análise estatística

Os dados referentes ao monitoramento da qualidade do leite e qualidade da água, com as devidas identificações de amostra, foram transferidos e organizados em planilhas do programa Microsoft Excel 2019 para a obtenção de médias e elaboração de tabelas. Foi utilizado o delineamento inteiramente Casualizado (DIC) com medidas repetidas no tempo, e após a realização de análise de variância (ANOVA), foi aplicado o teste de Tukey com nível de significância 5%, como forma de comparação entre os resultados obtidos em cada coleta, tendo os animais como unidade experimental.

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

y_{ij} : parâmetro observado relativo ao mês e observação (Produção de leite e CPP);

μ : média geral;

t_i : efeito do tempo nos parâmetros;

e_{ij} : erro experimental associado à observação do parâmetro y_{ij} .

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Local de Estudo e produção de leite de búfala

O período de partos na EEA-UFRGS, compreendeu os meses entre março e junho de 2022. Ao início das coletas, as búfalas primíparas apresentavam uma média de $98,25 \pm 23,94$ dias em lactação, enquanto as búfalas múltíparas uma média de $160,67 \pm 29,77$ dias em lactação. As onze búfalas submetidas à ordenha foram identificadas como búfalas primíparas P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, e múltíparas M1, M2 e M3.

Ao avaliar a produtividade do rebanho bubalino, foi observado que as médias individuais apresentaram diferença estatística significativa entre as búfalas em lactação no período de coleta (Tabela 1). A búfala múltípara M1 apresentou a maior média de produção individual por ordenha, enquanto a búfala múltípara M3 apresentou média individual relativamente menor quando comparada às demais múltíparas. A búfala M3, apesar de ser múltípara ainda estava em adaptação à ordenha mecânica, pois em temporada anterior teve perda do terneiro por distocia, sendo este ano a primeira lactação nesse sistema, o que pode ter influenciado na expressão do seu potencial produtivo.

Entre as primíparas, a búfala P1 apresentou a maior média individual por ordenha, porém não diferiu significativamente das demais na mesma categoria. Já a búfala primípara P2 apresentou a menor média em relação à média individual de todas as búfalas em lactação, fato que pode estar relacionado ao período de adaptação ao sistema, além da reatividade apresentada por esta búfala durante a ordenha. Segundo Oliveira et al. (26), podem ocorrer dificuldades na adaptação do animal ao ambiente de ordenha, principalmente aqueles que estão passando pela primeira lactação. Ao observar a resposta comportamental de búfalas Murrah, submetidas à ordenha mecânica, Cavallina et al. (27) verificou que os comportamentos indicadores de estresse, como coices, defecação, micção e derrubadas de teteira foram mais frequentes em fêmeas primíparas. Búfalas são sensíveis até mesmo a pequenas mudanças na rotina de ordenha,

podendo apresentar comportamentos reativos, alterando assim o nível de ocitocina e consequentemente reduzindo a produção de leite (28).

Em relação à média total de leite produzido por ordenha (Tabela 2), não foram observadas diferenças estatísticas significativas durante o período de coleta. O resultado demonstra uma constância na produção de leite, o que reflete um período estável da curva de lactação, já que as coletas foram realizadas em um período relativamente curto, não compreendendo as variações de início ou final de lactação e sem alterações na alimentação das búfalas (29). A produção média diária foi $3,91 \pm 0,35$ Kg/búfala/dia, semelhante ao observado por Domenico et al. (10), mas inferior ao observado por Lamontagna & Franzolim (30) e Costa Filho et al. (31). Segundo Mesquita et al. (32), a produtividade de búfalas no Brasil apresenta valores muito baixos, com média em torno de 4,9 e 5,2 kg/búfala/dia quando comparadas as médias registradas na Itália que são de aproximadamente 13 kg kg/búfala/dia em sistemas semi-intensivo. Os baixos valores de produção têm sido atribuídos à fase de estabilização, já que a exploração da bubalinocultura leiteira é uma atividade relativamente recente e os sistemas de produção vigentes são predominantemente a pasto e sem desenvolvimento de um programa de melhoramento genético (33, 34).

Mesmo não havendo variações na média de produção diária geral, as búfalas múltíparas demonstraram maiores produções diárias, apresentaram produção de leite em média 1,75 kg superior às primíparas em cada ordenha. A produção de leite é influenciada pela idade e o número de partos, e é esperado que a partir da segunda lactação as búfalas produzam mais leite pelo fato de terem o sistema mamário estimulado pela primeira lactação (35). As primíparas apresentam menor capacidade produtiva, devido ainda estarem em fase de crescimento e desenvolvimento da glândula mamária, necessitando de maior aporte nutricional para a lactação e para atingirem o peso adulto na segunda lactação e assim expressar o seu potencial produtivo (36). Isto pode justificar as baixas médias de produção observadas, já que oito das onze búfalas em lactação no período de coleta foram primíparas que emprenharam precocemente, iniciando a primeira lactação com uma média de 24 meses.

Sanidade da glândula mamária

Nas avaliações feitas pelo teste da caneca de fundo preto, não foram evidenciadas alterações no leite e na glândula mamária, não identificando animais positivos para mastite clínica. No teste CMT, dos 44 quartos mamários testados, 9 (20,45%) apresentaram resultado positivo fraco (+) ou positivo (++) em algum momento do período de amostragem. Este resultado foi obtido a partir das búfalas P3, P5 e P6, sugerindo mastite subclínica em 3 (27,3%) das 11 búfalas avaliadas. Resultado próximo a este trabalho, foi encontrado por Patel et al. (37) na Índia, onde 21 (22,82%) das 92 búfalas avaliadas apresentavam mastite subclínica. Por outro lado, Cunha et al. (38) e Melo et al. (39) registraram 53 (42,2%) de 128 búfalas e 22 (48,88%) de 45 búfalas avaliadas com este perfil.

A búfala P6 apresentou resultado positivo no CMT em todos os quartos mamários (AD/AE/PD/PE) na coleta 2 e quartos mamários AD e AE na coleta 3 e 4. Já a búfala P3 apresentou reação em todos os quartos mamários apenas na coleta 2, enquanto a búfala P5 apresentou resultado positivo no quarto mamário PE na coleta 7 (Tabela 3). Dos 13 resultados positivos ao CMT, 8 foram provenientes dos quartos mamários anteriores, demonstrando que os quartos mamários anteriores apresentaram maior frequência de resultados positivos em relação aos posteriores, ao contrário de Melo et al. (39), que observou maior frequência de resultados positivos em quartos mamários posteriores.

O CMT é utilizado mundialmente no diagnóstico da mastite subclínica e tem como vantagem poder ser empregado a campo, no momento em que os animais são ordenhados. Reação positiva ao CMT geralmente indica reação inflamatória na glândula mamária, sugerindo

mastite subclínica. Porém, outros fatores de origem não infecciosa, como o estágio de lactação, quantidade de células somáticas presentes, idade, estação do ano e estresse podem influenciar os resultados do CMT, que é considerado um indicador indireto de células somáticas do leite (40). No entanto, para um controle eficaz da mastite subclínica, é importante a associação dos resultados do CMT com a CCS, além de testes microbiológicos periódicos para identificação dos agentes etiológicos e seu perfil de suscetibilidade a agentes antimicrobianos e assim direcionar a terapia antimicrobiana (41).

Isolamento e identificação do agente etiológico

No período de realização deste estudo, foram coletadas treze amostras de quartos mamários que apresentaram reação ao CMT, para isolamento e identificação do possível agente etiológico. Somente a amostra da Búfala P5 com reação positiva ao CMT no quarto mamário posterior esquerdo apresentou crescimento de colônias em meio ágar sangue com hemólise total, onde identificou-se a bactéria *Staphylococcus aureus* através da técnica de MALDI-TOF. Bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. possuem grande capacidade de adaptação, estando amplamente distribuídas na natureza, são os principais microrganismos residentes da pele, glândulas e mucosas de mamíferos (42). Estes microrganismos, destacam-se por serem causadores de mastites contagiosas e de tratamento mais difícil devido à elevada resistência aos antimicrobianos. Além disso, apresentam implicações importantes em saúde pública, tendo em vista que as toxinas produzidas por esses microrganismos, podem ser excretadas no leite e permanecer estáveis nos produtos oferecidos ao consumo humano (7). Em búfalas as bactérias pertencentes ao gênero *Staphylococcus* spp. são os principais agentes patogênicos causadores de mastite subclínica (39). Em Analândia, no estado de São Paulo, Almeida (43) avaliou 160 amostras de leite de búfalas que não apresentavam sinais clínicos de mastite, mas 32 quartos mamários apresentaram reação positiva ao CMT, isolando *Staphylococcus aureus* em 22 das amostras. Em outro estudo, Vázquez-García et al. (44) encontraram com maior frequência *Staphylococcus epidermidis* (17,0%) e *Staphylococcus aureus* (15,0%) nas amostras de leite de búfala com mastite subclínica.

Teste de susceptibilidade a antimicrobianos

O isolado *Staphylococcus aureus* se mostrou sensível aos oito agentes antimicrobianos empregados. Este resultado diverge do resultado encontrado por Almeida et. al (43), que evidenciou estirpes de *Staphylococcus aureus* resistentes a Penicilina G e Eritromicina em amostras de leite bubalino. Da mesma forma, Godinho et. al (7), ao traçar o perfil de susceptibilidade de *Staphylococcus aureus* isolados do leite de búfalas no estado do Rio Grande do Sul, revelou resistência contra Penicilina G, Clindamicina, Eritromicina, Tetraciclina e Cefoxitina.

Conforme Pizauro et. al (40) a resistência está relacionada ao uso e dose indiscriminados, à amplitude de aplicação e duração do uso de antimicrobianos, permitindo a seleção de cepas resistentes. A identificação dos patógenos envolvidos na mastite e a determinação do seu perfil de susceptibilidade são importantes ferramentas para uso adequado de antimicrobianos específicos e assim promover o aumento da qualidade e produção de leite com efetiva redução dos custos de produção (44). Este resultado reflete um bom programa sanitário do rebanho, bem como a prevenção e controle de mastite através de protocolos de boas práticas agropecuárias, bem como o uso adequado de antimicrobianos.

Contagem padrão em placa

As amostras foram recebidas em até 6 horas no laboratório com uma temperatura média de $5,7\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,58\text{ }^{\circ}\text{C}$. A CPP não apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) no decorrer das coletas, mesmo com as variações de temperatura ambiente nos dias de coletas. A média para a CPP foi de $1,69 \times 10^4$ UFC/mL, se mantendo durante todo o período abaixo de $3,0 \times 10^5$ UFC/mL, limite estabelecido pela Instrução Normativa Nº 76/2018 do MAPA (45).

Conforme Bailone et. al (46) a qualidade microbiológica do leite muda de acordo com a temperatura circundante, assim a média de CPP tende a aumentar em períodos mais quentes. Como observado na Tabela 4, o maior valor de CPP ocorreu na coleta 6, a qual apresentou a maior média de temperatura ambiente. Na segunda coleta a temperatura da entrega estava acima do valor previsto na Instrução Normativa nº 77 do MAPA (47), que estabelece o acondicionamento das amostras de leite em caixas isotérmicas com gelo reciclável no período compreendido entre a coleta e a recepção de amostras, em temperatura máxima $7\text{ }^{\circ}\text{C}$, idealmente $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. A refrigeração do leite em temperatura ideal mantém a qualidade obtida durante a ordenha, evitando as altas taxas de proliferação de alguns microrganismos (48).

Outra prática determinante para a qualidade do leite com reflexo direto na redução da CPP é a higienização e sanitização correta de todos os equipamentos de ordenha. A higienização é formada por um conjunto de processos químicos, físicos e térmicos e consiste na eliminação de resíduos orgânicos e inorgânicos do leite, disponíveis para o desenvolvimento dos microrganismos, além de eliminar a maior parte dos microrganismos existentes nas superfícies dos equipamentos (49). Em estudo, Matsubara et al. (13) avaliaram a eficiência da implantação das práticas de desprezo dos primeiros jatos de leite, *pré-dipping* e lavagem vigorosa dos equipamentos de ordenha, obtendo uma redução de $1,3 \times 10^8$ para $1,8 \times 10^4$ UFC/mL, correspondendo a 99,9% de redução. O resultado para a média de CPP no presente trabalho foi menor que a média de duas das três propriedades avaliadas por Godinho et al. (7) no estado do Rio Grande do Sul. Também foi menor em relação à média obtida por Domenico et al. (10) durante a implementação e consolidação do sistema de produção leiteira bubalina em seu primeiro ano na Estação EEA-UFRGS. Estes resultados refletem a necessidade da implementação das Boas Práticas Agropecuárias.

Perfil de ácidos graxos

Entre os AGL detectados (Tabela 5), foi possível observar a predominância de ácidos palmítico (C16:0) e ácido oleico (C18:1- cis (ω 9)) em todas as amostras, além da frequência de AGL de cadeia longa (≥ 18), assim corroborando com os resultados obtidos por Ahmad et al. (50). O ácido palmítico (C16:0) foi o ácido graxo saturado que mais contribuiu para a composição total dos AGL, enquanto que o ácido oleico (C18:1- cis (ω 9)) foi o que mais contribuiu com o perfil de ácidos graxos insaturados (MUFA + PUFA). O ácido esteárico (C18:0) foi o terceiro ácido com maior contribuição no perfil geral de ácidos graxos, ao contrário de outros ácidos graxos saturados, o ácido esteárico não está relacionado ao aumento de colesterol, pois quando ingerido é metabolizado a ácido oleico (51).

Em relação ao total de AGL, não foram observadas diferenças durante o período de coleta, bem como dos ácidos graxos de forma individual. Alterações na composição de ácidos graxos do leite de búfala podem ser influenciadas pela raça, estágio de lactação, temporada e a dieta (50). A alimentação é o fator que exerce maior influência sobre o perfil de ácidos graxos do leite, dietas como gramíneas e leguminosas frescas disponibilizam mais ácidos graxos poliinsaturados para o processo de biohidrogenação no rúmen, em especial o ácido linoleico, o que vai refletir sobre a composição do leite. Sendo assim, um bom manejo nutricional pode contribuir para o aumento de ácidos graxos poliinsaturados, aumentando a qualidade do perfil

de AGL no leite, o que é de relevante importância na dieta humana, além de ser fator importante para características tecnológicas de derivados.

Resíduos de antimicrobianos e antiparasitários

Nas amostras de leite de búfala analisadas, não foram identificados nenhum dos 62 resíduos de antimicrobianos e antiparasitários pesquisados. O controle de resíduos de medicamentos veterinários representa uma importante medida para assegurar a qualidade do leite e garantir segurança alimentar. A Instrução Normativa nº 77 (52) inclui entre os testes obrigatórios do leite cru, a pesquisa periódica de resíduos de produtos veterinários acima dos limites máximos, conforme previsto na Instrução Normativa nº 51 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que estabelece os limites máximos de resíduos (LMR), ingestão diária aceitável (IDA) e dose de referência aguda (DRfA) para insumos farmacêuticos ativos (IFA) de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal (48). As análises devem ser realizadas em laboratório da RBQL (Rede Brasileira de Laboratórios de Qualidade do Leite) composta pelos Laboratórios Federais de Defesa Agropecuária (LFDAs) e laboratórios credenciados no MAPA.

A presença de resíduos antimicrobianos e antiparasitários no leite podem interferir no processo de fabricação de muitos produtos lácteos, causando problemas na fermentação dos derivados e diminuição no rendimento de massas, além de riscos à saúde pública (53). A principal fonte de resíduos em leite são os antimicrobianos, devido ao uso inadequado de drogas para o controle de mastite, sem respeitar os períodos de carência, no qual o descarte da produção de leite deve ser realizado (54). O consumo de alimentos de origem animal com a presença de resíduos de medicamentos veterinários mesmo em baixos níveis podem desencadear no homem efeitos indesejáveis como hipersensibilidade, alteração da flora intestinal e possível desenvolvimento de resistência, além de efeito teratogênico (55). Os resultados indicam conformidade com a legislação vigente, além do uso adequado de medicamentos, respeitando os períodos de carência, bem como o descarte da produção de leite no período.

Coleta e análise microbiológica da água

Para avaliar a qualidade microbiológica e potabilidade da água utilizada no Tambo de leite da EEA-UFRGS, foram realizadas duas coletas durante o período de monitoramento. Na primeira coleta foi observada uma contagem de bactérias heterotróficas mesófilas de 4×10 UFC/ml e a presença de coliformes totais no valor de 50 NMP/mL. Não foi observada a presença de coliformes termotolerantes. Na segunda coleta, com o intervalo de um mês, os resultados foram semelhantes. A contagem de bactérias heterotróficas mesófilas foi de $5,27 \times 10$ UFC/ml e a contagem de coliformes totais com valor de 11 NMP/mL. Coliformes termotolerantes não foram observados. Dessa forma, a média entre as coletas para coliformes totais foi de 30,50 NMP/mL e para bactérias heterotróficas mesófilas foi de 4,85 UFC/ml.

A água utilizada no Tambo de leite apresentou a presença de Coliformes Totais nas duas coletas, assim estando em desacordo com a GM/MS Nº 888, do Ministério da Saúde (56) que estabelece a ausência de Coliformes totais e Coliformes Termotolerantes na água destinada à ingestão, preparação de alimentos e à higiene pessoal, independentemente da sua origem. A contagem de bactérias heterotróficas mesófilas é um importante parâmetro da qualidade microbiológica e de integridade de reservatórios e redes de água, os resultados encontrados foram inferiores ao valor de 500 UFC/mL preconizados em legislação vigente. A disponibilidade e a qualidade da água na ordenha são aspectos relevantes na obtenção de leite de qualidade. A baixa qualidade da água utilizada na higiene das mãos dos ordenhadores,

limpeza e higienização de equipamentos de ordenha e resfriamento é um dos fatores que pode contribuir para a produção de leite com alta contagem bacteriana total (57, 58). Em estudo, Neto et al. (59) avaliaram a qualidade microbiológica da água de oito propriedades leiteiras no município de Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro, onde obteve 100% das amostras com presença de Coliformes Totais, evidenciando a importância do monitoramento da qualidade da água, a fim de evitar a contaminação do leite. Segundo Amaral et al. (60), a água pode veicular microrganismos patogênicos para o leite e para a glândula mamária, assim como um aumento linear da CPP do leite.

No presente trabalho, apesar da qualidade microbiológica da água utilizada na ordenha não estar adequada para consumo e utilização, a qualidade do leite estava de acordo com os padrões microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa nº 76 (45). A adoção de boas práticas agropecuárias como a utilização de detergentes específicos para limpeza dos equipamentos e a sanitização com hipoclorito de sódio 0,2% de todo sistema de ordenha e utensílios antes da ordenha, podem ter contribuído para a redução da população microbiana presente nestes equipamentos no período entre ordenhas, e assim evitando a contaminação ou aumento da CPP do leite (48).

CONCLUSÃO

A implementação de protocolos de Boas Práticas Agropecuárias contribuiu para a obtenção de um leite bubalino de qualidade, além de auxiliar no diagnóstico e prevenção de mastite. O monitoramento da qualidade do leite bubalino na EEA-UFRGS demonstrou que a utilização de protocolos de Boas Práticas Agropecuárias na ordenha foi eficiente no controle microbiológico do leite, garantindo um leite bubalino de qualidade de acordo com a IN 76, além de auxiliar no diagnóstico e prevenção de mastite, garantindo a sanidade da glândula mamária das búfalas em ordenha.

REFERÊNCIAS

1. Liguori AD. Búfalos: produção, qualidade de carcaça e de carne. Alguns aspectos quantitativos, qualitativos e nutricionais para promoção do melhoramento genético. *Rev Bras Reprod Anim.* 2005;29(2):122-34.
2. Bastianetto E. Criação de búfalos no Brasil: situação e perspectiva. *Rev Bras Reprod Anim.* 2009;6:98-103.
3. Gerude Neto OJDA, Pontes LS, Pereira DR, Costa JA. Aspectos da cadeia produtiva de búfalas no Brasil: uma revisão. *RECIMA21.* 2023;4(10):e4104188.
4. Food and Agriculture Organization of The United Nations Statistics. FAOSTAT [Internet]. Rome: FAO; 2021 [citado 21 Dez 2023]. Disponível em: <http://faostat.fao.org/>
5. Nascimento AJDSN, Nardi GD Jr, Oliveira PAD, Barbosa-Fantim BR, Dantas A. Bubalinocultura no Brasil: principais raças, características e importância ao agronegócio. *Peer Review.* 2023;5(3):19-30.
6. Pignata MC, Fernandes SAA, Ferrão SPB, Faleiro AS, Conceição DG. Estudo comparativo da composição química, ácidos graxos e colesterol de leites de búfala e vaca. *Rev Caatinga.* 2014;27(4):226-33.

7. Godinho FM, Krug M, Figueiredo RP, Müller A, Jank L, Tomaszewski CA, et al. Microbiological and physicochemical characteristics of buffalo milk used for dairy products in southern Brazil. *J Dairy Res.* 2020;87(4):463-8.
8. Figueiredo EL, Lourenço JB Jr, Toro MJU. Caracterização físico-química e microbiológica do leite de búfala “in natura” produzido no estado do Pará. *Rev Bras Tecnol Agroind.* 2010;4(1):19-28.
9. Vidal AMC, Saran Netto A. Obtenção e processamento do leite e derivados. Pirassununga: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo; 2018. doi: 10.11606/9788566404173.
10. Domenico VLD, Paiva AR, Jank L, Tomaszewski CA, Motta ADSD. Implementação de um sistema de ordenha e manejo da qualidade do leite bubalino em uma estação experimental no Rio Grande do Sul, Brasil. *Cienc Anim Bras.* 2023;24:e-75499E.
11. Jorge AM, Andrighetto C, Strazza MRB, Correa RC, Kasburgo DG, Piccinin A, et al. Correlação entre o California Mastitis Test (CMT) e a contagem de células somáticas (CCS) do leite de búfalas Murrah. *Rev Bras Zootec.* 2005;34(6):2039-45.
12. Vallin VM, Beloti V, Battaglini APP, Tamanini R, Fagnani R, Angela HL, et al. Melhoria da qualidade do leite a partir da implantação de boas práticas de higiene na ordenha em 19 municípios da região central do Paraná. *Sem Ci Agr.* 2009;30(1):181-8.
13. Matsubara MT, Beloti V, Tamanini R, Fagnani R, Silva LCCD, Monteiro AA, et al. Boas práticas de ordenha para redução da contaminação microbiológica do leite no agreste Pernambucano. *Sem Ci Agr.* 2011;32(1):277-86.
14. FAO Produção e Saúde Animal. Guia de boas práticas na pecuária de leite. Roma: FAO e IDF; 2013. (Diretrizes, 8).
15. Restucci B, Dipineto L, Martano M, Balestrieri A, Ciccarelli D, Russo TP, et al. Histopathological and microbiological findings in buffalo chronic mastitis: evidence of tertiary lymphoid structures. *J Vet Sci.* 2019;20(3):e28. doi: 10.4142/jvs.2019.20.e28.
16. Di Domenico VL, Motta AS. Manual de boas práticas agropecuárias na ordenha: bubalinocultura [Internet]. Porto Alegre: UFRGS; 2022 [citado 20 Dez 2023]. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10183/252376>
17. Gao J, Barkema HW, Zhang L, Liu G, Deng Z, Cai L, et al. Incidence of clinical mastitis and distribution of pathogens on large Chinese dairy farms. *J Dairy Sci.* 2017;100(6):4797-806. doi: 10.3168/jds.2016-12334.
18. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables interpretation of MICs and zone diameters. Version 12. Vaxjo: EUCAST; 2022.
19. ISO 4833-1. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Part 1: Colony count at 30 degrees C by the pour plate technique. Geneva: International Organization for Standardization; 2013.

20. American Oil Chemists' Society. Official methods and recommended 60 practices of the American Oil Chemists' Society Urbana. Champaign: AOCS Press; 2009.
21. Luddy FE, Barford RA, Herb SF, Magidman P. A rapid and quantitative procedure for the preparation of methyl esters of butteroil and other fats. *J Am Oil Chem Soc.* 1968;45(8):549-52.
22. Rübensam G, Barreto F, Hoff RB, Kist TL, Pizzolato TM. A liquid–liquid extraction procedure followed by a low temperature purification step for the analysis of macrocyclic lactones in milk by liquid chromatography–tandem mass spectrometry and fluorescence detection. *Anal Chim Acta.* 2011;705(1-2):24-9.
23. Jank L, Martins MT, Arsand JB, Motta TMC, Hoff RB, Barreto F, et al. High-throughput method for macrolides and lincosamides antibiotics residues analysis in milk and muscle using a simple liquid–liquid extraction technique and liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry analysis (LC–MS/MS). *Talanta.* 2015;144:686-95.
24. Barreto F, Ribeiro C, Hoff RB, Costa TD. Determination of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in poultry, swine, bovine and fish by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2016;1449:48-53.
25. Fundação Nacional de Saúde. Manual Prático de Análise de Água. 4a ed. Brasília: FUNASA; 2013.
26. Oliveira JPFD, Rangel AHDN, Barreto MLDJ, Araújo V, Lima D Jr, Novaes LP, et al. Temperamento de búfalas em sala de ordenha sobre índices produtivos e adaptabilidade ao ambiente: uma revisão. *J Anim Behav Biometeorol.* 2013;1(1):21-30.
27. Cavallina R, Roncoroni C, Campagna MC, Minero M, Canali E. Buffalo behavioural response to machine milking in early lactation. *Ital J Anim Sci.* 2018;7(3):287-95.
28. Thomas CS, Bruckmaier RM, Östensson K, Svennersten-Sjaunja K. Effect of different milking routines on milking-related release of the hormones oxytocin, prolactin and cortisol, and on milk yield and milking performance in Murrah buffaloes. *J Dairy Res.* 2005;72(1):10-8.
29. Silva MMA, Barros NAMT, Rangel AHN, Fonseca FDCE, Veloso F Jr, Lima DM Jr. Persistência da lactação em búfalas da raça Murrah (*Bubalus bubalis*) exploradas no agreste do Rio Grande do Norte. *Acta Vet Brasilica.* 2010;4(4):286-93.
30. Lamontagna C, Franzolim R. Níveis de proteína não degradável na dieta sobre a qualidade do leite de búfalas em pastagem. *Rev Bras Saude Prod Anim.* 2009;10(2):322-32.
31. Costa Filho MHD, Lima DMD Jr, Rangel AHN, Silva FJSD, Novaes LP, Galvão JGB Jr, et al. Sazonalidade e variação na qualidade do leite de búfalas no Rio Grande do Norte. *Acta Vet Brasilica.* 2014;8(3):201-8.

32. Mesquita AA, Costa GMD, Almeida FVMD, Demeu FA, Reis EMB. Mastite em rebanhos bubalinos e sua suscetibilidade a antimicrobianos. *Pubvet*. 2016;11:1-102. doi: 10.22256/pubvet.v11n1.62-73.
33. Bastianetto E, Escrivão SC, Oliveira DAA. Influência das características reprodutivas da búfala na produção, composição e qualidade do leite. *Rev Bras Reprod Anim*. 2005;29(1):49-52.
34. Seno LO, Cardoso VL, Tonhati H. Valores econômicos para as características de produção de leite de búfalas no Estado de São Paulo. *Rev Bras Zootec*. 2007;36 Supl:2016-22. doi: 10.1590/S1516-35982007000900010.
35. Bezerra JS Jr, Fraga AB, Couto ADG, Barros CDC, Silva RMDO. Produção de leite, duração da lactação e intervalo de partos em búfalas mestiças Murrah. *Rev Caatinga*. 2014;27(2):184-91.
36. Santos MV, Fonseca LFL. Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite. Barueri: Manole. 2007.
37. Patel R, Kunjadia P, Koringa P, Joshi C, Kunjadiya A. Microbiological profiles in clinical and subclinical cases of mastitis in milking Jafarabadi buffalo. *Res Vet Sci*. 2019;125:94-9.
38. Cunha AP, Silva LD, Pinheiro JW, Silva DD, Oliveira ADF, Silva KD, et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana de agentes contagiosos e ambientais isolados de mastite clínica e subclínica de búfalas. *Arq Inst Biol*. 2006;73(1):17-21. doi: 10.1590/1808-1657v73p0172006.
39. Melo BAD, Silva GMD, Santos MTD, Santos TMCD, Fraga AB. Perfil da mastite subclínica e frequência de micro-organismos isolados de búfalas mestiças (*Bubalus bubalis*). *Res Soc Dev*. 2022;11(4):e24911427327.
40. Pizauro L JL, Silva DG, Santana AM, Clemente V, Lara GHB, Listoni FJP, et al. 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. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2014;66(6):1703-10.
41. Bhutto AL, Murray RD, Woldehiwet Z. California mastitis test scores as indicators of subclinical intra-mammary infections at the end of lactation in dairy cows. *Res Vet Sci*. 2012;92(1):13-7. doi: 10.1016/j.rvsc.2010.10.006.
42. Rola JG, Korpysa-Dzirba W, Czubkowska A, Osek J. Prevalence of enterotoxin genes and antimicrobial resistance of coagulase-positive staphylococci recovered from raw cow milk. *J Dairy Sci*. 2015;98(7):4273-8.
43. Almeida CC, Pizauro L JL, Rossi OD Jr, Ávila FA, Zafalon LF, Pizauro JM. Isolation and identification of antimicrobial resistant staphylococcus aureus isolated from buffalo milk samples bubalino. *Rev Bras Hig Sanid Anim*. 2014;8:1-4.

44. Vázquez-García I, Salinas F, Li J, Fischer A, Barré B, Hallin J, et al. Clonal heterogeneity influences the fate of new adaptive mutations. *Cell Rep.* 2017;21(3):732-44.
45. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 76 de 26 de Novembro de 2018. Dispõe sobre identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. *Diário Oficial da União.* 30 Nov 2018.
46. Bailone RL, Borra RC, Roça RO, Aguiar RL, Harris M. Quality of refrigerated raw milk from buffalo cows (*Bubalus bubalis bubalis*) in different farms and seasons in Brazil. *Cienc Anim Bras.* 2017;18:1-12.
47. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 77, de 26 de Novembro de 2018. Dispõe sobre os critérios e procedimentos para a produção, acondicionamento, conservação, transporte, seleção e recepção do leite cru em estabelecimentos registrados no serviço de inspeção oficial. *Diário Oficial da União.* 2018; ed. 230, Sec. 1, p. 10.
48. Santos MV, Fonseca LFL. Importância e efeito de bactérias psicotróficas sobre a qualidade do leite. *Rev Hig Alim.* 2001;15(82):13-9.
49. Rangel AHN, Araújo VMD, Lima DMD Jr. Processo de higienização dos equipamentos de ordenha em propriedades leiteiras. *Acta Vet Brasilica.* 2014;8(2):107-12.
50. Ahmad S, Anjum FM, Huma N, Sameen A, Zahoor T. Composition and physico-chemical characteristics of buffalo milk with particular emphasis on lipids, proteins, minerals, enzymes and vitamins. *J Anim Plant Sci.* 2013;23(1):62-74.
51. Caldeira LA, Ferrão SPB, Fernandes SADA, Magnavita APA, Santos TDR. Índices de qualidade nutricional da fração lipídica do leite de búfalas da raça Murrah produzido em diferentes fases de lactação. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2010;69(4):545-54.
52. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 51, de 19 de Dezembro de 2019. Estabelece a lista de limites máximos de resíduos (LMR), ingestão diária aceitável (IDA) e dose de referência aguda (DRfA) para insumos farmacêuticos ativos (IFA) de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. *Diário Oficial da União.* Brasília. 2019; Sec. 1, p. 98.
53. Mendes CG, Sakamoto SM, Silva JBA, Leite AÍ. Pesquisa de resíduos de beta-lactâmicos no leite cru comercializado clandestinamente no município de Mossoró, RN, utilizando o Delvotest SP. *Arq Inst Biol.* 2008;75(1):95-8.
54. Nero LA, Mattos MRD, Beloti V, Barros MAF, Franco BDGM. Resíduos de antibióticos em leite cru de quatro regiões leiteiras no Brasil. *Food Sci Technol.* 2007;27(2):391-3. doi: 10.1590/S0101-20612007000200031.
55. Chowdhury S, Hassan MM, Alam M, Sattar S, Bari MS, Saifuddin AKM, et al. Antibiotic residues in milk and eggs of commercial and local farms at Chittagong, Bangladesh. *Vet World.* 2015;8(4):467-71. doi: 10.14202/vetworld.2015.467-471.

56. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria GM/MS nº 888, de 4 de Maio de 2021. Esta Portaria dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial da União. Brasília: Ministério da Saúde; 2021.
57. Silva CG, Alessio DRM, Knob DA, D'Ovidio L, Thaler Neto A. Influência da sanificação da água e das práticas de ordenha na qualidade do leite. Arq Bras Med Vet Zootec. 2018;70(2):615-22.
58. Lacerda LM, Mota RA, Sena MJ. Qualidade microbiológica da água utilizada em fazendas leiteiras para limpeza das tetas de vacas e equipamentos leiteiros em três municípios do Estado do Maranhão. Arq Inst Biol. 2021;76(4):569-75.
59. Moraes Neto JNS, Moraes SVF, Rocha AS, Ornellas TS, Corrêa JG, Gomes FF. Avaliação microbiológica da qualidade da água utilizada em propriedades leiteiras no município de Campos dos Goytacazes, RJ. In: Anais da 29ª Semana Acadêmica do Curso de Agronomia do CCAE/UFES-SEAGRO; 2018; Alegre (ES). Alegre: SEAGRO; 2018.
60. Amaral LA, Romano APM, Nader Filho A, Rossi OD Jr. Qualidade da água em propriedades leiteiras como fator de risco à qualidade do leite e à saúde da glândula mamária. Arq Inst Biol. 2004;71(4):417-21.

Recebido em: 24/06/2024

Aceito em: 12/03/2025