

MARILDA GARCIA SIMÕES

**EFEITOS DE VARIAÇÕES SAZONAIS E DA PROPORÇÃO LEITE  
DE VACA:LEITE DE BÚFALA SOBRE CARACTERÍSTICAS  
FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DE QUEIJOS  
ARTESANAIS DO MARAJÓ**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação, em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S593e  
2014  
Simões, Marilda Garcia, 1957-  
Efeito de variações sazonais e da proporção leite de  
vaca:leite de búfala sobre características físico-químicas e  
microbiológicas de queijos artesanais do Marajó / Marilda  
Garcia Simões. – Viçosa, MG, 2014.  
xi, 121f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Leite de búfala - Variações sazonais. 2. Queijos  
artesanais - Marajó (PA). I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa de  
Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. II. Título.

CDD 22. ed. 637.17

MARILDA GARCIA SIMÕES

**EFEITOS DE VARIAÇÕES SAZONAIS E DA PROPORÇÃO LEITE  
DE VACA: LEITE DE BÚFALA SOBRE CARACTERÍSTICAS  
FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DE QUEIJOS  
ARTESANAIS DO MARAJÓ**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação, em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para a obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

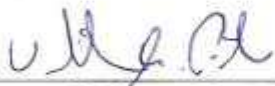
APROVADA: 15 de abril de 2014.



Ana Clarissa dos Santos Pires  
(Coorientadora)



Eduardo Basílio de Oliveira  
(Coorientador)



Uelinton Manoel Pinto



Tânia Toledo de Oliveira



Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira  
(Orientadora)

*A você, Mauro.*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu marido Mauro, pelo apoio, pelo estímulo, pela orientação e pela parceria e paciência dispensada a cada dia.

À Universidade do estado do Pará (UEPA), à Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV, pela oportunidade do aprimoramento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo no período do estágio na Universidade Federal de Viçosa.

À professora Célia Lúcia Luces Fortes Ferreira, pela orientação, pela amizade e pelos ensinamentos.

Ao professor Eduardo Basílio de Oliveira, pelo apoio e por sua valiosa contribuição, que enriqueceu esta pesquisa.

Aos membros da banca, pela disponibilidade e contribuição científica ao avaliarem esta pesquisa.

Às alunas do Curso de Tecnologia de Alimentos, da Universidade do estado do Pará (UEPA), Salvaterra, Ilha do Marajó, Rosane Esmeralda Portal e Joseane Gonçalves Rabelo, pelo imprescindível auxílio durante a fase experimental, realizada na Ilha do Marajó.

Aos produtores dos queijos artesanais do Marajó, de Cachoeira do Arari, Soure e Salvaterra, região do Arari, Ilha do Marajó, pela parceria, apoio, pela confiança e pelo auxílio durante a condução de toda fase experimental da pesquisa.

À Secretaria de estado da Agricultura e Desenvolvimento Rural – Soure-PA (SAGRI), Ilha do Marajó, particularmente ao Sr. Cassiano, pelo auxílio na logística do transporte e na intermediação com os produtores de queijos da região do Arari, na Ilha do Marajó.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Amazônia Oriental (EMBRAPA), particularmente à Dr<sup>a</sup> Alessandra Ferraiolo Nogueira Domingues, pelo auxílio na realização das análises de TPA e sensorial.

Ao Laboratório Nacional Agropecuário, LANAGRO, Pará, e ao Laboratório Central do estado do Pará (LACEN) que auxiliaram, de forma incansável, na realização das análises físico-químicas e microbiológicas.

Aos amigos e companheiros do DINTER (UFV/UEPA), Elaine, Alessandra, Ana Carla, Vitória, Tonye, Carissa, Adriano e Sérgio, pela convivência, pelo apoio, pelo estímulo, pelas discussões e incertezas.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFV, Maria Gerald e Poliana, pelas orientações e pelo apoio.

Ao meu melhor e maior amigo, Lulu, pela companhia e pelo carinho.

E a todos, que de alguma forma, contribuíram para a concretização deste trabalho.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	3
3. OBJETIVOS .....	4
3.1. Objetivo Geral.....	4
3.2. Objetivos Específicos .....	4
4. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
4.1. Ilha do Marajó – Sazonalidade Pluviométrica.....	5
4.2. Leite de Búfala.....	7
4.2.1. Composição Físico-Química.....	11
4.2.2. Compostos Bioativos em Leite de Búfala.....	15
4.3. Queijos Artesanais do Marajó.....	17
4.3.1. Queijo Creme.....	19
4.3.2. Queijo Manteiga .....	21
4.3. Referências Bibliográficas .....	23
5. MATERIAL E MÉTODOS .....	31
5.1. Local do Estudo .....	31
5.2. Coleta das Amostras .....	31
5.3. Elaboração das formulações dos queijos Creme e Manteira .....	32
5.4. Análises físico-químicas do leite de búfala cru e dos queijos Creme e Manteiga.....	32
5.5. Análises microbiológicas do leite de búfala cru e dos queijos Creme e Manteiga.....	35
5.6. Análise do perfil de textura (TPA) das formulações dos queijos Creme e Manteiga .....	37
5.7. Medida da cor das formulações dos queijos Creme e Manteiga.....	38
5.8. Análise Sensorial das formulações dos queijos Creme e Manteiga.....	38
5.9. Análise Estatística.....	39
5.10. Referências Bibliográficas .....	39

	<b>Página</b>
RESULTADOS .....	41
6.1. Artigo 1 – Compostos Bioativos em Leite de Búfaca: Revisão .....	41
Abstract .....	42
Resumo .....	42
1. Introdução .....	43
2. Leite de búfala: composição nutricional .....	44
3. Compostos bioativos presentes no leite de búfalaem sua forma ativa.....	45
3.1. Proteínas bioativas .....	45
3.1.1. Imunoglobulina.....	46
3.1.2. Lactoferrina.....	46
3.1.3. Lisozima.....	48
3.1.4 Sistema lactoperoxidase (LP-s) .....	48
3.2. Lipídeos bioativos.....	50
3.2.1. Ácido linoleico conjugado (CLA) .....	50
3.2.2. Gangliosídeos.....	51
3.3. Oligossacarídeos bioativos .....	52
4. Peptídeos bioativos em leite de búfala.....	54
4.1. Peptídeos bioativos derivados da caseína .....	55
4.2. Peptídeos bioativos derivados do soro do leite .....	57
5. Considerações finais .....	57
6. Referências.....	58
6.2. Artigo 2 – Seasonal Variations Affect the Physicochemical Composition of Buffalo Milk and Artisanal Cheeses Produced in Marajó Island (Pa, Brazil) .....	70
Abstract.....	71
Introduction.....	71
Material and methods.....	72
Results and discussion .....	74
Conclusion .....	78
References.....	79
6.3. Artigo 3 – Effect of bovine milk addition to buffalos milk on diferente characteristics of artisanal Marajó “Cream Cheese” type .....	82
Resumo .....	83
Abstract.....	84

	<b>Página</b>
1 Introduction.....	84
2 Material and methods.....	85
3 Results and discussion .....	86
4 Conclusions.....	89
5 References.....	90
6.4. Artigo 4 – Physicochemical properties of butter cheese from Marajó manufactured with buffalo milk and cow milk .....	92
Abstract.....	93
I. Introduction .....	93
II. Material and Methods .....	94
2.1 Formulations of Butter Cheese .....	94
2.2 Physicochemical analysis .....	94
2.3 Texture Profile Analysis (TPA).....	94
2.4 Color Measurement.....	95
2.5 Statistical analysis.....	95
III. Results and Discussion .....	95
3.1 Physicochemical Composition.....	95
3.2 Texture Profile Analysis (TPA).....	96
3.3 Correlation between physicochemical and texture parameters.....	96
3.4 Color Analysis .....	97
IV. Conclusion .....	97
References.....	97
7. CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	99
8. ANEXOS .....	100

## RESUMO

SIMÕES, Marilda Garcia, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2014. **Efeitos de variações sazonais e da proporção leite de vaca:leite de búfala sobre características físico-químicas e microbiológicas de queijos artesanais do Marajó.**

Orientadora: Célia Lúcia de Lucas Forte Ferreira. Coorientadores: Ana Clarissa dos Santos Pires e Eduardo Basílio de Oliveira.

O objetivo desta pesquisa foi avaliar os efeitos da variação sazonal nas características físico-químicas e no perfil microbiológico do leite de búfala e dos queijos artesanais tipo Creme e tipo Manteiga, produzidos na Ilha de Marajó, região do Arari, em duas estações típicas do local, das chuvas, de janeiro a junho, e da seca, de julho a dezembro. Dezoito fazendas do Arari, localizadas nos municípios de Cachoeira do Arari, Soure e Salvaterra foram envolvidas no estudo. Avaliou-se, também, em relação à produção destes queijos, os efeitos da substituição parcial do leite de búfala por leite de vaca, quanto as características físico-químicas, textura, cor e parâmetros sensoriais. Quatro diferentes formulações foram elaboradas para cada um dos dois tipos de queijo, Creme (C) e Manteiga (M): C<sub>100</sub>/M<sub>100</sub> (100% leite de búfala); C<sub>80</sub>/M<sub>80</sub> (80% leite de búfala + 20% leite de vaca); C<sub>70</sub>/M<sub>70</sub> (70% leite de búfala + 30% leite de vaca) e C<sub>60</sub>/M<sub>60</sub> (60% leite de búfala + 40% leite de vaca). A composição físico-química do leite de búfala foi influenciada pelas estações do ano, mas não interferiu na contagem de células somáticas e na contagem-padrão em placas. Comparado ao das chuvas, o período seco mostrou aumento na concentração da gordura ( $5,53 \pm 0,71$  -  $6,74 \pm 1,19$ ) e lactose ( $4,77 \pm 0,20$  -  $5,20 \pm 0,20$ ) e redução na concentração de sólidos totais ( $16,89 \pm 0,92$  -  $15,77 \pm 1,54$ ), sólidos desengordurados ( $9,94 \pm 0,36$  -  $8,99 \pm 1,23$ ) e minerais ( $0,84 \pm 0,12$  -  $0,62 \pm 0,09$ ) ( $p < 0,05$ ). A influência da estação foi observada na composição físico-química dos dois tipos de queijo. Comparado à estação das chuvas, no queijo tipo Creme, os valores mais elevados ( $p < 0,05$ ), para o período seco, foram para a acidez titulável ( $0,63 \pm 0,02$  -  $0,78 \pm 0,15$ ), gordura ( $32,38 \pm 3,22$  -  $36,89 \pm 4,59$ ), gordura na matéria seca ( $55,06 \pm 3,26$  -  $63,92 \pm 2,49$ ), mas valores mais baixos para atividade de água ( $0,99 \pm 0,02$  -  $0,49 \pm 0,03$ ), minerais ( $2,37 \pm 0,55$  -  $1,40 \pm 0,02$ ) e cálcio ( $0,28 \pm 0,08$  -  $0,18 \pm 0,07$ ) foram encontrados. Para o queijo tipo Manteiga, na estação seca, os valores mais elevados foram para acidez titulável ( $0,49 \pm 0,02$  -  $0,38 \pm 0,02$ ) e valores mais baixos ( $p < 0,05$ ) para atividade de água ( $0,59 \pm 0,08$  -  $0,99 \pm 0,02$ ), minerais ( $1,40 \pm 0,02$  -  $2,68 \pm 0,03$ ) e cálcio ( $0,18 \pm 0,07$  -  $0,45 \pm 0,08$ ). Os resultados microbiológicos e os da contagem de materiais estranhos em ambos os queijos não foram afetados pela

sazonalidade. A substituição parcial do leite de búfalo por leite de vaca em queijo Creme, promoveu mudanças significativas nas características físico-químicas (umidade, proteínas, gorduras, minerais e acidez), nos parâmetros de textura (dureza, elasticidade, coesividade, mastigabilidade) e nos atributos de cor ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*h^0$ ). Este modelo experimental mostrou que a proteína e o pH exerceram papel importante sobre a diminuição da dureza e o aumento da elasticidade. Em queijo Manteiga, a adição parcial do leite de vaca aumentou os valores da umidade e diminuiu os teores da proteína, gordura, sais minerais, pH e acidez ( $p < 0,05$ ). De igual modo, a elasticidade, coesividade, gomosidade e mastigabilidade diminuíram. A umidade, gordura e proteína desempenharam papel importante na redução destes parâmetros de textura. Foram encontradas diferenças significativas para as variáveis de cor  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  e  $h^0$ . A presença do leite de vaca, em ambos os queijos, não provocou alterações nos atributos sensoriais. Os queijos, elaborados com 40 % de leite bovino atingiram a classificação mais alta para intenção de compra. O estudo mostrou que alguns componentes do leite de búfalo e dos queijos artesanais do Marajó, produzidos na região do Arari, foram influenciados pelas estações chuvosa e seca e, portanto, algumas variações sensoriais são esperadas em todo o ano. A adição de até 40% de leite bovino na elaboração do queijo Creme e Manteiga não afeta a aceitação pelo consumidor, permitindo um abastecimento do mercado em períodos de entressafra, quando a produção do leite búfalo diminui.

## **ABSTRACT**

SIMÕES, Marilda Garcia, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April of 2014. **Effect of seasonal variations and the proportion cow milk: buffalo milk on physicochemical and microbiological characteristics of Marajó artisanal cheeses.** Adviser: Célia Lúcia de Luces Forte Ferreira. Co-Advisers: Ana Clarissa dos Santos Pires and Eduardo Basílio de Oliveira.

This research was carried out to evaluate the influence of seasonal variation in physicochemical composition and microbiological profile of buffalo milk and of the artisanal Cream cheese type and Butter cheese type produced on Marajó Island, Arari region, in two typical periods, the rainy season, from January to June, and the dry season, from July to December. Eighteen farms located on three municipal districts, Cachoeira do Arari, Soure and Salvaterra, on the island, were involved in the study. Also was evaluated the effects of the partial substitution of buffalo milk for cow milk on the physicochemical characteristics, texture, color and sensorial parameters of both artisanal cheeses. Four formulations were elaborated for each cheese type, Cream cheese (C) and Butter cheese (B): C/B<sub>100</sub> (100% buffalo milk); C/B<sub>80</sub> (80% buffalo milk + 20% cow milk); C/B<sub>70</sub> (70% buffalo milk + 30% cow milk) and C/B<sub>60</sub> (60% buffalo milk + 40% cow milk). Three replicates were performed. The physicochemical composition of buffalo milk was influenced by the seasons, which did not influence the Somatic Cells Count (SCC) and Standard Plate Count (SPC). Compared to the rainy, the dry period showed an increase in fat ( $5.53 \pm 0.71$  to  $6.74 \pm 1.19$ ) and lactose ( $4.77 \pm 0.20$  to  $5.20 \pm 0.20$ ) concentrations and a reduction in total solids ( $16.89 \pm 0.92$  to  $15.77 \pm 1.54$ ), nonfat dry matter ( $9.94 \pm 0.36$  to  $8.99 \pm 1.23$ ) and minerals ( $0.84 \pm 0.12$  to  $0.62 \pm 0.09$ ) concentrations ( $p < 0.05$ ). The seasonal influence was observed in the physicochemical composition of both cheese types. Compared to the rainy season, in the dry season the cream cheese type showed higher values ( $p < 0.05$ ) for titratable acidity ( $0.63 \pm 0.02$  to  $0.78 \pm 0.15$ ), fat ( $32.38 \pm 3.22$  to  $36.89 \pm 4.59$ ), fat in the dry matter ( $55.06 \pm 3.26$  to  $63.92 \pm 2.49$ ) but lower values for water activity ( $0.99 \pm 0.02$  to  $0.49 \pm 0.03$ ), minerals ( $2.37 \pm 0.55$  to  $1.40 \pm 0.02$ ) and calcium ( $0.28 \pm 0.08$  to  $0.18 \pm 0.07$ ). For the butter cheese type, when compared to the rainy season, the dry season presented higher values for titratable acidity ( $0.49 \pm 0.02$  to  $0.38 \pm 0.0$ ) and lower values for water activity ( $0.59 \pm 0.08$  to  $0.99 \pm 0.02$ ), minerals ( $1.40 \pm 0.02$  to  $2.68 \pm 0.03$ ) e calcium ( $0.18 \pm 0.07$  to  $0.45 \pm 0.08$ ). The microbiological results and the count of foreign material in both cheeses were not affected by seasonality. Partial substitution of buffalo milk for cow milk in Cream cheese, promoted

significant changes in physicochemical characteristics (moisture, protein, fat, minerals and acidity), texture parameters (hardness, springiness, cohesiveness, chewiness) and color attributes ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$  and  $h^\circ$ ). This experimental model showed that the protein and pH played an important role in reducing the hardness and increasing the springiness. In the Butter cheese, partial addition of cow milk increased the moisture and pH, and decreased the protein, fat and mineral concentrations ( $p < 0.05$ ). Similarly, springiness, cohesiveness, gumminess and chewiness decreased. The moisture, fat and protein played an important role in reducing these texture parameters. Significant differences were found for the color variables  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  and  $h^\circ$ . On the other hand, the presence of cow milk did not cause alterations on sensorial attributes. The cheeses made with 40% of bovine milk reached the highest ranking for purchase intent. The study showed that some components of the buffalo milk and artisanal cheeses produced on Arari region of Marajó Island are influenced by the dry and rainy typical seasons, therefore sensory variations are expected. The addition of up to 40% of bovine milk to buffalo milk in the elaboration of Cream and Butter cheese does not affect the acceptance by the consumer, allowing a market supply during the dry period when production of buffalo milk decreases.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

No Brasil, a produção artesanal de queijos constitui uma atividade de grande importância econômica, social e de valorização de recursos locais, sendo uma consequência do ambiente histórico e cultural de onde são produzidos, o qual deve ser preservado (PUJOL, 1997). No estado do Pará, a produção da variedade artesanal é conhecida como queijo do Marajó, de dois tipos, o Creme e o Manteiga. Sua elaboração é realizada em pequenas propriedades rurais situadas na ilha do Marajó, com o emprego de mão de obra familiar e, tradicionalmente, com a utilização do leite de búfala, podendo ser acrescido do leite de vaca.

Na Ilha, se concentra o maior rebanho bubalino do país, com 263.088 animais (IBGE, 2010), o que representa 54,2% do total presente no estado do Pará, detentor do maior efetivo de bubalinos nacional, com 485.033 animais (37,95%) (IBGE, 2012) e 22% do total nacional, apurado em 1,278 milhões de cabeças (FAO, 2013; IBGE, 2012). Na região a maior parte do leite de búfala é transformada em queijos artesanais, pois se encontra longe dos centros consumidores e fora dos circuitos de coleta (BERNARDES, 2007). A produção desses queijos é uma tradição centenária, transmitida entre gerações como forma de aproveitamento da produção leiteira das búfalas criadas em pequenas propriedades rurais, e representa fonte de renda e de trabalho para parcela considerável de pequenos e médios produtores rurais da Ilha.

Os queijos do Marajó são obtidos pela coagulação espontânea e fusão da massa coalhada e dessorada do leite de búfala cru, ou acrescido de leite bovino cru na proporção máxima de 40% (SIMÕES *et al.*, 2013), a qual é lavada com água e leite de búfala ou leite de vaca, e adicionada do creme ou da manteiga do leite (PARA, 2013). Na alta safra do leite, com valor próximo a  $12 \text{ t dia}^{-1}$ , a produção dos queijos é estimada em  $1.500 \text{ kg dia}^{-1}$ , provenientes de cerca de 60 queijarias (SEBRAE, 2013).

Nesta Ilha, a precipitação pode ser considerada a principal variável meteorológica, com um regime sazonal de chuvas, de janeiro a junho, cuja acentuada concentração pluviométrica é cerca de 3.000 mm, e um período de seca, de julho a dezembro, com 487 mm (INMET, 2011). Esta variação sazonal afeta a disponibilidade e a qualidade da alimentação dos animais (GALVÃO JÚNIOR *et al.*, 2010), e pode influir, também, na qualidade do leite de búfala produzido na Ilha, que, por sua vez, poderá alterar as características dos queijos ali produzidos. Além disso, a sazonalidade das chuvas causa uma irregularidade na quantidade de leite produzido ao longo do ano,

que obedece a um período de safra e entressafra, decorrentes da maior ou menor disponibilidade de pastagens nativas naturais, única forma de alimentação das búfalas do Marajó.

Para suprir a demanda da produção dos queijos durante a entressafra, há necessidade da complementação com o leite bovino, também produzido na Ilha. A mistura destes leites pode trazer alterações nas características físico-químicas, nos parâmetros sensoriais, de textura e de cor, dos queijos do Marajó.

A avaliação dos efeitos da variação sazonal sobre as características do leite de búfala e dos queijos artesanais tipo Creme e tipo Manteiga e da substituição parcial do leite bubalino por leite de vaca na produção destes queijos, fornecerá, aos produtores da Ilha do Marajó, resultados importantes a serem seguidos, de modo a garantir a qualidade dos queijos artesanais, sem o risco de perder sua autenticidade e a fidelização de seus consumidores.

## 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERNARDES, O. Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 31, n. 3, p. 292-298, 2007.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. *Agriculture data*. 2013. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/home/index.html#download>>. Acesso em: 8 maio 2013.

GALVÃO JÚNIOR, G. B.; RANGEL, A. H. N.; MEDEIROS, H. R.; SILVA, J. B. A.; AGUIAR, E. M.; MADRUGA, R. C.; LIMA JÚNIOR, D. M. Efeito da produção diária e da ordem de parto na composição físico-química do leite de vacas de raças zebuínas. *Acta Veterinária Brasílica*, v. 4, p. 25-30, 2010.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA – INMET. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/>>. Acesso em: 1º nov. 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Pesquisa da Pecuária Municipal, Rio de Janeiro: IBGE, 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Pesquisa da Pecuária Municipal, Rio de Janeiro: IBGE, 2012.

PARÁ. AGÊNCIA ESTADUAL DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO ESTADO DO PARÁ – ADEPARÁ. *Aprova o Regulamento Técnico para a Produção do Queijo do Marajó*. Portaria nº 418, de 4 de março de 2013 (Estadual – Pará). Diário Oficial de 6 de março de 2013.

PUJOL, D. *A organização colectiva de uma fileira para a valorização local dos recursos agrícolas: O exemplo da produção de queijo*. Inovação em meio rural. Observatório Europeu Leader, 1997. 31 p.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO À MICRO E PEQUENAS EMPRESAS – SEBRAE. 2013. Disponível em: <[www.pa.agenciasebrae.com.br/noticia\\_pdf.kmf?cod=19915677](http://www.pa.agenciasebrae.com.br/noticia_pdf.kmf?cod=19915677)>. Acesso em: 8 mar. 2013.

SIMÕES, M. G.; DOMINGUES, A. F. N.; MACIEL, L. P.; RABELO, J. G.; OLIVEIRA, E. B.; FERREIRA, C. L. L. F. Effect of bovine milk addition in different characteristics of artisanal cream cheese from Marajó, elaborated with buffalo milk. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tosté*, v. 68, p. 32-40, 2013.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Estudar os efeitos da variação sazonal e da adição de leite de vaca nas características dos queijos artesanais do Marajó, Creme e Manteiga, produzidos na Ilha do Marajó, na região do Arari.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Escrever uma revisão de literatura sobre os artigos publicados referentes aos compostos bioativos em leite de búfala, com foco em suas concentrações e efeitos benéficos à saúde humana.

- Avaliar a influência da estação das chuvas e da seca na composição físico-química e microbológica do leite de búfala.

- Avaliar a influência da estação das chuvas e da seca na composição físico-química e microbológica dos queijos do Marajó, Creme e Manteiga.

- Avaliar os efeitos da substituição parcial do leite de búfala por leite de vaca, nas características físico-químicas, de textura (medidas instrumentais de dureza, fraturabilidade, adesividade, elasticidade, coesividade, gomosidade e mastigabilidade) de cor (parâmetros do sistema CIE -  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ), e na aceitação dos queijos artesanais do Marajó, Creme e Manteiga, tradicionalmente elaborados com leite de búfala.

## **4. REVISÃO DE LITERATURA**

### **4.1. Ilha do Marajó – Sazonalidade Pluviométrica**

Inicialmente a Ilha do Marajó chamava-se Marinatambal e, nos tempos coloniais, passou a ser chamada de Ilha Grande de Joanes, sendo, posteriormente denominada de Marajó, cujo nome vem da palavra tupi Mbara-yó, ou “barreira do mar”. Segundo o dicionário Aurélio, Marajó, significa “o vento que sopra à tarde sobre a ilha”. É a maior ilha do arquipélago de mesmo nome, seguida pelas ilhas Caviana, Mexiana e Gurupá (BARBOSA, 2005; MIRANDA NETO, 2005).

A Ilha do Marajó está situada às proximidades da linha do equador, que passa quase paralela ao norte da ilha. Suas coordenadas geográficas estão localizadas entre os paralelos 0° 38' N e 1° 55' S, e os meridianos 48° 20' W Gr e 51° 57' W Gr, no extremo norte do Brasil, à foz do rio Amazonas, onde também deságuam alguns dos maiores rios da região, sendo os principais os rios Pará, Tocantins, Xingu, formando uma extensa área conhecida como foz Amazônica. Esta ilha continental encontra-se estrategicamente localizada entre duas capitais – Belém, PA e Macapá, AP (Figura 1), e caracteriza - se pela presença de extensas áreas de savanas mal drenadas, sendo sua paisagem formada por florestas, campinas, gramados, praias de rio, lagos de variados tamanhos, furos e igarapés.

Com área total de 49.606 km<sup>2</sup>, é maior que estados como do Rio de Janeiro, Alagoas, Sergipe e Espírito Santo, por exemplo (ATLAS, 2005). É a maior ilha fluvio-marítima do mundo, com população de 487.010 habitantes, dos quais 275.700 vivem na área rural, o que corresponde a 56,59% do total. Possui 23.034 agricultores familiares, 14.618 famílias assentadas, 18 comunidades quilombolas. Seu índice de desenvolvimento humano (IDH) médio é 0,63 (IBGE, 2010).

Geograficamente, é dividida em três regiões, Arari, Furos de Breves e Portel, e 16 distritos municipais. Nesta ilha, a produção dos queijos artesanais do Marajó ocorre predominantemente na região do Arari, costa leste, nos municípios de Cachoeira do Ararí, Soure, Salvaterra, região caracterizada pela presença dos campos alagados ou savanas amazônicas (BRASIL, 1999), onde estão localizadas as fazendas de búfalo, gado e suinocultura. A Figura 2 mostra os municípios da Ilha do Marajó e dentre eles os



equivalente a 14% deste total (BRASIL, 2007; INMET, 2011). A estação chuvosa provoca dificuldades no acesso a algumas regiões, já que aproximadamente dois terços da ilha são inundados (MIRANDA NETO, 2005). Apresenta clima tropical úmido, temperatura média anual de 28 °C, amplitude térmica média de 4 °C e variações na umidade relativa entre 80% a 90% (LIMA *et al.*, 2005; BRASIL, 2007).

Esta variação no clima causa uma irregularidade na produção de leite de búfala ao longo do ano, a qual obedece a um período de safra e entressafra, decorrentes da maior ou menor disponibilidade de pastagens nativas naturais, única forma de alimentação das búfalas do Marajó, influenciada pela variação do regime de chuvas na região. Sistemas baseados em pastagem natural utilizam menos fertilizantes, sementes e operações agrícolas do que pastagem cultivada. São considerados mais ecológicos em razão da flora adaptada às condições agro-climáticas, porém são mais variáveis com a estação (RUBINO *et al.*, 1995).

Em uma escala global, o efeito da variação sazonal na produção e qualidade do leite chama a atenção pela sua influência na qualidade dos produtos lácteos (YASMIN *et al.*, 2012), a qual depende da sua composição, que varia de acordo com a localidade, estágio de lactação, raça e espécies, sistema de ordenha, idade e tamanho do animal, meio ambiente, clima, temperatura, composição da dieta e das estações do ano (GALVÃO JÚNIOR *et al.*, 2010). Os fatores climáticos envolvem a umidade relativa do ar, precipitação, temperatura e fotoperíodo (ZICARELLI, 2010). Na Ilha do Marajó, onde não há grandes variações em fotoperíodo, os demais fatores climáticos exercem maiores influências na composição do leite de búfala (BERNARDES, 2007). Dessa forma, a produção e a composição do leite de búfala e de seus derivados podem ser diretamente influenciadas pela época do ano, uma vez que esta afeta a disponibilidade e a qualidade da alimentação dos animais (BASTIANETTO *et al.*, 2005). Vários estudos mostram os efeitos da variação sazonal na composição do leite de búfala em diferentes regiões (ARAUJO *et al.*, 2011; RANGEL *et al.*, 2011; ARAUJO *et al.*, 2012).

## **4.2. Leite de Búfala**

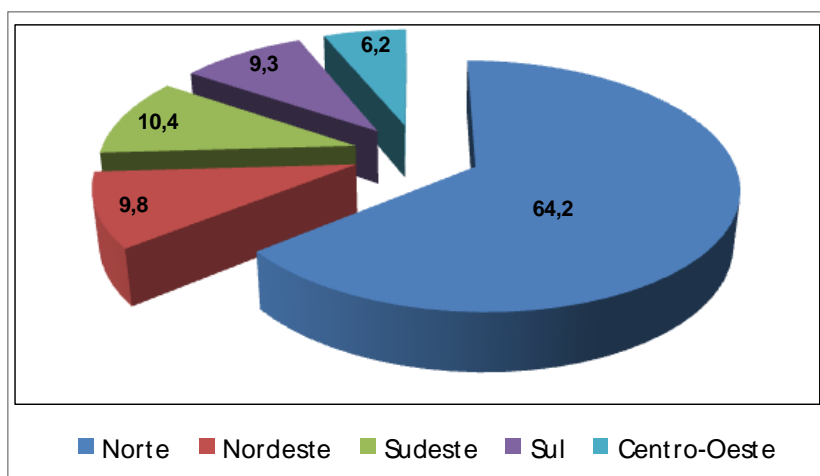
O búfalo (*Bubalus bubalis*) há séculos tem sido utilizado como força de trabalho e fonte alimentar em vários países asiáticos (MESQUITA *et al.*, 2001). O efetivo bubalino mundial é de 195,266 milhões de cabeças (FAO, 2013), cerca de 189 milhões encontram-se na Ásia (97%), com destaque para a Índia com cerca de 113 milhões de

animais (60%) (FAO, 2013). Nas últimas décadas, a criação de búfalos tem aumentado em razão da sua capacidade de adaptação em diferentes climas, elevada taxa de produtividade de carne e leite, além de sua alta fertilidade, superior aos bovinos (MARQUES *et al.*, 2006).

No Brasil, estes animais foram introduzidos há mais de 100 anos na ilha do Marajó, no estado do Pará, de onde se expandiram por toda a região Amazônica, onde as raças Murrah e Mediterrâneo se destacam (IBGE, 2012). O efetivo de bubalinos nacional foi de 1,278 milhões de cabeças (IBGE, 2012; FAO, 2013). O índice de crescimento da produção no Brasil tendeu a acompanhar o índice mundial, com 14,5% no período 2002-2011 (FAO, 2011).

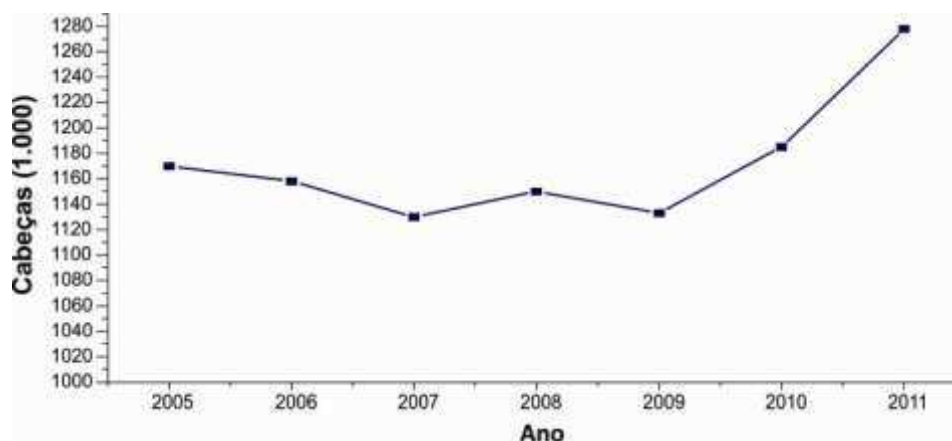
O rebanho concentra-se sobremaneira no estado do Pará (37,95%), com 485.033 animais, Amapá (18,4%) com 235.549 animais, ou cumulativamente, 64,21% do efetivo nacional encontra-se na região Norte. A Ilha do Marajó possui o maior rebanho de búfalos do país, com 263.088 animais, o que representa 58,2% dos animais presentes no estado do Pará (IBGE, 2012) e 22% do total nacional. Na ilha, os búfalos são criados em pequenas e médias propriedades, onde são mantidos em regime de criação extensiva, alimentados com pastagem nativa, sendo explorados principalmente para a produção de carne e leite (BERNARDES, 2007).

Comparando-se os efetivos (Figura 4), observa-se que o rebanho bubalino da região Norte se destaca quando comparado com as demais regiões do Brasil (IBGE, 2012). A Figura 5 mostra a evolução do efetivo nacional de bubalinos nas regiões do Brasil, no período entre 2005 a 2011, (IBGE, 2012).



Fonte: IBGE, Diretoria de Pesquisa, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa da Pecuária Municipal (2012).

Figura 4 – Efetivo de bubalinos, segundo as Grandes Regiões, 2012.



Fonte: IBGE, Diretoria de Pesquisa, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa da Pecuária Municipal.

Figura 5 – Evolução do efetivo nacional de bubalinos, no período de 2005 a 2011.

No entanto, existe discrepância entre as informações oficiais sobre os efetivos nacionais e regionais, mas este fato não impede a constatação que a bubalinocultura no Brasil apresentou crescimento nos últimos anos, com aumento, em 2012, de 7,8% (IBGE, 2012). De acordo com a EMBRAPA, 2011, o efetivo deste rebanho era cerca de 2,5 milhões de cabeças, com projeção de 12% de aumento ao ano. Jorge *et al.* (2011) relatam que o Brasil possui o maior rebanho de búfalos da América, com cerca de 4 milhões de animais.

Embora apresente o maior rebanho bubalino do Brasil, o estado do Pará ainda possui muitos entraves quanto à produção racional de búfalos, como a falta de informação e apoio logístico por parte dos órgãos públicos, aliadas a baixa capacidade de investimentos e certo isolamento por parte dos produtores.

Atualmente, em nosso País, tem sido realizado um intenso trabalho visando à implantação definitiva da bubalinocultura, pois o búfalo é um animal de tripla aptidão; produz carne, leite e energia. É de conhecimento geral a elevada rusticidade desses animais e sua capacidade de adaptação a solos de baixa fertilidade e terrenos alagadiços, sendo capazes de converter alimentos de baixa qualidade em carne e leite (MARQUES *et al.*, 2006). Os búfalos apresentam longevidade incomparável e grande possibilidade de ocupar regiões que são inadequadas para a criação de bovinos e outros ruminantes (MADELLA-OLIVEIRA *et al.*, 2005).

O búfalo produz carne e leite de excepcionais qualidades, que podem efetivamente contribuir com a nutrição humana. Há um *slogan* utilizado pela Cooperbúfalo, e que é de propriedade da ASCRIBU, ambas no estado do Rio Grande do Sul, que sintetiza as qualidades do búfalo em uma única frase, de modo simples, mas, excepcional: “búfalo + em tudo” (BARBOSA, 2010).

Nos últimos 50 anos, o crescimento da produção de leite de búfala foi de 301,0%; ao contrário do leite de vaca que nesse mesmo período alcançou 59,3%; o de leite de cabra 85,0%; e o de ovelha 54,5%, o que sinaliza a importância da evolução da bubalinocultura leiteira (JORGE *et al.*, 2011).

Comercialmente, as búfalas contribuem com 13% do total de leite produzido no mundo, cerca de 95,8 milhões de toneladas/ano (FAO, 2012), com taxa de crescimento anual de 3,1%, sendo o continente asiático responsável por 96% da produção mundial, com crescimento anual de 4%. Os maiores produtores são Índia com 68% e Paquistão com 24% (FAO, 2012). No Brasil, não existe informação oficial sobre o volume de leite de búfala produzido, mas acredita-se que a produção venha acompanhando a tendência mundial (AMARAL; ESCRIVÃO, 2005, IBGE, 2010). Estima-se que a produção anual de leite de búfala no Brasil era, aproximadamente, de 92,3 milhões de litros, com crescimento de 10% ao ano (POLO, 2008).

A produção de leite de búfala na Ilha representa uma atividade de importância econômica, além de garantir a permanência do homem na zona rural. No entanto, o fator físico e geográfico, dentre outros, afeta negativamente a produção leiteira. As fazendas estão distantes da capital, Soure, e o único transporte possível é o fluvial, onde barcos movidos a motor “popopo”, como denominado na região em alusão ao barulho feito por eles, levam horas para chegar até Soure. De Soure até o porto de Camará, de onde saem os transportes para Belém são mais trinta minutos, e de Camará para Belém, são mais quatro horas. Sem o apoio governamental, capacitação e orientação aos produtores não há como escoar a produção de leite *in natura* para Belém (BARBOSA, 2005).

Por outro lado, é válido salientar que, no Brasil, as pesquisas com búfalos foram iniciadas há aproximadamente 50 anos. Contudo, como citado anteriormente, tem ocorrido um aumento crescente na criação desses animais, principalmente para a produção leiteira (IDF, 2012) em decorrência das características peculiares do seu leite, que permitem fácil identificação sob o ponto de vista físico-químico e sensorial. Seu sabor é peculiar, ligeiramente adocicado e mais branco que o leite bovino, em virtude da ausência de caroteno (MESQUITA *et al.*, 2001). As raças Murrah e Mediterrâneo são as

mais utilizadas para produção de leite no Brasil, seguidas da Jafarabadi e Carabao, respectivamente. A maior vantagem do leite bubalino, em relação ao leite de outras espécies, é a qualidade nutricional, pois possui teores de proteínas, gorduras e minerais que superam consideravelmente os do leite da vaca, sobrepujando o rendimento do leite bovino em mais de 40% (VIEIRA et al., 2005). Segundo Mesquita *et al.*, 2001, há necessidade de se realizar trabalhos regionais que promovam o conhecimento das reais características do leite bubalino, com vistas, inclusive, à adoção de padrões para a efetivação do controle de qualidade. Dados os aspectos apontados, e em razão da crescente produção de leite de búfala no Brasil, a determinação de sua composição físico-química torna-se uma ferramenta indispensável para que se possa verificar a integridade do mesmo no que tange à adição ou à retirada de componentes, como a presença de antibióticos, metais pesados etc., assim como, para avaliar as alterações de sua composição em decorrência de modificações na dieta e no metabolismo dos animais em lactação (MESQUITA *et al.*, 2001).

#### 4.2.1. Composição Físico-Química

A composição do leite de búfala é variável, em função de fatores ambientais, estação do ano, nutrição e características do animal como raça, idade, estágio da lactação, dentre outras (AMARAL, 2005). A FAO reconhece a importância deste leite em razão da superioridade de sua composição química em relação ao de vaca.

É importante salientar a inexistência de uma legislação federal específica para o leite bubalino, no Brasil. A Secretaria de Agricultura e Abastecimento (SAA) do estado de São Paulo implantou uma resolução que estabelece valores mínimos de 4,5% para o teor de gordura, não fazendo, no entanto, referências para lactose, proteína, sólidos totais (Tabela 1).

Tabela 1 – Características físicas do leite de búfala

<b>Características Físicas</b>	<b>Valores</b>
Gordura	Mínimo 4,5%
Acidez (°D)	14 °D – 23 °D
pH	6,40 – 6,90
Extrato seco desengordurado	Mínimo 8,57%
Densidade a 15 °C	1,028 g mL <sup>-1</sup> – 1,034 g mL <sup>-1</sup>

Fonte: adaptada de São Paulo (2008), *apud* Dias (2009).

A Secretaria de Inspeção de Produtos de Origem Animal (SIPA), por meio da Portaria nº 236, permite a incorporação de até 30% do leite bubalino ao bovino desde que seja incluída esta especificação no rótulo. Esta mistura diminui a demanda do leitebubalino, achata seus preços e desestimula investimentos na atividade (MADELLA-OLIVEIRA *et al.*, 2001).

A grande importância desse alimento está na sua transformação em derivados, uma vez que sua composição peculiar possibilita um alto rendimento industrial (OLIVIERI, 2004). O leite de búfala é cerca de 40-50% mais produtivo na elaboração de derivados que o leite bovino (AMARAL; ESCRIVÃO, 2005; TEIXEIRA *et al.*, 2005).

A Tabela 2 mostra os valores médios dos constituintes do leite de búfalas encontrados em estudos realizados no Brasil e em outros países; para o propósito de comparação, a Tabela 3 indica a composição do leite de búfala e de outros mamíferos.

Tabela 2 – Valores médios dos constituintes do leite de búfala, no Brasil e em outros países ((g/100g)

<b>Autor</b>	<b>País</b>	<b>Gordura</b>	<b>Proteína</b>	<b>Sólidos</b>	<b>Lactose</b>
Sodi <i>et al.</i> (2008)	Índia	7,70	3,81	17,00	4,83
Tufarelli <i>et al.</i> (2008)	Itália	8,10	4,65	17,60	4,85
Arian <i>et al.</i> (2008)	Paquistão	7,00	4,35	16,60	4,21
Patiño e Stefani (2005)	Argentina	7,22	3,85	16,35	4,49
Amaral <i>et al.</i> (2004)	Brasil	6,83	4,19	17,99	4,93
Teixeira <i>et al.</i> (2005)	Brasil	6,52	3,74	16,24	4,97
Neto <i>et al.</i> (2010)	Brasil	6,80	3,80	16,10	4,65
Figueiredo <i>et al.</i> (2011)	Brasil	8,22	4,39	-	5,23
Araújo <i>et al.</i> (2011)	Brasil	7,06	4,33	16,84	-
Araújo <i>et al.</i> (2012)	Brasil	5,70	4,22	15,73	4,82

Alguns componentes destacam-se quanto as características nutricionais pela sua maior concentração no leite de búfala quando comparado ao leite de vaca, como a gordura, proteína, Ca, P, vitaminas A, C e B6, MUFA (ácidos graxos monoinsaturados), PUFA (ácidos graxos poli-insaturados) e CLA (ácido linoleico conjugado). Outro aspecto importante é a concentração de colesterol, que no Leite de búfala (LB) é em média 30% a 70% menor. Importa ressaltar, ainda, a ausência de caroteno que contribui para a cor branca mais acentuada do leite de búfala e em seus derivados. No entanto, a

concentração de vitamina A é cerca de 50% mais alta que a encontrada no leite de vaca.

A maior concentração de Ca presente no LB, pode ser responsável pela maior instabilidade deste leite quando submetido ao teste do álcool (alizarol), quando comparado com o leite de vaca (LV) (PURI, 1977). Pesquisa realizada por Zanela et al., 2011, classificou 64,17% das amostras de LB, como leite instável não ácido (LINA), no teste do alizarol (BRASIL, 2002).

Tabela 3–Composição do leite de diferentes mamíferos (g/100g)

<b>Componentes</b>	<b>Humano</b> <sup>6,7</sup>	<b>Búfala</b> <sup>1,3</sup>	<b>Vaca</b> <sup>1,2,3,4,7</sup>	<b>Cabra</b> <sup>5</sup>
Umidade (g)	89,5	83,2 ± 0,6	87,7 - 89,2	87,03
Sólidos totais (g)	12,1	17,0 ± 0,6	13,3	12,90
Sólidos não gordo (g)	7,3	9,7 ± 0,8	8,8 - 9,8	8,76
Proteína (g)	1,4	4,0 ± 0,5	3,1 - 3,3	3,56
Gordura (g)	4,0	7,4 ± 0,9	3,3 - 3,7	4,14
Lactose (g)	6,5	4,4 ± 0,6	4,9 - 5,6	4,45
Minerais (g)	0,2	0,8 ± 0,04	0,7	1,04
Cálcio (mg)	32	191 ± 38	119	134
Fósforo (mg)	14	185 ± 94	93	111
Colesterol (mg)	20	4 - 10	14	27
Fosfolipídeos (mg)	25,3	20	28	--
Vitamina A (µg) RAE	67	69	46	57
Vitamina B6 (mg)	--	0,33	0,04	--
Vitamina C (mg)	--	2,5	0,0	--
MUFA (mg)	1,6	2,1	1,0	1,1
PUFA (mg)	0,5	0,24	0,1	0,15
CLA (mg)	--	0,5 - 1,1	0,4 - 0,9	--

Fonte: <sup>1</sup> Medhammar *et al.* (2012); <sup>2</sup> Rigueira (2006); <sup>3</sup> Talpur (2007); <sup>4</sup> USDA (2009); <sup>5</sup> Inran *et al.* (2008); <sup>6</sup> Garcia *et al.* (2012); <sup>7</sup> Nikkhah (2011); e Lönnnerdal (1985). MUFA = ácidos graxos monoinsaturados; PUFA = ácidos graxos poli-insaturados; eCLA = ácido linoleico conjugado.

A gordura é o mais variável e um dos mais importantes componentes do leite, oscilando, em média, entre 5,5% e 8,5 % nos bubalinos (DUARTE *et al.*, 2001). Apesar de bastante alta, a porcentagem de matéria gorda no leite de búfala é variável em função das raças e das regiões onde se encontram os animais. As fases da lactação alteram o percentual de gordura, aumentando gradativamente com o transcorrer da mesma (FONSECA *et al.*, 2001). Os glóbulos de gordura do LB são maiores do que os do LV, com maior densidade e temperatura de fusão mais elevada 32 °C - 43,5 °C (GANGULI, 1979).

A gordura do LB, no período de lactação, apresenta em torno de 64% de ácidos graxos saturados (AGS), com predominância de ácidos graxos de cadeia longa como palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0). Para os ácidos graxos saturados de cadeia curta e média (C6-C14), o ácido graxo merístico (C14:0) é encontrado em maior concentração. O caprílico (C8:0) apresenta a menor porcentagem seguida do capróico (C6:0) e cáprico (C10:0). Os ácidos graxos insaturados representam aproximadamente 36% da gordura do leite de búfala, e o ácido graxo predominante é o oléico seguido do linoleico e palmitoléico (FERNANDES, 2004). Alguns componentes graxos como MUFA (ácidos graxos monoinsaturados), PUFA (ácidos graxos poli-insaturados) e CLA (ácido linoleico conjugado), destacam-se quanto às características nutricionais pela sua maior concentração no leite de búfala quando comparado ao LV (Tabela 3). Melício (2004) mostrou que as quantidades de ácidos graxos saturados e insaturados variam durante o período de lactação. A quantidade de colesterol média no LB durante a lactação é de 0,026 mg g<sup>-1</sup> com um valor mínimo de 0,04 mg g<sup>-1</sup> e máximo de 0,1 mg g<sup>-1</sup>.

As micelas de caseína do LB são maiores que as encontradas no LV, fazendo com que, a coalhada elaborada com LB retenha menos água durante a ação do coalho (GANGULI, 1979).

O LB é 30% a 40% mais calórico do que o LV. Em relação ao teor de minerais, ele é mais rico em Ca (1,99 gkg<sup>-1</sup> versus 1,19 gkg<sup>-1</sup>), P (185 gkg<sup>-1</sup> versus 93 gkg<sup>-1</sup>) e Mg (0,18 gkg<sup>-1</sup> versus 0,11 gkg<sup>-1</sup>) do que o LV, porém é mais pobre em Na, K e Cl. A relação Ca/P é 1,71, enquanto no LV é de 1,31 (DE FRANCISCIS; DI PALO, 1994, PINHEIRO *et al.*, 2011). A maior concentração de cálcio diminui o tempo de coagulação (HUHN *et al.*, 1986).

Na análise de aminoácidos, o LB apresenta 25,5% de aminoácidos essenciais a mais do que o LV (VERRUMA; SALGADO, 1994). A porção proteica no LB é constituída por 77% - 79% de caseína e de 21% - 23 % de soroproteínas. A caseína está presente principalmente na forma de micelas com as frações  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$ , nas respectivas concentrações 31% , 13%, 28% e 7% (BRAMANTI *et al.*, 2003).

O alto teor dos sólidos totais, incluindo a gordura, proteína, lactose, vitaminas e sais minerais, favorece decisivamente o aumento do rendimento na fabricação de queijos com leite de búfalas (BERNARDES, 2007; MATOS, 2007).

O valor nutricional e a digestibilidade proteica do leite e dos produtos obtidos do leite de búfala e de vaca, são semelhantes. O valor de PER (razão de eficiência proteica) para a proteína do leite de búfala é de 2,74 e o da proteína do leite de vaca 2,49. O NPU

(eficiência líquida da proteína) são 8,8 e 7,9 e, a absorção de gordura, 78,4 e 74,6 para o leite de búfala e de vaca, respectivamente (KANAWJIA e SINGH, 1993).

#### **4.2.2. Compostos Bioativos em Leite de Búfala**

Nas últimas décadas, a identificação de substâncias bioativas de origem alimentar, definidas como compostos dietéticos, nutrientes ou não (FAO, 2007), tem se destacado como um novo campo de pesquisa. A atividade dos chamados alimentos funcionais, definidos como aqueles que, além da função básica de nutrir, exercem uma atividade reguladora no organismo humano (BRASIL, 2002), são inferidas pelos componentes bioativos.

Estes componentes estão presentes nos alimentos em natureza ou são adicionados a uma matriz alimentar, e podem ser classificados de acordo com a função que irão exercer no organismo (antimicrobianos, opioides, vaso constritores, antioxidantes, prebióticos, etc.), de acordo com a composição química (carboidratos, lipídeos, proteínas e outros) ou de acordo com a origem (vegetal: isoflavonas, ômega 3, oligossacarídeos, etc.; animal: proteínas, ácidos linoleicos conjugados (CLA), peptídeos, lactoperoxidasas, por exemplo; ou microbiana: lactobacilos, bifidobactérias e outros) (FAO, 2007).

Pesquisas mostram que o leite de búfala apresenta um leque diversificado de compostos bioativos em sua forma ativa, com destaque para as imunoglobulinas, lactoferrina, lisozima, lactoperoxidase, ácido linoleico conjugado, gangliosídeos e oligossacáridos, todos secretados em sua forma ativa na glândula mamária (MILLS *et al.*, 2011), como, também, de peptídeos bioativos liberados a partir de suas caseínas e proteínas do soro, alguns em quantidades mais expressivas e mais eficazes que os do leite de vaca, ou com bioatividades únicas.

Dentre os peptídeos lácteos bioativos, os fosfopeptídeos foram os primeiros identificados em hidrolisados da caseína do leite de vaca (MELLANDER, 1950). Posteriormente, outros peptídeos com funções definidas foram isolados e caracterizados (PANDYA; HAENLEIN, 2009), como: i) peptídeos de ligação – que carregam e aumentam a absorção de minerais, principalmente a do cálcio (HARTMANN; MEISEL, 2004); ii) peptídeos opioides – exorfinas que atuam como substâncias reguladoras, com propriedades farmacológicas semelhantes

asencefalinas usadas para aliviar a dor (GOBBETTI *et al.*, 2007; HARTMANN; MEISEL, 2007); iii) anti-hipertensivos (RICCI *et al.*, 2010; QUIAN *et al.*, 2011; TAVARES *et al.*, 2011a); iv) imunomoduladores (GAUTHIER *et al.*, 2006; HARTMANN; MEISEL, 2007; KAMOU *et al.*, 2010a; QUIAN *et al.*, 2011); v) antibacterianos (KAMOU *et al.*, 2010b); vi) antioxidantes (HARTMANN; MEISEL, 2007); vii) antitrombóticos (KORHONEN; PIHLANTO, 2006); viii) citomodulatórios (HARTMANN; MEISEL, 2004; KAMOU *et al.*, 2010a); ix) anticancerogênicos (AGYEI; DANQUAH, 2011); e x) de atividade antiúlcera (TAVARES *et al.*, 2011b).

Nos últimos anos, em razão da grande importância que estes peptídeos têm alcançado no mercado, a hidrólise enzimática *in vitro* de proteínas de alimentos com enzimas proteolíticas de origem microbiana tem sido empregada para a obtenção de novos peptídeos bioativos (TAVARES *et al.*, 2012). A maior parte destes estudos é realizada com peptídeos bioativos do leite de vaca e seus derivados, que abordam principalmente a sua separação e caracterização (TAVARES *et al.*, 2011b) e a produção e biodisponibilidade, a qual depende em grande parte da sua capacidade de permanecer intacto até chegar ao órgão onde exercerá sua atividade (KORHONEN; PIHLANTO, 2006; SAGUZA-CARPOS *et al.*, 2011). Comercialmente, o número de derivados lácteos contendo peptídeos bioativos com atividade declarada, ainda é baixa, mas futuramente, esta quantidade irá aumentar, em razão, da forte tendência pró saúde desses produtos alimentares (DZIUBA; DZIUBA, 2014). A Figura 6 mostra a presença de compostos bioativos em derivados do leite de vaca.



Figura 6 – Peptídeo da  $\beta$ -casein e k-caseína do leite de vaca em iogurte e manteiga: redutor do colesterol e da pressão sanguínea.

Pesquisas indicam que é de se esperar que as proteínas do leite de búfala e do leite de vaca produzam péptidos bioativos análogos, em razão da similaridade das sequências de seus aminoácidos e que desempenhem as mesmas atividades funcionais (ABD EL-SALAM; EL-SHIBINY, 2011; ABD EL-SALAM *et al.*, 2013).

O leite de búfala é um alimento funcional que inclui várias fontes de compostos bioativos multifuncionais, pode ser usado para diferentes fins, como o desenvolvimento de produtos alimentares inovadores que podem reduzir o risco de doenças e manter a saúde, uma nova tendência nos alimentos funcionais, nutrição e dietética. Outros componentes do leite de búfala, como fonte de bioativos e suas propriedades funcionais, precisam ainda ser investigados.

### **4.3. Queijos Artesanais do Marajó**

Tradicionalmente, o queijo artesanal do Marajó é produzido na ilha do Marajó, com leite de búfalas que se alimentam em pastagens nativas, mas, que, também, pode ser produzido com o leite misto, de bovino com bubalino. Além de representar uma importante atividade econômica da Ilha (BLASKOVSKY *et al.*, 2010), sua fabricação faz parte da cultura da população local e suas características sensoriais são bastante difundidas e conhecidas regionalmente e em todo o estado do Pará. Na Ilha, a maior parte do leite de búfala é transformada em queijos artesanais, pois a região encontra-se longe dos centros consumidores e fora dos circuitos de coleta, sendo os queijos tipo Creme e tipo Manteiga, os mais tradicionais (BERNARDES, 2007).

De acordo com o Regulamento Técnico de Produção (PARA, 2013), entende-se por Queijo do Marajó o produto elaborado artesanalmente na área geográfica do arquipélago de mesmo nome, conforme a tradição histórica e cultural da região onde é produzido. São obtidos pela coagulação espontânea e fusão da massa coalhada e dessorada de leite de búfala cru e, ou, leite de búfala cru acrescido de leite bovino cru, na proporção máxima de 40%, a qual é lavada com água e leite de búfala ou bovino, e adicionada do creme ou da manteiga do leite.

Elaborados com o leite de animais de raças específicas e alimentadas em sistemas de pastejo nativo com forrageiras locais, são queijos que possuem *terroir*, o qual é conferido a produtos que são característicos do seu local de origem, o que lhes atribui reputação, valor intrínseco e identidade própria. Apresentam, pois, qualidade única em função de recursos naturais como solo, vegetação, clima e saber fazer (*know-*

*how* ou *savoir-faire*) (BRASIL, 2011). Possuem textura macia, compacta e fechada, com pequenas e poucas “olhaduras”; aroma agradável, coloração amarela-esverdeada (SIMÕES *et al.*, 2013), sendo levemente ácidos e salgados, adquirem a forma do recipiente em que são envasados e são destinados ao consumo imediato (PARA, 2013).

O histórico da produção do queijo do Marajó remonta ao final do século XIX, antes mesmo da introdução dos bubalinos neste local. Nesta época, famílias de fazendeiros portugueses e franceses, residentes na Ilha, elaboravam o queijo com a utilização de leite bovino. Em 1895, com a introdução dos búfalos na região, caracterizada pela presença das pastagens nativas naturais e campos inundáveis, esses animais encontraram condições propícias para sua reprodução e desenvolvimento (FONSECA, 1974; VALE *et al.*, 2002). Desse modo, o leite de búfala que inicialmente era consumido apenas na dieta alimentar dos nativos da região passou, também, a ser empregado na fabricação do queijo Marajoara, sendo o fazendeiro João Batista Lima o primeiro criador a explorar a búfala como produtora de leite, utilizando-o na elaboração do queijo Manteiga, em suas fazendas no município de Cachoeira do Arari e Soure.

Nesta mesma época (1895), o produtor Francisco de Castro Ribeiro ao importar da Holanda a primeira desnatadeira, iniciou inovação na tecnologia da produção do queijo Marajoara, originando o queijo Creme (FIGUEIRAS; QUADROS, 2002; SILVA; OLIVEIRA, 2003). Assim, o produto que, inicialmente, foi produzido por estes fazendeiros do Marajó, passou a ser apreciado pela população de outras regiões do estado do Pará. Atualmente, o “Queijo do Marajó” faz parte do hábito alimentar do paraense, estando, também, presente na culinária de outras regiões brasileiras e é produzido quase exclusivamente com leite de búfala (FIGUEIRAS; QUADROS, 2002; SILVA; OLIVEIRA, 2003).

Dessa forma, a fabricação artesanal dos queijos do Marajó, Creme e Manteiga, resultam de uma tradição centenária, transmitida entre gerações como forma de aproveitamento da produção leiteira das búfalas criadas nas pequenas propriedades rurais, e representa fonte de renda e de trabalho para parcela considerável de pequenos e médios produtores rurais da Ilha. Em geral, alguns destes pecuaristas são também produtores de leite de búfala e de vaca. É importante destacar que grande parte da produção de queijo (72,5%) ainda é artesanal (SILVA; OLIVEIRA, 2003), sendo a matéria-prima própria e, ou, comprada de outras fazendas.

A comercialização mais comum é realizada pelo intermediário, o qual se desloca até o produtor e entrega posteriormente o queijo, aos centros consumidores de maior

poder aquisitivo, principalmente na cidade de Belém (SILVA; OLIVEIRA, 2003). Na alta safra do leite, com volume próximo de 12 toneladas/dia, a produção dos queijos é estimada em 1.500 kg/dia, provenientes de cerca de 60 queijarias localizadas principalmente nos municípios de Cachoeira do Arari, Soure e Salvaterra, região do Arari da ilha do Marajó (SEBRAE, 2013). Na entressafra esta produção cai para menos da metade.

Apesar da grande importância e aceitação, atualmente, o queijo do Marajó ainda é comercializado na informalidade, uma vez que, a maior parte das queijarias não se encontram cadastradas no órgão de fiscalização estadual – Agência de Defesa Agropecuária do estado do Pará – ADEPARÁ. Este órgão fiscaliza a sanidade dos rebanhos, as condições higiênicas sanitárias dos sistemas de produção, a qualidade da água, do leite e do produto final, ou seja, parâmetros relacionados quanto à segurança alimentar deste produto, que podem colocar em risco a saúde do consumidor (PARA, 2013). Há a necessidade do controle da qualidade deste queijo, que garanta sua segurança e conseqüentemente a obtenção de registro legal para sua comercialização. Os produtores cadastrados são autorizados a comercializar os queijos do Marajó somente no estado do Pará (PARA, 2011), mas esta comercialização poderá se estender à todo o território brasileiro, após a aprovação do Regulamento Técnico de Produção do Queijo do Marajó (ADEPARA, 2013), pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

As orientações, capacitações e apoio governamental relacionado à produção e comercialização destes queijos são pontosa serem considerados, pois são inexistentes na região. Por isso, nem sempre os objetivos são alcançados, o que sugere a necessidade de programas governamentais e de proteção especial à produção e comercialização dos queijos artesanais do Marajó. Da mesma maneira, novas pesquisas científicas devem ser direcionadas para avaliar a adequação atual da produção destes queijos.

#### **4.3.1 Queijo Creme**

Os maiores produtores de queijos artesanais do Marajó produzem o queijo Creme, principalmente nos municípios de Soure e Salvaterra. No processo de elaboração do queijo Creme, apresentado na Figura 3, o leite é desnatado por desnatadeira elétrica, e grande parte do creme é automaticamente extraído (80%). Posteriormente, o leite desnatado é submetido à fermentação natural à temperatura

ambiente (30 °C), por cerca de 24 horas. A quebra da massa é realizada manualmente, sendo esta massa colocada em sacos de algodão para a retirada do soro, por cerca de 8 horas. Para ocorrer à diminuição da acidez a massa dessorada é submetida a lavagens com água (2 L de água para 1 kg de massa), sob aquecimento, 70°C, sendo a última

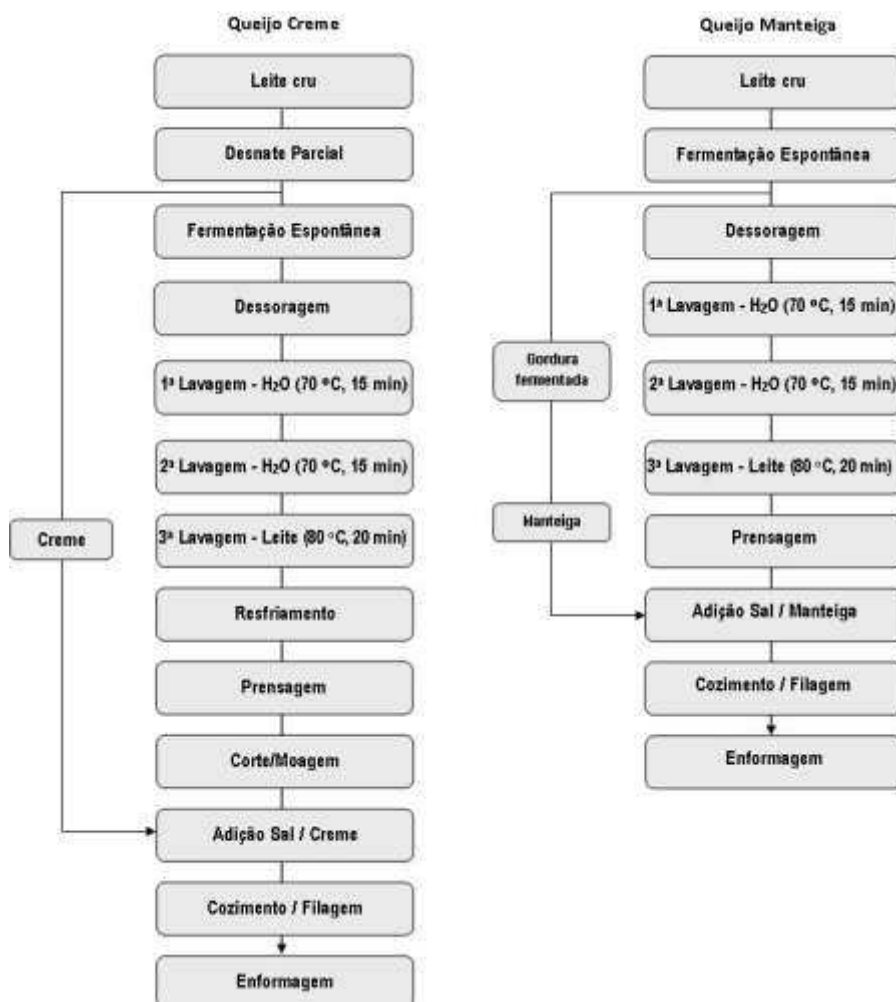


Figura 3 – Fluxograma da produção dos queijos artesanais do Marajó, Creme e Manteiga.

lavagem efetuada com leite desnatado (2 L de leite para 1 kg de massa), para incorporação de sólidos e aumentar o rendimento. A massa retirada do aquecimento é colocada em uma superfície de aço inoxidável, para ser resfriada (40 °C). Para acelerar o resfriamento, algumas queijarias usa água sobre a massa. Após, a massa resfriada é prensada mecanicamente, para a remoção do excesso de soro, cortada em triturador elétrico, em cubos, e triturada em pequenas partículas, assumindo aparência de massa moída. O creme obtido no processo do desnate (1 L de creme para 1 kg de massa) e o sal (1,5%), são adicionados à massa moída, e submetidos a tratamento térmico (80 °C, 20 min) para a filagem e obtenção da consistência adequada (FIGUEIRAS; QUADROS,

2002; FIGUEIREDO *et al.*, 2011). Em seguida, a massa fundida é distribuída em embalagens plásticas de 200 g e 400 g, e resfriada à temperatura ambiente (30 °C), podendo ser consumido após a produção. Deve ser armazenado, transportado, distribuído e comercializado em refrigeração ou em temperatura ambiente, conforme condições preconizadas no protocolo de Boas Práticas de Fabricação dos queijos do Marajó (PARA, 2013).

#### **4.3.2 Queijo Manteiga**

O queijo Manteiga, desde o início da sua produção até a atualidade, é produzido principalmente nas comunidades do município de Cachoeira do Arari (FINOTELLO, 1981; LOURENÇO, 2002), onde a produção leiteira bubalina é considerada como a principal atividade econômica, em razão da presença natural dos campos marajoaras para a criação dos rebanhos. Apesar da grande produção da matéria-prima, os queijos são produzidos em pequena escala por algumas famílias, cuja produção média, na entressafra, não passa de 5 kg/dia. Utilizam tecnologias rudimentares e infra-estrutura inadequada para o processamento e a comercialização do produto (BLASKOVSKY *et al.*, 2010). Para a produção de 1 kg de queijo manteiga utiliza-se cerca de 7 litros de leite de búfala.

No processo de elaboração do queijo Manteiga, apresentado na Figura 3, o leite de búfala cru é submetido ao processo de fermentação espontânea, à temperatura ambiente (30 °C), durante um período próximo a 24 horas.

Após, o creme fermentado da superfície é retirado para a produção da manteiga. A quebra da massa é realizada manualmente, sendo esta massa colocada em sacos de algodão para a retirada do soro, por cerca de 8 horas. Peneiras de fibra vegetal auxiliam no processo de prensagem para a retirada do soro. A massa dessorada é submetida a lavagens sucessivas com água (2 L de água para 1 kg de massa), em aquecimento (70 °C, 15 min), para diminuir a acidez, sendo que a última lavagem em aquecimento (70 °C, 15 min) é realizada com leite de búfalo cru integral (2 L de leite para 1 kg de massa), para a incorporação de sólidos solúveis.

A massa, que antes estava fragmentada, fica unida, formando um bloco homogêneo, brilhoso e sem caroços, adquire consistência e passa a agregar as partes sólidas do leite, aumentando o volume. Novamente, como nas demais lavagens a massa é colocada sobre uma peneira e enxugada com o uso de panos de algodão. A seguir, a

massa obtida é levada ao tacho para “fritar” com a manteiga previamente preparada com o creme fermentado, juntamente com o sal (1,5%), até adquirir a consistência desejada, é a filagem do queijo. Tradicionalmente, o queijo Manteiga foi enformado em formas de madeira forradas com papel manteiga, mas, atualmente, estão sendo substituídas pelas formas de plástico de 200 g e 400 g. Como o queijo Creme, pode ser consumido imediatamente após a produção (FIGUEIRAS; QUADROS, 2002; VIEIRA *et al.*, 2005). Os queijos devem ser armazenados, transportados, distribuídos e comercializados em refrigeração ou em temperatura ambiente, conforme condições preconizadas no protocolo de BPF (PARA, 2013).

#### 4.4. Referências Bibliográficas

ABD EL-SALAM, M. H.; EL-SHIBINY, S. A comprehensive review on the composition and properties of buffalo milk. *Dairy Science & Technology*, v. 91, p. 663-699, 2011.

ABD EL-SALAM, M. H.; EL-SHIBINY, S. Bioactive peptides of buffalo, camel, goat, sheep, mare, and yak milk and milk products. *Food Reviews International*, v. 29, n. 1, p. 1-23, 2013.

AGYEI, D.; DANQUAH, K. Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. *Biotechnology Advances*, v. 29, p.272-277, 2011.

AMARAL, F. R. *Fatores que interferem na contagem de células somáticas e constituintes do leite de búfalas*. 2005. 46 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) –Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

AMARAL, F. R.; ESCRIVÃO, S. C. Aspectos relacionados ao leite de búfala. *Revista Brasileira Reprodução Animal*, v. 29, p.111-117, 2005.

ARAÚJO, T. P. M. *et al.* Influência das estações do ano sobre a composição do leite de búfalas mantido em tanque de resfriamento. *ACSA – Agropecuária Científica no Semi-Árido*, v.7, p.1-5, 2011.

ARAUJO, K. B. S. *et al.* 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 of Animal Science*, v. 11, p. 87-91, 2012.

ARIAN, H. H.; KHASKHALI, M.; ARIAN, M. A.; SOOMRO, A. H.; NIZAMANI, A. H. Heat stability and quality characteristics of postpartum buffalo milk. *Pakistan Journal of Nutrition*, v. 7, p. 303-307, 2008.

ATLAS GEOGRÁFICO DO BRASIL. *Melhoramentos*. Disponível em:<<http://biblioteca.uol.com.br/atlas/tabelas/estadareapop.htm>>. Acesso em : 21 maio 2012.

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, n. 1, p. 49-52, 2005.

BARBOSA, N. G. S. Bubalinocultura no estado do Pará. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 29, p. 34-38, 2005.

BARBOSA, N. G. S. *Torta de amêndoa de dendê: consumo, digestibilidade, metabolismo ruminal e desempenho leiteiro em bubalinos*. 2010. 176 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, 2010.

BERNARDES, O. Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 31, n. 3, p. 292-298, 2007.  
BLASKOVSKY, C.; CALDAS, R. L.; SILVA, I. M.; MAIA, J. C. Avaliação primária da infra-estrutura para implementação de indústria de beneficiamento de queijo do Marajó no município de Cachoeira do Arari, PA. *Revista INGEPRO*, v. 2, p. 53-59, 2010.

BRAMANTI, E.; SORTINO, C. H.; ONOR, M.; BENI, F.; RASPI, G. Separation and determination of denatured  $\alpha$ s1-,  $\alpha$ s2-,  $\beta$  and  $\kappa$ -caseins by hydrophobic interaction chromatography in cow's, ewes and goats' milk mixture and cheeses. *Journal of Chromatography A*, v. 994, p. 59-74, 2003.

BRASIL, M. C. Marajó: em busca da sobrevivência. *Textos IESAM*, Belém, Pará, n. 7, p. 80, 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. *Instrução Normativa nº 51, de 22 de setembro 2002. Regulamento técnico de identidade e qualidade do leite cru refrigerado*. Brasília: Ministério da Agricultura, 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde – ANVISA. *Resolução RDC nº 2, de 7 de janeiro de 2002. Regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional e ou de saúde*. Brasília: ANVISA, 2002.

BRASIL. *Plano de desenvolvimento sustentável do arquipélago territorial do Marajó*. Disponível em: <<http://www.sudam.gov.br/Adagenor/PRDA/PlanoMarajo/07.pdf>, 2007Marajo/07\_0035\_FL.pdf, 2007>. Acesso: 11 dez. 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/desenvolvimento-sustentavel/indicacao-geografica>, 2011>. Acesso em: 11 mar. 2013.

DE FRANCISCIS, G.; DI PALO, R. Buffalo milk production. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 4., 1994, São Paulo, SP. *Proceedings...* São Paulo: Associação Brasileira de Criadores de Búfalos, 1994. p. 137-145.

DIAS, S. S. *Avaliação da qualidade de derivados de leite de Búfala encontrados no varejo do Rio de Janeiro*. 2009. 58 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2009.

DZIUBA, B; DZIUBA, M. Milk proteins-derived bioactive peptides in dairy products: Molecular, biological and methodological aspects. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, v. 13, p. 2-25, 2014.

DUARTE, J. M. C. 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 Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, Juiz de Fora, v. 56, n. 5, p. 16-19, 2001.

FAO. Food Quality and Standard Services (AGNS). *Report on functional foods*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2007.

FAO. Food and Agriculture Organization. *Agriculture data*. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/home/index.html#download>>. 2013. Acesso em: 8 maio 2013.

FERNANDES, S. A. A. *Levantamento exploratório da produção, composição e perfil de ácidos graxos do leite de búfalas em cinco fazendas do estado de São Paulo, Piracicaba, SP*. 2004. 84 f. Tese (Doutorado em Agronomia), Área de concentração: Ciência Animal e Pastagens, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo, 2004.

FIGUEIRAS, A.; QUADROS, M. Queijo Marajó: Começa a fase industrial. *Revista Agroamazônia*, Belém, v. 3, p. 36-37, 2002.

FIGUEIREDO, L. E.; LOURENÇO JUNIOR, J. B.; TORO, M. A.; LIMA, S. C. G. Queijo do “Marajó” tipo creme: parâmetros físico-químicos e sensoriais. *Revista Instituto de Laticínio Cândido Tostes*, v. 66, n. 378, p. 26-33, 2011.

FINOTELO, Nemer Alfredo. *Melhoramento na tecnologia, produção e conservação do queijo marajoara*. 1981. 113 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos e Agrícola) – Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 1981.

FONSECA, L. F. L.; SNATOS; M. V.; PEREIRA, C. C. Qualidade higiênica do Leite: efeito sobre a qualidade dos produtos lácteos e estratégias de controle. In: VILELA *et al.* (Ed.). *Sustentabilidade da pecuária de leite no Brasil: qualidade e segurança alimentar*. Goiânia: CNPq, Serrana Nutrição Animal. Juiz de fora: Embrapa Gado de Leite, 2001.p. 141-161.

GALVÃO, J. G. B.; RANGEL, A. H. N.; MEDEIROS, H. R.; SILVA, J. B.; AGUIAR, E. M.; MADRUGA, R. C.; LIMA JÚNIOR, D. M. Efeito da produção diária e da ordem de parto na composição físico-química do leite de vacas de raças zebuínas. *Acta Veterinária Brasília*, v. 4, p. 25-30, 2010.

GARCIA, C.; NORBERT, W.; LUTZ, B. C.; SYLVIANE CONFORT-GOUNY, B. C., PATRICK, J.; COZZONE MARTINE ARMAND, A.; BERNAR, M. Phospholipid fingerprints of milk from different mammals determined by <sup>31</sup>P NMR: Towards specific interest in human health. *Food Chemistry*, v. 135, p. 1777-1783, 2012.

GANGULI, N. C. Tecnología de la leche de búfala. *Revista Mundo da Zootecnia*, v. 30, p. 2-10, 1979.

GAUTHIER, S. F.; POULIOT, Y.; SAINT-SAUVEUR, D. Immunomodulatory peptides obtained by the enzymatic hydrolysis of whey proteins. *International Dairy Journal*, v. 16, n. 11, p.1315-132, 2006.

- GOBBETTI, M.; MINERVINI, F.; RIZZELLO, C. G. Bioactive peptides in dairy products. In: HUI, Y. H. (Ed.). *Handbook of food products manufacturing*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2007.p. 489-517.
- HARTMANN, R.; MEISEL, H. Caseinophosphopeptides and their cell modulating potential. *Biofactors*, v. 21, p. 73-78, 2004.
- HARTMANN, R.; MEISEL, H. Food-derived peptides with biological activity: From research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 18, p. 163-169, 2007.
- HÜHN, S.; LOURENÇO JUNIOR, J. B.; MOURA CARVALHO, L. O. D.; NASCIMENTO, C. N. B.; VIEIRA, L. C. Aproveitamento do leite de búfala em produtos derivados. In: SIMPÓSIO DO TRÓPICO ÚMIDO, 1., 1984, Belém. *Anais...* Belém: EMBRAPA-CPATU, v. 5, n. 36, p. 265-269, 1984.
- IMRAN, M.; KHAN, H.; HASSAN, S. S.; KHAN, R. Physicochemical characteristics of various milk samples available in Pakistan. *Journal of Zhejiang University Science B*, v. 9, n. 7, p. 546.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. *Pesquisa da Pecuária Municipal* – Pesquisa da Pecuária Municipal, 2010.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA- IBGE. *Pesquisa da Pecuária Municipal* – Pesquisa da Pecuária Municipal, 2012.
- INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA - INMET. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/>>. Acesso em: 1<sup>o</sup> nov. 2012.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION - IDF MILK. *Bulletin of the IDF No. 446/2010*. The world Dairy Situation 2010. Buffalo milk, 2010.p. 8-9.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION – IDF MILK. *The world dairy situation*, 2012.Brussels, Belgium:International Dairy Federation, (Bulletin No. 458).
- JORGE, A. M.; COUTO, A. G.; CRUDEL, G. A.; PAT ÑO, E.M. *Produção de búfalas de leite*. Botucatu: FEPAF, 2011. 181 p.
- KAMOU, S. M.; LU, R.; CHEN, W.; LIU, X.; TIAN, F.; SHEN, Y.; GAO, T. Functional significance of bioactive peptides derived from milk proteins. *Food Reviews International*, v. 26, p. 386-401, 2010a.
- KAMOU, S. M.; CHEISON, S. C.; CHEN, W.; LIU, X. M.; LU, R-R. Alpha-lactalbumin, its production technologies and bioactive peptides. *Comprehensivy Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 9, p. 197-212, 2010b.
- KANAWJIA, S. K.; SINGH, S. Effect of setting time of milk on biochemical and sensory characteristics of buffalo milk Cheddar cheese. *Japanese Journal of Dairy and Food Science*, v. 42, p. A13-19, 1993.

KORHONEN, H.; PIHLANTO, A. Bioactive peptides, production and functionality. *International Dairy Journal*, v. 16, p. 945-960, 2006.

LIMA, A. M. M.; OLIVEIRA, L. L.; FONTINHAS, R. L.; LIMA, R. J. S. Ilha do Marajó. Revisão histórica, hidroclimatologia, bacias hidrográficas e proposta de gestão. *Holos Environment*, v. 5, n. 1, p. 65-80, 2005.

LONNERDAL, B. Biochemistry and physiological function of human milk proteins. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 42, p. 1299-1317, 1985.

LOURENÇO, L. F. H.; SIMÃO NETO, M.; LOURENÇO JÚNIOR, J. B. Análise microbiológica do requeijão Marajoara elaborado no norte do Brasil. *Revista Higiene Alimentar*, v. 16, p. 55-59, 2002.

MADILLA-OLIVEIRA, A. F.; QUIRINO, C. R.; ADONA, P. R.; PACHECO, A. Aspectos da comercialização de carne e leite de bubalinos na região Norte Fluminense. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, MG, v. 29, n. 1, p. 53-54, 2005.

MARQUES, J. R. F.; CAMARGO JUNIOR, R. N. C.; MARQUES, L. C.; RODRIGUES, A. E. A bubalinocultura no Brasil: criação, melhoramento e perspectivas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 16., 2006, Recife, PE. *Palestras...Recife: 2006. Zootecnia, 2006.CD-Rom.*

MATOS, B. C. Aspectos qualitativos do leite bubalino. *PUBVET*, v. 1, n. 9, ed. 9, Art. 166, 2007.

MEDHAMMAR, E.; BETTONI, R. W.; STADLMAYR, B.; NILSSON, E.; CHARRONDINE, U. R.; BURLINGAME, B. Composition of milk from minor dairy animals and buffalo breeds: a biodiversity perspective. *Journal of Science Agriculture*, v. 92, p. 445- 474, 2012.

MELÍCIO, S. P. L. *Características do leite de búfala da raça Murrah na região de São Carlos*. 2004. 47 f. Dissertação (Mestre em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. UNESP, Jaboticabal, 2004.

MESQUITA, A. J.; TANEZINI C. A.; FONTES M. I.; PONTES, I. S.; ROCHA, J. M.; SOUZA, J. T.; D’ALESSANDRO, W. T. *Qualidade físico-química e microbiológica do leite cru bubalino*. Goiânia: Universidade Federal de Goiás/CEGRAF, 2001. 77p.

MILLS, S.; ROSS, R. P.; HILL, C.; FITZGERALD, G. F.; STANTON, C. Milk intelligence: Mining milk for bioactive substances associated with human health. *International Dairy Journal*, v. 21, p. 377-401, 2011.

MIRANDA NETO, M. J. *Marajó:Desafio da Amazônia* – aspectos da reação a modelos exógenos de desenvolvimento. Belém: EDUFPA, 2005. 218 p.

NIKKHAH, A. Equidae, camel and yak milks as functional foods: A review. *Nutrition and Food Science*, v. 1, n. 5, p. 1-5, 2011.

OLIVIERI, D. A. *Avaliação da qualidade microbiológica de amostras de mercado de queijo mussarela, elaborado a partir de leite de búfala (Bubalus bubalis)*. 2004. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

QUIAN, B.; XING, M.; CUI, L.; DENG, Y.; XU, Y.; HUANG, M.; ZHANG, S. Antioxidant, antihypertensive and immunomodulatory activities of peptide fractions from fermented skim milk with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* LB340. *Journal of Dairy Research*, v. 78, n. 1, p. 2-9, 2011.

PANDYA, A. J.; KHAN, M. M. H. Buffalo milk. In: PARK, Y. W.; HAENLEIN, G. F. W. (Ed.). *Handbook of milk of non - bovine mammals*. Ames, Iowa:Blackwell Publishing Professional, 2006. p. 195-273.

PANDYA, A. J.; HAENLEIN, G. F. W. Bioactive components in buffalo milk. In: PARK, Y. (Ed.). *Bioactive components in milk and dairy products*. Ames: Wiley-Blackwell, 1. ed., 2009. 426 p.

PARA. Lei nº 7.565, de 25 de outubro de 2011. *Dispõe sobre normas para licenciamento de estabelecimentos processadores, registro e comercialização de produtos artesanais comestíveis de origem animal e vegetal no estado do Pará*. Disponível em: <<http://www.sepaq.pa.gov.br/?q=node/278>>. Acesso em: 8 maio 2010.

PARA. Agência Estadual de Defesa Agropecuária do estado do Pará – ADEPARÁ. Aprova o Regulamento Técnico para a Produção do Queijo do Marajó. Portaria nº 418, de 4 de março de 2013 (Estadual - Pará). **Diário Oficial de 6 de março de 2013**.

PINHEIRO, C. P.; BOMJARDIM, H. A.; ANDRADE, S. J. T.; FAIAL, K. C. F.; OLIVEIRA C. M. C.; BARBOSA, J. D. Níveis de fósforo, cobre, cobalto e zinco em bubalinos (*Bubalus bubalis*) na Ilha de Marajó, estado do Pará. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 31, n. 3, p.193-198, 2011.

POLO, E. Produção de leite de búfalas cresce para atender indústrias. *Diário do Comércio e Indústria. São Paulo, SP, 2008*. Disponível em: <<http://www.zoonews.com.br/noticiax.php?idnoticia=145602>>.

PUJOL, D. *A organização colectiva de uma fileira para a valorização local dos recursos agrícolas: O exemplo da produção de queijo*. Inovação em Meio Rural. Observatório Europeu Leader, 1997. 31 p.

PURI, B. R.; NARIAN, H.; JOSHI, U.; VERMA, K. S. Heat stability of buffalo milk in relation to compositionalfactors. *Indian Journal Dairy Science*, v. 30, p. 24-26, 1977.

RANGEL, A. H. N. *et al.* Influência do estágio de lactação sobre a composição do leite de búfala. *Acta Veterinaria Brasilica*, v. 5, n. 3, p. 306-310, 2011.

RICCI, I.; ARTACHO, R.; OLALLA, M. Milk protein-peptides with angiotension I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 50, p. 390-402, 2010.

RIGUEIRA, J. C. S. *Desenvolvimento de metodologia analítica para detecção de adulteração pela adição de leite em pó e leite fluído*. 2006. 58 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 2006.

RUBINO, R.; MOIOLI, B.; FEDELE, V. *et al.* Milk production of goats grazing native pasture under different supplementation regimes in southern Italy. *Small Ruminants Research*, v. 17, n. 3, p. 213-221, 1995.

SAGUZA-CARPOS, M.; CHEL-GUENEZO, L.; BETANCAZ-ANCONA, D.; HORNANDEZ-ESCELANTA, V. Bioavailability of bioactive peptides. *Food Reviews International*, v. 27, p. 213-226, 2011.

SEBRAE. Serviço Brasileiro de Apoio à Micro e Pequenas Empresas. Disponível: <[www.pa.agenciasebrae.com.br/noticia\\_pdf.kmf?cod=19915677](http://www.pa.agenciasebrae.com.br/noticia_pdf.kmf?cod=19915677)>.. Acesso em: 8 mar. 2013.

SHARMA, R.; KAUR, S.; RAJPUT, Y.S.; KUMAR, R. Activity and thermal stability of indigenous enzymes in cow, buffalo and goat milk. *Milchwissenschaft*, v. 64, p. 173-175, 2009.

SILVA, V. R.; OLIVEIRA, V. L. *O queijo do Marajó tipo “creme” derivado do leite de búfala: Uma alternativa para o desenvolvimento sustentável do agronegócio no Município de Soure*. 2003. 70 f. Monografia de Especialização em Empreendedorismo Rural e Desenvolvimento Sustentável, Universidade do estado do Pará, Belém, 2003.

SIMÕES, M. G.; DOMINGUES, A. F. N.; MACIEL, L. P.; RABELO, J. G.; OLIVEIRA, E. B.; FERREIRA, C. L. L. F. Effect of bovine milk addition in different characteristics of artisanal cream cheese from Marajó, elaborated with buffalo milk. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Toste*, v. 68, p. 32-40, 2013.

SODI, S. S.; MEHRA, M. L.; JAIN, A. K.; TREHAN, P. K. Effect of non-genetic factors on the composition of milk of Murrah buffaloes. *Indian Veterinary Journal*, v. 85, p. 950-952, 2008.

TALPUR, F. N. *Fatty acid composition of ruminant milk, meat and dairy products of livestock in Sindh, Pakistan*. 2007. Ph. D. Thesis, University of Sindh, Jamshoro, Pakistan, 2007.

TAVARES, T. G.; CONTRERAS, M. M.; AMORIM, M.; MARTIN-AVAREZ, P. J.; PINTADO, M. E.; RECIO, I.; MALCATA, F. X. Optimisation, by response surface methodology, of degree of hydrolysis and ACE-inhibitory activities of whey protein hydrolysates obtained with cardoon extract. *International Dairy Journal*, v. 21, p. 926-933, 2011a.

TAVARES, T. G.; MONTERIO, K. M.; POSSENTI, A.; PINTADO, M. E.; CARVALHO, J. E.; MALCATA, F. X. Antiulcerogenic activity of peptide concentrates obtained from hydrolysis of whey proteins by proteases from *cynara cardunculus*. *International Dairy Journal*, v. 21, p. 926-933, 2011b.

TAVARES, T. G.; AMORIM, M.; GOMES, D.; PINTADO, M. E.; PEREIRA, C. D.; MALCATA, F. X. Manufacture of bioactive peptide-rich concentrates from Whey: Characterization of pilot process. *Journal of Food Engineering*, v. 110, p. 547-552, 2012.

TEIXEIRA, L. V.; BASTIANETTO, E.; OLIVEIRA, D. A. A. Leite de búfala na indústria de produtos lácteos. *Revista Brasileira Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 29, n. 2, p. 96-100, 2005.

TUFARELLI, V.; DARIO, M.; LAUDADIO, V. Diet composition and milk characteristics of Mediterranean water buffaloes reared in South Eastern Italy during spring season. *Livestock Research for Rural Development*, v. 20, n. 10, p. 1-7, 2008.

USDA, USDA National Nutrient Database for Standard Reference, 2009. Disponível em: <<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>>.

VALE, W. G. *et al.* Arrested development of the mesonephric ducts in a Murrah buffalo bull. In: BUFFALO SYMPOSIUM OF AMERICAS, v. 1, 2002 Belém, PA. *Proceedings...* Belém, 2002, p. 479-81.

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

VIEIRA, L. C.; LOURENÇO JÚNIOR, J. B.; ALVES, O. S.; MONTEIRO, E. M. M.; SANTOS, N. F. A. Produção de requeijão Marajoara de leite de búfala. ZOOTEC'2005 - 24 a 27 de maio de 2005. *Anais...*, Campo Grande, MS, 2005

ZANELA, M. B.; KOLLING, G. J.; FERNANDES, V. N. V.; RIBEIRO, M. E. R.; CANELLAS, L. C. C.; YAMADA, M.; PEREIRA, K. P. Características físicas e instabilidade ao álcool do leite de búfala. In: CONFERENCIA INTERNACIONAL SOBRE LECHE INESTABLE, 2., 2011, Colonia. *Anais...* Colonia: Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria de Uruguay, 2011. p. 56.

ZICARELLI, L. Influência de fatores ambientais sobre as características reprodutivas de búfalos do rio (*Bubalus bubalis*). *Revista de Ciências Agrárias*, v. 45, p.1-13, 2010.

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1. Local do Estudo**

Esta pesquisa foi realizada na ilha do Marajó, nos municípios, Salvaterra, Soure e Cachoeira do Arari, região do Arari. A escolha por estes municípios foi embasada em levantamentos de campo previamente realizados os quais mostraram que, nestas comunidades, existem, atualmente, cerca de 25 propriedades ativas, envolvidas na fabricação dos queijos artesanais do Marajó elaborados com leite de búfala cru, ou com a mistura deste leite com o leite bovino, o que torna estes municípios os maiores centros produtores destes queijos no estado do Pará. Visitas à região contribuíram para a definição da amostragem, uma vez que do universo das propriedades produtoras, somente 18 são passíveis de livre acesso nas duas estações do ano. Os queijos Creme e Manteiga, elaborados com a mistura de leite de búfala com leite de vaca foram manufaturados em propriedades produtoras, respectivamente, em Soure e Cachoeira do Arari.

### **5.2. Coleta das Amostras**

As amostras de leite cru e dos queijos, para as análises físico-químicas e microbiológicas, foram coletadas diretamente nas propriedades produtoras dos três municípios da região do Arari, as de queijo Creme nos municípios de Soure e Salvaterra e as do queijo Manteiga em Cachoeira do Arari, nas estações, das chuvas e da seca. Amostras individuais de queijos (500g) foram coletadas em suas embalagens originais, e as de leite cru em sacos plásticos estéreis, todas mantidas refrigeradas em caixa de isopor contendo gelo reciclável até o momento da realização das análises físico-químicas no Laboratório Nacional Agropecuário, LANAGRO – Belém, e das análises

microbiológicas e identificação de materiais estranhos no Laboratório Central do estado do Pará (LACEN).

Para a análise de contagem de células somáticas – CCS, as amostras de leite cru foram coletadas de acordo com as normas da Rede Brasileira de Laboratório de Controle de Qualidade do Leite (MARTINS *et al.*, 2008), em frascos (40mL) contendo o conservante bromopol (8mg), acondicionados em caixas de isopor contendo gelo reciclável e mantidas em refrigeração durante o transporte para o Laboratório de Controle de Qualidade do Leite – LQL, situado em Goiânia.

### **5.3. Elaboração das formulações dos queijos Creme e Manteiga**

Neste estudo, formulações do queijo Creme e do queijo Manteiga foram elaboradas com leite de búfala cru e com a adição de leite de vaca cru ao leite de búfala cru, em três diferentes concentrações. As formulações do queijo Creme foram processadas em queijaria situada no município de Soure, e as do queijo Manteiga, em Cachoeira do Arari. Os leites foram provenientes das mesmas propriedades rurais. Quatro diferentes formulações foram elaboradas para cada um dos dois tipos de queijo, Creme (C) e Manteiga (M): C<sub>100</sub>/M<sub>100</sub> (100% leite de búfala); C<sub>80</sub>/M<sub>80</sub> (80% leite de búfala + 20% leite de vaca); C<sub>70</sub>/M<sub>70</sub> (70% leite de búfala + 30% leite de vaca) e C<sub>60</sub>/M<sub>60</sub> (60% leite de búfala + 40% leite de vaca). Todas as formulações foram elaboradas, de acordo com o fluxograma da Figura 3, em triplicata. Uma amostra aleatória de cada formulação, de cada um dos queijos, foi selecionada e mantida em refrigeração (7 °C - 8 °C) até a realização das análises.

### **5.4. Análises físico-químicas do leite de búfala cru e dos queijos Creme e Manteiga**

As determinações da acidez titulável, umidade, resíduo mineral fixo, proteína, gordura, extrato seco, cloretos e cálcio foram realizadas segundo os métodos oficiais descritos na Instrução Normativa nº 68, Métodos Analíticos Oficiais, Físico-Químicos, para controle de leite e produtos lácteos, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), de 12 de dezembro de 2006 (BRASIL,2006).

#### **- Determinação da acidez titulável**

A acidez foi determinada por meio da titulação das amostras de leite de búfala e das amostras de queijos, preparadas com 10g de queijo e 50 mL de água, com solução padronizada de NaOH 0,1 mol/L, sendo a acidez expressa em porcentagem de ácido láctico.

#### **- Determinação da umidade**

Foi utilizado o método gravimétrico, definido pela perda de massa da amostra, porsecagem em estufa a  $105 \pm 2$  °C, até massa constante.

#### **- Determinação do resíduo mineral fixo**

O conteúdo de cinzas (% m/v) foi determinado pelo método gravimétrico após carbonização e incineração da matéria orgânica das amostras de leite e de queijos, em forno mufla a  $550 \pm 10$ °C.

#### **- Determinação do extrato seco**

O extrato seco foi realizado pelo método gravimétrico, que consiste na perda da umidade e de voláteis por dessecação e pesagem do resíduo assim obtido. Para a determinação da porcentagem de extrato seco desengordurado, subtrair a porcentagem de gordura da amostra.

#### **- Determinação da gordura**

O conteúdo de gordurapresente no leite de búfala foi determinado diretamente no butirômetro de Gerber, que se baseia na quebra da emulsão do leite pela adição de ácido sulfúrico e álcool isoamílico, com posterior centrifugação e determinação do teor de gordura. Para a deteminação da gordura nos queijos, o método Mojonnier, que mede componentes solúveis em éter e insolúveis em álcali diluído, foi empregado.

#### **- Determinação dos cloretos**

O conteúdo de cloretos nos queijos foi determinado por argentimetria imediatamente após a análise de cinzas, na qual se adicionou ácido nítrico, carbonato de cálcio e solução de dicromato de potássio (5 %). Titulou-se com solução padronizada de nitrato de prata (0,1mol/L) e calculou-se a porcentagem de cloreto de sódio na amostra.

#### **- Determinação do cálcio**

A determinação do conteúdo do cálcionos queijos foi realizada por complexometria (EDTA).

#### **- Determinação da densidade do leite a 15°C**

A determinação da densidade do leite de búfala cru foi realizada diretamente, com o auxílio do Termolactodensímetro, marca Incoterm, modelo 5784, Porto Alegre, RS, Brazil, pela introdução direta do equipamento na amostra de leite.

#### **- Determinação do índice crioscópico do leite**

A determinação do índice crioscópico do leite de búfala cru foi efetuado com Crioscópio eletrônico MicroLak, marca Entelbra, Santa Catarina, SC, Brazil, de acordo com as instruções do equipamento.

#### **- Determinação da Contagem de Células Somáticas (CCS)**

A contagem de células somáticas (CCS) do leite de búfala cru foi realizada pelo método de citometria de fluxo, em equipamento automatizado (Bentley Somacount 300) de acordo com a Federação Internacional de Laticínios (IDF, 2006).

#### **- Determinação do pH**

A determinação do potencial hidrogeniônico do leite de búfala cru e dos queijos foram realizadas por meio da leitura direta em potênciometro (marca Metrohn Pensalab

Instrumentação Analítica Ltda, São Paulo, SP, Brazil), por meio da introdução do eletrodo na amostra de leite e no extrato aquoso dos queijos.

#### **- Determinação da atividade de água (AW)**

A determinação da AW dos queijos foi realizada com medidor digital modelo AW43 – Etec, São Paulo, SP, Brasil, de acordo com as instruções do equipamento.

#### **- Determinação da gordura no extrato seco**

A determinação do teor de gordura no extrato seco dos queijos foi realizada de modo indireto, por meio da razão entre o teor de gordura e o teor de extrato seco total dos queijos (PEREIRA *et al.*, 2001).

#### **- Determinação do nitrogênio total e proteína total**

A análise de nitrogênio total foi determinada pelo método de Kjeldhal, segundo a técnica descrita pela International Dairy Federation 20b (IDF-FIL, 1993). A proteína total, foi determinada por método indireto, multiplicando-se o nitrogênio total pelo fator 6,38, valor indicado para a proteína derivada do leite (SILVA; QUEIROZ, 2005).

#### **- Identificação de materiais estranhos**

A identificação de materiais estranhos nos queijos foi determinada por meio de microscopia. Foi empregada a técnica da hidrólise ácida das amostras, seguida de filtração descrita pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2012).

Todas as análises foram realizadas em duplicatas.

### **5.5. Análises microbiológicas do leite de búfala cru e dos queijos Creme e Manteiga**

As determinações microbiológicas foram realizadas seguindo a legislação vigente, em atenção às normas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, Instrução Normativa, MAPA SDA 062/20, com modificações. Na pesquisa de *Listeria monocytogenes* utilizou-se o método rápido TECRATM *Listeria* Visual Immunoassay<sup>®</sup>. Os plaqueamentos foram realizados em duplicatas.

#### **- Preparo e diluições das amostras**

Utilizando-se as técnicas de higiene, foram retirados 25 g de cada amostra de queijo e 25 mL de leite de búfala. Em cada porção, fez-se a homogeneização com 225 mL de solução salina peptonada (0,1%), por aproximadamente dois minutos, em homogeneizador Stomacher. Foram realizadas diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ .

#### **- Contagem de bactérias aeróbias mesófilas(UFC/mL)**

Empregou-se o método de Contagem-padrão em Placas, que consiste na semeadura em meio Agar Padrão. A semeadura foi realizada na superfície do meio de cultura, em placas de Petri estéril, as quais foram incubadas invertidas, em temperatura de 37 °C, por 24 a 48 horas.

#### **- Contagem de Bolores e Leveduras(UFC/g)**

Os fungos filamentosos e leveduras foram determinados empregando-se a técnica *Spread Plate* (plaqueamento em superfície) em placas de Petri contendo Potato Dextrose Agar (PDA), acidificado com 1% de ácido tartárico 10% (pH 3,5), seguida de incubação a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  por 3 a 5 dias.

#### **-Coliformes a 35 °C e Coliformes a 45 °C(NMP/mL)**

A determinação de coliformes 35 °C e Coliformes 45 °C foi realizada pela técnica dos tubos múltiplos, com três séries de três tubos ( $10^{-1}$ , 1 e 10). Empregou-se, como meio presuntivo, o Caldo Lauril Sulfato Triptose, com incubação a 35°C, durante 48 horas. Após leitura, os tubos positivos (que apresentavam gás) foram repicados para Caldo Verde Brilhante bile, a 2% de lactose, incubados a temperatura de 35°C, por 24 horas a 48 h, para confirmação da presença de coliformes totais. Posteriormente, foram repicados para “Caldo EC”, incubados a temperatura de 45°C, em banho-maria, com agitação, por 24 h a 48 h, para a prova confirmativa de coliformes a 45 °C.

#### **- Contagem de *Staphylococcus aureus* (UFC/g)**

Utilizaram-se alíquotas de 0,1 mL das diluições  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  das amostras, as quais foram inoculadas, em duplicatas, na superfície do meio Agar Baird-Parker, enriquecido com gema de ovo e telurito. As placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas a 48 h, a 35 °C. Após o período de incubação foram selecionadas colônias típicas: negras circundadas por halo transparente. A partir destas colônias foi realizada a prova bioquímica de coagulase.

#### **-Pesquisa de *Salmonella* sp**

A suspensão inicial (diluição de  $10^{-1}$ ) foi preparada com 25 mL de leite ou 25 g de queijo, em 225 mL de água peptonada tamponada. Após a incubação, a 35 °C, por 24 horas, 1 mL dessa suspensão foi transferida para 100 mL de caldo selenito-cistina e 1 mL para 10 mL de caldo tetracionato e incubados a 42 °C, por 24 horas. Após esse período, foram realizadas semeaduras, por esgotamento, em placas de Petri, contendo agar SS (*Salmonella-Shigella*) e agar Hectoen. A incubação foi realizada a 35°C, por 24 horas. As colônias suspeitas foram confirmadas, pelos testes bioquímicos (TSI, LIA, caldo uréia, meio IAL, caldo malonato fenilalanina) e sorológicos (soro O e H polivalente).

#### **- Pesquisa de *Listeria monocytogenes***

Na pesquisa utilizou-se o kit TECRA TML *Listeria* Visual Immunoassay® (Hexis Científica), de acordo com as recomendações do fabricante.

### **5.6. Análise do perfil de textura (TPA) das formulações dos queijos Creme e Manteiga**

A textura dos queijos Creme e Manteiga, elaborados com leite de búfala e com a mistura de três diferentes concentrações de leite de vaca foram avaliadas dois dias após a elaboração das formulações, utilizando-se um texturômetro Stable Micro Systems, modelo TA.XT Plus (Surrey, Inglaterra) com o dobro do ciclo de compressão, equipado com carga de célula de 25 kg. Amostras cilíndricas com diâmetro e altura iguais a 20 mm foram retiradas de pontos aleatórios dos queijos, de modo a se obter amostras uniformes e homogêneas, e mantidas à temperatura ambiente (21 °C). O perfil de textura

foi obtido por teste de dupla compressão dos cilindros de queijos, à temperatura ambiente, utilizando uma sonda de compressão cilíndrica com 75 mm de diâmetro (P75). A compressão foi realizada à velocidade constante de 2,0 mm.s<sup>-1</sup> e com força de contato igual a 5 g, até que a altura da amostra reduzisse a 10 mm (ou seja, 50% de sua altura inicial). Os dados foram obtidos através do *software* Texture Expert for Windows - versão 1.20 (Stable Micro System). As análises foram realizadas em cinco replicatas, na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Amazônia Oriental.

### **5.7. Medida da cor das formulações dos queijos Creme e Manteiga**

Dois dias após a elaboração das formulações, os parâmetros de cor dos queijos Creme e Manteiga, foram avaliados à temperatura de 23 °C, utilizando-se um colorímetro Hunter Lab, modelo ColorQuest XE (Reston, EUA), conforme as definições propostas pela Commission Internationale de l'Éclairage (CIE, 1986). O valor L\* representa a luminosidade e indica quão claro ou escuro é o produto, variando de zero (totalmente preto) a 100 (totalmente branco). A coordenada de cromaticidade a\* é um indicador de verde (-) e vermelho (+), ao passo que b\* é um indicador de azul (-) e amarelo (+). Os valores a\* e b\* foram usados para calcular Hue (h°), ângulo de tonalidade ou cor e Chroma (C\*) que descreve a intensidade de uma tonalidade (cromaticidade ou saturação da cor), usando-se as seguintes fórmulas:  $h = \tan^{-1}(b^*/a^*)$  e  $C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$ , respectivamente. As medições foram realizadas em triplicata, com o aparelho calibrado, utilizando-se dez amostras, cinco da parte central e cinco da parte periférica dos queijos de cada formulação (PATHARE *et al.*, 2012).

### **5.8. Análise Sensorial das formulações dos queijos Creme e Manteiga**

Os testes de aceitação sensorial e de intenção de compra (REIS; MININ, 2006) das formulações dos queijos Creme e Manteiga, elaborados com leite de búfala e com a mistura de três diferentes concentrações de leite de vaca foram realizados três dias após a elaboração, por 50 provadores não treinados, 30 do sexo feminino e 20 do sexo masculino, com idades acima de 18 anos, incluindo pesquisadores, estagiários, estudantes, técnicos e funcionários da Embrapa Amazônia Oriental, Pará, Brasil, local da realização das análises. Avaliou-se no teste de aceitação os atributos: aparência geral, cor, odor, sabor e dureza. Utilizou-se Escala Hedônica de nove pontos, sendo o valor 1 atribuído ao termo hedônico “desgostei extremamente”, e o valor 9, ao termo “gostei

extremamente” (CHAVES; SPROSSER, 2001). Blocos de queijos foram cortados em cubos de 1,5 cm de aresta, colocados no interior de formas de papel codificadas com números aleatórios de três dígitos. Os testes foram conduzidos à temperatura ambiente de 21 °C. As amostras foram servidas em uma bandeja de papel aluminizado, juntamente com água para a limpeza do paladar. Foi fornecido aos provadores lápis, borracha e a ficha de avaliação (Anexo).

## **5.9. Análise Estatística**

Para as variáveis paramétricas, todos os valores foram apresentados sob a forma de média aritmética e respectivo desvio-padrão. O coeficiente de variação e o intervalo de confiança de 95% são mostrados quando necessários.

Para a análise univariada, o teste do qui-quadrado de aderência foi utilizado para verificar a significância estatística das diferenças relativas às intenções de compra dos queijos.

Nas análises bivariadas, a significância estatística entre variáveis paramétricas foi verificada pela aplicação do teste *t* de Student bicaudal. Para avaliar a força da associação entre as diferentes características físico-químicas e os parâmetros de textura, foi empregado o método de análise do coeficiente de correlação de Pearson (*r*).

Para as análises multivariadas, a normalidade dos dados foi verificada pela aplicação do teste de Shapiro-Wilk (teste W). Para as variáveis cujos dados seguem a distribuição normal gaussiana, a significância estatística foi verificada com o emprego da análise de variância (One Way-ANOVA). Na presença de significância estatística, as diferenças entre as médias dos grupos, comparadas duas a duas, foram identificadas pela aplicação do teste de comparação múltipla de Tukey. Para as variáveis cujos dados não seguem o padrão de normalidade, o teste ANOVA foi substituído pelo teste de Kruskal-Wallis e, na presença de significância estatística, o teste de comparações múltiplas de Dunn foi aplicado para identificar as diferenças entre os grupos estudados. Em todas as análises utilizou-se o nível de significância alfa de 5% ( $P \leq 0,05$ ). Os valores de P foram obtidos com o software BioEstat 5.0.

## **5.10. Referências Bibliográficas**

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. *Official Methods of Analysis*. 19.ed., Washington, D.C.: AOAC. 2012. P. 887-935.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. *Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003*. Oficializa os métodos derivados analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. *Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006*. Métodos analíticos físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos.

CHAVES, J. B. P.; SPROSSER, R. L. *Práticas de laboratório de análise sensorial de alimentos e bebidas*. Viçosa: UFV. 2001. 81p.

COMMISSION INTERNATIONALE DE L'ECLAIRAGE– CIE. *Colorimetry*. 2. ed. Vienna: Central Bureau of the Commission Internationale de L'Eclairage, 1996.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION – IDF. IDF-FIL, 20b –*Milk. Total nitrogen content (Kjeldhal method)*. Brucelas. 1993. 3p.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. *Whole milk– Enumeration of somatic cells. Guidance on the operation of fluoro-opto-electronic counters*. IDF Standard 148-2. Brussels: International Dairy Federation. 2006. 20p.

PATHARE, P. B. *et al.* Colour measurement and analysis in fresh and processed foods: A review. *Food and Bioprocess Technology*, Dublin, v. 6, n. 1, p. 36 - 60, 2013.

PEREIRA, D. B. C.; SILVA, P. H. F.; OLIVEIRA, L. L.; COSTA JÚNIOR, L. G. C. *Físicoquímica do leite e derivados – Métodos analíticos*. 1. ed. Juiz de Fora, MG: Oficina de Impressão Gráfica e Editora Ltda., 2001. 190 p.

REIS, R. C.; MININ, V. P. R. Teste de aceitação. In: MININ, V. P. R. (Ed.) *Análise sensorial: estudo com consumidores*. Viçosa: UFV. 2006. p. 67-83.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. *Análise de alimentos: Métodos químicos e biológicos*. 3. ed. Viçosa, MG: UFV, 2006. 235 p.

## **6. RESULTADOS**

### **6.1 Artigo1**

#### **COMPOSTOS BIOATIVOS EM LEITE DE BÚFALA: REVISÃO**

## COMPOSTOS BIOATIVOS EM LEITE DE BÚFALA: REVISÃO

SIMÕES, Marilda Garcia  
FERREIRA, Célia Lúcia de Luces Fortes

### **Abstract**

Milk of little-known species such as buffalo has been increasingly valued worldwide due to its nutritional and functional aspects. However, the appreciation of this type of milk and its derivatives requires specific studies, particularly on bioactive compounds and their benefits to health. This review aimed to emphasize the main bioactive substances present in buffalo milk. Studies have shown that buffalo milk contains a wide range of bioactive compounds in active form, besides the bioactive peptides released from its caseins and their whey proteins. Some of these bioactive peptides are more efficient and in higher amounts than in cow milk, or present unique functionality. Such information is useful to disseminate knowledge on bioactive compounds and functional properties of buffalo milk in order to stimulate increased consumption of this milk and its derivatives worldwide.

Keywords: buffalo milk, bioactive components, bioactive peptides, functional food.

### **Resumo**

A importância do leite de outras espécies que não o de vaca, como o bubalino, por exemplo, cresce em todo o mundo em razão de seus aspectos nutricionais e funcionais. Por outro lado, a valorização deste leite, e de seus derivados, requer a implementação de estudos específicos, em particular na área dos compostos bioativos que, em razão das suas funcionalidades, carregam benefícios à saúde, incluindo ação hipotensiva, opioide, imunomoduladora, antibacteriana, citomodulatória e anticarcinogênica, dentre outras. Pesquisas mostram que o leite de búfala apresenta um leque diversificado de compostos bioativos em sua forma ativa, como, também, de peptídeos bioativos liberados a partir

de suas caseínas e proteínas do soro, alguns em quantidades mais expressivas e mais eficazes que os do leite de vaca, ou com bioatividades únicas. Estas informações mostram-se oportunas para que se possam difundir as funcionalidades dos compostos bioativos presentes no leite de búfala.

Palavras-chave: leite de búfala, alimento funcional, compostos bioativos, peptídeos bioativos.

## 1. Introdução

Nas últimas décadas, a identificação de substâncias bioativas de origem alimentar, definidas como compostos dietéticos, nutrientes ou não (FAO, 2007), tem se destacado como um novo campo de pesquisa. A atividade dos chamados alimentos funcionais, definidos como aqueles que, além da função básica de nutrir, exercem uma atividade reguladora no organismo humano (BRASIL, 2002), são inferidas pelos componentes bioativos.

Estes componentes estão presentes nos alimentos em natureza ou são adicionados a uma matriz alimentar, e podem ser classificados de acordo com a função que irá exercer no organismo (antimicrobianos, opioides, vaso constritores, antioxidantes, prebióticos, etc.), de acordo com a composição química (carboidratos, lipídeos, proteínas, e outros) ou de acordo com a origem (vegetal: isoflavonas, ômega 3, oligossacarídeos, etc.; animal: proteínas, ácidos linoleicos conjugados (CLA), peptídeos, lactoperoxidases, por exemplo); ou microbiana: lactobacilos, bifidobactérias, e outros) (FAO, 2007).

Dentre os alimentos de origem animal, o leite merece destaque, pois é fonte natural de compostos bioativos, com destaque para as imunoglobulinas, lactoferrina, lisozima, lactoperoxidase, ácido linoleico conjugado, gangliosídeos e oligossacarídeos, todos secretados em sua forma ativa na glândula mamária (MILLS *et al.*, 2011). Além disso, várias proteínas do leite contêm em sua estrutura primária peptídeos scriptografados como sequências de aminoácidos, designados por peptídeos bioativos (MEISEL, 1990). Estes peptídeos permanecem latentes até serem liberados e ativados por meio da hidrólise ácida ou enzimática (GAUTHIER *et al.*, 2006) durante a digestão gastrointestinal (GUILLOTEAU *et al.*, 2009), ou durante o processamento dos alimentos, como na maturação dos queijos e na fermentação do leite, como por exemplo, durante a elaboração de iogurte, kefir e outros leites fermentados (HARTMAN; MIESEL, 2007). Estes peptídeos bioativos, de grande interesse científico em razão da sua diversidade

emúltiplos benefícios à saúde, podem atravessar o epitélio gastrintestinal (URISTA *et al.*, 2010), onde desempenham funções específicas (GUILLOTEAU *et al.*, 2010; MEDINA *et al.*, 2010) e atingir os tecidos periféricos via circulação sistêmica.

Embora menos estudado do que o leite de vaca (LV), tem-se observado uma tendência quanto ao aumento do consumo do leite de búfala (LB) em todo o mundo, com respaldo na importância que tem sido demonstrada em termos culturais (FAYE; KONUSPAYEVA, 2011), econômicos (FAYE; KONUSPAYEVA, 2011) e funcionais (ABD EL-SALAM; EL-SHIBINY, 2013). Esse aumento pode tornar-se ainda mais marcante à medida que as características nutricionais e os princípios bioativos presentes, aliados à funcionalidade desse leite, forem mais conhecidos, explorados e divulgados.

Foi realizada uma busca nas principais bases científicas (Scopus, Science Direct, Google Acadêmico) com a utilização dos seguintes descritores: “leite de búfala”, “imunoglobulina”, “lisozima”, “lactoferrina”, “lactoperoxidase”, “ácido linoleico conjugado”, “gangliosídeos”, “oligossacarídeos” e “peptídeos bioativos”, com os respectivos vocábulos em inglês. As expressões da pesquisa foram construídas combinando-se esses termos ou utilizando-os de forma isolada.

## **2. Leite de búfala: composição nutricional**

Mundialmente, a produção do LB está ranqueada em segundo lugar, contribuindo com cerca de 93 milhões de toneladas/ano, o que representa 13% do total de leite produzido (IDF, 2011). Particularmente nos países em desenvolvimento, este leite desempenha um papel importante na nutrição humana, pois, quando comparado ao leite de vaca, é mais rico em quase todos os nutrientes principais. Além disso, a divulgação dessas características, aliadas à qualidade funcional diferenciada, tem contribuído para o aumento no interesse do LB e seus derivados (ABD EL-SALAM; EL-SHIBINY, 2011). A Tabela 1 indica a composição média dos principais componentes do LB e do LV.

Alguns componentes destacam-se quanto as características nutricionais e funcionais pela sua maior concentração no LB quando comparado ao LV, como a gordura, proteína, Ca, P, vitaminas A, C e B6, MUFA (ácidos graxos monoinsaturados), PUFA (ácidos graxos poli-insaturados) e CLA (ácido linoleico conjugado). Outro aspecto importante é a concentração de colesterol, que no LB é em média 30% a 70% menor (MEDHAMMAR *et al.*, 2012). Importa ressaltar, ainda, a ausência de caroteno

que contribui para a cor branca mais acentuada do LB e em seus derivados. No entanto, a concentração de vitamina A é cerca de 50% mais alta que a encontrada no LV.

No organismo humano, alguns dos componentes bioativos do leite são transformados durante o metabolismo, tornando-se ativos geralmente pela ação das enzimas do processo digestivo e, também pela atuação da microbiota intestinal. Essas substâncias serão avaliadas com mais detalhe a seguir.

Tabela 1. Composição média (%) de leite de búfala e do leite de vaca

<b>Componentes</b>	<b>Búfala<sup>1,3</sup></b>	<b>Vaca<sup>1,2,3,4,5</sup></b>
Umidade (g)	83,2 ± 0,6	87,7 - 89,2
Sólidos totais (g)	17,0 ± 0,6	13,3
Sólidos não gordo (g)	9,7 ± 0,8	8,8 - 9,8
Proteína (g)	4,0 ± 0,5	3,1 - 3,3
Gordura (g)	7,4 ± 0,9	3,3 - 3,7
Lactose (g)	4,4 ± 0,6	4,9 - 5,6
Minerais (g)	0,8 ± 0,04	0,7
Cálcio (mg)	191 ± 38	119
Fósforo (mg)	185 ± 94	93
Colesterol (mg)	4 - 10	14
Fosfolipídeos (mg)	20	28
Vitamina A, (µg) RAE	69	46
Vitamina B6 (mg)	0,33	0,04
Vitamina C (mg)	2,5	0,0
MUFA (mg)	2,1	1,0
PUFA (mg)	0,24	0,1
CLA (mg)	0,5 - 1,1	0,4 - 0,9

MUFA: ácidos graxos monoinsaturados; PUFA: ácidos graxos poli-insaturados; CLA: ácido linoleico conjugado. Fonte: <sup>1</sup>Medhammar *et al.* (2012); <sup>2</sup>Rigueira (2006); <sup>3</sup>Talpur (2007); <sup>4</sup>USDA (2009); <sup>5</sup>Nikkhah (2011).

No organismo humano, alguns dos componentes bioativos do leite são transformados durante o metabolismo, tornando-se ativos geralmente pela ação das enzimas do processo digestivo e, também pela atuação da microbiota intestinal. Essas substâncias serão avaliadas com mais detalhe a seguir.

### **3. Compostos bioativos presentes no leite de búfala em sua forma ativa**

#### **3.1 Proteínas bioativas**

As principais proteínas do LB são as chamadas proteínas do leite: as caseínas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\kappa$ ; as proteínas do soro:  $\beta$ -Lactoglobulina ( $\beta$ -LA);  $\alpha$ -Lactoalbumina ( $\alpha$ -LA), as imunoglobulinas (IgA, IgG, IgM); e outras substâncias proteicas na forma de

lactoferrina, lisozima e lactoperoxidase (sistema lactoperoxidase, LPS-s), conforme indicado na Tabela 2. Essas substâncias diferem na sua estrutura química, nas funções biológicas e nas propriedades funcionais. A concentração dessas proteínas bioativas presentes no leite em sua forma ativa varia de acordo com o período da lactação, raça, espécie, idade, tamanho do animal, clima e composição da dieta (GALVÃO *et al.*, 2010).

Tabela 2. Concentrações médias das principais proteínas do leite de búfala e do leite de vaca

Proteína	Búfala (g L <sup>-1</sup> )	Vaca (g L <sup>-1</sup> )
Total de caseínas	37,84	26,0
αs-	16,6 - 20,8	13,0
β-	12,6 - 15,8	9,3
κ-	4,3 - 5,4	3,3
Total de proteínas do soro	6,2	6,3
β-lactoglobulina	3,9	3,2
α-lactoalbumina	1,4	1,2
Imunoglobulinas (A, G e M)	10,66	0,7
Lactoferrina	0,32	0,1-0,5
Lizosima	0,000152	0,0004
Lactoperoxidase <sup>1</sup>	5,2 - 9,8	0,03

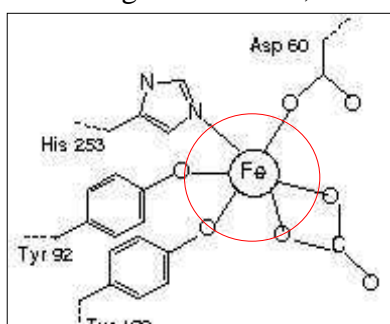
<sup>1</sup>U L<sup>-1</sup>

Fonte: Pandya e Khan (2006).

**3.1.1 Imunoglobulina:** São glicoproteínas que, no leite maduro de búfala, estão presentes em maiores concentrações do que aquelas presentes no LV (Tabela 2). Consistem em IgG, em maior quantidade, com média de 8,71 mg mL<sup>-1</sup>, IgM e IgA com concentrações de 1,91 mg mL<sup>-1</sup> e 0,04 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente. No início da fração colostrar, a quantidade dessas imunoglobulinas é maior, cerca de 50 mg mL<sup>-1</sup>, diminuindo drasticamente após dois dias de lactação. As imunoglobulinas atuam na saúde das glândulas mamárias protegendo-as contra patógenos, e no fortalecimento da imunidade, para minimizar as chances de mortalidade e morbidade da cria recém-nata (EL-LOLY *et al.*, 2007).

Com o interesse crescente na exploração comercial do valor terapêutico das imunoglobulinas do leite, ambos, leite de búfala e seu colostro, podem ser direcionados comercialmente para a elaboração de alimentos funcionais usados no cuidado da saúde humana e de animais (HE *et al.*, 2001).

**3.1.2 Lactoferrina:** São glicoproteínas ligadas ao ferro, conforme indicado na Figura 1.



Sua quantidade média n<sup>o</sup> Figura 1. Parte da molécula da lactoferrina, mostrando presença do Fe<sup>3+</sup>. 1,2 mg mL<sup>-1</sup>, diminuindo para 0,32mg mL<sup>-1</sup> no início do período (FATTAH *et al.*, 2012) e 0,5 mg mL<sup>-1</sup> no final deste período (GIACINTI *et al.*, 2013).

A lactoferrina exibe uma gama de atividades biológicas. É um elemento chave no sistema de defesa inato, em razão de suas propriedades: i) antimicrobiana que, pela sua alta afinidade por íons Fe<sup>+3</sup>, sequestra este cátion da parede bacteriana, principalmente de espécies patogênicas, como as do gênero *Escherichia*, como a *Escherichia coli*, na qual o ferro é indispensável para seu metabolismo (FARNAUD; EVANS, 2003). A natureza catiônica desta proteína também parece ser importante para a atividade antimicrobiana; ii) antiviral, contra herpes, influenza, HIV, rotavirus e hepatite C (CAMPANELLA *et al.*, 2009); e iii) imunomoduladora, particularmente quando administrada por via oral, pois aumenta a produção no epitélio intestinal da IL-18, importante regulador da resposta inata e adquirida que exerce atividade nas inflamações crônicas, doenças autoimunes e em vários tipos de câncer (BAVEYE *et al.*, 1999), do número dos linfócitos CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e das células exterminadoras naturais (*Natural Killer Cell*) (STEIJNS; van HOOIJDONK, 2000), diminuindo a ocorrência de infecções gastrintestinais e processos carcinogênicos.

Também tem sido descrita como um fator benéfico para os ossos, pois mantém a densidade destes pelo estímulo na formação dos osteoblastos que sintetizam e mineralizam esta matriz óssea, e pela inibição na formação dos osteoclastos, que degradam essa matriz. Este efeito atua na prevenção da osteoporose e, conseqüentemente, na redução de fraturas (CORNISH *et al.*, 2004; NAOT *et al.*, 2005; CORNISH *et al.*, 2006).

A lactoferrina pode apresentar potencial terapêutico na mastite, quando desempenha ação bactericida, particularmente contra o *Staphylococcus aureus*. Portanto, a menor vulnerabilidade à mastite, em búfalas, pode ser parcialmente explicada pela elevada concentração de lactoferrina presente no leite da espécie (GIACINTI *et al.*, 2013).

A administração oral da lactoferrina, a qual é principalmente isolada do soro do leite, por meio da cromatografia de troca iônica (LAW; REITER, 1977), exerce vários efeitos benéficos à saúde, não só em crianças e adultos, mas também, em animais, o que aumenta o potencial de sua aplicação como aditivo alimentar (WAKABAYASHI, 2006). A lactoferrina do LB, poderia ser utilizada comercialmente na complementação de alimentos, como fórmulas infantis, iogurtes, bebidas, comprimidos, alimentos para esportistas e produtos para alimentação animal, tal como a lactoferrina do LV.

**3.1.3 Lisozima:** A concentração desta enzima no leite de búfala ( $1,52 \mu\text{g L}^{-1}$ ) é menor do que a encontrada no leite de vaca ( $1,80 \mu\text{g L}^{-1}$ ), ambas menores do que aquelas presentes no leite humano ( $0,4 \text{g L}^{-1}$ ) (KUMARI; MATHUR, 1981). No entanto, essas informações são contraditórias, havendo relatos em que a atividade da lisozima do leite de búfala foi duas vezes maior ( $60 \pm 3,9 \times 10^{-3} \text{ U mL}^{-1}$ ) do que a lisozima do leite de vaca ( $29,1 \pm 10^{-3} \text{ U mL}^{-1}$ ), quando testadas em animais com contagem de células somáticas menor que  $5 \times 10^5 \text{ cell mL}^{-1}$  (PRIYDARSHINI; KANSAL, 2002a).

A lisozima representa um importante componente do sistema antibacteriano do leite, pois destrói o peptídeoglicano, componente da parede da célula bacteriana, levando-a a morte. A lisozima cliva a ligação glicosídica  $\beta$ -1,4 do dissacarídeo, formado pelo ácido N-Acetilglicosamínico e o ácido N-acetil murâmico, os quais ligam-se à resíduos de amino ácidos, para formar o peptídeoglicano (PRIYADARSHINI; KANSAL, 2002b).

Em LB, estudos desenvolvidos por Priyadarshini e Kansal (2002b) indicaram ação bactericida da lisozima sobre *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* e *Lactococcus lactis ssp. Lactis*. Embora, a clara do ovo seja considerada a fonte primária para a produção de lisozima em escala industrial, outras fontes, como o leite de mamíferos, dentre eles o LB, devem ser pesquisados, pois podem conter moléculas de lisozima com propriedades específicas.

**3.1.4 Sistema lactoperoxidase (LP-s):** É um antimicrobiano natural presente no leite cru de diferentes mamíferos, em concentrações e atividades variáveis (REITER, 1985). Embora, historicamente, este sistema tenha sido utilizado na conservação do leite bovino cru, em situações de indisponibilidade de refrigeração o LP-s pode também atender às pequenas propriedades produtoras do LB, as quais apresentam, pela falta da coleta do leite e das instalações de refrigeração, dificuldades com a preservação do leite cru a ser

comercializado. Este problema é comum nos países em desenvolvimento, principalmente naqueles de clima tropical, como o Brasil. Estudos realizados na Argentina (NIEUWENHOVE *et al.*, 2004), na Índia (RAMBABU *et al.*, 2004), no México (MASUD *et al.*, 2010), no Paquistão (KAKAR *et al.*, 2013) dentre outros países, mostraram que o efeito do LPS-s em LB cru foi viável e vantajoso quando comparado ao sistema de refrigeração, utilizado tradicionalmente na conservação do leite cru.

O LP-s consiste em três componentes: i) lactoperoxidase (LP-); ii) tiocianato (SCN-); e iii) peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Sua utilização para preservar o leite cru, na ausência da refrigeração, foi aprovada pelo Codex Alimentarius (CAC, 1991), e está baseada na ativação exógena do sistema nas concentrações: lactoperoxidase (LP-), 0,5 ug mL<sup>-1</sup>– 10 ug mL<sup>-1</sup>; tiocianato (SCN-), 10 mg L<sup>-1</sup>– 15 mg L<sup>-1</sup> e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 1 mg L<sup>-1</sup>– 10 mg L<sup>-1</sup> (CAC, 1991).

Tal como a LP, a concentração do tiocianato pode variar amplamente em razão do regime alimentar (REITER, 1985) e necessita ser suplementada, assim como, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o qual não é normalmente detectado no leite cru, mas que em condições aeróbicas pode ser produzido por *Lactobacilos*, *Lactococcus* e *Streptococos* em quantidades suficientes para ativar o LP-s (WOLFSON; SUMNER, 1993).

A ativação do LP-s, dependendo da espécie e estirpe da célula bacteriana, gera efeito bactericida ou bacteriostático, o que previne a multiplicação das bactérias presentes no leite cru, aumentando sua vida útil (PRUITT;REITER, 1985).A enzima LP catalisa a oxidação do íon tiocianato (SCN-) a hipotiocianato(OSCN-) (AUNE;THOMAS, 1977), um potente agente oxidante e bactericida, altamente reativo. O resumo das reações encontram-se na Figura 2.

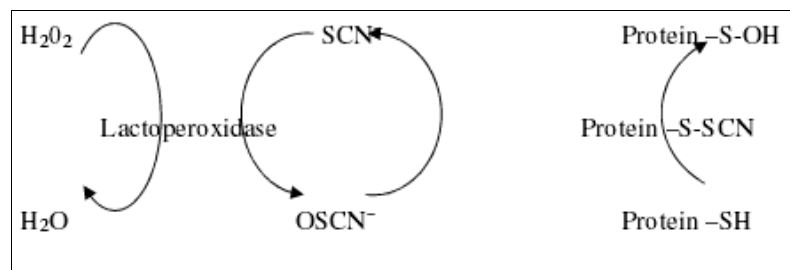


Figura 2. Sistema lactoperoxidase (LPS-s) - Efeito bactericida bacteriostático. (SCN<sup>-</sup>) - íon tiocianato (OSCN<sup>-</sup>) -hipotiocianato.Fonte adaptada de Aune e Thomas(1978).

A membrana citoplasmática bacteriana é o principal alvo desses ânions (NAIDU, 2000), que oxidam grupossulfidril (-SH<sup>1</sup>) de proteínas (REITER; HARNULV, 1984),

originando sulfenil tiocianato (-S-SCN-), que se desdobram em dissulfetos (-S-S-) e ácido sulfênico (-S-OH)(AUNE;THOMAS, 1978). Estes compostos causam danos estruturais à membrana plasmática, ocasionando perda de aminoácidos, polipetídeos e potássio para o meio extracelular, além da diminuição do transporte de carboidratos e da utilização e captação de oxigênio, vitais para as células bacterianas (PRUITT; REITER, 1985). Também têm sido demonstrados efeitos do LP-s sobre vírus, bolores, leveduras, micoplasmas e protozoários (PRUITT; REITER, 1985).

No LB a concentração da LP é em média 31 mg L<sup>-1</sup> (KUMAR; BHATIA, 1999), e o LP-s apresenta alta atividade contra bactérias patogênicas gram-negativas e gram-positivas como, por exemplo, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Shigella dysenteriae*, dentre outras, com efetividade comparada aos antibióticos tetraciclina, penicilina e netilmicina (OZDEMIR *et al.*, 2002). Estas informações, mostram a possibilidade da substituição do papel da refrigeração pela utilização do LP-s, na manutenção da qualidade do LB cru em regiões tropicais.

Por conseguinte, na Ilha do Marajó, situada às proximidades da linha do Equador, local onde se concentra o maior número de propriedades de pequenos produtores de LB do Brasil, que por motivos práticos e, ou, econômicos não possuem instalações de refrigeração para manter a conservação do leite cru, o LP-s poderia ser utilizado como um método viável, com o propósito de propiciar a comercialização deste leite, e, com isso, promover a disponibilidade de um alimento seguro e saudável, contribuindo com a segurança microbiológica e alimentar, com a nutrição e com a melhoria da saúde das famílias, além de gerar renda para a população local.

### **3.2 Lipídeos bioativos**

**3.2.1 Ácido linoleico conjugado (CLA):** É o termo empregado para descrever um ou mais isômeros do ácido linoleico (*cis*-9, *cis*-12, ácido octadecadienóico) com duplas ligações conjugadas. O leite é uma das fontes mais ricas em CLA, e, em razão dos efeitos à saúde, interesse especial tem sido reportado quanto ao conteúdo deste composto presente no leite de diferentes mamíferos, sendo o isômero C18:2 *cis*9, *trans*11 e o isômero C18:2 *trans*10, *cis*12, os mais estudados.

No leite de búfala, estudos originados em diversos países têm indicado diferentes concentrações de CLA, variando de 0,39% em rebanho bubalino na Búlgaria (MIHAYLOVA; PEEVA, 2007), 0,48% em búfalos na Argentina (GONZALEZ *et*

*al.*,2004), a 0,77% para búfalos indianos (TYAGI *etal.*,2007). Estudos desenvolvidos na Itália detectaram CLA nas concentrações de 0,51% a 1,06% (VARRICCHIO *etal.*,2007). Na França, Menard *et al.* (2010) detectaram 0,90%, enquanto no Paquistão foram encontradas concentrações de 0,8% e 0,71% (TALPUR, 2007). Estas variações refletem diferenças na genética dos animais, na alimentação, nos fatores ambientais e no tempo de lactação, além do valor da atividade da enzima  $\Delta^9$  desaturase (estearoil-CoA desaturase), presente no leite dos animais. A atividade dessa enzima tem sido utilizada como um índice da quantidade de CLA no leite (FERNANDES *etal.*, 2007).

Estes isômeros apresentam atividade anticarcinogênica, originadas pelas suas propriedades antiinflamatórias que regulam negativamente a produção de agentes pró-inflamatórios, como factor de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ), e as interleucinas IL-1 $\beta$  e IL-6 (SONG *et al.*, 2012). Podem exercer efeito citotóxico, pela produção e ação de espécies reativas de oxigênio no retículo endoplasmático das células cancerígenas, inibindo o ciclo celular dessas células e posterior apoptose (PIERRE *et al.*, 2013). Estão também envolvidos na prevenção de doenças cardiovasculares, pois inibem a capacidade migratória transendotelial dos monócitos, e na redução da expressão dos mediadores pró-inflamatórios como TNF-  $\alpha$  e IL-6 (EDER; RINGSEIS, 2010; MOONEY *et al.*, 2012), e na regulação da síntese de gordura no organismo. Essa regulação é ocasionada pela diminuição moderada dos triacilglicerídeos no tecido adiposo (YAMASAKI *et al.*, 1999), pela promoção de lipólise e liberação dos ácidos graxos (WANG; JONES, 2004), pela inibição da incorporação da glicose em pré adipócitos para a síntese de triacilglicerídeos (BROWN; MCINTOSH, 2003) e pela apoptose em adipócitos e pré adipócitos (FISCHER-POSOVSZKY *et al.*, 2007).

**3.2.2 Gangliosídeos:** São glicoesfingolípides que contêm pelo menos uma molécula de ácido siálico (N-acetilneuramínico). Componentes da membrana plasmática da maioria das células de vertebrados, os gangliosídeos interagem com uma variedade de fatores biologicamente ativos e possuem, provavelmente, um papel importante na transmissão de sinais entre células, no crescimento e diferenciação de tecidos, ou seja, na comunicação celular (WIEGANDT, 1985).

Gangliosídeos atuam na modificação da microbiota intestinal de recém-nascidos, na qualidade de prebióticos, promovem o crescimento das bifidobactérias e estimulam a resposta imune (PARK *et al.*, 2007). A colonização da microbiota bifidogênica é mais rápida em fórmulas de leites suplementados com gangliosídeos, cujo efeito bifidogênico

parece ser relacionado a presença do ácido siálico, que provavelmente estabelece uma diminuição no pH intestinal, que favorece o crescimento desse grupo bacteriano (RUEDA *et al.*, 1996). Gangliosídeos também são identificados como receptores de agentes patogênicos. Podem por exemplo, aderir-se aos receptores de ácido siálico, inibindo a adesão e ocasionando a apoptose ou a eliminação da atividade (IDOTA; KAWAKAMI, 1995) de agentes como vírus da gripe (FUKUNAGA *et al.*, 2003) e HIV (VIARD *et al.*, 2004), toxinas do cólera (IDOTA *et al.*, 1995), do tétano (EMSLEY *et al.*, 2000), do botulismo (SWAMINATHAN; ESWARAMOORTHY, 2000) e de bactérias, como a *Escherichia coli*, de modo a aumentar a defesa contra infecção durante a lactação (LAEGREID; OTNAESS, 1987). Mais estudos são necessários para conhecer o mecanismo, a especificidade e a forma como cada gangliosídeo interfere no processo de adesão bacteriana, a fim de garantir uma relação de causa – efeito (SALCEDO *et al.*, 2013).

No leite, as membranas dos glóbulos de gordura contêm cerca de 90% dos gangliosídeos totais, e a concentração molar em leite e soro de búfalas é de  $6,8 \mu\text{mol L}^{-1}$  –  $14,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  (RUEDA *et al.*, 1996), a mesma encontrada no leite humano. No leite bovino maduro, esta quantidade é de  $4,1 \mu\text{mol L}^{-1}$  -  $4,4 \mu\text{mol L}^{-1}$  (PUENTE *et al.*, 1992). Os gangliosídeos presentes no leite de búfala pertencem a classe GM1, possuem sequências dos açúcares ligados à ceramida e número de resíduos de ácido siálico, diferentes daqueles identificados no leite bovino classe GM3 e GD3. Além disso, no leite de búfala são encontrados gangliosídeos denotados como gangliosídeo "F" e "L", cuja função ainda não foi estabelecida (BERGER *et al.*, 2005).

O leite maduro de búfalas da Itália e do Paquistão, quando comparados ao leite bovino suíço, apresentou 40% a 100% a mais de gangliosídeos lipofílicos, os quais manifestaram atividade antiinflamatória em culturas de células epiteliais do cólon expostas ao TNF- $\alpha$ , com a diminuição de 75% a 80% das prostaglandinas pró-inflamatórias da série 2 (COLAROW *et al.*, 2003). Leite búfalo e seu soro surgem como fontes valiosas de lípidos bioativos, adequados para a preparação de produtos alimentares inovadores.

### **3.3. Oligossacarídeos bioativos**

São carboidratos com três a dez monossacarídeos que, no leite, representam os componentes mais variáveis, com diferenças temporal e individual de acordo com o estágio da lactação e a capacidade genética do mamífero em sintetizar ligações

específicas no metabolismo destes compostos (GUDIÉL-URBANO; GOÑI, 2001). No leite, são derivados da lactose, monômeros da D-glucose, D-galactose, N-acetilglucosamina, L-fucose e ácido N-acetil neuramínico, como: o Lacto-N-fucopentose I, N-acetyl-lactosamina, Lacto-N-tetrose, 3-Glucolilneuraminil-lactose, dentre outros (MEHRA; KELLY, 2006).

Estes oligossacarídeos podem ser considerados prebióticos, pois são promotores do crescimento de bactérias bífidas (KUNZ *et al.*, 2000) com potencial de modular a microbiota intestinal; previnem a adesão de bactérias patogênicas pela competição dos sítios dos receptores epiteliais, ou ligam-se a estes patógenos e reduzem a translocação (KIM *et al.*, 2009), além de estimular o sistema imune com aumento de IgA, IgG e IgM (SHARON e OFEK, 2000).

Quando comparado ao leite humano ( $1,85 \text{ g}100 \text{ mL}^{-1}$ ) (GUDIÉL-URBANO; GOÑI, 2001), a quantidade deste composto no leite da maioria das espécies animais é baixa, e relatos indicam que estas diferenças são significativas (MARTINEZ-FEREZ *et al.*, 2006). Informações quantitativas sobre o total de oligossacárideos e componentes individuais presentes no leite de outros animais, como a cabra, vaca ou búfala, são limitadas.

O conteúdo médio nocolostrode vacase búfalas no início da lactação corresponde a  $20,3 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$  e  $26,0 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$ , respectivamente, valores que diminuem para  $14,7 \text{ mg}100 \text{ g}^{-1}$  e  $17,2 \text{ mg}100 \text{ g}^{-1}$  no meio da lactação, e chegam a  $8,7 \text{ mg}100 \text{ g}^{-1}$  e  $10,2 \text{ mg}100 \text{ g}^{-1}$  ao final da mesma (BALASUBRAMANTA *et al.*, 1993). O colostro bubalino contém resíduos de galactose ativadores de macrófagos, semelhantes àqueles presentes em leite bovino e no colostro humano, os quais produzem espécies reativas de  $\text{O}_2$  que favorecem o *burst* respiratório dessas células, aumentando sua atividade de fagocitose (APARNA; SALIMATH, 1994). Pesquisas relataram ainda a presença de glicoproteínas bifidogênicas no soro colostrado de búfalas, com papel imunoprotetor (APARNA; SALIMATH, 1999).

Saksena *et al.* (1999), isolaram, no leite de búfala, um pentassacarídeo imunoestimulante, o qual mostrou, em estudos experimentais com ratos, aumento de seis vezes na quantidade de anticorpos hemaglutinantes, e de duas vezes na contagem de células formadoras de placas nos animais alimentados com leite de búfala em comparação com os controles.

Assim, verifica-se que o colostro do leite de búfala pode ser adequado para o isolamento de oligossacarídeos individuais, os quais podem ser adicionados às fórmulas

para lactentes, com o objetivo de estimular bactérias bífidas, grupo bacteriano da maior importância para o equilíbrio da microbiota intestinal e da manutenção da saúde do recém nascido (MORO *et al.*, 2002).

#### **4. Peptídeos bioativos em leite de búfala**

Em razão da sua diversidade em múltiplos benefícios à saúde (CLARE e SWAISGOOD, 2000), os peptídeos bioativos presentes no leite e seus derivados são considerados como de grande interesse científico (HAQUE *et al.*, 2009, PARK, 2009). Dentre os peptídeos lácteos bioativos, os fosfopeptídeos foram os primeiros identificados em hidrolisados da caseína do leite de vaca (MELLANDER, 1950). Posteriormente, outros peptídeos com funções definidas foram isolados e caracterizados (PANDYA; HAENLEIN, 2009), como: i) peptídeos de ligação: que carreiam e aumentam a absorção de minerais, principalmente a do cálcio (HARTMANN; MEISEL, 2004); ii) peptídeos opioides: exorfinas que atuam como substâncias reguladoras, com propriedades farmacológicas semelhantes às encefalinas usadas para aliviar a dor (GOBBETTI *et al.*, 2007; HARTMANN; MEISEL, 2007); iii) anti-hipertensivos (RICCI *et al.*, 2010; TAVARES *et al.*, 2011a; QUIAN *et al.*, 2011); iv) imunomoduladores (GAUTHIER *et al.*, 2006; HARTMANN; MEISEL, 2007; KAMOU *et al.*, 2010a; QUIAN *et al.*, 2011); v) antibacterianos (KAMOU *et al.*, 2010b); vi) antioxidantes (HARTMANN; MEISEL, 2007); vii) antitrombóticos (KORHONEN; PIHLANTO, 2006); viii) citomodulatórios (HARTMANN; MEISEL, 2004; KAMOU *et al.*, 2010a); ix) anticancerogênicos (AGYEI; DANQUAH, 2011); e x) de atividade anti-úlcerosa (TAVARES *et al.*, 2011b).

Na última década, estudos focaram o enriquecimento de produtos comerciais com peptídeos bioativos, como por exemplo, bebidas lácteas fermentadas (FITZGERALD; MURRAY, 2006; KORHONEN; PIHLANTO, 2006; HAQUE *et al.*, 2009; TAVARES *et al.*, 2012). Outros estudos utilizaram especialmente a adição dos peptídeos anti-hipertensivos como ingrediente básico em lácteos fermentados. Os peptídeos anti-hipertensivos inibem a atividade da enzima ACE (enzima conversora de angiotensina I à angiotensina II, que provoca o aumento da pressão arterial) (SIEBER *et al.*, 2010; TAVARES *et al.*, 2011a; NEJATI *et al.*, 2013). Nessas pesquisas, os peptídeos bioativos são adicionados ou obtidos por meio da utilização de uma seleção de culturas *starters* (FITZGERALD; MURRAY, 2006; NEJATI *et al.*, 2013), por seleção

de enzimas (TAVARES *et al.*, 2011a) e, ou, alterandoos parâmetros dos processos de fabricação dos derivados lácteos (TAVARES *et al.*, 2012).

Estudos limitados têm sido realizados com as proteínas do leite de búfala e de seus derivados lácteos, como fontes de peptídeos bioativos. No entanto, estudos feitos até o momento indicam que é de se esperar que as proteínas do LB e do LV produzam peptídeos bioativos análogos, em razão da similaridade das sequências de seus aminoácidos, denominada de grau de homologia. Diferentes graus de homologia, ou seja, variações nos aminoácidos dos peptídeos bioativos, são esperados entre proteínas do leite de diferentes mamíferos (D'AMBROSIO *et al.*, 2008). No LB, as principais proteínas apresentam altas porcentagens de homologia com as proteínas do LV (D'AMBROSIO *et al.*, 2008), sendo que ambos possuem número similar de resíduos de aminoácidos e substituições de aminoácidos variáveis em suas cadeias polipeptídicas (D'AMBROSIO *et al.*, 2008; ABD EL-SALAM; EL-SHIBINY, 2011; ABD EL-SALAM *et al.*, 2013). Portanto, da mesma forma que o LV, as proteínas do LB podem ser precursoras potenciais de peptídeos bioativos, com diversificadas funcionalidades (ABD EL-SALAM *et al.*, 2013), como os peptídeos bioativos derivados da caseína e do soro.

#### **4.1 Peptídeos bioativos derivados da caseína**

As caseínas do LB,  $\alpha_1$ -caseína ( $\alpha_1$ -CN),  $\alpha_2$ -caseína ( $\alpha_2$ -CN), e  $\beta$ -caseína ( $\beta$ -CN) possuem *clusters* (aglomerados) de fosfoserina semelhantes aos dos LV. Assim, a proteólise de frações da caseína do LB podem produzir fosfopeptídeos semelhantes aos obtidos a partir da caseína do LV. Por exemplo, o N-terminal da sequência de aminoácidos do fragmento da  $\beta$ -CN 1-25 (f 1-25) do LB difere apenas no resíduo de aminoácido 25 (ABD EL-SALAM *et al.*, 2013).

Ambas,  $\beta$ -CN do LB e do LV apresentam a mesma sequência de aminoácidos na região 165-209. Atividades multifuncionais têm sido descritas para o peptídeo  $\beta$ -CN (f 193-209) do LV (RICCI *et al.*, 2010) e do colostro de búfala (D'AMBROSIO *et al.*, 2008; ROHIT *et al.*, 2012). Estes biopeptídeos exibem atividades imunomoduladoras e contêm a sequência do peptídeo bioativo de inibição da ACE, denominado de  $\beta$ -casoquinina-10, que atua no controle da pressão arterial. Portanto,  $\beta$ -CN (f 193-209) do LB pode ser considerado como um precursor para os peptídeos com potencial imunestimulador e inibidor da atividade da ACE (ABD EL-SALAM *et al.*, 2013).

Um outro peptídeo inibidor da ACE foi obtido a partir da ação da proteinase PR4 produzida pelo *Lactobacillus helveticus* em caseína do LB. Este peptídeo foi identificado como o fragmento  $\beta$ -CN (f 58-66), que tem a sequência de uma parte do peptídeo da ACE (f 58-76), liberado da  $\beta$ -CN do leite de vaca sob as mesmas condições (MINERVINI *et al.*, 2003). O  $\beta$ -búfalo CN (f 58-66) também compartilha da mesma sequência do  $\beta$ -casomorfina 7 (f 60-66), o qual exibe ação inibidora da atividade da enzima ACE, além da sua função como opiáceo. Assim, o peptídeo  $\beta$ -CN (f 58-66) do LB pode ter atividades multifuncionais.

A maioria dos peptídeos opioides são fragmentos de  $\beta$ -CN, chamados de  $\beta$ -casomorfina em razão das suas propriedades semelhantes à atuação da morfina, substância usada no tratamento da dor (YOSHIKAWA *et al.*, 1986), enquanto outros podem ser obtidos a partir da hidrólise de  $\alpha$ <sub>1</sub>-CN (MEISEL e SCHLIMME, 1990). No leite de vaca, vários peptídeos opioides resultam da  $\beta$ -CN (f 57-74) (MEISEL, 2004). Assim, a semelhança das sequências de aminoácidos do  $\beta$ -CN (f 58-84) entre o LB e o LV sugere que peptídeos bioativos similares podem ser obtidos a partir das duas fontes (ABD EL-SALAM *et al.*, 2013).

Estudos desenvolvidos por De Simone *et al.* (2011), indicaram que a ação de enzimas na coagulação do LB, dentre as quais as proteases endógenas (produzidas pela microbiota natural do leite) e pela cultura *starter* adicionada, um grande número de peptídeos foram encontrados no queijo mozzarella e no soro formado a partir da sua produção, onde os peptídeos,  $\beta$ -CN (f 57-68) e  $\beta$ -CN (f 60-68) foram identificados. Estes peptídeos são precursores dos opioides  $\beta$ -casomorfina-7 e  $\beta$ -casomorfina-5. Além disso, estes peptídeos apresentaram uma potente atividade antioxidante (DE SIMONE *et al.*, 2009). Ainda neste estudo, o fracionamento destes peptídeos por cromatografia líquida de fase reversa de elevado desempenho (HPLC-RP) produziu cinco subfrações, sendo que, dessas, apenas uma delas mostrou acentuado efeito antibacteriano, com redução de 67% no crescimento bacteriano.

Alguns peptídeos bioativos derivados da  $\alpha$ -CN têm atividade antimicrobiana. O peptídeo  $\alpha$ <sub>1</sub>-CN (f 1-23) do LB difere do homólogo bovino  $\alpha$ <sub>1</sub>-CN (f 1-23) em duas substituições de aminoácidos (E14  $\rightarrow$  G14 e H4  $\rightarrow$  P4) (HEMÁNDEZ-LEBLSESMA *et al.*, 2011). Há relatos que o peptídeo bovino  $\alpha$ <sub>1</sub>-CN (f 1-23) apresenta atividade antimicrobiana. Esse peptídeo também foi identificado no leite cru de búfala (DE SIMONE *et al.*, 2011). No entanto, essa atividade ainda não foi comprovada experimentalmente. Bajaj *et al.* (2005), em estudos utilizando-se membranas de troca iônica,

separaram e purificaram parcialmente peptídeos catiônicos obtidos da digestão das  $\alpha_1$ -CN e  $\alpha_2$ -CN do leite de búfala. Esses peptídeos atuam como antimicrobianos contra *Micrococcus leutenus*, *Escherichia coli* e *Bacillus cerus*. Os peptídeos derivados da  $\alpha_1$ -CN em leite de búfala têm sido considerados mais potentes do que os derivados da  $\alpha_2$ -CN.

O peptídeo C-terminal,  $\alpha_2$ -CN (f 183-207) do LV possui atividade antibacteriana contra *Escherichia coli* (LAHAV; REGELSON, 1996). A semelhança da sequência de aminoácidos nesta região em leite bovino e bubalino sugere que peptídeos antimicrobianos podem ser derivados de ambas as fontes.

A ação da quimosina na  $\kappa$ -CN, em LB e LV, produz os macropeptídeos CMPs (f 106-169). Estes macropeptídeos têm ação bifidogênica (METWALLY *et al.*, 2001).

#### **4.2. Peptídeos bioativos derivados do soro do leite**

As  $\beta$ -LG presentes no LB e LV mostram alta homologia, pois diferem apenas nos aminoácidos dos domínios N-terminal e C-terminal (METWALLY *et al.*, 2001). A  $\beta$ -LG do leite bovino é fonte de peptídeos bioativos multifuncionais (MADUREIRA *et al.*, 2007), como anti-hipertensivos, antimicrobianos, antioxidantes, imunomoduladores, anti-carcinogênicos, opioides, hipocolesterolêmicos, e outros efeitos metabólicos (CHATTERTON *et al.*, 2006). Portanto, a  $\beta$ -LG do leite bubalino pode ser considerada uma fonte potencial de peptídeos bioativos semelhantes aos obtidos a partir do leite de vaca  $\beta$ -LG.

A  $\alpha$ -LA do LV também tem sido relatada como fonte de peptídeos bioativos (KAMOU *et al.*, 2010), os quais têm sido associados a diversas atividades biológicas, como a ação anti-hipertensiva, antimicrobiana, imunomodulatória, anticarcinogênica, opiácea e prebiótica (PIHLANTO; KORHONEN, 2003; CHATTERTON *et al.*, 2006). A semelhança nas sequências de aminoácidos da  $\alpha$ -LA do soro do leite de búfala e de vaca sugere que o LB pode ser uma fonte de peptídeos bioativos similares aos derivados da  $\alpha$ -LA do LV.

A contribuição para uma nutrição saudável, atribuída aos peptídeos bioativos originados do leite, atualmente ingeridos com alimentos funcionais, tem sido amplamente discutida na comunidade científica. Os peptídeos bioativos do leite LB, com alegação de saúde comprovada, apresentam aplicação potencial para o desenvolvimento de produtos nutracêuticos, bem como alimentos funcionais promotores da saúde.

## 5. Considerações finais

O LB é um alimento funcional que inclui várias fontes de compostos bioativos multifuncionais, alguns dos quais com atividades diferentes daquelas encontradas no leite de vaca. O LB pode ser usado para diferentes fins, como o desenvolvimento de produtos alimentares inovadores que podem reduzir o risco de doenças e manter a saúde, uma nova tendência nos alimentos funcionais, nutrição e dietética. Outros componentes do LB, como fonte de bioativos e suas propriedades funcionais, precisam ainda ser investigados.

A estratégia para o aumento no consumo do LB está alicerçada na troca de informações entre pesquisadores, indústria e consumidores. Assim, uma população bem informada sobre os efeitos funcionais do LB poderá direcionar o aumento no consumo desse leite e de seus produtos lácteos funcionais. Para isso, um maior número de pesquisas direcionada para o LB, e sua divulgação em diversos níveis, poderia contribuir para o aumento da disponibilidade desses produtos e, ao mesmo tempo, para o aumento no consumo dos mesmos.

## 6. Referências

ABD EL-FATTAH, A. M.; ABD RABO, F. H. R.; SAMIA M EL-DIEB, S. M.; A EL-KASHEF, H. A. Changes in composition of colostrum of Egyptian buffaloes and Holstein cows. *BMC Veterinary Research*, p. 8-19, 2012.

ABD EL-SALAM, M. H.; EL-SHIBINY, S. A comprehensive review on the composition and properties of buffalo milk. *Dairy Science & Technology*, v. 91, p. 663-699, 2011.

ABD EL-SALAM, M. H.; EL-SHIBINY, S. Bioactive peptides of buffalo, camel, goat, sheep, mare, and yak milks and milk products. *Food Reviews International*, v. 29, n. 1, p. 1-23, 2013.

AGYEI, D.; DANQUAH, K. Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. *Biotechnology Advances*, v. 29, p. 272-277, 2011.

APARNA, H. S.; SALIMATH, P. V. Galactose terminated oligosaccharides activate macrophage respiratory burst. *Nutrition Research*, v. 14, p. 433-444, 1994.

APARNA, H. S.; SALIMATH, P. V. Studies on the acidic glycoproteins of buffalo colostrum and their influence on the growth of *Bifidobacterium bifidus*. *Nutrition Research*, v. 19, p. 295-303, 1999.

- AUNE, T. M.; THOMAS, E. L. Accumulation of hypothiocyanite ion during peroxidase catalysed oxidation of thiocyanate ion. *European Journal of Biochemistry*, v. 80, p. 209-214, 1977.
- BAJAJ, R. K.; NAZASIMHA, K.; MANN, B.; SANGWAN, R. B.; VIJ, S. Isolation of cationic peptides from buffalo  $\alpha$ s1 and  $\alpha$ s2 casein and their antibacterial activity. *Indian Journal of Dairy Science*, v. 58, p. 387-391, 2005.
- BALASUBRAMANTA, N. N.; SARWAR, N.; NARAYANAN, K. M. Effect of stage of lactation on oligosaccharides level in milk. *Indian Journal of Dairy & Bioscience*, v. 4, p. 58-60, 1993.
- BAVEYE, S.; ELASS, E.; MAZURIER, J.; SPIK, G.; LEGRAND, D. Lactoferrin: a multifunctional glycoprotein involved in the modulation of the inflammatory process. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, v. 37, p. 281-286, 1999.
- BERGER, A.; TURINI, M. E.; COLAROW, L. *Buffalo milk gangliosides*. US Patent No. 20,050,107,311, 2005.
- BRANTL, V.; TESCHEMACHER, H.; HEMSCHEM, A.; LOTTSPEICH, F. Novel opioid peptides derived from casein ( $\beta$ -casomorphins). *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie*, v. 360, p.1211-1216, 1979.
- BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, MINISTÉRIO DA SAÚDE – ANVISA. *Resolução RDC nº 2, de 7 de janeiro de 2002*. Regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional e ou de saúde. Brasília: ANVISA, 2002.
- BROWN, J. M.; McINTOSH, M. K. Conjugated Linoleic Acid in humans: regulation of adiposity and insulin sensitivity. *Journal of Nutrition, Rockville*, v. 133, n. 10, p. 3041-3046, 2003.
- COMISIÓN DEL CODEX ALIMENTARIUS – CAC. *Directrices para la conservación de la leche cruda mediante la aplicación del Sistema de la lactoperoxidasa*, CAC/GL, 1991.
- CAMPANELLA, L.; MARTINI, E.; PINTORE, M.; MAURO TOMASSETTI, M. Determination of Lactoferrin and Immunoglobulin G in Animal Milks by New Immunosensors. *Sensors*, v. 9, p. 2202-2221, 2009.
- CHATTERTON, D. E. W.; SMITHERS, G.; ROUPAS, P.; BRODKORB, A. Bioactivity of  $\beta$  lactoglobulin and  $\alpha$  lactalbumin – technological implications for processing. *International Dairy Journal*, v. 16, p. 1290-1240, 2006.
- CLARE, D. A.; SWAISGOOD, H. E. Bioactive milk peptides: a prospectus. *Journal of Dairy Science*, v. 83, p.1187-1195, 2000.
- COLAROW, L.; TURINIA, M.; TENEBERG, S.; BERGER, A. Characterization and biological activity of gangliosides in buffalo milk. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1631, p. 94-106, 2003.

CORNISH, J.; CALLON, K. E.; NAOT, D.; PALMANO, K. P.; BANOVIC, T.; BAVA, U. *et al.* Lactoferrin is a potent regulator of bone cell activity and increases bone formation in vivo. *Endocrinology*, v. 145, p. 4366-4374, 2004.

CORNISH, J.; PALMANO, K.; CALLON, K. E.; WATSON, M.; LIN, J. M.; VALENTI, P.; NAOT, D.; GREY, A. B.; REID, I. R. Lactoferrin and bone; structure–activity relationships. *Biochemistry & Cell Biology*, v. 84, p. 297-302, 2006.

D’AMBROSIO, C.; ARENA, S.; SALZANO, A. M.; RENZONE, G.; LEDDA, L.; SCALONI, A. A proteomic characterization of water buffalo milk fractions describing PTM of major species and the identification of minor components involved in nutrient delivery and defense against pathogens. *Proteomics*, v. 8, p. 3657-3666, 2008.

DE SIMONE, C.; PICARIELLO, G.; MAMONE, G.; STIUSO, P.; DICITORE, A.; VANACORE, D.; CHIANESE, L.; ADDEO, F.; FERRANTI, P. Characterisation and cytomodulatory properties of peptides from mozzarella di bufala campana cheese whey. *Journal of Peptide Science*, v. 15, p. 251-258, 2009.

DE SIMONE, C.; FERRANTI, P.; PICARIELLO, G.; SCOGNAMIGLIA, I.; DICITORE, A.; CHIANESE, L.; ADDEO, F.; STIUSO, P. Peptides from water buffalo cheese whey induced senescence cell death via ceramide secretion in human colon adenocarcinoma cell line. *Molecular Nutrition & Food Research*, v. 55, p. 229-238, 2011.

DIMITROV, T.; BOYCHEVA, S.; PAVLOV, A.; SLAVOVA, S.; ZHELEVA, N. Preservation of buffalo milk through activation of its natural inhibiting system (LPS). I. Chemical activation of milk LPS. *Animal Science*, Sofia, v. 63, n. 2, p. 73-75, 2006.

EDER, K.; RINGSEIS, R. Metabolism and actions of conjugated linoleic acids on atherosclerosis-related events in vascular endothelial cells and smooth muscle cells. *Molecular Nutrition & Food Research*, p. 54, n. 1, p. 17-36, 2010.

EL-LOLY, M. M.; AWAD, A. A.; MANSOUR, A. I. A Thermal kinetics denaturation of buffalo immunoglobulins. *International Journal of Dairy Science*, v. 2, p. 292-301, 2007.

EMSLEY, P.; FOTINOU, C.; BLACK, I.; FAIRWEATHER, N. F.; CHARLES, I. G.; WATTS, C.; HEWITT, E.; ISAACS, N. W. The structures of the HC fragment of tetanus toxin with carbohydrate subunit complexes provide insight into ganglioside binding. *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, p. 8889-8894, 2000.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO. *Report on functional foods*. Food Quality and Standard Services (AGNS). Rome: FAO/ONU, 2007.

FARNAUD, S.; EVANS, R. W. Lactoferrin a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Molecular Immunology*, v. 40, p. 395-405, 2003.

FAYE, B.; KONUSPAYEVA, G. The sustainability challenge to the dairy sector – The growing importance of non-cattle milk products worldwide. Keynote presentation, IDF.

In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SHEEP'S, GOAT'S AND OTHER NON-COW MILK, Athens, Greece, 16-18, may, 2011.

FERNANDES, S. A. A.; MATTOS, W. R. S.; MATARAZZO, S. V.; TONHATI, H.; SUNDFELD GAMA, M. A.; LANNA, D. P. D. Activity of  $\Delta 9$ desaturase enzyme in mammary gland of lactating buffaloes. *Italian Journal of Animal Science*, v. 6, n. 2, p. 1060-1062, 2007.

FISCHER-POSOVSZKY, P.; KUKULUS, V.; ZULET, M. A.; DEBATIN, K. M.; WABITSCH, M. Conjugated linoleic acid promote human fat cell apoptosis. *Hormone and Metabolic Research*, v. 39, n. 3, p. 186-191, 2007.

FITZGERALD, R. J.; MURRAY, B. A. Bioactive peptides and lactic fermentations. *International Dairy Journal*, v. 59, p. 118-125, 2006.

FUKUNAGA, K.; TOYODA, T.; ISHIDA, H.; KISO, M. Synthesis of lacto- and neolacto-series ganglioside analogs containing *N*-glycolylneuraminic acid: Probes for investigation of specific receptor structures recognized by influenza A viruses. *Journal of Carbohydrate Chemistry*, v. 22, p. 919-37, 2003.

GALVÃO JÚNIOR, J.G.B., A.H.N. RANGEL, H.R. MEDEIROS, J.B. SILVA, E.M. AGUIAR, R.C. MADRUGA AND D.M. LIMA JÚNIOR (2010). Efeito da produção diária e da ordem de parto na composição físico-química do leite de vacas de raças zebuínas. *Acta Veterinária Brasília*, v. 4, p. 25-30, 2010.

GARCIA, C.; NORBERT, W.; LUTZ, B. C.; SYLVIANE CONFORT-GOUNY, B. C., PATRICK, J.; COZZONE MARTINE ARMAND, A.; MONIQUE BERNAR. Phospholipid fingerprints of milk from different mammals determined by  $^{31}\text{P}$  NMR: Towards specific interest in human health. *Food Chemistry*, v. 135, p. 1777-1783, 2012.

GAUTHIER, S. F.; POULIOT, Y.; SAINT-SAUVEUR, D. Immunomodulatory peptides obtained by the enzymatic hydrolysis of whey proteins. *International Dairy Journal*, v.16, n. 11, p.1315-132, 2006.

GIACINTI, G.; BASIRIC, L.; RONCHI, B.; BERNABUCCI, U. Lactoferrin concentration in buffalo milk. *Italian Journal of Animal Science*, v. 12, n.1, 2013.

GOBBETTI, M.; MINERVINI, F.; RIZZELLO, C. G. Bioactive peptides in dairy products. In: HUI, Y. H. (Ed.). *Handbook of food products manufacturing*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2007. p. 489-517.

GONZALEZ, S.; NIEUWENHOVE, C. V.; PEREZ-CHAIA, A.; DE RUIZ HAP. Conjugated linoleic acid in buffalo (*Bubalus bubalis*) milk from Argentina. *Milchwissenschaft*, v. 59, p. 506-508, 2004.

GUDIÉL-URBANO, M.; GOÑI, I. Oligosacáridos de la leche humana. Papel en la salud y en el desarrollo del lactante. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, v. 51, n. 4, 2001.

- GUILLOTEAU, P. A.; VERONIQUE, R.; LUC, D.; FRANCOIS, M.; LOIC, R.; CHAYVIALLE, J. A. A new role of phosphopeptides as bioactive peptides released during milk casein digestion in the young mammal: Regulation of gastric secretion. *Peptides*, v. 30, p. 2221-2227, 2009.
- GUILLOTEAU, P. A.; VERONIQUE, R.; LUC, D.; FRANCOIS, M.; LOIC, R.; CHAYVIALLE, J. A. Is caseinomacropeptide from milk proteins, an inhibitor of gastric secretion? *Regulatory Peptides*, v. 159, p. 129-136, 2010.
- HAQUE, E.; CHAND, R.; KAPILA, S. Biofunctional properties of bioactive peptides of milk origin. *Food Reviews International*, v. 25, n. 1, p. 28-43, 2009.
- HARTMANN, R.; MEISEL, H. Caseinophosphopeptides and their cell modulating potential. *Biofactors*, v. 21, p. 73-78, 2004.
- HARTMANN, R.; MEISEL, H. Food-derived peptides with biological activity: From research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 18, p. 163-169, 2007.
- HE, F.; TUOMOLA, E.; ARVILOMMI, H.; SALMINEN, S. Modulation of human humoral immune response through orally administered bovine colostrum. *Elsevier Science B.V. Federation of European Microbiological Societies*, v. 31, p. 93-96. 2001.
- HEMÁNDEZ-LEBLSESMA, B.; CONTRERAS, M. D.; RECIO, I. Antihypertensive peptides, production, bioavailability and incorporation in foods. *Adv. Colloid and Interface Science*, v.165, p. 23-35, 2011.
- INTERNATIONAL DAIRY FOOD – IDF. *The world dairy situation 2010*. Buffalo milk, 2010, p. 8 - 9. (Bulletin of the IDF No. 446/2010).
- IDOTA, T.; KAWAKAMI, H.; MURAKAMI, Y.; SUGAWARA, M. Inhibition of cholera toxin by human milk fractions and sialyllactose. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 59, p. 417-419, 1995.
- IDOTA, T.; KAWAKAMI, H. Inhibitory effects of milk gangliosides on the adhesion of escherichia coli to human intestinal carcinoma cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v.59, p. 69-72, 1995.
- IMRAN, M.; KHAN, H.; HASSAN, S. S.; KHAN, R. Physicochemical characteristics of various milk samples available in Pakistan. *Journal of Zhejiang University Science B*, v. 9, n. 7, p. 546-551, 2008.
- KAKAR, M. U. H.; KAKAR, M. A.; SHAHWANI, M. N.; AHMED, N.; ARAIN, M. A.; KHASKHAILI, M. Stabilization of fresh buffalo milk by activating lactoperoxidase system. *Journal of Animal and Plant Sciences*, v. 23, p. 90S1-93S1, 2013.
- KAMOU, S. M.; LU, R.; CHEN, W.; LIU, X.; TIAN, F.; SHEN, Y.; GAO, T. Functional significance of bioactive peptides derived from milk proteins. *Food Reviews International*, v. 26, p. 386-401, 2010a.

- KAMOU, S. M.; CHEISON, S. C.; CHEN, W.; LIU, X. M.; LU, R-R. Alpha-lactalbumin, its production technologies and bioactive peptides. *Comprehensivy Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 9, p. 197-212, 2010b.
- KORHONEN, H.; PIHLANTO, A. Bioactive peptides, production and functionality. *International Dairy Journal*, v. 16, p. 945-960, 2006.
- KORHONEN, H. Bioactive components in buffalo milk. In: YOUNG, W. (Ed.) *Bioactive components in milk and dairy products*. 1.ed. Park: Wiley-Blackwell, 2009. 426 p.
- KUMARI, V.; MATHUR, M. P. Buffalo milk lysozyme. *Indian Journal of Dairy Science*, v. 34, p. 385-390, 1981.
- KUMAR, R.; BHATIA, K. L. Standardization of method for lactoperoxidase assay in milk. *Lait*, v. 79, p. 269-274, 1999.
- KUMAR, J. S.; KANSAL, V. K. Effect of breed and parity of animals, stage of lactation and processing of milk on the content of conjugated linoleic acid in dairy products. *Milchwissenschaft*, v. 60, p. 370-372, 2005.
- KUNZ, C.; RUDLOFF, S.; BAIER, W.; KLEIN, N.; STROBEL, S. Oligosaccharides in human milk: Structural, functional, and metabolic aspects. *Annual Review of Nutrition*, v. 20, p. 699-722, 2000.
- KUTILA, T.; PYÖRÄLÄ, S.; SALONIEMI, H.; KAARTINEN, L. Antibacterial effect of bovine lactoferrin against udder pathogens. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 44, p. 35-42, 2003.
- LAEGREID, A.; OTNAESS, A. B. K. Trace amounts of ganglioside GM1 in human milk inhibits enterotoxin from vibrio cholerae and escherichia coli. *Life Science*, v. 40, p. 55-62, 1987.
- LAHAV, E.; REGELSON, E. Antibacterial and immunostimulating casein derived substances from milk: Casecidin and isracidin peptides. *Food and Chemical Toxicology*, v. 31, p.131-145, 1996.
- LAW, B. A.; REITER, B. The isolation and bacteriostatic properties of lactoferrin from bovine milk whey. *Journal of Dairy Research*, v. 44, p. 595-599, 1997.
- LONNERDAL, B. Biochemistry and physiological function of human milk proteins. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 42, p. 1299-1317, 1985.
- LONNERDAL, B.; IYER, S. Lactoferrin: molecular structure and biological function. *Annual Review of Nutrition*, v. 15, p. 93-110, 1995.
- LÓPEZ-EXPÓSITO, I.; AMIGO, A. L.; RECIO, I. Casein hydrolysates as a source of antimicrobial, antioxidant and antihypertensive peptides. *Lait*, v. 87, p. 241-249, 2007.
- MADUREIRA, A. R.; PEREIRA, C. I.; GOMES, M. P.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. Bovine whey proteins-Overview on the main biological properties. *Food Research International*, v. 40, p.1197-1211, 2007.

MAGALHÃES, K. T.; PEREIRA, G. V. M.; CAMPOS, C. R.; DRAGONE, G.; SCHWAN, R. F. Brazilian kefir: microbial communities and chemical composition. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 42, p. 693-702, 2011.

MARNILA, P.; KORHONEN, H. Immunoglobulins. In: ROGINSKI, H.; FUQUAY, J. W.; FOX, P. F. (Ed.). *Encyclopedia of dairy science*. London, UK: Academic Press, 2002. p. 1950-1956.

MASUD, T; KHALID, S.; MAQSOOD, S.; BILAL, A. preservation of raw buffalo's milk by the activation of lactoperoxidase system and its effect on yogurt preparation. *Journal of Food Processing and Preservation*, v. 34, p. 241-254, 2010.

MARTÍNEZ AUGUSTIN, O.; MARTÍEZ DE VICTORIA MUNOZ, E. Proteína e peptídeos em nutrição enteral. *Nutrición Hospitalaria*, v. 2, p.1-14, 2006.

MEDHAMMAR, E., BETTONI, R. W.; STADLMAYR, B.; NILSSON, E.; CHARRONDINE, U. R.; BURLINGAME, B. Composition of milk from minor dairy animals and buffalo breeds: a biodiversity perspective. *Journal of Science Agriculture*, v. 92, n. 3, p. 445-474, 2012.

MEDINA, F. S.; DADDAOUA, A.; REQUENA, P.; CAPITÁN-CANÃDAS, F.; ZARZUELO, A.; DOLORES SUAREZ, M.; MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O. New insights into the immunological effects of food bioactive peptides in animal models of intestinal inflammation. *Proceedings of the Nutrition Society*, v. 69, p. 454-462, 2010.

MEHRA, R.; KELLY, P. Milk oligosaccharides: Structural and technological aspects. *International Dairy Journal*, v.16, n. 11, p. 1334-1340, 2006.

MEISEL, H.; SCHLIMME, D.E. Milk proteins: precursors of bioactive peptides. *Trends in Food Science & Technology*, v. 1, p. 41-43, 1990.

MEISEL, H. Multifunctional peptides encrypted in milk proteins. *Biofactors*, v. 21, p. 55-61, 2004.

MELLANDER, O. The physiological importance of the casein phosphopeptide calcium salt. II. Peroral calcium dosage of infants. *Acta Societatis Medicorum Upsaliensis*, v. 55, p. 247-255, 1950.

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

METWALLY, M. M.; EL-SHIBINY, S.; EL-DIEB, S. M.; EL-ETRIBY, H. M.; ASEEM, F. M. Large scale preparation and growth promoting effect on bifidobacteria of glycomacropeptide from sweet whey. *Egyptian Journal of Dairy Science*, v. 29, p. 37-52, 2001.

MIHAYLOVA, G.; PEEVA, T. Trans fatty acids and conjugated linoleic acid in the buffalo milk. *Italian Journal of Animal Science*, v. 6, p. S1056-S1059, 2007.

MILLS, S.; ROSS, R. P.; HILL, C.; FITZGERALD, G. F.; STANTON, C. Milk intelligence: Mining milk for bioactive substances associated with human health. *International Dairy Journal*, v. 21, p. 377-401, 2011.

MINERVINI, F.; ALGARON, F.; RIZZELLO, C. G.; FOX, P. F.; MONNET, V.; GOBETTI, M. Angiotension I converting enzyme inhibitory and antibacterial peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 proteinase hydrolyzed caseins of milk from six species. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, p. 5297-5305, 2003.

MOONEY, D.; MCARTHY, C.; BELTON, O. Effects of conjugated linoleic acid isomers on monocyte, macrophage and foam cell phenotype in atherosclerosis. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, v. 98, n. 3-4, p. 56-62, 2012.

MORO, G.; MINOLI, I.; MOSCA, M.; FANARO, S.; JELINEK, J.; STAHL, B.; BOEHM, G. Dosage-related bifidogenic effects of galacto- and fructooligosaccharides in formula-fed term infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, v. 34, p. 291-295, 2002.

NAIDU, A. S. Lactoperoxidase: In: NAIDU, A. S. (Ed). *Natural food antimicrobial systems*. Boca Raton: CRC Press. p.103-132, 2000.

NEJATI, F.; RIZZELLO, C. G.; DI CAGNO, R.; SHEIKH-ZEINODDIN, M.; DI VICCARO, A.; MINERVINI, F.; GOBETTI, M. Manufacture of a functional fermented milk enriched of angiotensin-I converting enzyme (ACE)- inhibitory peptides and g-amino butyric acid (GABA). *LWT. Food Science and Technology*, v. 51, n.1, p. 183-189, 2013.

NIEUWENHOVE, C. P.; GUTERREZ, C. V.; NUNEZ, M. S.; GONZALEZ, S. N. Lactoperoxidase and lyzosome activity in buffalo milk from Argentina. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, v. 3, p. 431-433, 2004.

NIKKHAH, A. Equidae, camel and yak milks as functional foods: A review. *Nutrition and Food Science*, v. 1, n. 5, p. 1-5, 2011.

OZDEMIR, H.; HACIBEYOGLU, H. I.; USLU, H. Purification of lactoperoxidase from Greek-water buffalo milk and investigation of kinetic and antibacterial properties. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, v. 32, p. 143-155, 2002.

PANDYA, A. J.; KHAN, M. M. H. Buffalo milk. In: PARK, Y. W.; HAENLEIN, G. F. W. (Ed.). *Handbook of milk of non bovine mammals*. Ames, Iowa: Blackwell Publishing Professional, 2006. p.195-273.

PANDYA, A. J.; HAENLEIN, G. F. W. *Bioactive components in buffalo milk*. Bioactive components in milk and dairy products. 1. ed., Wiley-Blackwell, 2009. 426 p.

PARK, E. J.; SUH, M.; THOMSON, B.; MA, D. W. L.; RAMANUJAM, K.; THOMSON, A. B. R. *et al.* Dietary ganglioside inhibits acute inflammatory signals in

intestinal mucosa and blood induced by systemic inflammation of *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Shock*, v. 28, p. 112-117, 2007.

PARK, Y. W. Overview of bioactive components in milk and dairy products. In: PARK, Y. W. (Ed.). *Bioactive components in milk and dairy products*. 1. ed. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2009. 426 p.

PIERRE, A. S.; MINVILLE-WALZ, M.; FEVRE, C.; HICHAMI, A.; GRETI, J.; LAURENT PICHON, L.; BELLENGER, S.; BELLENGER, J.; GHIRINGHELLI, F.; NARCE, M.; RIALLAND, M. Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid induced cell death in human colon cancer cells through reactive oxygen species-mediated ER stress. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1831, p. 759-768, 2013.

PIHLANTO, A.; KORHONEN, H. Bioactive peptides and proteins. In: TAYLOR, S. L. (Ed.). *Advances in food and nutrition research*. San Diego, CA: Elsevier Inc., 2003. p. 175-276.

PRIYADARSHINI, S.; KANSAL, V. K. Lysozyme activity in buffalo milk: effect of lactation period, parity, mastitis, season in India, pH and milk processing heat treatment. *Journal of Animal Science*, v. 15, n. 6, p. 895-899, 2002a.

PRIYADARSHINI, S.; KANSAL, V. K. Purification, characterization, antibacterial activity and N-terminal sequencing of buffalo-milk lysozyme. *Journal of Dairy Research*, v. 69, p. 419-431, 2002b.

PRUITT, K. M.; REITER, B. Biochemistry of the peroxidase system. In: PRUITT, K. M.; TENEVUO, J. O. (Ed.). *The lactoperoxidase system: Chemical, biological significance*. New York: Marcel Dekker, 1985. p. 143-178.

PUENTE, R.; GARCIA-PARDO, L. A.; HUESO, P. Gangliosides in bovine milk. Changes in content and distribution of individual ganglioside levels during lactation. *Biological Chemistry*, v. 373, p. 283-288, 1992.

QUIAN, B.; XING, M.; CUI, L.; DENG, Y.; XU, Y.; HUANG, M.; ZHANG, S. Antioxidant, antihypertensive and immunomodulatory activities of peptide fractions from fermented skim milk with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* LB340. *Journal of Dairy Research*, v. 78, n. 1, p. 2-9, 2011.

RAMBABU; VARSHNEY, M. L.; SOGI, D. S. Preservation of raw milk with lactoperoxidase system. *Journal of Science and Technology*, v. 41, p. 42-46, 2004.

REITER, B. The lactoperoxidase system of bovine milk. In: PRUITT, K. M.; TENOVUO, J. O. *The lactoperoxidase system*, New York: Marcel Dekker, 1985. p. 123-141.

REITER, B.; HARNULV, G. Lactoperoxidase antibacterial system: Natural occurrence, biological functions and practical applications. *Journal of Food Protection*, v. 47, p. 724-732, 1984.

RICCI, I.; ARTACHO, R.; OLALLA, M. Milk protein-peptides with angiotension I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 50, p. 390-402, 2010.

RIGUEIRA, J. C. S. *Desenvolvimento de metodologia analítica para detecção de adulteração pela adição de leite em pó e leite fluído*. 2006. 58 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 2006.

ROHIT, A. C.; SATHISHA, K.; APARNA, H. S. A variant peptide of buffalo colostrum  $\beta$ -lactoglobulin inhibits angiotensin I-converting enzyme activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 53, p. 211-219, 2012.

RUEDA, R.; MALDONADO, J.; GIL, A. Comparison of content and distribution of human milk gangliosides from Spanish and Panamanian mothers. *Annals of Nutrition and Metabolism*, v. 40, p. 194-201, 1996.

SALCEDO, J.; BARBERA, R. A.; MATENCIO, B. E.; ALEGRÍA, A. A.; LAGARDA, M. J. Gangliosides and sialic acid effects upon newborn pathogenic bacteria adhesion: An in vitro study. *Food Chemistry*, v. 136, p. 726-734, 2013.

SAKSENA, R.; DEEPAK, D.; KHARE, A.; SAHAI, R.; TRIPATHI, L. M.; SRIVASTAVA, V. M. L. A novel pentasaccharide from immune stimulant oligosaccharide fraction of buffalo milk. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1428, p. 433-445, 1999.

SANGWAN, R. B.; SIRNIVASULU, R.; MANN, B.; BAJAJ, R. K. Antibacterial activity of buffalo lactoferrin hydrolysates against *Bacillus subtilis*. *Indian Journal of Dairy Science*, v. 60, p. 165-167, 2007.

SHARON, N.; OFEK, I. Safe as mother's milk: Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for bacterial diseases. *Glycoconjugate Journal*, v. 17, p. 659-664, 2000.

SIEBER, R.; BÜTIKOFER, U.; EGGER, C.; PORTMANN, R.; WALTHER, B.; WECHSLER, D. ACE-inhibitory activity and ACE-inhibiting peptides in different cheese varieties. *Dairy Science and Technology*, v. 90, p. 47-73, 2010.

SONG, A. A.; SNEDDON, S. D.; HEYS, K. W. J. Wahle Regulation of fatty acid synthase (FAS) and apoptosis in estrogen-receptor positive and negative breast cancer cells by conjugated linoleic acids. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, v. 87, n. 6, p. 197-203, 2012.

STEIJNS, J. M.; VAN HOOIJDONK, A. C. Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin. *British Journal of Nutrition*, v. 84, p. S11-S17, 2000.

SWAMINATHAN, S.; ESWARAMOORTHY, S. Structural analysis of the catalytic and binding sites of *Clostridium botulinum* neurotoxin B. *Nature Structural & Molecular Biology*, v. 7, p. 693-699, 2000.

TALPUR, F. N. *Fatty acid composition of ruminant milk, meat and dairy products of livestock in Sindh, Pakistan*. 2007. Ph. D. Thesis, University of Sindh, Jamshoro, Pakistan, 2007.

TAVARES, T. G.; CONTRERAS, M. M.; AMORIM, M.; MARTIN-AVAREZ, P. J.; PINTADO, M. E.; RECIO, I.; MALCATA, F. X. Optimisation, by response surface methodology, of degree of hydrolysis and ACE-inhibitory activities of whey protein hydrolysates obtained with cardoon extract. *International Dairy Journal*, v. 21, p. 926-933, 2011a.

TAVARES, T. G.; MONTERIO, K. M.; POSSENTI, A.; PINTADO, M. E.; CARVALHO, J. E.; MALCATA, F. X. Antiulcerogenic activity of peptide concentrates obtained from hydrolysis of whey proteins by proteases from *cynara cardunculus*. *International Dairy Journal*, v. 21, p. 926-933, 2011b.

TAVARES, T. G.; AMORIM, M.; GOMES, D.; PINTADO, M. E.; PEREIRA, C. D.; MALCATA, F. X. Manufacture of bioactive peptide-rich concentrates from Whey: Characterization of pilot process. *Journal of Food Engineering*, v. 110, p. 547-552, 2012.

TYAGI, A. K.; KEWALRAMANI, N.; DHIMAN, T. R.; KAYRA, H.; SINGHALA, K. K.; KANWAJIAA, S. K. Enhancement of the conjugated linoleic acid content of buffalo milk and milk products through green fodder feeding. *Animal Feed Science and Technology*, v. 133, p. 351-358, 2007.

URISTA, C. M.; FERNÁNDEZ, R. A.; RODRIGUEZ, F. R.; CUENCA, A. A.; JURADO, A. T. Review: Production and functionality of active peptides from milk. *Food Science and Technology International*, v. 17, n. 4, p. 293-317, 2010.

USDA, USDA National nutrient database for standard reference. 2009. Disponível em: <<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>>.

VARRICCHIO, M. L.; DI FRANCIA, A.; MASUCCI, F.; ROMANO, R.; PROTO, V. Fatty acid composition of Mediterranean buffalo milk fat. *Italian Journal of Animal Science*, v. 6, p. S509-S511, 2007.

WAKABAYASHI, H. Lactoferrin research, technology and applications. *International Dairy Journal*, v. 16, n. 11, p. 1241-1151, 2006.

VIARD, M.; PAROLINI, I.; RAWAT, S. S.; FECCHI, K.; SARGIACOMO, M.; PURI, A.; BLUMENTHAL, R. The role of glycosphingolipids in HIV signaling, entry and pathogenesis. *Glycoconjugate Journal*, v. 20, p. 213-22, 2004.

WALSTRA, P. Casein sub-micelles: do they exist? *International Dairy Journal*, v. 9, n. 3-6, p. 189-192, 1999.

WANG, Y. W.; JONES, P. J. Conjugated linoleic acid and obesity control: efficacy and mechanisms. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*, v. 28, n. 8, p. 941-55, 2004.

WIEGANDT, H. Gangliosides. In: WIEGANDT, H. (Ed.). *Glycolipids*. Amsterdam: Elsevier, 1985. p. 101-198.

WOLFSON, L. M.; SUMNER, S. S. Antibacterial activity of the lactoperoxidase system. A review. *Journal of Food Protection*, v. 56, p. 887-892, 1993.

YAMASAKI, M.; KISHIHARA, K.; IKEDA, I.; SUGANO, M.; YAMADA, K. A recommended esterification method for gas chromatographic measurement of conjugated linoleic acid. *Journal American Oil Chemist Society*, v. 76, n. 8, p. 933-938, 1999.

YOSHIKAWA, M.; TANI, F.; YOSHIMURA, T.; CHIBA, H. Opioid peptides from milk proteins. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 50, p. 2419-2421, 1986.

## **6.2. Artigo 2**

**SEASONAL VARIATIONS AFFECT THE PHYSICOCHEMICAL  
COMPOSITION OF BUFALLO MILK AND ARTISANAL CHEESES  
PRODUCED IN MARAJÓ ISLAND (PA, BRAZIL)**



## Seasonal Variations Affect the Physicochemical Composition of Buffalo Milk and Artisanal Cheeses Produced in Marajó Island (Pa, Brazil)

<sup>1</sup>M.G., Simões, <sup>2</sup>R.E. Portal, <sup>1</sup>J.G. Rabelo and <sup>2</sup>C.L.L.F. Ferreira

<sup>1</sup>Department of Food Technology, University of Pará State, Belém, PA, Brazil

<sup>2</sup>Department of Food Science and Technology, Federal University of Viçosa, Viçosa, MG, Brazil

**Abstract:** This research was carried out to evaluate the influence of seasonal variation in physicochemical composition and microbiological profile of buffalo milk and of the artisanal cream and butter types cheeses produced on Marajó Island. Eighteen farms located of the island were involved in the study. Milk and cheese quality were evaluated in two typical seasons. The rainy, from January to June and dry, from July to December. Samples were submitted to a detailed set of laboratorial analyses. Physicochemical composition of buffalo milk was influenced by the seasons. Compared to rainy, the dry period showed an increase in fat ( $5.53 \pm 0.71$  to  $6.74 \pm 1.19$ ) and lactose ( $4.77 \pm 0.20$  to  $5.20 \pm 0.20$ ) concentrations and reduction in total solids ( $16.89 \pm 0.92$  to  $15.77 \pm 1.54$ ), nonfat dry matter ( $9.94 \pm 0.36$  to  $8.99 \pm 1.23$ ) and minerals ( $0.84 \pm 0.12$  to  $0.62 \pm 0.09$ ) concentrations ( $p < 0.05$ ). The season influence was observed in physicochemical composition of both cheese-types. Compared to rainy season, in the cream cheese type, higher values ( $p < 0.05$ ) were found for titratable acidity ( $0.63 \pm 0.02$  to  $0.78 \pm 0.15$ ), fat ( $32.38 \pm 3.22$  to  $36.89 \pm 4.59$ ), fat in the dry matter ( $55.06 \pm 3.26$  to  $63.92 \pm 2.49$ ) but lower values for water activity ( $0.99 \pm 0.02$  to  $0.49 \pm 0.03$ ), minerals ( $2.37 \pm 0.55$  to  $1.40 \pm 0.02$ ) and calcium ( $0.28 \pm 0.08$  to  $0.18 \pm 0.07$ ). For the butter cheese type, in the dry season, higher values were found only for titratable acidity ( $0.49 \pm 0.02$  to  $0.38 \pm 0.0$ ) and lower values for water activity ( $0.18 \pm 0.07$  to  $0.45 \pm 0.08$ ). The study have shown that some components of the buffalo milk and artisanal cheeses produced on Marajó Island are influenced by the dry and rainy typical seasons and therefore, some sensory variations are expected around the year.

**Keywords:** Artisanal Marajó cheese, raw milk quality, seasonal variations

### INTRODUCTION

The production of buffalo milk and dairy products have grown increasingly to appeal to consumers looking for differentiated nutritional and functional quality, besides special characteristics and taste (Araujo *et al.*, 2012). This milk has elevated levels of fat, lactose, protein, Ca, Fe and P minerals, as well as A, C and B6 vitamins. In addition, it presents lower levels of vitamin E, riboflavin and cholesterol. Due to the absence of carotene and the presence of biliverdin (a green-blue pigment), as well as the presence of bioactive pentasaccharides and gangliosides, which are absent in cow milk, buffalo milk is the object of several revisions (Abd El-Salam and El-Shibiny, 2011; Araujo *et al.*, 2012; Medhammar *et al.*, 2012; Abd El-Salam and El-Shibiny, 2013).

Although the production of cow (83%), goat (2.2%) and sheep milk (1.3%) represent 87% of the world's production, buffalo milk is ranked second, with 13%, nearly 93 million tons/year (IDF, 2010), with an annual growth rate of 3.1%, over 1.8% the cow milk production. This estimate includes India and Pakistan

with the largest variety of breeds and highest number of animals, with respectively 68 and 28% of the world production (IDF, 2010).

In Brazil, the buffalo population is 1.185 million, the largest herd of the species in the Americas, with the highest concentration (38.5%) in the state of Pará. Out of this amount, 263,088 animals are on the Marajó Island (IBGE, 2010), where, in several municipalities, the buffalo dairy activity is a relevant income factor for a large part of small and medium scale rural producers, contributing to their community in the region (Bernardes, 2007).

On the island, most of buffalo milk is used for artisanal cheese production, since the region is far from consumer centers and out of collection circuits. The most traditional cheeses are the cream cheese type and butter cheese type (Bernardes, 2007). The preparation process of these cheeses results from a centenary tradition passed down through generations, which contributes to maintaining the special characteristics of the product and is part of the culture of the population (Silva and Oliveira, 2003).

**Corresponding Author:** M.G. Simões, Department of Food Technology, University of Pará State, Belém, PA, Brazil, Tel.: +55 91 32251850

According to technical regulation (Pará, 2013), Marajó Cheese is an artisanal product prepared in the geographical area of the archipelago of the same name, following historical and cultural tradition of the region. The cheeses are obtained by spontaneous coagulation, fusion and draining of curd of buffalo milk and/or buffalo added with bovine milk at a maximum proportion of 40%, which is washed with water and buffalo or bovine milk, then added with cream or butter. They have a soft, compact and closed texture, with small and few pores, pleasant aroma, greenish-yellow color (Simões *et al.*, 2013); also, they are slightly acidic and salty and appropriate for immediate consumption (Pará, 2013).

At the high milk season, with nearly 12 tons/day volume, cheese production is estimated in 1.500 kg/day originating from nearly 60 dairies located mainly in the municipality of Cachoeira do Arari, Soure and Salvaterra, Arari region, Marajó Island (PA, Brazil) (SEBRAE, 2013).

Since the Marajó island is situated near the equator line, it presents a wet tropical climate with an annual mean temperature of 28°C, mean thermal amplitude of 4°C and relative moisture variations between 80 and 90% (Lima *et al.*, 2005; Brazil, 2007). However, in this region, rainfall can be considered the main meteorological variable, with the seasonal rainfall regime, given that it has a rainy period, from January to June, in which the rain concentration is nearly 3000 mm, corresponding to 86% of the total annual rainfall, and a dry period, from July to December, with 487 mm, equivalent to 14% of this total (INMET, 2011). This climate variation causes buffalo milk production inconsistency throughout the year, following season and off-season periods, resulting from higher or lower availability of natural native pastures, the only food source for buffalos in Marajó.

The effects of seasonal variation in milk production and quality is important because it influences the quality of milk products, which depend on composition, which in turn varies according to location, lactation stage, breed and species, milking system, animal age and size, environment, climate, temperature and diet composition (Galvão *et al.*, 2010). Hence, buffalo milk and dairy production and composition can be directly influenced by the season, as it affects food availability and quality for animals (Bastianetto *et al.*, 2005). Several studies show the effects of seasonal variation on buffalo milk composition in different regions (Rangel *et al.*, 2010, 2011; Araujo *et al.*, 2011; Araujo *et al.*, 2012).

Considering the socioeconomic and cultural importance of the production of artisanal Marajó cheeses and the factors influencing quality, this study aims to evaluate the effects of seasonal variation on physicochemical and microbiological composition of buffalo milk and artisanal cream cheese type and butter cheese type, produced on Marajó Island.

## MATERIALS AND METHODS

**Experimental design:** The study was carried out in 18 dairies located in the municipalities of Soure, Salvaterra and Cachoeira do Arari, Arari region, in the Marajó Island, Northern extreme of Pará State (PA, Brazil), situated between parallels 0°38' N and 1°55' S and meridians 48°20' W Gr and 51°57'. This region has great areas of natural pastures and flooding fields; therefore, it is adequate for milk and cheese production. In these three municipalities, the buffalos were maintained in natural pastures throughout the whole year, without food supplements in the dry season. The buffalo milk used in the preparation of the Marajó cheeses was obtained by manual milking.

Milk samples were collected in three municipalities. Samples of butter cheese type were collected in the municipality of Cachoeira do Arari and cream cheese type samples, in Soure and Salvaterra. The collections were carried out at two periods of time: in July of 2012, corresponding to the rainy season, harvest period and in December of 2012, corresponding to the dry season, off season.

**Cheese manufacturing:** Preparation of the artisanal cream cheese type and butter cheese type followed typical production procedures, traditionally used in the region:

- **Cream cheese type:** After morning milking, raw buffalo milk was partially skimmed in an electric centrifuge and submitted to spontaneous fermentation at a mean temperature of 28°C, for 24 h. Subsequently, the whey was manually removed and washed twice with water (2l water/1 kg curd mass) under heating (70°C, 15 min), for acidity reduction. A third wash with buffalo milk (2l milk/1 kg curd mass) was carried out, also under heating (70°C, 15 min); to fuse taste and components lixiviated by water, in other words, soluble solids. The paste was stretched on a table to reduce temperature to 40°C; then, it was pressed mechanically for removal of excess whey, cut into cubes and ground in a manual or an electric grinder, into small particles, assuming the appearance of meal. Salt (15 g/1 kg curd mass) and cream (1l cream/1 kg curd mass), obtained from the milk skimming, were added to the ground paste which was submitted to thermal treatment (80°C, 20 min) and continuous manual mixing. In this stage stretching occurred, the fused paste was distributed into Plastic Polypropylene (PP) packaging and cooled at room temperature (28°C).
- **Butter cheese type:** In the preparation of this cheese, raw milk was submitted to spontaneous fermentation at mean temperature of 28°C, for 24 h. The fermented cream, formed on the surface, was removed for butter production. The stages of

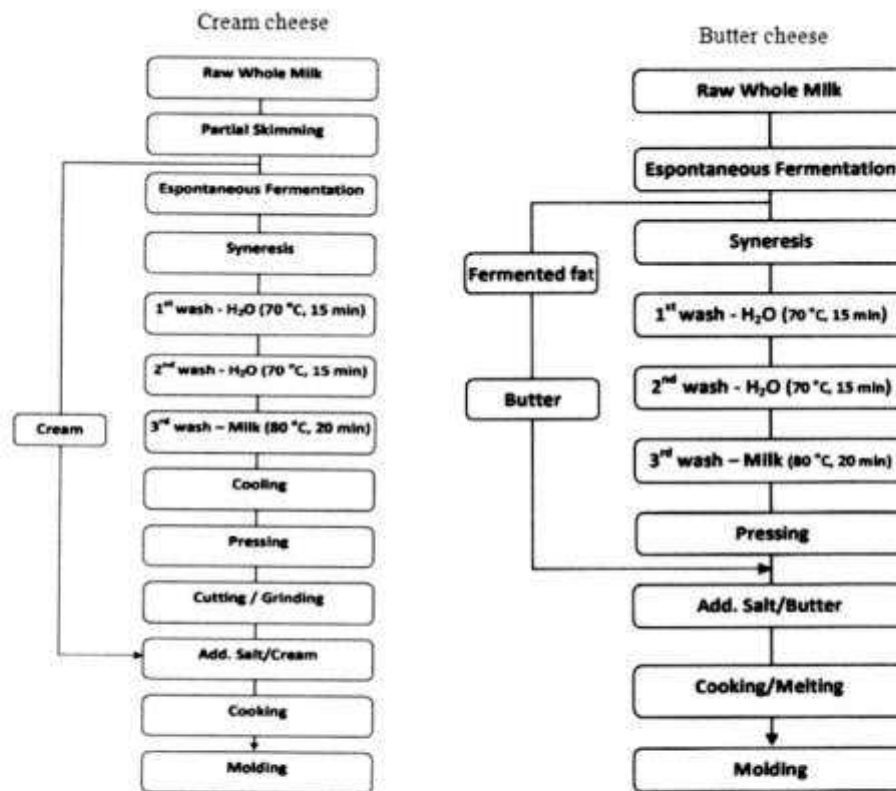


Fig. 1: Production flow chart of artisanal Marajo cream cheese type and butter cheese type

they draining and washing with water and milk followed the same procedures as the cream cheese type. Subsequently, for removal of excess liquids, the paste was pressed manually. Salt (15 g/1 kg curd mass) and butter (100 g butter/1 kg curd mass), obtained from cooking the fermented fat were added and submitted to thermal treatment (80°C, 20 min) and continuous manual mixing. In this stage stretching occurred, the fused paste was then distributed into Plastic Polypropylene (PP) packaging and cooled at room temperature (28°C).

In each producing farm, three samples of each cheese type were selected and maintained under refrigeration (7-8°C). Figure 1 shows cheese production flow chart.

**Buffalo milk and Marajo cheese samples:** Samples of raw milk were collected at the end of milking, carried out in the morning, stored in sterile plastic bags and in standardized 40 mL plastic bottles containing Bronopol preservative (8 mg) for Somatic Cell Count (SCC). Cheeses of approximately 500 g, produced with this milk, were stored in plastic bags. Date, hour and place

were marked on each sample at collection. All milk and cheese samples were transported to Belém (PA, Brazil) in isothermal boxes containing recyclable ice, at 4°C and submitted for laboratorial analyses. The physicochemical and microbiological analyses were carried out soon after the laboratories received the samples.

**Physicochemical analyses:** The variables analyzed in the buffalo milk were: pH, titratable acidity, density, Cryoscopic Index (CI), protein, fat, lactose, Total Dry Extract (TDE), Nonfat Dry Extract (NDE), minerals and Somatic Cell Count (SCC). For cheeses, the following analyses were determined: pH, titratable acidity, protein and fat, Fat Dry Extract (FDE), minerals, moisture, Water Activity (WA), chlorides, calcium and foreign material identification.

Cheese and milk fat was determined by the Mojonnier and Gerber methods, respectively (Brazil, 2006). Total protein content was estimated by the micro-Kjeldal method (Brazil, 2006). Moisture by drying was measured at 105°C to a constant weight (Brazil, 2006). Fixed mineral residue was measured by calcination in a muffle furnace (Brazil, 2006). Factor

6.38 was used for nitrogen conversion to protein. The pH values were measured by the potentiometric method (Metrohn Pensalab Analytical Instrumentation Ltda, Sao Paulo, SP, Brazil) and acidity was estimated by lactic acid percentage determination (Brazil, 2006). Total dry matter level was obtained by the sum of percentages of ashes, protein, lipids and carbohydrates (Kindstedt and Kosikowski, 1985). Determination of fat content in dry matter was carried out indirectly, by the ratio fat to total dry matter content of cheese (Pereira *et al.*, 2001). Analysis of chlorides was carried out by the Mohr (1855) and Brazil (1981) and Water Activity (WA) by the instrumental method in digital meter (model AW43-Etec, Sao Paulo, SP, Brazil). Calcium concentration was determined by Atomic Absorption Spectrophotometry (Instituto Adolfo Lutz, 2008). Density (DE) 15°C (g/cm<sup>3</sup>) and Cryoscopic Index (CI) were determined according to official methodology (Brazil, 2006). Analyses were carried out at the National Agricultural Laboratory, in duplicate. SCC was determined by the flow cytometry method, with automated equipment (Somacount, Bentley<sup>®</sup> 300, Instruments Inc.), according to the International Dairy Federation (IDF, 2006), carried out in the Milk Quality Laboratory. Foreign Material identification (FMC) was performed by microscopy, by the acid hydrolysis technique, which was followed by the filtration described by the Association of Official Analytical Chemists, (AOAC, 2012), was carried out in the Public Health Central Laboratory of Pará State.

**Microbiological analyses:** Microbiological determinations for milk and cheese were carried out in the Public Health Central Laboratory of the State of Pará, following the valid legislation, as well as the standards of the Ministry of Agriculture, cattle-raising and Supply (MAPA). Standard Plate Count (SPC),

Coliform count at 30°C, Coliform count at 45°C, *Staphylococcus aureus* count, *Samonella* sp., fungi and yeasts and *Listeria monocytogene* were analyzed and determined according to techniques described by Instruction MAPA (Brazil, 2003).

**Statistical analysis:** To verify the effects of seasons on the physicochemical and microbiological composition in buffalo milk and Marajó cheeses, the averages of experimental data were submitted to two-tailed Student's t-test. The Coefficients of Variation (CV%) and Confidence Intervals (CI95%) were calculated so that variations of data in each analyzed season could be compared. In all analyses, 5% (p<0.05) significance level was used. p-values were obtained by using BioEstat 5.0 software.

## RESULTS AND DISCUSSION

Components of buffalo milk physicochemical composition, Somatic Cells Count (SCC) and Standard Plate Count (SPC), observed in the dry and rainy seasons is shown in Table 1.

Seasonality influenced buffalo milk composition (Table 1). In the dry period, an increase in fat and lactose concentration and a reduction in, Total Dry Extract (TDE), Nonfat Dry extract (NDE) and mineral levels (p<0.05) was noted. These differences can be sufficient to alter the sensory and technological properties of milk. The protein level, similar to physical variable results pH, acidity, DE and CI, did not occur significant alterations due to seasonal change (p>0.05) (Table 1). The physical and chemical results found in this study are in agreement with the Technical Regulations for Cooled Raw Milk Collection and Transport (Brazil, 2011).

Similar results were reported in Rio Grande do Norte (RN, Brazil), with fat content increase (5.27 to

Table 1: The effects of seasonality on physicochemical composition, somatic cell count and standard plate count of buffalo milk produced in Anari region, Marajó Island (PA, Brazil)

Variable	Rainy (harvest season)			Dry (off-season)			p-value
	Mean±S.D.	CV%	CI95%	Mean±S.D.	CV%	CI95%	
pH	6.870±0.170	2.47	6.790-6.940	6.860±0.120	1.82	6.810-6.900	0.8250
Acidity <sup>a</sup>	0.160±0.040	25.62	0.140-0.180	0.150±0.030	21.16	0.140-0.170	0.5780
DE	1.031±0.003	0.26	1.030-1.032	1.030±0.004	0.19	1.029-1.031	0.1670
CI	-0.565±0.051	9.11	-0.5405- -0.5887	-0.569±0.048	8.44	-0.5514- -0.5866	0.7550
Protein <sup>b</sup>	4.050±0.530	13.18	3.800-4.300	3.920±0.540	13.70	3.720-4.120	0.4110
Fat <sup>b</sup>	5.530±0.710	13.04	5.310-5.980	6.740±1.190	17.69	6.310-7.190	<0.0001
Lactose	4.770±0.200	4.23	4.690-4.840	5.200±0.200	3.93	5.100-5.290	<0.0001
TDE <sup>c</sup>	16.890±0.920	5.47	16.460-17.330	15.770±1.540	9.79	15.200-16.330	0.0021
NDE <sup>c</sup>	9.940±0.360	2.87	9.850-10.120	8.990±1.230	13.70	8.540-9.440	0.0001
Minerals <sup>b</sup>	0.840±0.120	13.07	0.800-0.900	0.620±0.090	13.89	0.590-0.660	<0.0001
SCC (x10 <sup>5</sup> )	2.900±2.200	73.81	1.900-4.100	2.400±2.400	100.18	1.100-3.700	0.4806
SPC <sup>e</sup> (x10 <sup>5</sup> )	2.320±1.500	64.53	1.570-3.060	1.400±1.370	97.60	0.720-2.080	0.0844

Statistical analysis: Student's t test; Values represent mean±S.D. (n = 18); <sup>a</sup> % lactic acid; <sup>b</sup> g 100/g; <sup>c</sup> UFC/mL; DE: Density (g/cm<sup>3</sup>), CI: Cryoscopic index (°H); TDE: Total dry extract; NDE: Nonfat dry extract; SCC: Somatic cell count (cell/mL); SPC: Standard plates count; S.D.: Standard deviation; CV: Coefficient of variation; IC95%: 95% confidence interval

5.70%) in the dry season and similar concentrations of the other variables in both seasons (Araújo *et al.*, 2011). However, the buffalos were fed in a pasture rotation system with sugarcane and urea-based supplementation, in the dry season. On the other hand, Araújo *et al.* (2012) and Andrade *et al.* (2011), in studies also carried out in Rio Grande do Norte (RN, Brazil) did not find significant alterations due to seasonal change on milk components, although fat concentrations in the dry and rainy periods (7.149-7.063%) observed by these authors were higher than those found in the present study.

In the Arari region, in dry periods animals grazed in natural pastures in arid areas, where forage is small and poor, with low nutritional value. Noticeably, the supply of complementary food was not usually used; consequently, milk production drastically decreased in this season (off-season); meanwhile a higher milk fat content was observed, but it did not reach expressive values (Table 1). The less milk volume in this period increased the solid/liquid volume ratio. Hence, the dilution effect can explain the fat concentration variation in the two seasons, which is also influenced by the lipid and fiber content of the ingested vegetation.

Fat value variations are expected, as it is the most sensitive milk component to a variety of factors, such as food management, genotype, nutrition, lactation, calving phase and order (Macedo *et al.*, 2001). Fat, in both seasons, obtained the most elevated coefficient of variation, 13.04% in the dry and 17.69% in the rainy period, possibly indicating the use of pasture management and/or food supplementation in some farms. According to Fernandes *et al.* (2011), in studies carried out in Brazil, buffalo milk fat levels varied between 5.5 and 10.4%, with mean values nearly 6.0%. Thus, the milk fat concentration evaluated in this study is within the national average, though at the minimum established limit.

Protein concentrations, even relatively low, 3.72% (dry) and 4.05% (rain), range from 3.66 to 5.40% as reported by Amaral *et al.* (2005) and Teixeira *et al.* (2005), respectively. These values were lower than those reported by Bosquis *et al.* (2008) and Lopes (2009).

As fat is the major component in buffalo milk (Teixeira *et al.*, 2005; Mattos, 2007), any modification in its concentration may influence total solid levels. However, in this study, in the dry period, the slight fat concentration increase was not able to neutralize the minimum lactose and mineral concentration values, causing a slight, but significant reduction in total solids concentration, with variation between 16.89 (rainy) and 15.20% (dry). In this study, TDE ranges from 15 to 17%, similarly to Amaral *et al.* (2005). However, these values were higher than the values obtained by Jorge *et al.* (2005), (13.88%), similar to those reported by Lamontagna and Franzolin (2009), (15.2%) and lower than those found by Oliveira *et al.* (2009), (18.3 and 20.12%), using supplementation with different lipid

sources. Total solids are important parameters for industry, since their higher proportion in the milk indicates better yield in the manufacture of dairy. However, NDE, a less variable parameter, is used to standardize the milk solid level of herds in different handling conditions, as fat can vary up to 3% (Campanile *et al.*, 2007).

Values of physical variables DE and CI were similar in both seasons and are in agreement with those reported by Teixeira *et al.* (2005), with DE between 1.025 and 1.047 g/mL and CI between -0.531 and -0.548°H, for the rainy and dry seasons, respectively. However, pH values found in the present study were higher than those reported by this author (6.41-6.47) but close to those observed by Finotelo (1981), who establishes pH values between 6.6 and 6.9 and between 7.00 and 7.06 by the end of lactation.

Lactose values were different from those reported by Araújo *et al.* (2011), 4.73% in the dry season and 4.82%, in the rainy season. However, these values are in agreement with those reported by Finotelo (1981), 3.30 and 5.90%, in rainy and dry seasons, respectively. In the present study, mineral concentration is within the interval of variation (0.75-0.85%) indicated by Finotelo.

The season change did not influence ( $p>0.05$ ) Somatic Cell Count (SCC) (Table 1), for it was observed that during the rainy and dry seasons 66.6 and 70%, individual milk samples, respectively presented values below  $2.5 \times 10^5$  cells/mL and only 38.8 and 30% showed count between  $2.5 \times 10^5$  and  $5.0 \times 10^5$  cells/mL. These values are in agreement with Normative Instruction number 62, which establishes, for the northern region, a maximum of  $6.0 \times 10^5$  cells/mL (Brazil, 2011). The found SCC values are close to those reported by Andrade *et al.* (2011), with  $2.5 \times 10^5$  and  $1.9 \times 10^5$  cells/mL, in dry and rainy seasons, respectively.

A common parameter for evaluation of udder health, milk quality and monitoring of mastitis control programs is a SCC (Harmon, 1994), which is a direct indicator of the severity of mammary gland inflammation. Despite the myths about the buffalo species, these animals present similar sanitary problems as bovine, among them the occurrence of mastitis (Sollecito *et al.*, 2011). Female buffaloes with elevated SCC present reduction of milk production (Cerón-Muñoz *et al.*, 2002), alterations of component levels (Tripaldi *et al.*, 2003) and coagulation time alterations during the cheese production process, compromising quality, processing and industrial yield (Singh and Singh, 1981). To avoid such alterations, it is important to maintain the threshold of somatic cells in up to 200.000 cells/mL (Tripaldi *et al.*, 2003).

There is no evidence that SCC itself has any effect on human health. However, the presence of elevated counts presupposes the risk of raw milk being contaminated with pathogens and antibiotic residues,

Table 2: Effect of seasonality on physicochemical composition<sup>a</sup> of cream cheese type and butter cheese type, produced in Arari region, Marajó Island (PA, Brazil)

		Season of the year							p-value
		Rainy (harvest season)			Dry (off-season)				
Cheese type		Mean±S.D.	CV%	95% CI	Mean±S.D.	CV%	95% IC		
Cream cheese type	pH	5.26±0.15	4.91	5.13-5.80	5.49±0.38	6.84	5.17-5.81	0.5138	
	Acidity <sup>b</sup>	0.63±0.02	19.98	0.62-0.64	0.78±0.15	19.98	0.65-0.90	0.0002	
	Moisture	41.26±3.48	8.43	38.35-44.17	40.29±1.98	4.91	38.63-41.94	0.1666	
	WA	0.99±0.02	1.74	0.97-1.00	0.49±0.03	7.03	0.46-0.51	<0.0001	
	Protein	24.99±1.63	6.53	23.63-26.35	23.08±2.16	5.49	21.27-24.89	0.0510	
	Fat	32.38±3.22	9.96	29.69-35.07	36.89±4.59	12.43	33.05-40.73	0.0391	
	FDM	55.06±3.26	5.93	40.73-57.79	63.92±2.49	3.90	61.84-66.00	<0.0001	
	Mineral	2.37±0.55	23.08	1.91-2.83	1.40±0.02	1.40	1.38-1.42	0.0016	
	Calcium	0.28±0.08	28.68	0.21-0.35	0.18±0.07	35.61	0.12-0.24	0.0387	
	NaCl	1.18±0.11	9.61	1.08-1.27	1.21±0.20	17.11	1.04-1.38	0.7609	
	(FMC)	39.00±28.14	71.34	15.47-62.53	10.98±4.50	41.06	7.22-14.74	0.0591	
Butter cheese type	pH	5.18±0.06	1.19	5.11-5.24	5.39±0.41	6.44	5.04-5.39	0.0496	
	Acidity <sup>b</sup>	0.38±0.02	5.40	0.36-0.40	0.49±0.02	16.57	0.47-0.51	<0.0001	
	Moisture	50.69±2.71	5.35	47.84-53.53	49.43±4.00	8.10	45.23-53.63	0.5355	
	WA	0.99±0.02	1.62	0.97-1.01	0.59±0.08	13.13	0.51-0.67	<0.0001	
	Protein	25.60±0.38	1.48	24.87-5.99	24.38±1.17	7.96	22.52-26.24	0.1920	
	Fat	23.30±2.01	8.61	21.19-5.41	25.36±3.84	15.14	21.33-29.39	0.2710	
	FDE	46.99±3.78	8.61	43.02-50.96	49.99±2.49	9.24	45.14-54.84	0.2460	
	Mineral	2.68±0.03	1.15	2.65-2.71	1.40±0.02	0.74	1.41-1.43	0.0038	
	Calcium	0.45±0.08	18.73	0.37-0.30	0.18±0.07	17.52	0.25-0.35	0.0255	
	NaCl	1.51±0.16	10.65	1.34-1.68	1.21±0.20	16.00	1.12-1.58	0.1801	
	(FMC)	73.02±23.97	32.64	52.98-93.06	60.00±8.46	14.14	52.93-67.07	0.2547	

Statistical analysis: Student's t test; Values represent mean±S.D., (n = 8); <sup>a</sup> %, <sup>b</sup> % lactic acid; WA: Water activity; FDE: Fat dry extract; FMC: Foreign material count; S.D.: Standard deviation; CV: Coefficient of variation (%); 95% CI 95%: Confidence interval

which may indirectly represent a risk to human health (Smith, 2002).

Standard Plate Count (SPC) results showed no significant statistical difference in the rainy and dry seasons (p>0.05). Besides, in both seasons, 100% of Buffalo milk samples were within the standards established by MAPA (Brazil, 2011). Although this Instruction is valid only for bovine milk, it was used in this study, given that in Brazil, there is no special legislation for buffalo milk. Normative Instruction N.62 only considers SCC and SPC as microbiological quality parameters for raw milk, not stipulating maximum allowed values for microorganisms considered in RDC51 (Brazil, 2002). If used RDC51, only 13.33% samples in the rainy season and 53.33% samples in the dry season would meet the microbiological standards established by legislation, as elevated counts of Coliforms were found at 30°C, as well as Coliforms at 45°C and *Staphylococcus aureus*. Contamination by *Salmonella* was not detected.

Table 2 shows mean physicochemical composition and foreign material count values found in cream cheese type and butter cheese type in rainy and dry seasons. Seasonal variation of buffalo milk composition influenced the final quality of Marajó cheeses. According to the results, six of the eleven physicochemical parameters of cheeses were influenced by the rainy and dry seasons.

In the dry season, cream cheese type and butter cheese type presented lower WA, mineral and calcium values (p<0.05), while acidity was higher. However, fat and FDE increased only in cream cheese type, in the

same season. Conversely, there was no significant difference (p>0.05) for pH, moisture and protein and NaCl levels (Table 2). Hence, cream cheese type and butter cheese type produced in the dry season, which characterizes the off-season period, are safer and more acidic, however with less calcium, only the cream cheese type presented a more elevated level.

The results found in this study were not comparable to those obtained by Bittencourt (2011). This author evaluated seasonality only in Marajó cream cheese type, which did not alter its composition, except acidity, which significantly decreased in the dry season, in contrast to the present study. The values observed in that study, in the rainy and dry seasons, respectively, were lower for pH (5.14-5.15), acidity (0.68-0.57), fat (32.00-31.14%); FDE (56.48-55.84%) and protein (19.89-19.13%), but the values were higher for minerals (2.42-2.52%) and moisture (42.91-43.10%) (Bittencourt, 2011).

There is just one study with butter cheese type produced in the Marajó Island carried out by Finotelo (1981), but no study on the seasonal influence in this type of cheese. According to this author, medium composition typical of Marajó butter cheese type consists of the following: moisture, 37.38%; fat, 40.40%; FDE, 61.51%; protein, 22.7%; pH, 4.5; NaCl, 1.75%. It can be verified that values found here are higher for pH, moisture and protein and lower for fat, FDE and NaCl.

This current study shows that, besides being less acidic and salty, Marajó cheeses have similar protein concentrations but different fat concentrations in

comparison to Finotelo's study. The butter cheese type is now produced with lower fat concentration (16.07% less) characterizing it as a healthier product. However, its quality may have been affected by this fat reduction, which is responsible for texture, paste delicacy and cheese taste. This is an important factor, which has a direct impact on the cheese quality appreciated by consumers. The cream cheese type, in contrast, has, today, nearly 12.64% more fat than when compared to the study of Finotelo (1981).

The increase in fat concentration found in the cream cheese type, in the dry period, may be related to the lack of standardization in the cream quantity added during the stretching of the curd mass and/or to the fat concentration increase in buffalo milk caused by milk volume reduction due to the reduction of pastures and quality. Conversely, for butter cheese type production, fat concentration increase of buffalo milk in the dry season did not influence fat increase; since during the stretching of this cheese, the reincorporation of great fat quantities in the form of butter is more difficult than cream reincorporation, in the cream cheese type. According to Toro and Sousa (2002), corroborated by reports of Nassu *et al.* (2001), fat concentration variations of milk used in the processing of cheeses affect curd formation and handling, as well as the ability to keep fat and moisture, influencing the composition of these dairy products.

Cream cheese type and butter cheese type were in accordance with the physicochemical standards established by the Technical Regulation for Marajó Cheese Production and by the Technical Regulation for Identity Determination and Quality of Cheese spread or *Requesón* (Pará, 2013). This guideline establishes that solid cheese spread must contain from 45 to 54.9% fat dry matter and maximum of 60% moisture, whereas for the butter cheese type spread, fat in the dry matter must be 25 to 59.9% minimum and maximum moisture of 58% (Brazil, 1997). Fat values classify cream cheese type and butter cheese type as semi-fat cheeses. Whereas moisture values classify the cream cheese type as middle moisture cheese while the butter cheese type is considered high moisture cheese (Brazil, 1997). Both have protein concentration in agreement with the established standards by the Ministry of Agriculture, Cattle-raising and Supply (Brazil, 1996), of 20 and 30%.

High Coefficient of Variation (CV%) values were obtained for acidity, minerals and calcium in the cream cheese type, in both seasons. CV% values for acidity show differences in the process used by producers, mainly concerning fermentation time, number of washings with water and milk and, possibly, the differences in the microbiotic compositions of raw buffalo milk, which depending on the lactic bacteria count and other present bacteria in the environment, can easily increase acidity (Queiroga *et al.*, 2009).

In the rainy season, mean WA values were higher for both cheeses and are in agreement with Furtado, 1990, who establishes WA between 0.96 and 0.98 for cheeses with moisture between 40 and 49%, the range in which Marajó cheeses are. Thus, it can be stated that these cheeses are favorable medium for deteriorating and pathogenic microorganism growth, particularly *Staphylococcus aureus*, which may developed even at minimum WA of 0.86 (Jay, 2005). However, in the dry period moisture and salt concentration were not altered, but WA was reduced to half in both cheeses; this fact is possibly associated with an increase in the milk lactose concentration produced in this season, associated to not uniform manual pressing, which may have interfered in the quantity of lactose removed with the whey.

The high variation coefficients for minerals and calcium indicate differences in the animal diet and, possibly, supplementation carried out in some herds to supply the energetic and nutrient needs in the dry season. In addition, in the dry season less availability and quality of natural pastures, characterized by low mineral content, caused significant reduction ( $p < 0.05$ ) of mineral and calcium concentration in the buffalo milk and, consequently, in Marajó cheeses. Calcium levels in the cream cheese type (0.28-0.12%), in the rainy and dry period, respectively, were still lower than those found in butter cheese type (0.45-0.25%). Quantitatively, calcium represents the most important component in milk and its level can be influenced by the animal diet (Ferrara and Intriery, 1974). Therefore, animal diet in the municipality of Cachoeira do Arari (PA, Brazil), a place where the butter cheese type is produced, could possibly justify this difference. The low calcium concentration in Marajó cheeses can also be a consequence of the production process, which involves acid fermentation, where high environment acidity increases mineral salt solubility, gradually changing to aqueous phase and calcium is among these minerals.

Mean microscopy results, in both cheeses, did not differ significantly in both seasons. However, it must be emphasized that high standard deviations and great Coefficients of Variation (CV%) found may have masked these results, mainly in the cream cheese type. The foreign material count average in the rainy season was 18% higher for the cream cheese type and 13% for the butter cheese type. When both cheeses are compared, in both seasons, it is noticed that the butter cheese type obtained higher physical contaminant rates, which indicate unsatisfactory hygienic habits during milking, milk filtration, processing and packing of cheeses and presence of animals in the adjacencies of the producing unit (Borsari, 2001). Inappropriate use of equipment and utensils in cheese processing increases the quantity of dark and brown spots, originating from earthen material, insect and leaf fragments suspended in the air and carried by the wind.

Table 3: Microbiological results of cream cheese type and butter cheese type produced in Arari region, Marajó Island (PA, Brazil), in both seasons

Cheese	Microbiological analysis	Season of the year	
		Rainy (harvest season)	Dry (off-season)
Cream cheese type	Coliform at 35°C <sup>a</sup>	<10	<10
	Coliform at 45°C <sup>a</sup>	<3	<3
	<i>Salmonella</i> sp. <sup>b</sup>	Absence	Absence
	Congulase-positive <i>Staphylococcus</i> <sup>c</sup>	<10	<10
	<i>Listeria monocytogenes</i> <sup>b</sup>	Absence	Absence
	Fungi, yeasts <sup>d</sup>	120 a 130000	10 a 130000
Butter cheese type	Coliform at 35°C <sup>a</sup>	<10	<10
	Coliform at 45°C <sup>a</sup>	<3	<3
	<i>Salmonella</i> sp. <sup>b</sup>	Absence	Absence
	Congulase-positive <i>Staphylococcus</i> <sup>c</sup>	<10	<10
	<i>Listeria monocytogenes</i> <sup>b</sup>	Absence	Absence
	Fungi, yeasts <sup>d</sup>	1300 a 47000	800 a 45000

<sup>a</sup>: NMP/g; <sup>b</sup>: Absence in 25 g; <sup>c</sup>: UFC/g

During the processing of Marajó cheeses, bags made of cotton fabric, of easy fragmentation, are still used in several dairies for milk filtration and manual whey draining of the curd mass. Thus, presence of fabric fragments was found in 100% of the samples. Human and animal hair, the latter in higher quantity, as well as insect fragments were found in all analyzed samples, indicating nonuse of good manufacturing practices and physical precarity of producing units. These physical contaminants may carry pathogenic microorganisms associated with diseases such as salmonella, leptospirosis, black plague and typhoid, representing risk to the consumer (Fontes and Fontes, 2005). Similar results were found by Pimentel Filho *et al.* (2005) and Fernandes *et al.* (2011), in the microscopic analysis of fresh Minas cheese. The Table 3 shows microbiological evaluation results of Marajó cheeses, in both seasons.

Microbiological results of cream cheese type and butter cheese type were not affected by seasonality. Mean values for coliform count at 35°C, coliform count at 45°C, *Salmonella* sp., coagulase-positive *Staphylococcus*, *Listeria monocytogenes* and fungi and yeasts (Table 3), were within the microbiological standards established by the Technical Regulation for Marajó Cheese Production (Pará, 2013), Technical Regulation of Identity and Quality of the Cheese spread (Brazil, 1997) and Technical Regulation on Microbiological Standards for Foods (Brazil, 2001).

These results indicated that thermal treatments applied during curd mass washings and stretching were able to reduce and almost remove the microbial load found in raw milk used in the production of these cheeses. However, in both seasons, elevated levels with great variations in fungi and yeasts count were detected in almost 90% of the butter cheese type samples and in nearly 40% of the cream cheese type samples. Similar results were reported by Sousa *et al.* (2002), Lourenço *et al.*, 2002, who observed this contamination after the first manufacture day. Brazilian legislation does not stipulate fungi and yeasts limits for cheeses, but these

microorganisms cause alterations in foods, since they produce enzymes that hydrolyze proteins, lipids and carbohydrates. This degradation creates compounds that promote modifications in color, appearance, loss of taste and toxic metabolites such as mycotoxins, which make the cheese unsuitable for consumption as well as reduce its shelf life (Franco and Landgraf, 1996).

Since these microorganisms can be widely distributed throughout the processing plant and/or via air circulation, overall hygiene of these variables is essential in order to prevent the recontamination of cheeses during the cooling and packaging process. This is especially true for the butter cheese type, which is generally wrapped in wax paper only. Thus, greater care and protection is recommended in these stages, as well as the use of vacuum packaging which creates an anaerobic environment averse to the growth of these microorganisms.

## CONCLUSION

The results, besides confirming the importance of evaluation and routine quality monitoring of Marajó buffalo milk and cheeses, showed that dry and rainy typical seasons influenced the composition of buffalo milk and these differences were sufficient to alter the concentration of some constituents of artisanal cheeses produced in the region of Arari, Marajó Island, which could compromise consumer fidelity and consolidation of the producing region.

## ACKNOWLEDGMENT

The authors thank the Coordination for Enhancement of Higher Personnel (Capes, Brazil) for the financial support, the Secretaria de Estado da Agricultura e Desenvolvimento Rural-Soure/PA, the milk and cheeses producers of Marajó, the National Agricultural Laboratory and the Public Health Central Laboratory of the State of Pará, for performing the physicochemical and microbiological analyses.

## REFERENCES

- Abd El-Salam, M.H. and S. El-Shibiny, 2011. A comprehensive review on the composition and properties of buffalo milk. *Dairy Sci. Technol.*, 91(6): 663-699.
- Abd El-Salam, M.H. and S. El-Shibiny, 2013. Bioactive peptides of buffalo, camel, goat, sheep, mare and yak milks and milk products. *Food Ver. Int.*, 29(1): 1-23.
- Amaral, F.R., L.B. Carvalho, N. Silva and J.R.F. Brito, 2005. Qualidade do leite de búfalas: Composição. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 29: 106-110.
- Andrade, K.V., A.H.N. Rangel, V.M. Araújo, D.M. Lima Júnior and N.A. Oliveira, 2011. Efeito da estação do ano na qualidade do leite de búfalas. *J. Green Sustain. Dev. Agroecologia (Portuguese)*, 6(3): 33-37.
- AOAC, 2012. *Official Methods of Analysis*. 19th Edn., Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C., pp: 887-935.
- Araújo, T.P.M., A.H.N. Rangel and A.D. Soares, 2011. Influência das estações do ano sobre a composição do leite de búfalas mantido em tanque de resfriamento. *Agric. Sci. Semiarid (Portuguese)*, 7(1): 1-5.
- Araújo, K.B.S., A.H.N. Rangel, F.C.E. Fonseca and E.M. Aguiar, 2012. 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. *Ital. J. Anim. Sci.*, 11: 87-91.
- Bastianetto, E., S.C. Escrivão and D.A.A. Oliveira, 2005. Influência das características reprodutivas da búfala na produção, composição e qualidade do leite. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 29(1): 49-52.
- Bernardes, O., 2007. Bubalinocultura no Brasil: Situação e importância econômica. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 31: 293-298.
- Bittencourt, R.H.F.P.M., 2011. Requeijão Marajoara e Queijo Minas Frescal Produzidos Com Leite De Búfalas (*Bubalus bubalis, Lin.*) no Estado Do Pará. Ph.D. Thesis, Universidade Federal Fluminense, Niterói.
- Borsari, P.L., 2001. A importância da análise microscópica e histológica em leites e derivados. *Rev. Adit. Ingr.*, 16: 16-20.
- Bosquis, R.R.A., L.C. Albuquerque, A.B. Bignadi, T.C. Chud, L.O. Seno and H. Tonhati, 2008. Estimação de parâmetros genéticos para produção de leite e porcentagens de gordura e proteína de búfalas. *Proceeding of 7th National Symposium on Animal Breeding*, pp: 25-29.
- Brazil, 1981. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Laboratório Nacional de Referência Animal. Métodos Analíticos oficiais para controle para produtos de origem animal e seus ingredientes. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, out.
- Brazil, 1996. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Portaria nº146, de 07 de março de 1996. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos.
- Brazil, 1997. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Portaria nº359, de 04 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Requeijão ou Requeson.
- Brazil, 2001. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 02 Jan. 2001.
- Brazil, 2002. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária -Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel.
- Brazil, 2003. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária -Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003-Oficializa os Métodos derivados Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água.
- Brazil, 2006. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária -Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006-Métodos Analíticos Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos.
- Brazil, 2007. Plano de Desenvolvimento Sustentável do Arquipélago do Marajó. Retrieved from: [http://www.presidencia.gov.br/estrutura\\_presidencia/casa\\_civil/camaras/grupos/maraj](http://www.presidencia.gov.br/estrutura_presidencia/casa_civil/camaras/grupos/maraj), (Accessed on: Jan. 12, 2013).
- Brazil, 2011. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Alterar o caput, excluir o parágrafo único e inserir os §§ 1º ao 3º, todos do art. 1º, da Instrução Normativa MAPA nº 51, de 18 de setembro de 2002.
- Campanile, G., O. Bernardes, E. Bastianetto, P.S. Baruselli, L. Zicarelli and D. Vecchio, 2007. Manejo de Búfalas Leiteiras. *Buffalo Tec. Associação Brasileira de Criadores de Búfalos*, pp: 74.
- Cerón-Muñoz, M.F., M. Tonhati, J. Duarte, J.M. Muñoz-Berrocal and H. Jurado-Gámez, 2002. Factors affecting somatic cell counts and their relations with milk and milk constituent yield in buffaloes. *J. Dair. Sci.*, 85(11): 2885-2889.

- Fernandes, R.V.B., D.A. Botrel, V.V. Rocha, F.M. Campo and F.Q. Mendes, 2011. Avaliação físico-química, microbiológica e microscópica do queijo artesanal comercializado em Rio Paranaíba-MG. *Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes*, 66(382): 21-26.
- Ferrara, B. and C. Intrieri, 1974. Caratteristiche ed impiego del latte di búfala. *Estratto da R. Zoot. Vet.*, 1(2): 111-120.
- Finotelo, N.A., 1981. Melhoramento de tecnologia na produção e conservação do queijo Marajoara. Tese de Mestrado, em Tecnologia de Alimentos-Universidade Estadual de Campinas, pp: 113.
- Fontes, E.A.F. and P.R. Fontes, 2005. *Microscopia de Alimentos: Fundamentos Teóricos*. Editora UFV, Viçosa, pp: 151.
- Franco, B.D.G.M. and M. Landgraf, 1996. *Microbiologia dos alimentos*. Atheneu, São Paulo, pp: 192.
- Furtado, M.M., 1990. Fatores que afetam as características finais do queijo. *A arte e a Ciência do Queijo*. Editora Globo, São Paulo.
- Galvão, J.G.B., A.H.N. Rangel, H.R. Medeiros, J.B. Silva, E.M. Aguiar, R.C. Madruga and D.M. Lima Júnior, 2010. Efeito da produção diária e da ordem de parto na composição físico-química do leite de vacas de raças zebuínas. *Acta Vet. Brasilica*, 4: 25-30.
- Harmon, R.J., 1994. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *J. Dairy Sci.*, 77(7): 2103-2112.
- IBGE, 2010. *Pecuária Municipal Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística*, Rio de Janeiro. Retrieved form: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/imprensa/ppts/000000222.pdf>.
- IDF (International Dairy Federation), 2010. *Bulletin of the IDF n.º 446: The World Dairy Situation 2010. Buffalo Milk*, pp: 8-9.
- INMET, 2011. Instituto Nacional de Meteorologia. Retrieved form: <http://www.inmet.gov.br/>, (Accessed on: 01, 2012).
- Instituto Adolfo Lutz (IAL), 2008. *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*. 4th Edn., São Paulo, pp: 1020.
- International Dairy Federation (IDF), 2006. Enumeration of somatic cells-Part 2: Guidance on the operation of fluoro-opto-electronic counters. *ISO and IDF*, Geneva, pp: 13.
- Jay, J.M., 2005. *Microbiologia de Alimentos*. 6th Edn., Chapman Hall, New York, pp: 711.
- Jorge, A.M., C. Andrighetto, M.R.B. Strazza and R.D.C. Correa 2005. Correlações entre o califomia mastitis test e a contagem de células somáticas do leite de búfalas murrá. *R. Bras. Zootec.*, 34(6): 2039-2045.
- Kindstedt, P.S. and F.V. Kosikowski, 1985. Improved complexometric determination of calcium in cheese. *J. Dairy Sci.*, 68: 806-809.
- Lamontagna, C. and R. Franzolin, 2009. Níveis de proteína não degradável na dieta sobre a produção e qualidade do leite de búfalas em pastagem. *Braz. J. Anim. Health Prod. (Portuguese)*, 10(2): 322-332.
- Lima, A.M.M., L.L. Oliveira, R.L. Fontinhas and R.J.S. Lima, 2005. Ilha do Marajó. Revisão histórica, hidroclimatologia, bacias hidrográficas e proposta de gestão. *Holos Environ.*, 5(1): 65-80.
- Lopes, F.A., 2009. Caracterização da Produtividade e da Qualidade do Leite de Búfalas na Zona da Mata Sul de Pernambuco. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco.
- Lourenço, L.F.H., C.L. Sousa, N.M. Simão, J. Lourenço and B. José, 2002. Análise microbiológica do requeijão marajoara elaborado no norte do Brasil. *Hig. Aliment.*, 16(96): 55-59.
- Macedo, P.M., F.D. Wechsler, A.A. Ramos, J.B. Amaral, J.C. Souza, F.D. Resende and J.V. Oliveira, 2001. Composição físico-química e produção do leite de búfalas da raça mediterrânea no oeste do estado de São Paulo. *R. Bras. Zootec.*, 30: 1084-1088.
- Mattos, B.C., 2007. Aspectos qualitativos do leite bubalino. *Pubvet*, 1(9).
- Medhammar, E., R.W. Bettoni, B. Stadlmayr, E. Nilsson, U.R. Charrondine and B. Burlingame, 2012. Composition of milk from minor dairy animals and buffalo breeds: A biodiversity perspective. *J. Sci. Agric.*, 92: 445-474.
- Mohr, F., 1855. *Lehrbuch der chemisch-analytischen titrimethode*. Vieweg: Braunschweig.
- Nassu, R.T., R.S. Araújo, M.F. Borges, J.R. Lima, B.A. Macedo, M.H.P. Lima and M.S.R. Bastos, 2001. Diagnóstico das condições de processamento de produtos regionais derivados do leite no Estado do Ceará. *Fortaleza. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento-Embrapa Tropical*, pp: 28.
- Oliveira, R.L., M.M. Ladeira, M.A.A.F. Barbosa, M. Matsushita, G.T. Santos and A.R. Bagaldo, 2009. Composição química e perfil de ácidos graxos do leite e muçarela de búfalas alimentadas com diferentes fontes de lipídeos. *Arq. Bras. Med. Vet.*, 61: 736-744.
- Pará, 2013. Agência Estadual de Defesa Agropecuária do Estado do Pará- ADEPARÁ. *Aprova o Regulamento Técnico para a Produção do Queijo do Marajó*. Portaria Nº 418 de 04/03/2013 (Estadual-Pará).
- Pereira, D.B.C., P.H.F. Silva, L.L. Oliveira and L.G.C. Costa Júnior, 2001. *Físicoquímica do leite e derivados-Métodos analíticos*. 1. Edn., Juiz de Fora-MG: Oficina de Impressão Gráfica e Editora Ltda, pp: 190.

- Pimentel Filho, N.J., J.M. Martins, M.P.P. Ramos, M.S. Rosado, N.P. Oliveira, L.R. Cunha, K.F. Costa and C.L.L.F. Ferreira, 2005. Características microscópicas do queijo minas artesanal da região do alto paranaíba. *Rev. Inst. Lat. Cândido Toste*, 345(60): 298-301.
- Queiroga, R.C.R.E., S.M.G. Matias, M.M. Santos, I.C. Barbosa, E.F. Garcia, E.L. Souza, C.E.V. Oliveira and H.M.H. Sousa, 2009. Características físico-químicas, microbiológicas e perfil de ácidos graxos de queijos de leite de cabra comercializados. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 68(3): 411-418.
- Rangel, A.H.N., K.B.S. Araújo, F.C.E. Fonseca, A.A. Simplicio, E.M. Aguiar and F.V. Júnior, 2010. Influência do ano e da estação de partos na produção e rendimento em queijo mozzarella e de leite de búfalas no estado do Rio Grande do Norte. In: *Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, XLVII, 2010, Salvador, Anais...* Salvador: Universidade Federal da Bahia.
- Rangel, A.H.N. *et al.*, 2011. Influência do estágio de lactação sobre a composição do leite de búfala. *Acta Vet. Brasilica*, 5(3): 306-310.
- SEBRAE, 2013. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. Retrieved form: [http://www.pa.agenciasebrae.com.br/noticia\\_pdf\\_kmf?cod=19915677](http://www.pa.agenciasebrae.com.br/noticia_pdf_kmf?cod=19915677), (Accessed on: Mar. 02, 2013).
- Silva, V.R. and V.L.O. Oliveira, 2003. Queijo Do Marajó Tipo "Creme" Derivado do Leite de Búfala: Uma Alternativa Para O Desenvolvimento Sustentável Do Agronegócio no Município de Soure. Monografia de Especialização em Empreendedorismo Rural e Desenvolvimento Sustentável, Universidade do Estado do Pará, Belém, pp: 70.
- Simões, M.G., A.F.N. Domingues, L.P. Maciel, J.G. Rabelo, E.B. Oliveira and C.L.L.F. Ferreira, 2013. Effect of bovine milk addition in different characteristics of artisanal cream cheese from Marajó, elaborated with buffalo milk. *Rev. Inst. Lat. Cândido Toste*, 68(391): 32-40.
- Singh, S.P. and R.S. Singh, 1981. Influence of somatic cell count on the physico-chemical properties of buffalo milk. *Ind. J. Dairy Sci.*, 34: 96-99.
- Smith, K.L.A, 2002. Discussion of normal and abnormal milk based on somatic cell count and clinical mastitis. *Bull. IDF*, 372: 43-45.
- Sollecito, N.V., L.B. Lopes and R.C. Leite, 2011. Contagem de células somáticas, perfil de sensibilidade antimicrobiana e microorganismos isolados de mastites em búfalos: Uma breve revisão. *Rev. Bras. Med. Vet.*, 33(1): 18-22.
- Sousa, C.L., E.C.A. Neves, C.A.A. Carneiro, J.B. Farias and M.R.S. Peixoto, 2002. Avaliação microbiológica e físico-química do doce de leite e requeijão produzidos com leite de búfala na Ilha do Marajó-Pa. *Bol. Ceppa*, 20(2): 191-202.
- Teixeira, L.V., E. Bastianetto and D.A.A. Oliveira, 2005. Leite de búfala na indústria de produtos lácteos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 29(2): 96-100.
- Toro, M.J.U. and C.L. Sousa, 2002. Microbiologic and physical-chemical characteristics of cheese "Marajoara" sold in Belém, Pará State, Brazil. *Proceeding of the 1st Buffalo Symposium of Américas*, pp: 591-593.
- Tripaldi C., S. Terramoccia, S. Bartocci, M. Angelucci and V. Danesi, 2003. The effects of the somatic cell count on yield, composition and coagulating properties of Mediterranean buffalo milk. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 16: 738-742.

### **6.3. Artigo 3**

#### **EFFECT OF BOVINE MILK ADDITION TO BUFFALO S MILK ON DIFFERENT CHARACTERISTICS OF ARTISANAL MARAJÓ “CREAM CHEESE” TYPE**

**Artigo Técnico****EFEITO DA ADIÇÃO DE LEITE BOVINO AO LEITE DE BÚFALA NAS DIFERENTES CARACTERÍSTICAS DO QUEIJO ARTESANAL DO MARAJÓ, TIPO CREME****Effect of bovine milk addition to buffalo's milk on different characteristics of artisanal Marajó "cream cheese" type***Marilda Garcia SIMOES\***Alessandra Ferraiolo Nogueira DOMINGUES<sup>2</sup>**Lorena Pedreiro MACIEL<sup>3</sup>**Joseane Gonçalves RABELO<sup>4</sup>**Eduardo Basílio de OLIVEIRA<sup>5</sup>**Célia Lúcia de Lucas Fortes FERREIRA<sup>6</sup>***RESUMO**

O objetivo do estudo foi comparar os efeitos da substituição parcial do leite bubalino por leite de vaca, nas características físico-químicas, de textura, cor e nos parâmetros sensoriais do queijo artesanal do Marajó tipo Creme, tradicionalmente elaborado com leite de búfala. Quatro queijos foram elaborados com as seguintes formulações: C100 (100% leite de búfala); C80 (80% leite de búfala + 20% leite de vaca); C70 (70% leite de búfala + 30% leite de vaca) e C60 (60% leite de búfala + 40% leite de vaca). Três repetições foram realizadas. Os resultados analíticos da composição (umidade, proteína, gordura, minerais e acidez); dos parâmetros de textura (dureza, elasticidade, coesividade, mastigabilidade) e dos atributos de cor ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$ ,  $h^o$ ) foram significativamente diferentes entre as formulações. Por outro lado, a presença do leite de vaca não ocasionou alterações nos atributos sensoriais. Com base nos resultados desse estudo, concluiu-se que a adição de até 40% de leite bovino na elaboração do queijo tipo Creme não afeta a sua aceitação pelo consumidor, permitindo um abastecimento do mercado em períodos de entressafra, quando a produção do leite bubalino diminui.

**Palavras-chave:** requeijão Marajoara; queijos artesanais; composição centesimal; textura; cor; análise sensorial.

- 1 Mestre em Alimentos e Nutrição. Professora Assistente IV, Universidade do Estado do Pará (UEPA), Belém, Pará, Brasil. E-mail: marildags@uol.com.br
  - 2 Doutora em Engenharia Química, Pesquisadora da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, Pará, Brasil. E-mail: alessandra.domingues@embrapa.br
  - 3 Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Assistente da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, Pará, Brasil. E-mail: lorena.maciel@embrapa.br
  - 4 Graduanda do Curso de Tecnologia Agroindustrial - Alimentos - UEPA- Salvaterra, Ilha do Marajó, Pará, Brasil. E-mail: joseane.rabelo@hotmail.com
  - 5 Doutor em Procédés Biotechnologiques et Alimentaires. Professor Adjunto II, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. E-mail: eduardo.basilio@ufv.br
  - 6 Doutora em Food Science. Professora Titular do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. E-mail: clferrei@ufv.br
- \* Autor para correspondência: Universidade do Estado do Pará – UEPA. Rua Antônio Barreto, 983/1502, Umarizal, Belém, Pará, Brasil. CEP:66055050. E-mail: marildags@uol.com.br

*Recebido / Received: 31/10/2012*

*Aprovado / Approved: 18/02/2013*

## ABSTRACT

The purpose of the present study was to compare the effects of a partial substitution of buffalo's milk by cow's milk, on physico-chemical characteristics, texture, color and sensorial parameters of an artisanal Cream cheese from Marajó, which is traditionally elaborated from buffalo's milk. Four cheeses prototypes were made from four formulations: C100 (100% buffalo milk); C80 (80% buffalo milk + 20% cow milk); C70 (70% buffalo milk + 30% cow milk) and C60 (60% buffalo milk + 40% cow milk). Three replicates were performed. The analytical results for the cheese composition (moisture, protein, fat, minerals and acidity), for textural parameters (hardness, springiness, cohesiveness, chewiness) and for color attributes ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$  and  $h^o$ ) were significantly different between prototypes. On the other hand, the presence of cow's milk did not cause alterations on common sensory attributes. Based on the results from this study, it was concluded that adding up to 40% of bovine milk to buffalo's milk in the elaboration of Marajó "Cream cheese" type does not affect its acceptance by the consumer, allowing a market supply during the "dry" period when production of buffalo milk decreases.

**Keywords:** cottage cheese Marajoara; artisan cheese; proximate composition; texture; color; sensorial analysis.

## 1 INTRODUCTION

In several countries, artisanal cheeses are an income source for small rural producers and represent the local culture. In Marajó, the largest river-sea island in the world, located in the Northern region of Brazil, artisanal cheeses are popular and much appreciated. Besides, they represent a way to use the milk production of buffalos bred in small and medium rural properties in the Island.

Today, Marajó Island has the largest buffalo herd of the country, with about 263,000 animals, corresponding to 22% of the total national buffalo herd (IBGE, 2010). Traditionally called "Marajó cheese" ("queijo do Marajó" in Portuguese), they can be of two types: "Cream cheese", the most produced one, and "Butter cheese". With a soft texture, compact, closed and pleasant aroma, a yellow-greenish surface and white inside, the "Cream cheese" is slightly acid and salted (LOURENÇO, 1999).

Before the introduction of buffalo in the Island, at the end of XIX century, the production of the "Marajó" cheese was exclusively from bovine milk. However, with the continuous growth of the buffalo herd, due to the presence of natural pastures and floodplains, the production of buffalo milk increased, and it started to be mixed with bovine milk for cheese production (FIGUEIRAS, QUADROS, 2002; SILVA; OLIVEIRA, 2003). Thus, since this time, the artisanal cheeses of Marajó started to be produced almost exclusively with buffalo milk.

In the Island, the production of buffalo milk is not regular throughout the year, because there is a marked grazing period (June to November) due to larger availability of pastures, and an intermediate dry period (December to May), time of parturition and small offer of native pastures. To meet the demand of cheese production during the intermediate dry period,

there is a need to complement with bovine milk, also produced in the island. The mixture of those milks may bring alterations in the blend physico-chemical characteristics, in sensorial parameters, and in texture and color of the cheese made thereof, caused by the added bovine milk composition that has a lower amount of fat, lactose, protein, ashes, calcium and A and C vitamins, and higher concentration of  $\beta$ -carotene, absent in buffalo milk (AHMAD et al., 2008; ABD EL-SALAM; EL-SHIBINY, 2011; MEDHAMMAR, 2012).

In cheeses, generally, texture is one of the most important sensorial characteristics, because it allows the consumer to identify specific varieties and their qualities, even before evaluating the flavor. The texture characteristics of cheeses are influenced by several factors, one of the most important is the raw-material composition (DE JONG, 1976; LAWRENCE, et al., 1987; FOX, et al., 2000). Alterations caused by the protein, salt, and water concentration, the pH value and fat content, in this order, affect texture and cheese color, and consequently may have an effect in its acceptance (CHEN et al., 1979). Besides acting as a differential in characterization of different types of cheese, the color is also part of descriptors for the maturation stage of the cheese.

Therefore, it is important the knowledge of adequate percentages of bovine milk that may be added to buffalo milk so that there are no undesirable alterations in the characteristics of the cheese, what may cause damage in its acceptability and commercialization. In the specialized literature there are no scientific studies that evaluate these alterations. Thus, the purpose of the present study was to determine the physicochemical characteristics, including texture and color, and the sensorial attributes of artisanal "Cream cheese" from Marajó, elaborated from blends of buffalo and cow's milk.

## 2 MATERIAL AND METHODS

### Formulations of “cream cheese”

In this study, four formulations of the “Cream cheese” were elaborated with buffalo and cow’s milk, all processed in a cheese factory located in the municipality of Soure, in the Marajó island. The milk (buffalo, cow) came from the same rural property. The four formulations are designed by: C100 (100% buffalo milk); C80 (80% buffalo milk + 20% cow milk); C70 (70% buffalo milk + 30% cow milk) and C60 (60% buffalo milk + 40% cow milk). Three replicates were performed. The cheeses were elaborated according to workflow diagram depicted in Figure 1.

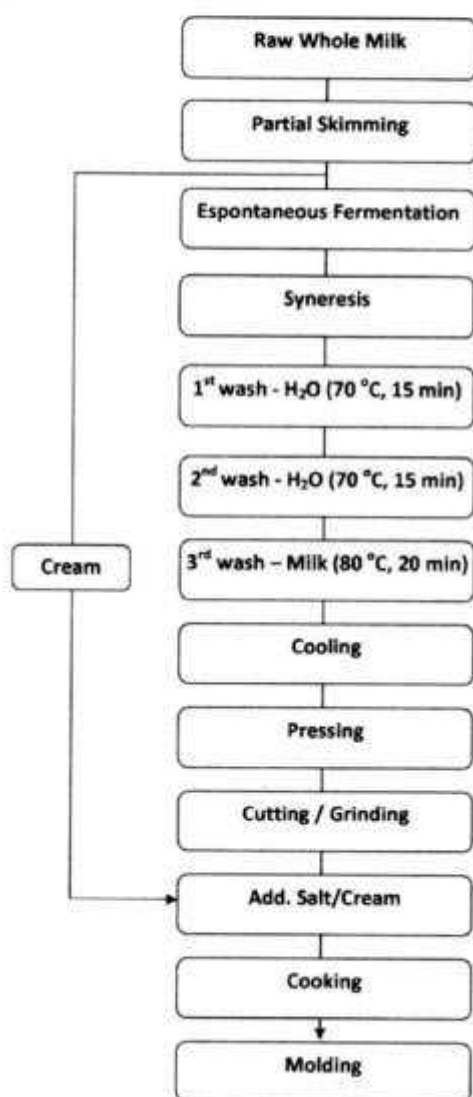


Figure 1 – Workflow diagram for the production of artisanal Marajó “cream cheese” type. Marajó Island (PA), 2012

For the cheese making trials, after manual mix, raw and partial skimmed milks in milk skimmer machine, without addition of starter culture, were submitted to spontaneous fermentation and kept at room temperature (30 °C), during 24 hours. Afterwards, went through a manual handling to induce syneresis and removal of the serum was performed and hereafter washed twice with water at room temperature about 30 °C (2 L of water/1kg of curd mass) under heating (70 °C, 15 min), for acidity reduction. A third wash with buffalo milk (2 L of milk/1 kg of curd mass) was performed, also under heating (70 °C, 15 min), to reincorporate flavor and components washed out by the water, that is, some soluble solids. The mass was then stretched over a table to reduce the temperature to 40 °C; after that, it was mechanically pressed in metallic press for removal of excess serum, cut into cubes and crushed to small particles using a manual or an electric cruncher, assuming a milled appearance. Salt (15 g/1 kg of curd mass) and cream (1 L of cream/1 Kg of curd mass) from milk skimming, were added to the crushed mass and submitted to a thermal treatment (80 °C, 20 min). In this stage the curd stretching occurs, which is performed by manual beating. Then, the melted mass was distributed in polypropylene plastic packages (PP) and cooled to room temperature (30 °C). All cheeses were kept under refrigeration (7 °C - 8 °C) until the analyses were carried out. A package of each formulation was used for this purpose.

### Instrumental analysis of the physico-chemical composition

The cheese fat was determined by the Mojonnier’s method (BRAZIL, 2006). The total protein content was estimated by the micro-Kjeldal’s method (BRAZIL, 2006), moisture by kiln drying at 105 °C until constant weight (BRAZIL, 2006) and the fixed mineral residue by calcination in muffle furnace (BRAZIL, 2006). The factor used in conversion from nitrogen to total protein was 6.38. The cheese pH was determined by the potentiometric method (Metrohn Pensalab Instrumentação Analítica Ltda., São Paulo, SP, Brazil) and the acidity estimated by the determination of lactic acid % (BRAZIL, 2006). Determination of fat content in dry matter was made indirectly, by calculating the ratio between the fat content and the total solids content of the cheese (PEREIRA et al. (a), 2001). The analyses of physico-chemical composition were evaluated seven days after the elaboration of the formulations. Analyses were carried out in duplicates in Laboratório Nacional Agropecuário - Lanagro/PA/Brazil.

### Instrumental Texture Profile Analysis (TPA)

The textural characteristics were evaluated two days after the elaboration of the formulations,

using a device from Stable Micro Systems, model TA.XT Plus (Surrey, England), equipped with cell charge of 25 kg. Cylindrical samples with diameter and height equal to 20 mm were removed from random points in the cheese, in order to get uniform and homogeneous samples, and equilibrated at room temperature (21 °C). The texture profile was obtained by double compression test of the cheese cylinder, at room temperature, using a cylindrical compression probe with 75 mm of diameter (P75). Compression was performed at constant speed of 2.0 mm. s<sup>-1</sup> with contact strength equal to 5 g, until the sample height was reduced to 10 mm (that means 50% of the initial height). Data were obtained by software Texture Expert for Windows - version 1.20 (Stable Micro System). The analyses were performed in five replicates in Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Amazônia Oriental /PA/Brazil.

#### Instrumental color analysis

After two days of elaboration of formulations, the cheese color parameters were evaluated using a colorimeter Hunter Lab, model Color Quest XE (Reston, EUA), according to definitions proposed by the Commission Internationale de l'Éclairage (CIE, 1986). The value L\* represents luminosity and indicates how bright or dark the product is, it refers to the object capacity to reflect or transmit light and varies from zero (totally black) to 100 (totally white), the higher the value of L\* is, the brighter the object is. The chromaticity coordinate a\* is an indicator of green (-) and red (+), while b\* is an indicator of blue (-) and yellow (+). The values a\* and b\* were used to calculate Hue (ho), tone angle or color, and Chroma (C\*) that describes a color intensity (chromaticity of color saturation), using the following formulas:  $h = \tan^{-1}(b^*/a^*)$  e  $C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$ , respectively. The determinations were performed in triplicate, with the calibrated equipment, using 10 samples, 05 from the central part and 05 from the periphery of cheeses from each formulation, at room temperature (23 °C) (PANARI et al., 2003; TOSI et al., 2008; PATHARE et al., 2013). The analyses were performed in Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Amazônia Oriental /PA/Brazil.

#### Sensory Evaluation

The sensorial acceptability and buying intention (REIS; MININ, 2006) for the cheese from the four formulations were evaluated three days after the elaboration by 50 untrained tasters, 30 female and 20 male, (≥18 years old), including researchers, trainees, students, technicians and workers from Embrapa Amazônia Oriental /PA/Brazil, the site where the analyses were performed. The attributes evaluated in the acceptance test were: appearance, color, smell,

taste and hardness, the hedonic scale of 9 points was used, with value 1 attributed to the hedonic term "extremely disliked", and value 9 to the term "extremely liked" (CHAVES; SPROSSER, 2001). Blocks of cheese were cut in cubes with 1.5 cm of edge, placed inside paper pans codified with three digits random numbers. The samples were served in an aluminum paper tray, together with water to clean the taste. The tests were performed in individual booths at room temperature (21 °C).

#### Statistical analysis

To compare the effects of different cow milk admixtures to buffalo milk on the physico-chemical composition of cheese, including their texture and color, the averages from the analytical data were submitted to a variance analysis (One Way-ANOVA). When significant differences ( $p \leq 0.05$ ) were observed, a Tukey's test was applied. In the sensorial analysis the scores obtained did not have normal distribution, hence, the averages from the descriptors of each formulation were compared by Kruskal-Wallis' test and. The correlation between texture and physico-chemical parameters was expressed as Pearson's correlation coefficient. When statistical differences happened, a Dunn's test was applied. An adherence chi-square test was used to compare the frequencies of buy intentions. In all analyses was used a significance level of 5% ( $p \leq 0.05$ ). Values of p were obtained with software BioEstat 5.0.

### 3 RESULTS AND DISCUSSION

#### Physical-chemical composition

The effects of replacing buffalo's milk by cow's milk in the physico-chemical composition of the formulations for "Cream cheese" types are shown in Table 1.

Cheese pH, fat, fat in dry matter (FDM), protein, ashes and acidity decreased with increasing addition of cow's milk to buffalo's milk in the formulations used for processing, while the moisture content increased. These results are in agreement with those found by Fenelon et al. (2000), Mistry (2001), and Souza et al. (2012), whom also reported in their studies an increase in the amount of cheese moisture as the fat content was reduced. The Marajó "Cream cheese" prototypes had low acidity (Table 1), however higher values than those found by Figueiredo (2011).

As expected, the cheese elaborated with 100% of buffalo milk (C100) had the higher values for protein, fat, fat in dry matter, minerals and acidity, and the lower values for moisture; however, an equal amount of fat matter when compared with formulations C80 and C70 and differing only from C60. The lower moisture in formulation C100 may be explained by the

higher amount of fat present in buffalo milk, while, in the other formulations, the decrease of protein, fat and mineral amounts was due to the lower amount of those components in cow milk that was added in higher proportions (ABD EL-SALAM; EL-SHIBINY, 2011; MEDHAMMAR, 2012).

**Texture Profile Analysis (TPA)**

The results of the instrumental texture analysis (TPA) are compiled in Table 2. According to the rheological results, the partial substitution of buffalo milk by bovine milk, in concentrations from 20%, 30% and up to 40%, did not alter significantly ( $p < 0.05$ ) the parameters flexibility, adhesiveness and gumminess of Marajó “Cream cheese” type.

The addition of different percentages of bovine milk to buffalo’s milk in the trials altered significantly the values for cheese hardness, elasticity, cohesiveness and chewiness (Tabela 2). The values of hardness decreased with the increase in bovine milk concentration, that is, the cheeses became softer however without significant difference, showing that cheeses produced with addition of up to 30% of bovine milk keeps the same hardness than C100. However the formulation C60 differed from the others. The hardness values are lower when compared to those of other cheese types: for example, the hardness values of fresh

Cheddar, Gouda and Mozzarella were found to be 47, 77 and 68 N, respectively (TUNICK; VAN HEKKEN, 2002). On the other hand, they are higher than those found for Minas cheese made from buffalo milk and for fresh cheese (MARCATTI et al., 2009; TUNICK et al., 2012). Rogens et al. (2010) concluded that the lower amount of fat influences the texture properties of Cream cheese and Cheddar, leading to an increase of hardness. In this study, however, the decrease in cheese fat concentration (Table 1), did not increase the hardness, on the other hand, there was a decrease in this parameter, which can be probably explained by the lower amount of protein and higher amount of moisture found in the cheese composition (Table 1). Possibly there was the formation of a smaller protein mass by unit area of fat which has been associated to lower hardness values, since the protein matrix is the structural component that gives more deformation resistance (LOBATO-CALLEROS et al., 1997).

The values obtained for elasticity, or recovery after the first compression, indicate that the increase of cow’s milk concentration in the blend increased the elasticity of Marajó “Cream cheese”, with all cheese formulations significantly differing among themselves. Cheddar, Gouda and Mozzarella cheeses, in comparison, have elasticity values from 8.5 to 10.0 mm, meaning that formulations of Marajó “Cream cheese” that have values between 4.7 and 6.5 mm do

**Table 1** – Effects of the addition of cow’s milk to buffalo’s milk on the composition of Marajó “Cream cheese” (in g/100g)

Formulation	Physico-chemical parameters						
	pH	Moisture(%)	Protein (%)	Fat (%)	FDM** (%)	Ashes (%)	Acidity***
C100	5.54 ± 0.05 <sup>a</sup>	40.46 ± 0.01 <sup>a</sup>	21.35 ± 0.21 <sup>a</sup>	39.30 ± 1.27 <sup>a</sup>	66.00 ± 2.13 <sup>a</sup>	2.11 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.36 ± 0.00 <sup>a</sup>
C80	5.43 ± 0.07 <sup>a</sup>	42.29 ± 0.01 <sup>b</sup>	20.85 ± 0.07 <sup>b</sup>	38.00 ± 0.11 <sup>a</sup>	64.12 ± 0.74 <sup>a</sup>	1.89 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.31 ± 0.01 <sup>b</sup>
C70	5.38 ± 0.04 <sup>a</sup>	42.22 ± 0.13 <sup>b</sup>	20.35 ± 0.07 <sup>b</sup>	37.00 ± 0.42 <sup>a</sup>	63.82 ± 0.01 <sup>a</sup>	1.59 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.23 ± 0.00 <sup>c</sup>
C60	5.21 ± 0.03 <sup>d</sup>	47.25 ± 0.07 <sup>d</sup>	20.10 ± 0.05 <sup>d</sup>	30.30 ± 0.08 <sup>b</sup>	57.4 ± 0.22 <sup>b</sup>	1.55 ± 0.02 <sup>d</sup>	0.20 ± 0.01 <sup>d</sup>
P value*	0.005	< 0.001	0.003	0.002	0.007	< 0.001	0.001

\*Statistical analysis using ANOVA post-hoc Tukey’s tests. Each value represents mean ± SD; data represent means of three replicates. \*\*FDM – Fat in dry matter; \*\*\* % Lactic acid. Values with different superscript letters within the same column are significantly different ( $p < 0.05$ ). C100 = no addition; C80 = 20% cow’s milk added; C70 = 40% cow’s milk added; C60 = 40% cow’s milk added.

**Table 2** – Effects of added cow’s milk to buffalo’s milk on textural characteristics of Marajó “Cream cheese”.

Formulation	Textural characteristics						
	Hardness (N)	Fracturability (N)	Adhesiveness	Springiness (mm)	Cohesiveness	Gumminess (N)	Chewiness (N, mm)
C100	33.00 ± 5.20 <sup>a</sup>	26.20 ± 7.30	- 42.78 ± 8.65	4.69 ± 0.24 <sup>a</sup>	0.44 ± 0.03 <sup>a</sup>	14.52 ± 2.08	68.24 ± 10.10 <sup>a</sup>
C80	29.03 ± 5.03 <sup>a</sup>	26.40 ± 3.85	- 54.85 ± 20.12	5.25 ± 0.24 <sup>b</sup>	0.38 ± 0.05 <sup>a</sup>	11.00 ± 2.03	57.75 ± 18.2 <sup>a</sup>
C70	25.46 ± 4.17 <sup>a</sup>	30.20 ± 5.12	- 66.11 ± 20.98	5.85 ± 0.13 <sup>c</sup>	0.42 ± 0.01 <sup>a</sup>	10.70 ± 3.00	62.59 ± 19.0 <sup>a</sup>
C60	24.02 ± 3.00 <sup>b</sup>	25.40 ± 3.67	- 46.67 ± 14.94	6.52 ± 0.33 <sup>d</sup>	0.54 ± 0.06 <sup>b</sup>	13.00 ± 2.12	84.76 ± 22.6 <sup>b</sup>
P value*	0.025	0.523	0.176	< 0.001	< 0.001	0.579	0.005

\* Statistical analysis was using ANOVA post-hoc Tukey’s tests. Each value represents mean ± SD; data represent means of three replicates. Values with different superscript letters within the same column are significantly different ( $p < 0.05$ ). C100 = no addition; C80 = 20% cow’s milk added; C70 = 40% cow’s milk added; C60 = 40% cow’s milk added

not recover well from compression (TUNICK; VAN HEKKEN, 2002). The fat globules in cow's milk, which are smaller (GANGULI, 1979) than those in buffalo's milk, may have caused the increase of this parameter. According to Marshall (1990), in cheese, a smaller fat particle size is associated to a more elastic product. When the diameter of fat globules is reduced, they are more uniformly distributed and in larger number in the continuous phase (protein matrix), causing an increase of protein-protein and protein-fat interactions and, consequently, of elasticity (PEREIRA et al. (b), 2001). Therefore, this increase in the internal interactions of the protein matrix probably explains the lower elasticity of traditional cheese when compared to the other cheese types from admixtures with bovine milk.

Finally, for the parameters cohesiveness and chewiness the values increased with the increase in the concentration of added cow's milk. However only formulation C60, with 40% of added bovine milk, differed significantly from the other ones, being characterized as the cheese composition with higher resistance to chewiness. The cohesion was between 0.38 and 0.54, contrasting with 0.21, 0.28 and 0.41 for cheeses like fresh Cheddar, Gouda and Mozzarella (TUNICK; VAN HEKKEN, 2002). Therefore, artisanal Marajó "Cream cheese" is quite cohesive. The values of 5.73 – 8.43 N mm for chewiness were similar to those reported for cheese of the Feta type, elaborated from buffalo milk (KUMAR et al., 2011).

### Correlation between physico-chemical and texture parameters

The correlation coefficients of Pearson between textural parameters and physico-chemical characteristics are presented in Table 3.

The data from Table 3 indicate that hardness and elasticity had a strong positive correlation with the pH value. In its turn, hardness also had strong positive correlation with protein, whereas elasticity showed a strong negative correlation. The meaning and importance of the correlation coefficients may be related to the type of formulation used and, in this experimental model, showed that protein and pH have an important role over the hardness decrease and elasticity increase of the cheese.

### Color analysis

In Table 4 are presented the results obtained from the instrumental evaluation of color for the four analyzed cheese types.

For all four cheese types, parameter  $a^*$  had negative values, indicating a trend to the green color, while parameter  $b^*$  had positive values, indicating a trend to a yellow color. For variables  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$  and  $h_0$ , significant differences were found between the cheese types. The color variation observed is related with the use of bovine milk as a substitute for buffalo

**Table 3** – Linear correlations between physico-chemical and textural parameters <sup>a</sup>

	Texture characteristics						
	Hardness	Fracturability	Adhesiveness	Springiness	Cohesiveness	Gumminess	Chewiness
Moisture	- 0.785 <sup>NS</sup>	- 0.327 <sup>NS</sup>	0.127 <sup>NS</sup>	0.916 <sup>NS</sup>	0.796 <sup>NS</sup>	0.678 <sup>NS</sup>	0.844 <sup>NS</sup>
FDMb	0.841 <sup>NS</sup>	0.293 <sup>NS</sup>	- 0.018 <sup>NS</sup>	- 0.945 <sup>NS</sup>	- 0.729 <sup>NS</sup>	-0.712 <sup>NS</sup>	- 0.820 <sup>NS</sup>
Protein	0.998 <sup>S</sup>	- 0.216 <sup>NS</sup>	- 0.451 <sup>NS</sup>	- 0.976 <sup>S</sup>	- 0.461 <sup>NS</sup>	-0.912 <sup>NS</sup>	- 0.753 <sup>NS</sup>
pH	0.955 <sup>S</sup>	- 0.005 <sup>NS</sup>	- 0.321 <sup>NS</sup>	0.967 <sup>S</sup>	0.480 <sup>NS</sup>	0.782 <sup>NS</sup>	0.698 <sup>NS</sup>

<sup>a</sup> - Results expressed as Pearson's correlation coefficient (r); b - Fat in dry matter; S - Significant ( $p < 0.05$ ); NS - Not significant ( $p \geq 0.05$ )

**Table 4** – Mean composition and Hunter color ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$ ,  $h_0$ ) values of Marajó "Cream cheese" types

Formulation	Color parameters				
	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$C^*$	$h_0$
C100	86.76 ± 3.11 <sup>a</sup>	-4.18 ± 0.20 <sup>a</sup>	13.67 ± 1.04 <sup>a</sup>	19.53 ± 0.97 <sup>a</sup>	106.25 ± 4.42 <sup>a</sup>
C80	85.37 ± 1.12 <sup>a</sup>	-3.30 ± 0.44 <sup>b</sup>	17.33 ± 1.06 <sup>b</sup>	17.65 ± 0.98 <sup>b</sup>	100.70 ± 1.95 <sup>b</sup>
C70	83.92 ± 3.06 <sup>b</sup>	-2.12 ± 0.10 <sup>c</sup>	22.42 ± 1.75 <sup>c</sup>	22.52 ± 1.74 <sup>c</sup>	95.43 ± 0.59 <sup>c</sup>
C60	82.20 ± 1.87 <sup>b</sup>	-1.50 ± 0.29 <sup>d</sup>	23.95 ± 1.54 <sup>d</sup>	24.00 ± 1.53 <sup>d</sup>	93.61 ± 0.77 <sup>c</sup>
P value**	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

\*\*Statistical analysis was performed using ANOVA post-hoc Tukey's tests. Each value represents mean ± SD; data represent means of three replicates. Values with different superscript letters within the same column are significantly different ( $p < 0.05$ ). C100 = no addition; C80 = 20% cow's milk added; C70 = 40% cow's milk added; C60 = 40% cow's milk added

milk, since differences in the color have a tendency to accentuate with the increase in the proportion of this substitution, which reduced the green color intensity caused by the absence in cow's milk, of a blue-green (biliverdin) pigment, present in buffalo's milk (ABD EL-SALAM; EL-SHIBINY, 2011), and also by the increase in concentration of the pigment  $\beta$ -carotene, present in cow's milk and absent in buffalo's milk. In this way the values of L and a\* decreased while the values of b\* increased; which means, with the increase in concentration of bovine milk, the cheese became darker, less white and more yellow in color. The values of L\* were high, however lower than those reported for fresh cheese (GUO et al., 2011) and rennet cheese (ANDRADE et al., 2007).

The angle or color tone (ho) is the magnitude, in degrees, that characterizes the color quality in food and may be useful to measure the changes in their intensities in different process steps of food elaboration and conservation. In this study, both magnitudes were significantly affected by the addition of cow's milk to buffalo's milk in the making of the different "Cream cheese" types. The cheese made from buffalo's milk with 40% of bovine milk added had the greater C\* value, that is, a more intense color (24.00) when compared to the others.

A linear increase was observed in the color intensity with the increase in concentration of added cow's milk, due to the larger amount of  $\beta$ -carotene pigment carried over. According to the above results, it is possible to observe that with an increase in the concentration of cow's milk added, there was increase in intensity of yellow color and decrease of green color, with alterations in yellow-greenish tone.

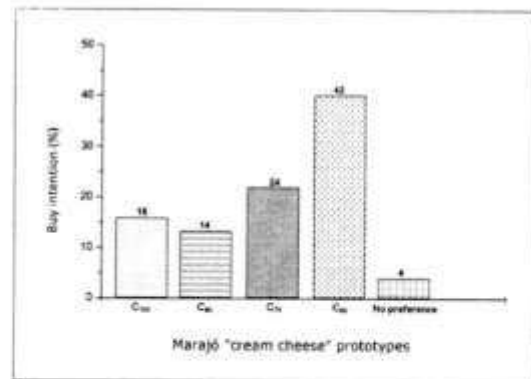
### Sensorial Analysis

The average scores attributed to each one of the evaluated parameters (overall appearance, color, smell, taste and hardness) are presented in Table 5.

The four cheese types had averages over 6.0 for all sensory attributes, showing good acceptance by the

cheese tasters. Although the bovine milk addition may cause a reduction in the parameters color, smell and taste (FUNDORA et al., 2001), all sensory attributes evaluated for the three cheese types made from with different percentages of cow's milk added to buffalo's milk, they did not differ statistically from those found (Table 5) for the traditional cheese (C100). Therefore the partial substitution of buffalo's milk up to 40% with cow's milk caused no significant sensorial alterations.

Figure 2 shows the frequency histogram for the attribute buying intention. Cheese from the formulation C60 had higher value than cheese from the formulation with 100% of buffalo milk (C100). A similar result was found by Sameen et al. (2008). Thus, it may be said that bovine milk has a good potential to improve the sensorial attributes of the traditional Marajó "Cream cheese".



**Figure 2** – Frequency histogram of scores for buy intention of artisanal Marajó "cream cheese" prototypes made from buffalo's milk with 0% (C100), 20% (C80), 30% (C70) and 40% (C60) cow's milk added to it. X<sup>2</sup> = 40.40; p < 0.0001.

### 4 CONCLUSIONS

The partial replacement of buffalo's milk by

**Table 5** – Mean scores for attributes appearance, color, smell, taste and hardness of Marajó "Cream cheese" types.

Formulation	Attributes <sup>1</sup>				
	Appearance	Color	Smell	Taste	Hardness
C100	7.08 ± 1.64	6.90 ± 1.73	7.20 ± 1.41	7.06 ± 1.67	7.50 ± 1.54
C80	7.54 ± 1.34	7.32 ± 1.39	6.28 ± 1.83	7.12 ± 1.65	7.24 ± 1.78
C70	7.60 ± 1.03	7.54 ± 1.07	6.92 ± 1.43	6.94 ± 1.79	7.12 ± 1.85
C60	7.54 ± 1.28	7.46 ± 1.31	6.74 ± 1.47	7.42 ± 1.51	7.54 ± 1.37
<b>P value*</b>	0.482	0.375	0.054	0.570	0.778

\*\*Statistical analysis was performed using ANOVA post-hoc Tukey's tests. Each value represents mean ± SD; data represent means of three replicates. Values with different superscript letters within the same column are significantly different (p < 0.05). C100 = no addition; C80 = 20% cow's milk added; C70 = 40% cow's milk added; C60 = 40% cow's milk added

cow's milk promoted significant changes in the physico-chemical characteristics, in textural parameters and color attributes of artisanal Marajó "Cream cheese". However, the sensory evaluations by non-trained cheese tasters, representing the normal consumer, demonstrated that those differences were not clearly perceptible. Besides, the "Cream cheese" type elaborated from 40% of bovine milk added to buffalo's milk reached the highest ranking for buying intention. For those reasons, it is possible to conclude that the final quality of "Cream cheese" is not strongly affected with the substitution of up to 40% of buffalo's milk by bovine milk. This may be an interesting alternative for producers of this type of cheese, especially during the dry season period, without the risk of losing the product authenticity.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior (Capes) for their financial support and Secretaria de Estado da Agricultura e Desenvolvimento Rural – Soure/PA (SAGRI) and cheese producers in the city of Soure, for technical help with the cheese processing.

#### 5 REFERENCES

- ABD EL-SALAM, M. H.; EL-SHIBINY, S. A. Comprehensive review on the composition and properties of buffalo milk. **Dairy Science & Technology**, Rennes, v. 91, n. 6, p. 663 – 690, 2011.
- AHMAD, S. et al. Effects of acidification on physico-chemical characteristics of buffalo milk: A comparison with cow's milk. **Food Chemistry**, Oxford, v. 106, n. 1, p. 11 – 17, 2008.
- ANDRADE, A. S. A. et al. Medidas instrumentais de cor e textura em queijo de coalho. In: CONGRESSO LATINO AMERICA DE ANALISTA DE ALIMENTOS, 15., 2007, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: LACEN, 2007. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CPPSE/17127/1/PROCIRTN2007.00124.pdf>>. Acesso em: 12 jun. 2012.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os métodos analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 14 dez. 2006. Disponível em: <http://www.diariodasleis.com.br>. Acesso em: 06 mar. 2012.
- CHAVES, J. B. P.; SPROSSER, R. L. **Práticas de laboratório de análise sensorial de alimentos e bebidas**. Viçosa: UFV, 2001. 81p.
- CHEN, A. H. et al. Textural analysis of cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 62, n. 6, p. 901–907, 1979.
- COMMISSION INTERNATIONALE DE L'ECLAIRAGE (CIE). **Colorimetry**. 2 ed. Vienna: Central Bureau of the Commission Internationale de L'Eclairage, 1996.
- DE JONG, L. Protein breakdown in soft cheese and its relation to consistency I. Proteolysis and consistency of Noordhollandse Meshanger cheese. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, Wageningen, v. 30, n.3/4, p. 242–253, 1976.
- FENELON, M. A. et al. The Effect of Fat Content on the Microbiology and Proteolysis in Cheddar Cheese During Ripening. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 83, n. 10, p. 2173 - 2183, 2000.
- FIGUEIRAS, A.; QUADROS, M. Queijo Marajó: Começa a fase industrial. **Revista Agroamazônia**, Belém, n. 3, p. 36-37, maio 2002.
- FIGUEIREDO, E. L. et al. Queijo do "Marajó" tipo Creme: parâmetros físico-químicos e sensoriais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 66, n. 378, p. 26 – 33, 2011.
- FOX, P. F. et al. Cheese rheology and texture. In: FOX et al. **Fundamentals of cheese science**. Aspen Publisher Inc: Gaithersburg, 2000. p. 298–340.
- FUNDORA, O. et al. A comparative study of milk composition and stability of Murrah river buffaloes and Holstein cows grazing star grass. **Cuban Journal of Agriculture Science**, Mayabeque, v. 35, p. 219 – 222, 2001.
- GANGULI, N. C. Tecnología de la leche de búfala. **Revista Mundial de Zootecnia**, Roma, v. 30, p. 2 – 10, 1979.
- GUO, L. et al. Effect of salt on the chemical, functional, and rheological properties of Queso Fresco during storage. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 21, n. 5, p. 352 – 357, 2011.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Pesquisa da Pecuária Municipal – **Pesquisa da Pecuária Municipal**. 2010. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/default.shtm>>. Acesso em: 02 jun. 2012.
- LAWRENCE, R. C. et al. Texture development during cheese ripening. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 70, n.8, p. 1748–1760, 1987.

- LOBATO-CALLEROS, C. et al. Use of fat blends in cheese analogs: Influence on sensory and instrumental textural characteristics. **Journal of Texture Studies**, Malden, v. 28, n. 3, p. 619–632, 1997.
- LOURENÇO, L. H. F. **Análise da composição química, microbiológica, sensorial e dos aromas do requeijão marajoara**. 1999. 127f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Pará, Belém, 1999.
- KUMAR, S. et al. Effect of rate of addition of starter culture on textural characteristics of buffalo milk Feta type cheese during ripening. **Journal of Food Science and Technology**, London, v.48, n.5, p. 1-5, 2011. DOI 10.1007/s13197-011-0565-z
- MARCATTI, B. et al. Minas-type fresh cheese developed from buffalo milk with addition of L. ácido. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, n. 4, p. 481 - 485, 2009. DOI.org/10.1590/S0103-90162009000400008
- MARSHALL, R. J. Composition, structure, rheological properties and sensory texture of cheese analogues. **Journal of Science and Food Agriculture**, London, v. 50, n. 2, p. 237 – 252, 1990.
- MEDHAMMAR, E. et al. Composition of milk from minor dairy animals and buffalo breeds: a biodiversity perspective. **Journal of Science Agriculture**, Roma, v. 92, n. 3, p. 445 – 474, 2012.
- MISTRY, V. V. Low fat cheese technology. **International Dairy Journal**, Oxford, v.11, n. 4-7, p. 413 – 422, 2001.
- PANARI, P. et al. Variazione della composizione e andamento della proteolisi del Parmigiano-Reggiano nel corso della maturazione in riferimento al profilo (centro e periferia) della forma. **Scienza e Tecnica Lattiero - Casearia**, Parma, v. 54, n.3, p. 199 – 212, 2003.
- PATHARE, P. B. et al. Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods: A Review. **Food and Bioprocess Technology**, Dublin, v. 6, n.1, p. 36-60, 2013.
- PEREIRA, D. B. C. et al. **Físico-química do leite e derivados: métodos analíticos**. 1.ed. ampl e ver. Juiz de Fora: Oficina de Impressão Gráfica e Editora Ltda, 2001a. 190 p.
- PEREIRA, R. B. et al. Rheological and microstructural characteristics of model processed cheese analogues. **Journal of Texture Studies**, Malden v. 32, n.5-6, p. 349–373, 2001 b.
- REIS, R. C.; MININ, V. P. R. Teste de aceitação. In: MININ, V. P. R. **Análise sensorial: estudo com consumidores**. Viçosa: UFV, 2006. p. 67-83.
- ROGENS, N. R. et al. Rheological properties and microstructure of Cheddar cheese made with different fat contents. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 93, n. 10, p. 4565- 4576, 2010.
- SAMEEN, A. et al. Quality evaluation of Mozzarella cheese from different milk sources. **Pakistan Journal of Nutrition**, Faisalabad, v. 7, n.6, p. 753 - 756, 2008.
- SILVA, V. R.; OLIVEIRA, V. L. **O Queijo do Marajó tipo “Creme” derivado do leite de búfala: Uma alternativa para o desenvolvimento sustentável do agronegócio no Município de Soure**. 2003. 70f. Monografia (Especialização em Empreendedorismo Rural e Desenvolvimento Sustentável) - Universidade do Estado do Pará, Belém, 2003.
- SOUZA, V. R. et al. Efeito da concentração de gordura nas propriedades físicas, químicas e sensoriais do queijo petit suisse elaborado com retenção de soro. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 67, n. 386, p. 20 - 28, 2012.
- TOSI, F. et al. Variazioni di composizione e proprietà fisico chimiche del parmigiano reggiano durante la maturazione e in differenti zone della forma. **Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia**, Parma, v. 59, n. 6, p. 507–528, 2008.
- TUNICK, M. H.; VAN HEKKEN, D. L. Torsion gelometry of cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 11, p. 2743 - 2749, 2002.
- \_\_\_\_\_; et al. Characterization of Queso Fresco during storage at 4 and 10 °C. **Journal of Food Research**, Toronto, v. 1, n.1, p. 308 – 319, 2012. <http://dx.doi.org/10.5539/jfr.v1n1p308>.

#### **6.4. ARTIGO 4**

### **PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF BUTTER CHEESE FROM MARAJÓ MANUFACTURED WITH BUFFALO MILK AND COW MILK**

## Physicochemical properties of Butter cheese from Marajó manufactured with buffalo milk and cow milk

Marilda Garcia Simões<sup>1</sup>, Joseane Gonçalves Rabelo<sup>1</sup>, Rosane Esmeralda Portal<sup>1</sup>,  
Alessandra Ferraiolo Nogueira Domingues<sup>2</sup>, Eduardo Basilio Oliveira<sup>3</sup>,  
Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Food and Technology, College of Food Technology, State University of Pará, Brazil

<sup>2</sup>Embrapa, Agribusiness, Brazil

<sup>3</sup>Department of Food and Technology, College Food Engineering, Federal University of Viçosa, Brazil

**Abstract:** This study aimed to evaluate the physicochemical characteristics, texture and color parameters of the artisanal Butter cheese from Marajó, manufactured with partial substitution of buffalo milk for cow milk. Four formulations were elaborated: B<sub>100</sub> (100% buffalo milk); B<sub>80</sub> (80% buffalo milk + 20% cow milk); B<sub>70</sub> (70% buffalo milk + 30% cow milk) and B<sub>60</sub> (60% buffalo milk + 40% cow milk). Three replicates were performed. The partial substitution of 20%, 30% and 40% of buffalo milk caused the reduction of fat in 16.2%, 21.6% and 25.4% and protein in 5.2%, 5.7% and 6% respectively, with decrease of elasticity, cohesiveness, gumminess and chewiness, but had no influence on the hardness. Moisture had significant and strongly negative correlation with elasticity, cohesiveness, gumminess and chewiness. Fat and protein had significant and strongly positive correlations with elasticity, cohesiveness, gumminess and chewiness. Significant differences were found for color variables L\*, a\*, b\* and h°. The increase in cow milk concentration increased the yellow-greenish tonality, with an emphasis in yellow tones.

**Keywords:** color, Marajó "Butter cheese", physicochemical composition, texture TPA.

### I. Introduction

The artisanal Butter cheese, are cheeses produced for almost two centuries on Marajó Island, the largest fluvial-marine island in the world, located in the northern region of Brazil, is the result of a centennial tradition passed down through the generations as a way to use the milk production of buffalos bred on small rural farms, and a source of income and work for the considerable number of producers on the island.

Before the introduction of buffalo in the Island, at the end of XIX century, the production of this cheese was exclusively made with bovine milk. However, with the expressive growth of the buffalo herd, due to the presence of natural pastures and floodplains, the production of buffalo milk increased, and it started to be mixed with bovine milk in cheese production [1]. Thus, since this time, the artisanal cheeses of Marajó started to be produced almost exclusively with buffalo milk.

Today, this cheese is produced from the spontaneous fermentation of raw buffalo milk and/or buffalo added with bovine milk at a maximum proportion of 40% [2], being obtained by fusion and intended for immediate consumption. However, the mixture of those milks may bring alterations in physicochemical characteristics, texture and color parameters, caused by bovine milk composition that has a lower amount of fat, lactose, protein, ashes, Ca and A and C vitamins, and higher concentration of  $\beta$ -carotene, absent in buffalo milk [3] [4]. Buffalo milk has higher levels of fat with a minimum and maximum of 6.6 g 100 g<sup>-1</sup> and 8.8 g 100 g<sup>-1</sup>, while cow milk average is 3.3 g 100 g<sup>-1</sup>[5]. Protein concentration in buffalo milk range from 3.66% to 5.40% and in cow milk average is 3.2% [5].

Cheese is a visco-elastic material formed by a net of casein where dispersed globules of fat and water determine its texture [6]. The texture is identified by consumers as one of the most important attributes of cheese quality [7] and the most important sensorial characteristics, because it allows the consumer to identify specific varieties and their qualities, even before evaluating the flavor [8]. The texture characteristic of cheese is influenced by several factors, one of the most relevant being the raw-material composition [8] and changes on these parameters are caused by concentrations of protein, salt, water, pH and fat, in this order [9]. In addition, color parameters acting as a differential in characterization of different types of cheese [10].

The purpose of this work was to evaluate physicochemical characteristics, texture and color parameters of artisanal Marajó Butter cheese produced with different concentrations of buffalo milk and cow milk.

## II. Material and Methods

### 2.1 Formulations of Butter Cheese

In this study, four formulations of the Butter Cheese were produced with buffalo and cow milk; all were processed in a cheese factory located in the municipality of Cachoeira do Arari, on the Marajó Island. The milk (buffalo and cow) came from the same rural property. The four formulations are designed by: B<sub>100</sub> (100 % buffalo milk); B<sub>80</sub> (80 % buffalo milk + 20 % cow milk); B<sub>70</sub> (70 % buffalo milk + 30 % cow milk) and B<sub>60</sub> (60 % buffalo milk + 40 % cow milk). Three replicates were performed. One cheese from each formulation was selected for analysis. The cheeses were produced according to process used by Marajó's producers, as shown in the workflow diagram depicted in Fig. 1.

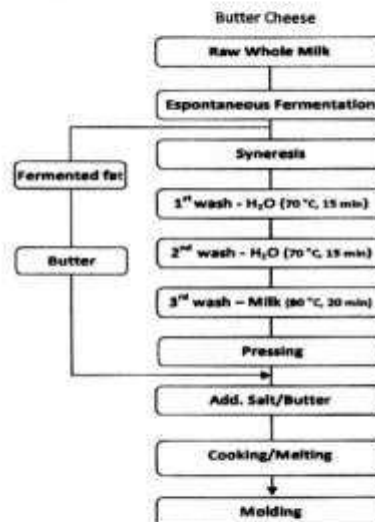


Figure 1 - Production flow chart of artisanal Marajó Butter cheese type.

During cheese preparation, raw milk was homogenized without the addition of a starter culture, submitted to spontaneous fermentation and kept at room temperature (30 °C) for twenty-four hours. The fermented cream on the surface was removed to produce butter. Afterwards, the curd mass went through a manual handling to induce syneresis, and the whey was extracted. Then it was washed twice with water at a room temperature of about 30 °C (2 L of water kg<sup>-1</sup> of curd mass) under heating (70 °C, 15 min), for acidity reduction. A third wash with buffalo milk (2 L of milk kg<sup>-1</sup> of curd mass) was performed, also under heating (70 °C, 15 min), to reincorporate flavor and components washed out by the water, that is, some soluble solids.

Posteriorly, to remove excess liquids, the mass was manually pressed. Salt (15 g kg<sup>-1</sup> of curd mass) and butter (100 g of butter kg<sup>-1</sup> of curd mass) from baking the fermented fat were added and submitted to heat treatment (80 °C, 20 min). In this stage the curd stretching occurs, which is performed by manual beating. The melted mass was distributed in polypropylene plastic packages (PP) and cooled to room temperature (30 °C). All cheeses were refrigerated (7 °C - 8 °C) until the analyses were carried out. A package of each formulation was used for this purpose.

### 2.2 Physicochemical analysis

The cheese fat was determined by the Mojonnier's method [11]. The total protein content was estimated by the micro-Kjeldal's method; moisture was determined by kiln drying at 105 °C until constant weight; and the fixed mineral residue was assessed by calcination in muffle furnace [11]. The factor used in conversion from nitrogen to total protein was 6.38. The cheese pH was determined by the potentiometric method (Metrohn Pensalab Instrumentação Analítica Ltda., São Paulo, SP, Brazil) and the acidity was estimated by the determination of the percentage of lactic acid [11]. Determination of fat content in dry matter was made indirectly, by calculating the ratio between the fat content and the total solid content of the cheese [12]. The analyses of physicochemical composition were evaluated seven days after the production of the formulations. Analyses were performed in duplicates.

### 2.3 Texture Profile Analysis (TPA)

The textural characteristics were evaluated two days after the production of the formulations, using a device from Stable Micro Systems, model TA.XT Plus (Surrey, England), equipped with a cell charge of 25 kg.

Cylindrical samples, with diameters and heights equal to 20 mm, were removed from random points in the cheese, in order to get uniform and homogeneous samples, and kept at room temperature (21 °C). The texture profile was obtained by a double compression test of the cheese cylinder, at room temperature, using a cylindrical compression probe with a 75 mm diameter (P75). Compression was performed at a constant speed of 2.0 mm s<sup>-1</sup> with contact strength equal to 5 g until the sample height was reduced to 10 mm (that means 50% of the initial height). Data was obtained by software Texture Expert 1.20 for Windows (Stable Micro System). Five independent replicates were produced.

#### 2.4 Color Measurement

Two days after the production of the formulations, the cheese color parameters were evaluated using a colorimeter Hunter Lab, model Color Quest XE (Reston, EUA), according to definitions proposed by the Commission Internationale de l'Éclairage. The value L\* represents luminosity and indicates how bright or dark the product is; it refers to the object's capacity to reflect or transmit light and varies from zero (totally black) to one hundred (totally white), the higher the value of L\* is, the brighter the object is. The chromaticity coordinate a\* is an indicator of green (-) and red (+), while b\* is an indicator of blue (-) and yellow (+). The values a\* and b\* were used to calculate Hue (h°), tone angle or color, and Chroma (C\*), color intensity (chromaticity of color saturation), using the following formulas:  $h = \tan^{-1}(b^*/a^*)$  and  $C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$ . The determinations were performed in triplicate, with the calibrated equipment, using 10 samples, 5 from the center and 5 from the periphery of the cheeses from each formulation [10].

#### 2.5 Statistical analysis

In order to compare the physicochemical properties, the averages of experimental data were submitted to analysis of variance (One Way-ANOVA). When significant differences were observed (P ≤ 0.05), Tukey's test was applied. The correlation between texture and physicochemical parameters was expressed as Pearson's correlation coefficient. All analyses used a significance level of 5% (P ≤ 0.05). Values of P were obtained with software BioEstat 5.0.

### III. Results and Discussion

#### 3.1 Physicochemical Composition

Table 1 displays the results of the compositions of each cheese formulation. Statistical differences were found for values of pH, moisture, minerals, protein and fat; however, acidity in the four formulations did not present significant. As expected, cheese made with 100% of buffalo milk (B<sub>100</sub>) had the higher values of protein, fat and minerals and the lower values of pH and moisture [13].

Table1. The physicochemical properties of the cheeses (g 100 g<sup>-1</sup>)<sup>a</sup>

Formulation	Physicochemical Parameters						
	pH	Moisture (%)	Ashes (%)	Fat (%)	Protein (%)	FDM <sup>b</sup> (%)	Acidity <sup>c</sup> (%)
B <sub>100</sub>	5.51 ± 0.01 <sup>d</sup>	47.38 ± 0.06 <sup>d</sup>	2.48 ± 0.01 <sup>a</sup>	37.00 ± 0.01 <sup>d</sup>	26.40 ± 0.14 <sup>f</sup>	75.04 ± 0.10 <sup>f</sup>	0.18 ± 0.01
B <sub>80</sub>	5.60 ± 0.01 <sup>e</sup>	49.93 ± 0.13 <sup>e</sup>	2.37 ± 0.01 <sup>a</sup>	31.00 ± 0.01 <sup>e</sup>	25.05 ± 0.21 <sup>e</sup>	59.54 ± 0.15 <sup>e</sup>	0.16 ± 0.01
B <sub>60</sub>	5.97 ± 0.01 <sup>f</sup>	50.25 ± 0.14 <sup>f</sup>	2.19 ± 0.01 <sup>f</sup>	29.00 ± 0.01 <sup>f</sup>	24.90 ± 0.01 <sup>e</sup>	57.29 ± 0.16 <sup>e</sup>	0.16 ± 0.01
B <sub>40</sub>	5.59 ± 0.01 <sup>e</sup>	50.70 ± 0.12 <sup>f</sup>	2.17 ± 0.01 <sup>f</sup>	27.60 ± 0.01 <sup>e</sup>	24.80 ± 0.01 <sup>e</sup>	57.29 ± 0.14 <sup>f</sup>	0.18 ± 0.01
P value*	0.0004	0.0007	0.0004	0.0001	0.0019	0.0002	0.5518

<sup>a</sup> Each value represents mean ± standard deviation; data represent means of two replicates (n = 6).

<sup>b</sup> FDM – Fat in dry matter.

<sup>c</sup> Lactic acid.

<sup>d-e</sup> Means with different superscript letters within the same column are significantly different (P < 0.05).

The lower moisture in B<sub>100</sub> formulation may be explained by the higher amount of fat present in buffalo milk. This result is according to reports by Souza et al., 2012 [14] that also reported in their studies an increase in the moisture as the fat rate was reduced. In other formulations, the decrease of protein, fat and mineral amounts was due to the lower amounts of those components in cow milk, which was added in larger proportions.

According to Brazilian legislation, "cottage" cheese must have a maximum moisture content of 65% and a minimum fat content on a dry weight basis of 55% [15]. Analysis of moisture and fat concentrations in the four formulations shows that those products may be classified as Butter Cottage Cheese, a melted cheese also called processed cheese, typically from the northern region of Brazil.

The partial substitution of 20%, 30% and 40% of buffalo milk for cow milk caused the reduction of fat in 16.2%, 21.6% and 25.4%, and protein in 5.2%, 5.7%, and 6%, respectively. Thus, Butter cheeses manufactured with the partial addition of cow milk have more moisture and lower concentration of protein, minerals and calories.

### 3.2 Texture Profile Analysis (TPA)

Results for Texture Profile Analysis (TPA) are compiled in Table 2.

When there is a reduction of fat, the microstructure of the protein net is changed; normally hardness and elasticity increase, while adhesiveness and cohesiveness decrease [16]. On the other hand, cheeses with high amounts of fat are characterized by attributes such as more softness, cohesiveness and good flavor.

Table 2. Textural characteristics of the cheeses<sup>a</sup>

Formulation	Texture Characteristics						
	Hardness (N)	Fracturability (N)	Adhesiveness	Springiness (mm)	Cohesiveness	Gumminess (N)	Chewiness (N.mm)
B <sub>100</sub>	28.20 ± 4.32	30.80 ± 2.94	-2.257 ± 0.549	7.24 ± 0.40 <sup>b</sup>	0.66 ± 0.05 <sup>b</sup>	19.93 ± 3.07 <sup>b</sup>	143.97 ± 23.27 <sup>b</sup>
B <sub>80</sub>	27.23 ± 4.98	28.83 ± 3.86	-2.329 ± 1.567	5.87 ± 0.66 <sup>c</sup>	0.51 ± 0.02 <sup>c</sup>	11.73 ± 1.33 <sup>c</sup>	69.28 ± 10.57 <sup>c</sup>
B <sub>70</sub>	26.87 ± 3.27	28.60 ± 4.56	-1.951 ± 1.066	5.47 ± 0.49 <sup>c</sup>	0.45 ± 0.04 <sup>c</sup>	11.30 ± 2.66 <sup>c</sup>	62.50 ± 16.44 <sup>c</sup>
B <sub>60</sub>	26.10 ± 2.53	27.83 ± 3.97	-1.662 ± 0.300	5.37 ± 0.98 <sup>c</sup>	0.45 ± 0.05 <sup>c</sup>	10.08 ± 2.08 <sup>c</sup>	54.80 ± 16.51 <sup>c</sup>
P value	0.596	0.075	0.7178	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

<sup>a</sup> Each value represents mean ± standard deviation; data represent means of five replicates (n = 15).

<sup>b,c</sup> Means with different superscript letters within the same column are significantly different (P < 0.05).

However, in this study, the reduction of fat, caused by the increase of cow milk concentration, reduced the values of elasticity cohesiveness, gumminess and chewiness while not significantly changing the values of hardness, brittleness and adhesiveness.

Hardness, the measure of the strength needed to compress a sample producing a deformation, is explained by resistance of the protein matrix of cheese; in other words, lower concentrations of protein reduced the hardness. However, the joint action of protein and fat reduction, caused by the cow milk, kept the cheese's hardness. In this case, lower values of hardness, produced by the lower concentration of proteins, possibly were balanced by the lower amount of fat that caused higher resistance to deformation, an antagonistic effect [17].

Values of hardness were lower when compared with other types of cheese, for example, Cheddar, Gouda, Mozzarella and rennet cheese; they were respectively 47 N, 77 N, 68 N and 36 N [18]. On the other hand, the values of hardness were higher than the ones found in fresh cheese [19].

Elasticity, or recovery after compression, as seen in Table 2, went from 7.24 mm to 5.37 mm, showing that the increase of cow milk concentration reduced the elasticity of Butter Cheese, with formulation B<sub>100</sub> significantly differed from others which had similar elasticity. In cheese, the protein matrix produces elasticity [8] and is the main factor responsible for flexibility and recovery after tension removal. Thus, as there was a decrease in the amount of protein with the increase of cow milk concentration, TPA values for elasticity decreased. In comparison to Cheddar, Gouda, and Mozzarella, that have elasticity values from 8.5 to 10.0 mm, Butter Cheese does not recover well after compression [20].

Finally, for the parameters cohesiveness and chewiness the values decreased with the decline in the concentration of added cow milk. The cohesion was between 0.45 and 0.66, contrasting with 0.21, 0.28 and 0.41 for cheeses like fresh *Cheddar*, *Gouda* and *Mozzarella* [20]. Therefore, artisanal Marajó Butter cheese is quite cohesive. The values for chewiness were higher to those reported for cheese of the *Feta* type, elaborated from buffalo milk [21].

Thus, Butter cheeses manufactured with the partial addition of cow milk kept the same hardness, fracturability and adhesiveness, but lower elasticity, cohesiveness and chewiness.

### 3.3 Correlation between physicochemical and texture parameters

Pearson's correlation coefficients between texture parameters and physicochemical characteristics are presented in Table 3. Analyzing the values found, it was observed that moisture had significant and strongly negative correlation with elasticity, cohesiveness, gumminess and chewiness. On the other hand, fat and protein had significant and strongly positive correlations with elasticity, cohesiveness, gumminess and chewiness. The pH did not significantly influence alterations of texture parameters. The meaning and importance of correlation coefficients may be related to the type of formulation and, in this experimental model, the increase of cow milk concentration caused the decrease of protein and fat concentration, and also, the increase of moisture, which played an important role on the decrease of elasticity, cohesiveness, gumminess and chewiness of cheeses.

Table 3. Linear correlation between physicochemical and texture parameters.<sup>a</sup>

Formulation	Texture Characteristics						
	Hardness	Fracturability	Adhesiveness	Springiness	Cohesiveness	Gumminess	Chewiness
Moisture	-0.705 <sup>NS</sup>	-0.843 <sup>NS</sup>	0.627 <sup>NS</sup>	-0.997 <sup>S</sup>	-0.983 <sup>S</sup>	-0.986 <sup>S</sup>	-0.992 <sup>S</sup>
FDM <sup>b</sup>	0.674 <sup>NS</sup>	0.765 <sup>NS</sup>	-0.548 <sup>NS</sup>	0.996 <sup>S</sup>	0.983 <sup>S</sup>	0.986 <sup>S</sup>	0.967 <sup>S</sup>
Protein	0.675 <sup>NS</sup>	0.796 <sup>NS</sup>	-0.569 <sup>NS</sup>	0.998 <sup>S</sup>	0.982 <sup>S</sup>	0.985 <sup>S</sup>	0.999 <sup>S</sup>
pH	-0.632 <sup>NS</sup>	-0.065 <sup>NS</sup>	0.272 <sup>NS</sup>	-0.541 <sup>NS</sup>	-0.612 <sup>NS</sup>	-0.607 <sup>NS</sup>	-0.571 <sup>NS</sup>

<sup>a</sup> Results expressed as Pearson's correlation coefficient (r).

<sup>b</sup> Fat in dry matter.

S - Significant (P < 0.05).

NS - Not significant (P ≥ 0.05).

### 3.4 Color Analysis

Table 4 shows the average values of color parameters of cheeses obtained by instrumental measures. For the four formulations, parameter a\* had negative values, appearing slightly green in color, while parameter b\* had positive values, appearing slightly yellow in color. For variables L\*, a\*, b\* and h° significant differences were found (P<0.05) between the four formulations.

Table 4. Mean composition and Hunter color (L\*, a\*, b\*, C\*, h°) values of cheeses<sup>a,b</sup>.

Formulation	Hunter Color				
	L*	a*	b*	C*	h°
B <sub>100</sub>	88.67 ± 4.90 <sup>b</sup>	-5.41 ± 0.48 <sup>b</sup>	17.47 ± 1.04 <sup>b</sup>	19.53 ± 0.89	106.07 ± 1.86 <sup>b</sup>
B <sub>80</sub>	86.71 ± 3.20 <sup>b</sup>	-4.41 ± 0.42 <sup>c</sup>	18.29 ± 1.06 <sup>c</sup>	18.02 ± 0.85	103.14 ± 0.48 <sup>c</sup>
B <sub>70</sub>	86.56 ± 5.52 <sup>b</sup>	-3.67 ± 0.68 <sup>d</sup>	18.85 ± 1.75 <sup>c,d</sup>	18.86 ± 2.05	100.70 ± 2.46 <sup>d</sup>
B <sub>60</sub>	84.85 ± 4.96 <sup>c</sup>	-3.53 ± 0.56 <sup>e</sup>	21.38 ± 1.54 <sup>e</sup>	21.68 ± 1.15	99.41 ± 1.63 <sup>e</sup>
P-value	0.0228	< 0.0001	< 0.0001	0.8660	< 0.0001

<sup>a</sup> Each value represents mean ± standard deviation; data represent means of five replicates (n = 30).

<sup>b-c</sup> Means with different superscript letters within the same column are significantly different (P < 0.05).

As expected, cheese produced with 100% of buffalo milk had a higher value for luminosity (white component), differing only in B<sub>60</sub>. In the same way, formulation B<sub>100</sub> reached higher values of the chromaticity component of green color, caused by the presence of the blue-green pigment (biliverdin), which is present in buffalo milk and absent in cow milk [3]. However, the presence of β-carotene pigment in cow milk caused an increase in the yellow chromaticity component in formulations produced with this type of milk [3].

Values of C\* that quantify saturation or color intensity, were not significantly affected by the addition of cow milk. However, the tone angle (h°), indicated the existence of significant variations in formulation tonalities. In this case, the increase in cow milk concentration did not cause an increase in color intensity but did cause a change in the yellow-greenish tonality, with an emphasis in yellow tones.

### IV. Conclusion

Partial addition of cow milk improved some properties of artisanal Marajó Butter cheese. Moisture and pH shown a significantly increased, however, smaller amounts of protein, minerals and fat were found. Similarly, the instrumental elasticity, cohesiveness and chewiness decreased. The increase of moisture played an important role on the decrease of elasticity, cohesiveness, gumminess and chewiness of these cheeses. The increase in cow milk concentration did not cause an increase in color intensity but changed the yellow-greenish tonality, with an emphasis in yellow tones.

### Acknowledgements

The authors gratefully thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) for their financial support and Secretaria de Estado da Agricultura e Desenvolvimento Rural – Soure/PA (SAGRI) and cheese producers in the city Cachoeira do Arari, for technical help with the cheese processing.

### References

- [1] A. Figueiras and M. Quadros, Queijo Marajó: Começa a fase industrial, Revista Agroamazônia, (3), 2002, 36-37.
- [2] Pará, Agência Estadual de Defesa Agropecuária do Estado do Pará. Portaria n°418 de 04 de março de 2013 aprova o Regulamento Técnico para a Produção do Queijo do Marajó. Diário Oficial do Estado do Pará, 2013 març. 06
- [3] M. H. Abd El-Salam and S. A. El-Shibiny, A comprehensive review on the composition and properties of buffalo milk, Dairy Science & Technology, 91(6), 2011, 663- 690.

- [4] E. Medhammar, R. W. Bettoni, B. Stadlmayr, E. Nilsson, U. R. Charrondine and B. Burlingame, Composition of milk from minor dairy animals and buffalo breeds: a biodiversity perspective, *Journal of Science Agriculture*, 92(3), 2012, 445-474.
- [5] Usda. National Nutrient Database for Standard Reference, 2009, <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search>, accessed oct. 02, 2012.
- [6] J. H. Prentice, K. R. Langley and R. J. Marshall, Cheese Rheology, in: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (Fox PF et al., editor: Chapman and Hall, 1993).
- [7] F. R. Jack, A. Paterson and J. R. Piggot, Relationships between rheology and composition of Cheddar cheeses and texture as perceived by consumers, *International Journal of Food Science & Technology*, 28, 1993, 293-302.
- [8] P. F. Fox, T. P. Guinee, T. M. Cogan and P. L. H. Mc Sweeney, Cheese rheology and texture, in: *Fundamentals of cheese science* (Fox P.F. et al., editor: Aspen Publisher Inc, 2000).
- [9] A. H. Chen, J. W. Larkin, C. J. Clark and W. E. Irwin, Textural analysis of cheese, *Journal of Dairy Science*, 62, 1979, 901-907.
- [10] B. P. Pathare, U. L. Opara, F. A. J. Al-Said, Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods: A Review, *Food Bioprocess Technology* (on line), <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11947-012-0867-9#page-1>, accessed oct. 28, 2012.
- [11] Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária - Instrução Normativa n° 68, de 12 de dezembro de 2006. Métodos Analíticos Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. Diário Oficial da União, Brasília-DF, 2006 dez. 14.
- [12] D. B. C. Pereira, P. H. F. Silva, L. L. Oliveira and J. L. C. G. C Costa, Físico-química do leite e derivados-Métodos analíticos (Juiz de Fora-MG: Oficina de Impressão Gráfica e Editora Ltda., 2001).
- [13] A. G. Karahan, A. Kart, A. Akoğlu and M. L. Çakmakç, Physicochemical properties of low-fat soft cheese Turkish Beyaz made with bacterial cellulose as fat mimetic, *International Journal of Dairy Technology*, 64(4), 2011, 502-508.
- [14] V. R. Souza, J. D. S Carneiro, S. M. Pinto, A. B. Souza and R. Stephani, Efeito da concentração de gordura nas propriedades físicas, químicas e sensoriais do queijo *petit suisse* elaborado com retenção de soro, *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 67(386), 2012, 20 - 28.
- [15] Mercosul. Regulamento Mercosul/Gmc. Resolução n° 82, de 11 de outubro de 1996. Estabelece o Regulamento Técnico Mercosul de Identidade e Qualidade do Requeijão. Tratado de Assunção, Protocolo de Ouro Preto, artigo 10 da Decisão n° 4/91 do Conselho do Mercado Comum. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 1996 oct. 11.
- [16] A. H. Chen, Larkin JW, Clark CJ, Irwin WE, Textural analysis of cheese, *Journal of Dairy Science*, 62, 1979, 901-907.
- [17] C. C. Lobato, C. E. J. Vernon, L. I. Guerrero, S. J. Soriano and B. H. Escalona, Use of fat blends in cheese analogs: Influence on sensory and instrumental textural characteristics. *Journal Texture Study*, 28, 1998, 619-632.
- [18] M. H. Tunick and D. L. Van Hekken, Torsion gelometry of cheese. *Journal of Dairy Science*, 85, 2002, 2743-2749.
- [19] M. H. Tunick and D. L. Van Hekken, L. Guo and P. M. Tomasula, Chemistry of Queso Fresco. In: *Hispanic Foods: Chemistry and Bioactive Compounds*, American Chemical Society Symposium Series, Washington, DC: American Chemical Society Publication, 2012. p. 11-23.
- [20] M. H. Tunick and D. L. Van Hekken, Torsion gelometry of cheese. *Journal of Dairy Science*, 85, 2002, 2743-2749.
- [21] S. Kumar, S. K. Kanawjia, S. Kumar and S. Kharkar, Effect of rate of addition of starter culture on textural characteristics of buffalo milk Feta type cheese during ripening. *Journal of Food Science and Technology* (on line), 2011, 1-5.

## **7. CONSIDERAÇÕES GERAIS**

A avaliação dos efeitos da variação sazonal sobre as características do leite de búfala e dos queijos artesanais Creme e Manteiga fornecerá aos produtores da Ilha do Marajó resultados importantes a serem seguidos, de modo a garantir a qualidade desses queijos artesanais, sem o risco de perder sua autenticidade e a fidelização de seus consumidores.

A adição de até 40% de leite de vaca ao leite de búfala poder ser uma alternativa interessante para os produtores destes tipos de queijos, especialmente durante o período de seca, permitindo um abastecimento no mercado em períodos de entressafra, quando a produção do leite de búfala diminui.

Os dados gerados nesta pesquisa foram utilizados para fundamentar o Projeto de Elaboração do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) dos queijos do Marajó (PARA, 2013) encaminhado ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e estão auxiliando os produtores no processo de obtenção da certificação dos seus queijos, que possibilita a comercialização legal no estado do Pará, e futuramente em todo território brasileiro.

## **8. ANEXOS**

## 8.1. Formulários das Análises Sensoriais

### 8.1.1 Queijo Creme

Assinale com x a resposta mais adequada

**Sexo:**

1 ( ) Masculino    2 ( ) Feminino

**Idade em anos:**

1 ( ) 15 – 20    2 ( ) 21 – 25    3 ( ) 26 – 30    4 ( ) 31 – 35    5 ( ) 36 – 40    6 ( ) 41 – 45  
7 ( ) mais de 45

Avalie a amostra de queijo utilizando a escala abaixo para descrever o quanto você gostou ou desgostou. Escreva a nota que melhor corresponde ao seu julgamento.

- 9 - Gostei extremamente
- 8 - Gostei muito
- 7 - Gostei moderadamente
- 6 - Gostei ligeiramente
- 5 - Não gostei/nem desgostei
- 4 - Degostei ligeiramente
- 3 - Degostei moderadamente
- 2 - Degostei muito
- 1 - Degostei extremamente

Amostra A		Amostra B		Amostra AC		Amostra D	
Atributo	Nota	Atributo	Nota	Atributo	Nota	Atributo	Nota
Aparência geral		Aparência geral		Aparência geral		Aparência geral	
Cor		Cor		Cor		Cor	
Odor		Odor		Odor		Odor	
Sabor		Sabor		Sabor		Sabor	
Textura		Textura		Textura		Textura	

Qual desses produtos você compraria: ( ) A    ( ) B    ( ) C    ( ) D

### 8.1.2 Queijo Manteiga

Assinale com x a resposta mais adequada:

**Sexo:**

1 ( ) Masculino    2 ( ) Feminino

**Idade em anos:**

1 ( ) 15 – 20    2 ( ) 21 – 25    3 ( ) 26 – 30    4 ( ) 31 – 35    5 ( ) 36 – 40    6 ( ) 41 – 45  
7 ( ) mais de 45

Avalie a amostra de queijo utilizando a escala abaixo para descrever o quanto você gostou ou desgostou. Escreva a nota que melhor corresponde ao seu julgamento.

- 9 - Gostei extremamente
- 8 - Gostei muito
- 7 - Gostei moderadamente
- 6 - Gostei ligeiramente
- 5 - Não gostei/nem desgostei
- 4 - Degostei ligeiramente
- 3 - Degostei moderadamente
- 2 - Degostei muito
- 1 - Degostei extremamente

Amostra A		Amostra B		Amostra AC		Amostra D	
Atributo	Nota	Atributo	Nota	Atributo	Nota	Atributo	Nota
Aparência geral		Aparência geral		Aparência geral		Aparência geral	
Cor		Cor		Cor		Cor	
Odor		Odor		Odor		Odor	
Sabor		Sabor		Sabor		Sabor	
Textura		Textura		Textura		Textura	

Qual desses produtos você compraria: ( ) A ( ) B ( ) C ( ) D

## 8.2. Dados Experimentais

### 8.2.1. Efeitos da Sazonalidade

#### 8.2.1.1 Leite de búfala – Análises Físico-Químicas – Estação das Chuvas

Tabela 1A– Valores brutos das análises físico-químicas do leite de búfala. Estação das chuvas, janeiro a junho

Propriedades	pH	Acidez	DE	ESD	EST	CI	Lactose	Gordura	Proteína	Minerais	CCS(x 10 <sup>3</sup> )
CA-01	7,10	0,12	1,033	9,94	16,58	-0,552	5,27	6,63	3,70	0,97	342,00
CA-02	6,90	0,17	1,033	10,14	16,96	-0,542	5,27	6,82	3,90	0,97	130,00
CA-03	6,40	0,30	1,029	9,95	17,90	-0,679	5,30	7,95	3,70	0,95	488,00
CA-04	7,00	0,14	1,031	10,06	15,66	-0,565	5,24	5,24	4,00	0,83	620,00
CA-05	6,90	0,13	1,029	10,20	17,16	-0,554	5,26	5,26	4,10	0,84	27,00
CA-06	6,80	0,23	1,029	10,27	16,18	-0,661	5,26	5,26	4,20	0,86	523,00
CA-07	7,00	0,14	1,029	10,10	16,82	-0,546	5,25	5,25	4,10	0,75	301,00
CA-08	7,00	0,12	1,027	10,24	17,83	-0,535	5,26	5,26	4,10	0,93	410,00
CA-09	6,90	0,15	1,032	10,00	17,55	-0,601	5,19	5,19	4,00	0,82	821,00
CA-10	6,80	0,16	1,035	10,10	16,00	-0,690	5,25	5,25	4,00	0,85	39,00
CA-11	6,90	0,14	1,028	10,14	16,48	-0,546	5,25	5,25	4,00	0,88	104,00
SO-02	6,90	0,16	1,033	8,93	16,89	-0,530	5,26	5,25	3,00	0,67	420,00
SO-03	7,00	0,14	1,029	9,96	17,83	-0,529	5,29	5,29	4,00	0,67	220,00
SO-05	7,00	0,13	1,031	10,01	17,24	-0,541	5,27	5,27	3,90	0,91	155,00
SO-06	6,59	0,16	1,036	10,02	15,38	-0,530	4,54	5,35	5,45	0,95	296,00
SO-07	6,60	0,18	1,035	10,06	15,41	-0,530	4,68	5,35	5,35	0,88	219,00
SA-01	7,00	0,16	1,034	9,78	18,06	-0,540	5,30	5,30	3,50	0,97	38,00
SA-02	6,90	0,15	1,029	9,75	15,86	-0,552	5,23	5,23	4,10	0,65	262,00
SA-03	6,80	0,19	1,029	9,87	17,78	-0,520	5,19	5,19	4,00	0,68	269,00
SA-04	6,90	0,17	1,031	10,21	18,32	-0,548	5,34	5,34	3,90	0,97	168,00
<b>Média</b>	<b>6,87</b>	<b>0,16</b>	<b>1,031</b>	<b>9,94</b>	<b>16,89</b>	<b>-0,565</b>	<b>5,20</b>	<b>5,53</b>	<b>4,05</b>	<b>0,84</b>	<b>292,57</b>
<b>Desvio-Padrão</b>	<b>0,17</b>	<b>0,04</b>	<b>0,003</b>	<b>0,36</b>	<b>0,92</b>	<b>0,051</b>	<b>0,20</b>	<b>0,71</b>	<b>0,53</b>	<b>0,84</b>	<b>290,10</b>

CA = Cachoeira do Arari; SO =soure; SA = Salvaterra; acidez =% ácido láctico; DE = densidade (g cm<sup>-3</sup>); ESD = extrato seco desengordurado; EST = extrato seco total; CI = índice crioscópico (°H); lactose, gordura, proteína e minerais = %; e CCS = contagem células somáticas (cell/mL).

### 8.2.1.2 Leite de búfala – Análises Microbiológicas – Estação das Chuvas

Tabela 2A – Valores brutos das microbiológicas do leite de búfala. Estação das chuvas, janeiro a junho

Propriedades	CPP(x 10 <sup>3</sup> )	Coliformes (45 °C)	Salmonella	Staphylococcus	E. coli
CA-01	370	> 1.100	aus/25	<10	presença
CA-02	160	1.100	aus/25	6,0 X 10 <sup>4</sup>	presença
CA-03	160	> 1.100	aus/25	7,0 X 10 <sup>3</sup>	presença
CA-04	150	> 1.100	aus/25	<10	presença
CA-05	280	150	aus/25	<10	presença
CA-06	190	> 1.100	aus/25	<10	presença
CA-07	240	> 1.100	aus/25	<10	presença
CA-09	390	> 1.100	aus/25	1,4 X 10 <sup>4</sup>	presença
CA-10	380	> 1.100	aus/25	<10	presença
CA-11	360	>1.100	aus/25	<10	presença
SO-02	390	>1.100	aus/25	<10	presença
SO-06	2,8	< 3	aus/25	<10	presença
SO-07	4,3	< 3	aus/25	<10	presença
SA-01	400	> 1.100	aus/25	<10	presença
SA-02	2,6	23	aus/25	<10	presença
<b>Média</b>	<b>232</b>				
<b>Desvio-Padrão</b>	<b>150</b>				

CA = Cachoeira do Arari; SO =soure; SA = Salvaterra; CPP =contagem-padrão em placas (UFC/mL); coliformes 45 °C = NMP/mL; e *Staphylococcus* – UFC/mL.

### 8.2.1.3 Queijos do Marajó – Análises Físico-Químicas – Estação das Chuvas

Tabela 3A – Valores brutos das análises físico-químicas dos queijos do Marajó, Manteiga e Creme. Estação das chuvas, janeiro a junho

Propriedades	Proteína	Gordura	GES	Umidade	Cinzas	Acidez	pH	Aw	NaCl	Ca	FMC
CA-01	25,40	22,26	45,18	50,73	2,71	0,28	5,28	0,96	1,33	0,44	109,00
CA-02	25,40	21,15	46,96	54,96	2,65	0,30	5,15	1,00	1,55	0,48	84,00
CA-03	25,90	23,63	47,64	52,39	2,69	0,32	5,17	1,00	1,57	0,33	75,00
CA-04	26,05	22,51	42,65	47,22	2,70	0,34	5,10	1,00	1,34	0,40	67,00
CA-05	25,05	23,27	45,63	49,00	2,71	0,39	5,22	0,99	1,76	0,58	43,00
CA-08	25,80	27,00	53,85	49,85	2,64	0,29	5,17	1,00	1,50	0,44	60,00
<b>Média</b>	<b>25,43</b>	<b>23,30</b>	<b>46,99</b>	<b>50,69</b>	<b>2,68</b>	<b>0,32</b>	<b>5,18</b>	<b>0,99</b>	<b>1,51</b>	<b>0,45</b>	<b>73,02</b>
<b>Desvio-Padrão</b>	<b>0,53</b>	<b>2,01</b>	<b>3,78</b>	<b>2,71</b>	<b>0,03</b>	<b>0,04</b>	<b>0,06</b>	<b>0,02</b>	<b>0,16</b>	<b>0,08</b>	<b>23,97</b>
SO-03	26,00	36,20	60,14	39,82	2,68	0,61	5,46	0,99	1,25	0,25	44,00
SO-04	25,80	30,53	53,34	42,74	2,49	0,62	5,31	1,00	1,12	0,22	22,00
SO-05	25,95	31,22	51,72	39,63	2,71	0,59	5,32	1,00	1,26	0,34	6,00
SO-06	23,30	35,58	57,77	38,40	1,65	0,67	5,80	1,00	1,23	0,36	60,00
SO-07	21,65	35,69	57,57	38,01	1,35	0,67	5,72	0,99	1,37	0,41	38,00
SA-01	25,95	32,94	55,20	40,32	2,67	0,61	5,06	1,00	1,08	0,28	64,00
SA-02	26,00	27,71	54,14	48,81	2,70	0,63	5,30	1,00	1,06	0,17	
SA-03	25,30	29,20	50,57	42,31	2,70	0,64	5,11	0,95	1,07	0,23	
<b>Média</b>	<b>24,99</b>	<b>32,38</b>	<b>55,06</b>	<b>41,26</b>	<b>2,37</b>	<b>0,63</b>	<b>5,26</b>	<b>0,99</b>	<b>1,18</b>	<b>0,28</b>	<b>39,00</b>
<b>Desvio-Padrão</b>	<b>1,63</b>	<b>3,22</b>	<b>3,26</b>	<b>3,48</b>	<b>0,55</b>	<b>0,03</b>	<b>0,15</b>	<b>0,02</b>	<b>0,11</b>	<b>0,08</b>	<b>28,14</b>

CA = queijo Manteiga; SO/SA = queijo Creme; acidez =% ácido láctico; GES = gordura no extrato seco (%); e gordura, proteína, minerais, NaCl e Ca = %.

### 8.2.1.4 Queijos do Marajó – Análises Microbiológicas– Estação das Chuvas

Tabela 4A – Valores brutos das análises microbiológicas dos queijos do Marajó, Manteiga e Creme. Estação das chuvas, janeiro a junho

Propriedades	Coliformes 35 °C	Coliformes 45 °C	Salmonella	Staphylococcus	Fungos e Leveduras	Listeria
CA-01	<3	<3	Aus	<10	22.000	Aus
CA-02	<3	<3	Aus	<10	24.000	Aus
CA-03	<3	<3	Aus	<10	47.000	Aus
CA-04	<3	<3	Aus	<10	7.800	Aus
CA-05	<3	<3	Aus	<10	1.300	Aus
CA-06	<3	<3	Aus	<10	37.000	Aus
CA-07	<3	<3	Aus	<10	28.000	
SO-03			Aus		120	Aus
SO-04	<3	<3	Aus	<10	14.000	Aus
SO-05	<3	<3	Aus	<3	1.200	Aus
SA-01	<3	<3	Aus	<10	800	Aus
SA-01	<3	75	Aus	<10	590.000	Aus
SA-02	<3	<3	Aus	<10	130.000	Aus
SA-03	<3	210	Aus	<10		Aus
SA-06	<3	9	Aus	<10		Aus
SA-07	<3	3	Aus	<10		Aus

CA – queijo Manteiga; SO/SA – queijo Creme; Coliformes 35 °C - NMP/mL; Coliformes 45 °C - NMP/mL; *Staphylococcus* – UFC/mL.

### 8.2.1.5 Leite de búfala – Análises Físico-Químicas–Estação da Seca

Tabela 5A – Valores brutos das análises físico químicas do leite de búfala. Estação das chuvas, julho a dezembro

Propriedades	pH	Acidez	DE	ESD	EST	CI	Lactose	Gordura	Proteína	Minerais	CCS(x 10 <sup>3</sup> )
CA-01	6,99	0,15	1,032	10,49	15,69	-0,550	4,82	6,20	3,60	0,67	219
CA-02	6,80	0,15	1,029	8,54	15,99	-0,528	5,00	6,30	3,40	0,65	13
CA-03	6,74	0,16	1,029	8,61	14,46	-0,591	5,67	5,85	3,50	0,58	263
CA-04	6,84	0,14	1,031	9,41	15,91	-0,538	4,99	6,50	3,80	0,55	876
CA-05	6,76	0,16	1,030	9,23	16,23	-0,550	5,83	7,00	4,15	0,64	145
CA-07	6,96	0,14	1,033	9,95	15,95	-0,602	5,64	6,00	3,60	0,61	451
CA-08	6,84	0,15	1,032	8,51	14,05	-0,572	4,58	8,80	3,40	0,60	267
CA-10	6,78	0,14	1,031	7,66	13,51	-0,545	4,59	7,85	3,40	0,57	362
SA-02	6,85	0,15	1,033	9,74	15,84	-0,594	5,04	6,10	4,00	0,63	163
SA-06	6,81	0,17	1,033	8,44	18,00	-0,685	5,03	8,60	4,90	0,66	220
SA-07	6,90	0,15	1,029	8,39	16,48	-0,576	5,74	7,00	4,90	0,65	65
SO1	7,01	0,16	1,030	9,08	16,08	-0,538	5,67	7,00	3,85	0,59	36
SO4	6,87	0,16	1,035	8,76	16,00	-0,530	5,06	4,80	4,60	0,68	37
<b>Média</b>	6,86	0,15	1,031	8,99	15,77	-0,569	5,20	6,74	3,92	0,62	240
<b>Desvio-Padrão</b>	0,12	0,03	0,004	0,12	1,54	0,048	0,20	1,19	0,54	0,09	232

CA = Cachoeira do Arari; SO =soure; SA = Salvaterra; acidez =% ácido láctico; DE = densidade (g cm<sup>-3</sup>); ESD = extrato seco desengordurado; EST = extrato seco total; CI = índice crioscópico (°H); lactose, gordura, proteínas e minerais = %; e CCS = contagem células somáticas (cell/mL).

### 8.2.1.6 Leite de búfala - Análises Microbiológicas - Estação da Seca

Tabela 6A– Valores brutos das análises microbiológicas do leite de búfala. Estação das chuvas, julho a dezembro

Propriedades	CPP(x 10 <sup>3</sup> )	Coliformes 45 °C	Salmonella	Staphylococcus	E. coli
CA-01	170	< 3	aus/25	<10	presença
CA-02	1,3	< 4	aus/25	<10	presença
CA-03	220	240	aus/25	<10	presença
CA-04	290	9	aus/25	<10	presença
CA-05	180	43	aus/25	<10	presença
CA-06	3,1	<3	aus/25	<10	presença
CA-07	160	23	aus/25	<10	presença
CA-09	240	> 1.100	aus/25	1,4 X 10 <sup>4</sup>	presença
CA-10	160	> 1.100	aus/25	<10	presença
CA-11	360	>1.100	aus/25	<10	presença
SO-02	46	4	aus/25	<10	presença
SO-04	1,7	<3	aus/25	<10	aus
SA-01	400	> 1.100	aus/25	<10	presença
SA-02	2,6	<3	aus/25	<10	aus
SA-06	2,3	> 1.100	aus/25	<10	aus
SA-07	4,3	< 3	aus/25	<10	aus
<b>Média</b>	140				
<b>Desvio-Padrão</b>	137				

CA = Cachoeira do Arari; SO =soure; SA = Salvaterra; CPP =contagem-padrão em placas (UFC/mL); coliformes 45 °C = NMP/mL; e *Staphylococcus* =UFC/mL.

### 8.2.1.7 Queijos do Marajó – Análises Físico-Químicas – Estação da Seca

Tabela 7A–Valores brutos das análises físico químicas dos queijos do Marajó, Manteiga e Creme. Estação das chuvas, julho a dezembro

Propriedades	Proteína	Gordura	GES	Umidade	Cinzas	Acidez	pH	Aw	NaCl	Ca	FMC
CA-01	20,90	24,72	53,15	53,49	1,38	0,48	5,81	0,70	1,00	0,22	60,00
CA-02	25,80	21,44	44,10	51,38	1,40	0,49	5,31	0,62	1,10	0,13	71,00
CA-03	23,50	24,76	50,41	50,88	1,41	0,47	5,40	0,64	1,18	0,14	60,00
CA-04	24,60	30,47	55,26	44,86	1,40	0,48	5,68	0,52	1,28	0,24	46,00
CA-05	26,00	29,36	52,36	43,93	1,42	0,49	4,90	0,59	1,76	0,26	62,00
CA-08	25,50	21,43	44,65	52,01	1,41	0,45	5,20	0,49	0,98	0,08	61,00
<b>Média</b>	24,38	25,36	49,99	49,43	1,40	0,49	5,39	0,59	1,21	0,18	60,00
<b>Desvio-Padrão</b>	1,77	3,84	2,49	4,00	0,02	0,02	0,41	0,08	0,20	0,07	8,46
SA-01	21,75	37,20	61,50	39,51	1,40	0,80	5,43	0,55	1,50	0,32	10,00
SA-02	22,50	27,17	63,79	41,26	1,44	0,77	5,33	0,47	1,11	0,13	6,00
SA-03	21,50	33,62	60,96	44,85	1,41	0,49	6,28	0,48	1,35	0,14	11,00
SA-06	20,80	38,15	63,59	40,01	1,41	0,84	5,44	0,46	0,93	0,14	9,00
SA-07	18,90	41,58	68,44	39,25	1,39	0,92	5,24	0,47	1,18	0,16	19,00
SO4	20,00	40,46	66,48	39,14	1,38	0,87	5,54	0,53	1,16	0,18	11,00
SO1	21,30	37,96	62,59	39,25	1,40	0,94	5,01	0,46	0,91	0,29	
SO2	21,90	39,01	64,02	39,07	1,38	0,64	5,68	0,47	1,10	0,21	
<b>Média</b>	21,08	36,89	63,92	40,29	1,40	0,78	5,49	0,49	1,21	0,18	10,98
<b>Desvio-Padrão</b>	1,16	4,59	2,49	1,98	0,02	0,15	0,38	0,03	0,20	0,07	4,50

CA = queijo Manteiga; SO/SA = queijo Creme; acidez =% ácido láctico; GES = gordura no extrato seco (%); e gordura, proteína, minerais, NaCl e Ca = %.

### 8.2.1.8 Queijos do Marajó – Análises Microbiológicas – Estação da seca

Tabela 8A – Valores brutos das análises microbiológicas dos queijos do Marajó, Manteiga e Creme. Estação das chuvas, julho a dezembro

Propriedades	Coliformes (35 °C)	Coliformes (45 °C)	<i>Salmonella</i>	<i>Staphylococcus</i>	Fungos e Leveduras	<i>Listeria</i>
CA-01	<3	<3	Aus	<10	800	Aus
CA-02	<3	<3	Aus	<10	18.000	Aus
CA-03	<3	<3	Aus	<10	1.900	Aus
CA-04	<3	<3	Aus	<10	7.800	Aus
CA-05	<3	<3	Aus	<10	45.000	Aus
CA-06	<3	<3	Aus	<10	890	Aus
CA-07	<3	<3	Aus	<10	4.000	Aus
SO-03			Aus		120	Aus
SO-04	<3	<3	Aus	<10	10	Aus
SO-05	<3	<3	Aus	<3	1.200	Aus
SA-01	<3	<3	Aus	<10	10	Aus
SA-02	<3	<3	Aus	<10	500	Aus
SA-03	<3	<3	Aus	<10	130.000	Aus
SA-06	<3	<3	Aus	<10	110.000	Aus
SA-07	<3	3	Aus	<10	14.000	Aus

CA = queijo Manteiga; SO/SA = queijo Creme; coliformes 35 °C = NMP/mL; coliformes 45 °C = NMP/mL; e *Staphylococcus*=UFC/mL.

### 8.2.2 Queijo Creme – Elaborado com leite de búfala e leite de vaca

#### 8.2.2.1 Análise físico-química

Tabela 9A – Valores brutos das análises físico-químicas dos queijos Creme elaborados com a mistura de leite de búfala com leite de vaca

	100%	80%	70%	60%
Acidez (% ácido láctico)	0,36	0,31	0,23	0,20
	0,36	0,31	0,23	0,21
pH	5,57	5,42	5,41	5,23
	5,50	5,43	5,35	5,19
GES (%)	67,51	64,64	63,81	57,27
	64,49	63,59	63,82	57,59
Gordura (%)	40,20	38,00	37,30	30,24
	38,40	38,00	36,70	30,35
Proteína %	21,40	21,00	20,30	20,10
	20,30	20,70	20,40	20,20
Cinzas (%)	2,12	1,53	1,59	1,90
	2,10	1,56	1,59	1,88
Umidade e voláteis (%)	40,45	42,30	42,31	47,20
	40,46	42,29	42,13	47,30

GES = gordura no extrato seco.

### 8.2.2.2 Análise de textura (TPA)

Tabela 10A – Valores brutos da análise de textura (TPA) dos queijos Creme elaborados com a mistura de leite de búfala com leite de vaca

	<b>100%</b>	<b>80%</b>	<b>70%</b>	<b>60%</b>
Dureza	37,00	24,00	27,00	23,00
	32,00	25,04	31,00	27,00
	34,00	35,00	25,00	27,00
	24,00	28,02	21,00	22,00
	36,00	33,00	23,00	21,00
<b>Média</b>	<b>33,00</b>	<b>29,03</b>	<b>25,46</b>	<b>24,02</b>
<b>Desvio-padrão</b>	<b>5,20</b>	<b>5,03</b>	<b>4,17</b>	<b>3,00</b>
Fraturabilidade	31,00	22,00	35,00	23,00
	35,00	24,00	27,00	31,00
	17,00	26,00	32,00	26,00
	27,00	28,00	34,00	24,00
	21,00	32,00	23,00	23,00
<b>Média</b>	<b>26,20</b>	<b>26,40</b>	<b>30,20</b>	<b>25,40</b>
<b>Desvio-padrão</b>	<b>7,30</b>	<b>3,85</b>	<b>5,12</b>	<b>3,37</b>
Adesividade	-43,29	-63,52	-79,81	-72,99
	-53,61	-57,47	-71,21	-38,84
	-48,34	-81,53	-56,10	-39,74
	-36,29	-28,65	-35,19	-44,33
	-32,35	-43,07	-88,26	-37,43
<b>Média</b>	<b>-42,78</b>	<b>-54,85</b>	<b>-66,11</b>	<b>-46,67</b>
<b>Desvio-padrão</b>	<b>8,65</b>	<b>20,12</b>	<b>20,98</b>	<b>14,94</b>
Elasticidade	4,77	5,37	5,87	6,64
	4,92	4,86	5,56	6,91
	4,33	5,47	5,95	6,72
	4,85	5,17	5,81	6,19
	4,56	5,39	5,88	6,14
<b>Média</b>	<b>4,69</b>	<b>5,25</b>	<b>5,85</b>	<b>6,52</b>
<b>Desvio-padrão</b>	<b>0,24</b>	<b>0,24</b>	<b>0,13</b>	<b>0,33</b>
Coesividade	0,48	0,41	0,41	0,61
	0,40	0,30	0,41	0,57
	0,45	0,36	0,42	0,55
	0,43	0,42	0,42	0,49
	0,44	0,41	0,42	0,47
<b>Média</b>	<b>0,44</b>	<b>0,38</b>	<b>0,42</b>	<b>0,54</b>
<b>Desvio-padrão</b>	<b>0,03</b>	<b>0,05</b>	<b>0,01</b>	<b>0,06</b>
Gomosidade	14,00	13,00	10,00	15,00
	6,00	12,00	8,00	13,00
	16,00	11,00	15,00	10,00
	14,00	9,00	13,00	14,00
	13,00	10,00	8,00	13,00
<b>Média</b>	<b>14,52</b>	<b>11,00</b>	<b>10,70</b>	<b>13,00</b>
<b>Desvio-padrão</b>	<b>2,08</b>	<b>2,98</b>	<b>3,00</b>	<b>2,12</b>
Mastigabilidade	70,00	50,00	70,00	90,00
	90,00	40,00	50,00	11,00
	60,00	47,00	70,00	90,00
	50,00	71,00	80,00	70,00
	70,00	80,00	40,00	60,00
<b>Média</b>	<b>68,24</b>	<b>57,75</b>	<b>62,59</b>	<b>84,76</b>
<b>Desvio-padrão</b>	<b>10,10</b>	<b>18,20</b>	<b>19,00</b>	<b>22,6</b>

### 8.2.2.3 Análise de cor

Tabela 11A – Valores brutos das análises de cor dos queijos Creme elaborados com a mistura de leite de búfala com leite de vaca

	<b>100%</b>	<b>80%</b>	<b>70%</b>	<b>60%</b>
Luminosidade (L)	81,55	85,66	84,54	80,21
	83,63	85,08	83,05	79,80
	84,07	82,48	76,58	80,97
	82,73	83,63	84,78	79,72
	84,28	84,98	85,94	80,05
	84,96	85,42	85,76	81,46
	84,69	85,92	86,73	81,42
	84,36	86,49	83,90	82,22
	88,17	85,21	83,86	83,08
	88,20	86,54	84,01	84,45
	88,38	86,74	82,04	84,49
	89,50	86,93	85,93	83,36
	90,82	84,42	85,46	83,75
	91,79	85,22	78,70	84,76
	88,97	85,59	87,56	83,24
<b>Média</b>	<b>86,76</b>	<b>85,37</b>	<b>83,92</b>	<b>82,20</b>
<b>Desvio-padrão</b>	<b>3,11</b>	<b>1,12</b>	<b>3,06</b>	<b>1,87</b>
Tonalidade a*	-4,62	-4,13	-2,16	-1,27
	-4,25	-3,08	-2,14	-0,88
	-4,24	-4,77	-2,24	-1,87
	-4,51	-3,41	-2,30	-1,48
	-4,38	-3,35	-2,23	-1,59
	-4,32	-3,11	-2,05	-1,50
	-4,30	-3,17	-2,10	-1,38
	-4,26	-3,13	-2,15	-1,32
	-4,02	-3,12	-2,20	-1,28
	-4,03	-3,10	-2,09	-1,38
	-4,05	-3,10	-2,10	-1,72
	-3,99	-3,11	-2,00	-1,63
	-3,95	-3,15	-1,99	-1,62
	-3,94	-3,14	-1,97	-2,06
	-4,03	-3,10	-2,10	-1,48
<b>Média</b>	<b>-4,18</b>	<b>-3,30</b>	<b>-2,12</b>	<b>-1,50</b>
<b>Desvio-padrão</b>	<b>0,20</b>	<b>0,44</b>	<b>0,10</b>	<b>0,29</b>
Tonalidade b*	13,61	16,97	22,69	24,45
	12,66	17,34	24,66	26,12
	12,75	14,76	19,70	24,54
	13,54	19,44	20,84	27,21
	12,98	19,54	20,83	25,75
	12,88	17,29	21,08	22,02
	12,73	18,09	21,01	22,86
	12,73	17,50	21,86	23,67
	12,99	17,45	22,37	23,13
	12,99	17,31	21,13	23,77
	13,13	17,26	24,76	24,30
	14,30	17,33	22,35	22,52
	15,12	16,66	24,31	22,59
	16,07	16,87	24,89	22,82
	14,22	16,94	23,68	23,20
<b>Média</b>	<b>13,67</b>	<b>17,33</b>	<b>22,42</b>	<b>23,95</b>
<b>Desvio-padrão</b>	<b>1,04</b>	<b>1,06</b>	<b>1,75</b>	<b>1,54</b>

### 8.2.2.4 Análise sensorial

Tabela 12A – Valores brutos da análise sensorial dos queijos Creme elaborados com a mistura de leite de búfala com leite de vaca

	100%	80%	70%	60%
Aparência Geral	8	9	7	8
	9	8	8	8
	7	7	8	8
	8	8	8	9
5	8	8	8	6
	7	5	6	8
	4	5	5	6
	7	7	7	8
10	4	4	6	7
	8	7	7	7
	8	9	8	8
	8	9	9	9
15	8	8	8	7
	7	8	5	8
	5	8	8	6
	8	9	9	8
20	4	7	9	8
	6	6	7	7
	8	9	6	7
	9	9	9	9
25	7	9	8	7
	9	5	7	6
	8	9	8	8
	8	8	8	9
30	5	6	9	5
	9	8	8	9
	6	7	6	8
	4	7	8	9
35	6	5	9	8
	6	8	8	7
	5	7	7	8
	8	9	8	9
40	7	7	8	9
	8	8	8	7
	8	8	8	8
	8	8	7	7
45	5	9	6	8
	9	8	6	4
	6	5	7	5
	9	8	8	8
50	8	8	7	7
	6	8	8	4
	5	5	9	8
	9	8	8	8
Média	7	9	7	6
	9	8	8	9
	6	7	8	8
	7	7	8	9
Desvio-padrão	7	7	8	6
	6	5	7	8
	5	5	5	5
	7	7	7	8
Cor	4	4	6	7
	8	9	8	7
	9	8	8	9
	6	7	8	8

Continua...

Tabela 12A, cont.

	100%	80%	70%	60%
	7	7	6	6
	8	8	7	8
10	8	9	9	9
	8	7	8	8
	8	8	5	8
	5	6	7	5
	9	9	9	8
15	4	8	9	8
	6	6	7	7
	8	9	7	7
	9	9	9	9
	8	9	7	7
20	9	8	7	7
	7	8	8	8
	9	9	9	9
	5	5	8	5
	9	6	7	9
25	6	6	7	9
	5	6	8	8
	5	6	7	8
	6	8	6	6
	4	5	7	7
30	8	9	9	8
	4	7	8	9
	9	9	8	9
	6	5	7	8
	5	7	7	8
35	8	8	8	8
	8	8	7	7
	8	8	8	8
	7	8	7	8
	6	6	8	3
40	8	7	5	7
	9	8	9	8
	8	8	7	7
	5	9	9	6
	2	5	8	5
45	8	8	7	7
	7	8	9	7
	9	9	8	8
50	8	8	9	9
<b>Média</b>	<b>6,90</b>	<b>7,32</b>	<b>7,54</b>	<b>7,46</b>
<b>Desvio-padrão</b>	<b>1,73</b>	<b>1,39</b>	<b>1,07</b>	<b>1,31</b>
	7	9	7	8
Odor	8	9	7	9
	5	5	9	6
	8	8	7	9
	6	6	9	5
	6	5	8	5
5	7	5	5	5
	8	7	7	8
	5	5	6	5
	8	5	5	7
	8	8	7	7
10	9	8	9	4
	8	6	6	7
	7	5	7	5
	6	6	6	5
	8	8	9	9
15	9	7	9	9
	8	8	7	7
	7	8	6	8

Continua...

Tabela 12A, cont.

	100%	80%	70%	60%
	9	5	9	5
	7	9	8	7
20	9	8	8	8
	8	9	9	8
	8	9	8	8
	9	3	5	3
	8	5	8	7
25	5	5	4	6
	5	5	5	6
	9	5	9	9
	6	6	6	7
	5	6	7	7
30	9	9	8	8
	7	3	5	8
	8	8	8	9
	8	4	4	7
	5	6	7	5
35	6	6	5	6
	7	5	5	6
	8	8	6	8
	6	7	7	6
	4	5	6	7
40	7	4	6	6
	6	5	6	7
	8	8	7	7
	6	2	9	4
	5	4	7	6
45	9	6	6	6
	9	9	8	8
	9	5	7	7
50	7	7	7	7
<b>Média</b>	<b>7,20</b>	<b>6,28</b>	<b>6,92</b>	<b>6,74</b>
<b>Desvio-padrão</b>	<b>1,41</b>	<b>1,83</b>	<b>1,43</b>	<b>1,47</b>
	6	8	9	9
	8	9	7	9
Sabor	8	7	8	7
	8	8	8	9
	8	7	8	9
	7	5	6	6
5	6	4	5	6
	8	8	8	6
	6	5	7	7
	8	9	8	9
	8	8	8	8
10	7	8	4	7
	9	8	8	9
	8	8	8	8
	4	4	6	4
	8	8	9	9
15	9	7	8	9
	7	7	8	7
	7	9	6	8
	9	9	9	9
	7	9	8	7
20	9	5	6	6
	8	7	9	9
	7	6	6	9
	7	5	7	6
	9	9	8	6
25	4	6	4	6
	7	8	8	8
	9	7	9	9

Continua...

Tabela 12A, cont.

	100%	80%	70%	60%
30	7	6	6	6
	4	8	7	8
	6	7	9	6
	7	4	5	7
	9	7	8	8
35	6	5	5	8
	8	3	6	8
	2	6	1	8
	7	6	4	3
	8	8	8	8
40	7	8	5	9
	8	9	7	9
	5	6	8	8
	5	7	5	8
	9	9	6	7
45	3	9	9	8
	5	8	9	3
	8	9	5	6
	6	9	9	7
	9	5	4	7
50	8	9	8	8
<b>Média</b>	<b>7,06</b>	<b>7,12</b>	<b>6,94</b>	<b>7,42</b>
<b>Desvio-padrão</b>	<b>1,67</b>	<b>1,65</b>	<b>1,79</b>	<b>1,51</b>
Textura	5	8	9	9
	9	9	8	9
	7	7	8	7
	8	6	8	9
	9	7	7	8
5	7	5	4	6
	5	4	4	5
	8	9	8	8
	5	6	6	7
	9	9	9	7
10	8	9	8	8
	8	7	7	8
	8	8	8	9
	9	9	9	9
	9	9	9	9
15	5	6	4	8
	9	8	9	9
	8	9	8	9
	7	7	8	7
	7	9	6	8
20	9	9	9	9
	7	9	8	8
	9	7	7	7
	8	9	9	9
	8	8	6	8
25	5	7	9	8
	9	9	9	2
	6	4	4	8
	9	7	7	8
	9	9	9	9
30	7	8	7	7
	5	7	7	8
	8	7	9	6
	6	4	7	8
	8	8	8	8
35	4	3	4	5
	8	4	3	7
	6	5	6	8
	9	3	5	7
	9	9	7	9

Continua...

Tabela 12A, cont.

	<b>100%</b>	<b>80%</b>	<b>70%</b>	<b>60%</b>
40	4	6	3	6
	8	8	8	8
	9	7	9	5
	6	7	6	7
	9	9	8	7
45	6	9	9	8
	8	8	9	7
	9	8	5	6
	9	9	9	9
	9	5	4	7
50	8	8	8	8
<b>Média</b>	<b>7,50</b>	<b>7,24</b>	<b>7,12</b>	<b>7,54</b>
<b>Desvio-padrão</b>	<b>1,54</b>	<b>1,78</b>	<b>1,85</b>	<b>1,37</b>
<b>Intenção de compra</b>	<b>8 (16%)</b>	<b>7 (14%)</b>	<b>12 (24%)</b>	<b>42 (34%)</b>
<b>Não compraria: 2 (4%)</b>				

## 8.2.3 Queijo Manteiga – Elaborados com leite de búfala e leite de vaca

### 8.2.3.1 Análise físico-química

Tabela 13A – Valores brutos das análises físico-químicas dos queijos Manteiga elaborados com a mistura de leite de búfala com leite de vaca

	<b>100%</b>	<b>80%</b>	<b>70%</b>	<b>60%</b>
Acidez (% ácido láctico)	0,18	0,14	0,17	0,18
	0,18	0,18	0,15	0,17
pH	5,51	5,59	5,97	5,59
	5,51	5,59	5,97	5,59
pH	5,51	5,60	5,97	5,59
	5,51	5,59	5,97	5,59
GES (%)	74,97	59,43	57,40	56,99
	75,11	59,64	57,18	57,59
Lipídios (%)	37,00	31,00	29,00	27,80
	37,00	31,00	29,00	27,40
Proteína(%)	26,50	24,90	24,90	24,80
	26,30	25,20	24,90	24,80
Cinzas(%)	2,48	2,37	2,20	2,16
	2,47	2,38	2,19	2,18

GES = gordura no extrato seco.

### 8.2.3.2 Análise de textura (TPA)

Tabela 14A – Valores brutos das análises de textura (TPA) dos queijos Manteiga elaborados com a mistura de leite de búfala com leite de vaca

	100%	80%	70%	60%
Dureza	0,029	0,025	0,024	0,028
	0,027	0,023	0,027	0,025
	0,034	0,025	0,027	0,022
	0,022	0,029	0,023	0,028
	0,029	0,034	0,033	0,027
	0,029	0,025	0,024	0,028
<b>Média</b>	<b>28,20</b>	<b>27,23</b>	<b>26,87</b>	<b>26,10</b>
<b>Desvio-padrão</b>	<b>4,32</b>	<b>4,98</b>	<b>3,27</b>	<b>2,53</b>
Fraturabilidade	28,00	29,00	25,00	30,00
	31,00	27,00	33,00	26,00
	32,00	28,00	23,00	29,00
	28,00	25,00	33,00	25,00
	35,00	35,00	29,00	29,00
	<b>Média</b>	<b>30,80</b>	<b>28,80</b>	<b>28,60</b>
<b>Desvio-padrão</b>	<b>2,94</b>	<b>3,86</b>	<b>4,56</b>	<b>3,97</b>
Adesividade	-2,266	-2,269	-3,634	-2,166
	-2,353	-0,909	-1,432	-1,603
	-2,816	-2,885	-2,832	-1,454
	-1,35	-0,568	-0,895	-1,67
	-2,502	-4,945	-1,139	-1,417
	<b>Média</b>	<b>-2,257</b>	<b>-2,329</b>	<b>-1,951</b>
<b>Desvio-padrão</b>	<b>0,549</b>	<b>1,567</b>	<b>1,066</b>	<b>0,300</b>
Elasticidade	0,69	0,54	0,50	0,50
	0,71	0,70	0,59	0,54
	0,76	0,57	0,56	0,55
	0,75	0,58	0,593	0,60
	0,70	0,540	0,56	0,49
	<b>Média</b>	<b>7,24</b>	<b>5,87</b>	<b>5,47</b>
<b>Desvio-padrão</b>	<b>0,40</b>	<b>0,66</b>	<b>0,49</b>	<b>0,98</b>
Coesividade	0,63	0,53	0,459	0,39
	0,61	0,51	0,472	0,50
	0,71	0,48	0,453	0,49
	0,71	0,54	0,523	0,497
	0,62	0,50	0,4	0,37
	<b>Média</b>	<b>0,66</b>	<b>0,51</b>	<b>0,452</b>
<b>Desvio-padrão</b>	<b>0,05</b>	<b>0,02</b>	<b>0,04</b>	<b>0,05</b>
Gomosidade	19,00	10,00	12,00	0,013
	17,00	13,00	9,00	0,014
	24,00	10,00	10,00	0,006
	1,009	14,00	12,00	0,01
	20,00	12,00	13,00	0,011
	<b>Média</b>	<b>19,93</b>	<b>11,73</b>	<b>11,30</b>
<b>Desvio-padrão</b>	<b>3,07</b>	<b>1,33</b>	<b>2,66</b>	<b>2,08</b>
Mastigabilidade	130,00	70,00	0,005	40,00
	120,00	86,00	0,006	80,00
	180,00	60,00	0,008	60,00
	130,00	80,00	0,007	40,00
	150,00	50,00	0,005	50,00
	<b>Média</b>	<b>143,97</b>	<b>69,28</b>	<b>62,50</b>
<b>Desvio-padrão</b>	<b>23,27</b>	<b>10,57</b>	<b>16,44</b>	<b>16,51</b>

### 8.2.3.3 Análise de cor

Tabela 15A – Valores brutos da análise de cor dos queijos Manteiga elaborados com a mistura de leite de búfala com leite de vaca

	<b>100%</b>	<b>80%</b>	<b>70%</b>	<b>60%</b>
	81,70	81,85	81,24	78,19
	82,41	82,14	82,96	78,29
	82,53	83,31	83,36	78,30
	84,01	81,99	80,87	82,02
	84,29	83,23	81,46	81,74
	83,75	83,27	81,24	81,41
	83,70	84,26	82,49	79,36
	83,28	84,02	83,66	79,12
	83,92	85,06	83,81	78,98
	85,30	84,09	81,08	80,88
	86,13	84,49	80,61	80,82
	86,44	84,69	80,50	80,72
	83,78	84,69	79,16	80,40
	84,46	87,01	79,56	80,43
	85,02	87,71	79,57	80,48
Luminosidade (L)	93,13	89,03	91,09	89,50
	95,28	85,56	92,00	90,08
	95,95	85,89	92,35	90,49
	91,63	85,91	87,96	90,45
	93,06	89,18	87,77	90,24
	93,39	90,62	87,81	89,98
	91,35	91,56	92,84	88,52
	91,66	88,31	94,07	88,37
	91,61	89,85	94,51	88,40
	92,13	90,19	91,66	88,74
	93,08	89,65	92,75	89,64
	93,44	90,68	92,97	89,83
	94,26	90,84	91,54	90,09
	94,68	90,90	92,88	90,00
	94,77	91,40	92,94	89,90
<b>Média</b>	<b>88,67</b>	<b>86,71</b>	<b>86,56</b>	<b>84,85</b>
<b>Desvio-padrão</b>	<b>4,90</b>	<b>3,20</b>	<b>5,52</b>	<b>4,96</b>

Continua...

Tabela 15A, cont.

	<b>100%</b>	<b>80%</b>	<b>70%</b>	<b>60%</b>
	-5,90	-4,96	-3,97	-3,97
	-5,87	-5,01	-3,95	-4,01
	-5,95	-4,56	-4,34	-4,07
	-5,84	-4,60	-4,28	-4,09
	-5,80	-4,55	-4,31	-4,12
	-5,81	-4,83	-4,35	-4,02
	-5,83	-4,87	-4,31	-4,11
	-5,87	-4,86	-4,31	-4,13
	-5,90	-4,91	-4,51	-4,03
	-5,86	-4,95	-4,50	-3,97
	-5,87	-4,96	-4,53	-3,99
	-5,83	-4,47	-4,42	-4,16
	-5,67	-4,53	-4,38	-4,13
	-5,63	-4,52	-4,42	-4,11
Tonalidade a*	-5,47	-3,93	-3,15	-3,04
	-5,41	-3,95	-3,03	-2,69
	-5,39	-3,92	-2,97	-2,57
	-5,40	-3,86	-3,45	-3,23
	-4,85	-3,84	-3,49	-3,04
	-4,77	-3,95	-3,52	-3,03
	-4,77	-4,09	-2,84	-3,09
	-5,01	-4,13	-2,69	-3,10
	-4,84	-4,10	-2,68	-3,11
	-4,90	-4,41	-3,04	-3,22
	-4,84	-4,34	-2,92	-3,00
	-4,82	-4,33	-2,89	-2,98
	-4,84	-3,89	-3,07	-2,92
	-4,85	-3,93	-2,98	-2,95
	-4,57	-3,96	-2,94	-2,90
<b>Média</b>	<b>-5,41</b>	<b>-4,41</b>	<b>-3,67</b>	<b>-3,53</b>
<b>Desvio-padrão</b>	<b>0,48</b>		<b>0,68</b>	<b>0,56</b>

Continua...

Tabela 15A, cont.

	<b>100%</b>	<b>80%</b>	<b>70%</b>	<b>60%</b>
	17,76	16,03	17,93	21,08
	17,62	16,04	17,88	21,05
	17,57	16,14	17,85	21,03
	16,74	18,43	18,32	21,61
	16,57	18,37	17,38	21,53
	16,44	18,22	17,58	21,33
	17,46	16,61	17,71	20,96
	17,33	16,66	18,24	20,73
	17,26	16,71	18,32	20,79
	18,13	18,82	17,98	20,67
	18,17	18,44	19,28	20,78
	18,13	18,40	19,30	20,84
	17,64	18,11	19,21	21,84
	17,58	18,07	19,45	21,74
Tonalidade b*	17,61	17,96	19,74	21,82
	16,29	18,18	20,55	19,81
	16,69	19,30	18,57	22,61
	17,02	19,70	18,74	23,68
	16,56	14,72	18,75	20,21
	16,59	14,68	18,80	21,95
	16,66	14,70	19,95	22,40
	17,27	20,09	20,82	19,24
	17,17	22,56	17,25	19,52
	17,19	23,68	18,24	19,50
	19,14	19,36	18,52	20,20
	19,49	20,64	18,94	22,36
	19,62	20,86	20,00	23,44
	17,32	17,87	22,20	22,52
	17,46	19,56	20,35	23,06
	17,52	19,74	19,66	23,18
<b>Média</b>	<b>17,47</b>	<b>18,29</b>	<b>18,85</b>	<b>21,38</b>
<b>Desvio-padrão</b>	<b>1,04</b>	<b>1,06</b>	<b>1,75</b>	<b>1,54</b>

#### 8.2.3.4 Análise sensorial

Tabela 16A – Valores brutos da análise sensorial dos queijos Manteiga elaborados com a mistura de leite de búfala com leite de vaca

	100%	80%	70%	60%
Aparência geral	7,00	8,00	8,00	8,00
	9,00	8,00	8,00	9,00
	5,00	8,00	8,00	8,00
	8,00	8,00	8,00	8,00
5	9,00	9,00	9,00	9,00
	8,00	8,00	8,00	7,00
	8,00	8,00	7,00	7,00
	9,00	8,00	7,00	9,00
10	9,00	9,00	8,00	9,00
	9,00	9,00	8,00	8,00
	6,00	4,00	4,00	5,00
	9,00	9,00	9,00	9,00
15	8,00	7,00	8,00	8,00
	8,00	5,00	6,00	6,00
	9,00	8,00	7,00	7,00
	9,00	8,00	8,00	8,00
20	8,00	8,00	8,00	8,00
	9,00	7,00	7,00	7,00
	6,00	7,00	8,00	8,00
	7,00	7,00	8,00	8,00
25	7,00	8,00	8,00	8,00
	4,00	6,00	7,00	6,00
	9,00	8,00	7,00	5,00
	8,00	8,00	8,00	8,00
30	8,00	9,00	8,00	9,00
	7,00	7,00	7,00	7,00
	8,00	9,00	8,00	9,00
	9,00	9,00	9,00	9,00
35	5,00	8,00	7,00	8,00
	7,00	4,00	5,00	7,00
	7,00	5,00	4,00	8,00
	6,00	9,00	9,00	9,00
40	9,00	8,00	7,00	9,00
	8,00	7,00	8,00	9,00
	9,00	8,00	8,00	9,00
	7,00	6,00	6,00	8,00
45	7,00	8,00	6,00	8,00
	8,00	5,00	6,00	6,00
	7,00	6,00	7,00	6,00
	8,00	7,00	8,00	9,00
<b>Média</b>	<b>7,72</b>	<b>7,54</b>	<b>7,36</b>	<b>7,80</b>
<b>Desvio-padrão</b>	<b>1,26</b>	<b>1,40</b>	<b>1,26</b>	<b>1,23</b>

Continua...

Tabela 16A,cont.

	<b>100%</b>	<b>80%</b>	<b>70%</b>	<b>60%</b>
Cor	7,00	7,00	9,00	7,00
	9,00	8,00	8,00	9,00
	3,00	8,00	7,00	8,00
	8,00	9,00	8,00	7,00
5	9,00	9,00	9,00	9,00
	8,00	8,00	8,00	8,00
	8,00	7,00	7,00	8,00
	8,00	8,00	9,00	9,00
	9,00	9,00	9,00	9,00
10	8,00	9,00	9,00	9,00
	7,00	7,00	7,00	9,00
	5,00	5,00	6,00	5,00
	9,00	8,00	8,00	9,00
	8,00	8,00	8,00	8,00
15	8,00	8,00	6,00	7,00
	8,00	8,00	7,00	8,00
	8,00	8,00	7,00	8,00
	9,00	9,00	8,00	8,00
	8,00	8,00	8,00	8,00
20	9,00	7,00	8,00	8,00
	4,00	7,00	8,00	7,00
	8,00	8,00	8,00	8,00
	7,00	8,00	8,00	8,00
	5,00	6,00	8,00	7,00
25	5,00	5,00	5,00	4,00
	8,00	8,00	8,00	8,00
	8,00	9,00	8,00	9,00
	7,00	7,00	7,00	7,00
	9,00	8,00	9,00	8,00
30	7,00	8,00	7,00	5,00
	7,00	8,00	8,00	7,00
	8,00	8,00	8,00	8,00
	8,00	8,00	8,00	8,00
	5,00	8,00	8,00	8,00
35	6,00	4,00	7,00	6,00
	8,00	8,00	7,00	8,00
	6,00	9,00	8,00	8,00
	8,00	8,00	8,00	8,00
	8,00	8,00	8,00	9,00
40	8,00	8,00	7,00	9,00
	7,00	7,00	6,00	8,00
	6,00	4,00	5,00	3,00
	5,00	9,00	7,00	6,00
	9,00	8,00	9,00	8,00
45	6,00	9,00	8,00	9,00
	9,00	9,00	9,00	9,00
	7,00	6,00	7,00	7,00
	7,00	8,00	8,00	8,00
	8,00	8,00	6,00	7,00
	5,00	5,00	6,00	5,00
<b>Média</b>	<b>7,30</b>	<b>7,64</b>	<b>7,60</b>	<b>7,62</b>
<b>Desvio-padrão</b>	<b>1,46</b>	<b>1,26</b>	<b>1,01</b>	<b>1,35</b>

Continua...

Tabela 16A,cont.

	<b>100%</b>	<b>80%</b>	<b>70%</b>	<b>60%</b>
Odor	8,00	8,00	7,00	8,00
	9,00	8,00	9,00	9,00
	8,00	5,00	6,00	7,00
	8,00	8,00	7,00	8,00
5	7,00	6,00	7,00	6,00
	8,00	6,00	7,00	6,00
	8,00	8,00	7,00	8,00
	9,00	8,00	8,00	8,00
	9,00	8,00	8,00	9,00
10	6,00	7,00	8,00	8,00
	6,00	6,00	8,00	8,00
	6,00	5,00	5,00	6,00
	8,00	7,00	7,00	7,00
	9,00	8,00	8,00	7,00
15	8,00	6,00	4,00	5,00
	8,00	8,00	8,00	8,00
	8,00	8,00	7,00	7,00
	6,00	9,00	8,00	8,00
	8,00	8,00	8,00	8,00
20	8,00	9,00	8,00	7,00
	7,00	8,00	8,00	8,00
	9,00	9,00	9,00	8,00
	8,00	8,00	8,00	8,00
	4,00	6,00	8,00	7,00
25	7,00	3,00	4,00	6,00
	9,00	8,00	8,00	8,00
	9,00	8,00	8,00	9,00
	6,00	7,00	7,00	7,00
	9,00	9,00	9,00	9,00
30	7,00	6,00	9,00	5,00
	7,00	8,00	7,00	6,00
	8,00	8,00	8,00	8,00
	8,00	8,00	8,00	9,00
	6,00	7,00	9,00	7,00
35	6,00	4,00	7,00	7,00
	7,00	8,00	7,00	7,00
	6,00	9,00	9,00	7,00
	8,00	7,00	8,00	8,00
	9,00	9,00	9,00	9,00
40	7,00	6,00	6,00	9,00
	5,00	3,00	5,00	5,00
	7,00	8,00	7,00	6,00
	7,00	8,00	8,00	7,00
	8,00	8,00	9,00	8,00
45	7,00	7,00	7,00	8,00
	7,00	7,00	9,00	9,00
	6,00	5,00	6,00	6,00
	8,00	8,00	8,00	8,00
	8,00	6,00	4,00	5,00
	6,00	5,00	5,00	6,00
<b>Média</b>	<b>7,42</b>	<b>7,14</b>	<b>7,38</b>	<b>7,36</b>
<b>Desvio-padrão</b>	<b>1,18</b>	<b>1,50</b>	<b>1,35</b>	<b>1,17</b>

Continua...

Tabela 16A,cont.

	<b>100%</b>	<b>80%</b>	<b>70%</b>	<b>60%</b>
Sabor	8,00	8,00	8,00	9,00
	9,00	9,00	9,00	8,00
	8,00	4,00	3,00	6,00
	9,00	6,00	7,00	8,00
5	9,00	7,00	9,00	7,00
	9,00	7,00	6,00	5,00
	8,00	8,00	7,00	7,00
	9,00	7,00	7,00	8,00
	7,00	7,00	7,00	6,00
10	7,00	3,00	6,00	6,00
	7,00	3,00	9,00	8,00
	7,00	4,00	3,00	4,00
	9,00	7,00	6,00	7,00
	7,00	7,00	6,00	6,00
15	8,00	5,00	8,00	6,00
	8,00	7,00	7,00	8,00
	9,00	8,00	7,00	7,00
	6,00	9,00	7,00	8,00
	8,00	9,00	9,00	8,00
20	4,00	8,00	7,00	4,00
	7,00	7,00	8,00	8,00
	8,00	9,00	9,00	8,00
	8,00	8,00	9,00	7,00
	5,00	8,00	8,00	7,00
25	4,00	6,00	7,00	3,00
	9,00	8,00	7,00	8,00
	9,00	8,00	8,00	9,00
	7,00	6,00	7,00	6,00
	7,00	9,00	9,00	9,00
30	6,00	5,00	7,00	8,00
	3,00	4,00	7,00	5,00
	7,00	7,00	8,00	7,00
	9,00	8,00	8,00	9,00
	2,00	5,00	6,00	6,00
35	5,00	4,00	8,00	5,00
	6,00	5,00	4,00	8,00
	7,00	3,00	6,00	7,00
	9,00	8,00	7,00	9,00
	9,00	6,00	9,00	9,00
40	8,00	7,00	7,00	7,00
	6,00	6,00	8,00	7,00
	7,00	6,00	3,00	8,00
	9,00	7,00	5,00	9,00
	8,00	9,00	8,00	9,00
45	8,00	6,00	7,00	8,00
	8,00	7,00	7,00	9,00
	7,00	7,00	7,00	7,00
	8,00	8,00	9,00	7,00
	8,00	5,00	8,00	6,00
	7,00	4,00	3,00	4,00
<b>Média</b>	<b>7,34</b>	<b>6,58</b>	<b>7,04</b>	<b>7,10</b>
<b>Desvio-padrão</b>	<b>1,64</b>	<b>1,73</b>	<b>1,63</b>	<b>1,52</b>

Continua...

Tabela 16A,cont.

	<b>100%</b>	<b>80%</b>	<b>70%</b>	<b>60%</b>
Textura	6,00	6,00	7,00	8,00
	8,00	8,00	9,00	9,00
	9,00	6,00	4,00	4,00
	7,00	9,00	6,00	7,00
5	8,00	8,00	8,00	8,00
	4,00	5,00	3,00	4,00
	8,00	7,00	7,00	8,00
	8,00	8,00	7,00	8,00
	8,00	8,00	8,00	8,00
10	8,00	6,00	6,00	7,00
	9,00	9,00	9,00	9,00
	7,00	4,00	4,00	4,00
	8,00	4,00	7,00	4,00
	8,00	7,00	7,00	6,00
15	8,00	5,00	8,00	8,00
	8,00	7,00	7,00	9,00
	9,00	7,00	7,00	8,00
	6,00	9,00	7,00	8,00
	7,00	7,00	7,00	6,00
20	7,00	7,00	7,00	8,00
	7,00	6,00	7,00	7,00
	8,00	8,00	8,00	9,00
	9,00	8,00	8,00	8,00
	5,00	7,00	7,00	8,00
25	3,00	1,00	6,00	2,00
	9,00	8,00	7,00	7,00
	9,00	9,00	8,00	9,00
	6,00	6,00	6,00	6,00
	8,00	9,00	9,00	9,00
30	8,00	4,00	9,00	9,00
	5,00	6,00	6,00	8,00
	7,00	8,00	8,00	7,00
	9,00	8,00	8,00	9,00
	2,00	5,00	5,00	6,00
35	5,00	6,00	6,00	8,00
	7,00	5,00	5,00	8,00
	6,00	5,00	6,00	7,00
	8,00	8,00	8,00	9,00
	9,00	6,00	7,00	9,00
40	7,00	5,00	6,00	7,00
	2,00	4,00	7,00	4,00
	6,00	6,00	6,00	6,00
	9,00	9,00	4,00	9,00
	9,00	8,00	8,00	9,00
45	8,00	6,00	7,00	8,00
	9,00	7,00	7,00	9,00
	7,00	6,00	7,00	7,00
	9,00	8,00	8,00	8,00
	8,00	5,00	8,00	8,00
	7,00	6,00	4,00	4,00
<b>Média</b>	<b>7,24</b>	<b>6,60</b>	<b>6,82</b>	<b>7,30</b>
<b>Desvio-padrão</b>	<b>1,77</b>	<b>1,69</b>	<b>1,40</b>	<b>1,74</b>
<b>Intenção de compra</b>	<b>16,00 (32%)</b>	<b>3,00 (6%)</b>	<b>12,00 (24%)</b>	<b>17,00 (34%)</b>
	<b>Não compraria: 2 (4%)</b>			