

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE EDUCAÇÃO SUPERIOR DO OESTE – CEO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA – PPGZOO

ALINE LUIZA DO NASCIMENTO

CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DE QUEIJO
COLONIAL ARTESANAL DE LEITE CRU OBTIDO DE VACAS JERSEYS
SUPLEMENTADAS COM ÓLEOS ESSENCIAIS

CHAPECÓ

2024

ALINE LUIZA DO NASCIMENTO

**CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DE QUEIJO
COLONIAL ARTESANAL DE LEITE CRU OBTIDO DE VACAS JERSEYS
SUPLEMENTADAS COM ÓLEOS ESSENCIAIS**

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do título de mestre em Zootecnia
pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
da Universidade do Estado de Santa Catarina –
UDESC.

Orientadora: Prof. Dr. Ana Luiza Bachmann
Schogor

Co-orientadora: Prof. Dr. Andréia Maria Faion

CHAPECÓ

2024

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Universitária Udesc,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Nascimento, Aline Luiza do
CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E
MICROBIOLÓGICAS DE QUEIJO COLONIAL ARTESANAL
DE LEITE CRU OBTIDO DE VACAS JERSEYS
SUPLEMENTADAS COM ÓLEOS ESSENCIAIS / Aline Luiza do
Nascimento. -- 2024.
80 p.

Orientadora: Ana Luiza Bachmann Schogor
Coorientadora: Andréia Maria Faion
Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa
Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste, Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia, Chapecó, 2024.

1. Eucaliptol. 2. Nariz Eletrônico. 3. Maturação. 4. Mentol. I.
Schogor, Ana Luiza Bachmann . II. Faion, Andréia Maria . III.
Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Educação
Superior do Oeste, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. IV.
Titulo.

ALINE LUIZA DO NASCIMENTO

**CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DE QUEIJO
COLONIAL ARTESANAL DE LEITE CRU OBTIDO DE VACAS JERSEYS
SUPLEMENTADAS COM ÓLEOS ESSENCIAIS**

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do título de mestre em Zootecnia
pelo Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia, da Universidade do Estado de Santa
Catarina – UDESC.

Orientadora: Prof. Dr. Ana Luiza Bachmann
Schogor

Co-orientadora: Prof. Dra. Andréia Maria
Faion

BANCA EXAMINADORA

Membros:

Ana Luiza Bachamann Schogor, Doutora
Universidade do Estado de Santa Catarina

Elisandra Rigo, Doutora
Universidade de Santa Catarina

Paula Montagner, Doutora
Universidade Federal de Santa Maria

Chapecó, 09 de agosto de 2024.

A minha família e amigos. Especialmente a meus avós, Maria e Euclides “*in memoriam*” .

“Aprendi que a coragem não é a ausência de medo, mas o triunfo sobre ele.” (Nelson Mandela)

RESUMO

O consumo de queijos no Brasil, principalmente do sul do país, é de do tipo colonial. Essa variedade é geralmente originária de propriedades familiares, produzidos a partir de leite cru e com pouco tempo de maturação. Lei nº 18.250, de 10 de novembro de 2021 do Estado de Santa Catarina, permite a comercialização do queijo de origem de leite cru desde que a maturação seja período no mínimo de cinco dias, em temperatura mínima de 5 ° C, desde que comprovada a inocuidade e qualidade do produto. O período de maturação é ideal para a inibição de microrganismos patógenos, queijos maturados em períodos abaixo de 60 dias devem ser submetidos a uma rígida fiscalização. Entretanto, o mercado informal de queijos coloniais e uma fiscalização mais branda possibilita a comercialização de produtos que não garantem a segurança alimentar. O uso de óleos essenciais pode auxiliar nessas questões, uma vez que ação antimicrobiana e antioxidantes foram observadas a partir do uso de óleos essenciais, tanto no animal que o consome, quanto na indústria alimentícia. A partir desse cenário o objetivo deste estudo foi avaliar a suplementação de diferentes doses de um *blend* de óleo essencial de eucaliptol e mentol, e investigar sua ação sob as características físico-químicas e microbiológicas do Queijo Colonial, fabricado com leite cru, com até 21 dias de maturação. O estudo foi conduzido em uma propriedade comercial localizada no Oeste Catarinense, com rebanho da raça Jersey em sistema de confinamento de *Compost Barn*. Três grupos de três animais, foram divididos em grupos suplementados com o *blend* de óleos essenciais com doses distintas, denominados como Dose 1 (EO3.6/vaca/dia) e Dose 2 (EO7.2/vaca/ dia) enquanto o outro recebeu a dieta padrão (Grupo Controle) sem adição do *blend*. Os queijos foram elaborados com leite cru e maturados em câmara de maturação pelo período de 21 dias com temperatura mínima de 5 C°. As avaliações microbiológicas e físico-químicas foram realizadas nos dias 0, 3, 7, 14 e 21. Não foram observadas alterações na composição total de QCA durante o período de maturação de 21 dias, mas diferenças estatísticas foram notadas no perfil de ácidos graxos ($p < 0,05$). Os grupos suplementados apresentaram interação tratamento $\times$ dia com maior proporção de ácidos graxos poli-insaturados durante todo o período experimental. Os grupos suplementados também apresentaram menores contagens de *E. coli* e Bolores e leveduras em comparação ao grupo controle. No entanto, os níveis obtidos para essas variáveis excederam os permitidos pela legislação estadual, o que demonstra o risco de comercializar queijos produzidos com leite cru com poucos dias de maturação. Não foram observadas diferenças entre os grupos para características sensoriais analisadas pelo *E-nose*, sugerindo que os óleos essenciais podem ser usados para melhorar a saúde animal sem afetar o produto final.

Palavras-chave: eucaliptol; nariz eletrônico; maturação; mentol.

ABSTRACT

Cheese consumption in Brazil, especially in the southern region, is predominantly of the colonial type. This variety typically originates from family-owned farms, is produced from raw milk, and has a short maturation period. Law No. 18,250, of November 10, 2021, from the State of Santa Catarina, permits the commercialization of cheese made from raw milk, provided that the maturation period is at least five days at a minimum temperature of 5°C, as long as the product's safety and quality are proven. The maturation period is ideal for inhibiting pathogenic microorganisms; cheeses matured for less than 60 days must undergo rigorous inspection. However, the informal market for colonial cheeses and more lenient inspection practices allow for the sale of products that do not ensure food safety. The use of essential oils can help address these issues, as antimicrobial and antioxidant effects have been observed from the use of essential oils, both in the animals that consume them and in the food industry. Given this scenario, the objective of this study was to evaluate the supplementation of different doses of a blend of essential oils of eucalyptol and menthol and to investigate their effects on the physicochemical and microbiological characteristics of Colonial Cheese, made with raw milk, with up to 21 days of maturation. The study was conducted on a commercial farm located in Western Santa Catarina, with a herd of Jersey cows in a compost barn confinement system. Three groups of three animals were divided into groups supplemented with the essential oil blend at different doses, labeled as Dose 1 (EO3.6/cow/day) and Dose 2 (EO7.2/cow/day), while another group received the standard diet (Control Group) without the addition of the blend. The cheeses were made with raw milk and matured in a maturation chamber for a period of 21 days at a minimum temperature of 5°C. Microbiological and physicochemical evaluations were conducted on days 0, 3, 7, 14, and 21. No changes were observed in the total ACC composition during the 21-day ripening period, but statistical differences were noted in the fatty acid profile ($p < 0.05$). The supplemented groups showed a treatment $\times$ day interaction with a higher proportion of polyunsaturated fatty acids throughout the experimental period. The supplemented groups also showed lower counts of *E. coli* and fungi and yeasts compared to the control group. However, the levels obtained for these variables exceeded those allowed by state legislation, which demonstrates the risk of commercializing cheeses produced with raw milk after only a few days of ripening. No differences were observed between the groups for sensory characteristics analyzed by E-nose, suggesting that essential oils can be used to improve animal health without affecting the final product.

Keywords: eucalyptol; electronic nose; ripening; menthol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Visão geral dos fatores da cadeia dos laticínios que influenciam as características do queijo.	24
Figura 2 - Visão geral dos fatores de produção da cadeia leiteira que influenciam a qualidade do queijo.	26
Figura 3 - Fluxo de nutrientes da alimentação através da vaca leiteira e seus efeitos no leite e no queijo.	29
Figura 4 - Estruturas químicas do mentol (direita) e do eucaliptol (direita)	32
Figure 5 - Installation and Animals	37
Figure 6 - Manufacturing Processes of Raw Milk Colonial Cheese	41
Figure 7 - Chromatogram obtained by injecting the sample into an MXT-5 column in the E-nose, with the highlighted peak corresponding to eucalyptus essential oil.	54
Figure 8 - Overlay chromatograms of the reference sample, and the milk and Colonial Cheese samples for the EO3.6 treatment.....	54
Figure 9 - Overlay chromatograms of the reference sample, and the milk and Colonial Cheese samples for the EO7.2 treatment.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Classificação dos queijos de acordo com teores de gordura e umidade, de acordo com a Portaria Nº 146, de 1996 do MAPA.....	20
Tabela 2- Padrões microbiológicos para do queijo	23
Tabel 3- Chemical Composition of Corn Silage, Ryegrass Silage, Commercial Feed, and Experimental Diets	37
Table 4- Composition of Colonial Cheese made from raw milk obtained from Jersey cows fed with essential oils (eucalyptol and menthol) at different days of maturation	45
Table 5- Result of substances reactive to thiobarbituric acid (TBARS) in Colonial cheese made from raw milk obtained from Jersey cows fed with essential oils (eucalyptol and menthol) at different days of maturation.	46
Tabela 6- Colimetry parameters (internal and on cheese rind) in Colonial Cheese made from raw milk obtained from Jersey cows fed with essential oils (eucalyptol and menthol) at different days of maturation.	47
Tabela 7- Averages for varying hardness of colonial cheese.	47
Tabela 8- Mean values for microbiological parameters of cheeses according to ripening.	49
Tabela 9- Profile of fatty acids in colonial raw milk cheese with different days of maturation	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALESC	Assembleia Legislativa de Santa Catarina
AGV's	Ácidos Graxos Voláteis
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CCS	Contagem de Células Somáticas
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FAPESC	Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação de Santa Catarina
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IN	Instrução Normativa
MAPA	Ministério da Agricultura e Pecuária
OE	Óleos Essenciais
RIISPOA	Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
TBARS	Substances Reactive to Thiobarbituric Acid
UDESC	Universidade do Estado de Santa Catarina
UniSENAI	Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	QUEIJO: DEFINIÇÃO E PRODUÇÃO	18
2.2	QUEIJO ARTESANAL.....	18
2.3	LEGISLAÇÃO	20
2.4	ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA NO QUEIJO, SUA RELAÇÃO COM A PASTEURIZAÇÃO E USO DE ADITIVOS A BASE DE ÓLEOS ESSENCIAIS	23
2.5	RELAÇÃO ENTRE OS ASPECTOS DE PRODUÇÃO, E QUALIDADE DO LEITE E DO QUEIJO	27
2.5.1	Nutrição animal, qualidade do leite e do queijo.....	28
2.5.2	Uso de óleos essenciais na nutrição animal e sua relação com produtos lácteos.....	31
2.5.3	Particularidades dos óleos essenciais mentol e eucaliptol	32
3	ARTIGO 1: INFLUENCE OF ESSENTIAL OILS ON THE PHYSICOCHEMICAL AND MICROBIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF RAW MILK CHEESE.....	35
3.1	INTRODUCTION	36
3.2	MATERIALS AND METHODS	38
3.2.1	Cow diets, sample collection and chemical analysis of feed and milk	38
3.2.2	Treatments.....	39
3.2.3	Milk collection and analysis for Artisanal Colonial Cheese production	39
3.2.4	Characteristics of the raw material used to produce cheese.....	40
3.2.5	Cheese Production	42
3.2.6	Physicochemical and Microbiological Analyses of Cheese	43
3.2.7	Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS), in Colonial cheese	43
3.2.8	Determination of fatty acids in cheese	44
3.2.9	Colonial Cheese sensory analysis: electronic nose (E-Nose)	45
3.2.10	Statistical Analysis	45
3.3	RESULTS	46
3.3.1	Composition and Physicochemical Analyses of Cheese	46
3.3.2	Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS), in Colonial cheese	47

3.3.3	Colonial Cheese Colorimetry and texture profile analysis (TPA).....	47
3.3.4	Cheese Microbiology	49
3.3.5	Fatty Acids in Cheese	50
3.3.6	Sensory Analysis by E-nose.....	54
3.4	DISCUSSION.....	56
3.5	FINAL CONSIDERATIONS.....	62
	REFERÊNCIAS.....	63
	ANEXO A – PERFIL DOS ÁCIDOS GRAXOS DO QUEIJO COLONIAL	
	ARTESANAL.....	72
	ANEXO B – COMPROVANTE DO CEUA (CERTIFICADO.....	79
	ANEXO C – COMPROVANTE DO CEUA (CERTIFICADO/EMENDA) .	80

1 INTRODUÇÃO

O queijo apresenta grande valor nutricional, possui em sua composição proteínas, lipídeos, carboidratos, sais minerais, cálcio, fósforo e vitaminas, em especial a vitamina A e as do complexo B (Perry, 2004). Diversos tipos de queijo são consumidos diariamente pela população, a produção do queijo artesanal também está em expansão, e segundo a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) atualmente existem 36 variedades em todo território nacional (Embrapa, 2023).

Os queijos artesanais possuem características específicas em cada região do país, devido as características de confecção de cada produtor (Monteiro et al., 2018). Na região Sul, o mais comum é o queijo colonial, e sua fabricação emprega leite cru, conferindo ao queijo características únicas que são percebidas pelo consumidor. Steinbach et al., (2021) caracterizaram o queijo colonial na região de Francisco Beltrão no estado do Paraná, e a partir da análise sensorial os consumidores relatam que a tradição, e os aspectos sensoriais como sabor, aroma e textura e o sentimento de nostalgia são as principais motivações para o consumo do produto. Por outro lado, a segurança alimentar é o principal motivo relatado para não consumir o queijo. Dessa forma, é necessário suprir a demanda dos consumidores, com queijos que possuam as características coloniais e que assegurem seu consumo. Neste sentido, é importante destacar que existem legislações nacionais e estaduais (no caso de Santa Catarina), com diretrizes sobre aspectos produtivos, qualidade físico-química e microbiológica dos queijos, para que sua segurança alimentar seja atingida. Além disso, constantes pesquisas são realizadas sobre o assunto, inclusive com fomentos por meio da Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado Santa Catarina (FAPESC), Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina (CIDASC) e SAR, à exemplo do Edital de Chamada Pública Fapesc nº 30/2022 – Programa Agroinovação SC II – Apoio à Pesquisa, Desenvolvimento Tecnológico e Inovação em Qualidade e Inocuidade de Produtos de Origem Animal da SAR/Cidasc.

Destacando a alimentação, esta pode alterar determinados compostos diretamente no leite. O perfil de ácidos graxos é o mais facilmente alterado devido à alimentação. Principalmente pelo tipo de volumoso (forragens frescas ou conservadas) ou oleaginosas (grãos ou farelo de soja, canola, caroço de algodão) utilizadas para nutrir os animais, os quais possuem distintos teores de ácidos graxos insaturados das famílias ômega-3 e ômega-6. Adicionalmente, a utilização de diversos aditivos na alimentação animal pode resultar na obtenção de um produto lácteo enriquecido desde a sua matéria-prima, sendo

um deles os óleos essenciais. Os mais comumente avaliados são os óleos a base de orégano, tomilho, alho, eucalipto, mentol, cravo-da-índia e canela. A partir desse cenário, na presente pesquisa avaliamos a adição de um *blend* de óleos essenciais, a base de mentol e eucaliptol fornecidos para vacas em lactação, a fim de avaliar seus feitos sob a produção de queijos coloniais originários do leite cru.

Neste trabalho, serão apresentadas informações detalhadas sobre a produção e legislação que regula a produção de queijos “comuns” e artesanais, com enfoque dado a aspectos microbiológicos do produto. Posteriormente, será discutida a relação entre a produção animal e seus efeitos sobre a produção de queijos, destacando como a alimentação animal e o uso de óleos essenciais podem interferir na produção de leite e seus derivados. Finalmente, é apresentado um artigo científico cujo objetivo foi avaliar os efeitos de um queijo produzido a partir do leite cru de vacas submetidas à ingestão de diferentes doses de um aditivo a base de óleos essenciais de eucaliptol e mentol, e investigar sua ação sob as características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas do queijo colonial com até 21 dias de maturação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 QUEIJO: DEFINIÇÃO E PRODUÇÃO

O queijo é o um subproduto produzido a partir do leite de diferentes mamíferos como vacas, cabras, ovelhas e búfalas. Existem milhares de variedades produzidas no mundo, que se diferem em razão da matéria-prima utilizada e método de fabricação. Diferentes teores de gordura, uso de bactérias específicas, tempo de maturação, uso de ervas ou demais especiarias e até mesmo a dieta dos animais influenciam no sabor e variedade de queijo produzido. No setor lácteo, o queijo se apresenta como um dos produtos mais relevantes no mercado alimentício, o consumo médio *per capita* é de 5,6 quilos por ano no Brasil (Siqueira; Viana; Chaves, 2021)

A produção de queijo obteve um aumento crescente nos últimos anos, e segundo Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), entre 2009 a 2018 foi observado um aumento de 17,08%, com 23.462.267 toneladas de queijo produzidas no ano de 2018 (FAO, 2022). Esse aumento deve ser gradativo, segundo a Associação de Industria de Queijos no Brasil (ABIQ) estima-se que até o ano de 2030 sejam produzidos mundialmente 27 milhões de toneladas de queijo (Embrapa, 2023).

No ano de 2017, de toda as agroindústrias rurais no Brasil cerca de 20,5% eram produtoras de queijo, representando cerca de 175.198 mil estabelecimentos. Ainda naquele ano, o país atingiu a produção total de 222.652 mil toneladas de queijo. O destaque vai para a região sudeste, que representa quase metade da produção nacional (IBGE, 2017). Entre os tipos de queijo mais produzidos, a muçarela obteve um crescimento de 30% nos últimos anos, com cerca de 430 mil toneladas foram produzidas em 2022 (ABIQ, 2023). Outra variedade em expansão são os queijos artesanais, que se diversificam em função da como a matéria-prima utilizada e o método de fabricação.

2.2 QUEIJO ARTESANAL

A produção de queijos artesanais no Brasil se deu no século XVIII com a vinda dos imigrantes europeus que se instalaram em diferentes regiões do país em busca de riquezas. Essa época foi marcada com a expansão da produção do queijo artesanal através da miscigenação de culturas e saberes (Penna, Gigante, Todorov, 2021). Nos dias atuais, a produção de queijo artesanal se estende por todo território nacional, principalmente por produtores rurais e suas famílias.

Conforme estabelecido pela Lei nº. 13.860/2019 (Brasil, 2019), o queijo artesanal é definido como aquele produzido por métodos tradicionais, com uma forte ligação e valorização territorial, regional ou cultural. Para se qualificar como queijo artesanal, é necessário seguir um protocolo de elaboração específico estabelecido para cada tipo e variedade, além de empregar boas práticas agropecuárias e boas práticas de fabricação. Essa legislação busca reconhecer e preservar a autenticidade e a qualidade dos queijos produzidos de forma artesanal, respeitando as tradições locais e valorizando a diversidade cultural.

No Brasil, é extensa a variedade de queijos artesanais, e segundo dados dos apresentados pela (Embrapa, 2023), existe 36 tipos de queijos artesanais, a citar como exemplo o queijo coalho, minas e o colonial. Na região sul, os queijos Colonial e Serrano são os que mais se destacam, sendo que a produção de queijos coloniais está associada a seus colonizadores, que inicialmente o produziam para seu autoconsumo e com objetivo de potencializar sua renda iniciaram a comercialização do produto (Dorigon; Renk, 2011). Os produtores de queijo colonial geralmente utilizam leite de produção própria, proveniente de pequenas propriedades rurais e produzidos a partir de leite cru. Porém, o processo de fabricação se modifica dependendo da região em que é produzido aliado ainda ao seu período de maturação, e ao longo dos anos foi necessário estabelecer também normativas a fim de caracterizar os diferentes tipos de queijos produzidos no país.

Uma revisão bibliográfica muito interessante acerca da produção destes dois tipos de queijo foi publicada por Ambrosini (2022). Neste trabalho, a autora traz especificidades sobre as produções destes queijos, e algumas serão trazidas aqui. Especificamente para o Serrano, historicamente os animais eram da raça Gado Franqueiro, mantidos em campos nativos; os queijos eram obtidos a partir de leite cru, com utilização de coalho e sal em suas receitas, e as peças tinham de 5 a 8 kg, maturadas por até 6 meses. Atualmente, o leite já é obtido de animais de cruzas de raças leiteiras bem como de corte, ainda mantidos em campos nativos, mas já com acesso a pastagens cultivadas e eventuais suplementações com silagem. Ainda se utiliza leite cru e sal, porém com uso de coalho de origem industrial, sendo as peças menores (1 a 3 kg) com 10 a 20 dias de maturação. Quanto ao Queijo Colonial, Ambrosini, (2022) traz que historicamente, a produção de queijo Colonial era baseada em várias raças, mantidas à pasto recebendo suplementação; com uso de leite cru, coalho e sal (semelhante ao Serrano), com peças de 1 kg e 10 dias de maturação. E que atualmente, o Queijo Colonial é obtido do leite de vacas das raças Holandês, Jersey e suas cruzas, as quais recebem

pastagem e são suplementadas com silagem de milho e alimentos concentrados. O queijo é obtido a partir de leite cru e pasteurizado, coalho industrial e sal, mantendo-se a produção de peças pequenas (1 kg) e período de maturação de uma semana a 10 dias.

2.3 LEGISLAÇÃO

Com o passar dos anos, a legislação brasileira regulamentou a produção e comercialização de queijos artesanais feitos a partir do leite cru, desde que sejam cumpridas uma série de exigências a fim de garantir a inocuidade e qualidade do produto, a citar como exemplo o processo de maturação com período não inferior a 60 dias (Brasil, 1996). Com base no cenário nacional e diminuir a informalidade do setor, a IN 30 de 2013 foi regulamentada, e permite a produção de queijos artesanais sejam maturados por um tempo inferior a 60 dias, desde que essa redução não comprometa a inocuidade e qualidade do produto (Brasil, 2013). No estado de Santa Catarina, a Assembleia Legislativa do Estado de Santa Catarina (ALESC) flexibilizou ainda mais esse prazo, permitindo a comercialização de queijos originais de leite cru a partir de 5 dias de maturação, em temperatura mínima a 5 °C com obrigatoriedade de garantir todas as normas sanitárias, qualidade e inocuidade do produto (ALESC, 2021).

Embora exista a legislação vigente, o mercado informal de queijos segue sendo bastante expressivo e inúmeros estudos desenvolvidos na região sul expressam a comercialização de diversos produtos que não atendem essas exigências legais. Tavares *et al.*, (2019) avaliaram as características microbiológicas de queijos coloniais de seis municípios localizados na região sul do Rio Grande do Sul, das amostras obtidas 80% positivaram para *Staphylococcus coagulase*. Outro estudo realizado na cidade de Porto Alegre, que possuía o mesmo objetivo, avaliou queijos coloniais oriundas de feiras modelo e mercado público. Os resultados expressam que 10,73% das amostras foram positivas para coliformes e 40,48% para *Staphylococcus coagulase* positiva, com valores superiores ao permitidos pela legislação, e ainda 2,9% das amostras positivas para *L. monocytogenes* (Ausani *et al.*, 2019).

A Portaria N° 146 do MAPA (1996) institui que “Entende-se por queijo o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactérias específicas, de ácido orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos

especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes”. A Portaria nº 146 estabelece ainda que o leite destinado à produção de queijos tem por obrigatoriedade passar pelo processo de pasteurização ou algum tratamento térmico que garanta a inocuidade do produto. Para que seja possível a utilização do leite cru, sem nenhum processamento térmico, é exigida que o produto seja submetido a regime de maturação durante um tempo mínimo de 60 dias, desde que mantido a temperatura superior a 5 °C (Brasil, 1996).

Além de estabelecer as definições, a portaria 146, 1996 do MAPA determina os critérios de identidade e de qualidade para produção de queijos no Brasil. A classificação dos queijos é feita com base no teor de umidade e teor de gordura, conforme apresentado no Tabela 1.

Tabela 1- Classificação dos queijos de acordo com teores de gordura e umidade, de acordo com a Portaria Nº 146, de 1996 do MAPA.

Classificação dos Queijos quanto ao teor de gordura	
<i>Classificação do Queijo</i>	<i>Teor de Gordura</i>
Extra Gordo ou Duplo Creme	Mínimo de 60%
Gordo	Entre 45,0 e 59,9%
Semi-Gordo	Entre 25,0 e 44,9%
Magro	Entre 10,0 e 24,9%
Desnatado	Menos de 10,0%
Classificação dos queijos quanto ao teor de umidade	
<i>Classificação do Queijo</i>	<i>Teor de Umidade</i>
Queijos de baixa umidade (massa dura)	Até 35,9%
Queijos de média umidade (massa semi-dura)	Entre 36,0 e 45,9%
Queijos de alta umidade (massa branda ou macios)	Entre 46,0 e 54,9%
Queijos de muito alta umidade (massa branda ou “mole”	Não inferior a 55,0 %

No ano de 2013 foi estabelecida a Instrução Normativa nº 30 que permite a utilização de leite cru na produção de queijos coloniais com maturação em período inferior a 60 dias, desde que haja a comprovação por meio de estudos técnico-científicos que a diminuição do regime de maturação não compromete a inocuidade e a qualidade do produto. Desta forma, caberá aos órgãos estaduais ou municipais realizar inspeção

industrial e sanitária para definir o novo período de maturação dos queijos artesanais (Brasil, 2013).

Um avanço em Santa Catarina foi aprovação da lei estadual N° 17.486, 16 de janeiro de 2018, que estabelece diretrizes sobre a produção e comercialização de queijos artesanais oriundo de leite cru. A lei caracteriza o queijo artesanal como aquele elaborado a partir de leite cru da própria fazenda ou de propriedades vizinhas, com obrigatoriedade de atender todas as normas sanitárias assim como seguir o regulamento técnico de identidade e qualidade estabelecido para cada tipo e variedade (ALESC, 2018). Dentre as exigências a produção só é permitida às propriedades certificadas como livre de tuberculose e brucelose, com programa de boas práticas de ordenha e de fabricação, e controle da qualidade da água (ALESC, 2018).

Ainda em 2018, foram elaboradas duas novas normas internas regulamentadoras: Portaria n°32/2018, de 07 de novembro de 2018 (NIR do Queijo Colonial) e Portaria n°33/2018, de 07 de novembro de 2018 (NIR do Queijo Fresco Colonial), com intuito de estabelecer os requisitos mínimos de qualidade para produção e comercialização de queijos frescos coloniais no estado de Santa Catarina (CIDASC, 2018). Os requisitos físico-químicos estabelecidos são de 45% a 59,9% de matéria gorda no extrato seco e de 36% a 45,9% de umidade para queijos de média umidade/ou de 46% a 54,9% para queijos de alta umidade, também é obrigatório a realização da secagem em câmara de resfriamento e sua conservação deve ser realizada sob temperatura máxima de 10 ° (CIDASC, 2018). A Portaria n°32/2018 descreve como Queijo Colonial aquele obtido de uma massa cozida, com remoção parcial do soro, podendo ou não ser lavada por adição de água quente, pré-prensada, dessorada, moldada, prensada, salgada e maturada, sendo permitido realizar a salga na massa ou em salmoura.

No ano de 2021 a Assembleia Legislativa de Santa Catarina (ALESC) com intuito de estabelecer os requisitos mínimos de qualidade para produção e comercialização de queijos coloniais no estado de Santa Catarina elaborou normas internas regulamentadoras que estão dispostas na Lei n° 18.250, de 10 de novembro de 2021. Entre as exigências estão o período mínimo de 5 dias para maturação e que deverá ocorrer, sob refrigeração ou climatização, em temperatura mínima de 5 °C (ALESC, 2021).

O aumento significativo no consumo de queijo ao longo dos anos levou a um subsequente aumento na produção do produto e na distribuição de diferentes tipos de queijos em todo o mundo. Sabendo disso, todos os envolvidos na cadeia de produção de leite e derivados, a saber desde a produção de leite e todos os fatores intrínsecos a este

processo, bem como coleta e industrialização, precisam abordar as questões da segurança alimentar, qualidade e inocuidade dos produtos lácteos.

2.4 ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA NO QUEIJO, SUA RELAÇÃO COM A PASTEURIZAÇÃO E USO DE ADITIVOS A BASE DE ÓLEOS ESSENCIAIS

A produção de queijo a partir de leite cru pode apresentar uma microbiota naturalmente diversificada. Por esse motivo, são exigidas boas práticas de fabricação em todas as etapas de produção do produto, sendo que o tempo de maturação e a manipulação dos queijos extremamente relevantes nesse processo. Além disso, a composição e a umidade dos produtos permitem o crescimento de microrganismos patogênicos que deterioram o produto e diminuem sua qualidade (Costa *et al.*, 2018). O processo de maturação de queijos, principalmente aqueles feitos a partir de leite cru, é importante, pois ajuda na inativação de microrganismos patogênicos pela ação das bactérias lácticas em competição com outras bactérias patogênicas, pela redução da atividade de água e concentração de sal e ácidos (Pretto; Sant'anna, 2017).

Dentre os responsáveis pela deterioração dos queijos se encontram as bactérias, leveduras e fungos (Khorshidian *et al.*, 2018). Os patógenos encontrados com maior frequência em queijos e associados a doenças alimentares são o *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, como gram-positivas e *Escherichia coli* e *Salmonella spp.* como gram-negativas (Gouvea; Rosenthal; Ferreira, 2017; Khorshidian *et al.*, 2018). Apesar dos avanços nos últimos anos em relação a questões sanitárias, uma estimativa realizada pela ABIQ em 2012 relevou que apenas 60% das propriedades produtoras de queijo são inspecionadas (Abiq, 2012). Condições inadequadas durante a produção de queijo podem acarretar na transmissão de agentes patógenos, apresentando um grande problema para a saúde pública (Silva *et al.*, 2012).

Staphylococcus aureus quando em populações suficientemente elevadas produzem uma enterotoxina com alta resistência por um longo período de tempo (Khorshidian *et al.*, 2018). Já a *Escherichia coli* e *Salmonella spp.* podem ser encontrados em queijos produzidos a partir de leite cru, pois ambos não sobrevivem à pasteurização uma vez que são sensíveis ao calor (Villarruel- López *et al.*, 2016). Déficit de sanidade e manejo associado ao elevado pH (6 a 7) e temperatura (8 a 12 °C) durante o processo de fabricação do queijo são os responsáveis pelo aparecimento de *Listeria monocytogenes*

(Christaki *et al.*, 2021). Entretanto, a deterioração mais comum no queijo é causada por leveduras e bolores.

Especificamente sobre o queijo colonial, estudos realizados em território nacional alertam sobre uma melhoria na fiscalização das boas práticas de fabricação. Pesquisa realizada por Tavares *et al.*, (2019) avaliaram as características microbiológicas de queijos coloniais de seis municípios localizados na região sul do Rio Grande do Sul, adquiridos diretamente no comércio local, e 80% positivaram para *Staphylococcus coagulase*. Outro estudo realizado na cidade de Porto Alegre, que possuía o mesmo objetivo, avaliou queijos coloniais oriundos de feiras modelo e mercado público. Foram avaliadas 205 amostras de 17 marcas distintas, e resultou em 10,73% das amostras positivas para coliformes e 40,48% para *Staphylococcus coagulase* positiva, com valores superiores ao permitidos pela legislação; e ainda, 2,9% das amostras positivas para *L. monocytogenes* (Ausani *et al.*, 2019).

Atualmente, a Instrução Normativa Nº 161 de 01 de julho de 2022 estabelece mínimos e máximos e exige a análise de queijo para *Estafilococos coagulase* positiva, *Escherichia coli*, enterotoxinas estafilocócicas, *Salmonella sp.*, e bolores e leveduras. (Brasil, 2022). Os dados sobre o exposto acima estão presentes no Tabela 2.

Tabela 2- Padrões microbiológicos para do queijo

Micro-organismo/Toxina/ Metabólito	m	M
Enterotoxinas estafilocócicas (ng/g)	Ausente	-
<i>Salmonella</i> /25g	Ausente	-
<i>Estafilococos coagulase</i> positiva/g	10 ²	10 ³
<i>Escherichia coli</i> /g, para queijos ralado ou em pó	10 ²	5x10 ²
<i>Escherichia coli</i> /g, para queijos com umidade abaixo de 46%	10	10 ²
<i>Escherichia coli</i> /g, para queijos com umidade igual ou acima de 46%	10 ²	10 ³
Bolores e Leveduras/g, somente para queijos ralado ou em pó	5x10 ²	5x10 ³

M: Máximo e m: mínimo

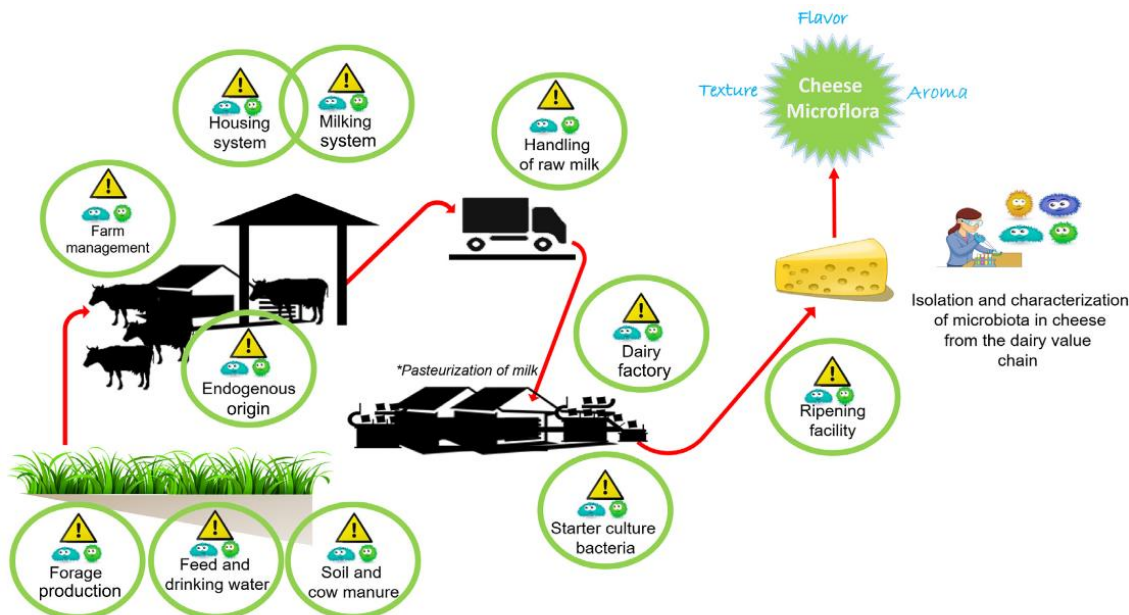
Segundo o Art. 255 do RIISPOA, “entende-se por pasteurização o tratamento térmico aplicado ao leite com objetivo de evitar perigos à saúde pública decorrentes de micro-organismos patogênicos eventualmente presentes, e que promove mínimas modificações químicas, físicas, sensoriais e nutricionais” (Brasil, 2017). Existem dois métodos principais de pasteurização do leite: Na pasteurização rápido (HTST – *High Temperature Short Time*) o leite é aquecido entre 72 a 75 °C por 15 a 20 segundos e em seguida resfriado rapidamente a uma temperatura igual ou inferior a °C. Já a pasteurização

lenta (LTLT- *Low Temperature Long Time*) consiste no aquecimento do leite entre 62 a 65 °C por 30 minutos e, em seguida, resfriado rapidamente a temperatura igual ou inferior a 4°C (Brasil, 2017).

Estudo conduzido por (Ressutte *et al.*, 2018) em Maringá/PR compara as características microbiológicas de queijos coloniais produzidos a partir de leite pasteurizado (72°C a 5 segundos) e leite cru. As avaliações foram realizadas durante o período de armazenamento de 0, 15 e 30 dias e dentre os resultados obteve-se contaminação para *E.coli* apenas no queijo produzido a partir de leite cru, diferentemente do queijo do leite pasteurizado. Para análise de *Estafilococos* Coagulase Positiva, apenas uma amostra de queijo processado com leite cru apresentou contaminação.

Todavia, destaca-se que a microbiota do leite e do queijo podem exercer influência sobre as características do queijo. A dinâmica da presença de microrganismos no leite, no processo de fabricação, e no queijo, bem como a indicação do efeito sobre a textura, sabor e aroma estão apresentados na Figura 1.

Figura 1 - Visão geral dos fatores da cadeia dos laticínios que influenciam as características do queijo.



Fonte: Priyashantha; Lundh (2021).

Na indústria alimentícia o uso dos óleos essenciais foi proposto principalmente contra os microrganismos deteriorantes de origem alimentar dada a sua ação

antimicrobiana (Ed-dra *et al.*, 2021). Apesar disso, grande parte dos resultados obtidos estão relacionados a estudos *in vitro*. Dessa forma, se os mesmos estudos forem desenvolvidos no produto, dada a complexa matriz alimentar do queijo possa apresentar resultados conflitantes (Ahmed *et al.*, 2021). É importante mencionar que a utilização de óleos essenciais como conservantes podem ser alterados pelo pH, pela composição química, pela temperatura de armazenamento e presença de oxigênio na embalagem (Chibane *et al.*, 2019).

Estudos *in vitro* conduzido por Ahmed *et al.*, (2021) evidenciaram que o uso de óleos essenciais de gengibre, tomilho e cravo apresentaram efeitos inibitórios contra os patógenos de origem alimentar *S. aureus*, *E. faecalis* e *E. coli*, além de outras bactérias e fungos deteriorantes. No queijo do tipo pasta mole fresco inoculado com *S. aureus* e *p. aeruginosa*, os óleos examinados apresentaram ação antimicrobiana significativa durante o período de armazenamento de 1 mês a 4°C (Ahmed *et al.*, 2021). Jemaa *et al.*, (2018) obtiveram como resultados que ao usar o óleo essencial do tomilho também houve preservação da qualidade do leite e prolongada a vida útil do leite desnatado UHT. O uso do óleo essencial de tomilho inibiu consideravelmente o desenvolvimento de toda a população bacteriana em até 24 horas de incubação a 37 °C. Esta capacidade de inibição está provavelmente relacionada ao conhecido efeito antimicrobiano do carvacrol, uma vez que foi identificado como o composto majoritário do óleo essencial de tomilho (Jemaa *et al.*, 2018).

A utilização do óleo de orégano para o queijo cottage, evidenciou um menor grau de deterioração química durante o armazenamento e preservação dos ácidos graxos polinsaturados da oxidação. Os principais ácidos graxos do queijo cottage eram os ácidos oleico, palmítico e esteárico. À medida que o tempo de oxidação térmica aumentou durante o armazenamento, a percentagem relativa de ácidos graxos saturados, como os ácidos láurico, mirístico e esteárico, aumentou. Simultaneamente, os ácidos graxos insaturados, incluindo os ácidos lauroléico, miristoléico, hexadecadienóico, elaídico, octadecadienóico e linolênico, diminuíram continuamente (Asensio *et al.*, 2015).

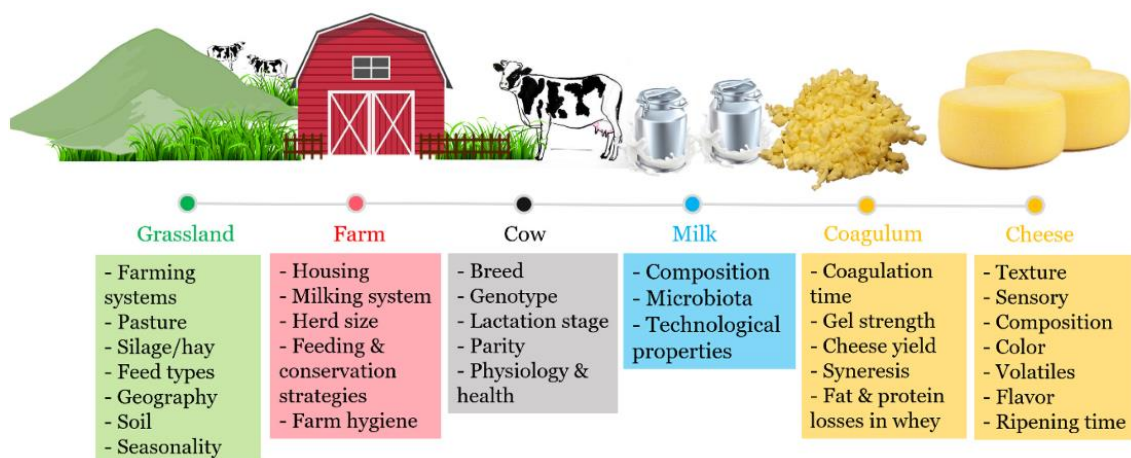
Atualmente, é crescente o interesse no uso de óleos essenciais (OE) no sentido de sua aplicação como aditivos preservativos diretamente em produtos lácteos, principalmente em substituição à compostos sintéticos (Mishra *et al.*, 2020). Os mesmos autores destacam que os OE são eficientes na restrição de crescimento e na sobrevivência de microrganismos no queijo, dentre outros efeitos em lácteos como propriedades antioxidantes e atividades organolépticas. Porém, são escassos na literatura trabalhos que

avaliaram o efeito da administração de óleos essenciais diretamente aos animais (via alimentação), e seus efeitos sobre características físico-químicas e microbiológicas do leite e/ou de seus produtos lácteos.

2.5 RELAÇÃO ENTRE OS ASPECTOS DE PRODUÇÃO, E QUALIDADE DO LEITE E DO QUEIJO

A produção do queijo depende de diversos fatores, Priyashantha; Lundh, (2021), destacam os seguintes que aspectos produtivos como o sistema de produção, sistema de ordenha, tipo de alojamento dos animais e seu manejo, alimentação e suplementação dos animais e, variações sazonais; e fatores relacionados diretamente às vacas de leite, como raça e composição do leite, perfil proteico e polimorfismo da proteína do leite cru, ordem de parto, estágio e duração da lactação.

Figura 2 - Visão geral dos fatores de produção da cadeia leiteira que influenciam a qualidade do queijo.



Fonte: Priyashantha; Lundh (2021).

2.5.1 Saúde e nutrição animal sobre a qualidade do leite e do queijo

A saúde das vacas leiteiras está diretamente relacionada a qualidade do leite e consequentemente do queijo que será produzido. Um dos exemplos mais comuns é a ocorrência de mastite nos animais. A mastite é uma resposta imunológica do organismo à presença de patógenos que causam inflamação na glândula mamária, resultando na redução da produção de leite e em alterações em sua composição (Coelho *et al.*, 2016). Dentre esses patógenos, podem-se citar como exemplo a *Escherichia coli*, classificado

como microrganismo ambiental, e *Staphylococcus* Coagulase Positiva (SCP), que são classificados como microrganismos contagiosos (Coelho *et al.*, 2016).

A *Escherichia coli* é uma bactéria do gênero coliformes, presente no trato digestivo dos animais, e frequentemente encontrada nas fezes, camas, na água e em outros ambientes (Massote *et al.*, 2019). Sua importância reside no fato de ser uma das principais causadoras de mastite ambiental em vacas leiteiras, além de representar um risco à saúde pública, por ser produtora de enterotoxinas que podem causar toxinfecções (Vitorino, 2018). Dentro do grupo dos *Staphylococcus* Coagulase Positiva (SCP), os que mais contribuem para a mastite são: *S. aureus*, *S. intermedius* e variantes de *S. hyicus*, sendo o *S. aureus* o microrganismo mais frequentemente isolado nos casos de mastite (Acosta *et al.*, 2016). De acordo com pesquisas de Costa & Dias (2013), até o ano de 2011, entre os 23 alimentos envolvidos em Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA's), o leite e seus derivados ocupavam a sexta posição no ranking, com o *S. aureus* ocupa o 2º lugar entre os agentes causadores de infecções alimentares. O gênero *Staphylococcus spp.* tem relevância como patógeno de DTA's devido à sua capacidade de produzir enterotoxinas, que causam intoxicação alimentar.

Coelho *et al.* (2014) relatam que a elevação da CCS está relacionada à perda de proteína e gordura do leite para o soro, à redução do teor de proteína do queijo, ao aumento da umidade e ao menor rendimento. Valente; Silva, (2023) destacam que animais acometidos com mastite possuem diminuição da quantidade de caseína no leite. É importante mencionar que a obtenção do coágulo ocorre através de ação enzimática para quebra da caseína e consequente formação da coalhada, e em situações que o leite apresenta alta CCS, as enzimas produzidas pelas células somáticas atacam a caseína e alteram a ação das enzimas do coalho, elevando o tempo para coagulação do leite (Mattiello *et al.*, 2018). A produção de uma coalhada menos firme e obtenção de queijos mais úmidos também são impactos observados (Coelho *et al.*, 2014)

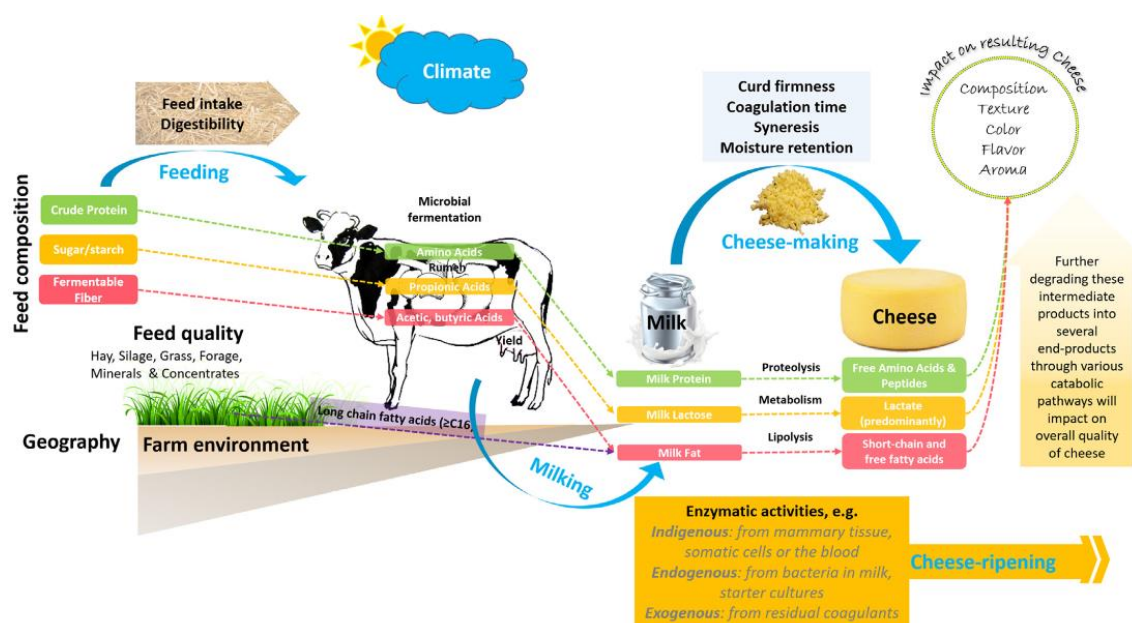
A qualidade da composição do leite tem relação com a ação dos ácidos graxos e aminoácidos, influenciam significativamente o aroma, sabor e bioatividade do queijo (Ali *et al.*, 2023). As altas concentrações de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) no leite de cabra o tornam de fácil digestão (Albenzio *et al.*, 2016). Dentre os achados do estudo estão o aumento da concentração de gordura, lactose, sólidos totais e sólidos desengordurados no leite para a dieta que incluía 45 gramas de óleo de soja. Quando comparada ao controle, essa dieta também favoreceu a concentração dos ácidos graxos considerados benéficos a saúde como o C18:1 *cis*-9, C18:2 *cis*-9, *cis*-12, C18:3 *cis*-9, *cis*-

12, *cis*-15, C18:2 *trans*-10, *cis*-12 (fator antiobesidade), C18:1 *trans*-11 (precursor da síntese endógena de ácido rumênico). Além disso a dieta com 45 gramas de óleos reduziu em mais de 60% a concentração de ácidos graxos C8:0 e C10:0, e em 26% a concentração total dos ácidos saturados C12:0, C14:0, C15:0, C16:0 e C18:0 que possuem propriedades aterogênicas (Silva *et al.*, 2020).

Essas modulações também são observadas a partir de fornecimento de subprodutos. Ianni *et al.*, (2019) adicionaram o bagaço de uva desidratado na dieta de vacas em lactação da raça Holandês e analisaram seus efeitos no leite e queijo. O enriquecimento do dieta com bagaço de uva não afetou a composição do leite mas induziu modificações no perfil dos ácidos graxos do leite e do queijo com aumento das concentrações de ácido linoleico, ácido transvacênico, ácidos rumênico. Além disso, após 30 dias de maturação do queijo, observou-se uma maior estabilidade oxidativa e aumento na concentração de ácidos Γ -aminobutíricos.

A suplementação de minerais na dieta também podem causar modificações no leite e seus derivados. Ling *et al.*, (2017) produziram queijos a partir do leite de vacas em lactação suplementadas com selênio orgânico e inorgânico de modo a considerar as quantidades máximas permitidas na dieta. Os resultados obtidos indicam que essa suplementação permite a produção de leite com maior valor acrescentado, visto que a o teor de selênio no leite foi suficientemente elevado para produzir um queijo que permite a alegação nutricional “rica em Se” conforme as diretrizes da União Européia (Ling *et al.*, 2017).

Figura 3 - Fluxo de nutrientes da alimentação através da vaca leiteira e seus efeitos no leite e no queijo.



Fonte: Priyashantha; Lundh (2021).

A qualidade de produtos lácteos pode ser avaliada por diferentes metodologias. Uma delas ainda não mencionada, é a análise sensorial. Assim, a modulação do perfil e características no queijo, as quais são diversas, podem ser avaliadas de várias formas. Como já discutido anteriormente, no Sul do Brasil o queijo do tipo colonial não possui uma padronização de preparo, o que não permite sua descrição de forma única ou mesmo ter seu mercado consumidor delineado, já que sua diversidade na elaboração inicia ainda no uso da matéria-prima que pode ser originária de leite cru ou pasteurizado (Mattiello *et al.*, 2018). (Steinbach *et al.*, 2021) caracterizaram o queijo colonial produzido na microregião de Francisco Beltrão no estado do Paraná e entre as 15 amostras de queijos coletadas, nove eram oriundas de leite pasteurizado e seis de leite cru. Ao serem submetidas a análise microbiológica apenas seis atenderam as exigências legais, sendo cinco de leite pasteurizado e uma de leite cru. As amostras aptas foram encaminhadas para a avaliação do perfil sensorial e aceitação do produto por uma equipe de avaliadores. A tradição e os aspectos sensoriais como sabor, aroma e textura são principais motivações para o consumo desse produto, os consumidores relatam um sentimento de nostalgia que os remetem ao tradicionalismo. Por outro lado, a segurança alimentar também é apontada como um problema e o principal motivo para não consumir o queijo colonial (Steinbach *et al.*, 2021).

2.5.2 Uso de óleos essenciais na nutrição animal e sua relação com produtos lácteos

O uso de plantas para fins terapêuticos é uma prática milenar transmitida de geração em geração. Os óleos essenciais são aditivos extraídos de sementes, folhas, galhos, cascas, entre outras fontes (Burt, 2004). Ao longo dos anos desenvolve-se estudos a fim de comprovar a eficiência do uso dos óleos essenciais em desempenhar atividade antioxidantes, antimicrobianas, anti-inflamatória para alguns tipos de óleos (Tariq *et al.*, 2019, Ed-dra *et al.*, 2021; Farina *et al.*, 2021).

Zhou *et al.*, (2019) avaliou os efeitos de diferentes do óleo essencial de orégano em ovinos, e obtiveram como resultados que a administração em pequenas doses é benéfica, em contrapartida, em doses elevadas podem ser prejudiciais à saúde. Já para bovinos de corte a administração de duas doses de óleo essencial orégano (130mg e 260mg) pelo período de 390 dias apresentou melhora no desempenho, além disso, e após abatidos, a suplementação promoveu aumento dos AGV's, alteração na microbiota ruminal, maior desenvolvimento das papilas do epitélio ruminal com consequente melhora na digestão (Zhang *et al.*, 2021).

A inclusão do óleo essencial de canela na dieta de novilhos holandeses em terminação, promoveu uma menor proporção de acetato enquanto os níveis de propionato e butirato aumentaram (Vakili *et al.*, 2013). Chaves *et al.*, (2008) utilizaram 200 mg de óleo essencial de canela /kg de MS na dieta de cordeiros, e obtiveram como resultados um aumento no ganho média diário de peso dos animais que consumiram o produto. Estudos realizaram *in vitro* apresentaram efeito antimicrobiana do óleo essencial de canela para cepas de *Escherichia coli* e *Trueperella pyogenes* presente em endometrite de vacas holandesas (Paiano *et al.*, 2023).

Para vacas leiteiras, a inclusão de 0,056% do extrato de orégano na matéria seca (MS) da dieta, apresentou aumento de acetato ruminal melhora na digestibilidade e no perfil de ácidos graxos no leite (Kolling *et al.*, 2018). Uma mistura de óleos essencial que contém na composição óleo essencial de canela, foi fornecida para vacas leiteiras na dose de 10g/dia e apresentou aumento na gordura do leite e diminuição significativa na CCS (Koknur *et al.*, 2022).

2.5.3 Particularidades dos óleos essenciais mentol e eucaliptol

O uso de produtos naturais ricos em substâncias bioativas tem se tornado expressivo nos últimos anos, atrelado a isso crescem a demanda por plantas que possuam

efeito fitoterapêuticos (Silva *et al.*, 2017). Citam-se como exemplos óleos essenciais derivados de plantas como o mentol e o eucaliptol.

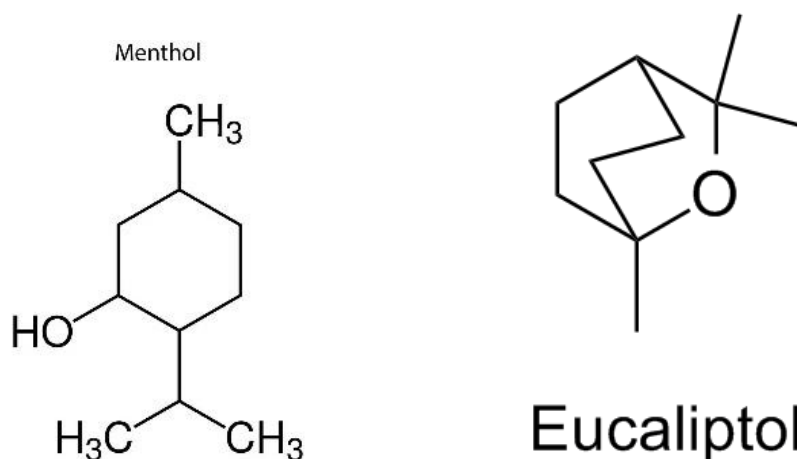
No gênero *Mentha*, pertencente à família *Lamaceae*, existe uma ampla variedade de espécies reconhecidas por suas propriedades benéficas, especialmente os flavanóides como quercitina, isorcoifolina, mentosídeo, vitamina K, (Thakur *et al.*, 2021). Os extratos dessas plantas são utilizados como erva medicinal e são conhecidas popularmente como hortelã ou menta (Biswas; Saha; Ali, 2014). O mentol faz parte do grupo dos monoterpenos cíclicos e sua estrutura química expressa na Figura 4. O mentol pode ser obtido a partir da *Mentha peperita L.*, ecomumente conhecida como hortelã-pimenta, um híbrido de *M. spicata L.* (hortelã) e *Mentha aquatic* (Singh; Shushni; Belkheir, 2015).

O óleo de hortelã-pimenta pode ser usado como um bom agente de conservação, inibindo alguns patógenos transmitidos por alimentos. Singh; Shushni; Belkheir, (2015) avaliaram o efeito inibitório desse óleo contra algumas cepas de gram-positivas e gram-negativas, as concentrações destiladas de 0,4% a 0,7% v/v mostraram efeito positivo para esses parâmetros, além disso, os extratos também exibiram atividade antioxidante significativa. O óleo de Hortelã- pimenta também apresentou atividade antifúngicas contra o parasita *Aspergillus flavus* (Abd El-Hack *et al.*, 2023).

Porém, destaca-se que poucos são os estudos que avaliaram o uso deste OE na produção animal. O extrato etanólico da *Mentha arvensis L.* apresentou atividades antioxidantes pela atividade eliminadora de radicais livres, antimicrobiana contra *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Shigella Boudii pyogenes* e *Streptococcus aureus* em comparação com o medicamento padrão, citotóxicas e analgésicas significativas em camundongos (Biswas; Saha; Ali, 2014). Em tambaquis (*Colossoma macropomum*) o extrato de hortelã mostrou efeitos positivos para fatores hematológicas, com consequente aumento da resistência de infecções bacterianas (Ribeiro *et al.*, 2016). Na alimentação de bovinos leiteiros, o estudo de Possenti, (2014) avaliou a ação antioxidante dessa substância (OE obtido da *M. arvensis*). Foi observada uma redução no TBARS após o tratamento com o extrato da *M. arvensis*, o que demonstra que planta possui ação antioxidante sobre os eritrócitos de vacas leiteiras.

Por fim, estudo de Coelho *et al.*, (2023) demonstrou a capacidade de *blend* de óleos de eucaliptol e mentol em reduzir os problemas respiratórios de bezeros leiteiros. A suplementação dos óleos foi feita através da dieta líquida durante 28 dias com dose diária de 4 ml/ dia. Após o desmame os animais foram avaliados até os 70 dias de idade e os resultados demostram que o grupo que recebeu o blend de óleos tendeu a ter maior consumo de matéria seca. Os animais desse mesmo grupo tenderam a ter menos dias de tosse e menos intervenções veterinárias.

Figura 4 - Estruturas químicas do mentol (direita) e do eucaliptol (direita)



Quanto ao eucaliptol, obtido do *Eucalyptus globulus*, sua atividade antioxidante também é reconhecida. Amakura *et al.* (2002) isolaram e identificaram os componentes químicos do extrato da folha de eucalipto como aditivo alimentar natural; e ainda, avaliaram sua atividade de inibição contra a peroxidação lipídica do ácido linoleico. Estudos realizado por Ghoshal; Singh (2020) demonstram que filmes nanocelulósicos de amido encapsulado com o extrato da folha de eucalipto embrulhado em uvas reduziram significativamente o crescimento de bactérias patogênicas de superfície.

Estudo *in vitro* com o uso do óleo de eucalipto apresentou possíveis efeitos a serem observados no ambiente ruminal do animal. Após diluição do líquido ruminal e incubação com o complexo de óleos (dose de 40 mg), foi possível observar ação redutora na produção de metano em 40%, a qual se deu pela diminuição de protozoários de modo a aumentar a produção ácidos graxos voláteis totais, com melhora a proporção de ácido propiônico (Tatsuoka *et al.*, 2008). Outro estudo *in vitro* realizado por Moshidi *et al.*, (2024) sugere que os óleos *essenciais de Eucalyptus globulus* têm o potencial de melhorar a fermentação ruminal e a degradabilidade das fibras em vacas leiteiras, a taxa de passagem foi superior nos grupos suplementados com o óleo essencial na dose de 150

mg. Todavia, nem este estudo, nem os demais apresentados, exploraram os efeitos da adição de OE a base de eucalipto e menta sobre o leite ou derivados lácteos.

Assim, embora seja claro que a qualidade do leite e a nutrição animal possam afetar suas características de composição, e que esta tenha efeitos diretos sobre os produtos lácteos, são escassos na literatura dados que mostrem a influência do uso de óleos essenciais na alimentação animal e sua influência sobre estes. Em especial, ao uso de óleos a base de menta e eucalipto, neste caso investigados sobre a produção de queijo tipo Colonial.

3 ARTIGO 1: PHYSICOCHEMICAL AND MICROBIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF ARTISANAL COLONAIL CHEESE MADE FROM RAW MILK OF JERSEY COWS SUPPLEMENTED WITH ESSENTIAL OILS

Os resultados desta dissertação são apresentados na forma de artigo, com a seções de acordo com as orientações da Revista “Animal Feed Science and Technology”.

Aline Luiza do Nascimento¹, Cristina Bachmann da Silva¹, Lucas Henrique Bavaresco¹, Bruna Klein³, Aline Zampar^{1,2}, Creciana Maria Andres⁴, Andréia Maria Faion⁴, Nathália Coelho Andrade⁵, Jocinei Dognini⁵, Ana Luiza Bachmann Schogor^{1,2}

¹Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Chapecó, SC, Brasil.

²Departamento de Zootecnia, UDESC, Chapecó, Brasil.

³Departamento de Engenharia Química e de Alimentos, UDESC, Pinhalzinho, Brasil.

⁴Centro Universitário do Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial, SENAI, Chapecó, Brasil

⁵Instituto Senai de Tecnologia Ambiental, SENAI, Blumenau, Brasil

*Correspondent author: alineluizan@outlook.com

3.1 INTRODUCTION

The wide variety of cheeses produced in Brazil is tied to historical and cultural aspects. Artisan cheeses differ in terms of processing, maturation time, raw materials used, texture, and other factors (Kamimura *et al.*, 2019). Colonial cheese is a variety widely produced in southern Brazil, characterized by the use of raw milk in its production (SILVA *et al.*, 2020). This use of raw milk in the production of colonial cheese imparts unique sensory characteristics to the cheese; however, it also creates conditions conducive to the proliferation of foodborne microorganisms (Medeiros Carvalho *et al.*, 2019). A systematic review presented by (Ströher; Silva; Nunes, 2023) evaluated various studies evaluating the microbiological characteristics of artisanal cheeses sold in the southern region and the impact of Good Manufacturing Practices (GMP) on them. The analysis revealed microbiological contamination by *S. aureus*, coagulase-positive *Staphylococcus*, *Salmonella sp.*, and *Escherichia coli*; additionally, all the studies demonstrated some failure in GMP.

Several regulations establish guidelines for the proper production and commercialization of Colonial Cheese. In the state of Santa Catarina, based on Law No. 18,250 of november 10, 2021, the commercialization of Colonial Cheese made from raw milk is permitted provided it undergoes at least 5 days of maturation at a minimum temperature of 5 °C, and the safety and quality of the product are proven (ALESC, 2021). Although there is existing legislation, it is not possible to guarantee the food safety of this product, as studies conducted in the southern region of the country have shown that various samples of cheese already on the market presented microbiological contamination at levels exceeding those permitted by law (Ausani *et al.*, 2019; Tavares *et al.*, 2019; Benincá *et al.*, 2022). The use of essential oils (EO) has proven effective against the action of microorganisms. (Ahmed *et al.*, 2021) evaluated the effect of 0.01% ginger, thyme, and clove oil on distinct samples of cheese inoculated with *S. aureus*, and the assessed oils showed significant antimicrobial action during the one-month storage period at 4 °C, along with an improvement in organoleptic properties (Ahmed *et al.*, 2021). Additionally, the use of EO is widely practiced in animal production and nutrition. In 2014, (Reza-Yazdi *et al.*, 2014) evaluated the effect of supplementing a blend of essential oils composed of cinnamon, peppermint, coriander, cumin, and lemongrass on ruminal fermentation parameters and milk composition of cows exposed to heat stress. The authors observed that the group of cows supplemented with the essential oil blend showed

superior milk production and higher dry matter intake. This suggests the potential benefits of using this strategy to reduce heat stress in lactating cows.

However, few studies have been conducted so far on peppermint and eucalyptus essential oils, especially in lactating cows, while some research has observed that these substances provide benefits for non-ruminant animals, such as poultry and pigs (Sinhorin *et al.*, 2017; Freire, 2020; Dal Santo, 2021). Both eucalyptus and mint essential oils are known for their strong, distinctive aromas and cooling effects. Eucalyptus oil is characterized by its sharp, camphoraceous scent and slightly woody undertone, while mint oil is recognized for its sweet, crisp, and intensely minty fragrance. These organoleptic properties make them popular in aromatherapy, personal care products, and culinary applications, where they impart freshness and a cooling sensation. These characteristics justify their widespread use in swine and poultry production due to sanitary, environmental, and management challenges.

The supplementation of 4 ml/day of a blend of eucalyptus and menthol oils for dairy calves was administered through the liquid diet for 28 days (Coelho *et al.*, 2023). After weaning, the animals were evaluated until 70 days of age, and the results showed that the group receiving the EO blend tended to have higher dry matter intake, fewer days with coughing, and fewer veterinary interventions (Coelho *et al.*, 2023). Based on this scenario, it is necessary to explore the properties and possible uses of essential oils both in animal nutrition and the food industry.

Therefore, the present study aims to evaluate the supplementation of different doses of a blend of eucalyptus and menthol essential oils and investigate their effects on the physicochemical and microbiological characteristics of Colonial Cheese, made from raw milk, with up to 21 days of maturation.

3.2 MATERIALS AND METHODS

3.2.1 Cow diets, sample collection and chemical analysis of feed

Nine Jersey cows, homogeneous in age, parity, and days in milk, were included in this study. The cows were randomly divided into three groups (treatments): a control group (Control), a group that received dose 1 (EO3.6), and a group that received dose 2 (EO7.2) of menthol and eucalyptol essential oils. The treatments are described below. The cows were housed for the entire trial period in a compost barn (12 m²/cow) with access to an identical feeding area and were fed twice daily (Figure 5). The study lasted

16 days, with 14 days for adaptation followed by two sampling days. The diet was formulated using AMTS® software according to the management of the commercial farm, considering the following parameters: body weight (BW) of 475 kg, body condition score (BCS) of 3.5 (scale 1 to 5), days in milk (DIM) of 101, predicted daily dry matter intake (DMI) of 16.15 kg. The ingredients and nutritional composition of the diet are in Tables 3 and 4. The chemical analyses of the feed were performed by wet chemistry in a commercial laboratory (3rLab, Chapecó, SC, Brazil) for crude protein (CP), neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF), starch, ether extract (EE), ash, dry matter and lignin contents according to AOAC International methods.

Figure 5- Installation and Animals



Source: Elaborated by the author (2024)

Table 3- Chemical Composition of Corn Silage, Ryegrass Silage, Commercial Feed, and Experimental Diets

Chemical Composition	Corn Silage	Ryegrass Silage	Commercial Feed
Dry matter	3600	2100	9166
Mineral Matter	444	-	660
Ether extract	319	367	406
Crude protein	866	1157	2500
NDF	4277	6930	-
ADF	2880	4530	-
Lignin	488	-	-
Sarch	2161	-	-

Source: Elaborated by the author (2024)

3.2.2 Treatments

The additive contains a blend of essential oils (EO) (BronchoVest, Biochem, Germany), comprising eucalyptus oil (minimum concentration of 126 g/kg) and peppermint oil plus menthol crystals (minimum concentration of 87 g/kg). The product is registered with the Ministry of Agriculture, Livestock, and Supply under number 245/2020/UTVDA/DREP. The EO concentrations were administered in two doses: dose 1, 36 mL of the commercial product containing 213 mg of concentrated active ingredients per animal/day; and dose 2, 72 mL of the commercial product containing 426 mg of concentrated active ingredients per animal/day. The additive was administered orally in daily doses, individually diluted in 50 mL of water. The adaptation period to the additive lasted 14 days, with milk collected on days 15 and 16 of the experiment.

3.2.3 Milk collection and analysis for Artisanal Colonial Cheese production

Milk was collected twice: the first collection at 4 pm and the next day at 6 am. The milk from each session was stored by group in plastic containers (50 L capacity each) at 4 °C. A total of 80 liters of milk per group was obtained by proportionally mixing the morning and afternoon milkings. After homogenization, two milk samples from each container were collected in vials containing Bronopol and sent for raw material characterization. The milk was then transported to the Food Analysis Laboratory of the National Service for Industrial Training (SENAI) in Chapecó, SC.

Chemical composition analyses and somatic cell count (SCC) were conducted by the Milk Analysis Laboratory – PARLEITE in Curitiba, PR, accredited by the Ministry of Agriculture, Livestock, and Food Supply. Quantification of fat, protein, lactose, total solids, and solids-not-fat was performed using the Mid-Infrared Spectrometry Method according to ISO 9622 - IDF Standard 141:2013. SCC was determined using the Flow Cytometry Method according to ISO 13366-2 - IDF Standard 148-2 (2006). Total Enterobacteriaceae count was conducted at the UniSENAI Food Laboratory in Chapecó, accredited by MAPA and INMETRO.

3.2.4 Characteristics of the raw material used to produce cheese

The composition, microbiological data, and fatty acids of the milk are presented descriptively, without statistical analysis being performed. The fat contents were 4.60%, 3.63%, and 3.34% for control, EO3.6 and EO7.2 respectively. The protein content

averaged 3.47%, 3.34% and 3.56% for control, EO3.6 and EO7.2 respectively. For lactose, the values were 4.5%, 4.61 and 4.73% for control, EO3.6 and EO7.2, respectively. The total solids content averaged 13.55%, 12.28% and 11.88%, for control, EO3.6 and EO7.2, respectively. The urea levels averaged 17.15 mg/dL for the control group, 17.65 mg/dL for EO3.6 and 14.5 mg/dL for EO7.2. The somatic cell count (SCC) was 424,000 cells/ml for the control group, 43,000 cells/ml for EO3.6 group, and 29,000 cells/ml for the EO7.2 group. The total Enterobacteriaceae count was $<1.0 \times 10^0$ for all three treatments.

The average fatty acid results of the milk are expressed as percentages (%). For butyric acid (C4:0), the control group showed a percentage of 0.2501, the EO3.6 group 0.2661, and the EO7.2 group 0.2224. The caproic acid (C6:0) had averages of 0.7774 (Control), 0.8157 (EO3.6), and 0.7334 (EO7.2). For caprylic acid (C8:0), the averages obtained were 0.7238 for the control group and 0.6528 for the EO3.6 group. The capric acid (C10:0) had values of 2.2048 (Control), 2.3495 (EO3.6), and 2.2581 (EO7.2). For undecanoic acid (C11:0), the averages for the control group were 0.2082, 0.2338 for the EO3.6 group, and 0.2241 for the EO7.2 group. For lauric acid, the control group showed averages of 3.2356, the EO3.6 group 3.5231, and the EO7.2 group 3.3977. The tridecanoic acid (C13:0) had averages of 0.1319, 0.1471, and 0.1624 for the control group, EO3.6, and EO7.2, respectively. Myristic acid had averages of 12.5864 for the control group, 12.3988 for the EO3.6 group, and 12.2824 for the EO7.2 group.

The averages for myristoleic acid (C14:1) were 0.5992 (Control), 0.6407 (EO3.6), and 0.5186 (EO7.2). The averages for pentadecanoic acid were 1.2393, 1.2287, and 1.3909 for the control group, EO3.6, and EO7.2, respectively. For palmitic acid (C16:0), the averages were 38.8034 for the control group, 40.2284 for the EO3.6 group, and 42.3456 for the EO7.2 group. Palmitoleic acid (C16:1) had averages of 1.2120 (Control), 1.1876 (EO3.6), and 1.2327 (EO7.2). The averages for heptadecanoic acid (C17:0) were 0.4514 for the control group, 0.4124 for the EO3.6 group, and 0.4493 for the EO7.2 group. For cis-10-heptadecenoic acid (C17:1), the averages were 0.1627, 0.1427, and 0.1372, respectively. Stearic acid showed averages of 13.1320 (Control), 12.0736 (EO3.6), and 12.1343 (EO7.2). The averages for elaidic acid (C18:1n9t) were 1.5549 for the control group, 1.3850 for the EO3.6 group, and 1.2407 for the EO7.2 group. For oleic acid (C18:1n9c), the averages were 18.7495 for the control group, 18.1103 for the EO3.6 group, and 16.6141 for the EO7.2 group.

Linoleic acid (C18:2n6c) showed averages of 2.8808 for the control group, 3.1805 for the EO3.6 group, and 3.1304 for the EO7.2 group. Arachidic acid (C20:0) had averages of 0.1618 (Control), 0.1403 (EO3.6), and 0.1471 (EO7.2). Linoleic acid (C18:3n6) showed averages of 0.0210 for the control group, 0.0278 for the EO3.6 group, and 0.0306 for the EO7.2 group. The averages for cis-11-eicosenoic acid (C20:1n9) were 0.0552, 0.0468, and 0.0590 for the control group, EO3.6 group, and EO7.2 group, respectively. For alpha-linolenic acid (C18:3n3), the averages were 0.2736 for the control group, 0.2607 for the EO3.6 group, and 0.2531 for the EO7.2 group. For heneicosanoic acid (C21:0), the averages were 0.3493 (Control), 0.3051 (EO3.6), and 0.2411 (EO7.2). The averages for cis-11,14-eicosadienoic acid (C20:2) were 0.0133 for the control group, 0.0165 for the EO3.6 group, and 0.0144 for the EO7.2 group.

For behenic acid, the averages were 0.0553 for the control group, 0.0541 for the EO3.6 group, and 0.0550 for the EO7.2 group. Cis-8,11,14-eicosatrienoic acid showed averages of 0.0779 (Control), 0.0818 (EO3.6), and 0.0907 (EO7.2). The averages for arachidonic acid were 0.0370, 0.0314, and 0.0324 for the control group, EO3.6 group, and EO7.2 group, respectively. Cis-13,16-docosadienoic acid (C22:2) showed averages of 0.0070, 0.0090, and 0.0085, respectively. Lignoceric acid showed averages of 0.0239 for the control group, 0.0244 for the EO3.6 group, and 0.0301 for the EO7.2 group. The averages for cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid were 0.0071 for the control group, 0.0118 for the EO3.6 group, and 0.0116 for the EO7.2 group. For nervonic acid, the averages were 0.0039 for the control group, 0.0086 for the EO3.6 group, and 0.0037 for the EO7.2 group. The averages for cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid were 0.0049, 0.0051, and 0.0046 for the control group, EO3.6 group, and EO7.2 group, respectively.

The average sum of saturated acids was 74.3399 for the control group, 74.8539 for the EO3.6 group, and 76.6167 for the EO7.2 group. For the sum of unsaturated acids, the averages were 25.6601 for the control group, 25.1462 for the EO3.6 group, and 23.3833 for the EO7.2 group. The monounsaturated acids showed averages of 22.3374 (Control), 21.5216 (EO3.6), and 19.8069 (EO7.2). For the polyunsaturated acids, the averages were 3.3226, 3.6245, and 3.5765 for the control group, EO3.6 group, and EO7.2 group, respectively.

3.2.5 Cheese Production

Cheese was produced using raw milk following the methodology described in Law No. 18,250 (ALESC, 2021). The cheese-making process involved heating the milk to 32 °C, adding calcium chloride (40 mL per 100 L of a 50% solution), and homogenizing. Lactic culture and rennet (Maxirene Chymosin) were added, and the mixture was allowed to form curds for 20-40 minutes. The curds were cut into 2 cm cubes and heated to 42 °C while stirring until the desired consistency was achieved. The curds were drained, salted, and pressed into 500 g molds for 30 minutes, flipped, and pressed for another 30 minutes before transferring to the maturation chamber.

The maturation process took place in a chamber with a minimum temperature of 5 °C (Suckmilk, Nova Erechim, SC) as per Law No. 18.250 of November 10, 2021. Samples from each treatment and the control group were analyzed on days 0, 3, 7, 14, and 21 of maturation. (Figure 6). A short maturation period was evaluated to ensure the safety of the raw milk product, with the possibility of maturation for a minimum of 5 days under refrigeration or climatization at a minimum temperature of 5 °C according to Law No. 18.250 (ALESC, 2021). This period aligns with the current maturation practices for Colonial Cheese produced in southern Brazil, whether using pasteurized or raw milk (Ambrosini, 2022).

Figure 6- Manufacturing Processes of Raw Milk Colonial Cheese



Source: Elaborated by the author (2024)

3.2.6 Physicochemical and Microbiological Analyses of Cheese

Cheese composition analyses followed methods described by (Wolf *et al.*, 2010). Moisture was determined by gravimetry (ISO 5534:2004-IDF 4) lipids by the butyrometric method (ISO 3433-IDF 222:2008), and protein by the micro-Kjeldahl method (ISO 8968-1:2014-IDF-20-1).

Microbiological evaluation was conducted according to Normative Instruction No. 161 of 01/07/2022 (Brasil, 2022), including the determination of coagulase-positive *Staphylococci*, *Escherichia coli*, *Staphylococcal* enterotoxins, *Salmonella sp.*, and molds and yeasts. Analyses were performed at the UniSENAI Food Laboratory (Chapecó Campus), certified by MAPA (Ordinance No. 354, 09/07/2021) and INMETRO.

3.2.7 Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) and Texture profile analysis (TPA) in Artisanal colonial cheese

The TBARS analysis involved preparing TBA (0.144 g of thiobarbituric acid diluted in 50 mL of distilled water) and TCA solutions (35.7 g of trichloroacetic acid + 0.5 g of EDTA + 0.5 g of propyl gallate diluted in 500 mL of distilled water). Ten grams of the sample were weighed, triturated, filtered, and mixed with 5 mL of each solution. The tubes remained in a water bath for 40 minutes before reading in a spectrophotometer (538 nm). Analyses were conducted in triplicate. Texture profile analysis (TPA) and colorimetry were performed as proposed by Steinbach *et al.* (2021) with adaptations. TPA used a TA. XT texturometer (Stable MicroSystems), After calibration of the equipment, readings were taken at five points on both the rind and the interior of the cheese samples.

3.2.8 Determination of fatty acids in cheese

For the determination of the fatty acid profile in cheese, lipid extraction was performed using the method of Bligh; Dyer, (1959) with adaptations. To a 15 mL polypropylene tube, 1.5 g of samples, 0.8 mL of water, 5 mL of methanol, and 2.5 mL of chloroform were added, followed by mechanical shaking for 30 minutes. Subsequently, 2.5 mL of chloroform solution and 1.5% NaSO₄ were added to promote a biphasic system. This mixture was shaken for 2 minutes and then centrifuged for 15 minutes at 2000 rpm. The lipids obtained from the chloroform phase were subjected to fatty acid analysis. FA methylation was performed using a transesterification method proposed by Hartman and Lago (1973). To the extracted lipids, 1 mL of 0.4 M methanolic KOH

solution was added in a test tube and vortexed for 1 minute. The samples were kept in a boiling water bath for 10 minutes. Afterwards, they were cooled to room temperature and 3 mL of 1 M methanolic H₂SO₄ solution were added and vortexed for chromatographic analysis. For the determination of FAMEs, a TRACE 1310 gas chromatograph equipped with a flame ionization detector (Thermo Scientific) was used. One microliter of samples was injected into a split/splitless injector, operated in split mode at a ratio of 1:20 at 250 °C. Hydrogen was used as the carrier gas at a constant flow rate of 1.5 mL/min. FAME separation was carried out using an RT 2560 chromatographic column (100 m × 0.25 mm × 0.20 µm film thickness, Restek, USA). The initial oven temperature was programmed at 100 °C for 5 minutes and increased to 180 °C at a rate of 8 °C/min. Subsequently, it was increased to 210 °C at a rate of 4 °C/min, and finally to 250 °C at a rate of 20 °C/min, held isothermally for 7 minutes. The detector temperature was maintained constant at 250 °C. FAME compounds were identified by comparing the experimental retention time with that of the authentic standard (FAME Mix-37, Sigma Aldrich, St. Louis, MO). The results were presented as the percentage of each fatty acid identified in the lipid fraction, considering the equivalent chain length factor for FAME for FID and the conversion factor from ester to the respective acid according to (Visentainer; Franco, 2012)

3.2.9 Colonial Chesse sensory analysis: electronic nose (E-Nose)

Odor profiles were obtained for cheeses ripened for 3, 7, 14, and 21 days, in a total of (Ghazghazi *et al.*, 2021) samples, with readings in triplicate. The odor profiles were obtained using an E-Nose (HERACLES II, Alpha MOS, Toulouse, France) integrated with dual-channel FAST-GC functionalities composed of two flame ionization detectors (FID), using MXT-5 and MXT-1701 columns, both with dimensions of 10 m × 0.18 mm and 1 µm film thickness. Each vial, containing approximately 1 g of the sample, and 20 mL of headspace gas was injected into the GC. Hydrogen was used as the carrier gas at a constant flow rate of 10 mL/min. After preparing the vials with the samples, each vial was incubated at 60 °C for 900 seconds with agitation at 500 rpm. The injection volume was 4000 µL, and the syringe temperature was 70 °C, with a trap at 40 °C and splitless. The initial oven temperature was 50 °C for 5 seconds, then increased at a rate of 2 °C/second until reaching 270 °C, maintained for 200 seconds, with a total acquisition time of 315 seconds. Data processing was performed using *AlphaSoft* v. 12.46 software (Alpha MOS, Toulouse, France).

3.2.10 Statistical Analysis

The data were initially checked for normality of residues and homogeneity of variance. Subsequently, an analysis of variance (ANOVA) was performed in a completely randomized design with repeated measures over time (days 0, 3, 7, 14, and 21 of maturation) to verify the interaction between day and treatment. When no significant interaction was observed, the significance of the treatment effect (control vs. essential oil) was evaluated.

3.3 RESULTS

3.3.1 Composition and Physicochemical Analyses of Cheese

The cheese composition variables are presented in Table 4. No significant differences were observed among the treatments, nor was there any interaction between treatment and day for the parameters of fat, moisture, protein, and ash content.

Table 4 - Composition of Colonial Cheese made from raw milk obtained from Jersey cows fed with essential oils (eucalyptol and menthol) at different days of maturation

Variables	Treatments			P – values	
	Control	EO3.6	EO7.2	Trat	Trat × Day
Fat (%)				0,0005	0,0260
d0	27.25a	27.00a	25.00b		
d3	32.75a	29.25c	31.50b		
d7	34.50b	34.00b	37.00a		
d14	38.25a	34.00b	37.75a		
d21	40.00a	40.00a	40.00a		
Average	34.55	32.85	34.25		
Crude Protein (%)				0.7895	0.6089
d0	18.05	22.18	22.21		
d3	20.05	24.03	24.15		
d7	22.35	26.89	25.79		
d14	26.88	27.07	28.21		
d21	26.01	30.64	30.79		
Average	22.87	26.16	26.23		
Moisture (%)				0.9903	0.9968
d0	49.18	46.75	47.21		
d3	41.82	41.93	40.93		
d7	38.56	37.50	37.23		
d14	31.37	31.81	32.69		
d21	23.00	23.81	24.67		
Average	36.78	36.36	36.54		
Ashes (%)				0.8739	0.4636
d0	3.61	3.68	3.85		
d3	3.65	3.68	4.60		
d7	3.36	3.95	3.59		
d14	3.68	3.98	3.76		
d21	3.57	3.83	3.65		
Average	3.57	3.83	3.89		

Different letters in the same row indicate a significant difference ($P < 0.05$).

3.3.2 Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS), in Colonial cheese

Treatment x day interactions were observed for the variables related to TBARS (Table 5). On day 3, the EO7.2 group showed superiority compared to the other groups. However, on day 7, this relationship reversed, with the control group showing superiority over the EO7.2 group and no difference from the EO3.6 group. From days 14 and 21, the groups did not differ from each other.

Table 5 - Result of substances reactive to t53hiobarbituric acid (TBARS) in Colonial cheese made from raw milk obtained from Jersey cows fed with essential oils (eucalyptol and menthol) at different days of maturation

TBARS	Treatments			P – values	
	Control	EO3.6	EO7.2	Trat	Trat × Day
d3	0.016b	0.015b	0.023a	0.4773	<0.0001
d7	0.086a	0.076ab	0.063b		
d14	0.042a	0.054a	0.042a		
d21	0.132a	0.099a	0.109a		
Average	0.069	0.061	0.059		

Different letters in the same row indicate a significant difference ($P < 0.05$).

3.3.3 Colonial Cheese Colorimetry and texture profile analysis (TPA)

The cheese colorimetry variables are presented in Table 6. For the analyses performed on the internal part of the cheese, treatment x day interactions were observed for lightness (L^*), with higher levels for the control group on days 14 and 21 compared to the groups that received the essential oils; on day 7, the groups did not differ from each other. For the a^* variable, treatment x day interactions were observed on days 7 and 14, where the control sample was superior to the treated groups; however, the groups did not differ on day 21. For the b^* variable, the groups did not differ on day 7; on day 14, the group that received the EO3.6 dose of essential oils was superior to the others. On day 21, this difference was observed only in relation to the EO7.2

For the analyses performed on the external part of the cheese (rind), differences in lightness (L^*) were observed only on day 21, with the EO3.6 dose group being inferior to the control and equal to the EO7.2 dose group. No differences were observed between the groups on days 7 and 14. For the a^* variable, on day 7, the control group was superior to the EO3.6 group and did not differ from the EO7.2 group; on days 14 and 21, this superiority was only for the EO7.2 group, being EO3.6 and EO7.2 equal between them. For the yellowness (b^*) variable, differences were observed only on day 14, where the control group was superior to the EO7.2 dose group, and the EO3.6 and EO7.2 dose groups did not differ from each other.

The texture results are presented in Table 6. For the hardness parameter, no statistically significant differences were observed between the groups, but there was a treatment x day interaction on day 7 of the experimental period. The OE3.6 group showed a lower average compared to the other groups, while the other groups did not differ from each other.

Table 6- Colimetry parameters (internal and on cheese rind) in Colonial Cheese made from raw milk obtained from Jersey cows fed with essential oils (eucalyptol and menthol) at different days of maturation

Variables	Treatments			P – values	
	Control	EO3.6	EO7.2	Trat	Trat × Day
Internal					
L				0.4953	0.0001
d7	93.48a	93.81a	92.88a		
d14	89.97a	85.00b	85.67b		
d21	85.72a	82.59b	76.38b		
Average	89.73	87.13	84.98		
a				<0.0001	<0.0001
d7	-7.87a	-9.11b	-9.22b		
d14	-8.30a	-8.77b	-9.01b		
d21	-8.49a	-8.44a	-8.21a		
Average	-8.22	-8.77	-8.81		
b				<0.0001	<0.0001
d7	24.35a	25.97a	23.65a		
d14	25.84b	27.89a	25.37b		
d21	26.91a	26.20a	23.99b		
Average	25.70	26.68	24.34		
Cheese rind					
L				0.0805	0.0014
d7	89.40a	91.49a	90.52a		
d14	70.26a	68.61a	69.48a		
d21	69.47a	66.34b	67.61ab		
Average	76.38	75.78	75.87		
a				<0.0001	0.0073
d7	-7.47a	-7.81b	-7.63ab		
d14	-6.94a	-7.43ab	-7.65b		
d21	-6.89a	-7.27ab	-7.60b		
Average	-7.10	-7.51	-7.63		
b				0.2729	0.0010
d7	28.90a	26.23a	24.49a		
d14	31.62a	29.95ab	26.51b		
d21	27.05a	25.46a	22.64a		
Average	29.19	27.22	24.55		

Different letters in the same row indicate a significant difference (P<0.05).

Table 7- Averages for varying hardness of colonial cheese

Hardness (Nw)	Treataments	P – values
---------------	-------------	------------

	Control	EO3.6	EO7.2	Trat	Trat × Day
d7	14.26 ^a	34.52 ^b	14.08 ^a	0.00016	0.0119
d14	21.94	26.16	23.37		
d21	29.85	29.14	19.76		
Average	22.02	29.77	19.42		

Different letters in the same row indicate a significant difference ($P < 0.05$).

3.3.4 Cheese Microbiology

The microbiological parameters were analyzed according to the requirements of the legislation and are presented in Table 8. The results for the analysis of staphylococcal enterotoxins detection were negative for both groups on all analysis days. The same result was observed for the detection of *Salmonella* spp., being absent in both groups throughout the experimental period. For the count of coagulase-positive *Staphylococcus*, the result of $< 1.0 \times 10^1$ remained throughout the experimental period for both groups. The mold and yeast counts remained stable for all groups until day 7, showing a value of $> 1.5 \times 10^4$. On day 14, an exponential increase was observed in all groups, which was even greater when the maturation period extended to 21 days. For the total count of *E. coli*, on day 0, the control group and Dose3.6 showed a value of $> 1.5 \times 10^4$, a different behavior from the Dose7.2 group, which showed a decrease in count with values of $< 1.0 \times 10^1$. On day 7, this behavior remained, with values of $> 1.5 \times 10^5$ for the control and Dose3.6 groups, while the Dose7.2 group showed a count of 3.5×10^3 . On day 14, the control and Dose3.6 groups showed values of $> 1.5 \times 10^5$, while the Dose7.2 group had a count of 6.0×10^1 . On day 21, the counts were 1.8×10^4 for the control group, 7.1×10^4 for the Dose3.6 group, and 1.9×10^6 for the EO7.2 group.

Table 8- Mean values for microbiological parameters of cheeses according to ripening.

Trataments	Control	EO3.6	EO7.2	Control	EO3.6	EO7.2	Control	EO3.6	EO7.2	Control	EO3.6	EO7.2
Days of maturation	Day 0	Day 0	Day 0	Day 7	Day 7	Day 7	Day 14	Day 14	Day 14	Day 21	Day 21	Day 21
Coagulase-Positive Staphylococcus Count	$<1,0 \times 10^{+1}$	$<1,0 \times 10^{+1}$	$<1,0 \times 10^{+1}$	$>1,5 \times 10^{+4}$	$>1,5 \times 10^{+4}$	$<1,0 \times 10^{+1}$	$<1,0 \times 10^{+1}$	$<1,0 \times 10^{+1}$	$<1,0 \times 10^{+1}$	$<1,0 \times 10^{+1}$	$<1,0 \times 10^{+1}$	$<1,0 \times 10^{+1}$
Detection of Salmonella spp	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence
Total E. coli Count	$>1,5 \times 10^{+4}$	$>1,5 \times 10^{+4}$	$<1,0 \times 10^{+1}$	$>1,5 \times 10^{+5}$	$>1,5 \times 10^{+5}$	$3,5 \times 10^{+3}$	$>1,5 \times 10^{+5}$	$>1,5 \times 10^{+5}$	$6,0 \times 10^{+1}$	$1,8 \times 10^{+4}$	$7,1 \times 10^{+4}$	$2,3 \times 10^{+3}$
Mold and Yeast Count	$>1,5 \times 10^{+4}$	$>1,5 \times 10^{+4}$	$>1,5 \times 10^{+4}$	$>1,5 \times 10^{+4}$	$>1,5 \times 10^{+4}$	$>1,5 \times 10^{+4}$	$2,0 \times 10^{+6}$	$4,6 \times 10^{+4}$	$3,1 \times 10^{+4}$	$6,1 \times 10^{+6}$	$6,8 \times 10^{+7}$	$1,9 \times 10^{+6}$
Detection of Staphylococcal Enterotoxins	Absence	Absence	Absence							Absence	Absence	Absence

3.3.5 Fatty Acids in Cheese

The individual results of the thirty-two fatty acids of the artisanal colonial cheese are presented in Appendix A. No differences were observed between treatments for butyric acid (C4:0), but there were interactions between treatment and day, where the EO7.2 dose was higher than the other groups on day 7 and lower on day 21. For caproic acid (C6:0), there was an effect only for treatment x day on day 7 of the experimental period, with the EO7.2 dose group being higher compared to the control, while the EO3.6 did not differ from the others. For caprylic acid (C8:0), no significant differences were observed between treatments, but there was an interaction for treatment x day, where the EO7.2 dose group had higher amounts compared to the control on days 0 and 7 of the experimental period, while the EO3.6 dose group did not differ from the others. Significant differences were observed between treatments for capric acid (C10:0) and lauric acid (C12:0) with higher averages in the EO7.2 dose group compared to the other groups; the EO3.6 dose group also had higher levels than the control group. No treatment x day interaction was observed for both acids.

Undecanoic acid (C11:0) showed differences between treatments, with higher levels in the groups that received the essential oils (EO), and no treatment x day interactions were observed. No differences were observed between treatments for tridecanoic acid (C13:0), but there was an interaction for treatment x day, with higher levels in the EO7.2 group compared to the others on days 0, 3, 7, and 14. For myristic acid (C14:0), significant differences were observed only between treatments, with higher levels in the groups receiving the EO compared to the control group. There was no treatment x day effect, but there was a treatment effect for myristoleic acid (C14:1), with the EO3.6 group showing higher levels than the others, and the control group being higher than the EO7.2 group.

Pentadecanoic acid (C15:0) levels did not differ between treatments, but there was a treatment x day interaction with higher levels in the EO7.2 dose group compared to the other groups throughout the experimental period. On days 3, 7, and 14, there were no differences between the control group and the EO3.6 dose group, but on days 0 and 21, the control group was higher than the EO3.6 dose group. No treatment x day interaction was observed for palmitic acid (C16:0), but there were differences between treatments with higher averages in the EO7.2 group compared to the other groups, and the EO3.6

also had higher levels than the control group. Palmitoleic acid (C16:1) averages showed significant differences between treatments, with higher levels in the control group compared to the others. No treatment x day interaction was observed. No treatment x day interaction was observed for heptadecanoic acid (C17:0), but there were differences between treatments with higher levels in the control group compared to the other groups. For cis-10-heptadecanoic acid (C17:1), no differences were observed between treatments, but there was a treatment x day interaction for all days of the experimental period, with the control group having higher levels compared to the others, while the EO3.6 and EO7.2 dose groups did not differ from each other.

No differences were observed between treatments for stearic acid (C18:0), but there was a treatment interaction, with the control group having higher levels compared to the others throughout the experimental period. On days 14 and 21, the EO3.6 and EO7.2 dose groups did not differ from each other, but on days 0, 3, and 7, the EO3.6 was higher than the EO7.2 dose group. Elaidic acid (C18:1n9t) averages showed significant differences between treatments, with higher levels in the control group compared to the others, and the EO3.6 dose group having higher levels than the EO7.2 dose group. No treatment x day interaction was observed for oleic acid (C18:1n9c), but there were significant differences between treatments, with the control group having higher averages compared to the others, and the EO3.6 dose group having lower levels than the EO7.2 dose group for this acid. Significant differences were observed for linoleic acid (C18:2n6c) between treatment averages, with the control group having lower levels compared to the others, while the EO3.6 and EO7.2 dose groups did not differ from each other.

Differences were observed between treatments for arachidic acid (C20:0), with the control group's averages being higher compared to the other groups. The EO3.6 and EO7.2 dose groups did not differ from each other. No differences were observed between treatments or treatment x day interaction for linolenic acid (C18:3n6). Henicosanoic acid (C21:0) averages did not show significant differences between treatments, but there was a treatment x day interaction, with the control group being higher compared to the others throughout the experimental period, and the EO3.6 dose group also having higher levels than the EO7.2 dose group on days 0, 3, 7, 14, and 21. No differences were observed between treatments for eicosadienoic acid (C20:2), but there was a treatment x day interaction on days 14 and 21 of the experiment, with the control group having higher levels compared to the others, while the EO3.6 and EO7.2 dose groups did not differ from

each other. Differences were observed between treatments for behenic acid (C22:0), with the EO3.6 dose group having lower averages compared to the others, while the control group and the EO7.2 dose group did not differ from each other. No treatment x day interaction was observed.

Eicosatrienoic acid (C20:3n6) averages showed differences between treatments, with the EO7.2 dose group being higher than the control and EO3.6 dose groups, while the control group was higher than the EO3.6 dose group. No treatment x day interaction was observed. Differences were observed between treatments for arachidonic acid (C20:4n6), with the control group's average being higher than the others, while the EO3.6 and EO7.2 dose groups did not differ from each other. No treatment x day interaction was observed, but there were differences between treatments for docosadienoic acid (C22:2), with the control group having higher averages compared to the other groups, while the EO3.6 and EO7.2 dose groups did not differ from each other. Lignoceric acid (C24:0) averages showed significant differences between treatments, with the control group having higher levels compared to the other groups, and the EO7.2 dose group being higher than the EO3.6 dose group. No treatment x day interaction was observed. No treatment x day interaction was observed, but there were significant differences for eicosapentaenoic acid (C20:5n3) averages, with the EO3.6 dose group having higher levels compared to the other groups, while the control and EO7.2 dose groups did not differ from each other. Nervonic acid (C24:1n9) treatment averages showed differences between treatments, with the control group having higher levels compared to the others, while the EO3.6 and EO7.2 dose groups did not differ from each other. No treatment x day interaction was observed. Docosahexaenoic acid (C22:6n3) averages did not show differences for either treatment x day or between treatments.

The sum of the fatty acid groups did not show any treatment x day interaction but showed differences between treatments (Table 9). The EO7.2 dose group presented higher levels compared to the other groups, and the EO3.6 dose group was also higher than the control group. An inverse behavior was observed for the sum of unsaturated fatty acids, with differences between treatments showing higher levels in the control group compared to the others, and the EO3.6 dose group having higher levels than the EO7.2 dose group. The sum of monounsaturated fatty acids showed differences in averages between treatments, with higher levels in the control group compared to the others, and the EO3.6 dose group having higher levels than the EO7.2 dose group. For the ratio between saturated and unsaturated acids, the treatment averages differed from each other,

with the control group having higher levels compared to the others, while the EO3.6 dose group had higher levels than the EO7.2 dose group.

The sum of omega-6 fatty acids did not show differences between treatments, but treatment x day interactions were observed. On days 3 and 21, omega-6 levels in the control group were lower than the others, while the groups containing oil did not differ from each other. No significant differences were observed for either treatment or treatment x day interaction for the sum of omega-3 fatty acids. For the ratio between omega-3 and omega-6, higher values were observed for the EO groups, and the treatments did not differ from each other.

Table 9: Average of treatments for fatty acids analysis in artisanal Colonial cheese.

Fatty Acids	Average of treatments (%)		
	Control	EO3.6	EO7.2
Saturated fatty acids (SFA)	73,57 ^C	74,95 ^B	77,10 ^A
Unsaturated fatty acids (UFA)	26,42 ^A	25,04 ^B	22,89 ^C
Monounsaturated fatty acids (MUFA)	23,20 ^A	21,63 ^B	19,55 ^C
Polyunsaturated fatty acids (PUFA)	3,15	3,40	3,34

Different letters in the same row indicate a significant difference ($P < 0.05$).

3.3.6 Sensory Analysis by E-nose

Figure 8 presents the chromatogram of the reference sample, i.e., essential oils based on menthol and eucalyptol, highlighting the major peak as the eucalyptus compound. Figures 9 show the overlay of chromatograms for the reference sample versus milk and Colonial Cheese at different maturation times for the EO3.6 treatment; and 10 shows the overlay of chromatograms for the reference sample versus milk and cheese at different maturation times for the EO7.2 treatment. The reference compound was not detected by the E-nose method in either the milk or the cheeses at different maturation times for the EO3.6 and EO7.2 treatments. Since the reference sample peak was not detected for the treatments, the chromatograms for the Control treatment are not presented.

Figure 7- Chromatogram obtained by injecting the sample into an MXT-5 column in the E-nose, with the highlighted peak corresponding to eucalyptus essential oil.

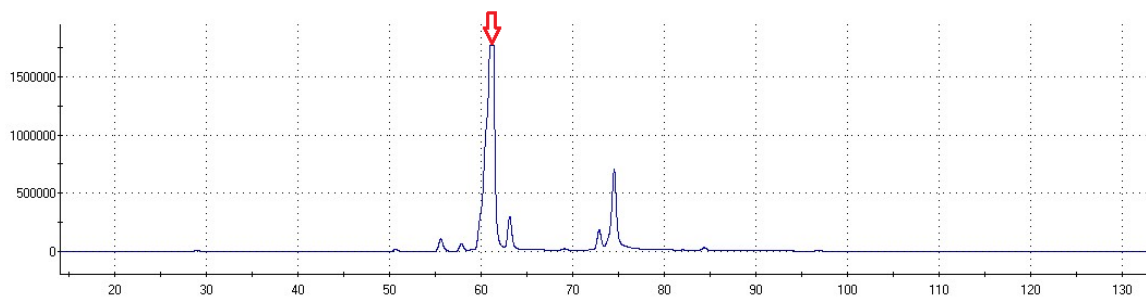


Figure 8- Overlay chromatograms of the reference sample, and the milk and Colonial Cheese samples for the EO3.6 treatment.

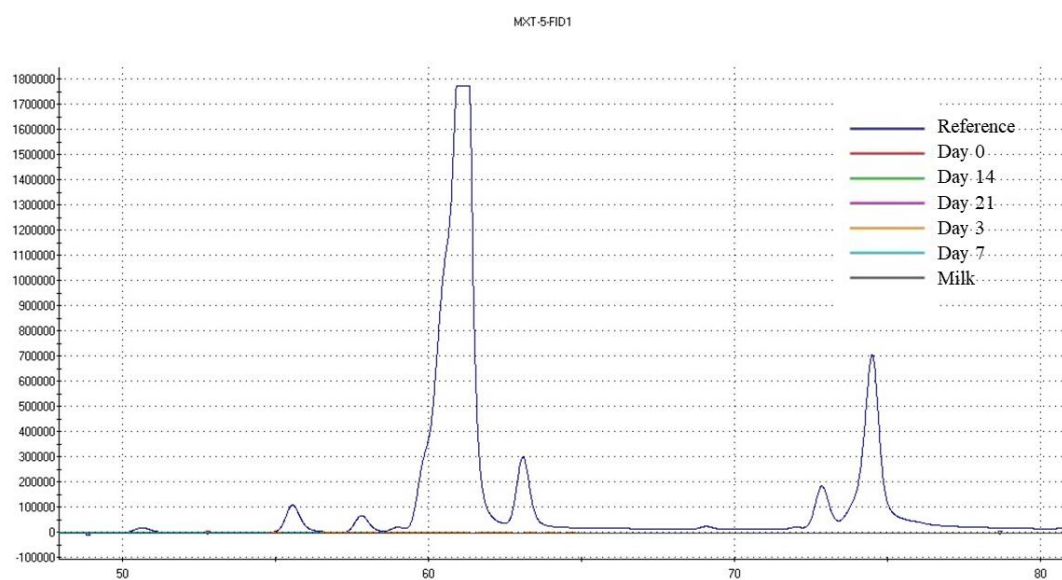
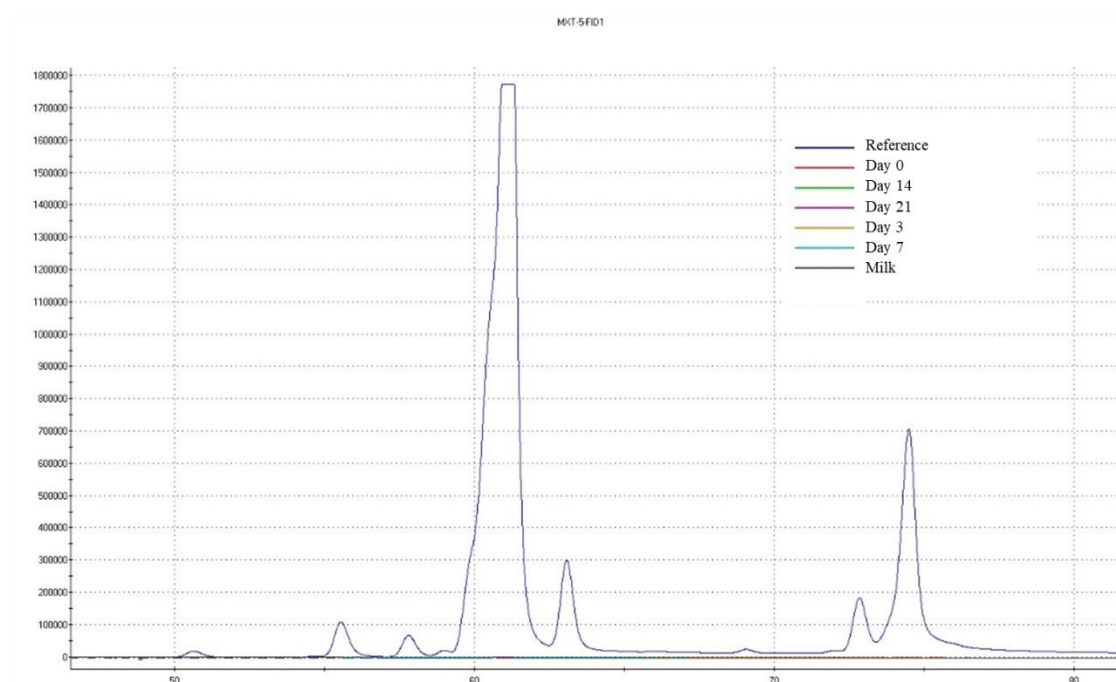


Figure 9 – Overlay chromatograms of the reference sample, and the milk and Colonial Cheese samples for the EO7.2 treatment.



3.4 DISCUSSION

In the present research, we evaluated the supplementation of essential oils based on mint and eucalyptus for Jersey cows and their effects on the characteristics of milk and Colonial Cheese produced from raw milk. Their impact on the physicochemical and microbiological characteristics of Colonial Cheese, manufactured with raw milk and matured for up to 21 days, was investigated. The use of raw milk, despite having specific legislation for its production and maturation, poses challenges to the dairy production chain, considering the possibility of microbiological contamination, among other production factors. Particularly, the state of Santa Catarina has its own legislation for the maturation of these cheeses, emphasizing the need for product safety.

Regarding the initial composition of the milk used for cheese production, the percentages were within the limits established by the legislation. According to normative instruction No. 76 of MAPA (Brasil, 2018), raw milk must have a physicochemical composition of at least 3.0% fat, 2.9% total protein, 4.3% anhydrous lactose, and a minimum total solids content of 11.4%. The somatic cell count in both groups was within the maximum levels established by the regulations, and the numbers found were within the expected and legally permitted range (Brasil, 2018).

There were no significant differences between treatments nor treatment x day interaction for the cheese composition variables ($P > 0.05$). Colonial cheese is not regulated by any Brazilian technical standard of identity and quality, and its characteristics can vary with the region and production process (Lucas *et al.*, 2012). The fat content of both groups classifies them as semi-fat cheeses (Brasil, 1996). For moisture, there was variability during the period for all groups; on day 0, the groups showed moisture percentages of 49.18% (Control), 46.75% (EO3.6), and 47.21% (EO7.2). By the last day of the experimental period, the groups had moisture percentages of 23% (Control), 23.81% (EO3.6), and 24.67% (EO7.2), classifying them as cheeses with levels below the low moisture classification. (Steinbach *et al.*, 2021) obtained differing results when evaluating Colonial cheese with 10 days of maturation, presenting averages of 42.32 ± 0.94 for moisture and 31.51 ± 1.26 for fat percentage. According to state legislation, the minimum temperature required for colonial cheese production is 5°C (Alesc, 2021). According to (Khattab *et al.*, 2019), very low temperatures during maturation affect cheese moisture, and these conditions can lead to decreased evaporation rates and the formation of ice crystals in the cheese matrix, causing damage to the cellular structure, resulting in moisture loss when the cheese is thawed. Conversely, according to (Possas *et al.*, 2021), the low moisture content of some cheese types reduces the growth and survival capacity of pathogenic bacteria. Overall, from the initial maturation period, the Colonial Cheese from all evaluated treatments met the expected characteristics for this type of product.

No differences were observed between treatments for the cheese colorimetry variables, but there was a treatment x day interaction ($P > 0.05$). The values obtained for the “b*” variable indicate a tendency towards yellowing. Steinbach *et al.* (2021) obtained similar averages when evaluating rindless Colonial Cheese produced from raw milk with 10 days of maturation. The averages presented in the study were 86.21 for luminosity, -3.63 for the a* variable, and 25.73 for the b* variable. The results for the L* (luminosity) variable of the internal part of the cheese indicate that the cheeses made from milk of cows supplemented with the OE blend darkened over time. According to Roncatti, (2016), higher L* values are associated with lower fat and protein content, which occurred in cheeses with shorter maturation times due to higher moisture content. Increases in the total solids of the cheese reduce free water, decreasing light dispersion and increasing whiteness. Opacity is influenced by the internal protein structure, with more hydrated matrices tending to have fewer light dispersion points (Roncatti, 2016).

In this context, according to a study by Boroski *et al.* (2012) cited Mishra *et al.*, (2020), one of the biggest problems found in dairy beverages is the oxidation of omega-3 fatty acids due to light and heating; however, in that study, oxidation was reduced due to the addition of flaxseed oil to the dairy beverage. In the present research, for Colonial Cheeses matured up to 21 days, there was no effect of the addition of the OE blend on omega-3, but there was on omega-6, and consequently on the omega ratio (Table 7). TBARS for cheeses from 14 days of maturation also did not differ between treatments, suggesting a certain stability regarding lipid peroxidation in cheeses. Furthermore, according to Christaki *et al.*, (2021), OEs and extracts from various plant sources can be used as preservatives and antioxidants in different types of cheese, but this did not occur when milk from animals supplemented with OE was used for cheese production. One possible explanation for the observed TBARS variation is that, according to Mazzocca *et al.*, (2024), the environmental maturation conditions can contribute to increased variability in cheese quality, impacting TBARS levels.

Lipid peroxides are known to be the first metabolites generated in oxidation. They are unstable and decompose into secondary intermediate products such as aldehydes, ketones, and dienes (Barros, 2012). These are final products of lipid peroxidation that can be sensorially perceived at concentrations around 0.5 to 2.0 mg TBA/kg (O'Neill *et al.*, 1998). According to Terra; Cichoski; Freitas (2006), TBARS values above 1.59 mg/kg of sample indicate a potential health risk to the consumer. In the present study, none of the samples showed values above this index.

Differences were observed between treatments for the fatty acid profile ($P > 0.05$). There was a predominance of saturated fatty acid production in all groups; however, a higher production was observed in the EO7.2 group (77.1%), followed by the EO3.6 group (74.95%) and, finally, the control group (73.5%). A fraction of the long-chain saturated fatty acids comes from the diet (Hanus *et al.*, 2018). These are transported as triglycerides via very low-density lipoproteins (VLDL) and absorbed by the mammary tissue epithelium (Lanier; Corl, 2015). The essential oils supplemented to the animals are abundant in saturated fatty acids. Peppermint oil has palmitic (16:0), linoleic (18:2) and linolenic (18:3) acids (Maffei; Scannerini, 1992). As well as eucalyptus oil, which has an abundance of acid (C16:0), myristic acid (C14:0), stearic acid (C18:0), arachidic acid (C20:0), behenic acid (C22:0), lignoceric acid (C24:0) (Ghazghazi *et al.* 2021).

According to Cadeira *et al.*, (2010), 40% of palmitic acid and fatty acids with 18 or more carbon atoms are pre-formed acids (originating from the diet or mobilized from

body reserves) in the blood. The highest percentages of saturated acids were found for palmitic acid (C16:0), myristic acid (C14:0), stearic acid (C18:0), and lauric acid (C12:0), with averages for the EO7.2 group being 40.81%, 12.62%, 11.64%, and 3.80% respectively. As components of the human diet, it is known that myristic (C14:0), palmitic (C16:0), and lauric (C12:0) acids are hypercholesterolemic, meaning they raise cholesterol levels in the blood and can contribute to an increased risk of developing coronary heart disease (Lima *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2013). However, studies by (Lima *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2013) did not show a reduction in the risk of secondary prevention of coronary heart disease with the replacement of saturated fatty acids with unsaturated ones.

Although milk has a high concentration of saturated fatty acids, the milk fat profile contains several compounds beneficial to human health (Costa Eifert *et al.*, 2006). Polyunsaturated fatty acids, such as omega-3 series and conjugated linoleic acid (CLA), are associated with a reduced incidence of cardiovascular diseases, prevention, and treatment of tumors and osteoporosis (Lock; Baumann, 2004). In the present study, the concentration of polyunsaturated fatty acids was higher in the groups that received essential oil throughout the experimental period.

Regarding microbiological parameters, the count of coagulase-positive *Staphylococcus* showed a value of $<1.0 \times 10^1$ for both groups throughout the experimental period, meeting the criteria established by legislation. There was no detection of *Salmonella spp.* and *Staphylococcal* Enterotoxins. For *Escherichia coli* count, there were different results between the groups from the first day of maturation. For day 0 of the experimental period, the only group that met the criteria established by legislation was EO7.2. From day 7, although not meeting the criteria established by legislation, the EO7.2 group showed lower counts than the other groups, suggesting a possible action of the oil in delaying the growth of this bacterium. The inclusion of essential oils has already proven effective in controlling the growth of this pathogen during 21 days of storage. Diniz-Silva *et al.*, (2020) produced Minas cheese subjected to an emulsion of *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. oils, whose main constituents are thymol (34.8%) and eucalyptol (27.9%), respectively. The evaluation of *E. coli* O157 survival was carried out by inoculating the pathogen into the curd after whey removal (initial count in cheese approximately 6 log CFU/g), and the results showed the pathogen's decrease over the days of maturation, with an approximately 1.5 log CFU/g decrease after 6 days of storage and a 3 log CFU/g decrease after 15 days of maturation.

Oregano essential oil also proved to be an antimicrobial agent against *E. coli* O157 by spraying 0.2 ml of oil per 100g of feta cheese, with its action observed from 16 days of storage (Govaris *et al.*, 2011). Black cumin seed oil also showed inhibitory action against some foodborne pathogens. inoculated pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enteritidis*) into pasteurized milk, and the oil was included in percentages of 0.1 and 0.2% before cheese curd coagulation. The supplementation with different concentrations of oil did not have a significant reductive effect on the proliferation of *L. monocytogenes* and *S. aureus*, but it did have a significant reductive effect on the proliferation of *S. enteritidis* and *E. coli*.

Contamination by *E. coli* occurs due to various factors, including extrinsic factors such as storage location and temperature and relative humidity (Farrokh *et al.*, 2013). State legislation (Law No. 18,250, of November 10, 2021) requires that cheeses produced from raw milk be subjected to a minimum temperature of 5°C for at least 5 days of maturation to ensure product safety, and this must be verified through laboratory tests. Lekkas *et al.*, (2006) subjected commercial Galotyri cheeses (traditional Greek sheep cheese from acidic curd), derived from local dairies, one industrial and the other artisanal, and inoculated *E. coli* strains into the samples. The cheeses were kept at temperatures between 4 and 12°C, and the pathogen's survival was evaluated over 28 days. The authors observed a much faster pathogen decline in industrial cheeses compared to artisanal ones at both temperatures. Thus, while *E. coli* became undetectable after 14 days at 4°C in industrial samples, populations of 1.4–1.9 and 4.2–5.1 log survived after 28 days in artisanal cheeses. The high survival of this pathogen in artisanal cheeses compared to industrial ones indicates a warning regarding the manufacturing conditions of these products.

Although current legislation exists, several studies conducted on samples of Colonial Cheeses collected from commerce indicate microbial contamination of Colonial cheeses already in commercial conditions (Ausani *et al.*, 2019; Tavares *et al.*, 2019). The presence of these contaminated products available to consumers raises the question of whether good manufacturing practices, storage, and laboratory tests are indeed being carried out and whether there is effective inspection.

Molds, such as those of the *Penicillium* species, are found in cheeses matured in a humid environment. Inadequate cleaning and disinfection of equipment are also significant sources of contamination. Yeasts such as *Saccharomyces cerevisiae* can be introduced through air, production utensils, or a contaminated environment (Banjara;

Suhr; Hallen-Adams, 2015; Zheng; Shi; Wang, 2021). The Mold and Yeast Count in both experimental groups showed the same levels until day 7 of the experiment. The count of $>1.5 \times 10^4$ already exceeds the allowed limit by legislation from the first day of the experiment. After 14 days of maturation, a possible action of the oil in delaying mold and yeast growth can be observed, as groups that received the essential oil had lower counts than the control group, although both groups did not meet the minimum required by legislation. This possible action of the oil can still be observed after 21 days of cheese maturation for the group that received EO7.2, which had lower mold and yeast counts than the other groups. The inhibitory effect of essential oils on molds and yeasts was also presented by Preis; Chagas; Rigo (2015), who evaluated the antimicrobial action of oregano oil in ricotta cheese. The oil was added before the cheese molding, and among the study's findings, samples supplemented with 0.010% oil showed better inhibition results against molds and yeasts compared to the control group.

Although the literature already evidences the action of essential oils as a bacterial agent, their efficacy against *E. coli* or Molds and Yeasts has only been demonstrated through direct application to the final product. Based on our findings, the antimicrobial action of the oils in colonial cheese produced from raw milk derived from cows that received essential oils orally had not yet been proven, making this an important finding of this study.

The sensory evaluation by *E-nose* did not detect menthol and eucalyptol compounds in either the milk or the Colonial Cheeses made from raw milk. This result is considered positive because the addition of eucalyptus and mint oils, which have strong aromas, did not interfere with the sensory characteristics. The odor and flavor of these compounds are not usually found in cheeses, and it is understood that for the general population, the sensations attributed to these compounds might not be accepted by consumers. The inclusion of this same menthol and eucalyptol oil has already been shown to be effective in reducing the respiratory rate of lactating Jersey cows (Melek, 2023). The fact that the use of the eucalyptus and menthol essential oil blend does not negatively affect cheese composition nor is detected in sensory analysis by *E-nose* makes it a strategy for use in animal production to mitigate heat stress in lactating cows without altering the milk and dairy products.

3.5 FINAL CONSIDERATIONS

The oral administration of different doses of essential oils of menthol and eucalyptol to lactating cows did not affect the synthesis of milk components and consequently the cheese produced from raw milk. The microbiological parameters suggest the effect of the oil on the count of *E. coli* and Molds and Yeasts, which until now, had not been proven through the administration of the product to the cows, making this an important finding of this study. Despite this, the microbiological requirements for these pathogens were not met. These results highlight the need for attention to these parameters in the production of colonial cheeses from raw milk. The informal sale of colonial cheeses suggests a risk to the population, and stricter inspections should be conducted. The fact that menthol and eucalyptol essential oil were not detected in the E-nose analysis and did not negatively affect the composition of the cheese indicates that their use to improve animal health is possible, providing an alternative to mitigate heat stress reactions in lactating cows.

REFERÊNCIAS

- ABD EL-HACK, M. E. et al. Peppermint essential oil and its nano-emulsion: Potential against aflatoxigenic fungus *Aspergillus flavus* in food and feed. **Toxicon**. 1 out. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2023.107309>
- ABIQ. Associação Brasileira das Indústrias de Queijo. **Mercado global de queijos bate recorde**. 2023. Disponível em: <https://www.abiq.com.br/>
- ACOSTA, A. C., SILVA, L. B. G. D., MEDEIROS, E. S., PINHEIRO-JÚNIOR, J. W., & MOTA, R. A. Mastites em ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 36(7), 565-573. 2016
- AHMED, L. I. et al. Potential application of ginger, clove and thyme essential oils to improve soft cheese microbial safety and sensory characteristics. **Food Bioscience**, v. 42, 1 ago. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101177>
- ALBENZIO, M. et al. Effect of stage of lactation on the immune competence of goat mammary gland. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 5, p. 3889–3895, 1 maio 2016. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10520>
- ALESC. Dispõe sobre a produção e comercialização de queijos artesanais de leite cru e adota outras providências. **Lei nº 17.486, de 16 de janeiro de 2018**. 2018.
- ALESC. Dispõe sobre os requisitos exigidos para elaboração do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Queijo Colonial Artesanal de Leite Cru e adota outras providências. **Lei nº 18.250, de 10 de novembro de 2021**. 2021.
- ALI, S. et al. Relationship between monounsaturated fatty acids and sarcopenia: a systematic review and meta-analysis of observational studies. **Aging Clinical and Experimental Research**. 1 set. 2023. 10.1007/s40520-023-02465-0
- AMAKURA, Y. et al. Constituents and their antioxidative effects in eucalyptus leaf extract used as a natural food additive. **Food Chemistry**, v. 77, p. 47–56, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00321-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00321-1)
- AMBROSINI, L. B. Historical origin and current context of production of traditional cheeses from Rio Grande do Sul: a terroir perspective analysis. **Revista Brasileira de Gastronomia**, v. 5, p. 1–20, 2022.
- ASENSIO, C. M.; GROSSO, N. R.; RODOLFO JULIANI, H. Quality preservation of organic cottage cheese using oregano essential oils. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 2, p. 664–671, 1 mar. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.10.054>
- AUSANI, T. DE C. et al. Microbiological quality of colonial cheese sold in Porto Alegre-RS. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 40, n. 2, p. 639–650, 1 mar. 2019. DOI: 10.5433/1679-0359.2019v40n2p639

BANJARA, N.; SUHR, M. J.; HALLEN-ADAMS, H. E. Diversity of Yeast and Mold Species from a Variety of Cheese Types. **Current Microbiology**, v. 70, n. 6, p. 792–800, 1 jun. 2015.

BARROS, É. A. Estudo de Lipoxigenases em extrato hidrossolúvel de soja (Glycine Max (L.) Merr.) submetido a diferentes tratamentos. Botucatu: Universidade Estadual Paulista. UNESP. 2012.

BENINCÁ, T. et al. Correlação entre dados microbiológicos e físico-químicos com as boas práticas de fabricação de queijos coloniais produzidos no Sul do Brasil. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 39, n. 3, p. 27176, 21 dez. 2022.
<http://dx.doi.org/10.35977/0104-1096.cct2022.v39.27176>

BISWAS, N. N.; SAHA, S.; ALI, M. K. Antioxidant, antimicrobial, cytotoxic and analgesic activities of ethanolic extract of *Mentha arvensis* L. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. 10, p. 792–797, 2014.
<https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014C1298>

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911–917, 1 ago. 1959.

BONINI, H. P.; MASSAROLO, K. C.; DE PAULA, L. P. Official and alternative methods for the determination of moisture and protein in cheese: a brief review. **Revista de Ciência de Alimentos e Gastronomia**, v. 2, n. 2, p. 20–34, 2024.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**, 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 30, de 07 de agosto de 2013. Revoga a Instrução Normativa nº 57. **Diário Oficial da União**. Brasília, 8 ago. 2013.

BRASIL. **Artigo 255 do Decreto nº 9.013 de 29 de março de 2017**. 2017. Disponível em: <https://www2.camara.leg.br/legin/fed/decret/2017/decreto-9013-29-marco-2017-784536-norma-actualizada-pe.pdf>

BRASIL. Estabelece o regulamento para fixar a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 2018.

BRASIL. Dispõe sobre a elaboração e a comercialização de queijos artesanais e dá outras providências. **Lei nº 13.860, de 18 de julho de 2019**, 2019.

BRASIL. INSTRUÇÃO NORMATIVA - IN Nº 161, DE 1º DE JULHO DE 2022. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA**, 2022.

BURT, S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. **International Journal of Food Microbiology**, 1 ago. 2004. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022

CHAVES, A. V. et al. Effects of cinnamaldehyde, garlic and juniper berry essential oils on rumen fermentation, blood metabolites, growth performance, and carcass characteristics of growing lambs. **Livestock Science**, v. 117, n. 2–3, p. 215–224, set. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2007.12.013>

CHIBANE, L. B. et al. Plant antimicrobial polyphenols as potential natural food preservatives. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 15 mar. 2019. DOI: 10.1002/jsfa.9357

CHRISTAKI, S. et al. Recent advances in plant essential oils and extracts: Delivery systems and potential uses as preservatives and antioxidants in cheese. **Food Science and Technology**. 1 out. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.07.029>

CIDASC- Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina.
Portaria nº32/2018, de 07 de novembro de 2018.

COELHO, K. O. et al. Efeito da contagem de células somáticas sobre o rendimento e a composição físico-química do queijo muçarela. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 4, p. 1260–1268, 2014. <https://doi.org/10.1590/1678-7616>

COELHO, K.O.; BRANDÃO, L.M.; BUENO, C.P.; MELO, C.S.; SILVEIRA NETO, O.J. Níveis de células somáticas sobre o perfil físico-químico do leite em pó integral. **Ciência Animal Brasileira**, v. 17, n. 4, p. 534-539, 2016.

COELHO, M. G. et al. Essential oil blend supplementation in the milk replacer of dairy calves: Performance and health. **PLoS ONE**, v. 18, n. 10 October, 1 out. 2023. DOI: 10.1371/journal.pone.0291038

COSTA, C. R. DE M., FEITOSA, M. L. T., PESSOA, G. T., BEZERRA, D. O., FERRAZ, M. S., & CARVALHO, M. A. M. Mastite caprina: etiologia e epidemiologia: revisão de literatura. **PUBVET**, 7, 619–706. 2013

COSTA EIFERT, E. et al. Perfil de ácidos graxos do leite de vacas alimentadas com óleo de soja e monensina no início da lactação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 1, p. 219–228, 2006.

COSTA, M. J. et al. Use of edible films and coatings in cheese preservation: Opportunities and challenges. **Food Research International**. 1 maio 2018. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.02.013

MEDEIROS CARVALHO, M. et al. Traditional Colonial-type cheese from the south of Brazil: A case to support the new Brazilian laws for artisanal cheese production from raw milk. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 11, p. 9711–9720, 1 nov. 2019. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16373>

DINIZ-SILVA, H. T. et al. Survival of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Escherichia coli* O157:H7 in Minas Frescal cheese made with oregano and rosemary essential oils. **Food Microbiology**, v. 86, 1 abr. 2020.

DORIGON, C.; RENK, A. Técnicas e Métodos Tradicionais de Processamento de Produtos Coloniais: de “miudezas de colonos pobres” aos mercados de qualidade diferenciada. **Revista de Economia Agrícola**, v. 58, n. 1, p. 101–113, 2011.

ED-DRA, A. et al. Comprehensive evaluation on the use of thymus vulgaris essential oil as natural additive against different serotypes of salmonella enterica. **Sustainability**, v. 13, n. 8, 2 abr. 2021. <https://doi.org/10.3390/su13084594>

EMBRAPA. Queijos artesanais: qualidade premiada aqui e no exterior. **Anuário do leite**. Embrapa, 2023.

FAO. Statistics Division -Food an Agriculture Organization of the United Nations. **Food and Agriculture**, 2022.

FARINA, P. et al. Andean plants essential oils: A scented alternative to synthetic insecticides for the control of blowflies. **Insects**, v. 12, n. 10, 1 out. 2021. <https://doi.org/10.3390/insects12100894>

FARROKH, C. et al. Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. **International Journal of Food Microbiology**. 2013. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.008

GHAZGHAZI, H. et al. Effects of Fruit Maturity Stages on GC-FID Fatty Acid Profiles, Phenolic Contents, and Biological Activities of *Eucalyptus marginata* L. **Journal of Food Quality**, v. 2021, 2021.

GHOSHAL, G.; SINGH, D. Synthesis and characterization of starch nanocellulosic films incorporated with *Eucalyptus globulus* leaf extract. **International Journal of Food Microbiology**, v. 332, 2 nov. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108765>

GOUVEA, F. DOS S.; ROSENTHAL, A.; FERREIRA, E. H. DA R. Extratos vegetais e óleos essenciais adicionados a queijos como antimicrobianos: Uma revisão. **Ciência Rural**. 2017. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20160908>

GOVARIS, A. et al. Antibacterial activity of oregano and thyme essential oils against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in feta cheese packaged under modified atmosphere. **LWT**, v. 44, n. 4, p. 1240–1244, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.09.022>

HANUS, O. et al. Role of fatty acids in milk fat and the influence of selected factors on their variability—a review. **Molecules**, 2018. <https://doi.org/10.3390/molecules23071636>

IANNI, A. et al. Chemical–nutritional quality and oxidative stability of milk and dairy products obtained from Friesian cows fed with a dietary supplementation of dried grape

pomace. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 7, p. 3635–3643, 1 maio 2019. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9584>

IBGE. Censo Agropecuário 2017. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, 2017.

IBGE. Rebanhos e valor dos principais produtos de origem animal foram recordes em 2022. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, 2023.

INTERNACIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. 2008. Cheese — Determination of fat content — Van Gulik method (ISO 3433:2008 | IDF 222:2008). ed. 2. Retrieved from: <https://www.iso.org/standard/46336.html>

INTERNACIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. 2004. Cheese and processed cheese — Determination of the total solids content (Reference method). (ISO 5534:2004 | IDF 4:2004) Ed. 2. Retrieved from: <https://www.iso.org/standard/35249.html>

INTERNACIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. 2014. Milk and milk products — Determination of nitrogen content. Part 1: Kjeldahl principle and crude protein calculation (ISO 8968-1:2014 | IDF 20-1:2014). Ed. 2. Retrieved from: <https://www.iso.org/standard/61020.html>

JEMAA, M. BEN et al. Nanoencapsulated Thymus capitatus essential oil as natural preservative. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 45, p. 92–97, 1 fev. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.08.017>

KAMIMURA, B. A. et al. Brazilian Artisanal Cheeses: An Overview of their Characteristics, Main Types and Regulatory Aspects. **Food Science and Food Safety**, 1 set. 2019. DOI: 10.1111/1541-4337.12486

KHATTAB, A. R. et al. Cheese ripening: A review on modern technologies towards flavor enhancement, process acceleration and improved quality assessment. **Food Science and Technology**. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.009>

KHORSHIDIAN, N. et al. Potential application of essential oils as antimicrobial preservatives in cheese. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. 1 fev. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.09.020>

KOKNUR, O.; BUYUKKILIÇ, S.; KONCA, Y. Effects of dietary essential oil and live yeast supplementation on dairy performance, milk quality and fatty acid composition of dairy cows. **Large Anima Review**, v. 28, p. 15–20, 2022.

KOLLING, G. J. et al. Performance and methane emissions in dairy cows fed oregano and green tea extracts as feed additives. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 5, p. 4221–4234, 1 maio 2018. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13841>

LEKKAS, C. et al. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in Galotyri cheese stored at 4 and 12°C. **Food Microbiology**, v. 23, n. 3, p. 268–276, maio 2006. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.03.008>

- LIMA, F. EMILIA LEITE et al. Fatty Acids And Cardiovascular Diseases: A Review. **Revista de Nutrição**, v. 13, n. 2, p. 73–80, 2000.
- LING, K. et al. Selenium supplementation of diets of dairy cows to produce Se-enriched cheese. **International Dairy Journal**, v. 71, p. 76–81, 1 ago. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.03.004>
- LOCK, A. L.; BAUMANN, D. E. Modifying Milk Fat Composition of Dairy Cows to Enhance Fatty Acids Beneficial to Human Health. **Lipids**, v. 39, 2004.
- LUCAS, S. D. M. et al. Padrão de Identidade e Qualidade de queijos colonial e prato, comercializados na cidade de Medianeira – PR. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, v. 67, p. 38–44, 2012. <https://doi.org/10.5935/2238-6416.20120034>
- MATTIELLO, C. A. et al. Industrial yield, manufacturing efficiency and physical and chemical characteristics of colonial cheese produced from milk with two levels of somatic cells. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 6, p. 1916–1924, 1 nov. 2018. 10.1590/1678-4162-9908
- MAZZOCCA, R. et al. Physicochemical and microbiological characterisation of a typical Italian raw ewe’s milk cheese: Pecorino bagnolese. **International Dairy Journal**, v. 157, 1 out. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2024.105998>
- MISHRA, A. P. et al. Combination of essential oils in dairy products: A review of their functions and potential benefits. **LWT- Food Science and Technology**, v. 133, 1 nov. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110116>
- MASSOTE, V. P., ZANATELI, B. M., ALVES, G. V., GONÇALVES, E. S., & GUEDES, E. Diagnóstico e controle de mastite bovina: uma revisão de literatura. **Revista Agroveterinária Do Sul de Minas**, 1(1), 41–54. 2019.
- MONTEIRO, R. P. et al. Queijo Minas Artesanal Valorizando a Agroindústria Família. 1. ed. Brasília: **Embrapa**, 2018.
- MOSHIDI, P. et al. 153. Effects of Eucalyptus globulus essential oils on in vitro rumen microbial fermentation and its potential to reduce methane emissions from dairy cows. **Animal - science proceedings**, v. 15, n. 1, p. 171–172, mar. 2024. DOI:10.1016/j.anscip.2024.02.154
- O’NEILL, L. M. et al. Comparison of effects of dietary olive oil, tallow and vitamin e on the quality of broiler meat and meat products. **British Poultry Science**, v. 39, n. 3, p. 365–371, 1998. 10.1080/00071669888917
- PAIANO, R. B. et al. In vitro effects of cinnamon, oregano, and thyme essential oils against Escherichia coli and Trueperella pyogenes isolated from dairy cows with clinical endometritis. **Theriogenology**, v. 196, p. 106–111, 15 jan. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.11.010>
- PERRY, K. S. P. Queijos: Aspectos Químicos, Bioquímicos E Microbiológicos. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 293–300, 2004.

PENNA, A. L. B.; GIGANTE, M. L.; TODOROV S. D. Artisanal Brazilian Cheeses—History, Marketing, Technological and Microbiological Aspects. **Foods**. 10 (7), 1562. 2021. <https://doi.org/10.3390/foods10071562>

POSSAS, A. et al. From Cheese-Making to Consumption: Exploring the Microbial Safety of Cheeses through Predictive Microbiology Models. 2021.

POSSENTI, C. G. R. Avaliação Da Ação Antioxidante Do Extrato De Mentha Arvensis L. Em Eritrócitos De Vacas Leiteiras Com Mastite. **Universidade de Cruz Alta**, 2014.

PREIS, C.; CHAGAS, T. E. R.; RIGO, E. Avaliação Da Ação Antimicrobiana De Óleo Essencial De Oregano (Origanum Vulgare) Em Ricotas Adicionadas De Especiarias. **Revista do Congresso Sul Brasileiro de Engenharia de Alimentos**, 2015.

PRETTO, Â. N.; SANT'ANNA, V. Queijo serrano: uma visão cultural, de qualidade e legal. **Vigilância Sanitária em Debate**, v. 5, n. 4, p. 81, 30 nov. 2017. 10.22239/2317-269x.00886

PRIYASHANTHA, H.; LUNDH, Å. Graduate Student Literature Review: Current understanding of the influence of on-farm factors on bovine raw milk and its suitability for cheesemaking. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 11, p. 12173–12183, 2021. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20146>

RESSUTTE, J. B. et al. Análise Microbiológica De Queijo Tipo Colonial Produzido A Partir De Leite Cru E Pasteurizado. **Ciência e Tecnologias de Alimentos**, p. 17, 2018.

REZA-YAZDI, K. et al. Effects of Specific Essential Oil Compounds on, Feed Intake, Milk Production, and Ruminant Environment in Dairy Cows during Heat Exposure. **International Journal of Biological, Veterinary, Agricultural and Food Engineering**, v. 8, 2014.

RIBEIRO, S. C. et al. Hematological responses of tambaqui *Colossoma macropomum* (Serrassalmidae) fed with diets supplemented with essential oil from mentha piperita (Lamiaceae) and challenged with *Aeromonas hydrophila*. **Acta Amazonica**, v. 46, n. 1, p. 99–106, 1 mar. 2016. <https://doi.org/10.1590/1809-4392201501284>

RONCATTI, R. Desenvolvimento e Caracterização do Queijo Santo Giorno, Típico Do Sudoeste do Paraná, produzido com leite cru e fermento endógeno. Pato Branco: **Universidade Tecnológica Federal Do Paraná**, 2016.

SANTO, A. D. et al. Avaliação da utilização de óleos essenciais de canela, orégano e eucalipto via água de bebida para frangos de corte. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 8, p. e11210817007, 7 jul. 2021.

SANTOS, R. D. et al. I Diretriz sobre o consumo de Gorduras e saúde Cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologias**, v. 100, p. 1–40, 2013.

SILVA, C. et al. PROPERTIES OF MENTHA PIPERITA: A BRIEF REVIEW. **World Journal of Pharmaceutical and medicinal research**, v. 3, p. 309–313, 2017.

SILVA, M. N. et al. Qualidade de queijos coloniais comercializados por feirantes. **Brazilian Journal of Food Research**, v. 11, n. 1, p. 135–146, 2020.

SINGH, R.; SHUSHNI, M. A. M.; BELKHEIR, A. Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 8, n. 3, p. 322–328, 1 maio 2015. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2011.01.019>

SIQUEIRA, K. B.; VIANA, C. C.; CHAVES, D. O. Evolução do consumo de queijos finos no Brasil. **Industria de Lactícios**, v. 149, p. 30–31, 2021.

STEINBACH, J. et al. Understanding consumer, consumption, and regional products: A case study on traditional colonial-type cheese from Brazil. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 26, 1 dez. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2021.100418>

STRÖHER, J. A.; SILVA, D. M. C.; NUNES, I. DOS S. Qualidade microbiológica do queijo artesanal colonial (QAC): impacto das boas práticas de fabricação (BPF)-uma revisão sistemática Microbiological quality of queijo artesanal colonial (qac): iMPact of good Manufacturing practices (gMp)-a systeMatic review. **Nutrivisa**, v. 10, 2023. <https://doi.org/10.18593/eba.28120>

TARIQ, S. et al. A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. **Microbial Pathogenesis**, v. 134, 1 set. 2019. [10.1016/j.micpath.2019.103580](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103580)

TATSUOKA, N. et al. Effects of the essential oil cyclodextrin complexes on ruminal methane production in vitro. **Animal Science Journal**, v. 79, n. 1, p. 68–75, fev. 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2007.00499.x>

TAVARES, A. B. et al. Artisanal cheese produced in the south of Rio Grande do Sul: Physical-chemical, microbiological assessment and susceptibility of antimicrobials from *Staphylococcus coagulase positive* isolates. **Ciência Animal Brasileira**, v. 20, 2019. <https://doi.org/10.1590/1089-6891v20e-47184>

TERRA, N. N.; CICHOSKI, A. J.; FREITAS, R. J. S. Valores de nitrito e TBARS durante o processamento e armazenamento da paleta suína curada, maturada e fermentada. **Ciência Rural**, v. 36, p. 965–970, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782006000300037>

THAKUR, S.; WALIA, B.; CHAUDHARY, G. *Mentha arvensis* (Pudina): A Review Based upon its Medicinal Properties. **Research Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 13, p. 143–148, 2021. [10.52711/0975-4385.2021.00024](https://doi.org/10.52711/0975-4385.2021.00024)

VAKILI, A. R. et al. The effects of thyme and cinnamon Essential oils on performance, rumen fermentation and blood metabolites in Holstein calves consuming high concentrate diet. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 26, n. 7, p. 935–944, jul. 2013. [10.5713/ajas.2012.12636](https://doi.org/10.5713/ajas.2012.12636)

VALENTE, G. L. C.; SILVA, L. D. C. Influência da mastite sobre a produção e a qualidade do leite cru. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 78, n. 1, p. 22–32, 15 mar. 2023. <https://doi.org/10.14295/2238-6416.v78i1.918>

VILLARRUEL- LÓPEZ, A. et al. Indicator microorganisms, Salmonella, Listeria monocytogenes, Staphylococcal enterotoxin, and physicochemical parameters in requeson cheese. **African Journal of Food Science**, v. 10, n. 9, p. 178–184, 30 set. 2016. 10.5897/AJFS2016.1473

VISENTAINER, J.; FRANCO, M. R. B. **Ácidos graxos em óleos e gorduras: identificação e quantificação**. 2. ed.

VITORINO, D. H. L. C. Eschechiria coli produtora da toxina shiga em bovinos: revisão. *Higiene Alimentar*, Londrina, v. 32, p. 57-61, 2018.

WOLF, I. V. et al. Study of the chemical composition, proteolysis, lipolysis and volatile compounds profile of commercial Reggianito Argentino cheese: Characterization of Reggianito Argentino cheese. **Food Research International**, v. 43, n. 4, p. 1204–1211, maio 2010. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.02.018>

ZHANG, R. et al. Oregano Essential Oils Promote Rumen Digestive Ability by Modulating Epithelial Development and Microbiota Composition in Beef Cattle. **Frontiers in Nutrition**, v. 8, 9 nov. 2021. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.722557>

ZHENG, X.; SHI, X.; WANG, B. A Review on the General Cheese Processing Technology, Flavor Biochemical Pathways and the Influence of Yeasts in Cheese. **Frontiers in Microbiology**. 29 jul. 2021. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.7032>

ZHOU, R. et al. Effects of oregano essential oil on the ruminal pH and microbial population of sheep. **PLoS ONE**, v. 14, n. 5, 1 maio 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217054>

ANEXO A – PERFIL DOS ÁCIDOS GRAXOS DO QUEIJO COLONIAL ARTESANAL

Variables	Treatments			P – values	
	Control	EO3.6	EO7.2	Trat	Trat × Day
C4:0 (Butyric) (%)				0,0058	<0,0001
d0	0,6232	0,6224	0,6513		
d3	0,6722	0,6426	0,6374		
d7	0,6364 ^B	0,6522 ^B	0,8200 ^A		
d14	0,6692	0,6831	0,6867		
d21	0,6687 ^A	0,6921 ^A	0,5999 ^B		
Average	0,6540	0,6585	0,6591		
C6:0 (Caproic) (%)				0,0179	0,0019
d0	0,9082	0,9606	1,0074		
d3	0,9741	0,9521	0,9733		
d7	0,9533 ^B	1,0076 ^{AB}	1,1322 ^A		
d14	0,9771	1,0266	0,9868		
d21	0,9656	1,0178	0,9016		
Average	0,9557	0,9930	0,8336		
C8:0 (Caprylic) (%)				0,0001	0,0281
d0	0,8124 ^B	0,8835 ^{AB}	0,9305 ^A		
d3	0,8862	0,8938	0,9199		
d7	0,8662 ^B	0,9304 ^{AB}	0,9727 ^A		
d14	0,8596	0,9271	0,9261		
d21	0,8566	0,9309	0,8479		
Average	0,7135	0,9132	0,9194		
C10:0 (Capric) (%)				<0,0001	0,0702
d0	2,4449	2,6624	2,8297		
d3	2,6241	2,7341	2,8442		
d7	2,5766	2,7144	2,9282		
d14	2,5293	2,7656	2,8382		
d21	2,5525	2,7691	2,7564		
Average	2,5455 ^C	2,7292 ^B	2,8394 ^A		
C11:0 (Undecanoic) (%)				<0,0001	0,3099
d0	0,2328	0,2676	0,2696		
d3	0,2416	0,2669	0,2736		
d7	0,2384	0,2702	0,2800		
d14	0,2464	0,2844	0,2791		
d21	0,2500	0,2812	0,2632		
Average	0,2419 ^B	0,2741 ^A	0,2731 ^A		
C12:0 (Lauric) (%)				<0,0001	0,1362
d0	3,3458	3,7281	3,8237		
d3	3,4748	3,7630	3,8450		
d7	3,4303	3,7471	3,86334		
d14	3,4295	3,7302	3,7720		
d21	3,4048	3,7946	3,7309		
Average	3,4171 ^C	3,7527 ^B	3,8070 ^A		

Continua...

Variables	Treatments			P – values	
	Control	EO3.6	EO7.2	Trat	Trat × Day
C13:0 (Tridecanoic) (%)				<0,0001	0,0008
d0	0,1606 ^B	0,1650 ^B	0,1898 ^A		
d3	0,1551 ^B	0,1624 ^B	0,1951 ^A		
d7	0,1549 ^B	0,1646 ^B	0,1983 ^A		
d14	0,1592 ^B	0,1586 ^B	0,1915 ^A		
d21	0,1587	0,1677	0,1734		
Average	0,1577	0,1637	0,1897		
C14:0 (Myristic) (%)				<0,0001	0,1258
d0	11,9718	12,5645	12,7989		
d3	12,2800	12,6280	12,7037		
d7	12,1630	12,5581	12,4735		
d14	12,1253	12,4856	12,5057		
d21	12,1517	12,5645	12,6599		
Average	12,1384 ^B	12,5602 ^A	12,6284 ^A		
C14:1 (Myristoleic) (%)				<0,0001	0,2568
d0	0,6786	0,7574	0,6289		
d3	0,6942	0,7447	0,6255		
d7	0,6796	0,7670	0,6508		
d14	0,7121	0,7608	0,6317		
d21	0,6971	0,7677	0,6119		
Average	0,6924 ^B	0,7596 ^A	0,6298 ^C		
C15:0 (Pentadecanoic) (%)				<0,0001	0,0434
d0	1,1858 ^B	1,0918 ^C	1,3244 ^A		
d3	1,1581 ^B	1,1337 ^B	1,3178 ^A		
d7	1,1604 ^B	1,1078 ^B	1,3086 ^A		
d14	1,1721 ^B	1,1138 ^B	1,3097 ^A		
d21	1,1946 ^B	1,1093 ^C	1,2700 ^A		
Average	1,1742	1,1113	1,3062		
C16:0 (Palmitic) (%)				<0,0001	0,1319
d0	37,2926	38,7326	40,7361		
d3	37,3026	38,8611	40,8623		
d7	37,0301	38,8075	40,5934		
d14	37,2716	38,7381	40,6338		
d21	37,3317	38,5567	41,2632		
Average	37,2458 ^C	38,7393 ^B	40,8178 ^A		
C16:1 (Palmitoleic) (%)				0,0042	0,6043
d0	1,2313	1,1493	1,1977		
d3	1,2343	1,2079	1,1978		
d7	1,2332	1,1975	1,2019		
d14	1,2301	1,1978	1,1727		
d21	1,2463	1,1311	1,1730		
Average	1,2351 ^A	1,1768 ^B	1,1887 ^B		
Continua...					

Variables	Treatments			P – values	
	Control	EO3.6	EO7.2	Trat	Trat × Day
C17:0 (Heptadecanoic) (%)				<0,0001	0,9732
d0	0,4952	0,4229	0,4238		
d3	0,5005	0,4230	0,4278		
d7	0,4969	0,4292	0,4183		
d14	0,4816	0,4267	0,4353		
d21	0,4887	0,4114	0,4162		
Average	0,4926 ^A	0,4227 ^B	0,4243 ^B		
C17:1 (cis-10-Heptadecenoic) (%)				<0,0001	0,0215
d0	0,1566	0,1384	0,1393		
d3	0,1601	0,1388	0,1340		
d7	0,1623	0,1336	0,1383		
d14	0,1565	0,1325	0,1374		
d21	0,1584	0,1354	0,1373		
Average	0,1588	0,1358	0,1373		
C18:0 (Stearic) (%)				<0,0001	0,0040
d0	13,0336 ^A	12,0140 ^B	11,6152 ^C		
d3	13,1415 ^A	12,0536 ^B	11,5928 ^C		
d7	13,0833 ^A	12,0450 ^B	11,4620 ^C		
d14	12,8661 ^A	12,0011 ^B	11,7533 ^B		
d21	12,8410 ^A	11,9814 ^B	11,8146 ^B		
Average	12,9932	12,0191	11,6476		
C18:1n9t (Elaidic) (%)				<0,0001	0,3346
d0	1,8223	1,6322	1,3009		
d3	1,7547	1,7073	1,2297		
d7	1,9055	1,6272	1,3802		
d14	1,9178	1,6886	1,4514		
d21	1,9093	1,7182	1,1963		
Average	1,8620 ^A	1,6747 ^B	1,3117 ^C		
C18:1n9c (Oleic) (%)				<0,0001	0,7261
d0	19,3450	18,0316	16,1324		
d3	18,8585	17,6344	16,2520		
d7	19,3533	17,7808	16,2537		
d14	19,2609	17,7887	16,3245		
d21	19,1817	17,9716	16,2252		
Average	19,1999 ^A	14,8679 ^C	16,2376 ^B		
C18:2n6c (Linoleic) (%)				0,0008	0,3106
d0	3,0058	3,0163	2,8893		
d3	2,6603	2,8918	2,8689		
d7	2,6481	2,9105	2,8107		
d14	2,6464	2,9414	2,8605		
d21	2,6957	2,8741	2,8755		
Average	2,7313 ^B	2,9269 ^A	2,8610 ^A		
Continua...					

Variables	Treatments			P – values	
	Control	EO3.6	EO7.2	Trat	Trat × Day
C20:0 (Arachidic) (%)				<0,0001	0,4427
d0	0,1807	0,1609	0,1569		
d3	0,1802	0,1593	0,1631		
d7	0,1765	0,1612	0,1543		
d14	0,1783	0,1600	0,1602		
d21	0,1823	0,1592	0,1595		
Average	0,1797 ^A	0,1602 ^B	0,1588 ^B		
C18:3n6 (?-Linolenic) (%)				0,0018	0,3296
d0	0,0223	0,0307	0,0293		
d3	0,0239	0,0289	0,0292		
d7	0,0240	0,0321	0,0253		
d14	0,0271	0,0302	0,0289		
d21	0,0228	0,0260	0,0276		
Average	0,0240 ^B	0,0296 ^A	0,0281 ^A		
C20:1n9 (cis-11-Eicosenoic) (%)				0,0012	0,0035
d0	0,0559 ^A	0,0483 ^B	0,0474 ^{AB}		
d3	0,0513	0,0475	0,0457		
d7	0,0543	0,0466	0,0428		
d14	0,0577	0,0474	0,0470		
d21	0,0535	0,0451	0,0485		
Average	0,0546	0,0470	0,0463		
C18:3n3 (α-Linolenic) (%)				0,0599	0,6024
d0	0,3030	0,2921	0,2855		
d3	0,2823	0,2844	0,2777		
d7	0,2807	0,2847	0,2804		
d14	0,2904	0,2845	0,2772		
d21	0,2782	0,2755	0,2744		
Average	0,2870	0,2843	0,2791		
C21:0 (Henicosanoic) (%)				<0,0001	0,0108
d0	0,4012 ^A	0,3643 ^B	0,3041 ^C		
d3	0,3933 ^A	0,3573 ^B	0,2983 ^C		
d7	0,3938 ^A	0,3598 ^B	0,3200 ^C		
d14	0,4222 ^A	0,3585 ^B	0,2973 ^C		
d21	0,3986 ^A	0,3522 ^B	0,2928 ^C		
Average	0,4019	0,3585	0,3025		
C20:2 (cis-11,14-Eicosadienoic) (%)				<0,0001	0,0088
d0	0,0233	0,0210	0,0209		
d3	0,0235	0,0216	0,0226		
d7	0,0222	0,0189	0,0230		
d14	0,0318 ^A	0,0206 ^B	0,0226 ^{AB}		
d21	0,0409 ^A	0,0205 ^B	0,0209 ^B		
Average	0,0284	0,0206	0,0220		

Continua...

Variables	Treatments			P – values	
	Control	EO3.6	EO7.2	Trat	Trat × Day
C22:0 (Behenic) (%)				<0,0001	0,3058
d0	0,0725	0,0571	0,0709		
d3	0,0740	0,0700	0,0707		
d7	0,0757	0,0631	0,0734		
d14	0,0808	0,0652	0,0725		
d21	0,0760	0,0585	0,0688		
Average	0,0758 ^A	0,0628 ^B	0,0713 ^A		
C20:3n6 (cis-8,11,14-Eicosatrienoic) (%)				<0,0001	0,1294
d0	0,0852	0,0826	0,0947		
d3	0,0859	0,0862	0,0945		
d7	0,0865	0,0824	0,0986		
d14	0,0877	0,0841	0,0982		
d21	0,0852	0,0850	0,0955		
Average	0,0862 ^B	0,0841 ^C	0,0964 ^A		
C20:4n6 (Arachidonic) (%)				<0,0001	0,3476
d0	0,0316	0,0278	0,0278		
d3	0,0320	0,0287	0,0259		
d7	0,0306	0,0284	0,0249		
d14	0,0313	0,0273	0,0272		
d21	0,0311	0,0272	0,0271		
Average	0,0314 ^A	0,0279 ^B	0,0267 ^B		
C22:2 (cis-13,16-Docosadienoic) (%)				0,0002	0,4755
d0	0,0097	0,0093	0,0080		
d3	0,0098	0,0095	0,0076		
d7	0,0106	0,0087	0,0087		
d14	0,0115	0,0084	0,0082		
d21	0,0113	0,0085	0,0078		
Average	0,0106 ^A	0,0089 ^B	0,0081 ^B		
C24:0 (Lignoceric) (%)				<0,0001	0,1903
d0	0,0405	0,0332	0,0357		
d3	0,0421	0,0353	0,0358		
d7	0,0426	0,0320	0,0353		
d14	0,0434	0,0337	0,0346		
d21	0,0413	0,0354	0,0365		
Average	0,0420 ^A	0,0340 ^C	0,0353 ^B		
C20:5n3 (cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic) (%)				0,0006	0,5315
d0	0,0193	0,0252	0,0230		
d3	0,0223	0,0267	0,0226		
d7	0,0237	0,0247	0,0222		
d14	0,0201	0,0233	0,0214		
d21	0,0188	0,0254	0,0202		
Average	0,0208 ^B	0,0251 ^A	0,0219 ^B		
Continua...					

Variables	Treatments			P – values	
	Control	EO3.6	EO7.2	Trat	Trat × Day
C24:1n9 (Nervonic) (%)				0,0001	0,1051
d0	0,0046	0,0046	0,0047		
d3	0,0046	0,0033	0,0036		
d7	0,0050	0,0029	0,0038		
d14	0,0051	0,0039	0,0040		
d21	0,0046	0,0040	0,0039		
Average	0,0048 ^A	0,0037 ^B	0,0040 ^B		
C22:6n3 (cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic) (%)				0,8521	0,6548
d0	0,0020	0,0010	0,0010		
d3	0,0008	0,0006	0,0012		
d7	0,0008	0,0026	0,0006		
d14	0,0006	0,0008	0,0011		
d21	0,0009	0,0012	0,0012		
Average	0,0010	0,0012	0,0010		
Σ Saturated fatty acids (SFA) (%)				<0,0001	0,9680
d0	73,2026	74,7316	77,1686		
d3	74,1009	75,1370	77,1609		
d7	73,4789	75,0509	77,0334		
d14	73,5122	74,9590	76,8854		
d21	73,5636	74,8828	77,2530		
Average	73,5717 ^C	74,9522 ^B	77,1003 ^A		
Σ Unsaturated fatty acids (UFA) (%)				<0,0001	0,7159
d0	26,7974	25,2684	22,8314		
d3	25,8991	24,8630	22,8391		
d7	26,5211	24,9491	22,9666		
d14	26,4878	25,0410	23,1146		
d21	26,4364	25,1172	22,7470		
Average	26,4283 ^A	25,0478 ^B	22,8997 ^C		
Σ Monounsaturated fatty acids (MUFA) (%)				<0,0001	0,5848
d0	23,2947	21,7621	19,4515		
d3	22,7580	21,4843	19,4885		
d7	23,3936	21,5559	19,6717		
d14	23,3405	21,6200	19,7690		
d21	23,2512	21,7734	19,3964		
Average	23,2076 ^A	21,6391 ^B	19,5554 ^C		
Σ Polyunsaturated fatty acids (PUFA) (%)				<0,0001	0,0059
d0	3,2289 ^C	3,5063 ^B	3,3799 ^A		
d3	3,1412 ^B	3,3788 ^A	3,3505 ^A		
d7	3,1275 ^C	3,3933 ^A	3,2948 ^B		
d14	3,1473 ^B	3,4210 ^A	3,3456 ^A		
d21	3,1852 ^B	3,3438 ^A	3,3506 ^A		
Average	3,1590	3,4086	3,3443		
Continua...					

Variables	Treatments			P – values	
	Control	EO3.6	EO7.2	Trat	Trat × Day
UFA/SFA				<0,0001	0,7283
d0	0,3662	0,3381	0,2959		
d3	0,3495	0,3309	0,2960		
d7	0,3610	0,3324	0,2981		
d14	0,3603	0,3341	0,3006		
d21	0,3594	0,3354	0,2944		
Average	0,3593 ^A	0,3342 ^B	0,2970 ^C		
Σ ω6 (%)				<0,0001	0,0003
d0	3,1451	3,1575	3,0414		
d3	2,8024 ^B	3,0357 ^A	3,0187 ^A		
d7	2,7894	3,0535	2,9598		
d14	2,7927	3,0832	3,0150		
d21	2,8350 ^B	3,0125 ^A	3,0259 ^A		
Average	2,8729	3,0685	3,0122		
Σ ω3				0,1186	0,9987
d0	0,3244	0,3184	0,3096		
d3	0,3054	0,3118	0,3015		
d7	0,3052	0,3121	0,3032		
d14	0,3111	0,3087	0,2998		
d21	0,2980	0,3022	0,2958		
Average	0,3088	0,3106	0,3020		
ω6/ω3 (%)				<0,0001	0,3126
d0	9,6879	9,9173	9,8261		
d3	9,1770	9,7356	10,0170		
d7	9,1384	9,7855	9,7609		
d14	9,0044	9,9883	10,0570		
d21	9,5145	9,9705	10,2284		
Average	9,3045 ^B	9,8794 ^A	9,9779 ^A		

Different letters in the same row indicate a significant difference (P<0.05).

ANEXO B – COMPROVANTE DO CEUA (CERTIFICADO)



UDESC
UNIVERSIDADE
DO ESTADO DE
SANTA CATARINA

LAGES
CENTRO DE CIÊNCIAS
AGROVETERINÁRIAS

Universidade do Estado de Santa Catarina

*Comissão de Ética no
Uso de Animais*

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Predição e monitoramento da composição e qualidade do leite, com validação de análises em tempo real, e avaliação dos aspectos tecnológicos de derivados lácteos em Santa Catarina.", protocolada sob o CEUA nº 5448251022 (ID 001639), sob a responsabilidade de **Ana Luiza Bachmann Schogor** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Estado de Santa Catarina (CEUA/UDESC) na reunião de 28/10/2022.

We certify that the proposal "Prediction and monitoring of milk composition and quality, with validation of real time analysis, and evaluation of technological aspects of dairy products in Santa Catarina", utilizing 40 Bovines (40 females), protocol number CEUA 5448251022 (ID 001639), under the responsibility of **Ana Luiza Bachmann Schogor** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the University of Santa Catarina State (CEUA/UDESC) in the meeting of 10/28/2022.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 01/2022 a 09/2024 Área: Zootecnia

Origem: Animais provenientes de estabelecimentos comerciais

Espécie: Bovinos sexo: Fêmeas

Linhagem: Holandês, Jersey

Idade: 2 a 10 anos N: 40

Peso: 350 a 700 kg

Lages, 11 de setembro de 2023

José Cristani
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade do Estado de Santa Catarina

Pedro Volkmer de Castilhos
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade do Estado de Santa Catarina



ANEXO C – COMPROVANTE DO CEUA (CERTIFICADO/EMENDA)



UDESC
UNIVERSIDADE
DO ESTADO DE
SANTA CATARINA

LAGES
CENTRO DE CIÊNCIAS
AGROVETERINÁRIAS

Universidade do Estado de Santa Catarina

*Comissão de Ética no
Uso de Animais*

CERTIFICADO : EMENDA v20/02/2023

Certificamos que a EMENDA (versão de 20/02/2023) da proposta intitulada "Predição e monitoramento da composição e qualidade do leite, com validação de análises em tempo real, e avaliação dos aspectos tecnológicos de derivados lácteos em Santa Catarina. ", CEUA nº 5448251022 (ID 060362), sob a responsabilidade de **Ana Luíza Bachmann Schogor** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos vigentes para sua apresentação, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), sendo assim **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Estado de Santa Catarina (CEUA/UDESC) em 24/02/2023.

Término previsto: 09/2024

Origem: Animais provenientes de estabelecimentos comerciais

Espécie: Bovinos	sexo: Fêmeas	idade: 2 a 10 anos	Quantidade e mantida: 40
Linhagem: Holandês, Jersey		Peso: 350 a 700 kg	

ANIMAIS UTILIZADOS

Bovinos

Fêmeas

Quantidade
Aprovada
80

Quantidade
Utilizada
0

Lages, 24 de fevereiro de 2023

José Cristani



José Cristani
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade do Estado de Santa Catarina

Pedro Volkmer de Castilhos
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade do Estado de Santa Catarina

