

INFLUÊNCIA DO RESFRIAMENTO MARGINAL SOBRE A MULTIPLICAÇÃO DE MICRORGANISMOS PSICOTRÓFICOS E O METABOLISMO ACIDIFICANTE DA MICROBIOTA LÁCTEA

Influence of marginal cooling on the psychrotrophic growth and acidifying metabolism of milk microbiota

Thiago B. Izidoro¹
Thiago L. B. Spina²
Stevo O. Tuasek³
Juliano G. Pereira⁴
Vera R. M. Barros⁵
José P. A. N. Pinto⁶

SUMÁRIO

O Brasil é o sexto maior produtor mundial de leite, atingindo 27 bilhões de litros anuais, mas a produtividade é uma das menores do mundo. Visando obter um produto de melhor qualidade, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento publicou, em 2002, a Instrução Normativa nº51, que estabeleceu a refrigeração do leite a 4°C, logo após a ordenha e sua entrega (a granel) aos laticínios dentro de 48 horas. O resfriamento associado à falta de higiene na obtenção colocou em evidência um grupo de microrganismos com alto potencial deteriorativo: os psicotróficos. O resfriamento é uma importante ferramenta tecnológica de conservação para preservar a qualidade inicial do produto, mas deve ser feito de maneira correta, pois temperaturas de resfriamento marginal, ou seja, acima de 7°C, favorecem não apenas um maior número de gêneros psicotróficos, como também uma microbiota de características mistas (mesófilas/psicotróficas), com intensa atividade metabólica lipo-proteolítica quanto acidificante, diminuindo a qualidade do leite e seus derivados. Com base nas informações expostas, o trabalho em questão visa determinar como o emprego do resfriamento marginal influencia a multiplicação bacteriana psicotrófica, e, além disso, quantificar a expressão da atividade metabólica acidificante, de uma microbiota de características mistas, que acaba modificando alguns parâmetros físico-químicos do leite, e por consequência a perda de características sensoriais gerais do produto. Os resultados indicaram que apenas o resfriamento a 4°C mostrou-se viável, como fator inibitório das atividades metabólicas de bactérias acidificantes. O trabalho ainda sugere maior rigorosidade no cumprimento das medidas higiênicas, como o modo mais eficiente de atingir os parâmetros microbiológicos e físico-químicos estabelecidos na legislação, pois além da temperatura de incubação, a contagem inicial bacteriana foi igualmente relevante para a manutenção das características sensoriais do leite.

Termos para indexação: psicotróficos; resfriamento marginal; leite; acidez; crioscopia.

- 1 Médico Veterinário. Doutorando na área de Saúde Animal, Saúde Pública Veterinária e Segurança Alimentar – UNESP – Campus de Botucatu. Caixa Postal 572. CEP 18-618-000, Botucatu, São Paulo. E-mail: tizidoro@veterinaria.com.br
- 2 Aluno de graduação em Medicina Veterinária – UNESP – Campus de Botucatu. Caixa Postal 572. CEP 18-618-000, Botucatu, São Paulo. E-mail: thiagospina@uol.com.br
- 3 Médico Veterinário formado pela UNESP – Campus de Botucatu. Caixa Postal 572. CEP 18-618-000, Botucatu, São Paulo. E-mail: stevo.okuma@farmabase.com.br
- 4 Médico Veterinário. Residente na área de Inspeção de Alimentos de Origem Animal – UNESP – Campus de Botucatu. Caixa Postal 572. CEP 18-618-000, Botucatu, São Paulo. E-mail: julianopereira@veterinaria.com.br
- 5 Médica Veterinária. Serviço de Inspeção Federal. Caixa Postal 572. CEP 18-618-000, Botucatu, São Paulo. E-mail: verarmbarros@uol.com.br
- 6 Médico Veterinário. Professor Assistente Doutor na área de Inspeção de Alimentos de Origem Animal – UNESP – Campus de Botucatu. Caixa Postal 572. CEP 18-618-000, Botucatu, São Paulo. E-mail: josepaes@fmvz.unesp.br

1 INTRODUÇÃO

A indústria laticinista brasileira é um importante gerador de recursos, o país produz 27 bilhões de litros anuais, sendo o 6º maior produtor mundial (ALVIM, 2007). Tais números podem induzir a conclusões equivocadas, pois o fato é que o Brasil possui um grande potencial de melhoria de sua produção leiteira, já que sua produtividade é baixíssima, algo em torno de 1730 quilos/vaca/ano, um dos menores índices do mundo (USDA, 2008). Visando obter um produto de melhor qualidade, capaz de competir no mercado de países emergentes, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) publicou, em 2002, a Instrução Normativa nº51 (IN-51) (BRASIL, 2002), que estabeleceu a refrigeração obrigatória do leite a 4°C, logo após a ordenha e sua entrega (a granel) aos laticínios dentro de 48 horas. Além disso, instituiu novos parâmetros físico-químicos e delineou as medidas higiênicas necessárias para a obtenção de um produto final de boa qualidade.

Ressalta-se que embora o resfriamento do leite, ainda na propriedade, seja uma medida válida para reduzir a multiplicação de microrganismos, ela não pode ser encarada como uma solução para o problema, pois quando empregada sem o subsídio de técnicas apropriadas de higiene, possibilita a emergência de um grupo de microrganismos, altamente deteriorantes: os psicrotóxicos (MABBITT, 1980; FAIRBAIRN & LAW, 1986), descritos como aqueles capazes de se multiplicar rapidamente em baixas temperaturas, embora seu ótimo metabólico esteja situado em faixas mais elevadas (COUSIN, 1981).

Porém, a definição exata de psicrotóxicos ainda é um ponto de divergência entre os pesquisadores. Não há consenso a respeito de qual seria a faixa de temperatura mais característica à multiplicação psicrotóxica, tampouco está plenamente definida qual seria a taxa, ou velocidade mínima dessa multiplicação para que uma bactéria possa ser inserida neste grupo (CHAMPAGNE et al., 1994; SØRHAUG & STEPANIAK, 1997; SANTANA, 2001; LORENZETTI et al., 2006).

Os psicrotóxicos não constituem um grupo taxonômico específico de microrganismos, pois estão distribuídos em aproximadamente 15 gêneros distintos (SUHREN, 1989). Apresentam comportamento psicrotóxico tanto bactérias Gram-negativas, destacando-se as do gênero *Pseudomonas*, quanto Gram-positivas como as do gênero *Bacillus*. Em comum, esses microrganismos, em temperaturas inferiores a 10°C, têm sua multiplicação favorecida, pelo incremento de atividades metabólicas predominantemente lipo-proteolíticas (PETERSON & GUNDERSON, 1960; CRAVEN & MACAULEY, 1993), expressando-se pela produção de enzimas intra e (principalmente) extracelulares, muitas das quais termoresistentes, resultando em uma dificuldade para

a manutenção do *flavour* e da qualidade geral do leite durante sua estocagem (CELESTINO et al., 1996; CHEN et al., 2003).

Embora seja uma ferramenta tecnológica de conservação importante para preservar a qualidade inicial do produto (DÜRR, 1975), o resfriamento deve ser empregado de maneira correta, evitando a multiplicação de psicrotóxicos, e também de microrganismos mesófilos/acidificantes. Temperaturas de resfriamento marginal, ou seja, acima de 7°C (JAY, 2005), favorecem não apenas um maior número de gêneros psicrotóxicos, como também uma microbiota de características mistas (mesófilas/psicrotóxicas), com intensa atividade metabólica tanto lipo-proteolítica quanto acidificante, diminuindo a qualidade do leite e seus derivados (IZIDORO, 2008). É muito claro que a falta, ou ausência, de higiene na cadeia primária resulta em um leite com altas contagens bacterianas iniciais, enquanto a refrigeração inadequada favorece a multiplicação desses microrganismos, com destaque para os mesófilos aeróbios, que apesar de apresentarem temperatura ótima de multiplicação entre 25°C e 40°C, podem se multiplicar em temperaturas mais baixas, justamente as que contemplam o resfriamento marginal (JAY, 2005).

Os mesófilos são capazes de iniciar um processo de deterioração do leite seja pela fermentação da lactose, processo resultante do metabolismo de bactérias lácticas, como *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Lactobacillus*, ou então pelo aproveitamento da glicose recém-formada, processo este, realizado por uma ampla gama de bactérias, especialmente as pertencentes à família Enterobacteriaceae, (JAY, 2005). Estes processos provocam aumento da acidez, pois têm como etapa final a produção de ácido láctico (BRAVERMAN, 1980). Desta forma, a acidez do produto resultaria de um sinergismo entre as bactérias naturalmente presentes no leite e bactérias contaminantes. Além de prejudicar a qualidade do leite e derivados, a acidez elevada altera propriedades coligativas, como o índice crioscópico. Quanto maior a acidez do leite, menor será seu ponto de congelamento (MITCHELL, 1989; PRATA, 2001).

A contaminação do leite pode ter várias fontes, de modo geral, o próprio ambiente da sala de ordenha, e mais especificamente a superfície do teto e equipamentos (ordenhadeiras, tubulações, tanques, por exemplo). Águas residuais, provenientes da higienização do tanque de resfriamento ou do caminhão-tanque, também podem contribuir significativamente com altas contagens bacterianas (SLAGHUIS, 1996). Essas informações, de forma alguma invalidam, mas sim, ampliam o conceito de "higiene na obtenção", quando o ideal, seria de fato, "higiene no processamento" do leite.

Quaisquer que sejam os números e os tipos de tratamento empregados no leite, um produto de qualidade só será obtido, se as normas de higiene

forem estritamente seguidas durante toda cadeia produtiva (SORHAUG & STEPANIAK, 1997).

Tendo em vista os assuntos expostos, o trabalho em questão visa determinar como o emprego do resfriamento marginal influencia a multiplicação bacteriana psicrotrófica, bem como quantificar a expressão da atividade metabólica acidificante de uma microbiota de características mistas, referentes à degradação dos carboidratos do leite que resultam na elevação da acidez e alteração do índice crioscópico, e por consequência a perda de características sensoriais gerais do produto.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento avaliou 30 amostras de leite, colhidas semanalmente, em uma propriedade situada no município de Botucatu - SP. As coletas foram realizadas no período vespertino, tendo havido a preocupação de que o leite a ser avaliado fosse, invariavelmente, recém-ordenhado.

As amostras foram colhidas diretamente do tanque de resfriamento da propriedade para 3 frascos estéreis (600 mL), acondicionados em caixas isotérmicas e imediatamente transportadas ao laboratório de pesquisas da disciplina de Inspeção Sanitária de Alimentos de Origem Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Campus de Botucatu.

No fluxo laminar eram retiradas alíquotas para que as análises físico-químicas pudessem ser realizadas concomitantemente à microbiológica e para que cada um dos 3 frascos pudesse ser incubado, rapidamente, em 3 diferentes estufas B.O.D. (*Biochemistry Oxygen Demand*) ajustadas para as temperaturas de 4°C, 8°C e 12°C. Definiu-se como M0, o momento em que as primeiras análises microbiológicas e físico-químicas foram efetuadas. Todas as provas foram repetidas, para cada uma das temperaturas de estocagem já citadas, 12, 24, 48 horas, após M0, e estes momentos de análise foram denominados, respectivamente, M12, M24, M48.

2.1 Análise microbiológica

2.1.1 Contagem total de microrganismos psicrotróficos

Primeiramente, o leite era homogeneizado e a seguir preparavam-se as diluições seriadas empregando-se solução de NaCl 0,85%. Então, 0,1 mL de cada diluição era semeado em duplicata em placas de *Petri* contendo ágar padrão para contagem (DIFCO®) pelo método de semeadura em superfície, sendo as mesmas incubadas a 21°C por 25 horas (OLIVEIRA & PARMELEE, 1976). O resultado final foi expresso em log de UFC.mL⁻¹.

2.2 Análises físico-químicas

2.2.1 Determinação da acidez titulável

Um total de 10 mL da amostra era transferido para um béquer e a seguir adicionavam-se 3-5 gotas de fenolftaleína. Iniciava-se então, a titulação com NaOH N/9, pelo acidímetro de *Dornic*. A leve tonalidade rosa indicava o ponto de viragem da reação. O valor, expresso em graus *Dornic* (°D), era lido pela própria graduação do acidímetro (BRASIL, 2003).

2.2.2 Determinação do índice crioscópico

Em tubos próprios para a análise (volume 7 mL), 3 mL de leite eram pipetados para aferição do ponto de congelamento em crioscópio eletrônico (ITR-MK 540), sendo os valores expressos em graus *Hortvet* (°H) (BRASIL, 2003).

2.3 Análise estatística

Utilizou-se a técnica da análise de variância para o modelo com dois fatores, complementar ao teste de comparação de múltiplos de *Tukey* ($p < 0,05$) (ZAR, 1999).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como se pode observar na figura 1, a microbiota psicrotrófica se multiplicou de forma esperada, ou seja, quanto maior a temperatura, maior a contagem obtida. Da mesma forma, as contagens aferidas nos maiores tempos de estocagem foram mais elevadas, pois, espera-se que em 48 horas de incubação (M48) um número maior de bactérias esteja adaptado às condições de resfriamento do que em 24 horas ou 12 horas.

As contagens iniciais de microrganismos psicrotróficos (M0), registraram média de $3,8 \pm 1,4$ log UFC.mL⁻¹. Pode-se afirmar que se trata de um leite com boa qualidade microbiológica para os padrões brasileiros. Souto et al. (2006) em condições similares descreveram a média de 6,9 log UFC.mL⁻¹

Quanto aos resultados finais (M48), acreditamos que o leite incubado experimentalmente a 4°C por 48 horas, em princípio, espelhe o produto entregue ao laticínio, de acordo com as normas da IN-51. Em nossos dados, para os leites incubados neste binômio tempo/temperatura (4°C / 48 horas) obteve-se a média de 5,5 log UFC.mL⁻¹. Em leites incubados nas mesmas condições, Lavor et al. (2006) relataram média bem superior (7,1 log UFC.mL⁻¹), diferentemente de Fujisawa et al. (2009) que reportam média próxima de 5,3 log UFC.mL⁻¹ e Villar et al. (1996), que encontraram média de 4,3 log UFC.mL⁻¹.

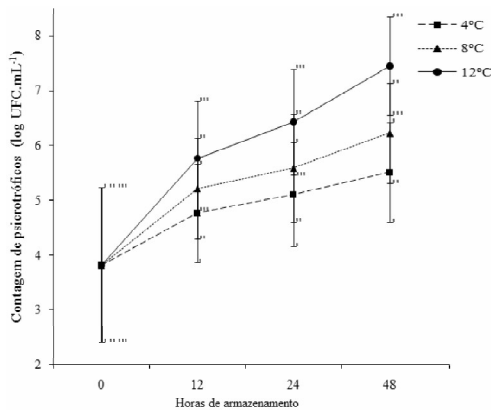


Figura 1 – Evolução da população média de microrganismos psicrotróficos (log de UFC.mL⁻¹) incubadas em 3 diferentes temperaturas (4°C, 8°C, 12°C) aferida em 0 (M0), 12 (M12), 24 (M24) e 48 (M48) horas de incubação.

É comum, na literatura, a descrição de que para preservar-se a qualidade microbiológica de um leite, conservado em temperaturas de resfriamento (5°C, por exemplo), em um prazo mínimo de 3 dias, sua contagem inicial de microrganismos psicrotróficos seja inferior a 4 log UFC.mL⁻¹ (LÜCK, 1972). No presente trabalho, a 4°C, e em alguns casos também a 8°C, no período de 48 horas, os microrganismos se multiplicaram no máximo 2 log (em geral, menos que isso), quando no momento 0, a contagem era inferior a 4 log UFC.mL⁻¹. A própria média obtida é bastante representativa (de 3,8 log UFC.mL⁻¹, em M0, para 5,5 log UFC.mL⁻¹, em M48). No entanto, quando as contagens iniciais eram superiores a 4 log UFC.mL⁻¹, foi comum o leite mostrar-se com números finais superiores a 6 log UFC.mL⁻¹, independente da temperatura de incubação.

Constata-se, portanto, que no caso da multiplicação bacteriana (em nosso caso, a microbiota psicrotrófica), tão importante quanto o binômio tempo/temperatura, são as contagens iniciais do leite, o que apenas reforça a ideia, já plenamente estabelecida, que a qualidade microbiológica, e consequentemente a qualidade organoléptica, está atrelada ao grau de higiene na obtenção do produto.

A figura 2 ilustra a relação entre a acidez e o índice crioscópico, observada também no presente experimento.

Nota-se pelo gráfico uma clara relação inversamente proporcional entre as curvas de acidez e crioscópico, isto ocorre, pois a fermentação de uma molécula de lactose dá origem a quatro moléculas de ácido láctico, ou seja, o resíduo

metabólico de uma bactéria fermentadora de lactose eleva a energia elétrico-cinética do meio, pelo maior número de cargas elétricas disponíveis neste, necessitando uma menor temperatura para congelá-lo (MITCHELL, 1989; PRATA, 2001).

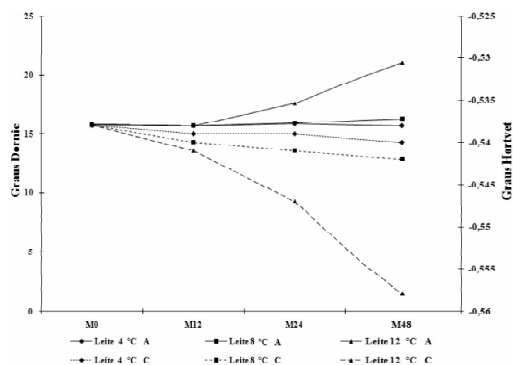


Figura 2 – Associação: acidez (A) e índice crioscópico (C) para amostras incubadas em 3 diferentes temperaturas (4°C, 8°C e 12°C) e analisadas em 0 (M0), 12 (M12), 24 (M24) e 48 (M48) horas de incubação.

À temperatura de 4°C e tempo de incubação de 48 horas, a acidez média registrada foi de 15,6 ± 0,9°D, e índice crioscópico médio, para as mesmas condições, de -0,540 ± 0,009°H. É importante ressaltar que os valores encontrados em M48, contemplam a IN-51 (BRASIL, 2002), que estabelece limites de acidez variando entre 14°D e 18°D, e de índice crioscópico inferior a -0,530°H.

Apesar de não ter havido diferenças estatísticas significativas (p<0,05) entre os leites a 4°C e 8°C, a conservação do produto nesta última temperatura é desaconselhável. Em quatro das trinta amostras analisadas, em T8/M48, os valores de acidez estavam consideravelmente elevados (21°D, 24°D, 25,5°D e 27,5°D). Há algumas hipóteses para explicar a tal fato. Ressalta-se, por exemplo, que tais amostras partiram, em M0, de contagens bacterianas altas em relação às demais (respectivamente, 5,5 log UFC.mL⁻¹; 5,0 log UFC.mL⁻¹; 5,5 log UFC.mL⁻¹ e 5,9 log UFC.mL⁻¹).

Outra possibilidade possível é que o valor elevado da acidez seja resultado da atividade acidificante de um número considerável de *Lactobacillus*, já que, mesmo em temperaturas psicrotróficas clássicas (4°C), este gênero multiplica-se, mantendo um metabolismo acidificante em níveis basais (ZACHAROV & HELPERN, 2007).

Finalmente, pode-se também considerar que as altas contagens iniciais de microrganismos provocaram uma intensa competição por substratos graxos e peptídicos, fazendo com que aqueles capazes

de fermentar lactose, fossem direcionados para a expressão esta característica, já que a 8°C este substrato não estaria sendo visado pela microbiota predominante. Seria este, o caso de bactérias do gênero *Lactococcus*, que apresentam metabolismo tanto acidificante como proteolítico (FOUCAUD & JULLIARD, 2000).

No leite armazenado a 12°C por 48 horas, a atividade fermentativa da lactose é bastante nítida, evoluindo de forma rápida até chegar a 21°D, extrapolando os limites estabelecidos pela legislação vigente (BRASIL, 2002). Além disso, neste momento e temperatura se registrou o único valor médio de índice crioscópico que difere estatisticamente dos demais, alcançando a marca de -0,558°H, valor similar aos de leite fraudados por sacarose (FONSECA & SANTOS, 2000).

4 CONCLUSÕES

Os dados apresentados ratificam a necessidade do cumprimento estrito das medidas higiênicas descritas na IN-51, como o modo mais eficiente de atender os parâmetros microbiológicos e físico-químicos estabelecidos na legislação, pois não apenas a temperatura de incubação, mas também a contagem inicial de psicrófilos foi igualmente relevante para a manutenção das características sensoriais do leite.

Finalmente, apenas a estocagem na temperatura de 4°C mostrou-se viável, como fator inibitório das atividades metabólicas de bactérias acidificantes.

SUMMARY

Brazil is the sixth largest producer of milk, amounting to 27 billion liters per year, although productivity is one of the lowest in the world. In order to obtain a better quality product, the Ministry of Agriculture published in 2002, Instruction nº51, which established the milk refrigeration at 4°C, after milking and delivery (bulk) for dairy plant within 48 hours. The cooling associated with lack of hygiene in obtaining highlighted a group of microorganisms with high deteriorating potential: the psychrotrophs. Cooling is an important technological tool of conservation to preserve the original quality of the product, but must be done right, because marginal cooling temperatures, above 7 ° C, promotes not only a greater number of genera psychrotrophic, as well as a mixed characteristics of microflora (mesophilic / psychrotrophic), with intense metabolic activity of lipo-proteolytic and acidifying, reducing the quality of milk and its derivatives. Based on the informations given, the work in question is to determine how the use of marginal cooling influences the psychrotrophic bacterial growth, and further quantify the expression of metabolic activities of a transience microbiota, that modify some physical and chemical parameters milk, and therefore the loss of sensories characteristics of the general product. The

results indicated that only the cooling to 4°C proved to be feasible, as a factor inhibiting the metabolic activities acid-producing bacteria. The work also suggests greater rigor in compliance with hygienic measures, as the most efficient way to achieve both microbiological and physical-chemical laid down in legislation, as well as the temperature of incubation, the initial bacterial count was also important for maintaining the sensories characteristics milk.

Index terms: psychrotrophic; marginal cooling; milk; acidity; crioscopia.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVIM, R. CNA: Produção de leite deve crescer 6% em 2007. 2007. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/?noticialD=41507&actA=7&areaID=50&secaoID=165>>. Acesso: 05 jan. 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 51, 18 de Setembro de 2002. **Regulamentos técnicos de produção, identidade, qualidade, coleta e transporte de leite**. Brasília, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 22, 14 de Abril de 2003. **Métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos**. Brasília, 2003.

BRAVERMAN, J.B.S. **Introducción a la bioquímica de los alimentos**. Cidade do México: Editorial El Manual Moderno, 1980. 359p.

CELESTINO, E.L.; IYER, M.; ROGINSKI, H. The effects of refrigerated storage on the quality of raw milk. **Australian Journal of Dairy Technology**, v.51, p.59-63, 1996.

CHEN, L.; DANIEL, R. M.; COOLBEAR, T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powder. **Internation Dairy Journal**, v.13, n.4, p.255-275, 2003.

CHAMPAGNE, C.P.; LAING, R.R.; ROY, D. Psychrotrophs in dairy products: their effects and their control. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v.34, p.1-30, 1994.

COUSIN, M.A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. **Journal of Food Protection**, v.45, p.172-207, 1981.

CRAVEN, H.M.; MACAULEY, B.J. Microorganisms in pasteurized milk after refrigerated storage. Effects of milk processor. **International Journal of Dairy Technology**, v.47, p.50-55, 1993.

DÜRR, R. Development of psychrotrophic bacteria in refrigerated raw milk at French dairy farms. **Dairy Science Abstracts**, v.326, p.913-919, 1975.

- FAIRBAIRN, D.J.; LAW, B.A. Proteinases of psychrotrophic bacteria: their production, properties, effects and control. **Journal of Dairy Research**, v. 53, p. 139-177, 1986.
- FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. **Estratégias de controle da mastite e melhoria da qualidade do leite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 314p.
- FOUCAUD, C.; JULLIARD, V. Accumulation of casein-derived peptides during growth of protease-positive strains of *Lactococcus lactis* in milk: their contribution to subsequent bacterial growth is impaired by their internal transport. **Journal Dairy Research**, v.67, p.233-240, 2000.
- FUJISAWA, F.M.; PEREIRA, J.G.; HIRAI, M.M.G.; VIANA, C.; GOTTARDO, E.T.; MAZIERO, M.T.; PINTO, J.P.A.N.; GUIRRO, E.C.B.P.; BARCELLOS, V.C.; BERSOT, L.S. Qualidade microbiológica do leite in natura: influência do tipo de tanque de estocagem na propriedade rural. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO, 4., BRASILEIRO DE HIGIENISTAS DE ALIMENTOS, 10., 2009, Florianópolis. **Revista Higiene Alimentar**, v.23, p.403-404, 2009.
- IZIDORO, T.B. **Efeito da multiplicação de microrganismos psicotróficos sobre as características físico-químicas do leite cru**. 2008. 94f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.
- JAY, J.M. **Microbiologia dos alimentos**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 712p.
- LAVOR, U.L.; D'OVÍDIO, L.; IZIDORO, T.B.; PADOVANI, C.R.; PINTO, J.P.A.N. Qualidade do leite cru produzido na região de Botucatu, SP, e impactos da nova legislação sobre o produto. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 2., 2006, Goiânia. **Anais ...** Goiânia, 2006. 1CD-ROM.
- LORENZETTI, D.K.; MOCELIN, G.; KOEHLER, H.S. Influência do tempo e da temperatura no desenvolvimento de microrganismos psicotróficos no leite cru de duas regiões do sul do Brasil. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 13., 2006, Juiz de Fora-MG. **Anais...** Juiz de Fora, 2006. v.61, p.55-57.
- LÜCK, H. Bacterial quality tests for bulk-cooled milk. A review. **African Journal of Dairy Technology**, v.34, p.101-122, 1972.
- MABBITT, L.A. Factors influencing the bacteriological quality of raw milk; The bacterial quality of raw milk: a summary. **International Dairy Federation**, v.120, p.30-31, 1980.
- MITCHELL, G.E. The contribution of lactose, chloride, citrate, and lactic acid to the freezing point of milk. **Australian Journal of Dairy Technology**, v.44, p.61-64, 1989.
- OLIVEIRA, J.S.; PARMELEE, C.E. Rapid enumeration of psychrotrophic bacteria in raw and pasteurized milk. **Journal of Milk and Food Technology**, v.39, p.269-272, 1976.
- PETERSON, A.C.; GUNDERSON, M.F. Some characteristics of proteolytic enzymes from *Pseudomonas fluorescens*. **Applied Microbiology**, v.8, p.98-104, 1960.
- PRATA, L.F. **Fundamentos da ciência do leite**. Jaboticabal: FUNEP, 2001. 287p.
- SANTANA, E.H.W.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F. Microrganismos psicotróficos em leite. **Revista Higiene Alimentar**, v.15, p.27-33, 2001.
- SLAGHUIS, B. Sources and significance of contaminants on different levels of raw milk production. In: International Dairy Federation Symposium on Bacteriological Quality of Raw Milk, 1996, Wolfpassing. **Proceedings...** Wolfpassing, Austria: IDF, 1996. 178p. p.19-27.
- SØRHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. **Trends in Food Science & Technology**, v.8, p.35-41, 1997.
- SOUTO, L.I.M.; GARBUGLIO, M.A.; BENITES, N.R. Contagem de microrganismos mesófilos e psicotróficos aeróbios estritos e facultativos viáveis de amostras de leite cru do Estado de São Paulo Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 2., 2006, Goiânia. **Anais...** Goiânia, 2006. 1 CD-ROM.
- SUHREN, G. Producer microorganism. In: MCKELLER, R.C. **Enzymes of psychrotrophs in raw food**. Boca Raton: CRC, 1989. 310p.
- USDA. **Dairy: World Markets and Trad.** 2008. Disponível em: <<http://www.usdabrazil.org.br/>>. Acesso em: 22 ago. 2009.
- VILLAR, A.; GARCÍA, J.; IGLESIAS, L.; GARCÍA, M.L.; OTERO, A. Application of principal component analysis to the study of microbial population in refrigerated raw milk from farm. **International Dairy Journal**, v.6, n.10, p.937- 945, 1996.
- ZACHAROV, E.H.; HALPERN, M. Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.22, p.7162-7168, 2007.
- ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**, 4th ed., New Jersey: Prentice Hall, 1999, 663 p.