

INFLUÊNCIA DOS MICRORGANISMOS PSICROTÓFICOS SOBRE A QUALIDADE DO LEITE REFRIGERADO PARA PRODUÇÃO DE UHT

Maisa Paula Zeni*
Maria Helena de Souza Maran*
Gizele Paula Rabaioli da Silva*
Eliane Maria de Carli**
Simone Canabarro Palezi***

Resumo

A granelização trouxe uma melhoria da qualidade do leite recebido pela indústria, pois o armazenamento e o transporte do leite refrigerado até a indústria reduzem o problema de proliferação de microrganismos mesófilos que aumentam a acidez deste, prejudicando o beneficiamento. Entretanto, com a permanência do leite a temperaturas de refrigeração por períodos prolongados, tem sido notada a substituição da microbiota deteriorante mesófila por uma microbiota de bactérias psicotróficas. Os microrganismos psicotróficos contribuem para a deterioração do leite da seguinte forma: produzem enzimas proteolíticas e lipolíticas que são excretadas no leite cru durante a estocagem antes do processamento. Estas enzimas são termorresistentes, assim resistem ao processamento térmico e causam alterações durante o *shelf life* (vida de prateleira) dos produtos lácteos. Este trabalho verificou a incidência de microrganismos psicotróficos e mesófilos no leite cru destinado à produção de leite UHT. Foram coletadas amostras de leite cru refrigerado as quais mostram contagens para mesófilos e psicotróficos acima de 10^6 , o que aponta a produção de enzimas psicotróficas, resultando em aumento na quantidade de sedimentos produzidos. Observou-se que a alta contagem inicial de microrganismos psicotróficos teve relação direta com a vida de prateleira do leite UHT.

Palavras-chave: Leite. Psicotróficos. Mesófilos.

1 INTRODUÇÃO

A qualidade insatisfatória do leite produzido no Brasil é um problema crônico, de difícil solução, em que fatores de ordem social, econômica, cultural e até mesmo climática estão envolvidos, e que não têm merecido a devida atenção no campo político, apesar do importante papel representado pelo leite na alimentação da população. O leite, por ser considerado um alimento completo em nutrientes, facilmente assimiláveis, torna-se um excelente alimento para o homem e um meio de cultura para a maioria dos microrganismos encontrados na natureza.

* Acadêmicas do Curso de Engenharia de Alimentos da Universidade do Oeste de Santa Catarina.

** Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos; Coordenadora do Curso de Engenharia de Alimentos da Universidade do Oeste de Santa Catarina; maysa_zeni@hotmail.com

*** Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos; Professora do Curso de Engenharia de Alimentos da Universidade do Oeste de Santa Catarina.

Com crescimento do setor de lácteos, fez com que surgisse a necessidade do armazenamento prolongado. Isso acabou se tornando uma realidade, no entanto, o desafio se encontra na manutenção da qualidade desses produtos. Entretanto, não se pode garantir um produto com vida útil prolongada se não for dada atenção à produção e estocagem da matéria-prima. Com isso, iniciou-se no Brasil na década de 1990 a estocagem do leite cru refrigerado, regulamentado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) em 2002 com a IN n. 51 (Regulamento técnico de identidade e qualidade do leite cru refrigerado). Isso reduziu os prejuízos por deterioração do leite por atividade acidificante das bactérias mesófilas. Mas, por outro lado, surgiu outro problema para a indústria de lácteos, que, em razão do tempo prolongado de permanência do leite cru em temperatura de refrigeração, favoreceu o desenvolvimento de bactérias psicrotróficas, as quais produzem enzimas termorresistentes que mesmo após a pasteurização e o tratamento UHT, continuam agindo sobre o leite.

Em geral, quanto maior o número de contaminantes e quanto mais alta a temperatura na qual o leite permanece (próxima de 30 °C), menor será o seu tempo de conservação. De forma geral, a qualidade do leite está associada à carga microbiana presente no produto (MUTUKUMIRA et al., 1996). No Brasil, o leite *in natura* apresenta baixa qualidade; este fator está relacionado à influência das estações do ano, às práticas de produção e manuseio em nível de fazenda, localização geográfica, temperatura de permanência do leite e à distância do transporte entre a fazenda e a plataforma de recepção da indústria, que contribuem para o desenvolvimento de microrganismos contaminantes do leite.

Os principais benefícios alcançados com o resfriamento do leite nas propriedades e seu transporte a granel são a melhoria da qualidade da matéria-prima e o aumento da eficiência produtiva para o produtor e também para a indústria. Obviamente, apenas o resfriamento do leite não soluciona o problema da falta de qualidade do leite. A cadeia deve ser trabalhada como um todo, incluindo a ordenha e o manejo dos animais, com treinamento dos produtores a fim de implementar as boas práticas agropecuárias; a carga microbiológica do leite cru é de extrema importância para a qualidade final de produtos lácteos.

Um leite de baixa qualidade microbiológica não se conserva por longos períodos, mesmo sob refrigeração, em razão da sua contaminação principalmente pelas bactérias psicrotróficas formadoras ou não de esporos, que apesar de seu crescimento lento, produzem grandes quantidades de enzimas (lipases e proteases), que rapidamente alteram o produto. A contaminação do leite por microrganismos psicrotróficos produz perdas econômicas e problemas tecnológicos para a indústria, pois as enzimas proteolíticas e lipolíticas produzidas por esse grupo de microrganismos estão relacionadas à perda de qualidade e à redução de vida de prateleira do leite UHT e de outros lácteos. Assim, o presente trabalho avaliou a influência das enzimas psicrotróficas sobre a vida de prateleira do leite UHT.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O leite é definido a *grosso modo* como um produto da secreção mamária. De acordo com o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), em

seu artigo 475, denomina-se leite, sem outra especificação, o produto normal, fresco, integral, oriundo da ordenha completa e ininterrupta de vacas sadias (TRONCO, 2003).

Do ponto de vista biológico, o leite é o produto da secreção das glândulas mamárias de fêmeas mamíferas, cuja função natural é a alimentação dos recém-nascidos (LIMA; COSTA; YAMAGUCHI, 2007).

Do ponto de vista físico-químico, o leite é uma mistura homogênea de grande número de substâncias (lactose, glicerídeos, proteínas, sais, vitaminas, enzimas, etc.), em que algumas estão em emulsão (a gordura e as substâncias associadas), em suspensão (as caseínas ligadas a sais minerais) e outras em dissolução verdadeira (lactose, vitaminas hidrossolúveis, proteínas do soro, sais, etc.) (LIMA; COSTA; YAMAGUCHI, 2007).

A qualidade do leite cru produzido em diversas regiões do Brasil é considerada insatisfatória; este fator está intimamente relacionado à taxa de multiplicação dos microrganismos contaminantes. Fatores como a qualidade bacteriológica das águas, utensílios não perfeitamente higienizados, sanidade dos ordenhadores e dos animais, contribuem, de modo decisivo, para o estado microbiológico do leite. Dessa forma, a higienização prévia dos tetos, mãos do ordenhador e do local de ordenha, que inclui teteiras, latões, ordenhadeira e piso, é fundamental para a redução da contaminação por microrganismos deteriorantes e patogênicos no leite (YAMAZI et al., 2010).

Entende-se por leite cru refrigerado o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas, descansadas; refrigerado e mantido nas temperaturas constantes, transportado em carro-tanque isotérmico da propriedade rural para um posto de refrigeração de leite ou estabelecimento industrial adequado, para ser processado (BRASIL, 2002).

O leite, considerado um alimento importante na dieta humana por ser altamente nutritivo, torna-se um produto de fácil deterioração, sendo necessária a utilização de métodos de conservação para reduzir parcial ou totalmente a microbiota patogênica e deteriorante para prolongar o seu tempo de consumo com segurança e qualidade.

A indústria leiteira brasileira passou por um período de transformações em sua estrutura com significativas mudanças nos sistemas de armazenamento e transporte de leite, aliado à constante preocupação dos consumidores em relação à segurança alimentar, passando a exigir do produtor uma matéria-prima de melhor qualidade. Considerando essas características, em 2002 foram implementadas normas nacionais de padrão de qualidade do leite pelo MAPA com a publicação da Instrução Normativa n. 51, gerando a implementação de melhorias como a coleta do leite cru refrigerado e seu transporte a granel (YAMAZI et al., 2010). Com o transporte do leite refrigerado em caminhões-tanque isotérmicos, obteve-se uma diminuição da contagem de microrganismos do leite, melhorando a qualidade microbiológica do produto nacional.

De acordo com a IN n. 51/2002, nesse processo de conservação do leite pelo frio, a temperatura de refrigeração deve ser igual ou inferior a 4 °C, após a segunda hora da ordenha, condição esta que pode favorecer a proliferação de microrganismos psicrotróficos. Porém, segundo Santos et al. (2009), a contagem de psicrotróficos será baixa no leite refrigerado a 4 °C que for produzido sob condições higiênicas adequadas.

A IN n. 51/2002 estabelece ainda que a temperatura máxima de conservação do leite na propriedade rural dever ser de 7 °C e 10 °C no estabelecimento onde a matéria-prima será processada; o tempo transcorrido entre a ordenha e o recebimento do leite no estabelecimento industrial deve ser de, no máximo, 48 horas, recomendado como ideal um período não superior a 24 horas.

Deve-se considerar ainda, que o armazenamento do leite cru sob refrigeração possibilitou a redução de custos operacionais de produção, evitando perdas desta matéria-prima pela atividade acidificante de bactérias mesofílicas (SHIRAI, 2010). Entretanto, a refrigeração por períodos prolongados pode comprometer a qualidade do leite cru, em razão da possibilidade de seleção de bactérias psicotróficas com atividade enzimática, formadoras ou não de esporos.

Muitas dessas enzimas proteolíticas são termorresistentes, mantendo sua atividade após a pasteurização, resultando na perda de qualidade e na redução da vida de prateleira do leite e de outros produtos lácteos, pois provocam alteração no sabor e odor, perda de consistência e gelatinização (NÖRNBERG, TONDO; BRANDELLI, 2009).

A gelatinização é considerada um dos principais problemas relacionado à qualidade do leite UHT. Estudos relacionados apontam que esta alteração ocorre inicialmente pela ação das proteases termorresistentes presentes na flora psicotrófica do leite; essas enzimas degradam as caseínas e promovem agregação das micelas do leite.

Os níveis de contaminação por microrganismos psicotróficos têm se tornado um sério agravante relacionado à baixa qualidade microbiológica do leite, visto que algumas espécies psicotróficas são patogênicas. Apesar da importância dos psicotróficos, o Ministério da Agricultura não estipula um padrão de identidade e qualidade do leite, baseado na contagem de unidades formadoras de colônia destes microrganismos. Contudo, é considerada inviável a utilização de leite em que a contagem de psicotróficos tenha excedido a $5,0 \times 10^6$ UFC/mL, pois, nesse caso, é grande a possibilidade da presença de enzimas hidrolíticas extracelulares durante a fase log (SHIRAI, 2010).

Microrganismos psicotróficos são aqueles que conseguem crescer em alimentos sob refrigeração em torno de 7 °C, independente de sua temperatura ótima de crescimento, entre 20 °C e 30 °C, podem ser bastonetes, cocos, víbrios, formadores ou não de esporos, aeróbios ou anaeróbios (NÖRNBERG; TONDO; BRANDELLI, 2009).

As bactérias psicotróficas encontradas no leite não constituem um grupo taxonômico específico, suas cepas descritas pertencem aos dois grandes grupos de bactérias Gram positivas e Gram negativas, incluídas em pelo menos 15 gêneros. Os principais gêneros envolvidos na alteração do leite são *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Yersinia*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Serratia*, *Corynebacterium* e *Clostridium*, em que *Pseudomonas* e *Bacillus* são os principais gêneros envolvidos, sendo *Pseudomonas* em razão do curto tempo de geração a temperaturas de refrigeração; o predominante, o leite cru, particularmente, à espécie *Pseudomonas fluorescens*. A *Yersinia*, *Bacillus* e *Listeria* são capazes de provocar enfermidades em humanos pela ingestão de leite cru, em condições especiais (SHIRAI, 2010).

Na atual situação de desenvolvimento da cadeia agroindustrial de leite, é de suma importância uma análise dos pontos críticos que podem levar a um alto risco de contaminação do leite por microrganismos psicotróficos, havendo uma grande necessidade de associar à refrigeração

as boas práticas de fabricação, para que se evite ou monitore a contaminação do leite por microrganismo psicrotróficos, prolongando, assim, a vida útil do leite e de seus derivados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

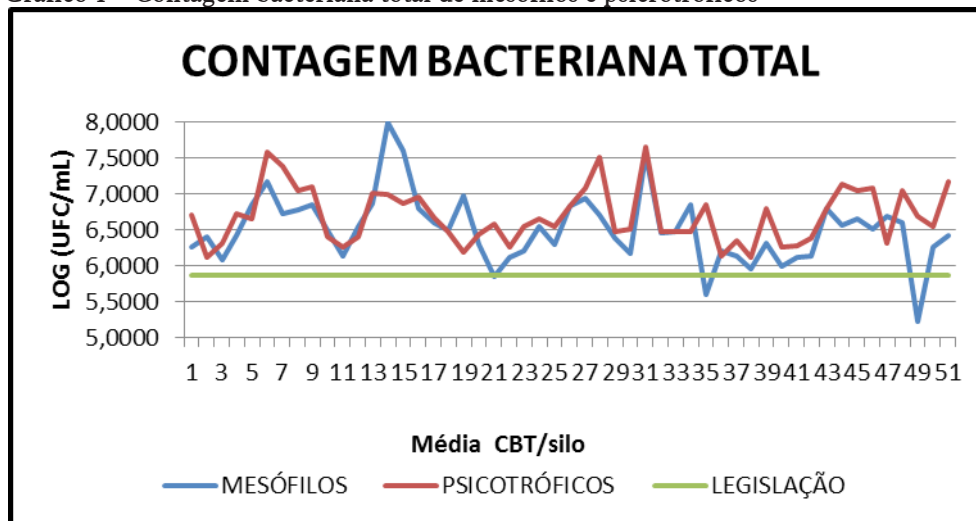
As amostras foram coletadas semanalmente nos meses de junho a dezembro de 2011, nos silos de leite cru refrigerado, que serviu de matéria-prima para a produção de leite UHT de um laticínio da região Oeste de Santa Catarina.

O leite cru refrigerado foi coletado semanalmente dos silos por meio de válvulas, previamente esterilizadas com álcool 70% e flambadas. As primeiras porções de leite obtido da válvula de coleta foram descartadas, e, posteriormente, coletado com frasco esterilizado aproximadamente 50 mL de leite. Após a coleta os frascos foram fechados imediatamente e encaminhados ao laboratório de microbiologia, no qual foram realizadas as seguintes análises: contagem-padrão de aeróbios mesófilos e de psicrotróficos. As análises foram realizadas em capela de fluxo laminar e os frascos com as amostra de leite foram desinfetados externamente com álcool 70%. Após a desinfecção dos frascos, estes foram homogeneizados por inversão (invertidos de 20 a 25 vezes). Com o auxílio de um pipetador automático de 1 mL e ponteiras esterilizadas, foi transferido 1 mL da amostra para um tubo de ensaio contendo 9 mL de água peptonada, sendo esta a primeira diluição (10^{-1}), e assim, sucessivamente até a diluição 10^{-6} . A seguir, foi adicionado nas placas o Agar Plate Count Agar – Merck (PCA), preparado de acordo com as orientações do fabricante, contidas no rótulo, esterilizado a 121 °C por 15 minutos a 1 ATM fundido em micro-ondas e resfriado à temperatura de 45 °C, e então, vertidos em torno de 15 a 20 ml em cada placa. Após a adição do meio, foi realizada a homogeneização das placas sobre a superfície do fluxo laminar, fazendo-se esta em forma de 8, em torno de 10 vezes, e incubadas. As placas para a contagem de mesófilos foram incubadas em estufa a $35 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 48 horas. As placas para a contagem de psicrotróficos foram incubadas em estufa a $7 \pm 1^\circ\text{C}$ por 10 dias. As temperaturas das estufas foram monitoradas duas vezes ao dia (manhã e tarde), garantindo, assim, sua linearidade. Decorrido o tempo de incubação foi realizada a leitura das placas da seguinte forma: o número de colônias crescidas vezes a diluição do inoculado e expressadas como Unidades Formadoras de Colônias por mL (UFC/mL). A contagem foi realizada nas placas com um intervalo de 25 a 250 colônias. A metodologia utilizada foi conforme Lanara (2001).

4 RESULTADO E DISCUSSÃO

Das amostras de leite cru, avaliou-se a contagem bacteriana total de mesófilos e psicrotróficos conforme mostra o Gráfico 1.

Gráfico 1 – Contagem bacteriana total de mesófilos e psicotróficos



Fonte: os autores.

Do total de amostras avaliadas, três apresentaram contagem bacteriana total de mesófilos inferior a 750.000. Esses valores estão de acordo com os padrões da Instrução Normativa n. 51 (BRASIL, 2002), que a partir de 1 de julho de 2008 contempla que para as regiões Sul, Sudeste e Centro Oeste a contagem bacteriana total de mesófilos é de $7,5 \times 10^5$ (log 5,8750). No entanto, convém salientar que essa legislação estabelece esse padrão para o leite no tanque do produtor, mas é importante segui-la como base a fim de verificar se a qualidade não se perdeu durante o transporte. Pode-se observar no Gráfico 1 que algumas amostras apresentaram valores acima deste padrão. Com esses resultados verificou-se que há uma deficiência da qualidade do leite, que pode ser desde a obtenção dessa matéria-prima quanto ao percurso até a chegada na indústria. Se na indústria não tivermos os cuidados adequados de higiene e resfriamento, isso pode contribuir com o aumento da contagem de bactérias. Conforme Silveira, Carvalho e Teixeira (2008), a qualidade do leite cru está intimamente relacionada ao grau de contaminação inicial e ao binômio tempo/temperatura em que o leite permanece desde a ordenha até o processamento. Em geral, quanto maior o número de contaminantes e quanto mais alta for a temperatura na qual o leite permanece (próxima de 30 °C), menor será o seu tempo de conservação; por isso, iniciou-se o sistema de granelização e resfriamento do leite.

Para as contagens de bactérias psicotróficas, não existe padrão descrito em legislação. No entanto, na literatura são descritos valores que causariam problemas de qualidade na produção de lácteos. Segundo Furtado (2005), se o número de psicotróficos no leite refrigerado estiver entre 500.000 e 1.000.000 por mL, não haveria motivos para preocupação, desde que o leite fosse imediatamente pasteurizado. Quando o número exceder a 5 milhões/mL, há um considerável risco de alterações das proteínas e gordura do leite. Também conforme Furtado (2005), o maior problema causado pelo grupo psicotróficos é a termorresistência das enzimas produzidas. Os microrganismos são destruídos, mas tanto as proteases quanto as lipases resistem à pasteurização, algumas até mesmo ao aquecimento a 100 °C por alguns minutos, e a tratamentos UHT.

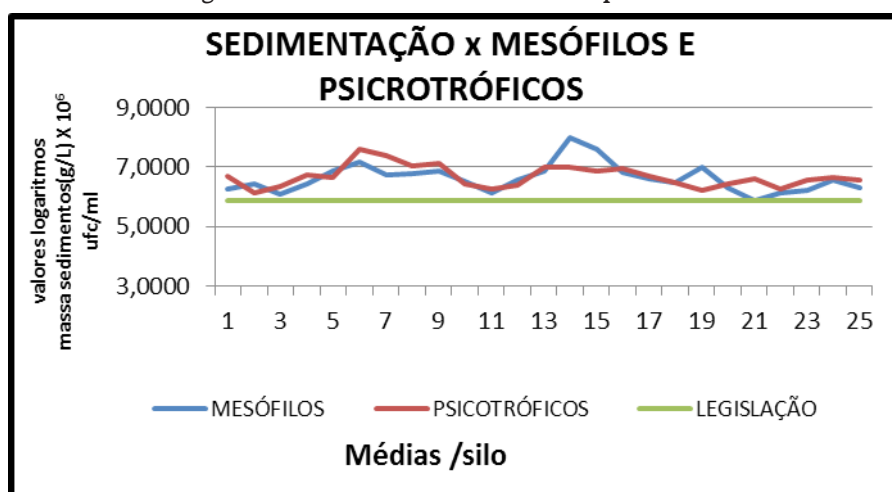
Com base nos resultados obtidos, o leite de todos os silos apresentaram valores acima do relatado por Furtado (2005); dessa forma, é possível presumir que houve produção de enzimas

proteolíticas termorresistentes pelas bactérias psicrotróficas, ocasionando proteólise durante a estocagem do leite UHT, elevando a viscosidade, característica própria do processo de gelificação e sedimentação do leite UHT (Gráfico 2).

Quanto à importância da qualidade microbiológica do leite cru, com ênfase nas bactérias psicrotróficas, conforme Sorhaug e Stepaniak (1997), a produção de proteinases termorresistentes por bactérias psicrotróficas antes do processamento representa o maior fator de deterioração do leite estocado. Neira (1986) concluiu que a atividade proteolítica no leite após processamento UHT pode ser atribuída em 93,17% pela atividade proteolítica anterior ao tratamento.

Esses dados também confirmam a má qualidade do leite desde a sua obtenção, seja pelo não seguimento das boas práticas de produção da matéria, seja pelo resfriamento e pela falta de qualidade da água utilizada nos procedimentos, apresentados no Gráfico 2.

Gráfico 2 – Massa de sedimentos formada em 30 dias de vida de prateleira *versus* contagem bacteriana total de mesófilos e psicrotróficos



Fonte: os autores.

Os resultados apresentados no Gráfico 2 comprovam a associação entre as contagens de psicrotróficos e mesófilos no leite cru e a sedimentação ao longo da vida de prateleira do leite UHT, confirmando dados encontrados por Furtado (2005), os quais afirmam a incidência da liberação de proteases responsáveis pelo início do processo de sedimentação.

De forma similar, Neira (1986) concluiu não ser constante a taxa de sedimentação em diferentes amostras de leite UHT, mas sempre se observa aumento no transcurso do tempo.

Shew (1981) afirmou que os tipos de microorganismos presentes no leite cru têm influência na qualidade de produtos UHT e que proteases extracelulares produzidas por psicrotróficos não completamente destruídas entre 140 °C e 150 °C podem produzir proteólise, sabor amargo e gelificação do leite UHT.

Gomes (1995), estudando a atividade proteolítica residual do leite UHT, concluiu que esta aumentou durante o armazenamento à temperatura ambiente, provavelmente em razão de uma intensificação da proteólise decorrente da resistência térmica de enzimas.

Conforme os resultados obtidos, demonstra-se que a qualidade microbiológica do leite cru, particularmente a contagem de microorganismos psicrotróficos, é fator preponderante para se obter leite UHT com menor tendência à sedimentação.

5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos e nas condições empregadas, foi possível concluir que a contagem de microrganismos psicrotróficos e aeróbios mesófilos causa grande impacto sobre a qualidade do leite UHT, devendo haver uma maior fiscalização no que se refere a esse problema. Além disso, constatou-se que boas práticas de produção aplicadas na produção de leite cru são eficazes para reduzir o nível de contaminação em pontos específicos da linha de ordenha. A refrigeração do leite cru, por períodos prolongados, na fonte de produção ou na indústria, pode comprometer a sua qualidade, considerando a possibilidade de seleção de bactérias psicrotólicas proteolíticas. Portanto, há a necessidade de investimentos contínuos em boas práticas para a prevenção da contaminação e do crescimento microbiano na cadeia produtiva do leite para reduzir problemas tecnológicos e econômicos na indústria de laticínios.

Abstract

The bulk milk brought a best quality to the milk received by industry, because the storage and transportation of refrigerated milk to the industry reduce the problem of proliferation of mesophilic microorganisms that increase the acidity of the milk, damaging the beneficiation. However, with the permanence of the milk in refrigeration temperatures for long periods have been notice the replacement of the deteriorating macrobiotics for a psychrotrophic bacterial macrobiotics. The psychrotrophic microorganisms contribute to the deterioration of milk as follows: produce proteolytic and lipolytic enzymes that are excreted in raw milk during the storage, before the processing. These enzymes are thermo resistant, and resist to the thermic processing and cause changes during the shelf life of lactic products. This work checked the incidence of psychrotrophic mesophilic microorganisms in raw milk designated to production of UHT milk. There were collected refrigerated raw milk samples which shown up counting for mesophilic and psychrotrophic over than 10^6 , what points to the production of psychrotrophic enzymes, what reflected in an increase of the quantity of produced sediments. We saw that the high begin counting of psychrotrophic microorganisms had straight relation with the shelf life of the UHT milk.

Keywords: Milk. Psychrotrophic. Mesophilic.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa n. 51, de 18 de setembro de 2002. Coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, v. 172, p. 8-13, 20 set. 2002. Seção 1.

GOMES, M. I. F. V. **Alterações na qualidade do leite pasteurizado pela ação de lipase microbiana**. Piracicaba: ESALQ, 1995. 85 p.

LIMA, V. M. B.; COSTA, C. N.; YAMAGUCHI, L. C. A. Gisleite: inovando a gestão de sistemas de produção de leite com uso de software livre. In: YAMAGUCHI, Luiz Carlos Takao; et al. (Org.). **Aspectos sócio-econômicos e ambientais da produção de leite**. 1. ed. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2007.

MUTUKUMIRA, A. N. et al. Chemical and microbiological quality of raw milk produced by Smallholder farmers in Zimbabwe. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 59, n. 9, p. 984-987, sept. 1996.

NÖRNBERG, M. F. B. L. **Atividade proteolítica, aderência e produção de biofilmes por microrganismos psicrotóxicos em leite bovino**. Porto Alegre, 2009. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/16148/000697839.pdf?Sequence=1>>. Acesso em: 04 abr. 2011.

NÖRNBERG, M. F. B. L.; TONDO, E. C.; BRANDELLI, A. **Bactérias psicrotóxicas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado**. Porto Alegre, 2009. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/actavet/37-2/art825.pdf>>. Acesso em: 05 abr. 2011.

SANTOS, P. A. dos et al. **Efeito do tempo e da temperatura de refrigeração no desenvolvimento de microrganismos psicrotóxicos em leite cru refrigerado coletado na macrorregião de Goiânia, GO**. Goiânia, 2009. Disponível em: <<http://revistas.ufg.br/index.php/vet/article/view/3522/6037>>. Acesso em: 04 abr. 2011.

SHEW, D. I. Technical aspects of quality assurance. In: INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **New monograph on UHT milk**. Brussels: [s.n.], 1981.

SHIRAI, M. A. **Conservação do leite cru pela aplicação de dióxido de carbono**. Curitiba, 2010. Disponível em: <<http://www.posalim.ufpr.br/Pesquisa/pdf/DissertaMarianne.pdf>>. Acesso em: 04 abr. 2011.

SILVEIRA, I. A.; CARVALHO, E. P.; TEIXEIRA, D. Influência de Microrganismos Psicrotóxicos sobre a Qualidade do Leite Refrigerado: Uma Revisão. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 12, n. 55, p. 21-27, 2008.

SORHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. **Trends in Food Science and Technology**, Oxford, v. 8, p. 35-41, feb. 1997.

YAMAZI, A. K. et al. **Práticas de produção aplicadas no controle de contaminação microbiana na produção de leite cru**. Viçosa, 2010. Disponível em: <<http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/7210/5136>>. Acesso em: 02 abr. 2011.

