

Avaliação microbiológica e físico-química durante o processamento do leite pasteurizado

Physical-chemical and microbiological evaluation during the pasteurized milk processing

RIALA6/1155

Walécia Souza de ATAÍDE¹, Janeeyre Ferreira MACIEL^{1*}, Pedro Luciano Alcântara de LIMA¹, Ana Raquel Carmo de LIMA¹, Fernanda Vanessa Gomes da SILVA¹, João A. SILVA¹.

*Endereço para correspondência: ¹ Universidade Federal da Paraíba, Centro de Tecnologia, Departamento de Tecnologia Química e de Alimentos. Rua Manoel Belarmino, 365,ap.404, Jardim Cidade Universitária. João Pessoa, PB/Brasil. CEP 58052-290, e-mail: janeeyre@bol.com.br

Recebido: 11/09/2007 – Aceito para publicação: 28/01/2008

RESUMO

No presente estudo foram avaliadas as características microbiológicas e físico-químicas dos leites cru, dos produtos recém pasteurizados e dos leites pasteurizados embalados, de uma indústria de laticínios, localizada no Estado da Paraíba, a fim de avaliar os parâmetros em comparação aos padrões estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Quatorze amostras de cada tipo de leite foram submetidas as seguintes análises microbiológicas: contagem de bactérias mesófilas viáveis, Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes, contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa, pesquisa de *Escherichia coli* e de *Salmonella*. Para análises físico-químicas foram determinados pH e acidez, além dos testes de fosfatase e peroxidase no leite recém pasteurizado. O leite cru apresentou números elevados de bactérias mesófilas viáveis e coliformes totais. *Staphylococcus* coagulase positiva foi detectado em 78,6% dessas amostras. Em 35,7% das amostras de leite recém pasteurizado e 64,3% das de leite pasteurizado embalado foram detectados coliformes totais, em números acima do limite estabelecido pela legislação em vigor. A enzima fosfatase não foi detectada no leite recém pasteurizado, indicando que a presença de coliformes pode ter ocorrido em função da recontaminação pós-pasteurização. Nenhuma amostra demonstrou a presença de *Salmonella*. Os três tipos de leite apresentaram amostras com acidez abaixo do limite mínimo estabelecido na legislação.

Palavras-chave. leite pasteurizado, processamento, avaliação físico-química, condições higiênico-sanitárias.

ABSTRACT

The present research aimed to evaluate the microbiological quality of raw milk, newly pasteurized milk, and packed pasteurized milk from a dairy industry located in the State of Paraíba, Brazil. Fourteen samples of each type of milk were submitted to the following microbiological analysis: viable mesophiles bacteria counting, Most Probable Number (MPN) of thermotolerant and total coliforms, positive- and negative - coagulase *Staphylococcus* counting, and detection of *Escherichia coli* and *Salmonella*. Also, pH and acidity were determined in all samples. In addition, phosphatase and peroxidase tests were performed in newly pasteurized milk. High rates of viable mesophiles bacteria count and total coliforms NMP were observed in all of raw milk samples. The positive coagulase *Staphylococcus* presence was verified in 78.6% of these samples. In 35.7% of the newly pasteurized milks and 64.3% of the packed pasteurized milk samples the total coliforms counts were higher than the established limit for this type of milk. No phosphatase was detected in newly pasteurized milk samples, indicating that the post-pasteurization recontamination should be the most probable cause to explain the coliforms presence in these samples. *Salmonella* was not detected in all analyzed samples. Among these three types of milk, some samples showed acidity value lower than the limit established by Brazilian legislation.

Key words. pasteurized milk, processing, physical chemical evaluation, hygienic-sanitary conditions.

INTRODUÇÃO

O leite é um alimento utilizado na dieta humana em todas as faixas etárias, principalmente por ser um dos produtos mais completos do ponto de vista nutricional^{1,2}. Porém, devido à sua riqueza em nutrientes, torna-se suscetível ao desenvolvimento de um grande número de microrganismos, provenientes do próprio animal, do ambiente, do homem e dos utensílios usados na ordenha.

O Brasil é um dos maiores produtores de leite do mundo, tendo produzido 23.475 milhões de litros de leite fluido em 2004, e essa produção tem aumentado a cada ano. A maior parte do leite produzido no Brasil é destinada ao mercado de leite fluido e à produção de queijos³. O segmento do leite fluido tem passado por importantes transformações desde o início da década de 90. Uma delas foi a crescente participação do leite longa vida no mercado nacional, com conseqüente redução na produção de leite pasteurizado⁴. Para incentivar a retomada do crescimento na produção e consumo do leite pasteurizado, é indispensável à melhoria de sua qualidade e segurança, conseqüentemente, aumentando a vida-de-prateleira do produto final.

Inúmeras pesquisas têm verificado a ocorrência de amostras de leite pasteurizado fora dos padrões legais vigentes, o que acarreta risco à saúde do consumidor^{5,6,7}. Com base nessas evidências, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) resolveu criar novas políticas de incentivo à produção leiteira, resultando no desenvolvimento do Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNQL) e na elaboração da Instrução Normativa 51 (IN51)⁸. A IN51 estabelece limite para a contagem de bactérias mesófilas aeróbias viáveis no leite cru (máximo: 10⁶UFC/mL).

Além da contagem de bactérias mesófilas aeróbias viáveis, é importante avaliar a presença de *Staphylococcus aureus* e de coliformes totais e termotolerantes no leite cru. O *S. aureus* pode contaminar o leite, principalmente por estar presente como agente etiológico da mastite. Uma vez presente, e encontrando condições favoráveis à sua multiplicação, esse microrganismo pode atingir números elevados, com produção de enterotoxinas potencialmente capazes de causar toxinfecção alimentar⁹. A pesquisa de coliformes termotolerantes é indicadora de condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, podendo ou não estar associada à presença de enteropatógenos, como *Salmonella*¹⁰.

Outro importante ponto de controle no processamento do leite pasteurizado, além do controle de qualidade da matéria-prima, é a etapa de pasteurização. Esse processo, quando eficiente deve eliminar todas as células vegetativas de bactérias patogênicas e a maioria dos microrganismos deteriorantes, não produzindo alterações significativas, quanto à qualidade nutricional do produto. A IN51 estabelece que a pasteurização é eficiente quando reduz o número de coliformes totais à < 0,3NMP/ml, imediatamente após ter sido submetido a este processo.

Nesse trabalho, características microbiológicas e físico-químicas dos leites cru, recém-pasteurizado e pasteurizado embalado, de uma indústria de laticínios, no Estado da Paraíba, foram avaliadas com o objetivo de certificar-se de que os mesmos atendiam aos padrões de qualidade estabelecidos pelo MAPA⁸.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Amostras dos leites cru, recém-pasteurizado e pasteurizado embalado foram obtidas em uma indústria de laticínios no Estado da Paraíba. Essa indústria possui registro no Serviço de Inspeção Estadual e processa em média 12.600 litros de leite cru, por dia, para a obtenção de leite pasteurizado tipo C, sendo o mesmo recebido a granel, e proveniente de diferentes produtores e municípios do estado. Amostras foram coletadas semanalmente, no período de abril a julho de 2006. O experimento foi conduzido segundo o delineamento casualizado, com 14 repetições. Foi coletado um litro de leite cru no tanque de espera, um litro de leite recém-pasteurizado e de leite pasteurizado embalado (em sacos de polietileno). As amostras foram identificadas e transportadas até o laboratório em caixas isotérmicas contendo gelo. No laboratório, foram homogeneizadas e diluídas, utilizando-se solução salina peptonada 0,1%¹¹.

Métodos

Análises microbiológicas

As amostras foram submetidas às seguintes análises: contagem de bactérias mesófilas viáveis, determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes, pesquisa de *Escherichia coli*, pesquisa de *Salmonella* e contagem de *Staphylococcus coagulase-positiva* e negativa. A pesquisa de *E. coli* foi realizada de acordo com o método descrito no *Bacteriological Analytical Manual*¹⁰. As demais análises foram realizadas de acordo com a metodologia recomendada pelo MAPA¹¹.

Análises físico-químicas

A acidez titulável, em graus Dornic (°D), foi determinada por titulação com solução de NaOH 1N/9 e o pH foi determinado em potenciômetro¹². A pesquisa da enzima fosfatase no leite pasteurizado utilizou um "Kit" comercial para fosfatase (Bio-diagnóstica Indústria Química LTDA) sendo acompanhada por análise simultânea de amostras de leite cru, fervido e água destilada, sendo estes o controle. A pesquisa da enzima peroxidase foi realizada de acordo com a metodologia recomendada pelo Instituto Adolfo Lutz¹².

Análise estatística

Os resultados das contagens de microrganismos e das determinações de pH e acidez foram submetidos aos cálculos de média e desvio padrão, utilizando-se o programa Excell, 1998¹³. Os valores máximo e mínimo da série foram identificados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Características microbiológicas e físico-químicas de leite cru

O leite cru apresentou bactérias mesófilas viáveis em números elevados, sendo a média $5,4 \times 10^6$ UFC/mL, estando todas as amostras acima de 10^6 UFC/mL (Tabela 1), padrão recomendado pelo MAPA⁸. O Número Mais Provável de coliformes totais, nestas amostras, esteve acima de 10^3 NMP/mL (Tabela 1), indicando deficiências nas condições de higiene durante o processo de obtenção do leite. Os coliformes termotolerantes e *E.coli* foram encontrados, respectivamente, em 78,6% e 42,9% das amostras. Contagens de bactérias mesófilas viáveis e de coliformes no leite cru, acima dos limites estabelecidos pela legislação⁸, têm sido verificadas em diversas regiões do país^{14,15,16,17,18}, comprometendo a qualidade do produto final.

A média das contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva no leite cru foi $3,9 \times 10^4$ UFC/mL (Tabela 1), estando abaixo do intervalo considerado significativo (10^5 - 10^6 UFC/mL) para causar intoxicação alimentar¹⁹. Embora a produção de enterotoxina estafilocócica seja comumente associada a *S. aureus* coagulase e termonuclease positiva, outras espécies de *Staphylococcus* (coagulase positivas e negativas) podem produzir enterotoxinas^{19,20,21}. A média da contagem de *Staphylococcus* coagulase negativa foi $2,7 \times 10^4$ (Tabela 1). Carmo et al.¹⁹ relataram um surto envolvendo *Staphylococcus* coagulase negativa em leite cru, com valores que excediam a 2×10^8 UFC/g. A ocorrência de mastite nos rebanhos e as condições higiênico-sanitárias insatisfatórias dos locais onde foram feitas as ordenhas são as hipóteses mais prováveis para a verificação da contaminação por *Staphylococcus* coagulase positiva e coagulase negativa.

Em nenhuma das amostras de leite cru foi detectada a presença de *Salmonella*. Oliveira²², não detectou *Salmonella* ao estudar as características microbiológicas em amostras de leite comercializado no Município de Piracicaba-SP.

Esses resultados indicam a necessidade de implementação ou revisão das práticas de higiene antes e durante a ordenha, adotadas pelos produtores, sendo importante um programa de conscientização dos envolvidos em todas as etapas do processo. A capacitação em organização social, administração e gerenciamento de propriedade rural, a ação mais efetiva dos órgãos competentes locais, como os da Vigilância Sanitária, Vigilância Epidemiológica e Secretaria da Agricultura e Abastecimento, e a divulgação de informações sobre a qualidade do leite e sua importância na saúde humana, são algumas das medidas que devem ser adotadas para a promoção da melhoria da qualidade da matéria-prima.

Com relação às características físico-químicas, as médias obtidas para acidez e pH do leite cru foram, respectivamente, 14,82°D e 6,72 (Tabela 2). Três amostras apresentaram acidez de 13°D, não atendendo a legislação⁸, que considera adequada a acidez do leite entre 14 e 18°D. Substâncias neutralizantes podem ser adicionadas ao leite para reduzir sua acidez com a intenção de fraude²³. Nesta pesquisa, não foram realizadas análises qualitativas para essas substâncias. O pH das amostras esteve situado no intervalo de 6,5 a 6,8, adequado para esse tipo de leite⁸.

Características microbiológicas e físico-químicas de leite recém pasteurizado

A contagem de bactérias mesófilas viáveis no leite recém pasteurizado variou de $1,4 \times 10^4$ a $5,8 \times 10^3$ UFC/mL, sendo a média de $1,4 \times 10^3$ UFC/mL (Tabela 1). Esses resultados estiveram abaixo do limite estabelecido pela IN51 (3×10^5 UFC/mL) para esse grupo de microrganismos em leite pasteurizado tipo C. A permanência de microrganismos viáveis nessas amostras pode ser devida à sobrevivência de bactérias termodúricas e/ou a recontaminação na seção de pré-aquecimento, bem como na seção de resfriamento do pasteurizador^{24,25}. Com relação à contagem de coliformes totais, 35,7% das amostras não atenderam a IN 51, que considera a pasteurização eficiente quando o número desses microrganismos

Tabela 1. Médias e desvios-padrões das análises microbiológicas dos leites cru, recém pasteurizado e pasteurizado embalado, processados em uma indústria de laticínios no estado da Paraíba.

Amostras	Contagem de bactérias mesófilas viáveis (UFC/mL)	Contagem de Coliformes Totais (NMP/mL)	Contagem de coliformes termotolerantes (NMP/mL)	Contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase Positiva (UFC/mL)	Amostras
Leite cru	$5,4 \times 10^6$ $\pm 2,9 \times 10^6$	$2,1 \times 10^5$ $\pm 3,1 \times 10^5$	$9,7 \times 10^4$ $\pm 1,4 \times 10^5$	$3,9 \times 10^4$ $\pm 9,0 \times 10^4$	$2,7 \times 10^4$ $\pm 1,7 \times 10^4$
Leite recém pasteurizado	$1,4 \times 10^3$ $\pm 1,6 \times 10^3$	ND	ND	ND	ND
Leite pasteurizado embalado	$1,4 \times 10^4$ $\pm 3,8 \times 10^4$	ND	ND	ND	ND

ND= Média não determinada

no leite recém pasteurizado não excede a 0,3NMP/mL. Os coliformes termotolerantes estiveram presentes em 4 amostras (28,6%), e *E.coli* foi confirmada em 2 (14,3%) das 14 amostras. As médias do NMP de coliformes totais e termotolerantes não foram determinadas porque em 9 das 14 amostras os resultados estiveram abaixo de 0,3NMP/mL. *Staphylococcus* coagulase negativa esteve presente em duas das 14 amostras, e *Staphylococcus* coagulase positiva em nenhuma das amostras. Por essa razão, não foram determinadas médias dessas contagens. Em nenhuma das amostras foi detectada a presença de *Salmonella*.

Com relação às análises físico-químicas, as médias obtidas para acidez e pH foram, respectivamente, 14,5°D e 6,69 (Tabela 2). A enzima fosfatase não foi detectada, indicando que a temperatura de pasteurização foi atingida²⁶. Em 4 amostras, a peroxidase não foi detectada, e em duas dessas, estiveram presentes coliformes e *Staphylococcus*, o que não deveria ocorrer, considerando que essas amostras foram superaquecidas e que essas bactérias são sensíveis as condições de tempo-temperatura da pasteurização²⁷. Isto evidencia que existiram problemas no pasteurizador, resultando na recontaminação do produto. Lamaita et al.²⁸ detectaram a enzima fosfatase em 7,5% das amostras de leite pasteurizado tipo C, e ausência da enzima peroxidase em 17,5%.

Análises microbiológicas de leite pasteurizado embalado

A contagem de bactérias mesófilas viáveis no leite pasteurizado embalado variou de $1,3 \times 10^2$ a $1,4 \times 10^5$ UFC/mL, sendo a média de $1,4 \times 10^4$ UFC/mL (Tabela 1). Esses resultados estiveram abaixo do limite estabelecido pela IN51 (3×10^5 UFC/mL) para esse grupo de microrganismos em leite pasteurizado tipo C. Quanto ao número de coliformes totais, os resultados variaram de abaixo de 3 a igual ou acima de $2,4 \times 10^3$ NMP/mL, tendo 9 amostras excedido ao limite máximo tolerado (4NMP/mL) para esse tipo de leite. Em 57,1% das amostras foi detectada a presença de coliformes termotolerantes, em números que excediam o limite máximo permitido (2NMP/mL). A presença de *Escherichia coli* foi confirmada em 35,7% das amostras. A contaminação do leite pasteurizado tipo C com coliformes termotolerantes também foi verificada por outros autores^{5,6,7}, em valores acima do padrão estabelecido pelo MAPA, colocando em risco a saúde dos consumidores. Em nenhuma das amostras foi detectada a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva e *Salmonella*. Entretanto, *Staphylococcus* coagulase negativa esteve presente em 21,4% das amostras.

O pH e acidez médios do leite pasteurizado embalado foram, respectivamente, 14,5°D e 6,70 (Tabela 2). Quatro (28,6%) amostras apresentaram acidez abaixo de 14°D, não atendendo ao limite mínimo estabelecido pela legislação⁸. Caldeira et al.²³, ao avaliarem características físico-químicas de três marcas de leite pasteurizado tipo C, comercializadas em Belo Horizonte, observaram que a acidez foi a característica que apresentou maior coeficiente de variação, variando de 11,0 a 16,2°D. Esses

autores fizeram análises qualitativas para substâncias neutralizantes, mas essas não foram detectadas. Lamaita et al.²⁸ verificaram que a acidez titulável de 37,5% das amostras de leite pasteurizado tipo C, beneficiado em Minas Gerais, não atendeu a legislação brasileira.

CONCLUSÕES

As amostras de leite cru analisadas nessa pesquisa apresentaram contagens de bactérias mesófilas viáveis e o número de coliformes elevados, excedendo ao recomendado para um leite obtido em condições de higiene adequadas. 35,7% das amostras de leite tipo C recém-pasteurizado apresentaram coliformes totais, indicando falhas no processo de pasteurização. O teste da fosfatase não foi suficiente para avaliar o bom funcionamento do pasteurizador, sendo necessária à realização de análises microbiológicas de rotina do leite na saída do pasteurizador. O aumento no número de amostras que não atenderam aos limites máximos estabelecidos pela legislação, para coliformes totais, verificado nas amostras de leite pasteurizado tipo C embalado, indicou haver deficiências nas condições higiênico-sanitárias após a pasteurização do leite. A determinação de acidez titulável é um teste simples e rápido que fornece informações sobre a qualidade microbiológica e físico-química do leite.

REFERÊNCIAS

1. Garcia CA, Silva NR, Luquetti BC, Silva RT, Martins IP, Vieira RC. Influência do ozônio sobre a microbiota do leite "in natura". *Hig Aliment* 2000; 14(70): 36-50.
2. Paschoa MF. A importância de se ferver o leite pasteurizado tipo "C", processado por algumas mini e micro usinas de beneficiamento do estado de São Paulo. *Hig Aliment*. 1997; 11(50): 24-8.
3. EMBRAPA. Empresa Brasileira de Agropecuária. Disponível em: <http://www.cnpq.embrapa.br/leite/index.php>
4. Martins RS, Santos CV, Teixeira SR. Alterações da rede logística e expansão do mercado de leite longa vida no Brasil, 1999. Disponível em: <http://www.adae.ufla.br/>.
5. Cerqueira MMO, Souza MR, Fonseca ML. Características físico-químicas e microbiológicas de leite integral pasteurizado em propriedades rurais e colhido no comércio varejista da grande Belo Horizonte – MG. *Rev Inst Latic "Cândido Tostes"* 1997; 52 (299): 28-32.
6. Hoffmann FL, Garcia-Cruz CH, Vinturim TM, Fazio MLS. Microbiologia do leite pasteurizado tipo C, comercializado na região de São José do Rio Preto-SP. *Hig Aliment* 1999; 3 (65): 51-4.
7. Cordeiro CAM, Carlos LA, Martins ML. Qualidade microbiológica de leite pasteurizado tipo C, proveniente de micro-usinas de Campos dos Goytacazes, RJ. *Hig Aliment* 2002; 16 (92/93): 41-44.

8. Brasil 2002. Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 set 2002. Seção 1, p.13.
9. Silva WP. Caracterização fenotípica e genotípica de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de leite de vacas com mastite subclínica e de outras fontes em propriedades produtoras de leite. [Tese de Doutorado] – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.
10. Feng P, Weagant SD, Grant MA. Enumeration of *Escherichia coli* and the coliform bacteria. In: Jackson GJ, Merker RI, Bandler R, editors. Bacteriological Analytical Manual Online. General Guidelines/Procedures [cited 2005 sept5]. Available from URL: <http://www.foodinfonet.com/publication/fdaBAM.htm>.
11. Brasil 2003. Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 set 2003. Seção 1, p.14.
12. Instituto Adolfo Lutz. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 3rd ed. São Paulo: O Instituto; 2005.
13. Neufeld JL. Estatística aplicada à administração usando Excel. São Paulo: Prentice Hall, 2003. 434p.
14. Brito MAVP, Brito JRF, Portugal JAB. Identificação de contaminantes bacterianos no leite cru de tanques de refrigeração. *Rev Inst Latic “Cândido Tostes”* 2002; 57(327): 83-8.
15. Nero LA. *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. em leite cru produzido em quatro Regiões leiteiras no Brasil: ocorrência e fatores que interferem na sua detecção. [Tese de Doutorado] – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
16. Catão RMR, Ceballos BSO. *Listeria* spp., coliformes totais e fecais e *E.coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no Estado da Paraíba (Brasil). *Ciênc e Tecnol Aliment* 2001; 21(3): 281-7.
17. Ramos MPP, Furtado MM, Junior JIR, Muller ES, Souza JG, Ladeira SA. Avaliação microbiológica de leite cru a granel e leite pasteurizado na Região de Viçosa - MG. *Rev Inst Latic “Cândido Tostes”* 2002; 57 (327):170-4.
18. Lange CC, Portugal JAB, Anna APS, Abreu ANI, Brito MAVP, Souza GN. Avaliação da contagem de bactérias mesófilas e psicotróficas no leite cru estocado a 4°C por 48 horas. *Rev Inst Latic “Cândido Tostes”* 2006; 61 (351): 185-7.
19. Carmo LS, Dias RS, Linardi VR, Sena MJ, Santos DA, Faria ME, et al. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiol* 2002; 19 (1): 9-14.
20. Sena MJ. Perfil epidemiológico, resistência a antibióticos e aos conservantes nisina e sistema lactoperoxidase de *Staphylococcus* sp isolados de queijos coalho comercializados em Recife-PE. [Tese Doutorado] – Escola de veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000. 75p.
21. Jay JM. Gastreenterite estafilocócica. In: Jay JM. Microbiologia de Alimentos. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p.471-89.
22. Oliveira RP. Condições microbiológicas e avaliação da pasteurização em amostras de leite comercializadas no Município de Piracicaba - SP. [Dissertação de Mestrado] - Escola Superior de Agricultura – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
23. Caldeira LA, Resende MFS, Viegas RP, Leite MO, Fonseca LM, Penna CFAM, Cerqueira MMOP, Souza MR. Avaliação da qualidade físico-química de leite pasteurizado tipo C comercializado em Belo Horizonte-MG. *Rev Inst Latic “Cândido Tostes”* 2006; 61 (351):107-10.
24. Fonseca LFL, Santos MV. Qualidade do leite e controle de mastite. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175p.
25. Zocche F, Bersot LS, Barcellos VC, Paranhos JK, Rosa STM, Raymundo NK. Qualidade microbiológica e físico-química do leite pasteurizado produzido na Região oeste do Paraná. *Arch Veter Sci* 2002; 7 (2): 59-67.
26. Tronco VM. Manual para inspeção da qualidade do leite. 1nd ed. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria; 2003.
27. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Ecologia microbiana de los alimentos 2. Zaragoza: Acribia; 1980.
28. Lamaita HC , Hotta JM, Veras JF, Silva ACO, Souza MR, Cerqueira MOP, Penna CFAM, Almeida, MR, Mendes RPR. Segurança alimentar de leite pasteurizado tipo C beneficiado em Minas Gerais avaliado por parâmetros microbiológicos e físico-químicos. *Rev Inst Latic “Cândido Tostes”* 2002; 57(327): 297-300.