

# Variação da qualidade do leite cru refrigerado em função do período do ano e do tipo de ordenha

Change in the quality of cooled raw milk due to the year period and type of milking

RIALA6/1264

Marco Antônio Pereira da SILVA<sup>1\*</sup>, Priscila Alonso dos SANTOS<sup>1</sup>, José Waldemar da SILVA<sup>1</sup>, Karen Martins LEÃO<sup>1</sup>, Antônio Nonato de OLIVEIRA<sup>2</sup>, Edmar Soares NICOLAU<sup>2</sup>

\*Endereço para correspondência: Instituto Federal Goiano. Campus Rio Verde. Rodovia Sul Goiana, Km 01, Caixa Postal 66, Zona Rural, CEP – 75.901-040, Rio Verde, GO, Brasil. Tel. (64) 3620-5626. e-mail: marcotonyrv@yahoo.com.br

<sup>1</sup>Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, GO, Brasil

<sup>2</sup>Centro de Pesquisa em Alimentos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás.Goiânia, GO, Brasil

Recebido: 17.11.2009 – Aceito para publicação: 30.03.2010

## RESUMO

O objetivo desta investigação foi de avaliar a qualidade do leite cru refrigerado estocado em propriedades rurais nos períodos de tempo chuvoso e seco. As amostras foram avaliadas quanto a CCS, CBT, composição centesimal, contagem de microrganismos psicrotóxicos e acidez titulável; os dados foram submetidos à análise de variância. Os fatores analisados foram: período do ano (chuvoso ou seco) e tipo de ordenha (manual ou mecânica), em delineamento inteiramente randômico e em arranjo fatorial 2 x 2. A comparação dos resultados em função do período de ano e tipo de ordenha foi realizada por meio do teste F da análise de variância; utilizando-se o programa software SISVAR. A taxa de CBT do leite cru refrigerado estava acima do limite estabelecido pela legislação, o que serve de alerta aos produtores e indústrias na obtenção e processamento de leite com qualidade higiênico-sanitária adequada.

**Palavras-chave.** CCS, CBT, leite refrigerado, microrganismos psicrotóxicos.

## ABSTRACT

The present investigation aims at evaluating the quality of cooled raw milk stored in dairy farms during rainy and dry weathers. The collected samples were analyzed on SCC, TBC, centesimal composition, psychrotrophics count and titratable acidity; the variance analysis was employed for evaluating the observed data. The analyzed factors were weather period (rainy or dry) and milking procedure (manual or mechanical), in a random delineation and in factorial arrangement 2 x 2. The data comparison as per year period and milking technique was performed by means of variance analysis (F-test), using the SISVAR software. The TBC rate of cooled raw milk was over the limit established by the legislation in effect, which indicated the inadequate hygienic-sanitary quality of the cooled raw milk samples analyzed.

**Key words.** cooled raw milk, psychrotrophics microorganisms, SCC, TBC.

## INTRODUÇÃO

O resfriamento logo após a ordenha, e a coleta granelizada, são importantes medidas para garantir a qualidade microbiológica do leite<sup>1</sup>. No entanto, a aplicação isolada dessas medidas, não é suficiente, sendo necessário o uso de práticas higiênicas, durante toda a etapa produtiva, para que a indústria possa receber o leite granelizado com uma baixa contagem bacteriana total (CBT).

A composição microbiológica e físico-química do leite está relacionada à estação do ano, raça, nutrição e fisiologia do animal. O mês, idade ao parto e estágio da lactação são importantes quando se avaliam as variações na produção e composição química do leite<sup>2</sup>. Gonzalez et al<sup>3</sup> observaram a influência dos meses do ano na composição química do leite e na incidência de mastite, o que foi relacionado à disponibilidade e qualidade dos alimentos e às condições climáticas favoráveis aos microrganismos.

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a qualidade do leite cru refrigerado estocado em propriedades rurais nos períodos chuvoso e seco, e a influência do tipo de ordenha.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta das amostras

As amostras de leite cru refrigerado foram coletadas de produtores rurais do Sudoeste Goiano. A empresa com inscrição no Serviço de Inspeção Federal (SIF) possuía fornecedores de leite integrados a um programa de coleta granelizada.

As análises eletrônicas (CCS, CBT) e composição centesimal foram realizadas no Laboratório de Qualidade do Leite (LQL) do Centro de Pesquisa em Alimentos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás. As análises microbiológicas e de acidez titulável foram realizadas nos Laboratórios da Unidade de Agroindústria do Instituto Federal Goiano – *Campus* Rio Verde – GO (IFGoiano).

As amostras de leite cru refrigerado foram coletadas de tanques de expansão de produtores individuais. Foram coletadas amostras em sete propriedades rurais nos períodos chuvoso e sete no período seco.

Das sete propriedades rurais, em cinco a ordenha era realizada manualmente e em duas a ordenha era mecânica. Não foi observado nenhum tipo de tratamento da água de abastecimento, e a pastagem era constituída de *Brachiaria*.

A coleta das amostras de leite cru refrigerado era realizada após o resfriamento de pelo menos duas horas no tanque de expansão, perfazendo um total de 28 amostras por período. As propriedades que subsidiaram as coletas foram as mesmas nos dois períodos avaliados.

Para a avaliação da contagem de microrganismos psicotróficos e acidez titulável as amostras foram coletadas em condições assépticas, com o uso de coletor de aço inoxidável e armazenadas em frascos de cor âmbar ( $\pm 250$  mL). Para a avaliação da CCS e composição centesimal as amostras foram coletadas diretamente em frascos contendo pastilha com conservante Bronopol. A coleta das amostras para a CBT foi realizada diretamente em frascos esterilizados contendo conservante Azidiol. Em seguida as amostras eram acondicionadas em caixa isotérmica contendo gelo e encaminhadas para serem analisadas (LQL e IFGoiano).

### Contagem bacteriana total

A contagem bacteriana total (CBT) foi realizada por meio do equipamento Bactoscan FC (Foss Electric A/S. Hillerod, Denmark). Os resultados foram expressos em UFC/mL.

### Contagem de microrganismos psicotróficos

A diluição da amostra foi preparada pipetando-se, assepticamente, 25 mL da amostra, para um frasco tipo Erlenmeyer, contendo 225 mL de água peptonada 0,1% (diluição  $10^{-1}$ ). A partir desta diluição, foram preparadas diluições decimais até  $10^{-6}$ , empregando-se o mesmo diluente. Foi adicionado 1 mL das diluições em placas de Petri (15 x 100) esterilizadas, em duplicata, e adicionados de 15 a 17 mL de ágar padrão para contagem fundido e resfriado a 45°C e homogeneizada (APHA<sup>4</sup>). Após a solidificação do ágar em temperatura ambiente, as placas foram incubadas invertidas a 7°C/10 dias<sup>5</sup>. As contagens foram realizadas em contador de colônias, em placas que continham entre 25 a 250 colônias. Para calcular o número de unidades formadoras de colônia (UFC)/mL, foi multiplicado o número de colônias, em cada placa, pelo inverso da diluição inoculada.

### Contagem de microrganismos psicotróficos proteolíticos

As diluições decimais foram preparadas conforme o descrito para a contagem de microrganismos psicotróficos. Após as diluições decimais, foi adicionado 1 mL de cada diluição em placas de Petri esterilizadas e adicionados de 15 a 17 mL de ágar leite (agar padrão acrescido de 10%

de leite em pó desnatado reconstituído a 10%) preparado recentemente, fundido e resfriado a 45°C. As placas foram incubadas a 21°C/72 horas<sup>5</sup>. As colônias de microrganismos psicrotóxicos proteolíticos apresentaram-se rodeadas por uma zona clara como resultado da conversão da caseína em compostos nitrogenados solúveis. Como o meio é opaco, utilizou-se um precipitante químico (ácido acético a 10%) para detectar a proteólise, e assim, confirmar se as zonas claras eram causadas por proteólise ou pela formação de ácidos devido à fermentação de carboidratos. Efetuou-se a contagem de colônias que possuíam halo transparente ao redor e calculou-se o número de UFC/mL.

### Contagem de *Pseudomonas* spp.

As diluições decimais foram preparadas conforme o descrito para a contagem de microrganismos psicrotóxicos. Após a realização das diluições decimais, foi adicionado 0,1 mL das diluições em placas de Petri esterilizadas e adicionados de 15 a 17 mL de *Pseudomonas* Agar Base com 5 mL de glicerol. As amostras foram inoculadas no meio de cultura, espalhadas com alça de Drigalski, sendo imediatamente incubadas a temperatura de 28°C por 48 horas. Ao fim desse período, realizou-se a leitura e interpretação<sup>6</sup>. Os resultados foram expressos em UFC/mL.

### Contagem de células somáticas

A análise de células somáticas (CS) foi realizada através do equipamento Fossomatic 5000 Basic (Foss Electric A/S. Hillerod, Denmark). O resultado foi expresso em CS/mL.

### Acidez titulável

A análise foi realizada de acordo com a metodologia descrita por BRASIL<sup>7</sup>. Os resultados foram expressos em gramas (g) de ácido lático/100 mL.

### Composição centesimal

Os teores de gordura, proteína, lactose, extrato seco total (EST) e extrato seco desengordurado (ESD) foram determinados pelo equipamento Milkoscan 4000 (Foss Electric A/S. Hillerod, Denmark). Os resultados foram expressos em porcentagem (%).

### Análises Estatísticas

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com período do ano (chuvoso ou seco) e tipo de ordenha (manual ou mecânica) em arranjo fatorial 2 x 2. A comparação do período do ano e do tipo

de ordenha foi realizada por meio do teste F da análise de variância. As análises estatísticas foram realizadas por meio do Software SISVAR<sup>8</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a análise estatística, não houve significância da interação tipo de ordenha e período do ano.

Na Tabela 1 pode ser observado o resultado da qualidade microbiológica e CCS do leite cru refrigerado.

**Tabela 1.** Qualidade microbiológica e CCS do leite cru refrigerado em função do período do ano e tipo de ordenha

Parâmetros	Período do ano		Tipo de ordenha	
	Chuvoso	Seco	Manual	Mecânica
CBT (UFC/mL)	2,3 x 10 <sup>5</sup> ns	1,9 x 10 <sup>6</sup> ns	2,9 x 10 <sup>5</sup> b	3,0 x 10 <sup>6</sup> a
Psicrotóxicos (UFC/mL)	3,0 x 10 <sup>5</sup> A	2,7 x 10 <sup>5</sup> B	3,1 x 10 <sup>5</sup> ns	2,2 x 10 <sup>5</sup> ns
Proteolíticos (UFC/mL)	1,5 x 10 <sup>5</sup> ns	6,7 x 10 <sup>4</sup> ns	1,2 x 10 <sup>5</sup> ns	8,3 x 10 <sup>4</sup> ns
<i>Pseudomonas</i> spp. (UFC/mL)	4,7 x 10 <sup>4</sup> A	6,8 x 10 <sup>3</sup> B	1,9 x 10 <sup>4</sup> b	4,6 x 10 <sup>4</sup> a
CCS (CS/mL)	2,9 x 10 <sup>5</sup> B	4,9 x 10 <sup>5</sup> A	2,9 x 10 <sup>5</sup> b	6,6 x 10 <sup>5</sup> a

Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas (período do ano) ou minúsculas (tipo de ordenha) na linha diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). ns = não significativo.

A legislação brasileira estabeleceu através da IN 51 que o leite cru refrigerado não deve exceder o limite de 750 mil UFC/mL, no período entre julho de 2008 a julho de 2011, nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul.

Os resultados da CBT obtidos no presente estudo ficaram acima do permitido pela IN 51 no leite ordenhado mecanicamente e durante a estação seca, isso pode ser relacionado à falta de higiene por parte dos manipuladores.

Os valores médios da CBT do presente estudo estão de acordo com Santos<sup>9</sup>, que observou uma alta CBT (4,3 x 10<sup>6</sup>) UFC/mL em amostras de leite granelizado.

Silveira et al<sup>10</sup> relataram que a carga microbiana presente no leite *in natura* tem influência das estações do ano, das práticas de produção e manuseio na propriedade rural, localização geográfica, temperatura de permanência do leite e distância do transporte entre a propriedade rural e o local de beneficiamento.

Os resultados da contagem de psicotróficos do presente estudo ficaram abaixo dos valores encontrados por Santos<sup>9</sup>, que foram de  $2,1 \times 10^6$  UFC/mL. Resultados maiores também foram obtidos por Pinto et al<sup>11</sup>, que relataram contagem de bactérias psicotróficas variando de  $2,0 \times 10^2$  UFC/mL a  $1,0 \times 10^7$  UFC/mL.

De acordo com Fox<sup>12</sup>, as bactérias psicotróficas não são significativas quanto à proteólise, a menos que a população exceda  $10^6$  UFC/mL, entretanto, Cromie<sup>13</sup> relatou que os problemas aparecem quando a contagem atinge  $10^7$  UFC/mL. Para Cousin<sup>14</sup>, os microrganismos psicotróficos evidenciaram atividades bioquímicas mesmo em temperaturas próximas a 0°C.

Embora no período seco a CBT tenha sido mais elevada, a maior contagem de psicotróficos foi observada no período chuvoso, demonstrando que esses microrganismos não têm uma relação direta com a microbiota total e o número de microrganismos psicotróficos e sim com o meio ambiente.

Os resultados da contagem de bactérias psicotróficas proteolíticas observadas neste estudo pode levar ao aumento da proteólise no leite e derivados. Segundo Vidal-Martins et al<sup>15</sup>, durante o armazenamento do leite UAT houve aumento do índice proteolítico e da viscosidade aparente durante a estocagem, relacionado à presença de proteases produzidas por bactérias psicotróficas contaminantes no leite cru. Fonseca e Santos<sup>16</sup> relataram que a temperatura de refrigeração, de cinco a 10°C, contribuiu para a multiplicação de microrganismos psicotróficos.

Os valores da contagem de *Pseudomonas* spp. diferiram significativamente entre os períodos do ano, deixando evidente que esse grupo de microrganismos se desenvolve bem em ambientes com condições higiênico-sanitárias inadequadas. Na época das chuvas a qualidade da água, as condições de higiene dos estábulos, utensílios e ordenhadores, a sanidade do rebanho, contribuíram de modo decisivo, para a maior contagem de psicotróficos. Pode se observar também uma maior contagem de *Pseudomonas* spp. no leite obtido através de ordenha mecânica, evidenciando condições inadequadas de higiene desses equipamentos.

Os resultados da contagem de *Pseudomonas* spp., do presente estudo foram menores que os valores obtidos por Pinto et al<sup>11</sup>, que relataram uma contagem de *Pseudomonas* spp., variando de  $1,0 \times 10^1$  UFC/mL a  $3,8 \times 10^6$  UFC/mL.

Dentre os microrganismos psicotróficos, o gênero *Pseudomonas* spp. representa o grupo de microrganismos

deterioradores predominantes no leite cru refrigerado, particularmente as *Pseudomonas fluorescens*. Costa et al<sup>17</sup> observaram que as *Pseudomonas fluorescens* presentes no leite *in natura*, armazenado a 6°C, produziram enzimas com elevada atividade proteolítica, a partir das 72 horas de incubação e quando a contagem atingia ao redor de  $10^7$  UFC/mL. As proteases liberadas por bactérias proteolíticas causam impacto econômico negativo na industrialização do leite, pois atuam diretamente sobre a caseína, causando sabor amargo no leite e derivados lácteos. Já a lipase, é responsável pelo sabor rançoso do leite devido a liberação de ácidos graxos de cadeia curta<sup>18</sup>.

Lorenzetti<sup>19</sup> observou que durante a estocagem do leite, a contagem de microrganismos psicotróficos aumentou, mesmo com o leite sob temperatura de refrigeração, recomendando-se o menor tempo possível de estocagem para a matéria-prima.

Os resultados médios da CCS foram mais elevados no período seco ( $4,9 \times 10^5$  CS/mL), sendo que no período chuvoso a CCS foi de  $2,9 \times 10^5$  CS/mL. No leite ordenhado mecanicamente ( $6,6 \times 10^5$  CS/mL) os resultados médios da CCS foram maiores que no leite obtido através da ordenha manual ( $2,9 \times 10^5$  CS/mL).

Nas amostras avaliadas por Bueno et al<sup>20</sup> foi observado uma maior CCS no período seco, o que corrobora com os resultados obtidos no presente estudo. A maior CCS no leite obtido através de ordenha mecânica pode estar relacionada ao mau uso dos utensílios e equipamentos de ordenha e à falta de higienização dos tetos antes e após a ordenha, refletindo de maneira expressiva na ocorrência de mastite nos rebanhos.

A CCS do presente estudo está abaixo do limite estabelecido por BRASIL<sup>21</sup> para o recebimento do leite cru refrigerado que é de 750 mil CS/mL, entretanto, os resultados são preocupantes, pois evidenciaram uma alta incidência de mastite sub-clínica nos rebanhos avaliados. A elevada CCS no tanque de expansão pode sinalizar perda de produção de leite, sendo que a baixa CCS no tanque de expansão é um indicativo de bom estado sanitário da glândula mamária.

Os resultados da CCS obtidos no presente estudo foram semelhantes aos valores descritos por Machado et al<sup>22</sup>. Ao avaliarem a qualidade do leite estocado em tanques de expansão em algumas regiões do país, esses pesquisadores obtiveram média de 641 mil CS/mL.

A maior CCS obtida no período seco pode estar relacionada às observações realizadas por Harmon<sup>23</sup> e Philpot<sup>24</sup>, que relataram que a CCS pode aumentar nos meses

mais quentes do ano em decorrência da menor produção de leite e consequente concentração das células somáticas.

Das sete propriedades avaliadas nesta pesquisa cinco ordenhavam o leite manualmente e apenas duas realizavam a ordenha mecanicamente. De acordo com Zanela et al<sup>25</sup>, a maior especialização dos sistemas resulta em maior produção de leite por animal e menor CCS, entretanto, no presente estudo quando o leite foi ordenhado mecanicamente os resultados da CCS foram mais elevados.

Os resultados da acidez titulável e composição centesimal são apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Qualidade físico-química do leite cru refrigerado em função do período do ano e tipo de ordenha

Parâmetros	Período do ano		Tipo de ordenha	
	Chuvoso	Seco	Manual	Mecânica
Acidez titulável (g ácido láctico/100 mL)	0,159 ns	0,169 ns	0,166 ns	0,161 ns
Gordura (%)	3,67 B	4,05 A	4,00 a	3,52 b
Proteína (%)	3,25 ns	3,32 ns	3,27 ns	3,35 ns
Lactose (%)	4,46 B	4,61 A	4,57 a	4,45 b
EST (%)	12,39 B	12,98 A	12,84 a	12,29 b
ESD (%)	8,72 B	8,93 A	8,84 ns	8,77 ns

Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas (período do ano) ou minúsculas (tipo de ordenha) na linha diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). ns = não significativo

Os resultados da acidez titulável estavam de acordo com a legislação brasileira que recomenda o recebimento de leite cru refrigerado com acidez variando de 0,14 a 0,18 g de ácido láctico/100 mL de leite. Resultados semelhantes foram observados por Martins et al<sup>26</sup>, que obtiveram média de 16°D para o mês de março (período chuvoso) e 15,5°D para o mês de julho (período seco).

Os resultados do teor de gordura obtidos no presente estudo estão de acordo com o recomendado por Brasil<sup>21</sup> que admite o recebimento de leite cru refrigerado com o mínimo de 3,0% de gordura. A elevação do teor de gordura no período seco foi relacionada ao maior fornecimento de fibra ao gado de leite, a dieta nesse período era constituída de pastagens de *Brachiaria* e em

alguns casos os animais eram suplementados com cana de açúcar triturada. O maior teor de gordura nesse período também pode ser relacionado à incidência de mastite no rebanho, visto que houve uma maior CCS. Pereira et al<sup>27</sup> observaram maior concentração de gordura no leite de vacas com mastite. Bueno et al<sup>20</sup> informaram que essa elevação pode ser apenas de caráter relativo, em virtude da redução expressiva nos demais componentes. Esses pesquisadores relataram que o teor de gordura do leite diminuiu em consequência da inibição da síntese na glândula mamária.

No presente estudo a porcentagem de gordura foi mais elevada no leite ordenhado manualmente, entretanto, Reis et al<sup>28</sup> encontraram menor teor de gordura no leite submetido ao método de coleta manual em relação ao obtido por ordenha mecânica. Porém, esses pesquisadores informaram que este resultado pode ser relacionado ao fato de que, na coleta manual, coletou-se somente amostra da porção inicial da ordenha, logo, os percentuais de gordura do leite foram menores em relação aos percentuais do leite oriundo de ordenha completa, como é o caso do presente estudo. O menor teor de gordura, observado nas amostras da ordenha mecânica, pode ser relacionado à genética do rebanho, pois os animais com sangue predominantemente holandês produzem menor teor de gordura quando comparado às demais raças.

Os resultados do teor de proteína foram compatíveis com os valores observados por Santos<sup>9</sup>, que obteve 3,23% de proteína em amostras de leite cru refrigerado.

O teor de lactose foi mais elevado durante o período seco e no leite ordenhado manualmente do que o leite obtido no período chuvoso e ordenhado através de ordenha mecânica. Esses resultados ficaram próximos do valor obtido por Santos<sup>9</sup>, que foi de 4,40% de lactose e Noro et al<sup>2</sup>, que relataram média de 4,46% (período chuvoso) e 4,55% (período seco). Os resultados de lactose do presente estudo foram mais elevados no período seco, quando foi observada uma maior CCS, entretanto, Bueno et al<sup>20</sup> observaram uma redução do teor de lactose de 4,60% para 4,36% a medida que a CCS aumentou.

A maior CCS observada no período seco não influenciou os resultados dos sólidos totais, enquanto Bueno et al<sup>20</sup> observaram uma diminuição no EST do leite cru refrigerado em função do aumento da CCS. Houve uma redução de 12,61% para 12,20%.

Os resultados do EST observados nesta pesquisa foram maiores que os resultados obtidos por Gonzalez et al<sup>3</sup>, que relataram média de 12,08% no período chuvoso e

12,04% no período seco e Martins et al<sup>26</sup>, que obtiveram média de 11,41% no período chuvoso e 11,24% no período seco, entretanto esses pesquisadores observaram maior EST no período chuvoso.

Os resultados da composição físico-química ficaram dentro dos limites estabelecidos por BRASIL<sup>21</sup>. Na pesquisa realizada por Zanela et al<sup>25</sup> apenas 41,8% das amostras de leite enquadraram-se nos limites estabelecidos pela IN 51.

## CONCLUSÃO

A CCS e CBT foram mais elevadas no leite granelizado coletado durante o período seco e obtido através da ordenha manual. Evidenciando a necessidade da adoção de medidas higiênico-sanitárias por parte dos elos envolvidos na cadeia produtiva do leite e especialmente quanto ao uso de tecnologia para obtenção do leite *in natura*, a fim de que o leite granelizado possa atender às exigências da legislação quanto a CBT.

A composição centesimal atendeu aos requisitos mínimos estabelecidos pela legislação brasileira para o recebimento do leite cru refrigerado.

## REFERÊNCIAS

1. Nero LA, Mattos MR, Beloti V, Barros MAE, Pinto JPAN, Andrade NJ et al. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51. *Cienc Tecnol Aliment*. 2005; 25(1): 191-5.
2. Noro G, Gonzalez FHD, Campos R, Durr JW. Fatores ambientais que afetam a produção e a composição do leite em rebanhos assistidos por cooperativas no Rio Grande do Sul. *R Bras Zootec*. 2006; 35 (3): 1129-35.
3. Gonzalez HL, Fischer V, Ribeiro MER, Gomes JF, Stumpf Jr W, Silva MA. Avaliação da qualidade do leite na bacia leiteira de Pelotas, RS. Efeito dos meses do ano. *R Bras Zootec*. 2004; 33 (6): 1531-43.
4. APHA – American Public Health Association. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4. ed. Washington: APHA, 2001.
5. Marshall RT. *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*. 16th ed. APHA, Washington, D.C 1992.
6. King EO, Ward MK, Raney DE. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J Lab Clin Med*. 1954; 44: 301.
7. Brasil. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. *Diário Oficial [da] União, Brasília, DF, 14 dez. 2006. Seção 1, Página 8*.
8. Ferreira DF. *Sisvar: versão 4.3 (Build 43)*. Lavras: Departamento de Ciências Exatas: Universidade Federal de Lavras; 2003.
9. Santos PA. Avaliação do leite cru refrigerado produzido na região sudoeste do estado de Goiás estocado por diferentes períodos [Tese de doutorado]. Goiânia, Goiás: Universidade Federal de Goiás, 2008. 50 pp.
10. Silveira IA, Carvalho EP, Teixeira D. Influência de microrganismos psicrotóxicos sobre a qualidade do leite cru refrigerado. Uma revisão. *Hig Aliment*. 2000; 12 (55): 21-7.
11. Pinto CLO, Martins ML, Vanetti MCD. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrotóxicas proteolíticas. *Cienc Tecnol Aliment*. 2006; 26 (3): 645-51.
12. Fox PF (ed.). *Developments in Dairy Chemistry – 4. Functional Milk Proteins*. Elsevier Applied Science, Elsevier Science Publisher Ltd. London and New York; 1989.
13. Cromie S. Psychrotrophs and their enzyme residues in cheese milk. *Austr J Dairy Technol*. 1992; 47 (2): 96-100.
14. Cousin MA. Presence and activity of Psychrotrophic bacteria in South East Queensland dairy products. *Austr J Dairy Technol*. 1982; 37: 147.
15. Vidal-Martins AMC, Salotti BM, Rossi Junior OD, Penna ALB. Evolução do índice proteolítico e do comportamento reológico durante a vida de prateleira de leite UAT/UHT. *Cienc Tecnol Aliment*. 2005; 25 (4): 698-704.
16. Fonseca LFL, Santos MV. *Qualidade do leite e controle de mastite*: Lemos Editora: 2000.
17. Costa LM, Gómez MF, Molina LH, Romero A. Purificación y caracterización de proteasas de *Pseudomonas fluorescens* y sus efectos sobre las proteínas de la leche. *Arch Latinoameric Nutric*, 2002; 52 (2): 1-13.
18. Brito JRFB, Brito MAVP. *Qualidade higiênica do leite*. Juiz de Fora: Embrapa-CNPGL-ADT; 1998.
19. Lorenzetti DK. Influência do tempo e da temperatura no desenvolvimento de microrganismos psicrotóxicos no leite cru de dois estados da região sul [Tese de doutorado]. Curitiba, Paraná: Universidade Federal do Paraná, 2006. 71 pp.
20. Bueno VFF, Mesquita AJ, Nicolau ES, Oliveira NA, Oliveira JP, Neves RBS et al. Contagem celular somática: relação com a composição centesimal do leite e período do ano no Estado de Goiás. *Cienc Rural*. 2005; 35 (4): 848-54.
21. Brasil. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova e Oficializa o Regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru refrigerado. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 20 set. 2002. Seção 1, Página 13-22*.
22. Machado PF, Pereira AR, Silva LFP, Sarriés GA. Células somáticas no leite em rebanhos brasileiros. *Scientia Agrícola*. 2000; 57 (2): 359-61.
23. Harmon RJ. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *J Dairy Sci*. 1994; 77 (7): 2103-12.
24. Philpot NW, Nickerson SC. *Vencendo a luta contra a mastite*. Piracicaba: Westfalia Surge/Westfalia Landtechnik do Brasil; 2002.

25. Zanela MB, Fischer V, Ribeiro MER, Stumpf Junior W, Zanela C, Marques LT et al. Qualidade do leite em sistemas de produção na região Sul do Rio Grande do Sul. *Pesq Agropec Bras*. 2006; 41 (1): 153-9.
26. Martins PRG, Silva CA, Fischer V, Ribeiro MER, Stumpf Júnior W, Zanela MB. Produção e qualidade do leite na bacia leiteira de Pelotas-RS em diferentes meses do ano. *Cienc Rural*. 2006; 36 (1): 209-14.
27. Pereira AR, Silva LFP, Molon LK, Machado PF, Barancelli G. Efeito do nível de células somáticas sobre os constituintes do leite I – gordura e proteína. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 1999; 36 (3): 429-33.
28. Reis GL, Alves AA, Lana AMQ, Coelho SG, Souza MR, Cerqueira MMOP et al. Procedimentos de coleta de leite cru individual e sua relação com a composição físico-química e a contagem de células somáticas. *Cienc Rural*. 2007; 37 (4): 1134-8.