

EFEITO DA ACIDIFICAÇÃO DO LEITE CRU SOBRE MICRO-ORGANISMOS PSICOTRÓFICOS

Marianne Ayumi Shirai*, Maria Lucia Masson.

Programa de Pós-graduação em Engenharia de alimentos, Universidade Federal do Paraná.

Resumo: A contaminação do leite cru com micro-organismos psicrotróficos tem se tornado um fator preocupante, pois estes são capazes de se multiplicarem em temperaturas de refrigeração e produzirem enzimas termorresistentes que afetam a qualidade do leite e produtos derivados. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da acidificação com CO₂ e HCl sobre micro-organismos mesófilos e psicrotróficos presentes no leite cru durante o armazenamento refrigerado. Amostras de leite foram acidificadas com CO₂ e HCl 1N até atingir pH 6,0 e armazenadas a 5 °C durante 10 dias. Os resultados mostraram uma redução média de 1 ciclo logarítmico no crescimento de mesófilos e psicrotróficos nas amostras tratadas com CO₂. A acidificação com HCl não mostrou efeito indicando que a ação inibitória ocorreu devido ao CO₂ e não simplesmente pela redução do pH.

Palavras-chave: Leite; Refrigeração; Carbonatação; Shelf-life.

Effect of acidification of raw milk on psychrotrophic microorganisms: The contamination of raw milk with psychrotrophic micro-organisms has become a concern because they are able to multiply at refrigeration temperatures and produce heat resistant enzymes that affect the quality of milk and dairy products. The objective of this study was to evaluate the effect of acidification with CO₂ and HCl on mesophilic and psychrotrophic bacteria present in raw milk during cold storage. Raw milk samples were acidified with CO₂ and HCl 1N until pH 6.0 and stored at 5 °C for 10 days. The results showed an average reduction of 1 logarithmic cycle in the growth of psychrotrophic and mesophilic microorganisms in samples treated with CO₂. Acidification with HCl showed no effect, indicating that inhibitory action was due to CO₂ not by pH reduction.

Keywords: Milk; Refrigeration; Carbonation; Shelf-life.

1 Introdução

O setor leiteiro brasileiro vem passando por um intenso processo de modernização com significativas mudanças nos sistemas de armazenamento e transporte do leite, visando a melhoria na qualidade do produto nacional. Nos últimos anos, tem-se observado a adoção acelerada de resfriamento do produto na fazenda após a ordenha, com posterior coleta e transporte do leite em caminhões-tanque isotérmicos (SANTOS; FONSECA, 2003). Esse procedimento inicialmente foi regulamentado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento por meio da Instrução Normativa n° 51 em 2002 (BRASIL, 2002), que em

seguida foi substituída pela Instrução Normativa n° 62 em 2011 (BRASIL, 2011).

O armazenamento do leite cru refrigerado na fonte de produção possui as vantagens de reduzir custos de produção, transporte e perda do produto devido à atividade acidificante por bactérias mesófilas. De acordo com Santos e Fonseca (2001), a eficiência da refrigeração do leite logo após a ordenha é maximizada se associada a outros fatores, como a adoção de práticas higiênicas durante a ordenha. Nesse processo de conservação do leite pelo frio, a Instrução Normativa n° 62 de 2011 preconiza que no tempo máximo de 3 horas após a ordenha, o leite seja refrigerado até temperatura igual ou inferior a 4 °C quanto for utilizado o tanque de refrigeração por expansão direta. Em se tratando de tanque de refrigeração por imersão, o leite deve ser refrigerado até temperatura igual ou inferior a 7 °C.

* E-mail: marianneshirai@hotmail.com

A conservação do leite cru em temperaturas de refrigeração por períodos prolongados pode resultar em perda de qualidade, que está associada ao crescimento de bactérias psicotróficas. Microrganismos psicotróficos são capazes de produzir crescimento visível a 7 ± 1 °C no prazo de 7 a 10 dias, independente de sua temperatura ótima (COLLINS, 1981). Na classificação tradicional dos microrganismos em função da temperatura – termófilos, mesófilos e psicófilos – os psicotróficos são um subgrupo dos mesófilos, não dos psicófilos, porque esses últimos não sobrevivem à temperatura ambiente. Os psicotróficos, ao contrário, se multiplicam em alimentos refrigerados, mas crescem melhor nas temperaturas da faixa mesófila (SILVA *et al.*, 2007).

As bactérias psicotróficas produzem enzimas extracelulares (proteases e lipases) termorresistentes, com atividade residual mesmo na ausência de células bacterianas viáveis (GRIFFITHS *et al.*, 1981; PATEL *et al.*, 1983; MUIR, 1996; CHEN *et al.*, 2003). Com o aumento da proteólise há uma redução no valor econômico do leite pelo seu impacto negativo sobre as proteínas funcionais, especialmente a caseína (MA; BARBANO; SANTOS, 2003). O desenvolvimento de altos níveis de ácidos graxos livres devido à lipólise transmite sabor ranço em produtos lácteos, tornando-os sensorialmente inaceitáveis (MA *et al.*, 2000).

Uma das tecnologias que vem sendo estudada para inibir a multiplicação de micro-organismos no leite é a acidificação com dióxido de carbono ou carbonatação. A técnica de carbonatação consiste em injeção de dióxido de carbono sob pressão controlada para acidificar o leite. O valor inicial de pH do leite é retomado por meio da degaseificação a vácuo (RAOUCHE *et al.*, 2008).

King e Mabbit (1982) adicionaram 30 mM/L de dióxido de carbono no leite cru e notaram um aumento no tempo de conservação do leite, com contagem inicial de 10^3 UFC/mL, em 3 dias. Roberts e Torrey (1988) adicionaram de 20 a 30 mM/L de dióxido de carbono em leite cru e verificaram que ao armazenar o leite por um período de 6 dias a 7 °C, a contagem de coliformes, psicotróficos e anaeróbios (facultativos e obrigatórios) foram significativamente mais baixos no leite cru tratado com dióxido de carbono do que o não tratado. A redução do pH do leite de 6,8 para 6,0 com CO₂ causou uma inibição de $1,41 \log_{10}$ UFC/mL em psicotróficos após 4 dias de armazenamento a 7 °C (SIERRA *et al.*, 1996). A mesma redução de pH diminuiu a contagem de psicotróficos lipolíticos em $1 \log_{10}$ UFC/mL após 4 dias a 4 °C (RUAS - MADIEDO *et al.*, 1996).

Ma, Barbano e Santos (2003), acidificaram o leite cru a 4 °C até pH 6,2 através da adição de 1500 ppm de dióxido de carbono e/ou ácido clorídrico. No leite acidificado com dióxido de carbono foi verificado

diminuição no crescimento de psicotróficos, na proteólise e lipólise, em contrapartida a acidificação com HCl não teve o mesmo impacto. Os autores concluíram que o efeito sobre as bactérias foi principalmente devido ao dióxido de carbono e não pela redução do pH ou substituição do oxigênio presente no leite.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da acidificação do leite cru com dióxido de carbono e ácido clorídrico sobre o desenvolvimento de microrganismos psicotróficos e mesófilos durante o armazenamento refrigerado.

2 Material e Métodos

2.1 Material

O leite cru foi obtido de um produtor da região metropolitana de Curitiba – PR. O leite foi coletado logo após a ordenha em frasco estéril e imediatamente encaminhado para os laboratórios da UFPR.

2.2 Acidificação do leite cru

O sistema de acidificação com CO₂ está descrito na Figura 1 e consistiu em uma válvula reguladora de vazão com indicador de pressão (Figura 1, B), uma válvula esfera (Figura 1, C) que permitiu o bloqueio ou alimentação do gás no recipiente e uma válvula de agulha (Figura 1, D) que realizou o ajuste fino da vazão de gás. O leite foi acidificado em reator de vidro com capacidade de 1 litro e este foi imerso em um banho termostático (Tecnal, modelo TE 184, Brasil). Ao final da linha de gás conectou-se um dispersor de gás (Figura 1, F) feito de vidro Pyrex provido de placa porosa na extremidade inferior. A porosidade média foi de 35 µm e a utilização deste permitiu a diminuição no tamanho das bolhas de gás para aumentar o contato com o leite. A adição de CO₂ foi realizada a pressão ambiente, a temperatura de 5 °C e em sistema aberto até o momento em que o leite atingisse pH 6,0. Para a acidificação com HCl empregou-se a mesma temperatura de operação, porém o ácido com concentração de 1 N foi adicionado ao leite gota a gota, sob agitação constante até atingir pH 6,0. Durante todo o processo, o pH foi controlado pelo eletrodo de vidro específico para amostras com proteína, conectado ao pHmetro portátil digital (Metrohm, modelo 826, Brasil) e a temperatura por um termômetro digital. Os leites acidificados foram envasados em garrafas de vidro estéreis e armazenados a 5 °C durante 10 dias. As amostras foram analisadas logo após a acidificação (T0), 5 (T5) e 10 dias (T10) após armazenamento refrigerado.

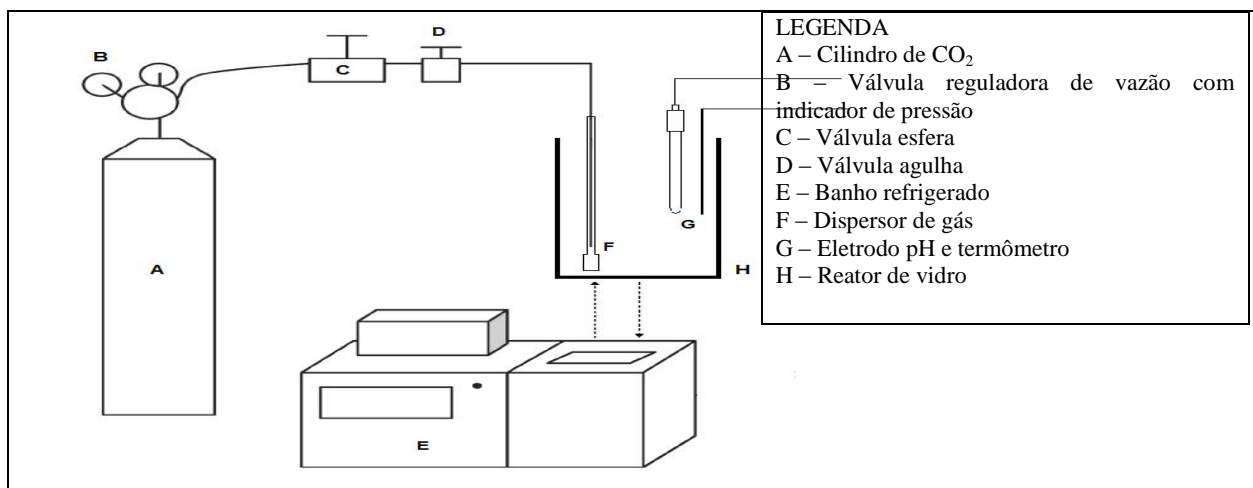


Figura 1 - Sistema para acidificação do leite cru com dióxido de carbono

2.3 Avaliação físico-química e microbiológica

No leite cru foram realizadas as seguintes análises: pH (Metrohm, modelo 826, Brasil), acidez em °Dornic, densidade a 15/15 °C, gordura pelo método de Gerber, proteínas pelo método de Kjeldahl, cinzas por incineração, extrato seco total e extrato seco desengordurado. Todas essas metodologias foram baseadas no Instituto Adolfo Lutz (2008). O teor de lactose foi calculado por diferença através da equação empregada por Sanvido (2007):

$$\text{Lactose (\%)} = \% \text{ Extrato Seco Total} - (\% \text{ Gordura} + \% \text{ Proteína total} + \% \text{ Cinzas})$$

A contagem de mesófilos foi realizada em ágar padrão – Plate Count Agar (Difco), com incubação a 35 °C por 48 horas e a contagem de psicrotóxicos foi feita pelo método de plaqueamento em superfície em ágar padrão - Plate Count Agar (Difco), e incubação a 7 °C por 10 dias (SILVA et al., 2007). Os resultados da contagem foram expressos em log₁₀ UFC/mL.

2.4 Análise estatística

Os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de significância (p < 0,05). A análise estatística foi feita com o auxílio do programa computacional *STATISTICA 7.0* (Stat-Soft, Tulsa, OK, USA).

3 Resultados e Discussão

Os resultados referentes à caracterização físico-química do leite cru encontram-se na Tabela 1. Ao considerar os requisitos físico-químicos do Regulamento técnico de

identidade e qualidade do leite cru refrigerado do MAPA (BRASIL, 2011), pode-se afirmar que todos os parâmetros avaliados encontraram-se em conformidade. Apesar do valor de acidez ter se encontrado abaixo do estipulado pela legislação (13,7 °D), considerou-se que esteve dentro da normalidade, devido ao erro padrão.

Tabela 1 – Caracterização físico-química do leite cru

Características	Valores
pH	6,82 ± 0,01
Acidez (°Dornic)	13,7 ± 0,58
Proteínas (%)	3,33 ± 0,08
Gordura (%)	3,6 ± 0,1
Lactose (%)	5,28 ± 0,1
Extrato seco total (%)	12,83
Extrato seco desengordurado (%)	9,23 ± 0,1
Cinzas (%)	0,627 ± 0,045
Densidade (g/mL)	1,033

NOTA: Média (n=3) ± Erro Padrão

A Tabela 2 apresenta as contagens de mesófilos e psicrotóxicos dos leites acidificados com CO₂ e HCl e da amostra controle armazenados durante 10 dias sob refrigeração (5 °C). A contagem inicial de mesófilos foi de 3,60 log₁₀ UFC/mL, abaixo do estipulado pela IN n° 62 de 2011 do MAPA que estabeleceram uma contagem máxima de 7,5 x 10⁵ UFC/mL ou 5,88 log₁₀ UFC/mL para as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil desde julho de 2008. Micro-organismos mesófilos predominam em situações em que há falta de condições básicas de higiene e quando há falta de refrigeração do leite. Em tais circunstâncias, essas bactérias atuam fermentando a lactose, produzindo ácido láctico e acidificando o leite (SANTOS; FONSECA, 2002). Assim, considerou-se que foram adotadas boas práticas higiênicas durante a ordenha, estocagem e transporte até o estabelecimento.

Tabela 2 – Contagem de mesófilos e psicrotróficos das amostras controle e acidificadas durante 10 dias de armazenamento refrigerado.

Tempo (dias)	Mesófilos (log ₁₀ UFC/mL)			Psicrotróficos (log ₁₀ UFC/mL)		
	Controle	CO ₂	HCl	Controle	CO ₂	HCl
0	3,60±0,12 ^{aA}	3,52±0,07 ^{aA}	3,64±0,06 ^{aA}	3,17±0,18 ^{aA}	3,24±0,05 ^{aA}	3,37±0,16 ^{aA}
5	5,10±0,09 ^{a,bB}	4,79±0,04 ^{aB}	5,45±0,10 ^{bB}	5,25±0,06 ^{a,bB}	4,95±0,08 ^{aB}	5,63±0,05 ^{bB}
10	5,73±0,21 ^{bC}	4,21±0,28 ^{aC}	5,97±0,05 ^{bB}	5,74±0,24 ^{bB}	4,51±0,27 ^{aB}	5,90±0,03 ^{bB}

NOTA: Médias seguidas de letras minúsculas na linha e letras maiúsculas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de significância.

Foi possível constatar que a população predominante nos leites durante o armazenamento refrigerado foi psicrotrófica, pois as contagens foram próximas da população mesófila. Celestino *et al.* (1996) constataram uma relação entre a contagem de bactérias psicrotróficas e mesófilas aeróbias de 47 a 80 % em amostras de leite cru estocadas a 4 °C por 48 horas. Cardoso (2006) encontrou uma proporção de psicrotróficos em média de 87,5 % em relação à contagem de mesófilos.

Cardoso (2006) ainda ressalta que embora não exista na legislação um limite para a população de bactérias psicrotróficas no leite cru, este é utilizado como um indicador suplementar da qualidade do leite. Já de acordo com Pinto, Martins e Vanetti (2006) é imprudente a fabricação de produtos a partir do leite cru com contagem de psicrotróficos superior a 5,0 x 10⁶ UFC/mL, pois neste caso é grande a possibilidade da presença de enzimas degradativas extracelulares.

No tempo inicial, a acidificação não interferiu no metabolismo dos micro-organismos, pois as contagens foram estatisticamente iguais. No entanto, a partir do quinto dia de armazenamento a contagem do leite acidificado com CO₂ começou a ficar menor em relação às demais amostras e em T10 ficou estabelecida uma contagem menor para o tratamento com CO₂. Resultados similares foram encontrados por Ma, Barbano e Santos (2003) e que afirmam que o efeito inibitório do CO₂ ocorreu durante a estocagem sob refrigeração e não logo ao ser adicionado ao leite.

Após 10 dias, as contagens de mesófilos e psicrotróficos do leite acidificado com CO₂ foram mais de um ciclo logarítmico menor do que as amostras controle e tratado com HCl. Resultados parecidos foram obtidos por Ruas-Madiedo *et al.* (1996), onde o leite tratado com CO₂ reduziu em 1 a 1,5 logaritmos o crescimento de mesófilos. Ma, Barbano e Santos (2003) constataram que ao adicionar 1500 ppm de CO₂ ao leite cru, houve uma diminuição de 1 a 2 ciclos logarítmicos na contagem de mesófilos e de 2 ciclos logarítmicos na de psicrotróficos após 21 dias de armazenamento a 4 °C. Roberts e Torrey (1988) verificaram que após 6 dias de armazenamento a 7 °C o leite cru contendo 25 mM/L de CO₂ teve 3,4 log₁₀ UFC/mL menos psicrotróficos quando comparado ao controle. Espie e Madden (1997) afirmam que a utilização de 30 e 45 mM/L de CO₂ foi efetiva na inibição do crescimento de psicrotróficos, quando o

leite foi armazenado a 6 °C por 7 dias. De acordo com Rowe (1988), o CO₂ também pode afetar a produção de enzimas extracelulares por micro-organismos psicrotróficos, sendo que foi observada uma redução de 50 % na produção de proteases e a produção de lipases foi 85 % maior no leite não tratado.

Os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que a simples redução do pH não foi suficiente para inibir o crescimento dos micro-organismos, pois as amostras acidificadas com HCl apresentaram contagem iguais ao controle e maior que as amostras tratadas com CO₂. Isso permite afirmar que o efeito sobre as bactérias foi principalmente devido ao dióxido de carbono e não pela redução do pH ou substituição do oxigênio presente no leite. Uma tentativa de explicar a ação inibitória do CO₂ seria sua habilidade de mudar a propriedade da membrana microbiana, diminuir o pH intracelular e interferir nas reações enzimáticas (MA; BARBANO; SANTOS, 2003).

Apesar dos benefícios da acidificação do leite cru pelo CO₂, estudos ainda são necessários para verificar o efeito deste processo sobre outros micro-organismos e componentes físico-químicos do leite uma vez que a legislação brasileira ainda não permite o uso de aditivos químicos e coadjuvantes tecnológicos em leite cru refrigerado.

4 Conclusão

A acidificação com CO₂ pode ser uma tecnologia promissora, pois foi capaz de reduzir em média um ciclo logarítmico o crescimento de bactérias mesófilas e psicrotróficas em leite cru durante o seu armazenamento refrigerado. O aumento do tempo de armazenamento do leite cru e do leite pasteurizado pode trazer benefícios econômicos para a indústria leiteira em virtude do aumento da flexibilidade na utilização e distribuição do leite.

5 Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES e o CNPq pelo apoio financeiro.

6 Referências

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº51, de 18 de setembro de 2002. **Coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, p.8-13, 20 set. 2002 a. Seção I.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº62, de 29 de dezembro de 2011. **Regulamento técnico de identidade e qualidade do leite cru refrigerado**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, p.6-11, 30 dez. 2011. Seção I.
- CARDOSO, R. R. **Influência da microbiota psicrotrofica no rendimento de queijo minas frescal elaborado com leite estocado sob refrigeração**. 43 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.
- CELESTINO, E. L.; IYER, M.; ROGINSKI, H. The effects of refrigerated storage on the quality of raw milk. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 51, p. 59-63, 1996.
- COLLINS, E. B. Heat resistant psychrotrophic microorganism. **Journal Dairy Research**, v. 64, p. 157-160, 1981.
- DANIELS, J. A.; KRISHNAMURTHI, R.; RIZVI, S. S. H. A Review of effects of carbon dioxide on microbial growth and food quality. **Journal of Food Protection**, v. 48, n. 6, p. 532-537, 1985.
- ESPIE, W. E.; MADDEN, R. H. The carbonation of chilled bulk milk. **Milchwissenschaft**, v. 52, n. 5, p.249-253, 1997.
- GRIFFITHS, M. W.; PHILIPS, J. D.; MUIR, D. D. Thermostability of proteases and lipases from a number of species of psychrotrophic bacteria of dairy origin. **Journal Applied Bacteriology**, v. 50, p. 289-303, 1981.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 4 ed, 2008.
- KING, J. S.; MABBITT, L. A. Preservation of raw milk by the addition of carbon dioxide. **Journal of Dairy Research**, v.49, p.439-447, 1982.
- LOSS, C. R.; HOTCHKISS, J. H. The use of dissolved carbon dioxide to extend the shelf-life of dairy products. In: SMIT, G. **Dairy processing – Improving quality**. Boca Raton: CRC Press, p. 5-38, 2000.
- MA, Y.; RYAN, C.; BARBANO, D. M.; GALTON, D. M.; RUDAN, M. A.; BOOR, K. J. Effects of somatic cell count on quality and shelf-life of pasteurized fluid milk. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 264-274, 2000.
- MA, Y.; BARBANO, D. M. Effect of temperature of CO₂ injection on the pH and freezing point of milks and creams. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 1578-1589, 2003.
- MA, Y.; BARBANO, D. M.; SANTOS, M. Effect of CO₂ addition on raw milk on proteolysis and lipolysis at 4 °C. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 1616-1631, 2003.
- MARSHALL, D. L.; SCHMIDT, R.T. Growth of *Listeria monocytogenes* at 10°C in milk inoculated with selected *Pseudomonas*. **Journal of Food Protection**, v.51, n. 4, p. 227-282, 1998.
- MARTIN, J. D.; WERNER, B. G.; HOTCHKISS, J. H. Effects of carbon dioxide on bacterial growth parameters in milk as measured by conductivity. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 1932-1940, 2003.
- PATEL, T. R.; BARTLETT, F. M.; HAMID, J. Extracellular heat-resistant proteases of psychrotrophic *Pseudomonas*. **Journal of Food Protection**, v.46, p.90-94, 1983.
- RAOUCHE, S.; DOBENESQUE, M.; BOT, A.; CUQ, J. L.; MARCHESSEAU, S. Stability of casein micelles subjected to CO₂ reversible acidification: Impact of carbonation temperature and chilled storage time. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 221-227, 2008
- ROBERTS, R. F.; TORREY G. S. Inhibition of psychrotrophic bacterial growth in refrigerated milk by addition of carbon dioxide. **Journal of Dairy Science**, v.71, p.52-60,1988.
- ROWE, M. T. Effect of carbon dioxide on growth and extracellular enzyme production by *Pseudomonas fluorescens*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 6, p. 51-56, 1988.
- RUAS-MADIEDO, P.; BADA-GANCEDO, J. C.; FERNANDEZ-GARCIA, E.; DELLANO, D. G.; REYES-GAVILÁN, C. G. Preservation of the microbiological and biochemical quality of raw milk by carbon dioxide addition: a pilot-scale study, **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 5, p. 502-508, 1996.
- RUAS-MADIEDO, P.; BASCARÁN, V.; BRAÑA, A. F.; BADA-GANCEDO, J.; REYES-GAVILÁN, C. G. Influence of Carbon Dioxide addition to raw milk on microbial levels and some fat-soluble vitamin contents of raw and pasteurized milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 1552-1555, 1998.
- SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Importância e efeito de bactérias psicrotólicas sobre a qualidade do leite. **Revista Higiene Alimentar**, v.15, n.82, p.13-19, 2001.
- SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Composição e propriedades físico-químicas do leite. **Curso on-line sobre monitoramento da qualidade do leite**, módulo 1. Instituto Fernando Costa – Milkpoint, 2002.
- SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Bactérias psicrotólicas e a qualidade do leite. **Revista CBQL**, v.19, p. 12-15, 2003.
- SANVIDO, G. B. **Efeito do tempo de armazenamento do leite cru e da temperatura de estocagem do leite pasteurizado sobre sua vida de prateleira**. 78 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.
- SIERRA, I.; PRODONAV, M.; CALVO, M.; OLANO, A.; VIDAL-VALVERDE, C. Vitamin stability and growth of psychrotrophic bacteria in refrigerated raw milk acidified with carbon dioxide, **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 12, p.1305-1310, 1996.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 3 ed, 2007.