

## INIBIDORES BACTERIANOS NO LEITE DE CONSUMO DA CAPITAL (1)

### BACTERIAL INHIBITORS PRESENT IN MILK OF S. PAULO, BRAZIL

ALEXANDRE MELLO FILHO (2)  
LAURO ALBANO SANDOVAL (3)  
NELSON DOS REIS RODRIGUES (4)  
JOSÉ XIMENES (5)

#### S U M M A R Y

For the last twenty years the literature dealing with the presence of bacterial inhibitors in milk and its derivatives has been increasing steadily.

Bacterial inhibitors in milk may be originated either from antibiotics given to the cows or from chemical treatment of the pipeline.

In 1959, Food & Drug Administration, U. S. A., declared undesirable the presence of penicillin in milk dairy products since it may cause chronic or recurrent dermatosis. Nation wide research programs demonstrated different levels of antibiotic in milk and derivatives.

The presence of bacterial inhibitors may, further, lead to errors in standard tests carried out in milk such as reductase test, bacterial counts, acidity test, etc.

Milk containing inhibitors may respond satisfactorily to routine tests, in spite of being highly infected in its source. On the other hand, milk produced under hygienic conditions may yield less satisfactory results in such tests.

The inhibitors may influence the normal flora metabolic capacity decreasing acid production and therefore affecting adversely the industrialization of milk.

In Brazil there has been practically no research programs carried out with the purpose to detect the presence of such inhibitors, mainly penicillin, in milk and dairy products.

One thousand samples of milk (type C) from São Paulo have been tested by means of tests that can be read after 2h30m to 3h30m. In 9% of the samples, inhibitors were found and penicillin levels between 0.05 to 0.5 U. I./ml were found in 1.9% of the samples.

#### INTRODUÇÃO

Há mais de 15 anos vem a literatura mundial, notadamente a norte-americana, se enriquecendo com inúmeros trabalhos de pesquisa da presença de substâncias inibidoras do crescimento bacteriano no leite, principalmente os antibióticos e, destes, destacadamente a penicilina pela maior faci-

lidade na sua pesquisa com a utilização da enzima específica — a penicilinase.

Conforme citam MARTH & ELLICKSON<sup>1</sup>, em 1959 e MARTH<sup>2</sup> e VAID<sup>3</sup>, em 1961, em trabalhos de revisão da literatura a respeito da presença de resíduos de antibióticos no leite e derivados, com o advento da antibiótico-terapia, os antibióticos passaram a ser empregados há quase duas

- (1) Realizado nos Laboratórios da Cooperativa Central de Laticínios do Estado de São Paulo. Apresentado, em caráter de nota preliminar, no Departamento de Higiene e Medicina Tropical da Associação Paulista de Medicina, em 4-8-1966.
- (2) Chefe da Clínica Dermato-sifilográfica do Hospital Municipal. Bacteriologista-Chefe da Cooperativa Central de Laticínios do Estado de São Paulo.
- (3) Chefe da Seção de Industrialização do Leite do Departamento de Produção Animal.
- (4) Chefe da Divisão de Controle de Qualidade, de Laborerápica-Bristol S/A.
- (5) Chefe do Laboratório de Controle Microbiológico da Laborerápica-Bristol S/A.

décadas, por fazendeiros e veterinários, no tratamento das doenças infecciosas do gado, das quais indubitavelmente a mais freqüente é a mastite, sendo também comum a incorporação daquelas drogas nas dietas suplementares, na alimentação do gado ou mesmo na conservação das silagens.

Os diversos antibióticos, nos animais afetados pela mastite, são administrados geralmente em solução ou suspensão, difundidos no quarto ou quartos do úbere infectado.

A penicilina foi a primeira de uma série de antibióticos empregados no tratamento daquela infecção, já em 1946, sendo após utilizados os demais — estreptomomicina, tetraciclínicos, cloranfenicol, neomicina, bacitracina, subtilina e polimixina — isoladamente ou em forma de associação medicamentosa.

A ordenha de animais assim tratados, num período médio de até 72 horas ou seja três dias após a última aplicação, revelou nitidamente a presença dos antibióticos em uso. Entretanto, outras doenças infecciosas acometem o gado leiteiro, havendo a necessidade do emprêgo de diversos antibióticos administrados, entre outras vias, principalmente pela oral, intra-uterina ou injetável, com eliminação relativamente rápida daquelas substâncias.

Porém, quando se utiliza a penicilina "retard", especialmente a benzatina, a sua eliminação extremamente lenta resulta na presença contínua e prolongada do medicamento no leite ordenhado <sup>4, 5, 6</sup>.

Não é de se estranhar, pois, que tais práticas venham condicionando o aparecimento dos antibióticos no leite, principalmente quando os animais tratados não são afastados do rebanho, por período de tempo adequado.

A contaminação antibiótica dependerá evidentemente do número de animais em tratamento, da quantidade do leite que os mesmos produzem em relação ao total ordenhado e da potência maior ou menor do antibiótico empregado.

Entretanto, além do uso abusivo e indiscriminado daquelas preparações, conforme acentua o "The Journal of the American Medical Association", no seu artigo "Penicillin and others antibiotics in milk", existe

alguma suspeita de que os antibióticos estejam sendo diretamente adicionados ao leite, como recurso de conservação contra a deterioração do produto, verificada por excessiva multiplicação da flora microbiana, no verão ou nos dias em que a temperatura se mantém elevada <sup>7</sup>.

Nos últimos anos, uma série de trabalhos de pesquisa estatística tem sido realizada nos Estados Unidos, Canadá e Grã-Bretanha, entre outros, visando determinar a incidência de antibióticos no leite dado ao consumo.

Nos Estados Unidos, três investigações foram levadas a efeito seguidamente em 1954, 1955 e 1956, pela *Food and Drug Administration*, tendo sido constatada a presença de penicilina, bacitracina e tetraciclina no leite analisado nesses anos. A penicilina foi encontrada em 3,2%, 11,6% e 5,9% das amostras examinadas respectivamente em 1954, 1955 e 1956 e em níveis que variavam entre os valores de 0,003 a 55 unidades por mililitro de leite.

Na Grã-Bretanha, as investigações realizadas no verão e inverno de 1951 e em 1953 demonstraram a presença da penicilina respectivamente em 1,4%, 2,8% e 3,2% das amostras de leite analisadas e com níveis do antibiótico variando entre 0,25 e em 15 unidades por mililitro, em 1951 e 0,1 a 1,17 unidades, em 1953.

Porém as conseqüências, da ordem de Saúde Pública, do uso veterinário dos antibióticos e do seu aparecimento no leite dado ao consumo humano foram se traduzindo no aparecimento de raças de estreptococos e estafilococos patogênicos, originários das mastites e tornados antibiótico-resistentes e que são eliminados no leite a par com o antibiótico, já agora ineficiente <sup>2, 8</sup>.

Foi também relatada a ação das drogas sobre o equilíbrio e composição microbiana da flora intestinal humana, com evidente interferência na síntese local microbiana das vitaminas <sup>8, 9</sup>.

O leite com contaminação penicilínica tem sido apontado por diversos pesquisadores como o causador, em pessoas previamente sensibilizadas, de processos alérgicos cutâneos, dos quais os mais freqüentes são as urticárias crônicas recorrentes <sup>10, 11, 12, 13</sup>.

Entretanto, os métodos usados comumente para o beneficiamento do leite, a pasteu-

rização e o resfriamento, não afetam os antibióticos. O leite, em estado de cru, sofre uma série de operações industriais: pasteurização, evaporação, secagem e resfriamento, de acordo com a finalidade do seu uso, "in natura", em pó ou condensado.

O calor não afeta sensivelmente os antibióticos. A atividade da penicilina no leite permanece parcialmente, mesmo após a fervura durante 60 minutos, ou autoclavagem durante 15 a 30 minutos.

Os demais antibióticos são igualmente bastante termo-resistentes. A clortetraciclina não é inativada pelo tratamento térmico a 63° C, durante 30 minutos, 88° C durante 60 minutos ou 121° C durante 15 minutos<sup>14</sup>.

Segundo OVERBY <sup>apud</sup> 2, 1952, a pasteurização do leite não inativa os seguintes antibióticos: clortetraciclina, cloranfenicol, estreptomina e oxitetraciclina. A penicilina, igualmente, passa indene pela pasteurização.

A separação do leite em creme e leite desnatado, segundo estudos de HANSEN, WIGGINS & BOYD<sup>15</sup>, 1950, não aumenta a concentração da penicilina ou da estreptomina. A estocagem do leite refrigerado a 8 ou 10° C não interfere, durante um período que vai até sete dias, na atividade dos seguintes antibióticos: penicilina, estreptomina, clortetraciclina, magnamicina, bacitracina e polimixina.

Segundo HIBBS & BOYD <sup>apud</sup> 2, 1957, ficou demonstrado que as amostras do leite contendo oxitetraciclina, penicilina, neomicina, estreptomina ou clortetraciclina podem permanecer congeladas cerca de 12 semanas, sem perda da atividade antibiótica.

Os autores têm referido a presença de atividade antibiótica no leite em pó.

Entretanto, não só os antibióticos surgem no leite, em consequência possivelmente de resíduos resultantes do tratamento veterinário do gado leiteiro, como também, embora com muito menor frequência, têm sido encontrados os sulfamídicos<sup>16</sup>.

Conforme bem descreveu MARTH<sup>17</sup>, no leite foram identificadas substâncias químicas diversas, principalmente compostos de amônio quaternário e derivados complexos de iodo, associados ou não a detergentes, decorrentes da higienização do vasilhame e do equipamento em geral, empregados

na indústria de laticínios, e capazes de agir como substâncias inibidoras do crescimento bacteriano, mesmo quando presentes em 10 ou 30 p.p.m.

Assim é que em 1954, nos Estados Unidos, um estudo estimativo realizado com a finalidade de revelar a incidência de substâncias inibidoras em geral, dos *starter* lácticos, realizados em grandes centros populacionais — Columbia, Dodge, Dane, Manitowoc Counties e Wisconsin — demonstrou a presença daquelas substâncias em 4,3% das amostras testadas, capazes de reduzir significativamente a atividade das culturas de fermentos lácticos selecionados, com repercussão evidente na industrialização dos derivados do leite.

Essas substâncias entretanto, segundo se supôs, deviam ser constituídas principalmente por antibióticos. No Canadá, no verão de 1952, pesquisa idêntica demonstrou que as culturas lácticas *starter* eram inibidas em 7,3%, nas 344 amostras analisadas.

É ponto pacífico a ação indesejável de pequenos traços dessas substâncias inibidoras, quer de origem química, porém principalmente os de origem bioquímica, na industrialização do queijo, manteiga e principalmente dos produtos dietéticos fermentados — coalhada, quefir, iogurte e outros<sup>18, 19, 20</sup>.

Uma questão importante, da esfera da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal, é o fato de a atuação bacteriostática das substâncias inibidoras, notadamente os antibióticos, criar condições adversas à multiplicação da flora banal de contaminação que, permanecendo parcialmente imobilizada, dissimulará a má qualidade de certos produtos, interferindo portanto na capacidade avaliadora das provas de rotina, e no tempo de desenvolvimento da prova da redutase, efetuada com o azul de metileno<sup>21, 22</sup>.

Além desses aspectos vistos, WECKEL<sup>23</sup>, em em 1960, pôs em evidência o problema criado pelos pesticidas largamente usados nos Estados Unidos pela moderna agricultura e sem os quais a produção de certas colheitas cairia periodicamente ao índice zero.

Os pesticidas são utilizados sob várias formas: nematocidas, herbicidas, fungici-

das, inseticidas, além dos tratamentos especiais, como os reguladores do crescimento, dessecantes e outros mais.

Tendo em vista a multiplicação do número de fazendas com larga extensão territorial cultivável ou de pastagens, o moderno uso do pesticida, conforme assinalou Weckel, tornou-se mais do que uma necessidade imprescindível, um verdadeiro seguro contra possíveis riscos na proteção dos investimentos.

As vantagens econômicas do seu emprêgo são tão grandes que nos Estados Unidos, já em 1958, as determinações do *Food Drug and Cosmetic Act*, que dispunham sôbre o registro, dados de revisão técnica etc., estabeleciam tolerância para sua presença nos suplementos alimentares.

A intensificação da produção do leite nas fazendas e granjas leiteiras levou à necessidade da aquisição de grãos e suplementos forrageiros cultivados por outrem, que não um criador de gado, o qual muitas vezes sem saber o destino que tais produtos iriam ter — como o de alimentação de um rebanho produtor de leite — empregava pesticidas para preservar a sua colheita.

Além do mais, os pesticidas empregados seguidamente, em seus diferentes tipos, permanecem no solo pelo período de vários anos, decompondo-se, muitas vezes, em produtos mais tóxicos do que os anteriores e, no organismo humano, têm ação acumulativa<sup>24</sup>.

Embora a “filosofia administrativa enuncie que o leite e seus derivados devem estar *analiticamente* livres dos pesticidas e antibióticos”, vem se tornando cadavez mais difícil estabelecer o conceito da absoluta ausência daquelas e outras substâncias oriundas das mais diversas manipulações, pois as técnicas no seu aperfeiçoamento constante tornam-se mais sensíveis, facultando a pesquisa de níveis de resíduos cada vez mais baixos, dados até então como ausentes.

Há evidência de que o nível livre zero não pode ser aplicado nos últimos tempos na pesquisa da presença de inibidores veiculados pelo leite, devido ao emprêgo abusivo e indiscriminado dos antibióticos e quimioterápicos em terapêutica humana<sup>25</sup>, nem à própria mãe que amamenta.

Entretanto, conforme concluiu o autor, a extensão dos efeitos resultantes do emprêgo dessas substâncias químicas em agricultura, quando presentes nos produtos de laticínios, ainda não está bem investigada.

Nos Estados Unidos, em 1955, *The Food and Drugs Administration*, como definição do seu ponto de vista, considerou o leite contaminado com antibiótico, como adulterado, levando em conta o risco do seu consumo por pessoas sensibilizadas e da possibilidade de dar origem a raças de germes patogênicos resistentes a tais drogas.

Entretanto, em que pese o vulto dos trabalhos de pesquisa efetuados, há quase duas décadas, e do número de publicações existentes na literatura mundial, no Brasil ainda não se cuidou de avaliar direta ou indiretamente (pesquisa de substâncias inibidoras) a percentagem e grau da contaminação antibiótica do leite dado ao consumo humano.

O regulamento federal brasileiro, da Inspeção Industrial e Sanitaria de Produtos de Origem Animal<sup>25</sup>, aprovado em 1952 e parcialmente modificado<sup>26</sup> em 1962, não obstante recomendar como único critério para a avaliação da contaminação microbiana do leite cru, tipo C, a prova da reductase pelo azul de metileno, não cuidou também de exigir fundamentalmente a pesquisa da presença das substâncias inibidoras e da penicilina, que afetam os resultados obtidos para aquela prova.

Tendo em vista a importância do assunto, quando recentemente, ainda há alguns meses passados, em congresso de Alimentação Pública realizado em Paris<sup>27</sup>, se adotou a decisão de que devem os alimentos levar etiquetas garantindo a sua qualidade e ausência de antibióticos, e a oportuna reformulação do nosso Regulamento de Inspeção, que se está processando, tomamos a iniciativa de realizar na Capital de São Paulo a presente pesquisa, com a finalidade de situar o grau da contaminação química e bioquímica de cerca de um milhão de litros de leite diariamente consumidos pela população paulistana.

## MÉTODOS

Multiplos são os métodos descritos pelos diversos autores, visando determinar a presença das substâncias inibidoras, com as

suas virtudes analíticas postas em ênfase, numa demonstração cabal de que o método ideal ainda está por surgir.

Todos êles se baseiam nas modificações do crescimento bacteriano e se distribuem em três principais grupos que se fundamentam em:

- a) Redução de corantes
- b) Produção de ácido
- c) Emprêgo do disco e da placa agar-agar-germe de prova.

Tendo em vista a necessidade de empregarmos métodos os mais rápidos possíveis, capazes de serem reproduzidos mesmo em pequenos laboratórios de controle higiênico do leite, das usinas de beneficiamento do interior, aproximando-se, guardado o limite horário da sua execução, aos chamados métodos de plataforma, lançamos mão do emprêgo de três principais processos, complementados por outras provas subsidiárias:

Dois destes processos, recomendados pelo *Standard Methods*<sup>28</sup>, 1960, são baseados o primeiro no emprêgo do complexo disco, placa e germe de prova e o segundo no da redução do C. T. T., por nós utilizados, com algumas modificações.

O terceiro processo, tendo como fundamento a produção do ácido láctico por germes de prova, fermentadores da lactose, foi por nós especialmente adaptado às circunstâncias, na necessidade da obtenção de um resultado rápido. Embora sendo por si mesmo um teste informativo individualizado de grande valia, funciona, no conjunto, frisantemente como prova e também contra prova do teste da redução do C. T. T.

No leite, os inibidores em potencial do crescimento bacteriano são representados pelos seguintes tipos<sup>28</sup>:

- a) Resíduos de substâncias químicas utilizadas na higienização do equipamento empregado na linha de beneficiamento do leite.
- b) Resíduos de sulfas empregadas com finalidade terapêutica.
- c) Resíduos de antibióticos utilizados com finalidade terapêutica.
- d) Bacteriófagos.
- e) Outras substâncias não identificadas, algumas naturais e peculiares a determinadas vacas.

Portanto, como cuidado obrigatório de ordem geral, tendo em vista a possibilidade da presença, no leite, de bacteriófagos ou de inibidores naturais e, levando em consideração a termo-resistência das demais substâncias inibidoras, todo e qualquer método de pesquisa de inibidores deve ser precedido do aquecimento, em laboratório, do leite cru ou pasteurizado a 80° C, durante 5 minutos.

Êsse aquecimento, destruindo as substâncias inibidoras naturais, impedirá a produção de falsos resultados positivos.

Outro cuidado necessário é o de se providenciar, em todo o material de laboratório, em especial a vidraria, a remoção de vestígios de detergente ou de mistura sulfocrômica etc., enfim, os ingredientes higienizadores empregados na rotina.

Os processos postos em execução são de caráter rápido, fornecendo respostas positivas dentro de 2h30m a 3h30m, sendo também capazes, pelo uso da enzima específica — a penicilinase — principalmente quando do emprêgo do disco e da placa, de identificar qualitativa e quantitativamente a presença da penicilina.

*Provas subsidiárias* — Quando em uma amostra positiva não se consegue identificar a penicilina, correndo, pois, a ação inibitória por conta de substâncias diversas, antibióticas ou não, devemos pesquisar sistematicamente a presença de traços de sulfamídicos, dos resíduos de substâncias químicas utilizadas na higienização do vasilhame ou de possíveis conservantes, adicionados fraudulentamente ao leite.

A sulfa é pesquisada pelo processo de Bratton e Marchall<sup>28, 29</sup> empregado para a investigação dessa substância no sangue e na urina — diazotização; os compostos de amônio quaternário, pelo método de MILLER e Elliker<sup>28, 29</sup>, e os diversos conservantes, entre os quais citaremos como principais o peróxido de hidrogênio e o aldeído fórmico, pelos processos de rotina dos laboratórios de exame do leite, baseados nas recomendações do livro *Métodos de Análises Bromatológicas*<sup>31</sup> do Instituto Adolfo Lutz.

Lançamos mão, também, da prova da placa de agar-*Pseudomonas aeruginosa*, cepa A. Lutz. A *Pseudomonas*, pela sua pequena

resposta aos antibióticos e sulfas, pode ser empregada para diferenciar essas substâncias, quando presentes, dos conservantes ou resíduos de agentes químicos, em geral, que agem bacteriostaticamente sobre o germe.

#### I — TESTE BASEADO NA REDUÇÃO DO C. T. T.

O cloreto de 2, 3, 5 trifenil-tetrazólio (C. T. T.) atua como acceptor de hidrogênio e de elétrons e, ao se reduzir, torna-se colorido. É um dos poucos compostos orgânicos incolores na forma oxidada e corados na forma reduzida. Essa propriedade é aplicável aos ensaios de redutase do leite, aos estudos de tecidos vivos, dos quais constitui um reagente, e na avaliação da capacidade germinativa das sementes; a solução do C. T. T., incolor, forma um composto vermelho, insolúvel, de trifenilformazona<sup>32</sup>.

Aquecendo-se as amostras dos leites a examinar, de diferentes procedências, para destruir os inibidores naturais e teoricamente nivelar as floras, e semeando-as com *starter* láctico, as substâncias inibidoras, quando presentes, interferirão diferentemente, de acordo com a sua concentração, no ritmo do desenvolvimento bacteriano, obtendo-se, como resultante, tonalidades cromáticas diversas que do vermelho — ausência completa de inibição — decairão ao carmim, róseo, róseo claro e, no caso de inibição completa, ao branco, a própria cor do leite, ficando pois o C. T. T. na sua leucoforma.

A amostra controle será obtida a partir de vacas sadias, não submetidas a tratamento, ou de leite em pó, desnatado, estéril, selecionado, livre de inibidores.

O leite em pó deve ser dissolvido, 10g em 90 ml de água esterilizada, destilada.

Quando se faz exame seriado de grande número de amostras, servirão igualmente como contra-prova, no momento, aquelas que aproximadamente adquirirem a coloração vermelha.

A escolha do germe de prova recaiu numa associação de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*, provenientes do laboratório Moseley, de *starter* lácticos, Indianapolis, Indiana, E. U. A., idealmente 1:1, cultivado em laboratório a 42-46° C até coagulação do leite selecionado, previamente tinalizado.

Embora tal amostra venha a ser um *Iogurte*, não recomendamos o emprego de *starter* comercial, pois já tem sido relacionado na literatura o desenvolvimento, nessa procedência, de cepas daqueles germes antibiótico-resistentes, falseando a interpretação dos resultados.

Além do mais, o *starter* comercial pode veicular bolôres, leveduras, coliformes ou demais germes de contaminação, o que não é desejável na presente prova, podendo entretanto ser usado excepcionalmente.

Neste caso, deve-se ter o cuidado de previamente determinar a sua acidês, indicada de uma boa atividade, nunca inferior a 80°D e de se estudar microscópicamente a flora, com densidade bacilo-estreptococo relativamente equilibrada, devendo ser o produto de fabricação recente, 12-24 horas.

Aliás, independentemente deste fato, de acordo com o tipo ou origem dos germes, mesmo se selecionados, pode haver uma sensibilidade diferente na presença de inibidores, antibióticos ou não.

No momento do emprego, a cultura recente (12 a 24 horas) será dissolvida a 1/2, no leite controle e pipetada na quantidade de 1 ml em 10 ml da amostra a ser examinada.

O C. T. T. dissolvido em água destilada, esterilizada, na proporção de 1:25, será acondicionado em frasco escuro e conservado refrigerado.

*Procedimento* — 1) Aquecer, em banho-maria, 10 ml da amostra controle e 10 ml das amostras problema, a 80° C, durante 5 minutos. 2) Resfriar até a temperatura ambiente. 3) Acrescentar 1 ml do *inoculum*, homogeneizando-se por inversão, três vezes, as amostras acondicionadas em tubos previamente arrolhados (rôlhas de borracha). 4) Incubar a 42-46° C, em estufa bacteriológica, durante 2 horas. 5) Acrescentar 0,3ml da solução do C. T. T., 1:25, novamente homogeneizando o conjunto, que será reincubado durante 30 minutos. Comparar as colorações com a da amostra controle. Cor vermelha escura ou clara (controle), igual a ausência de inibidores. Cor rósea, rósea clara, presença, em graduações variáveis. Cor branca — cor do leite — presença, em elevado teor, daquelas substâncias. 6) Gotear duas gotas de penicilinase em tubo contendo a amostra problema, que forneceu

coloração rósea ou branca. Homogeneizar, deixar 60 minutos em temperatura ambiente. Acrescentar 1 ml do *inoculum*. Homogeneizar e repetir a conduta anterior. Se no final de 2h30m a coloração da amostra problema se alterou, igualando a do controle, a prova é positiva para a presença da penicilina. Caso contrário, se permaneceu descorada, acusará a participação de substâncias inibidoras, antibióticos ou não, ou uma alta contagem leucocitária<sup>28</sup> (Fig. 1 e 2).

Nota: Embora terminada a prova, é proveitoso fazer nova leitura, dentro do período de 60 minutos passados. As amostras tendem a se uniformizar cromaticamente, porém, nas inibições totais ou semi-totais, a cor permanecerá sempre mais clara, rosada.

## II — DETERMINAÇÃO DA ACIDÊS (medida em graus Dornic)

Determinamos a acidês pela avaliação indireta da produção do ácido lático, usando

a solução N/9 de hidróxido de sódio, pelo processo corrente, recomendado por DORNIC<sup>28</sup>.

*Procedimento* — 1) Proceder como no método anterior, apenas excluindo o item 5, ou seja, não acrescentar o C. T. T.; após 2h30m, determinar a acidês, empregando a solução e o acidímetro de Dornic, que possui uma bureta especial, sendo os resultados fornecidos em graus Dornic.

2) Comparar o resultado obtido com o da prova do C. T. T., que se processou em igual lapso de tempo. A maior acidês — amostra controle — deverá corresponder à cor mais intensa, fornecendo os tubos rosados ou de cor branca, acidês de mais baixo valor. Este teste é prova e contra-prova do anteriormente visto. Exclue, quando positivo (acidês baixa), a possibilidade da interferência das altas contagens leucocitárias, ao contrário do que acontece no método de C. T. T.

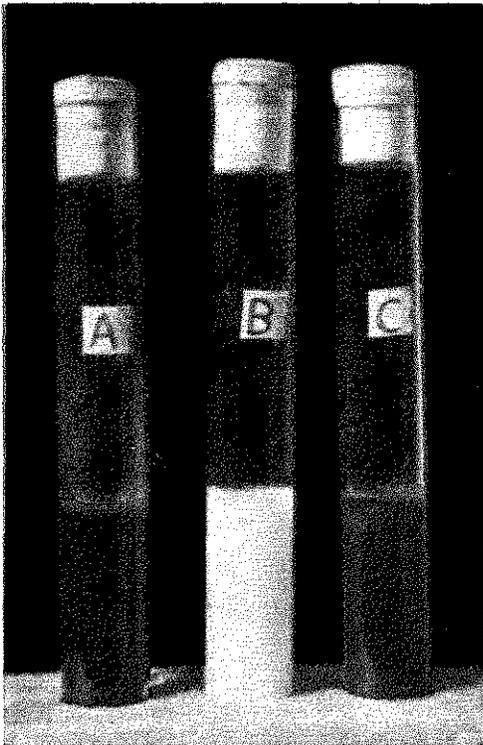


Fig. 1 — Tubos contendo: A) Leite padrão — cor vermelha; B) Leite com penicilina — cor branca; C) Leite com penicilina mais penicilinase — cor também vermelha.

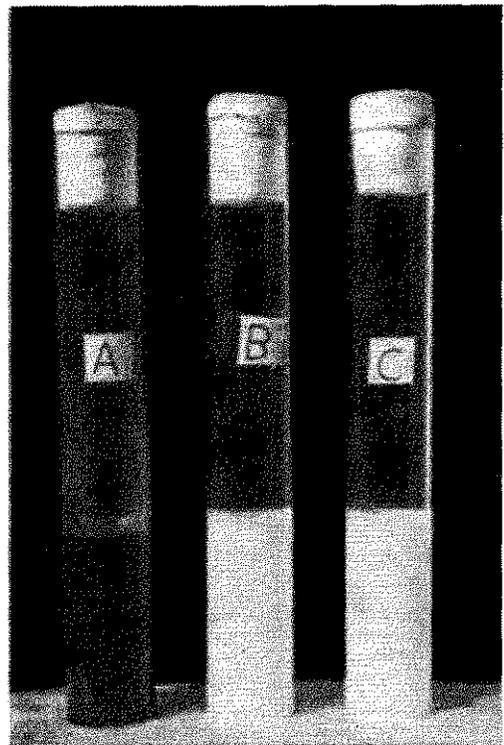


Fig. 2 — A penicilinase adicionada ao tubo C não alterou a cor, que permaneceu branca, índice da presença de inibidores diferentes da penicilina.

A prova pode também ser avaliada visualmente, pois, numa resposta negativa, o leite permanece coagulado, enquanto que a permanência no estado líquido é a tradução de um sub-desenvolvimento da flora, com sub-atividade bacteriana e conseqüente pequena produção ácida. 3) Repetir a etapa do item 7, como descrita para a prova do C. C. T., para as amostras que acusaram baixo nível de produção ácida ou permanecerem líquidas. Se, no final da prova, a acidês dessas amostras problema se elevou, aproximando-se da do controle, o teste é positivo para a presença da penicilina.

### III — MÉTODO DO DISCO E DA PLACA

Este processo exige um maior cuidado técnico, especialmente na preparação e estandarização da suspensão dos esporos do *Bacillus subtilis*, o germe de prova utilizado e na preparação das diversas diluições da penicilina padrão, contra-prova positiva do método.

Se a suspensão dos esporos do *B. subtilis* não foi submetida a uma adequada e prévia estandarização, de acôrdo com a sua concentração, poderá interferir na sensibilidade da prova, negatizando possíveis halos de inibição originados por pequenas potências de substâncias inibidoras ou diminuindo as suas amplitudes.

Este método, com referência à penicilina, é de precisão qualitativa e quantitativa, detetando no lapso de 2h30m a 3h30m, até 0,05 unidades por mililitro de leite.

Para os demais antibióticos, conforme verificaremos logo mais, a sua sensibilidade é diversa de acôrdo com o tipo empregado.

Com a utilização desta prova, os possíveis resultados se distribuirão nas seguintes categorias: a) Resultados negativos — nenhuma zona de inibição. b) Penicilina positiva — zona de inibição sem a penicilinase, mas nenhuma zona, após o tratamento penicilínástico. c) Atividades antibacterianas diversas, que não a penicilina — zona de inibição com e sem penicilinase<sup>28</sup>.

A prova da penicilinase é empregada para a penicilina comum, pois a sintética, de uso muito limitado, não sofre a ação daquela enzima.

### I. Material

*Placas de Petri* — As placas deverão ter a dimensão de 10 x 100 mm ou 20 x 100 mm, selecionando-se cuidadosamente as que apresentarem o fundo plano.

*Disco de papel de filtro* — Os discos devem ser de bôa procedência, com elevado índice de absorção, tais como o Bacto 1.564, B. B. L. 08-631 ou Schleicher-Schuell e Whatman, absorvendo 0,1 ml do leite e que foram por nós empregados.

Embora existam discos impregnados com penicilina, em diversas potências e impregnados com a penicilinase, devido a sua variação comercial, o que não garante um resultado seguro, demos preferência à impregnação dos mesmos no momento da prova.

*Penicilina padrão* — Dilui-se a penicilina em água destilada ou em solução estéril tamponada, fosfatada, pH 6,0, fazendo-se uma suspensão estoque, contendo 100 unidades por mililitro e conservada refrigerada durante dois dias.

Na ocasião da prova, dilui-se a mesma até 1; 0,50; 0,10 e 0,05 unidades por ml, embebendo-se os discos.

A potência 0,05 unidades vem a ser a concentração mínima inibitória.

*Penicilinase concentrada* — Emprega-se a penicilinase B. B. L. 02-629, Difco B 354 ou Laborcilinase Laborterapica, 500 000 unidades/ml, que foi por nós utilizada. A penicilinase deve ser conservada refrigerada, por ser termo-lábil.

*Agar "seed"* — É o meio de cultura usado nas placas, para a realização da prova — *Penicillin assay seed agar*, e com a seguinte composição: Peptona, 6,0 g; caseína (digestão pancreática), 4,0 g; extrato de levedura, 3,0 g; extrato de carne, 1,5 g; glicose, 1,0 g; agar, 15,0 g e água destilada, q. s. para 1 litro. Distribuir, esterilizar a 121° C, 15 minutos. O pH final deverá ser de 6,6.

*Agar base* — É o meio de cultura empregado na obtenção da cultura do *Bacillus subtilis* para a preparação da suspensão de esporos: Peptona, 6,0 g; extrato de levedura, 3,0 g; extrato de carne, 1,5 g; Agar, 15,0 g; água destilada q. s. para 1 litro. Distribuir e esterilizar. O pH final deverá ser de 7,0.

*Suspensão de esporos* — Podemos lançar mão de suspensões de esporos do *B. subtilis*, da *Bacto*, 0453 — ampôlas de 1 ml, B. B. L. 04-628, ou prepará-la em laboratório.

## 2. Método

Para o preparo e standardização da suspensão de esporos, devemos adotar a seguinte conduta. Suspender, em 5 ml de solução salina, a cultura recente (24 a 48 horas) de *Bacillus subtilis* A. T. C. C. 6.633, repicada em estria, em tubo contendo agar *seed* inclinado, cultivado a 37°C.

Distribuir essa suspensão na superfície de 300 ml de agar-base (meio de cultura mais pobre), acondicionado em garrafa de Roux e incubar durante 5 a 10 dias a 37° C.

Após, verificar microscópicamente, com coloração especial, se cerca de 70% do germe passou à forma esporulada; caso contrário, retornar à estufa, por mais alguns dias, até que aquêlê índice seja atingido.

Suspender a cultura obtida em 20 ml da solução salina fisiológica, atraindo a superfície do meio de cultura com o rolar de pequenas esferas de vidro, até obter uma hã turvação do líquido.

Concentrar os esporos por centrifugação a 4 000 r.p.m., ressuspender o sedimento e determinar espectrofotometricamente a sua turbidês, até atingir a transmissão de 90% com o comprimento de onda de 650 m $\mu$ .

Submetemos essa suspensão, já standardizada, a um aquecimento a 70°C, durante 15 a 30 minutos, para eliminar as formas vegetativas ainda existentes, estocando-a a seguir no refrigerador para uso até 2-3 meses da sua preparação.

Na falta do espectrofotômetro ou de um colorímetro fotoelétrico, poderá a suspensão de esporos ser standardizada através de tentativas sucessivas, até que a turbidês estabelecida forneça o maior e mais visível halo de inibição.

Para o preparo do agar-germe, acrescenta-se 1 ml da suspensão de esporos em 100 ml de agar *seed*, resfriado a 55-60°C, homogeneizando-se a seguir a mistura, e vertendo 5 ml do agar e placas de PETRI<sup>33</sup>.

As placas contendo o agar-germe deverão ficar acondicionadas no refrigerador não menos de 3 nem mais de 5 dias<sup>28, 34</sup>.

No momento da prova, remove-se a placa do refrigerador, devendo ser a mesma utilizada após período de 15 minutos. Com uma pinça, toma-se um disco e toca-se a superfície da amostra de leite, já perfeitamente homogeneizada, de modo a evitar a formação de conglomerados de substâncias gordurosas.

A absorção é da ordem de 0,1 ml. Agita-se levemente o disco, para espargir o excesso do leite, depositando-o suavemente na superfície do agar. Para cada amostra devemos usar um mínimo de dois discos e um máximo de oito discos por placa, ou seja, quatro amostras testadas.

A placa para a distribuição dos discos é dividida em quatro partes iguais, devendo os mesmos ser colocados simetricamente, evitando-se assim, no caso de positividade do resultado, coalescência dos halos de inibição formados (Fig. 3).

A placa assim preparada é levada à estufa a 37°C e posta a incubar durante 2h30m a 3h30m.

Ao fim dêsse período, em caso de positividade, pelo crescimento rápido do germe, um halo de inibição muito tenue, é detetado, sendo necessário, para tanto, examinar cuidadosamente a superfície do meio de cultura, colocando-se a placa contra um foco de luz distante e inclinando-se em diversos ângulos. O retorno da placa à estufa cultora, fornecerá, horas após, uma perfeita e nítida imagem do que conseguimos vislumbrar com o pouco contraste existente.

No caso do aparecimento do resultado positivo, para sabermos se é ou não a penicilina a substância inibidora presente, devemos acrescentar a 10 ml da amostra problema duas gôtas de penicilinase, homogeneizar, deixando-se, se houver tempo suficiente, 60 minutos em repouso, em temperatura ambiente, para garantir a ação enzimática.

Preparar novamente a placa, colocando na superfície da mesma quatro discos, dois embebidos na amostra com penicilinase e dois na amostra, porém sem aquela enzima.

Tornar a incubar. Uma zona de inibição ao redor dos discos não tratados, mas inibição alguma em torno do disco com penicilinase, representará um teste positivo para a penicilina (fig. 4). Zona de inibição com e sem a penicilinase, atividades antibacterianas diversas (fig. 5).

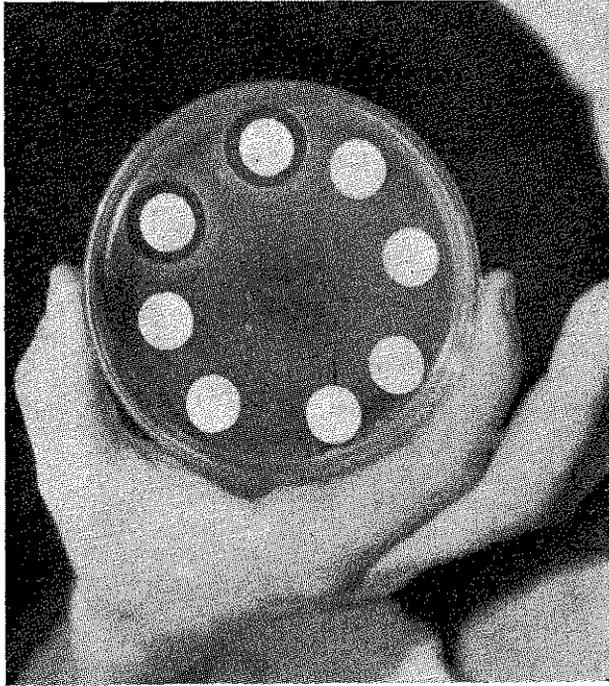


Fig. 3 — Placa dividida, para efeito de prova, em quatro quadrantes contendo quatro amostras-problema, com dois discos para cada uma. O quadrante superior esquerdo mostra a presença de substâncias inibidoras.

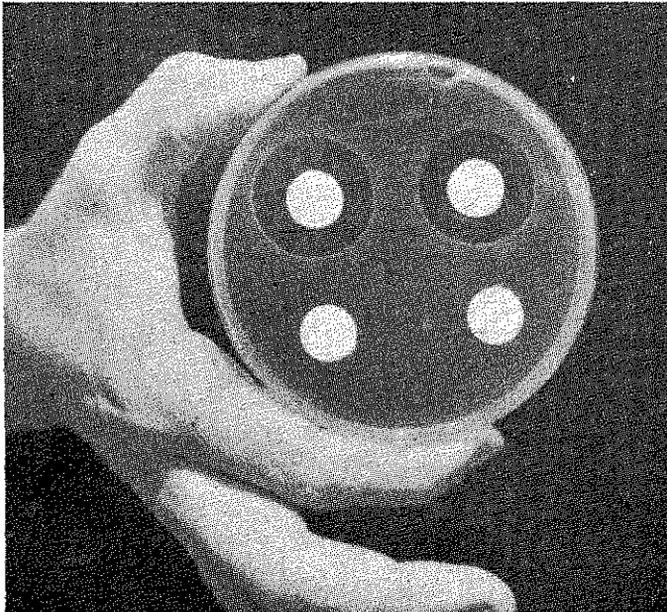


Fig. 4 — Penicilina positiva mostrando a zona de inibição, circundando os discos superiores. Ausência de halos junto aos discos inferiores embebidos com penicilinasase.

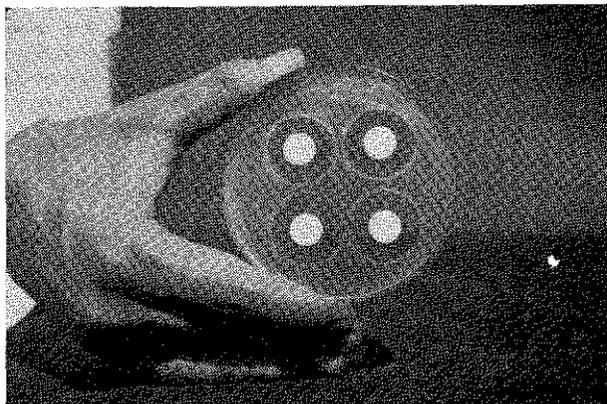


Fig. 5 — Atividades antibacterianas diversas, que não a penicilina. Zona de inibição com e sem a penicilínase.

Estabelecida qualitativamente a identificação do inibidor, para a determinação quantitativa da sua potência devemos comparar a dimensão do halo existente, medida pelo seu diâmetro, com as dimensões de outros halos de inibição resultantes da colocação na placa de discos embebidos em diferentes potências da penicilina: 1,0; 0,50; 0,10 e 0,05 unidades/ml (fig. 6).

O limite de sensibilidade desta prova rápida é de 0,05 unidades de penicilina por mililitro de leite.

#### IV — PROVAS SUBSIDIÁRIAS

##### 1. Pesquisa de sulfamídicos livres no leite

Este método é capaz de detetar, no leite, até 0,005% de sulfamídicos.

A presença de sulfa pode ser pesquisada pela modificação do método de Bratton e Marshall, empregado para a investigação dessa substância no sangue e urina.

O ácido tricloroacético precipita as proteínas, o ácido nitroso produzido como resultante da adição de nitrito de sódio reage com a sulfanilamida livre — diazotação — ou outros compostos que libertem sulfanilamida.

O excesso de ácido nitroso não diazotado é eliminado pelo sulfamato e o ácido nitroso diazotado copula com o N-(1-naftil-etileno-diamina), dando um composto estável de cor vermelha viva.

##### Material e Procedimento

A 1 ml de leite cru ou pasteurizado, adicionar 10 ml de ácido tricloroacético a 1,5%, recentemente preparado. O precipitado formado deve ser filtrado com papel de filtro

Whatman n.º 42; 1 ml da solução filtrada, límpida, é colocado em tubo de ensaio limpo, adicionando-se-lhe 1 ml de solução de nitrito de sódio 0,01%, deixando-se a solução em repouso durante 2 minutos. Finalmente adicionar 1 ml de solução de N-(1-naftil-etileno-diamina) a 0,5%.

O aparecimento de cor vermelha, quase que imediatamente, é indício da presença de sulfanilamida no leite examinado<sup>33, 34</sup>.

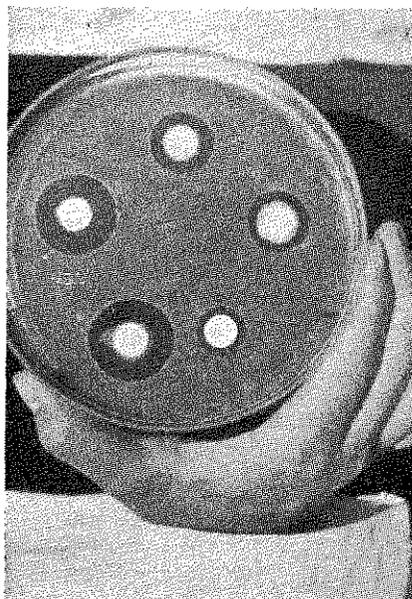


Fig. 6 — Determinação quantitativa da penicilina, pelo adição do antibiótico, em potências diversas, ao leite padrão. Os dois halos menores, coincidentes, de iguais dimensões — 2 mm — são respectivamente os do leite-problema e do leite padrão acrescentado a penicilina (0,5 U.I./ml).

## 2. Pesquisa de compostos de amônio quaternário no leite

Método de Miller e Elliker. Este método deteta a presença do amônio quaternário no leite, até a diluição de 5 p. p. m.

### Material e Procedimento

**Indicador** — Dissolva 0,1 g de eosina — na forma de tintura — aproximadamente 90% pura, em 200 ml de acetona, conservando em frasco âmbar, como solução estoque.

Adicione 10 ml desta solução a 90 ml de tetracloroetano técnico e junte 1 g de ácido cítrico puro cristalizado para eliminar a cor vermelha que aparece. Agite a solução e depois filtre.

**Solução tampão** — Dissolva 25 g de ácido cítrico puro, cristalizado (ácido cítrico com uma molécula de água de cristalização), em 100 ml de água destilada; adicione então solução de hidróxido de sódio a 50% até que o pH se ajuste a 3,5, sendo geralmente necessários 12 ml.

Coloque 1 ml da amostra problema em tubo de ensaio e adicione 5 ml de água destilada, 1 ml da solução de indicador e 0,2 ml da solução tampão. Agite vigorosamente durante 10 segundos; centrifugue a seguir durante 5 minutos a 3 200 r.p.m. Três camadas poderão aparecer, a camada superior da solução menos densa, a camada central formada pelas proteínas precipitadas e a camada inferior que, no caso da presença no leite do composto de amônio quaternário, adquire a cor vermelha.

## RESULTADOS

Tendo ficado estabelecidos os métodos de exame, antes de iniciarmos propriamente a pesquisa das substâncias inibidoras, em especial, a penicilina, no leite tipo C do consumo em São Paulo, para efeito de apreciação da funcionabilidade individual e do conjunto, dos métodos assinalados, dividimos o nosso trabalho em três etapas distintas, complementadas de uma quarta etapa especial:

1. Pesquisa, *in vitro*, pelo adicionamento, ao leite, padrão, de quatro antibióticos de maior emprego em terapêutica veterinária, em concentrações decrescentes, até o limiar de suas percepções.

2. Determinação, *in vivo*, no leite de animais estabulados, de penicilina e tetraciclina, por nós especialmente injetadas e difundidas, por via intra-mamária, na forma de suspensão.

3. Pesquisa de substâncias inibidoras, em especial a penicilina, no leite tipo C consumido na Capital de São Paulo.

4. Verificação em laboratório, pelo adicionamento de antibióticos ao leite, da interferência da presença dessas substâncias, nos resultados dos exames bromatológicos rotineiros — bioquímicos, químicos e bacteriológicos — e as conseqüentes falhas na apreciação da real qualidade do leite.

1. Pesquisa "in vitro", no leite padrão, da presença de quatro antibióticos de maior emprego em terapêutica veterinária em concentrações decrescentes, até o limiar de suas percepções.

A partir de antibióticos padrões, em pó, adicionados das substâncias tampão apropriadas, segundo o método proposto por XIMENES<sup>26</sup>, ou de solução tamponada, com pH adequado a cada antibiótico, fomos procedendo à diluição dos mesmos, no leite padrão previamente aquecido a 80° C, até determinarmos a potência mínima perceptível pelos três métodos descritos de início.

Esquemáticamente, os resultados obtidos estão, representados no quadro I.

As potências de 0,05 unidades/ml para a penicilina, de 0,50 mcg/ml para a tetraciclina e o cloranfenicol e de 5 unidades para a estreptomicina representam o mínimo inibidor para estas provas de caráter rápido.

Se dermos às tonalidades obtidas pela utilização da prova do C. T. T. correspondência numérica de 0 a 4 — zero para a cor branca, índice de completa inibição, 1 e 2 respectivamente para a cor rósea clara e rósea e 3 a 4 para a cor carmim ou vermelha — ausência de inibição — poderemos, pelo quadro II, situar aqueles mínimos inibitórios constantes do quadro I e, pela fig. 7, ter uma noção visual do fenômeno:

QUADRO I

Antibióticos adicionados ao leite	U.I. ou mcg/ml					
	5	1	0,5	0,1	0,05	0,025
Penicilina .....	5	1	0,5	0,1	0,05	0,025
Tetraciclina .....	10	5	2,5	1	0,50	0,25
Cloranfenicol .....	10	5	2,5	1	0,50	0,25
Estreptomicina .....	50	30	20	10	5	3

Os valores em grifo correspondem às concentrações inibidoras mínimas.

QUADRO II

Leite amostras	Tonalidades C. T. T.	Acidez °D	Coagulação	B-subtilis inibição
A	4	80	coagulado	—
B	0	28	líquido	+
C	1	35	líquido	+
D	2	50	líquido	+
E	3	70	coagulado	—
F	4	75	coagulado	—

+ positivo.  
— negativo

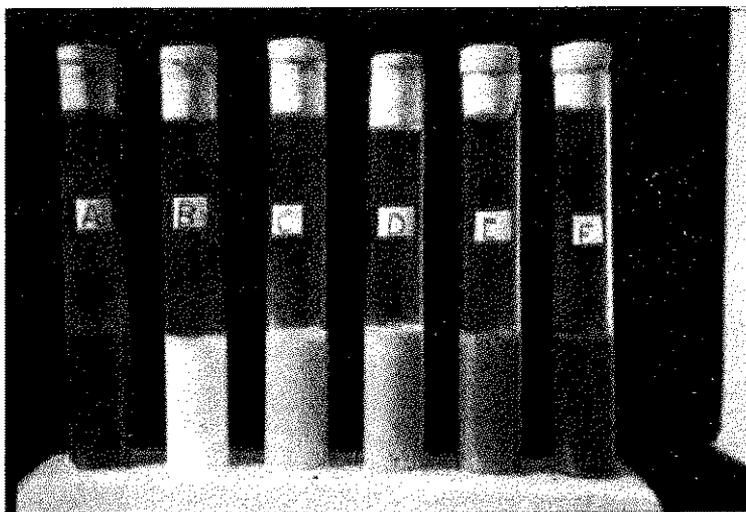


Fig. 7 — Tonalidades cromáticas na prova do C.T.T.: A) Coloração vermelha (tonalidade 4) — leite controle com ausência completa de inibidor; B) Cór branca (tonalidade zero) — inibição completa; C e D) Róseo-clara e rósea (tonalidade 1 e 2) — inibição média; E e F) Carmim e vermelha (tonalidades 3 e 4) — ausência completa de inibição.

Conforme pudemos verificar, as potências mínimas inibitórias — 0,05 unidades para a penicilina, 0,50 mcg para a tetraciclina e o cloranfenicol e 5 unidades para a estreptomicina — limite de detetibilidade dos métodos, em geral, se situam no índice 2 do

C. T. T., com acidez de teor ainda sensivelmente baixo, tendo em vista a acidez da amostra controle e igualmente com produção do halo de inibição, permanecendo o leite no seu estado líquido, não coagulado. As concentrações maiores daquêles anti-

bióticos forneceram valores de acidês cada vez mais baixos e C. T. T., 1 ou 0.

Em contrapartida, amostras de leite, veiculando potências menores do que os mínimos verificados, sub-concentrações inibitórias, portanto, atingiram o índice 3-4 do C. T. T., e uma acidês bastante elevada, com coagulação positiva e absoluta negatividade para a presença do halo de inibição, comportando-se pois como o leite padrão e passando despercebidas, indetectadas, pelo crivo destes processos.

Uma visualização do que foi explicado poderá ser melhor apreciado pela observação dos quadros III e IV, referentes à penicilina e tetraciclina dissolvidas experimentalmente no leite padrão.

Embora tenha ficado comprovada a boa funcionabilidade da prova, individualmente e no seu conjunto, durante a realização das pesquisas das substâncias inibidoras, em amostras do leite tipo C do comércio, alguns resultados discordantes foram surgindo.

A presença de inibidor era acusada pelo C. T. T., em gradação 1 ou 2, com baixa produção de ácido e incoaguabilidade, sem que halo de inibição se formasse. Entretanto, conforme verificado, os três métodos tinham acuidade muito parecida.

Porém, pareceu-nos que o conjunto C. T. T., e acidimetria, funcionando em consequência da presença do *S. thermophilus*, é mais sensível à presença da penicilina, podendo mesmo denunciá-la, na potência de 0,01 unidades/ml do leite. Em contrapartida, o processo da placa — *B. subtilis* — é capaz de denunciar a estreptomocina em níveis de até 2-3 unidades/ml.

Suspeitamos então de um outro mecanismo até então não verificado ou melhor, não pesquisado, da presença naqueles leites de associação de antibióticos ou outros inibidores, em sub-concentrações inibitórias, capazes, porém, nessa forma, de se tornarem

QUADRO III

nada ao leite Penicilina adicionado padrão U.I./ml	C. T. T. Tonalidades	Acidez °D	Coagulação	<i>B-subtilis</i> inibição
5	0	23	líquido	+
1	0	23	líquido	+
0,50	0	26	líquido	+
0,10	1	38	líquido	+
0,05	2	45	líquido	+
0,025	4	68	coagulado	—
CONTRA-PROVA				
Leite padrão	4	80	coagulado	—

QUADRO IV

Tetraciclina adicionada ao leite padrão mcg/ml	C. T. T. Tonalidades	Acidez °D	Coagulação	<i>B-subtilis</i> inibição
5	0	25	líquido	+
2,5	0	24	líquido	+
1	0	28	líquido	+
0,5	1	40	líquido	+
0,25	4	61	coagulado	—
CONTRA-PROVA				
Leite padrão	4	80	coagulado	—

QUADRO V

Penicilina adicionada ao leite padrão U.I./ml	C. T. T. Tonalidades	Acidez °D	Coagulação	<i>B-subtilis</i> inibição
0,05	2	45	líquido	+
0,025	4	68	coagulado	—
Penic. 0,025 U. I./ml Tetrac. 0,25 mcg/ml adicion. ao padrão	2	42	líquido	—
CONTRA PROVA Leite padrão	4	80	coagulado	—

QUADRO VI

Tetraciclina adicionada ao leite padrão mcg/ml	C. T. T. Tonalidades	Acidez °D	Coagulação	<i>B-subtilis</i> inibição
0,50	2	40	líquido	+
0,25	4	61	coagulado	—
Tetrac. 0,25 mcg/ml Penic. 0,025 U. I./ml adicion. ao padrão	2	38	líquido	—
CONTRA-PROVA Leite padrão/	4	80	coagulado	—

detectáveis, pelo C. T. T., e acidimetria, porém, não fornecendo halo algum de inibição. Para esclarecer esta última hipótese, associamos, em laboratório, sub-concentrações inibidoras, de diversos antibióticos, obtendo ampla confirmação do fato, conforme demonstrado nos quadros V e VI, com a associação penicilino-tetraciclina.

2. *Determinação "in vivo", no leite de animais estabulados, de penicilina e tetraciclina, por nós especialmente injetadas e difundidas, por via intra-mamária, na forma de suspensão.*

Os antibióticos escolhidos foram a penicilina benzatina, injetável, e a tetraciclina injetável e em forma de suspensão, para uso intra-mamário. A penicilina benzatina, devido a sua eliminação lenta, em média de 3 a 5 dias. A tetraciclina, pela sua mais rápida eliminação e o mesmo antibiótico, na forma de preparados anti-mastite, por se eliminar em doses mais elevadas, até um período de 72 horas, facultando pois bôa obser-

vação do fenômeno e servindo como contra-prova positiva para a funcionalidade dos testes propostos.

As experimentações foram efetuadas na Estação Experimental da Água Funda do Departamento de Produção Animal, com vacas da raça Jersey, pesando 300 e 370 quilos e respectivamente com 3 e 5 anos de idade e produção média leiteira de 6,4 e 8,2 litros.

A dose terapêutica da penicilina I. M. é de 10 000 a 20 000 U.I./kg de peso vivo e da tetraciclina I.M., 600 mg a 1 g, e foram ministradas, respectivamente, em doses únicas. A suspensão, para uso intra-mamário, na proporção de 200 mg por quarto mamário.

As amostras de leite foram colhidas cada 24 horas e examinadas até completo desaparecimento dos antibióticos, dentro das possibilidades dos métodos.

O próprio animal a ser tratado serviu previamente de contra-prova, tendo sido as amostras colhidas no mesmo ritmo horário e igualmente examinadas para a presença de

QUADRO VII

Vaca n.º	Penicilina benzatina U. I./kg *	Teor de Penicilina benzatina, U. I./ml, no leite, no período de zero a 120 horas de ordenha					
		H o r a s					
		0	24	48	72	96	120
155	—	0	0	0	0	0	0
	20 000	0	0,1	0,08	0,06	0,05	0

\* Injeção única de 6 200 000 U. I.

QUADRO VIII

Tradução dos valores do quadro VII nos índices de prova C. T. T., Acidez e Placa mais *B. subtilis*

Ordenha Horas	C. T. T. Tonalidades	Acidez ºD	Coagulação	<i>B. subtilis</i> inibição
0	4	63	coagulado	—
24	1	46	líquido	+
48	1	43	líquido	+
72	2	50	líquido	+
96	1	50	líquido	+
120	3	55	coagulado	—

QUADRO IX

Vaca n.º	Tetraciclina mcg/Kg*	Teor de tetraciclina — mcg/kg — no leite, no período de zero a 96 horas da ordenha			
		H o r a s			
		0	24	48	96
133	0	0	0	0	0
	2.700	0	0,7	0,5	0

\* Injeção única de 1 g de tetraciclina.

QUADRO X

Tradução dos valores do quadro IX, nos índices das três provas

Ordenha Horas	C. T. T. Tonalidades	Acidez ºD	Coagulação	<i>B. subtilis</i> inibição
0	4	78	coagulado	—
24	1	32	líquido	+
48	2	36	líquido	+
72	4	61	coagulado	—

QUADRO XI

Vaca	Tetraciclina mcg/quarto mamário *	Teor de tetraciclina — mcg/ml — no leite no período de 0 a 96 horas de ordenha				
		H o r a s				
		0	24	48	72	90
133	0	0	0	0	0	0
	200	0	10	1	0	0

\* Difundida por via intramamária.

QUADRO XII

Tradução dos valores do quadro XI, segundo os índices das provas

Ordenha Horas	C. T. T. Tonalidades	Acidez °C	Coagulação	<i>B. subtilis</i>
0	4	60	coagulado	—
24	0	22	líquido	+
48	1	33	líquido	+
72	3-4	55	coagulado	—
96	4	61	coagulado	—

inibidores, após o aquecimento a 80°C durante 5 minutos.

Os quadros seguintes (VII a XII) sintetizam os resultados e fornecem a sua tradução, segundo os índices e normas dos três métodos utilizados:

3. *Pesquisa de substâncias inibidoras, em especial a penicilina, no leite tipo C consumido na Capital de São Paulo.*

Para a realização destes exames, as amostras de leite tipo C foram adquiridas do Comércio e obtidas simultaneamente, em pontos diametralmente opostos, em dias diferentes, de todas as marcas industriais existentes à venda — Leco, Paulista, União e Vigor, acondicionadas em gelo e rapidamente transportadas.

No laboratório eram, no mesmo dia, submetidas aos exames de rotina correntes — físico-químicos, bioquímicos, bacteriológicos, tais como: pesquisa de conservadores diversos, principalmente o aldeído fórmico e o peróxido de hidrogênio, presença de redutores da acidez, adredemente colocados, da acidez, prova do alizarol, densidade, criscopia, redutase pelo azul de metileno, peroxidase, fosfatase, contagem global

em placas, colimetria e a prova da resistência em temperatura ambiente — coagulação — além de outras mais.

Simultaneamente era pesquisada especialmente a presença de compostos de amônio quaternário e de sulfamídicos.

Após aquecimento, as amostras eram submetidas às provas de pesquisa de substâncias inibidoras, sendo as que forneceram resultados positivos testadas com a penicilinase.

Examinamos um total de 1 000 amostras, em dias diferentes, que abrangeu um período de cerca de seis meses de constantes verificações, resultando a constatação da presença de substâncias inibidoras em 9% das amostras de leite analisadas.

As sulfas, o amônio quaternário ou demais substâncias químicas não foram encontrados, tendo sido porém em 1,9% das amostras examinadas evidenciada a penicilina em potência que variou de 0,05 a 0,50 unidades por mililitro de leite. Portanto, das 1 000 amostras vistas, 90 mostraram conter substâncias inibidoras, 71 das quais, não identificadas e 19 correspondendo à presença da penicilina na potência de 0,05 a 0,50 unidades/ml, conforme demonstrado no quadro XIII:

QUADRO XIII

Leites penicilino-positivos

Potências U. I./ml	N.º Amostras
0,05 .....	3
0,08 .....	1
0,10 .....	2
0,30 .....	3
0,40 .....	7
0,50 .....	3

Entretanto, durante o período de realização das referidas pesquisas, sucedeu que, para as diversas amostras adquiridas no comércio, de uma mesma marca industrial, num mesmo dia, porém em estabelecimentos comerciais distantes, encontramos uma das amostras contendo penicilina, estando porém as demais negativas, inclusive para a presença dos inibidores em geral.

Tal fato, aparentemente contraditório, torna-se entretanto bastante compreensível quando lembramos do fato de que, no interior de São Paulo ou de outros Estados de onde o leite provém, os entrepostos usina recebem a produção local.

O leite global dessa usina-entrepósito é portanto representado pela convergência do leite de todos os produtores da localidade, onde é o produto filtrado, padronizado, refrigerado e transportado em carros-tanques isotérmicos ou não, com capacidade variável em média de 10 000 litros.

Em São Paulo, nos diversos estabelecimentos de beneficiamento, é o produto bombeado diretamente do carro tanque para os pasteurizadores, pasteurizado e a seguir estocado em tanques isotérmicos, com capacidade também variável, em média 10 000 litros.

No momento do engarrafamento, é esse leite levado à máquina enfrascadora, engarrafado e acondicionado em cestas gradeadas e distribuídas ao consumo.

Terminada a operação, pelo esgotamento do conteúdo do tanque-estoque, passa-se ao seguinte, contendo leite proveniente de outra procedência.

O produto consumido na Capital não é pois o resultante da mistura global da produção da bacia leiteira do nosso interior ou de outros Estados, mas sim das regiões produtoras, parceladamente.

Portanto, não é de se estranhar que amostras colhidas em pontos diversos, embora do mesmo produto comercial, forneçam resultados diferentes.

Tendo em vista o sucedido, resolvemos fazer em uma das usinas de pasteurização de leite da Capital o exame sistemático do leite provindo das diversas zonas de fornecimento, colhendo as amostras de diferentes regiões produtoras, à medida que chegado.

Após exames seguidos, conseguimos destacar uma fonte produtora do interior, cujo leite se apresentou veiculando substâncias inibidoras não identificadas, diferentes da penicilina.

Feita essa verificação, providenciou-se a ida de um grupo técnico a essa região de nossa interlândia onde, no respectivo posto de resfriamento e à medida que chegava, iam sendo colhidas amostras do leite de todos os produtores da localidade.

Examinadas, essas amostras acusaram positividade para a presença de substâncias inibidoras em cerca de 20% do total global.

Estava pois comprovada a nossa previsão.

Não havendo tempo útil para se chegar até as fazendas cuja produção inquinava o total da produção local e desvendarmos *in loco* a etiologia do processo, sabendo quase certo serem agentes terapêuticos os responsáveis pela situação criada, deixamos recomendações saneadoras, entre outras, o afastamento da ordenha leiteira do animal que estivesse sob tratamento veterinário.

Dias após, na Capital, no laboratório, constatamos com satisfação que o leite daquele local se enquadrava na normalidade, não mais veiculando os inibidores.

Partindo do efeito, na Capital, havíamos conseguido chegar até as causas remotas, nas fazendas de produção do interior, obtendo a correção necessária.

Queremos, dentro do preceito da técnica, pôr em ênfase o cuidado especial que se deve ter com a penicilinase, devido à sua termo-sensibilidade e à possibilidade da sua contaminação durante os diversos manuseios, pois tais fatos obrigaram a desprezar o resultado obtido para quase 200 amostras, compelindo-nos a recomençar as pesquisas em andamento.

A *Pseudomona aeruginosa*, como germe de prova, pela sua resistência aos antibióticos e sulfas, no discrimine com os vestígios de substâncias químicas por nós adicionadas ao leite padrão, mostrou-se insatisfató-

ria, por resistir também a ações inibidoras diversas.

Enquanto o *Bacillus subtilis* e a *Sarcina lutea* A. T. C. C., 9341 apresentavam halo de inibição com o aldeído fórmico a 1:40 000, já a *P. aeruginosa* nada mais revelou.

4. *Verificação em laboratório, pelo adicionamento de antibióticos ao leite, da interferência da presença dessas substâncias nos resultados dos exames bromatológicos rotineiros — bioquímico, químicos e bacteriológicos — e as conseqüentes falhas na apreciação, da real qualidade do leite.*

O leite, pelas suas próprias condições de produção, em fonte animal, sujeito a manuseios inevitáveis, sendo substrato de extraordinário potencial nutritivo, é um vasto caudal onde crescem e se reproduzem centenas de milhares de células bacterianas, em ondas sucessivas<sup>36</sup>

Entretanto, apesar de ser alimento perecível, quando, desde a fonte de produção,

veicula inibidores do crescimento bacteriano, mesmo mantido à temperatura ambiente, não se deteriora por vários dias, demonstrando assim uma resistência invulgar.

Portanto, dois produtos diversos desigualmente contaminados, veiculando, porém, os mais poluídos vestígios de um inibidor, fornecerão, horas após o exame, resultados desiguais, sendo paradoxalmente o pior considerado como o de melhor qualidade, burlando a prova de rotina da determinação da acidez, redutase e o exame bacteriológico.

Para ilustrar o fato, fizemos, em laboratório, uma série de ensaios, acrescentando antibióticos a amostra de leite cru, recém chegada do interior e isenta de inibidores.

O leite era examinado no momento da prova e depois adicionado com penicilina — 1 unidade/ml, e tetraciclina — 1mcg/ml, sendo deixado à temperatura ambiente pelo período de 10 horas e, após, novamente examinado. Os quadros e fotografias que se seguem esquematizam os resultados obtidos, mostrando a notável influência inibitória sobre a flora global do leite (Quadros XIV e XV; Fig. 8 e 9).

QUADRO XIV

*Leite cru isento de inibidor (produção recente). Exame de rotina*

Contagem microbiana global em placas colônias/ml	Colimetria N. M. P.	Redutasimetria min.	Acidez °D
30 000 000	2 400 +	160	18

QUADRO XV

*Leite cru após 10 horas do exame de prova*

Leite	Contagem microbiana global em placas colônias/ml	Colimetria N. M. P.	Redutasimetria min.	Acidez °D
Isento de inibidor	200 000 000	2 400 +	20	68
Mais penicilina, 1 U. I./ml	50 000 000	2 400 +	120	43
Mais tetraciclina, 1 mcg/ml	38 000 000	2 400 +	130	21



Fig. 8 — Placa de gelose-padrão semeada com leite cru isento de inibidor (diluição 1:1 000 000).

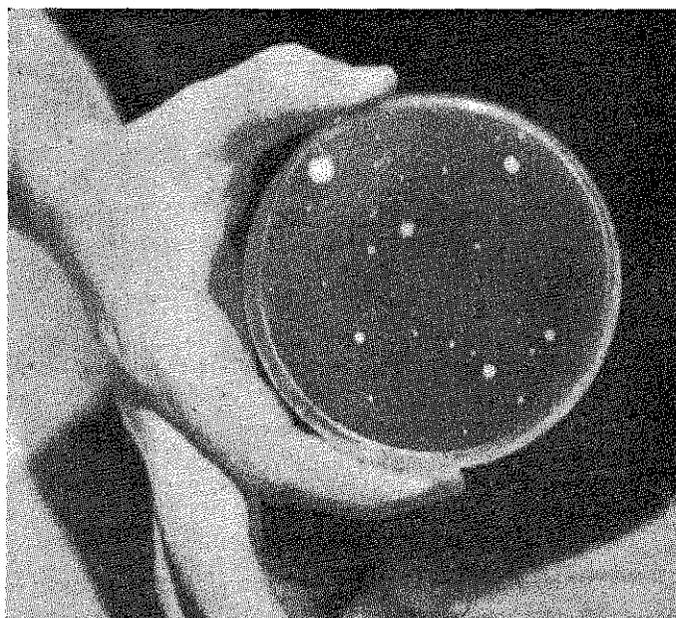


Fig. 9 — Placa de gelose-padrão semeada com o leite acrescentado com tetraciclina 1 mcg/ml, na diluição de 1:1 000 000.

Os coliformes não evidenciaram modificações significativas (Quadros XIV e XV).

Os resultados para as provas de pesquisa da presença presuntiva de coliformes não sofreram modificações significativas.

Como contra-provã das observações vistas, a partir das amostras do leite cru isento de inibidor e do mesmo contendo a penicilina e a tetraciclina, inoculamos 2% de *starter* de Iogurte, dentro da técnica da produção comercial e cultivamos a seguir a 46-48° C.

Como não podia deixar de acontecer, o Iogurte produzido a partir de leite cru exigiu cerca de 2 h 30 m para uma completa coagulação, fornecendo no final uma acidez de 70° D, enquanto que as demais amostras só chegaram a coagular após 4 a 6 horas de incubação, produzindo mesmo assim uma acidez de muito baixo valor e uma menor concentração da flora, quando examinada ao microscópio (Fig. 10 e 11, página seguinte).

Aliás, o fato relatado constitui a base do processo da pesquisa de substâncias inibidoras descrito, empregando a acidimetria.

#### DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Segundo pudemos constatar na maioria dos trabalhos que tivemos a oportunidade de compulsar, principalmente de autores americanos, é o tratamento da mastite pelo emprêgo de suspensões difundidas por via intra-mamária, entre outras causas, o grande responsável pelo aparecimento de substâncias inibidoras no leite de consumo da população ou no produto destinado à industrialização.

Tendo em vista a freqüência com que ocorre a afecção, verdadeiro flagelo do gado leiteiro e na impossibilidade de proibir o uso de medicamentos, como recurso terapêutico realmente valioso, recomenda o *Food and Drug Administration*, nos E. U. A., que no próprio tubo contendo antibiótico para a infusão intra-mamária seja impressa a advertência de que o leite produzido pelo animal assim tratado não deve ser dado ao consumo humano até o prazo mínimo de 72 horas após a última aplicação.

A incorporação de substâncias corantes, não tóxicas, como a clorofila solúvel ou outras diversas, na suspensão para uso intramamário, eliminando-se ao mesmo passo do

que o antibiótico e dando na ordenha uma apreciação visual do fenômeno, tem sido recomendada<sup>37, 38</sup>.

Os antibióticos empregados na alimentação do gado praticamente não interferem no aparecimento dos vestígios daquelas substâncias, o mesmo acontecendo quando empregados por via intra-uterina.

Os demais antibióticos injetáveis, tetraciclínicos, cloranfenicol, ou associações antibióticas, e mesmo a penicilina G, comum, eliminam-se rapidamente, em 24-48 horas.

A penicilina *retard*, cuja eliminação vai em média de 3 a 5 dias, é susceptível de entreter um nível apreciável da droga no leite ordenhado.

No campo de industrialização dos produtos de leite, o problema principal criado pela presença dos inibidores em geral e dos antibióticos em especial é a completa ausência ou diminuição acentuada da produção ácida nas culturas dos *starter*, inibindo entre outros o crescimento do *Streptococcus lactis*, *S. thermophilus*, *S. Durans*, *Lactobacillus lactis*, *L. helveticus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *Leuconostoc citrovorum*, etc., de maneira variável.

Na indústria do queijo, mesmo quando se constata no leite a presença de substâncias inibidoras, é o produto empregado, tendo-se porém o necessário cuidado de aumentar o volume do *inoculum*, prolongar o período de incubação e de produção ácida e aumentar a quantidade do sal adicionado.

No setor dos leites fermentados, como recurso de industrialização, procurou-se empregar "starter" constituída de germes antibiótico-resistentes, porém a produção ácida deixa muito a desejar, repercutindo no organoleptismo do produto.

Como conseqüência de ordem de Saude Pública, da veiculação há longos anos, do antibiótico no leite, principalmente a penicilina, além do aparecimento de estreptococos e estafilococos piogênicos resistentes, devemos pôr em destaque o papel desse resíduo na etiologia de fenômenos alérgicos cutâneos, em pessoas sensibilizadas.

Tendo em vista as 3 pesquisas nacionais nos E. U. A., nas quais ficou demonstrado que diversas amostras de leite do comércio continham quantidades variáveis de penicilina, o *"Food and Drug Administration"*, em 1959, reuniu em conferência um painel

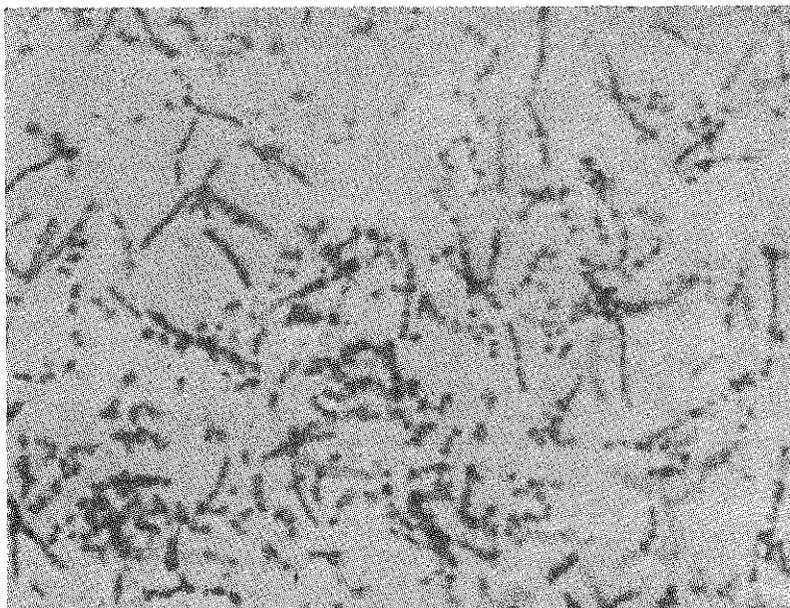


Fig. 10 — Aspecto microscópico da flora de Iogurte produzida a partir do leite padrão. 1 400 x.

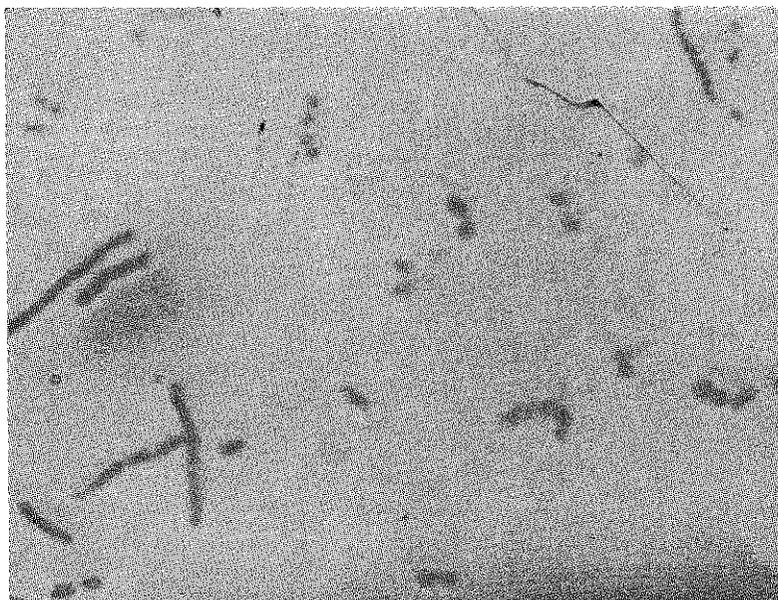


Fig. 11 — Aspecto microscópico da flora de Iogurte produzida a partir do leite mais tetraciclina. 2 240 x.

de autoridades médicas no campo especializado da alergia causada por antibióticos, para avaliar o risco à saúde pública da ingestão de antibióticos veiculados no leite e derivados.

Chegou-se à conclusão geral de que "os antibióticos diversos, tais como a bacitracina, neomicina, polimixina B, tetraciclina, todos utilizados em preparados anti-mastíticos, não constituem um risco à saúde".

Entretanto, concluiu-se também, que "a penicilina, quando presente no leite, mesmo em pequenas parcelas é altamente antigênica e capaz de causar reações alérgicas em pessoas sensibilizadas".

Foi estimado que, nos E. U. A., o número de pessoas alérgicas incluía cerca de 10% (dezesete milhões) da população total e que as reações alérgicas à penicilina variavam de um grau médio até reações de alta intensidade.

Em nossas pesquisas encontramos quantidades de penicilina variáveis de 0,05 a 0,5 unidades/ml, ou seja, respectivamente 5 e 50 unidades/100 ml.

Nos Estados Unidos, entretanto, a maioria dos alergistas consultados afirmaram que, em casos especiais, 2 a 3 unidades de penicilina ingerida produziram uma reação do tipo anafilático, em pessoas com alto grau de sensibilização e que havia suspeitas de que a penicilina veiculada no leite estivesse sendo a causa da urticária recorrente, frequentemente encontrada.

No setor da Inspeção Sanitária, o falsamento induzido pela presença de substâncias inibidoras, através da bacteriostase, na justeza da apreciação dos exames bacteriológicos rotineiros, só permite avaliar a qualidade atual do produto examinado, levando a considerar um leite altamente poluído como de boa qualidade, retirando daquele exame a sua elevada função julgadora.

A nosso ver, a pesquisa de substâncias inibidoras no leite e, principalmente, da penicilina, deve ser tornada obrigatória e realizada, a par dos exames de rotina, no produto em estado de cru, *advindo de cada região de produção*.

Os métodos por nós utilizados têm, justamente por esse motivo, caráter rápido, acompanhando o ritmo de desenvolvimento da redutase, podendo ser utilizada como prova seletiva de plataforma nas indústrias de fabricação de queijo.

O teste de acidimetria pode mesmo ser realizado em regiões de pequenos recursos técnicos, isoladamente.

E, finalmente, uma urgente campanha de esclarecimento deve ser desenvolvida, visando afastar da ordenha o gado leiteiro sob tratamento antibiótico ou sulfamídico, estabelecendo-se rigoroso policiamento a respeito e determinando-se, em todos os laboratórios de controle higiênico do leite, sistemático exame do produto advindo do interior, região por região, visando localizar os focos de produção do leite inquinado e o seu saneamento dentro do prazo mais rápido possível.

#### RESUMO

Os trabalhos de pesquisa da presença de inibidores bacterianos no leite e derivados vêm, há quase duas décadas, enriquecendo a literatura mundial.

Os inibidores podem decorrer da presença de traços de antibióticos resultantes do tratamento veterinário do gado leiteiro e de vestígios de substâncias químicas usadas na higienização em laticínios.

Nos Estados Unidos, em 1959, o *Food and Drug Administration* considerou um risco à saúde pública, pela sua capacidade de formação de antígenos, a presença de penicilina no leite e derivados, considerando fraudado o produto que veicule antibióticos em geral, tendo sido realizadas naquele país três pesquisas de âmbito nacional, em que foi constatada a presença de antibióticos em potências diversas.

A penicilina é responsabilizada pelo desenvolvimento, em pessoas sensibilizadas, de dermatose em caráter crônico ou recorrente.

Na esfera da inspeção de Alimentação Pública, a presença de inibidores do crescimento e da multiplicação bacteriana poderia falsear o julgamento da qualidade do produto, pois os exames de redutase, contagem bacteriana, pesquisa de acidez etc. forneceriam apenas o estado atual da flora.

Um leite altamente contaminado desde a fonte de produção, porém contendo inibidores, fornecerá um resultado satisfatório ao exame de rotina, feito na Capital. Paradoxalmente, um leite produzido sob condições padrões de higiene, mas sem conter inibidores, submetido ao mesmo exame, será considerado como de pior qualidade.

No setor da industrialização do leite, são altamente nocivos os efeitos da presença de inibidores, devido à baixa produção de ácido pela flora parcialmente imobilizada.

Em que pesem os fatos relatados, no Brasil ainda não se cuidou de pesquisar a presença de substâncias inibidoras em geral, principalmente a penicilina, no leite e seus derivados.

Usando métodos rápidos que fornecem respostas em 2h30m a 3h30m, foi pesquisada no leite, tipo C, de consumo da capital de São Paulo, a presença de inibidores bacterianos, tendo sido constatada a presença dos mesmos em 9% das 1000 amostras examinadas, correspondendo a penicilina a 1,9% do total encontrado, em quantidades variáveis de 0,05 a 0,5 unidades por mililitro de leite.

*Agradecimentos* — Externamos os nossos profundos agradecimentos à Laborterápica-Bristol S/A e aos técnicos de laboratório da Cooperativa Central de Laticínios do Estado de S. Paulo, Srs. Antônio José Xavier, Daniel Bastos de Matos e Vanderlei Gonçalves Candia, pela valiosa cooperação fornecida na execução das pesquisas.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- MARTH, E. H. & ELLICKSON, B. E. — Antibiotic residues in milk and milk products — A review. *J. Milk Fd. Technol.* 22:241-249, 1959.
- MARTH, E. H. — Antibiotics in milk — A review. Recent developments. *J. Milk Fd. Technol.* 24:36-44, 1961.
- VAID, M. Y. *et alii* — Penicillin levels in milk following parenteral administration of procaine penicillin G. *J. Milk Fd. Technol.* 24:7-10, 1961.
- LASSITER, C. A. — Present status of feeding antibiotics to lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 46:346-350, 1963.
- PROUTY, C. C. — Further observations of penicillin levels in milk following intramuscular and intrauterine administration. *J. Milk Fd. Technol.* 24:356-357, 1961.
- SCHIPPER, I. A.; FILIPOVS, D. & EBELTOFT, H. — Penicillactia following intramuscular administration of penicillins. *J. Milk Fd. Technol.* 28:1-4, 1965.
- AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION. Council on Drugs — Penicillin and on antibiotics in milk: report. *J. Am. Med. Assoc.* 171:135-137, 1959.
- MARTH, E. H. & ELLICKSON, B. E. — Problems created by the presence of antibiotics in milk and milk products — A review. *J. Milk Fd. Technol.* 22:266-272, 1959.
- STOLTZ, E. I. & HANKINSON, D. J. — The effects of antibiotics in milk on the human intestinal coliform bacteria. *J. Milk Fd. Technol.* 17:76-78, 1954.
- ERSKINE, D. — Dermatitis caused by penicillin in milk. *Lancet* 1(1):431-432, 1958.
- VICKERS, H. R.; BAGATUNI, L. & SUZANNE, A. — Dermatitis caused by penicillin in milk. *Lancet* 1(1):351-352, 1958.
- AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION. Council on Drugs — Penicillin and other antibiotics in milk: report. *J. Am. Med. Assoc.* 171:135-137, 1959.
- ZIMMERMAN, M. C. — Chronic penicillin urticaria from dairy products, proved by penicillinase cures. *Archs. Derm. Syph.* 79:1-6, 1959.
- SHAHANI, K. M. — The effect of heart and storage on the stability of Aureomycin in milk, butter and water. *J. Dairy Sci.* 41:382-391, 1958.
- HANSEN, H. C., WIGGINS, G. E. & BOYD, J. C. — Modern methods of mastitis treatment cause trouble in the manufacturing of fermented dairy products. *J. Milk Fd. Technol.* 13:359, 365, 1950.
- KOSIKOWSKY, F. V.; HENNINGSON, R. W. & SILVERMAN, G. J. — The incidence of antibiotics, sulfa drugs and quarternary ammonium compounds in the fluid milk supply of New York State. *J. Dairy Sci.* 35:533-539, 1962.
- MARTH, E. H. — Antibiotics in milk — A review. II. Methods for detection of antibiotics in milk. *J. Milk Fd. Technol.* 24:70-82, 1961.
- BERRIDGE, N. J. — Penicillin in milk: III. The effect on low concentration of penicillin on the rate of acid production by starter cultures. *J. Dairy Res.* 23:348-354, 1956.
- WHITEHEAD, H. R. & LANE, D. J. — The influence of penicillin on the manufacture and ripening of cheddar cheese. *J. Dairy Res.* 23:355-360, 1956.
- RICHARDS, R. J.; KENNEDY, H. E. & GOULD, I. A. — Antibiotics resis-

- tence and acid production among starter cultures belonging to the genus *Streptococcus*. J. Milk Fd. Technol. 24:317-320, 1961.
21. SHIVELER, G. & WEISER, H. — The effect of selected antibiotics upon the survival of microorganisms in raw and pasteurized milks. J. Milk Fd. Technol. 16:125-127, 1953.
  22. STOLZ, E. I. & HANKINSON, D. J. — The effects of antibiotics on the bacterial plate counts of normal raw milk. J. Milk Fd. Technol. 16:157-159, 166, 1953.
  23. WECKEL, K. G. — Aspects of pesticides and antibiotics as they relate to the dairy industry. J. Milk Fd. Technol. 23:277-280, 1960.
  24. RICHARDSON, L. A. & FOTER, M. J. — Pesticides and the food supply. J. Milk Fd. Technol. 29:148-155, 1956.
  25. BRASIL. Divisão de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem animal. (Aprovado pelo Decreto 30.691 de março de 1952). Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, 1952.
  26. BRASIL. Divisão de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Decreto n.º 1253 de 25 de junho de 1962. Altera o Decreto 30.691, de 29 de março de 1952, que aprovou o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, 1962.
  27. CUIDADOS com a alimentação Pública. Boletim Informativo da Associação Paulista de Medicina, junho, 1966.
  28. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION — Standard methods for the examination of dairy products, 11 ed. New York, A. P. H. A., 1960.
  29. MILK INDUSTRY FOUNDATION — Laboratory manual of analysis of milk and its products. Washington, D. C., Milk Industry Foundation, 1959.
  30. SILVERMAN, G. & KOSIKOWSKY, F. V. — Systematic testing of inhibitory substances in milk. J. Milk Fd. Technol. 15:120-124, 1952.
  31. INSTITUTO ADOLFO LUTZ — Métodos de análises bromatológicas. I. Análise químicas. São Paulo, Rev. Triunais, 1951.
  32. NOVELLI, A. — Química Organica. Buenos Aires, El Ateneo, 1959. v. 3: p. 351-353.
  33. WITTER, L. D. — & TUCKEY, S. — Variable factors in the new test for penicillin in milk. J. Milk Fd. Technol. 23:230-233, 1960.
  34. ARRET, B. & KIRSHBAUM, A. — A rapid disc assay method for detecting penicillin in milk. J. Milk Fd. Technol. 22:329-331, 1959.
  35. SHAHANI, K. M. — Factors affecting the visual method of detecting antibiotics in milk. J. Dairy Sci. 42:912-915, 1959.
  36. XIMENES, J. — Prova de sensibilidade antibiótica. Cadern. Terap. 6(5):266-267, 1965.
  37. MELLO FILHO, A. — O leite: colimetria, fosfatasimetria e contagem global. Rev. Inst. Adolfo Lutz 20:129-160, 1960.

Recebido para publicação em 7 de fevereiro de 1967.

Alexandre Mello Filho

Rua Ubatuba, 455

São Paulo

Brasil

