

INIBIDORES BACTERIANOS, EM ESPECIAL A PENICILINA, NO LEITE EM PÓ DE CONSUMO DA CAPITAL ⁽¹⁾

BACTERIAL INHIBITORS, WITH SPECIAL REFERENCE TO PENICILLIN, PRESENT IN POWDERED MILK OF S. PAULO, BRAZIL

ALEXANDRE MELLO FILHO ⁽²⁾

LAURO ALBANO SANDOVAL ⁽³⁾

NELSON REIS RODRIGUES ⁽⁴⁾

JOSÉ XIMENES ⁽⁵⁾

DANIEL BASTOS DE MATOS ⁽⁶⁾

SUMMARY

We have demonstrated for the first time in Brazil, in 1966, that there exist penicillin contamination of milk "in natura" used for consumption in São Paulo approximately one million liters a day.

So, it became necessary to develop a similar research related to its direct derivative, powdered milk.

Using methods based in growth inhibition of test organism such as agar-plate assay of *Bacillus subtilis* ATCC, 6633, or C.T.T. redutase test (triphenyltetrazolium chloride), and the research on the acidity degree of milk inoculated with *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*, we found in the powdered milk used in São Paulo penicillin levels between 0.05 to 0.5 U/g and also non-identified bacterial inhibitors, even possibly other antibiotics. In 1959, Food and Drug Administration, U.S.A., declared undesirable the presence of penicillin in milk since it may cause chronic or recurrent dermatosis. The presence of bacterial inhibitors may, further lead to errors in standard tests carried out in milk such as redutase test, bacterial counts, acidity test, etc.

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

In view of these facts, we believe that urgent measures should be taken, such as:

1. An official promotion to carry out a nation wide research which will give a real and complete idea of the problem.
2. A campaign aiming to avoid milking of cows under antibiotic or sulfamidic treatment.
3. Proper use of antibiotics as feed supplement to dairy cattle.
4. Rigorous sanitary control with every milk control laboratory assaying systematically the production coming from the country, topographically, section by section, in order to locate the source of contaminated milk and its sanitation in the shortest possible time.

Finally, it is important to consider frauded the milk carrying repeatedly inhibitory substances specially antibiotics direct or indirectly added.

-
- (1) Realizado na Divisão Técnica dos 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 4-12-1967.
 - (2) Da Clínica Dermato-sifilográfica do Hospital Municipal. Da Divisão Técnica dos Laboratórios da Cooperativa Central de Laticínios do Estado de São Paulo. Do Departamento de Dermatologia da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (Serviço Prof. H. Cerrutti).
 - (3) Da Seção de Industrialização do Leite do Departamento de Produção Animal, da Secretaria de Agricultura de São Paulo.
 - (4) Da Divisão de Controle de Qualidade da Laborerápica-Bristol S.A.
 - (5) Da Divisão de Microbiologia do Departamento Médico da Laborerápica-Bristol S.A.
 - (6) Da Divisão Técnica de Laboratórios da Cooperativa Central de Laticínios do Estado de S. Paulo.

INTRODUÇÃO

Há 38 anos passados, em 1929, com a descoberta da penicilina por FLEMING¹, inaugurava-se a era dos antibióticos.

Com o advento da antibioticoterapia, os antibióticos passaram a ser empregados há quase duas décadas, por fazendeiros e veterinários no tratamento das doenças infecciosas do gado, sendo também comum a incorporação daquelas drogas nas dietas suplementares, na alimentação do rebanho bovino^{2,3,4,5}.

Os antibióticos no leite surgem em decorrência de três principais possibilidades: indiretamente, em consequência do tratamento veterinário do gado leiteiro e pelo fornecimento aos rebanhos de dietas suplementares ou diretamente por fraude.

Rapidamente analisemos os três mecanismos. De toda a vasta patologia animal, bovina, há que ressaltar a trilogia mórbida: mastite, brucelose e tuberculose.

E indubitavelmente é a mastite o verdadeiro flagelo do gado bovino pois, não sendo doença do tipo epidêmico clássico, com manifestações de caráter agudo ou sub-agudo, é, ao contrário, insidiosa, persistente e altamente difundível, afetando os rebanhos leiteiros em extensão mundial. Dada a sua estreita subordinação anatômica, regional, poucos são na verdade os danos biológicos sistêmicos, passando mesmo inadvertida; porém imensas são as consequências econômicas da zoonose⁶.

Triste e oneroso privilégio, o rebanho mais bem selecionado, o melhor gado leiteiro é o mais afetado, com fenômenos inflamatórios, muitas vezes acentuados, em consequência dos quais surgem a fibrose e a atrofia maior ou menor da glândula mamária e queda vertical de sua produtividade.

"E sem gado que possa dar leite, e sem leite para vender" — escreveu o produtor no mármore de sua contabilidade glacial, o epítáfio da sua própria atividade⁷.

Este é o aspecto econômico do problema. Porém, mais grave ainda é o aspecto sanitário. Sabemos que as vacas atacadas de mastite "ao mesmo tempo que segregam o leite expulsam grandes quantidades de pus, que contaminam aquele produto e o transformam em poderoso agente de contágio"⁸, causando epidemias, como a de angina, assinaladas em Chicago, com mais de 10 000 casos,

sem citar a casuística norte-americana de escarlatina atribuída ao leite, e de origem animal ou mesmo por contágio humano do produto.

Além dessas estreptocócias geradas pela ingestão do leite, avultam as manifestações secundárias ao consumo de produto inquinado por estafilococos de origem mastítica, com uma grande variedade de quadros clínicos desde as infecções da pele, gastrenterites, septicemias, e morte⁹.

Além de sua ação bacteriana direta, o estafilococo produz uma enterotoxina termo-estável, que resiste à fervura, mesmo num período de 30 minutos⁹.

As enterotoxinas estafilocócicas no leite ou em seus sub-produtos causam nos consumidores manifestações que consistem em náuseas, vômitos, surtos diarréicos, dores abdominais difusas, ocorrendo de uma a seis horas após a ingestão do alimento⁹.

O uso não só do leite "in natura" mas também do leite em pó pode originar tais complicações na verdade raras pois é necessário que para tal fato suceda que o produto líquido fique muitas horas em deficiente temperatura de frigorificação.

Não obstante, as duas maiores casuísticas associadas à ingestão do leite em pó são a inglesa abrangendo 1 200 pessoas¹⁰ em 1955, e a de Porto Rico, atingindo 775 escolares que adoeceram após se alimentarem com leite produzido nos Estados Unidos e que ficou estocado em carro tanque, sem refrigeração, 48 horas antes de ser transformado em pó, em 1957¹¹.

E ressalta ROGICK¹² o fato de que as doenças transmissíveis ao homem através do leite e derivados aparecem com mais freqüência nas localidades onde não há usina de pasteurização e em consequência do consumo do produto cru, contaminado.

Porém, se a contaminação maciça do leite de um rebanho pode ser facilmente evitada, já nas fazendas, pela exclusão da ordenha dos animais clinicamente doentes, há que considerar o problema complexo da mastite sub-clínica, também inaparente fonte de contaminação do leite e muitas vezes ante-véspera da doença manifesta^{13,14,15}.

Nos Estados Unidos, em 1956, segundo estimativas de NELSON¹⁶ e de EDMOND & ME-

RILAN¹⁷, cêrca de 25% das vacas são clínica ou sub-clinicamente doentes, originando 15% de substituições no rebanho e 15 ou 20% na diminuição da produção leiteira.

Segundo COURTER e GALTON¹⁸, observações feitas em 1962 referem que 70% dos rebanhos leiteiros são portadores de mastite estafilocócica, não fornecendo entretanto os autores a estatística do número de animais infectados.

No Estado de São Paulo, conforme comprovam o trabalho de REIS & SWENSON¹⁹, 1931, SILVA FILHO²⁰, 1942, LACERDA JUNIOR, ZANI NETO e FREITAS^{21, 22}, 1953/1954, REZENDE²³, 1962, existe mastite bovina afetando os rebanhos leiteiros, produtores dos leites tipo "A", "B" e "C", e principalmente dos dois primeiros, não tendo, entretanto, ainda sido possível avaliar os danos provocados pela doença.

Segundo ROGICK¹², PORTO & GONÇALVES¹⁵, foi constatada a mastite na forma sub-clínica em 46% de 15 rebanhos produtores de leite tipo "C" e em 92% dos 38 rebanhos produtores do leite tipo "B", examinados em 1964. E que por estimativa de ROGICK¹⁵ em 1963, na zona de Campinas "levando-se em aprêço uma produção anual de 10 milhões de litros, a mutilação econômica dos criadores deve andar na ordem de 60 milhões de cruzeiros, não entrando neste cômputo, o leite rejeitado na plataforma da Usina, por apresentar contagem leucocitária elevada". E isso, acontecendo em 1963.

Na Grã-Bretanha, segundo LAING & MALCOLM²⁴ 1954, e BLACKBURN²⁵ 1956, os prejuízos são da ordem de 32 bilhões de cruzeiros velhos anuais. Nos Estados Unidos, as perdas são quatro vêzes superiores¹⁵.

Na Espanha, por estimativa apresentada por CECILIA⁶, 1956, a então produção mundial anual de leite andava pelo valor de "mais de dois mil e quinhentos milhões de hectolitros"; só na França, já em 1940, a perda anual na produção lactea era da ordem de 10 milhões de hectolitros de leite²⁶. Não é pois de estranhar que, para preservar essa formidável riqueza, lancem mãos, fazendeiros e veterinários, dos diversos antibióticos administrados aos animais afetados através da perfusão de pastas aquosas ou oleosas difundidas no quarto ou quartos do úbere infectado.

Devido à procura intensa e à livre aquisição das preparações antibióticas, na luta con-

tra a mastite, começaram as mesmas a ser perfundidas indiscriminada e abusivamente, sem maiores cuidados sanitários²⁷, como o de retirar da ordenha do leite destinado ao consumo humano e à industrialização os animais em tratamento. E já podemos falar então em contaminação antibiótica do leite, dependendo a sua extensão, freqüência e valores, naturalmente da quantidade do leite que os animais tratados estejam produzindo, em relação ao total ordenhado no rebanho.

Modificou-se também a patologia mamária pela menor freqüência do estreptococo mais susceptível e pelo desenvolvimento de espécies de estafilococos resistentes aos antibióticos²⁷, que são também eliminados no leite juntamente com o medicamento empregado e tornando menos útil.

Entretanto, outras doenças infecciosas acometem o gado bovino, havendo a necessidade do emprêço de diversos tipos de antibióticos administrados entre outras vias, principalmente pela parenteral, oral, intra-uterina, com eliminação relativamente rápida daquelas substâncias.

Porém, quando se utiliza a penicilina "retard" especialmente a benzatínica, na dosagem terapêutica de cêrca de 10 000 U por quilo pêso vivo²⁸, a sua eliminação extremamente lenta resulta na presença continuamente prolongada do medicamento no leite ordenhado, na verdade em potências muito inferiores aquelas encontradas após o tratamento local anti-mastítico^{4, 5, 29, 30}.

A suplementação, com antibiótico, das rações alimentares dos animais favorecendo o seu crescimento e acelerando a sua maturação, é fato comprovado pela observação feita em todo o mundo, embora não se conheça bem o seu mecanismo de ação.

Entretanto, infelizmente a antibiótico-suplementação deveria ser destinada somente aos animais jovens, o que freqüentemente não acontece.

As doses, nos anos de 1950-1955, acrescentadas às rações alimentares, oscilavam de 5 a 15 mg/quilo. Após, a tendência foi a de aumentar, atingindo ou passando 100 a 200 mg/quilo, visando mais a prevenção de infecções que a estimulação do crescimento, e empregados sem a supervisão veterinária.

Nas dosagens da ordem de 20 mg/quilo de pêso, conforme recomendação da Organi-

zação Mundial de Saúde, não se encontra antibiótico em quantidade significativa ou mesmo determinável nos tecidos, mas ao contrário acontece quando se ministra 100 a 200 mg/quilo de peso³¹. Porém acreditamos que a sua influência no aparecimento de vetígios de antibiótico no leite seja realmente pequena. Entretanto, essa suplementação antibiótica tem o inconveniente de induzir a antibiótico-resistência da micro-flora intestinal do animal, desde que não seja empregada devidamente (20 mg/quilo de peso).

A flora bacteriana intestinal comporta muitas vezes salmonelas (*Salmonella typhimurium*) que se tornam rapidamente resistentes. O tratamento pois indiscriminado da mastite bovina e a suplementação alimentar antibiótico dos animais em doses excessivas e em períodos prolongados levam respectivamente ao aparecimento no leite de espécies estafilocócicas e enterobacteriáceas resistentes, “não se sabendo entretanto de que maneira êstes germes passam a constituir problemas em terapêutica humana”³¹.

Finalmente a terceira eventualidade por nós aventada foi a da fraude, colocação proposital do antibiótico no leite, com intenção conservadora do produto.

Conforme refere Paschoal Mucciolo, “a introdução dos antibióticos na conservação dos alimentos deve ser atribuída a TARR, que em 1944, na Estação Experimental de Pesca, do Pacífico, tentou o uso de ácido penicilínico para prolongar a comestibilidade de filés de peixe”^{32, 33, 34}.

De dados obtidos em 1958, em diversos países, inclusive o Brasil, a clortetraciclina estava sendo utilizada, com permissão oficial, para a conservação de carne, pescado e aves.

Entretanto os antibióticos assim empregados além da possibilidade, embora pequena, de desenvolver uma micro-flora resistente³⁵, podem acarretar distúrbios no balanço da flora intestinal humana, se usados a longo termo³², ou induzir a antibiótico-resistência.

E, segundo MUCCILO³² são essas as razões que “levaram alguns estudiosos como Hansen (1961), a preconizar o uso reservado e exclusivo de um tipo de antibiótico para aplicação na conservação dos alimentos”. Segundo cita LACAZ³⁶ os antibióticos vêm sendo usado também para o combate das contaminações verificadas nas fermentações principalmente as alcoólicas; nos Estados Unidos,

segundo AQUARONE²⁷ (1959), para prevenir a contaminação durante a fabricação da cerveja.

No leite, em face das primeiras observações do aparecimento de antibiótico, secundários a tratamento veterinário, diversos pesquisadores entre êles CURRAN³⁸ (1946) e FOLEY & BYRNE³⁹ (1950) tentaram experimentalmente o emprêgo das penicilinas como conservantes e demonstraram a sua ineficiência pela pequena ação sôbre muitas espécies de *Bacillus* e sôbre os coliformes.

Entretanto, a estreptomocina já evidenciava boa ação conservadora e a clortetraciclina e a oxitetraciclina, no dose de 10 p.p.m., foram capazes de impedir o crescimento bacteriano por 20 horas a 37°C³².

Mas ficou bem acentuado por Mucciolo que a adição de antibióticos, nas fontes de produção, impediria que o leite fosse utilizado devidamente na industrialização, no preparo de queijos e produtos dietéticos fermentados como o iogurte e a coalhada, cujo preparo dependeria da boa multiplicação de germes fermentadores da lactose, previamente selecionados e inoculados no leite, e cujo crescimento seria parcial ou totalmente inibido pelos antibióticos.

O uso sistemático de antibióticos traria pois o inconveniente “de obrigar a uma seleção do leite na fonte de produção o que seria de todo inviável”³², sendo também prática ilegal, contrária ao que determina o atual Regulamento Federal a respeito^{78,79}.

Entretanto além do uso abusivo e indiscriminado das preparações antibióticas, conforme acentua o “The Journal of the American Medical Association”, no seu editorial “Penicillin and other antibiotics in milk”⁴⁰, existe alguma suspeita de que os antibióticos estejam sendo 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”. Entretanto também os sulfamídicos têm sido revelados no leite, ao par de resíduos de substâncias químicas originadas na higienização química dos vasilhames e maquinária utilizados na indústria de laticínios^{41, 42}.

Há mais de 20 anos vem a literatura mundial se enriquecendo com inúmeros trabalhos de pesquisa da presença de substâncias inibi-

doras do crescimento bacteriano no leite, principalmente os antibióticos e, destes, destacadamente a penicilina, pela maior facilidade na sua pesquisa com a utilização da enzima penicilino-inativamente, específica — a penicilinasase^{43, 44, 45, 46, 47}.

Em que pese o vulto de publicações existentes na literatura mundial, até 1966, quando apresentamos no Departamento de Higiene e Medicina Tropical da Associação Paulista de Medicina a nota prévia das nossas pesquisas sobre a presença de inibidores bacterianos no leite "in natura" tipo C, de consumo da Capital, e em 1967, os resultados preliminares das nossas investigações efetuadas com o leite em pó, no Brasil, ainda não se cuidara de avaliar direta ou indiretamente (pesquisa de substâncias inibidoras), a percentagem e grau de contaminação antibiótica do leite dado ao consumo humano^{5, 48, 49}.

MÉTODOS

Tendo em vista serem os métodos empregados nestas pesquisas os utilizados em 1966-1967, em idênticas experimentações nas pesquisas efetuadas com o leite "in natura"⁵, deixaremos de lado os detalhes técnicos, passando apenas a fornecer, para melhor compreensão do assunto, uma rápida visão dos mesmos.

Dos inúmeros métodos propostos na literatura, nestes últimos 20 anos, *atestado ineludível de que o método ideal ainda está por surgir*, e baseados, todos, nas modificações do crescimento bacteriano, selecionamos dois, recomendados pelo "Standard Methods"⁵⁰, fundamentado o primeiro no emprêgo do complexo disco absorvente, placa-agar-germe de provas e o segundo na redução do C.T.T., por nós utilizados, com algumas modificações. Complementados por um terceiro processo, tendo como fundamento a produção do ácido láctico por germes fermentadores da lactose e por nós especialmente adaptado às circunstâncias na necessidade da obtenção de um conjunto de rápida, prática e eficiente atuação.

Para a pesquisa de inibidores no leite "in natura" é fundamental o aquecimento prévio do mesmo a 80°C durante 5 minutos para destruir bacteriófagos ou substâncias inibidoras naturais eventualmente presentes, levando em conta a termo-resistência dos resíduos sulfamídicos, antibióticos e dos derivados quí-

micos da higienização do equipamento empregado na linha de beneficiamento do leite.

É obrigatória também a remoção em todo material de laboratório, em especial a vidraria, de vestígios de detergentes, mistura sulfocrômica etc., enfim o ingrediente higienizador empregado na rotina.

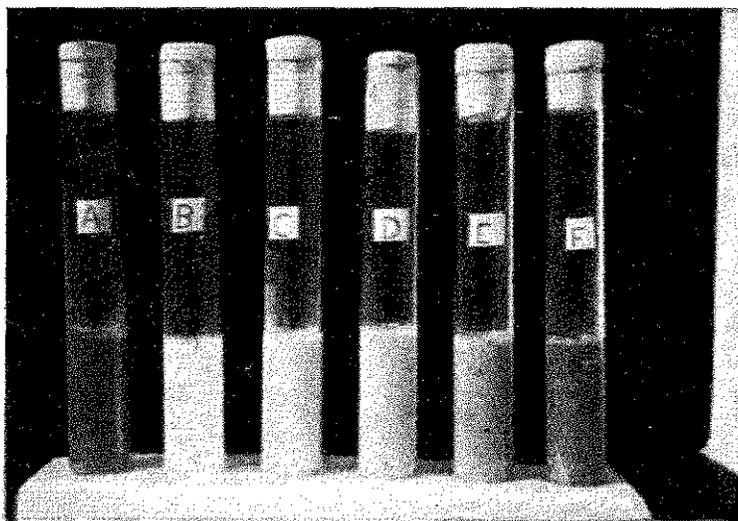
Na pesquisa feita com o leite em pó reidratado, seguimos também as mesmas normas. O primeiro método, citado de início, tem como fundamento o fato de que quando depositamos um disco de papel de filtro, embebido em leite, na superfície de uma placa contendo 5 ml de "seed-agar" acrescentando a esporos de *Bacillus subtilis* A.T.C.C., 6 633, ao incubar a placa a 37°C, o bacilo em rápido crescimento (2h30m a 3h30m) opacificava o agar exceto ao redor do disco embebido, em caso da presença do inibidor no leite, havendo então a formação de um halo de inibição que mantém a transparência local, inicial, do agar^{5, 50, 51, 52}.

Para sabermos se é ou não a penicilina o inibidor presente, acrescentamos ao leite a enzima penicilino-inativante — a penicilinasase — e repetimos a operação acima, tornando a incubar. Uma zona de inibição em torno dos discos não tratados e ausência de inibição em torno dos discos com penicilinasase representará um teste positivo para a penicilina.

Zona de inibição com e sem penicilinasase, atividades antibacterianas diversas. No caso da penicilina, estabelecida qualitativamente a sua identidade para a determinação semi-quantitativa da sua potência, devemos comparar a dimensão do halo formado, medido pelo seu diâmetro, com as dimensões de outros halos de inibição resultantes da colocação na placa de discos embebidos em diferentes potências de penicilina: 1,0; 0,50; 0,10 e 0,05 u/ml.

O limite de sensibilidade desta prova rápida é de 0,05 unidades de penicilina por mililitro de leite. O teste da redução do C.T.T. (cloreto de 2-3-5-trifenil-tetrazolio) é baseado no fato de que aquela substância, sendo um dos poucos compostos orgânicos incolores na forma oxidada, ao se reduzir torna-se colorida, o que acontece na presença de germes em desenvolvimento.

Dez mililitros das amostras dos leites-problemas e do padrão são aquecidos a 80°C durante 5 minutos para teoricamente nivelar suas floras e destruir possíveis inibidores naturais, sendo após semeados com quantidades



Tonalidades cromáticas na prova do C.T.T.: A) Coloração vermelha — leite controle com ausência completa de inibidor; B) Cór branca — inibição completa; C e D) Côres róseo-clara e rósea — inibição média; E e F) Côres carmim e vermelha — ausência completa de inibição.

iguais de *inoculum* contendo *Streptococcus termophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* e cultivados a 45°C, durante o período de 2 horas. Retirados da estufa cultora, são acrescentados a 0,3 ml da solução aquosa do C.T.T., a 1:25, homogeneizados, e tornados a incubar por mais 30 minutos.

Ao fim de 2h30m, comparamos as colorações obtidas com a da amostra do leite padrão. A cor vermelha indicará a ausência total de inibidores e representará pleno desenvolvimento da flora bacteriana de prova e boa redução do C.T.T., conforme mostra a figura acima.

As colorações de nuances mais claras vão indicando respectivamente inibições de grau mais acentuado. A cor branca, a coloração própria do leite, indica inibição completa do desenvolvimento bacteriano com ausência de redução do C.T.T., que permanece na sua leucoforma.

Para a realização da terceira prova, a da pesquisa do teor de acidez em ácido láctico, desenvolvemos as mesmas etapas já vistas, excluindo entretanto o emprêgo do C.T.T.

Após 2h30m de incubação a 45°C, avalia-se a acidez produzida, usando solução N/9 de hidróxido de sódio e bureta pelo processo corrente recomendado por DORNIC⁵⁴. Quan-

to mais elevada a acidez maior índice de atividade bacteriana e menor índice de inibição. Este método de simples execução é prova e contra-prova do anteriormente visto.

Outrossim, no final de 2h30m, as amostras isentas de inibidores encontram-se coaguladas, dando pela simples visualização imediatamente indicações do teor ácido produzido.

As amostras contendo inibidores permanecem líquidas ou no máximo tornam-se semi-coaguladas. Como prova subsidiária a empregar-se quando numa amostra de leite não conseguimos identificar a penicilina, correndo pois a ação inibidora por conta de substâncias inibidoras diversas, antibióticas ou não, pesquisamos sistematicamente a possível presença de resíduos sulfamídicos⁵, pelo processo de Bratt e Marshall; vestígios de compostos de amônio quaternário³, pelo método de Miller e Elliker, e os diversos conservadores entre os quais o peróxido de hidrogênio, o aldeído fórmico, pelos processos de rotina baseados nas recomendações do livro Métodos de Análise Bromatológicas⁵⁵, do Instituto Adolfo Lutz.

O leite em pó deve ser reconstituído, no momento do exame, aquecido a 80°C, durante o período de 5 minutos, na proporção de 11 g por 99 ml de água destilada, esterilizada.

Para as três provas utilizadas, conforme pudemos verificar, as potências mínimas inibitórias na pesquisa da penicilina, tetraciclina, cloranfenicol e estreptomina são: 0,05 UI/ml para a penicilina, 0,5 µg/ml para a tetraciclina e o cloranfenicol e 5 UI/ml para a estreptomina.

Entre as principais provas subsidiárias levadas a efeito, a procura de sulfamídicos livres no leite foi realizada até o limite de 0,005%; a dos compostos do amônio quaternário, até a diluição de 5 p.p.m., e a do formaldeído, até 1 parte por 100 000.

RESULTADOS

Para a realização do exame do leite em pó, foram adquiridos no comércio amostras diversas preferentemente as de produção recente e de lotes diversos tendo-se, inclusive, o cuidado prévio de verificar, na parte inferior da lata ou no pacote do leite em pó, o código indicativo da data de sua produção, para não incidirmos no erro de adquirir duas vezes o mesmo material.

Examinamos um total de 400 amostras, compreendendo um número aproximado para cada marca industrial: Glória, Mococa, Ninho, Paulista, Sol, União e Vigor.

As amostras examinadas foram sempre que possível a do leite em pó na forma integral e quando impossível, por não ser industrializado sob essa apresentação, na forma integral instantâneo.

A grande dificuldade encontrada foi a saturação do mercado com remessas de cada produção por marca industrial dentro das suas possibilidades, e que não se renovavam obviamente até o seu parcial esgotamento, quando surgiam novas partidas de leite com datas de produção diferentes das de partidas anteriormente adquiridas.

Portanto, essa foi a diferença marcante com o trabalho de pesquisa idêntico levado a efeito em 1966, com o leite líquido, cujo estoque no comércio se renova diariamente — 1 milhão de litros por dia — em alta rotação de consumo, fornecendo constantemente grande variedade de amostragem.

Dentre as 400 amostras examinadas, 4 mostraram veicular penicilinas bio-sintéticas nas potências de 0,05; 0,1; 0,4 e 0,5 U/g e 14 indicaram conter inibidores não identificados, nem mesmo pelos métodos subsi-

diários já citados, o que portanto levanta à suspeita de serem os mesmos de origem também antibiótica. Se considerarmos apenas a relação direta dos valores encontrados com referência ao total das amostras examinadas, teremos um índice de frequência de penicilina de 1% e o de outros inibidores, de 3,5%.

Entretanto, se as substâncias inibidoras não identificadas incidiram uniformemente nas diversas marcas industriais, o que mantém o seu índice de frequência a 3,5%, a penicilina mostrou-se presente tão somente naquelas cujo montante de produção é bem menos significativo, o que altera o raciocínio, passando pois a sua frequência a ser considerada não só em relação ao total das amostras examinadas mas também à produção industrial dos leites em pó de marcas diversas.

Considerando que a produção no ano de 1967 foi para o leite integral a de cerca de 25 000 000 de quilos para as marcas industriais de maior produtividade e a de 500 000 a 3 000 00 de quilos para as de menores índices de produção, chegamos à conclusão de que nas amostras examinadas o índice da presença de penicilina é o de 0,12%.

E vemos comparativamente que, no leite em pó, as percentagens dos inibidores não identificados, 3,5% e da penicilina, 0,12% são bem menores do que as encontradas em 1966 para o exame do leite "in natura", respectivamente 9% e 1,9%.

Também constatamos, em relação ao leite "in natura" tipo C, que existe larga flutuação daqueles valores, pois os exames estatísticos que continuamos a fazer mostram principalmente para a penicilina índices sensivelmente mais baixos, com cerca de 0,5% de frequência. Como ficou subentendido deixamos de entrar em maiores detalhes não declinando mesmo o nome das marcas industriais que mostraram a presença de penicilina para não dar margem a outras interpretações que não a pura intenção científica deste trabalho.

Julgamos que o número relativamente pequeno de amostras examinadas, dada a complexidade da sua obtenção, não foi de molde a favorecer um resultado que reflita absolutamente a real situação de contaminação química ou bioquímica do leite em pó.

Pois o leite em pó produzido não é tão somente o integral, mas também o desnatado,

o dietético infantil e o chamado leite em pó industrial empregado, entre outras, pelas indústrias de sorvetes, balas ou de chocolate e bolachas, alimentos que poderão, pois, embora numa possibilidade um tanto remota, veicular potências mínimas de penicilina, com sérias conseqüências de ordem da Saúde Pública.

Julgamos que também pesquisas idênticas às nossas, porém de maior amplitude, devam ser levadas a efeito pelos órgãos oficiais e com os diversos tipos do leite em pó industrializado no Brasil ou com os importados.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Tendo sido por nós demonstrado que existe contaminação penicilínica do leite "in natura" do consumo da Capital, cêrca de 1 milhão de litros diários, e do seu derivado mais direto, o leite em pó, com a presença de outros inibidores não identificados, possivelmente também antibióticos, a nosso ver urgentes medidas devem ter tomadas.

A promoção governamental de uma pesquisa de âmbito nacional que exprima a situação real, global do problema.

O desenvolvimento de uma campanha de esclarecimento visando afastar da ordenha o gado sob tratamento antibiótico ou sulfamídico.

O emprêgo adequado da antibiótico-suplementação das rações alimentares bovina.

O rigoroso policiamento sanitário a respeito, determinando-se, em todo laboratório de contrôle higiênico do leite, sistemático exame do produto advindo do interior, topográficamente, região por região, visando localizar os focos de produção do leite inquinado e o seu saneamento dentro do prazo o mais rápido possível⁵.

O estabelecimento do critério que considere fraudado o leite veiculando reiteradamente substâncias inibidoras do crescimento microbiano, principalmente se antibióticos, quer acrescentados direta ou indiretamente.

É o que vem sendo feito há muitos anos em diversos países, inclusive no nosso vizinho continental, os Estados Unidos.

Nos Estados Unidos, conforme já tivemos a oportunidade de citar⁵, investigações levadas a efeito pela F.D.A., de 1954 a 1956, e com o leite "in natura", evidenciaram a

presença da penicilina em níveis variáveis de 0,003 a 0,55 U/ml, e em 3,2 a 11,6% das amostras examinadas.

Na Grã-Bretanha, em 1951 e 1953 as potências penicilínicas encontradas foram de 0,35 a 15 U/ml e incidiram em 1,4 e 2,8% das amostras examinadas^{56, 57}.

Entretanto, outros inibidores foram identificados no leite, afora os antibióticos, constituídos por substâncias químicas derivadas, na higienização do equipamento empregado na indústria de laticínios ou pelo adicionamento por manobras ilícitas, como o emprêgo do peróxido de hidrogênio e do formaldeído⁵⁸. Nos Estados Unidos, em 1954, pesquisa da presença de inibidores em geral, acusou no leite *in natura*, o índice de frequência da ordem de 4,3% e no Canadá, em 1952, a percentagem de 7,3%.

Oportuno será acentuar que êsses inibidores, se de origem química, como os bioquímicos, interferem na multiplicação dos "starter" lácticos em geral, com repercussões evidentes na industrialização dos derivados fermentados do leite, tais como o queijo, a coalhada o Quefir e o Iogurte.

Segundo salientam TERPLAN & ZAADHOF⁵⁹, em 1957 em ampla revisão sôbre o assunto, a ação bactericida ou bacteriostática observada no leite deriva, além dos vestígios de sulfamídicos, antibióticos ou outras medicações empregadas com finalidades terapêuticas veterinárias, de catabolitos diversos, sendo algumas próprias do organismo animal ou provindas de pesticidas empregados pela moderna agricultura na preservação das pastagens e das colheitas de grãos eliminados pelo leite.

Outra origem seria o adicionamento, ao leite, de conservadores.

A ação bacteriostática natural do leite cru, fresco, seria devido aos bacteriófagos, às substâncias chamadas lacteninas, corpos de origem proteínóide cuja quantidade varia de animal a animal, ou certas aglutinases e imunoglobulinas, complementos e anti-corpos, sendo porém substâncias termo-lábeis^{59, 60}.

Atividades semelhantes estariam relacionadas com os hormônios, fermentos e leucócitos encontrados no leite^{59, 60}.

Substâncias antibiótico-semelhantes podem também ser produzidas por várias sementes, tendo os ácidos graxos livres ação inibidora⁵⁹.

Quais desses fatores seriam na verdade os responsáveis pela inibição encontrada pelos autores quando não vinculada a substâncias conhecidas?

Entretanto, a existência de uma ação bactericida e bacteriostática natural do leite, de importância significativa, é contestada por muitos autores como MEYER & WALSER ^{apud} 59, 1964.

Julgam TERPLAN & ZAADHOF ⁵⁹ que a ação inibidora encontrada no leite está vinculada principalmente ao emprego veterinário dos antibióticos, quer por via oral ou parenteral, porém principalmente pelo emprego abusivo de antibióticos em veículos oleosos, transfundidos intracisternalmente no tratamento anti-mastítico.

A ação dos pesticidas, principalmente dos inseticidas residuais, seria realmente pequena ⁵⁹ e mais intensa no leite líquido do que no em pó ⁶¹.

Conforme acentuamos de início, além da repercussão indesejável nos setores de industrialização, na esfera da inspeção da Alimentação Pública, a presença de inibidores do crescimento e multiplicação bacteriana pode falsear o julgamento da qualidade do produto, pois as provas da redução, pesquisa de acidez, alizarol, e a contagem bacteriana global etc. fornecem na Capital, nos laboratórios fiscalizadores de controle, apenas o estado atual da flora.

Um leite altamente contaminado, veiculando substâncias inibidoras, fornecerá um resultado satisfatório ao exame de rotina. Paradoxalmente um leite produzido sob condições padrão de higiene, mas sem conter inibidores, submetido ao mesmo exame poderá ser considerado como de pior qualidade.

Levando em consideração esses fatos, nos Estados Unidos, a "Food and Drug Administration", já em 1955, considerando os resultados dos inquéritos a respeito de emprego de drogas antibióticas e conservadores de alimentos, advindos da adição direta ou indireta a alimentos destinados ao consumo humano, podendo causar fenômenos de sensibilização aos consumidores e incitar o aparecimento de variedades de microrganismos patogênicos resistentes àquelas drogas, resolve declarar que os mesmos constituem um risco à saúde pública.

A presença de antibióticos nos alimentos destinados ao consumo humano, de direto

ou indireto adição, deve ser então condenados como uma adulteração.

Para avaliar, em particular, o risco, à Saúde Pública, da ingestão de antibióticos veiculados pelo leite e derivados, a "Food and Drug Administration" em 1959 reuniu em conferência, um painel de autoridades médicas no campo especializado na alergia causada pelos antibióticos.

Chegou-se a 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".

Conforme bem acentuam MENDES ⁶², BASTOS ⁶³, ROTBERG ⁶⁴, SILVA *et alii* ⁶⁵, HSU & EVANS ⁶⁶, WELCH *et alii* ⁶⁷, LACAZ ⁶⁸, e a literatura mundial a respeito é tão pródiga que maiores citações seriam fastidiosas, a penicilina tem salvo dezenas de milhares de vidas humanas, mas a redução da mortalidade tem afetado a vida de milhares de pessoas sensibilizadas pela ocorrência de reações colaterais que vão da reação cutânea moderada ^{62,64}, a uma resposta extremamente polimorfa: edema ângio-neurótico, reações gerais, tipo doença do soro, manifestações oftalmológicas, rinológicas, neuro-psíquicas, asmátiformes, gastrintestinais, cardiovasculares, e choque anafilático e morte.

A sensibilização à penicilina pode resultar da ingestão medicamentosa, de injeções ou de aplicações de pomadas para uso local, na pele, mucosa, ferimentos, ou pelo uso de colírios ⁶⁹.

Durante anos seguidos a penicilina tem sido injetada e administrada pela via oral aplicada a todas as partes do corpo, pulverizada, atomizada, pelas vias intra-abdominal, intracisternal, intrapleural, e intravaginal, sem deixar livre qualquer superfície ou cavidade ^{62, 65, 70}.

Casos diversos relatados, de enfermeiros e farmacêuticos sensibilizados pelo simples manuseio na preparação diária de injeções ministradas a pacientes, são bastante conhecidos.

Em 1956, nos Estados Unidos, WELCH *et alii* ⁶⁷, em pesquisa de âmbito nacional,

considerou que de 1 070 casos com reações graves, relacionadas, 901 foram causadas pela penicilina e que desses 901 casos, 83 faleceram.

A grande maioria das reações graves foram do tipo anafilático e a sua incidência vem aumentando conforme relacionado nos três anos de pesquisa daqueles autores: 179 casos em 1954, 231, em 1955 e 301 em 1956.

Até 1945, existia apenas um tipo de penicilina, já em 1957 se dispunha de 121 apresentações comerciais⁶⁵. Se bem que nos anos que se seguiram, até esta data, foram surgindo os demais antibióticos em uso, de ação mais ampla e menos antigênica, com a criação das penicilinas semi-sintéticas, que visam competir com os vários antibióticos e já também com largo espectro, sendo penicilinase resistente, está havendo um ressurgimento da penicilina quer na forma para uso oral como parenteral^{70, 71, 72, 73}.

E as penicilinas bio-sintéticas e as semi-sintéticas são igualmente antigênicas e capazes de produzir sensibilizações cruzadas⁷⁴.

Magno é o problema se considerarmos, por comparação, o que acontece nos Estados Unidos aonde foi estimado que 10% da população — 20 milhões de norte-americanos — apresentaram em qualquer fase de sua vida predisposição a sensibilização a algum alimento, medicamento ou outras substâncias.

E sendo muito variável a capacidade de sensibilização à penicilina, pode ser adquirida ao primeiro contato.

Em nossas pesquisas, encontramos para o leite em pó e "in natura" potências do antibiótico que variaram de 0,05 a 0,5 unidades por grama ou mililitro do produto examinado, ou seja respectivamente 5 e 50 unidades por 100 mililitros, cerca de um copo de leite reconstituído.

Nos Estados Unidos entretanto a maioria dos alergistas consultados afirmou que em casos especiais 2 a 3 unidades de penicilina ingeridas produziram uma reação do tipo anafilactóide 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 freqüentemente encontrada^{5, 72, 75, 76}.

Em vista dos fatos analisados, foi recomendado nos Estados Unidos o afastamento da ordenha do leite, para uso humano e industrial, do gado submetido a tratamento anti-

mastítico, por um período não inferior a 72 horas ou pelo período de tempo requerido para a eliminação dos antibióticos, em se tratando de outras terapias e de outros morbos, sendo obrigatória a impressão dessas recomendações no rótulo das drogas empregadas.

E no caso das pastas anti-mastíticas recomendou-se a adição de corantes ou substâncias fluorescentes ao medicamento como verdadeiros marcadores. Essas substâncias se eliminariam no leite ao mesmo passo que os antibióticos, dando a avaliação visual do fenômeno.

Foi igualmente desenvolvido um extenso programa de esclarecimento junto aos veterinários, zootecnistas, fazendeiros e sitiantes, às usinas de beneficiamento do leite, às revistas de agricultura, e pela imprensa jornalística pelos seus suplementos agrícolas, pelo rádio e TV, através de freqüentes programas rurais de elucidação².

Tendo em vista que no leite os antibióticos são potencialmente iatrogênicos, as medidas visando o consumo de um produto isento de tais drogas promoveria igualmente o consumo de sub-produto livre de contaminação, principalmente o leite em pó.

De fato, os métodos usados comumente para o beneficiamento do leite, a pasteurização e o resfriamento não afetam os antibióticos^{2, 12}. 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.

E embora nenhum resíduo antibiótico fosse encontrado no queijo, manteiga, leite em pó ou leite evaporado, pela "Food and Drug Administration", em pesquisas realizada em 1954, HANSEN, WIGGINS & BOYD⁷⁷ demonstraram que os antibióticos estavam presentes no leite em pó obtido de misturas de leites líquidos contendo um por cento do leite ordenhado de vacas cujos úberes tinham sido recentemente tratados com antibióticos.

E HANSEN e ELLICKSON^{apud 2}, buscando resíduos de penicilina no leite em pó desnatado, encontraram amostras contendo entre 0,5 a 2,5 unidades por grama, potências bem maiores que as por nós evidenciadas, em São Paulo.

Não obstante a importância do assunto pôsto em tela há quase duas décadas, o regulamento federal brasileiro da inspeção in-

dustrial e sanitária de produtos de origem animal⁷⁸, aprovado em 1952 e parcialmente modificado⁷⁹ em 1962, embora recomende, como principal critério para a avaliação da contaminação microbiana do leite tipo C, a prova da redutase, não cuidou também de exigir em especial a pesquisa de substâncias inibidoras que afetam os resultados obtidos para aquela prova. O mesmo acontece para a exigência regulamentar expressa no artigo 537, parágrafo 3.º e 4.º^{78, 79} onde, embora declare de início que o leite não deve estar adulterado ou fraudado, diz entre outras coisas que a acidez não pode ser superior a 18ºDornic e, no parágrafo 5, que não podem os leites crus destinados aos tipos "A", "B" e "C" revelar, na prova de redutase, contaminação excessiva com descoramento em tempo inferior a 5 horas para o tipo "A", 3h30m para o tipo "B", 2h30m para o tipo C e leite magro sem fazer referência especial às substâncias inibidoras.

No artigo 540 informa entre itens diversos que para indicar o padrão bacteriológico do leite cru destinado ao tipo "A" e "B" emprega-se o método de contagem microbiana que não deve ser superior respectivamente a 10 000 e a 500 000 antes da pasteurização.

Tôdas essas provas sofrem influência marcante dos inibidores veiculados pelo leite e cuja presença é capaz de determinar um tipo fictício de leite devendo, pois, a sua presença ser considerada uma fraude e ser exigida liminarmente a sua ausência, para se poder aceitar como válidos os resultados fornecidos por aquelas provas de rotina, sem o que poderá ser subvertida a elevada capacidade julgadora dos laboratórios bromatológicos e os resultados obtidos inapelavelmente falseados.

Tendo em vista o interesse do assunto, por iniciativa da Divisão Técnica de Laboratórios da Cooperativa Central de Laticínios do Estado de São Paulo, pioneiramente, já em 1966, com o concurso de um grupo escolhido de tecnólogos, foi levado a efeito na Capital de São Paulo a pesquisa de inibidores bacterianos, com a finalidade de situar o grau de contaminação química e bioquímica de cerca de um milhão de litros de leite diariamente consumidos pela população paulistana^{5, 48}.

Tal pesquisa coincidiu com a oportuna reformulação do Regulamento de Inspeção Federal, que se está processando, e com o recebimento da circular n.º 43, de 8 de julho

de 1966, da Inspeção de Produtos Agropecuários e Materiais Agrícolas de São Paulo, solicitando sugestões para a apreciação da Comissão encarregada da revisão. Em ofícios distintos enviados em 1966, respectivamente pela Cooperativa Central de Laticínios do Estado de São Paulo, e pelo Departamento de Produção Animal da Secretaria da Agricultura de São Paulo, sugerimos, entre outros itens, o acréscimo de três novos artigos e modificações parciais nos de número 514, 537 e 540, para a constituição do novo Regulamento.

Nos artigos a serem criados, sugerimos tornar obrigatório o afastamento da ordenha do leite para uso industrial ou humano do gado submetido a tratamento com drogas de origem química ou bioquímica capazes de produzir resíduos inibidores no leite, enquanto durar o tratamento; o afastamento do animal submetido a tratamento local antimastítico por não menos de 72 horas após o emprêgo da última medicação; a exigência do emprêgo, tão somente, de medicamento anti-mastítico que declare no rótulo a medida acima preconizada; e a incorporação a esses medicamentos quando para uso local, de substâncias não tóxicas, capazes de corar o leite do animal tratado, como indicadores da terapêutica em decorrência.

No artigo 514, aonde o parágrafo único diz ser proibido o emprêgo de substâncias químicas na conservação do leite, acrescentamos também as bioquímicas.

No artigo 537 que diz só pode ser beneficiado leite considerado normal, sugerimos modificar unicamente o item 3 que diz "esteja adulterado ou fraudado, revele presença de colostro ou leite de retenção" acrescentando "não revele, após aquecimento a 80°C, durante 5 minutos, presença de substâncias inibidoras do crescimento bacteriano.

E finalmente no artigo 540, aonde diz "Para a determinação do padrão bacteriológico das enzimas do leite, adote-se a prova da redutase para o leite cru; fosfatase, peroxidase, contagem microbiana e teste de presença de coliformes, para o pasteurizado" solicitamos acrescentar "Pesquisa da presença de substâncias inibidoras direta ou indiretamente adicionadas ao leite.

Entretanto esta pesquisa da presença de inibidores no leite em pó, que é um sensível complemento da já efetuada com o leite "in natura", e outras que venham a ser feitas,

marcarão cada vez mais o descompasso entre a esfera do progresso técnico e a do setor de fiscalização dos Serviços de Saúde Pública, respectivos, devido quase sempre à não atualização mais freqüente dos regulamentos em vigência.

Todavia, o caminho da regulamentação de inspeção não é tão somente o da imposição de novos regulamentos normativos, sendo certo que essas medidas só se tornarão realidade efetiva quando ao mesmo passo se desenvolver uma vasta campanha de elucidação visando esclarecer o homem do campo, seja o pequeno ou o grande produtor.

RESUMO

Em 1966, demonstrávamos pela primeira vez no Brasil, que existe contaminação penicilínica no leite "in natura" de consumo da Capital — cerca de 1 milhão de litros diários.

Tornou-se imperioso pois, em decorrência, o desenvolvimento de igual pesquisa em relação ao seu derivado mais direto, o leite em pó.

A partir de métodos baseados na inibição do crescimento de germes de prova, ou seja, o da placa-agar-esporos de *Bacillus subtilis* A.T.C.C., 6633, o da redução do C.T.T. (cloreto de 2-3-5 trifênil tetrazólio), e da pesquisa do grau maior ou menor da acidez do leite semeado com *Streptococcus termophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*, chegamos à conclusão de que o leite em pó integral do consumo em S. Paulo veicula igualmente penicilinas em potências variadas de 0,05 a 0,5 U/g e veicula também inibidores microbianos outros, não identificados, possivelmente também antibióticos.

Tendo em vista os fatos analisados, a nosso ver urgentes medidas devem ser tomadas, tais como:

1. Promoção governamental de uma pesquisa de âmbito nacional que exprima a situação real global do problema.

2. Desenvolvimento de uma campanha de esclarecimento visando afastar da ordenha o gado em tratamento antibiótico ou sulfamídico.

3. Emprêgo adequado do antibiótico-suplementação nas rações alimentares bovinas.

4. O rigoroso policiamento sanitário, determinando, em todo laboratório de controle higienico de leite, sistemático exame do produto advindo do interior, topograficamente região por região, visando localizar os focos de produção do leite inquinado e o seu saneamento dentro do prazo o mais rápido possível. E o estabelecimento de critério que considere fraudado o leite veiculando reiteradamente substâncias inibidoras do crescimento microbiano, principalmente se antibiótico, quer acrescentado direta ou indiretamente.

Agradecimentos — Externamos os nossos profundos agradecimentos à Cooperativa Central de Laticínios do Estado de São Paulo, ao Departamento de Produção Animal da Secretaria da Agricultura de São Paulo e à Laborerápica-Bristol S.A. pela valiosa cooperação fornecida à execução das nossas pesquisas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FLEMING, A. — On the antimicrobial action of cultures of a *Penicillium* with special reference to their use in the isolation of *B. influenza* Brit. J. Exp. Path. 10: 22-9, 1929.
2. MART, E. H. & ELLICKSON, B. E. — Antibiotic residues in milk and milk products. A review. J. Milk Fd. Technol 22:241-9, 1959.
3. MART, E. H. — Antibiotics in milk. A review. Recent developments. J. Milk Fd. Technol. 24:36-44, 1961.
4. VAID, M. Y.; PROUTY, C. C.; SHAW, A. O. & WATTS, R. E. — Penicillin levels in milk following parenteral administration of procaine penicillin G. J. Milk Fd. Technol. 24:7-10, 1961.
5. MELLO FILHO, A.; SANDOVAL, L. A.; RODRIGUES, N. R. & XIMENES, J. — Inibidores bacterianos no leite de consumo da Capital. Rev. Inst. Adolfo Lutz 25/27:69-94, 1965/67.
6. CECILIA, C. A. — Enciclopedia de la leche. Madrid, Espasa-Calpa, 1956.
7. MELLO, A. — O leite. Alguns aspectos relacionados aos fenômenos da nutrição, da industrialização e da produção. Bolm. Ind. Aním. 6(3):3-8, 1943.

MELLO FILHO, A.; SANDOVAL, L. A.; RODRIGUES, N. R.; XIMENES, J. & MATOS, D. B. — Inibidores bacterianos, em especial a penicilina, no leite em pó de consumo da Capital. Rev. Inst. Adolfo Lutz 28:27-41, 1968.

8. ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ — Comité mixte FAO/OMS d'experts de l'hygiène du lait. Maladies transmises par le lait. Premier rapport. Genève, O.M.S., 1957. Sér. Rapp. Techn. 124, p. 11-23.
9. SCHROEDER, S. A. — What the sanitarian should know about *Salmonellae* and *Staphylococci* in milk products. J. Milk Fd. Technol. 30:376-380, 1967.
10. ANDERSON, P. H. R.; STONE, D. M. — Staphylococcal food poisoning associated with spray dried milk. J. Hyg. Camb. 53:389-397, 1955.
11. ARNIJO, R.; HENDERSON, D. A.; THIMOTHEO, S. & ROBINSON, H. B. — Food poisoning outbreaks associated with spray dried milk. An epidemiologic study. Amer. J. Publ. Hlth. 47:1093-100, 1957.
12. ROGICK, F. A. — Doenças transmissíveis ao homem pelo leite e derivados. Zootecnia, S. Paulo (Brasil) 4(3):31-52, 1966.
13. HAMMER, B. W. & BABEL, F. J. — Dairy bacteriology. 4 ed. Chapman, London, 1957.
14. ROSSEL, J. M. & SANTOS, I. — Métodos analíticos de laboratório lactológico y microbiología de las industrias lácteas. Barcelona, Labor, 1952. Tomo II.
15. ROGICK, F. A.; PORTO, E. & GONÇALVES, M. — A mastite sub-clínica no rebanho produtor do leite tipo "B". Bol. Ind. Animal 22:91-120, 1964.
16. NELSON, F. E. — Control and treatment of mastitis in cows. Milk Pl. Mon. 45(4):27-30, 1956.
17. EDMONDSON, J. E. & MERILAN, C. P. — Controlling mastitis increases income. Milk Pl. Mon. 45(5):37-41, 1956.
18. COURTER, R. D. & GALTON, M. M. — Animal staphylococcal infections and their public health significance. Amer. J. Publ. Hlth. 52:1818-1827, 1962.
19. REIS, J. & SWENSON, A. — Flora estreptocócica das mamites esporádicas. Archos. Inst. Biol. S. Paulo 4:143-90, 1931.
20. SILVA FILHO, F. S. — Pesquisa de estreptococos causadores de mastite em rebanhos leiteiros. Bol. Ind. Animal 5(4):190-4, 1942.
21. LACERDA JUNIOR, P. M. G.; ZANI NETO, G. L. & FREITAS, D. C. — Estudo sôbre as mastites bovinas. Parte I. Rev. Fac. Med. Vet. Univ. S. Paulo 5(1):55-64, 1953-4.
22. LACERDA JUNIOR, P. M. G.; ZANI NETO, G. L. & FREITAS, D. C. — Estudo sôbre as mastites bovinas. Parte II. Rev. Fac. Med. Vet. Univ. S. Paulo 5(1):65-7, 1953-4.
23. REZENDE, M. L. R. *et alii* — Estudo dos problemas sanitários e econômicos das granjas de leite "A". Bol. Ind. Animal 20:63-8, 1962.
24. LAING, M. C. & MALCON, J. F. — The incidence of bovine mastitis with special to the non-specific condition. Vet. Rec. 68(20):447-55, 1956.
25. BLACKBURN, P. S. — Reviews of the progress of dairy science. J. Dairy Res. 25(3):535-64, 1958.
26. VEISSEYRS, R. — Techniques laitières modernes. Production, traitement, transformation du lait. Paris, La Maison Rustique (Librarie de l'Académie d'Agriculture), 1957.
27. ORGANIZATION DES NATIONS UNIES POUR L'ALIMENTATION ET L'AGRICULTURE. — Comité mixte FAO/OMS d'experts de l'hygiène du lait. Deuxième rapport. Geneve, FAO, 1960. Sér. Rapp. Techn. 197 p. 11-3.
28. D'APICE, M. — Antibióticos em medicina veterinária. In LACAZ, C. S. Antibióticos. São Paulo, Prociensx, 1965.
29. PROUTY, C. C. — Further observations of penicillin levels in milk following intramuscular and intrauterine administration. J. Milk Fd. Technol. 24:356-7, 1965.
30. SCHIPPER, I. A.; FILIPOVS, D. & EBELTORD, H. — Penicillactia following intramuscular administration of penicillins. J. Milk Fd. Technol. 28:1-4, 1965.
31. ORGANISATION MONDIALE POUR LA SANTÉ — Questions de santé publique procece pour l'introduction d'antibiotiques dans les aliments de l'Homme et des animaux domestiques. Genève, O.M.S., 1963. Ser. Rapp. Techn. no. 260.
32. MUCCIOLO, P. — Antibióticos na conservação de alimentos. In LACAZ, C. S. Antibióticos. São Paulo, Prociensx, 1965.
33. TARR, H. L. A. — Chemical inhibition of growth of fish spoilage bacteriae. J. Fish Res. Bd. Can. 6:257-262, 1944.
34. TARR, H. L. A. — Experimental preservation of fresh foods with antibiotics. Fd. Technol. 6:363-6, 1952.

MELLO FILHO, A.; SANDOVAL, L. A.; RODRIGUES, N. R.; XIMENES, J. & MATOS, D. B. — Inibidores bacterianos, em especial a penicilina, no leite em pó de consumo da Capital. Rev. Inst. Adolfo Lutz 28:27-41, 1968.

35. DEATHERAGE, F. E. — Use of antibiotics in the preservation of meat and other food products. Amer. J. Publ. Hlth 47: 594-600, 1957.
36. LACAZ, C. S. — Antibiótico e controle microbiológico das fermentações. Em seu "Antibióticos". São Paulo, Prociex, 1965.
37. AQUARONE, E. — Influência de antibióticos na fermentação alcoólica do mosto de melação de cana. São Paulo, 1959. Tese. Fac. Farm. Bioq. Univ. S. Paulo.
38. CURRAN, H. R. & EVANS, F. R. — The activity of penicillin in relation to bacterial spores and the preservation of milk. J. Bact. 52:89-98, 1946.
39. FOLEY, E. J. & BYRNE, J. V. — Penicillin as an adjunct to the preservation of quality of raw and pasteurized milk. J. Milk Technol. 13:170-4, 1950.
40. AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION — Council on Drugs — Penicillin and other antibiotics in milk: report. J. Amer. Med. Assoc. 171:135-7, 1959.
41. KOSIKOWSKY, F. N.; HENNINGSON, R. W. & SILVERMAN, G. J. — The incidence of antibiotics, sulfa drugs and quaternary ammonium compounds in the fluid milk supply of New York State. J. Dairy Sci. 35:535-9, 1962.
42. MARTH, E. H. — Antibiotics in milk. A review. I. Methods for detection of antibiotics in milk. J. Milk Fd. Technol. 24:70-82, 1961.
43. SHIVELER, G. & WEISER, H. — The effect of selected antibiotics upon the survival of microorganisms in raw and pasteurized milk. J. Milk Fd. Technol. 16: 125-7, 1953.
44. STOLZ, E. I.; HANKINSON, D. J. — The effects of antibiotics on the bacterial plate counts of normal raw milk. J. Milk Fd. Technol. 16:157-9, 1953.
45. 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: 348-54, 1956.
46. WITEHEAD, H. R. & LANE, D. J. — The influence of penicillin on the manufacture and repping of cheddar cheese. J. Dairy Res. 23:355-60, 1956.
47. RICHARDS, R. J.; KENNEDY, H. E. & GOULD, I. A. — Antibiotics resistance and acid production cultures belonging to the Genus *Streptococcus*. J. Milk Fd. Technol. 24:317-20, 1961.
48. MELLO FILHO, A.; SANDOVAL, L. A.; RODRIGUES, N. R. & XIMENES, J. — Inibidores bacterianos no leite tipo C, dado ao consumo na Capital (Nota preliminar). Revta. Ass. Paul. Med. 69: 264-5, 1966.
49. MELLO FILHO, A.; SANDOVAL, L. A.; RODRIGUES, N. R.; XIMENES, J. & MATOS, D. B. — Pesquisa de substancias inibidoras, em particular a penicilina, no leite em pó de consumo na cidade de São Paulo (Nota prévia) Revta. Paul. Med. 72(3):160-1, 1968.
50. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION — Standard methods for the examination of dairy products. 11. ed. New York, A.P.H.A., 1960.
51. ARRET, B. & KIRSHBAUM, R. — A rapid disc assay method for detecting penicillin in milk. J. Milk Fd. Technol. 22: 329-331, 1959.
52. MILK INDUSTRY FOUNDATION — Laboratory manual of analysis of milk and its products. Washington, 1959.
53. KOLMER, J. A.; HEARLE, H. S. & HOWARD, W. R. — Approved laboratory Technic. 5. ed. New York, Appleton, 1951.
54. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION — Standard methods for the examination of dairy products. 12. ed. New York, A.P.H.A., 1967.
55. BRASIL. Instituto Adolfo Lutz — Métodos de análises bromatológicas. I. Análises químicas. São Paulo, Revta. Tribunais, 1951. 751 p.
56. STORRS, F. C. & HIETT-BROWN, W. — The incidence of penicillin in milk supplies. J. Dairy Res. 21:337-41, 1954.
57. BERRIDGE, N. J. — Penicillin in milk. II. The incidence of penicillin. J. Dairy Res. 23:342-7, 1956.
58. LUCK, H. — The use of hydrogen peroxid as a dairy preservation. Dairy Sci. Abstr. 18:364-6, 1956.
59. TERPLAN, G. & ZAADHOF, J. — Zum Vorkommen und Nachweis von Hemmstoffen in der milch-eine kurze Übersicht. Milchwissenschaft 22(12):761-71, 1967.
60. REITER, B. & ORAN, J. D. — Bacteriae inhibitors in milk and other biological fluids. Nature, Lond. 216:328-30, 1967.
61. LANGLOIS, B. E.; LIAKA, B. J. & HILL, D. L. — The effects of processing and storage of dairy products on chlorinated insecticides residues. J. Milk Fd. Technol. 28:9-11, 1965.

MELLO FILHO, A.; SANDOVAL, L. A.; RODRIGUES, N. R.; XIMENES, J. & MATOS, D. B. — Inibidores bacterianos, em especial a penicilina, no leite em pó de consumo da Capital. Rev. Inst. Adolfo Lutz 28:27-41, 1968.

-
62. MENDES, E. — Reações alérgicas aos antibióticos. In LACAZ, C. S. — Antibióticos. 1. ed. São Paulo, Prociencx, 1965.
63. BASTOS, C. O. — Considerações sobre o emprego de antibióticos na prática médica e seus acidentes. In PRADO, F. C.; RAMOS, J. & VALE, J. R. — Atualizações terapêuticas. São Paulo, Edit. Artes Médicas, 1958. p. 1125.
64. ROTBERG, A. — Alergia a penicilina. (Revisão da Literatura e nota sobre prevenção). Revimédica 1(2):250-6, 1956.
65. SILVA, B. B.; SIMÕES, E. V.; SILVA, P. & CAPP, B. B. — Acidentes da penicilino-terapia. Publicões. Med. 25:(205):1017, 1959.
66. HSU, I. & EVANS, J. M. — Untoward reactions to benzathine penicillin in adults. New Eng. J. Med. 259(12): 581-5, 1958.
67. WELCH, H.; LEWIS, C. N.; WEINSTEIN, H. I. & BOECKMAN, R. B. — Severe reactions to antibiotics. A nation wide survey. Antibiotic Med. Clin. Ther. 4(12):800-6, 1957.
68. LACAZ, C. S. — Problemas decorrentes da antibioticoterapia. Em seu Antibióticos. São Paulo, Prociencx, 1965.
69. MELLO FILHO, A.; RODRIGUES, F. S. & RODRIGUES, N. R. — Métodos rápidos de verificação de penicilina no sangue de doadores, como tentativa de profilaxia do choque e outras manifestações alérgicas. Revta. Paul. Med. 72(3): 158-9, 1968.
70. MEIRA, D. A. — Penicilinas semi-sintéticas. In LACAZ, C. S. Antibióticos. São Paulo, Prociencx, 1965.
71. BASSOI, O. N. & MENEZES, J. P. — As novas penicilinas semi-sintéticas. Cadern. Terap. Labor 6(1-6):28-32, 1963.
72. STEWART, G. T. — The penicillin group of drugs. Amsterdam, Elsevier Publishing Company, 1965.
73. MARTIN, W. Y. — Newer penicillins. Med. drugs. Amsterdam, Elsevier Publishing Company, 1965.
74. ESKINE, D. — Dermatitis caused by penicillin in milk. Lancet 1(1):431-2, 1958.
75. VICKERS, H. R.; BAZUTUNI, L. & SUZANNE, A. — Dermatitis caused by penicillin in milk. Lancet 1(1):351-2, 1958.
76. ZIMMERMAN, M. C. — Chronic penicillin urticaria from dairy products proved by penicillinase cures. Archs. Derm. Syph. 79:1-6, 1959.
77. 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. 13:359-65, 1950.
78. 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.
79. BRASIL — Divisão de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Decreto n.º 1255 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.

Recebido para publicação em 12 de setembro de 1968.

