

CONSERVAÇÃO DO LEITE "IN NATURA" POR MEIOS FÍSICOS, QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS. PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO COMO CONSERVADOR ⁽¹⁾

MILK "IN NATURA" PRESERVATION BY PHYSICAL, CHEMICAL AND BIOCHEMICAL METHODS. HYDROGEN PEROXIDE USED AS AN PRESERVATIVE

ALEXANDRE MELLO FILHO ⁽²⁾
LUIZ CELSO DE CASTRO ⁽³⁾

SUMMARY

According to Brazilian Federal Regulation in this field, milk "in natura" can only be preserved through physical methods such as filtration, refrigeration and pasteurization. The usage of any other preservative — biochemical and chemical methods — is an evident transgression to the Regulation, and its lasting presence and easy detection, even in small quantities, makes the usage of these substance for illegal means, an impossibility. Although it is accepted the lasting presence of the hydrogen peroxide in decreasing doses in milk, it is also accepted that 5 hours after it is added, is no method known to check its presence in raw milk. This fact makes its usage desirable.

In 1966 and 1967 the authors published two papers on bacterial inhibitors present in milk of São Paulo, Brazil, and the result of the researches they performed denounced the presence of inhibitors, most of them non identified, in 15-20% of the samples, in 1966, and in 9% of the samples, in 1967. The same authors performed the present work in order to emphasize the importance of a method, even indirect one, good enough to detect the presence of hydrogen peroxide, beyond the period of 6 hours, as long as its inhibitors action is working on bacterial flora. This method is based upon an association of well known methods, and particularly the use of C.T.T. redutase test and agar-plate assay of *Bacillus subtilis* A.T.C.C., 6633 and *Sarcina lutea* A.T.C.C., 9341.

Experimentally, it was possible to check the presumptive presence of hydrogen peroxide, through its inhibitor action, 24 hours or more after it had been added it to standard raw milk. This method was later used in examining samples of milk grades B e C consumed in São Paulo, Brazil.

INTRODUÇÃO

Sob o ponto de vista físico-químico, é o leite uma emulsão de gordura em solução aquosa, contendo numerosas substâncias na forma coloidal ou dissolvidas.

Dos seus principais componentes, dissolvidos (albuminas, lactose, sais minerais, gases, vitaminas) ou na forma coloidal (ca-

seína, entre outros), dos corpos de origem proteínóide com função específica (aglutinases, imunoglobulinas, complemento, anticorpos, diástases), dos hormônios, da água que contém e das substâncias gordurosas decorrem suas propriedades físico-químicas, dietéticas e biológicas ^{1, 2, 3}.

(1) Trabalho realizado na Divisão de Contrôlo de Qualidade e Pesquisa da Cooperativa Central de Laticínios do Estado de São Paulo.

Apresentado, como Tema Livre, no II Congresso Brasileiro de Microbiologia, realizado no Conjunto das Químicas da Universidade de São Paulo, em 29 de agosto de 1970. Cidade Universitária, São Paulo, Brasil.

(2) Da Divisão de Contrôlo de Qualidade e Pesquisa da Cooperativa Central de Laticínios. Da Clínica Dermatológico-sifilográfica do Hospital Municipal de São Paulo, Do Departamento de Dermatologia da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo.

(3) Da Divisão de Contrôlo de Qualidade e Pesquisa da Cooperativa Central de Laticínios do Estado de São Paulo.

Mas o leite de consumo, mesmo quando obtido de animais sadios e em rigorosas condições técnicas, já contém ao ser ordenhado, um apreciável teor bacteriano, carregado dos canais galactóforos, ao qual se acrescenta a flora de contaminação do meio exterior. É a flora banal do leite que atua apenas sobre a qualidade do produto, a sua conservação, o seu organoleptismo, podendo haver a interferência dos patogênicos, geralmente de origem bovina, com mais graves conseqüências para a saúde pública, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11.

Nas regiões de clima quente, há necessidade da estrita observância das condições que impeçam ou dificultem a proliferação daqueles microrganismos no leite, envolvendo o local da ordenha, a saúde do gado e do homem que o ordenha, a qualidade dos recipientes coletores do leite, a rapidez da remoção do produto do estabulo, seu resfriamento, seu transporte para as cidades.

Conforme enfatiza VILARES³⁵, a coexistência desses fatores implica em certo padrão de riqueza e de civilização no meio rural.

Os processos atualmente empregados nos países mais evoluídos, na conservação do leite "in natura", baseiam-se exclusivamente no emprêgo de meios físicos: filtração e clarificação, refrigeração e aquecimento.

O frio, pela inibição que produz no desenvolvimento da flora microbiana, com a vantagem da não alteração do valor nutritivo do leite, é incapaz de destruir os germes patogênicos, passando pois à categoria de processo auxiliar, antecedendo e sucedendo a outra forma mais eficaz de beneficiamento, e principalmente utilizado no transporte do leite do interior às cidades.

O emprêgo do calor para o pré-aquecimento é processo somente utilizado no Brasil; antecede a pasteurização e é realizado em aparelho com contrôle automático de temperatura, tempo e volume do leite e jamais poderá ser pretexto para a conser-

vação, pela redução parcial da flora microbiana excessiva, de leites de má qualidade.

O emprêgo do calor na pasteurização do leite vem sendo realizado pelo método rápido que emprega aparelhos em placas em função da combinação do tempo e da temperatura no aquecimento do leite em camadas laminares, obtendo-se total eliminação dos germes patogênicos, e considerável redução na flora global.

O efeito fundamental da pasteurização, como técnica industrial, incluída no domínio dos preceitos bromatológicos é, não só a profilaxia das contaminações humanas, como também transmissão ao produto da durabilidade necessária à distribuição e ao consumo.

Mas, para despoluir o leite das suas impurezas mais grosseiras, antes do tratamento calórico, já se impõe, desde a fonte de produção, a filtração do produto que, nos estábulos é feita com a utilização de telas milimetradas mas, muitas vezes, negligenciada ou feita através da utilização de panos rusticos, no transbôrdio do leite dos baldes para os latões e nos centros de recepção e resfriamento para onde convergem aqueles leites, inicialmente pela passagem através de telas metálicas e, após, por filtração em apropriados filtros de flanela ou, então clarificado por centrifugação.

Mas já nos entrepostos muitas vezes se patenteiam, mesmo na operação chamada de telagem, os precários cuidados com que foi o leite obtido, pelo encontro dos mais variados detritos — artrópodes, restos vegetais, pêlos animais, naturalmente em grau maior ou menor de acôrdo com a zona produtora.

Outros meios físicos empregados limitadamente são utilizados pela radiação ionizante, luz ultra-violeta, raios X, raios catódicos, neutrons, raios gama e pelos ultrassom, pressão ou eletricidade⁹.

A radioatividade, o método do futuro, esbarra ainda com uma série de problemas de ordem técnica, na conservação do leite "in natura", embora já esteja sendo empregada no Canadá, E.U.A. e Rússia, na

conservação de alimentos; e nos E.U.A., com a autorização do "Food and Drugs Administration", para a esterilização do toucinho defumado, desinfestação do trigo e inibição do brotamento das batatinhas, pelo emprêgo do Cobalto 60³³.

Mas, para o destino à pasteurização, deve o leite cru ser obrigatoriamente selecionado desde a área de produção, seleção esta realizada pela inspeção higiênico-sanitária oficial, patenteando-se que certos leites crus não têm condição mínima para o envio ao beneficiamento, dada a sua poluição, acidez, composição química em geral e propriedades organolépticas anormais.

Porém, ainda mais grave é o problema do adicionamento ao leite de conservadores antissépticos, o que implica na dissimulação, com má fé, da falta de cuidados higiênicos, na produção.

Então, por definição abreviada, segundo o nosso Regulamento Federal,^{5, 6} e o "Comité mixte d'experts de l'hygiene du lait", 1957¹⁰, leite cru é aquele que foi submetido em seleção prévia, às operações conservadoras de filtração e clarificação, refrigeração, às quais *no Brasil* se acrescenta a do pré-aquecimento, *sendo proibido, pois, o emprêgo de substâncias químicas na conservação do leite*, que não deverá também veicular qualquer elemento estranho a sua composição.

O processo combinado da conservação, pela filtração e clarificação, resfriamento e congelamento parcial, pré-aquecimento e pasteurização exige gastos de instalação e elevado custo de manutenção e operação.

Há longos anos a técnica industrial vem estudando a possibilidade da obtenção do meio conservante ideal, capaz, pelo seu emprêgo, de suprimir aquelas onerosas e especializadas operações. Entretanto, a maioria dos conservadores químicos e bioquímicos têm-se mostrado tóxica para o consumidor, ou sensibilizante, de ação conservante limitada, alterando o organoloptismo e a composição do leite ou interferindo na industrialização dos seus subprodutos fermentados e, o que é absolutamen-

te grave, não destruindo as toxinas bacterianas termo-lábeis e certos tipos de microrganismos patogênicos^{9, 20, 21, 22, 26, 28, 35}.

Os conservantes no leite se distribuem em duas categorias principais: os que agem como neutralizantes ou como antissépticos. Os neutralizantes atuam sobre um fato consumado, a presença do ácido láctico derivado da bio-atividade das bactérias sobre a lactose. Não reduzem a flora microbiana, mas apenas evitam a coagulação do leite e, entre estes, principalmente se colocam o bicarbonato de sódio, o hidróxido de sódio e o carbonato de cálcio. Os conservantes antissépticos mostram relativo grau de toxidez e modificam profundamente as propriedades do leite ou podem ser pouco alterantes e não tóxicos. Entre os antissépticos os mais conhecidos são o aldeído fórmico e o cloro.

O aldeído fórmico, na concentração de 1/1 000 ou 1/2 000, produz, durante as primeiras 24 horas, um rápido decréscimo da flora bacteriana; após, uma lenta mas constante diminuição, até que, no fim de 5 dias, o leite estará praticamente estéril, agindo, pois, como uma verdadeira autoclave química; na proporção de 1/20 000, conserva o leite duas ou três vezes mais do que o mesmo sem tratamento algum, mas, na concentração de 1/5 000 ou 1/10 000, é o aldeído fórmico realmente um bom conservante se não fôra pela insolubilização da caseína, o que vai prejudicar a digestibilidade do produto.

Quanto ao cloro, tão amplamente utilizado no saneamento da água de consumo das cidades, no leite o seu índice de aproveitamento mostrou ser muito baixo, dadas as grandes alterações que produz no gosto e aroma do produto, mesmo em 50 e 100 p.p.m., quando se sabe que em concentrações menores a sua ação bacteriana no leite é bem pequena^{8, 9, 10}.

Como conservantes antissépticos não tóxicos, temos os antibióticos e classicamente, os compostos de amônio quaternário e o peróxido de hidrogênio.

Os antibióticos, que são conservadores bioquímicos, além de interferirem intensa-

mente na industrialização do leite, na produção de derivados fermentados, e da sua inocuidade para a maioria dos germes patogênicos do produto, podem produzir fenômenos de sensibilização em pessoas, quando altamente sensibilizadas²².

Os compostos de amônio quaternário em concentração adequada, são atóxicos, não irritantes, estáveis ao tratamento térmico e relativamente estáveis na presença de matéria orgânica, tendo boa atividade em qualquer pH., não imprimindo ao leite gosto ou aroma indesejáveis^{10, 13}.

Nos Estados Unidos, o aparecimento constante do amônio quaternário no leite de consumo originou vultuosa literatura, sendo considerado como resultante do tratamento químico, na higienização em laticínios^{10, 13}.

No Brasil, em laticínios, o amônio quaternário não é empregado como agente de higienização de aparelhagens e utensílios, sendo utilizado, entre outros, o cloro, liberado de solução de hipoclorito de sódio.

Finalmente, o peróxido de hidrogênio, *amplamente conhecido em nosso país*, pela maioria dos produtores de leite, como conservante efetivo do produto e sob o nome de água oxigenada ou peridrol, foi empregado desde os fins do século passado por Budde, na Alemanha, no processo conhecido como Budderização do leite.

A redução microbiana obtida é de ordem de 50% ou mais, com ligeiro acrescentamento ao produto de um sabor metálico ou maltado e com o desaparecimento espontâneo do conservante, decomposto pelas diastases, com liberação de oxigênio nascente.

A inocuidade deste processo se patenteou nas observações realizadas na Itália na nutrição experimental de 37 lactentes com leite ao qual foi acrescentada água oxigenada obtida por meios eletrolíticos^{21, 22}.

Em 1948, na Checoslováquia, e em 1950, na França, pesquisadores recomendaram o seu uso. Mas dignas de referências são as experiências oficiais italianas, em 1941, presididas pelo Professor

Satta, Diretor do Instituto de Higiene da Universidade do Siena, que confirmaram as observações realizadas em Roma, Milão, Gênova, Turim, Nápoles, Bolonha e Florença e em outras cidades, e que culminaram com a autorização do emprêgo do referido antisséptico, desde que observadas algumas condições, tais como o uso de peróxido de hidrogênio obtido por meio eletrolítico, de 130 volumes, e aplicado no leite na quantidade de 1 a 2/1 000 e sempre 5 horas antes do envio ao consumidor⁸.

Conforme acentua CECILIA⁸, o emprêgo do peróxido de hidrogênio só será tolerado em regiões extremamente subdesenvolvidas e, mesmo assim, como elemento conservador para o transporte do leite, dada a falta da refrigeração, ou em épocas excepcionais, como durante as conflagrações mundiais.

De fato, o adicionamento do peróxido de hidrogênio não oferece a garantia da eliminação dos germes patogênicos, e repetidas investigações provaram que a sua adição ao leite produz perda de 10 a 20% da vitamina A, 50% da B, e a quase totalidade da vitamina C.

Embora o peróxido de hidrogênio continue presente no leite, em quantidades menores e decrescentes, após *cerca de 6 horas* da sua colocação, não há meio corrente conhecido para avaliar a sua presença. Constituindo tal fato um estímulo para a transgressão do que preceitua o Regulamento Federal, elaboramos este trabalho, no intuito de fornecer um processo capaz de determinar, embora indiretamente, a presença do peróxido de hidrogênio como antisséptico, além daquelas 5 horas, e enquanto durar o seu efeito inibidor microbiano.

MÉTODOS

MÉTODO DE DUPOY, MODIFICADO E DA OXIDAÇÃO DO IODETO

São os dois métodos clássicos de pesquisa do peróxido de hidrogênio. O de Dupoy modificado foi empregado pelo uso da solução alcoólica de guaiacol a 1%,

clássicamente¹¹. Pela interferência da peroxidase existente no leite cru ou pasteurizado, surgiu, ao adição do guaiaicol, uma coloração vermelho-salmão. O segundo método da oxidação do iodeto foi realizado segundo as recomendações de PIEN, DESIRENT & LAFONTAINE²⁷; pelo acrescentamento do amido surgiu no leite uma nítida coloração azulado-violeta, quando da presença do peróxido de hidrogênio.

CONTAGEM GLOBAL MICROBIANA EM PLACAS E PELO MÉTODO DE BREED

As contagens foram realizadas segundo técnica preceituada pelo "Standard Methods"^{1, 2}. A contagem global em placas, contendo gelose-padrão, foi feita após 48 horas de incubação a 32°C. A contagem microbiana direta, pelo método de Breed, foi realizada quase que imediatamente com a utilização da coloração da lâmina contendo o leite, pelo azul de metileno.

ACIDIMETRIA, POTENCIOMETRIA, REDUTASE PELO AZUL DE METILENO E CONTAGEM DE COLIFORMES

A dosagem da acidez do leite foi realizada pelo processo de Dornic, a potenciometria através do emprêgo do potenciômetro. A redutase do azul de metileno e a contagem de coliformes, utilizando placas contendo "violet-red-bile-agar", foram realizadas segundo processos indicados pelo "Standard Methods" e pelo livro da MILK INDUSTRY FOUNDATION²³ — "Laboratory manual of analysis of milk and its products".

PESQUISA DE INIBIDORES EM GERAL COM O EMPRÊGO DAS PROVAS DO C.T.T., COAGULAÇÃO DO LEITE E DA PLACA AGAR-GERME DE PROVA

O emprêgo do C.T.T. que, em última análise, é também uma prova de redutase, foi feito de acôrdo com método por nós já descrito²⁰, após o aquecimento das amostras de leite a 80°C, 5 minutos, para a inativação dos inibidores naturais do leite,

semeadura de germes fermentadores da lactose — *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*, e incubação a 37°C, 2 horas e meia, após adição do C.T.T. Com a multiplicação dos germes, surgiu no leite uma côr vermelha, a do C.T.T., reduzido. Na presença de inibidor do crescimento bacteriano, não se deu a multiplicação microbiana, e o C.T.T. permaneceu inalterado, na sua leucoforma. A prova da coagulação do leite foi realizada pelo mesmo princípio, mas sem o acrescentamento do C.T.T.

Na ausência de inibidores, o leite sob ação bacteriana se acidificou e coagulou; em caso contrário, permaneceu líquido. Tal acidez foi testada pelo processo de Dornic e pela potenciometria. O método da placa agar-germe de prova, contendo, pois, esporos de *B. subtilis* A.T.C.C. 6.633 ou *S. lutea* A.T.C.C. 9.431, pela colocação nessas placas das amostras dos leites problemáticos, embebidas em discos de papel de filtro, fez surgir halos de inibição do crescimento daqueles germes de prova, quando da incubação. Este último processo entretanto funciona muito bem para a presença de antibióticos e sulfamídicos, não acusando a presença do peróxido de hidrogênio e de alguns outros inibidores químicos^{20, 22}.

PESQUISA DA PENICILINA PELO EMPRÊGO DA PENICILINASE

O processo obedeceu, em linhas gerais, ao anteriormente citado. Entretanto, uma vez obtida a presença do halo de inibição, adicionamos à amostra de leite em causa a enzima penicilino-inativante específica — a penicilinase. O leite assim tratado não mais evidenciou a presença de inibidor bioquímico — a penicilina, comprovando especificamente a presença qualitativa e quantitativa do antibiótico^{20, 22}.

PESQUISA DA FOSFATASE PELO MÉTODO RÁPIDO DE SHARER

Foi realizada de acôrdo com o processo proposto por SHARER^{23, 31}.

MÉTODO PARA A OBTENÇÃO DA CATALASE

A catalase foi obtida pela sua extração do fígado fresco de bovinos, triturado, suspenso em água destilada, tratado pelo clorofórmio e álcool etílico; a pasta resultante, filtrada, ressuspensa, centrifugada, decantada, novamente suspensa em água destilada, refrigerada, 12 a 14 horas em repouso. Após esse período, a catalase surgiu cristalizada, na forma de agulhas, em suspensão²⁴. A atividade da catalase assim obtida foi a seguir testada com a Katalase 15674 EDKA BOEHRINGER, originária da República Federal Alemã^(*), na forma de suspensão cristalina — 100 mg/5 ml.

PROVAS SUBSIDIÁRIAS

As amostras do leite cru ou pasteurizado que demonstraram, pela prova da pesquisa de inibidores em geral, presença daquelas substâncias, foram sistematicamente examinadas pelo processo de Bratton-Marshall modificado²⁰ e de Miller-Elliker²⁰, para excluir respectivamente a presença de compostos sulfamídicos e de amônio quaternário. A possível presença dos demais conservantes de natureza química, principalmente o formaldeído, foi testada pelos processos preconizados pelos livros "Métodos Analíticos de Laboratório Lactológico y Microbiología de las Industrias Lácteas"³⁰ e "Métodos de análises bromatológicas"¹¹ do Instituto Adolfo Lutz.

RESULTADOS

Tendo ficado estabelecidos os métodos de exame, dividimos as pesquisas a serem realizadas em três etapas distintas:

1. Pesquisa do comportamento enzimático e da flora bacteriana do leite cru padrão, deixado durante 30 min. em temperatura ambiente, a seguir, examinado e após re-examinado, 5, 10 e 24 horas após ter ficado em ambiente, e sob refrigeração a 5 a 8°C.

2. Determinação em temperatura ambiente e sob refrigeração, pelos métodos clássicos de exame, da mais longa perma-

nência determinável do peróxido de hidrogênio acrescentado ao leite padrão (1/1000 ml), em estado de cru, fervido e pasteurizado.

3. Emprêgo do conjunto de métodos já relacionados e dos clássicos, nos exames de amostras do leite tipo "C" e "B" de consumo da Capital pasteurizado ou em estado de cru.

1. PESQUISA DO COMPORTAMENTO ENZIMÁTICO E DO DA FLORA BACTERIANA NO LEITE CRU, PADRÃO, ACRESCENTADO OU NÃO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E DA CATALASE.

A duas amostras do mesmo leite, acrescentamos peróxido de hidrogênio (30%, 120 vol., U.S.A. Baker), na razão de 1/1 000 ml; porém, em uma delas, 5 minutos após esta operação, adicionamos à Catalase 2 gotas/10 ml de leite. A seguir, realizamos em ambas as amostras as pesquisas relacionadas acima, nos mesmos ritmos horários já citados (2, 5, 10 e 24 horas), em temperatura ambiente e sob refrigeração.

Visamos também avaliar a capacidade do conjunto dos métodos já citados, na determinação da presença daquele inibidor, por nós experimentalmente adicionado ao leite, além das 5 primeiras horas da sua coloração, fazendo, portanto, confronto com os resultados obtidos pelos métodos clássicos correntes, empregados qualitativamente para os mesmos fins — o do guaia-col e o da oxidação do iodeto.

A base para estabelecimento de paralelos foi fundamentalmente a comparação dos resultados obtidos com o leite cru, padrão, deixado 30 min, 5, 10 e 24 horas à temperatura ambiente e refrigerado, com as informações colhidas no exame do mesmo leite, em idênticas circunstâncias, mas com a adição de peróxido de hidrogênio e com o peróxido de hidrogênio e a catalase, conforme resultados relacionados no quadro I.

Conforme os resultados relacionados neste quadro, o leite padrão apresentou contagem global, em placas, de 25 000 000 colônias por mililitro e um valor bacterimétrico muito semelhante, 27 000 000, pela microscopia direta de Breed. A densidade coliformica em placas foi a de

(*) Gentilmente cedida pelo Prof. Klaus Zinner do Departamento de Bioquímica e Farmácia da U. S. P.

300 000 colônias por mililitro, o tempo da redutase do azul de metileno — 50 minutos, a acidez — 18°D, correspondente ao pH 6,58, potenciomêtricamente medido. A prova do C.T.T., pelo aparecimento de coloração róseo-avermelhada, negatividade da presença de inibidores, coagulação do leite mais "inoculum" de prova e ausência de inibição em placas com agar-germe excluíram a presença ativa de quaisquer inibidores do crescimento bacteriano (Fig. 1).

As provas que empregam o guaiacol em solução ou iodeto de potássio, obviamente não demonstraram presença do peróxido de hidrogênio. Em face dos resultados obtidos para o leite cru padrão, consideramos o mesmo isento de conservadores antissépticos, desenvolvendo-se a sua flora bacteriana global nas condições habituais.

Pelo exposto no quadro I, que apresenta também os resultados obtidos para o leite cru, adicionado recentemente do peróxido de hidrogênio — 30 minutos antes da prova — verificamos nêstes resultados as mesmas acentuadas alterações, perfeitamente notadas em comparação com os resultados obtidos para o mesmo leite, padrão. Realçamos a redução considerável da flora global computada pela contagem em placas, e a sua relativa não modificação quando avaliada pelo método de Breed, que consignou tôdas as bactérias — as recentemente desvitalizadas e as em atividade.

De fato, enquanto o método da semeadura em placas acusou a flora viva existente e já reduzida, o método de Breed computou tôdas as bactérias, desde que recentemente desvitalizadas, não levando em conta sequer o seu estado disgenético. A contagem global em placas foi a de 11 000 000 colônias/ml e a referida pelo método de Breed, 22 000 000 colônias/ml, dado êste muito próximo ao obtido para o leite padrão. Houve, em decorrência da diminuição da densidade da flora bacteriana em geral e da colifórmica, considerável aumento do tempo de redutase do azul de metileno que, de 50 minutos para o leite padrão, foi a 5 horas e 15 minutos para o acrescentado com o peróxido de hidrogênio. A prova do C.T.T. mostrou, pelo surgimento de uma côr róseo-clara, positi-

QUADRO I
Leite cru examinado após 30 minutos

Leite	Bacterimetria		Colimetria	Redutasi- metria	Acidez	Pesquisa de H ₂ O ₂		Pesquisa de inibidores em geral				
	Placas col./ml	Método Breed bactérias/ml				Placas col./ml	A. Metileno minutos	°D	Guaiacol	Iodeto	C.T.T.	Coagulação
Padrão	25 000 000	27 000 000	300 000	50	18	—	—	—	—	coagulado	—	—
Com H ₂ O ₂	11 000 000	22 000 000	13 000	315	18	+	+	+	+	líquido	—	—
Com H ₂ O ₂ e Catalase	20 000 000	23 000 000	180 000	110	18	—	—	—	—	coagulado	—	—

Negativo
Positivo
—
+

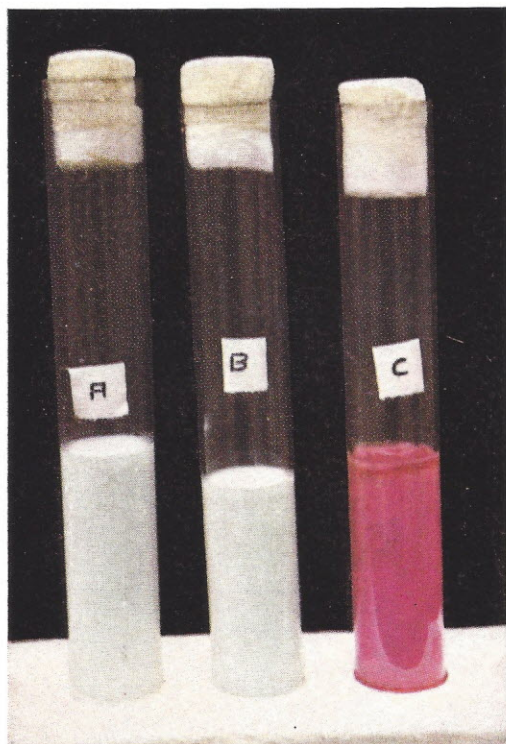


Fig. 1 — Leite cru, padrão.

Tubos A e B — cores brancas — provas de guaiacol e iodeto, negativas. Tubo C — cor vermelha — prova do C.T.T., negativa.

vidade para a presença do peróxido, o mesmo acontecendo com as demais provas, para tais fins (fig. 2). Apenas a prova que emprega a placa-agar-germe silenciou, não demonstrando inibição das suas bactérias, ao contrário do que acontece quando na presença de antibióticos ou sulfamídicos.

Nesse mesmo quadro I podemos apreciar que o leite cru acrescentado de peróxido de hidrogênio e, após, de catalase, mostrou comportamento intermediário, demonstrando com isso a ação apenas inicial do peróxido de hidrogênio, logo desdobrado em oxigênio molecular e água e inativado como antisséptico, pela ação enzimática da catalase. A sua flora bacteriana de índice intermediário entre a do leite padrão e a do leite adicionado somente ao peróxido de hidrogênio; a sua redutasiometria feita no tempo de 110 minutos, em contraposição aos 50 minutos, e 315 minutos (5 horas e 15 minutos) dos demais, mostraram o efeito

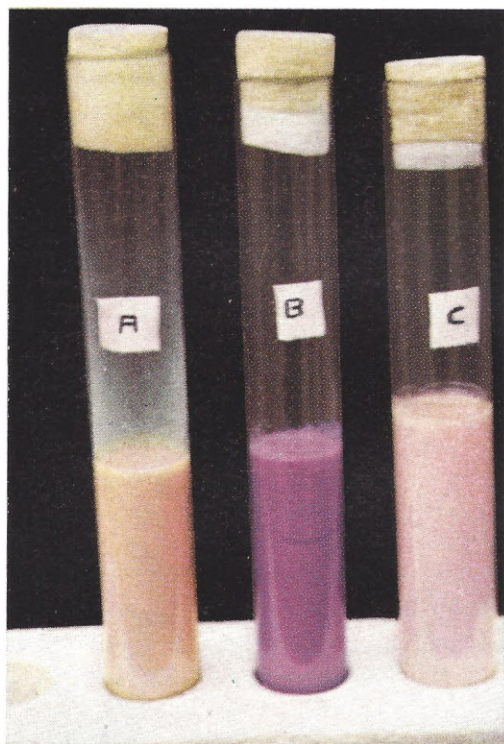


Fig. 2 — Leite cru, mais o peróxido de hidrogênio, recentemente colocado.

Tubos A, B e C — cores róseo-salmão, roxo-violeta e róseo-clara — provas do guaiacol, iodeto e C.T.T., positivas.

nítido daquela ação bactericida inicial. As provas da pesquisa de substâncias inibidoras não acusaram o peróxido de hidrogênio já desdobrado, o mesmo acontecendo com o método que utiliza o guaiacol e o iodeto. E como esse leite, nas provas subsequentes, após 5, 10 e 24 horas passadas, prosseguiu mostrando ausência do conservador e tendo um comportamento parecido com o do leite padrão, com a diferença somente devida à parcela de flora inicialmente reduzida, não mais computamos os seus resultados, pois o mesmo passou a funcionar como um leite, também padrão, mas com flora microbiana menor.

Cinco horas passadas do exame dos leites-testes, as amostras dos mesmos, conservadas refrigeradas, e em ambiente, foram re-examinadas, para estudo do seu comportamento.

Os dados obtidos estão demonstrados comparativamente nos quadros II e III:

QUADRO II

Leite cru padrão examinado após 5 horas

Leite	Bacterimetria		Colimetria	Redutasi- metria	Acidez	Pesquisa de H ₂ O ₂		Pesquisa de inibidores em geral		
	Placas col./ml	Método Breed bactérias/ml				Placas col./ml	A. Metileno minutos	°D	Guaiacol	Iodeto
Frigorificado	31 000 000	36 000 000	700 000	15	20	—	—	—	coagulado	—
Em ambiente	45 000 000	53 000 000	2 800 000	3	28	—	—	—	coagulado	—

QUADRO III

Leite cru, com H₂O₂, examinado após 5 horas

Leite	Bacterimetria		Colimetria	Redutasi- metria	Acidez	Pesquisa de H ₂ O ₂		Pesquisa de inibidores em geral		
	Placas col./ml	Método Breed bactérias/ml				Placas col./ml	A. Metileno minutos	°D	Guaiacol	Iodeto
Frigorificado	19 000 000	36 000 000	27 000	210	18	—	+	+	Líquido	—
Em ambiente	21 000 000	42.000 000	85 000	120	21	+	+	+	Líquido	—

MELLO FILHO, A. & CASTRO, L. C. — Conservação do leite "in natura" por meios físicos, químicos e biológicos. Peróxido de hidrogênio como conservador. Rev. Inst. Adolfo Lutz 29/30: 85-103, 1969/70.

Mesmo não entrando em detalhes, podemos ver entretanto que a flora do leite padrão, quer em ambiente ou refrigerada, aumentou consideravelmente, o mesmo acontecendo com o seu grau de acidez que, de 18°D, passou respectivamente a 20 e 28°D, enquanto que, no leite quimicamente conservado, mostrou o de 18 a 21°D, e flora consideravelmente mais baixa. A presença ativa do peróxido foi demonstrada pelo emprêgo do guaiacol, iodeto, C.T.T. e coagulação de prova. Noção já conhecida, mas digna de nota, foi a somação do efeito conservador dos dois conservantes, isto é, ação do peróxido aliada à frigorificação. E note-se que a frigorificação é norma rotineira, de exigência regulamentar, no transporte e estocagem do leite.

Dez horas passadas, foram mantidas as diferenças para o leite padrão conservado em ambiente e refrigerado, e acentuadas,

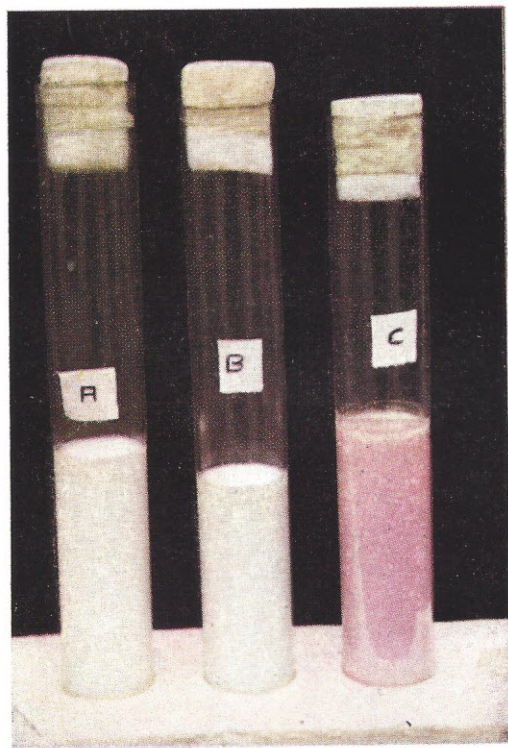


Fig. 3 — Leite cru, mais o peróxido de hidrogênio colocado há cerca de 10 horas.

Tubos A e B — cores brancas — provas de guaiacol e iodeto, negativas. Tubo C — cor róseo-clara — prova do C.T.T., positiva.

na sua réplica, com o peróxido de hidrogênio (quadros IV e V, pág. seguinte).

Os dados obtidos mantêm as mesmas diferenças, com uma exceção, exceção esta que é a base dêste trabalho. Enquanto os processos clássicos não mais acusam a presença do peróxido de hidrogênio, os métodos da presença de substâncias inibidoras indicam nitidamente a sua presença, pelo C.T.T. — positiva, roseo-claro — e a incoagulabilidade do leite mais o *inoculum* dos germes fermentadores da lactose. (Fig. 3).

Quanto aos demais valores, deixaremos de tecer comentários a respeito, pois poderão ser avaliados, inclusive por comparação, entre os diversos quadros apresentados e, daí, retiradas as múltiplas implicações.

Após 24 horas do início das pesquisas o leite padrão conservado em ambiente sofreu coagulação e ficou portanto sem condições de exame, sendo apenas consignada a sua acidez (55°D). Tal fato pode ser observado no quadro VI. Os valores obtidos para o mesmo leite frigorificado aí também estão.

Entretanto conforme dados do quadro VII, o leite que foi adicionado com o peróxido de hidrogênio, 24 horas passadas, mesmo deixado em temperatura ambiente, ainda tem condições de exame e qualidade muito melhor do que a apresentada pelo leite padrão, mesmo quando conservado sob refrigeração, a 8°C.

Note-se, e isto é fundamental, que enquanto prossegue o silêncio conivente das provas clássicas, na rotina da pesquisa do peróxido de hidrogênio, as provas do C.T.T. e coagulação acusam ainda a presença, decrescente mas ativa, daquele conservador.

QUADRO IV

Leite cru Padrão examinado após 10 horas

Leite cru	Bacterimetria		Colimetria Placas col./ml	Redutasi- metria A. Metileno minutos	Acidez °D	Pesquisa de H ₂ O ₂		Pesquisa de inibidores em geral		
	Placas col./ml	Método Breed bactérias/ml				Guaiacol	Iodeto	C.T.T.	Coagulação	Inibição Placas
Frigorificado	55 000 000	75 000 000	1 300 000	10	23	—	—	—	coagulação	—
Em ambiente	75 000 000	83 000 000	5 100 000	1	31	—	—	—	coagulação	—

QUADRO V

Leite cru com H₂O₂, examinado após 10 horas

Leite cru	Bacterimetria		Colimetria Placas col./ml	Redutasi- metria A. Metileno minutos	Acidez °D	Pesquisa de H ₂ O ₂		Pesquisa de inibidores em geral		
	Placas col./ml	Método Breed bactérias/ml				Guaiacol	Iodeto	C.T.T.	Coagulação	Inibição Placas
Frigorificado	22 000 000	48 000 000	35 000	160	20	—	—	+	Líquido	—
Em ambiente	42 000 000	61 000 000	340 000	60	26	—	—	+	Líquido	—



Fig. 4 — Placa com gelose, padrão, semeada com leite padrão, isento de inibidor (diluição 1/1 000 000)



Fig. 5 — Placa com gelose, padrão, semeada com leite cru ao qual se acrescentou peróxido de hidrogênio a 1/1 000 (diluição 1/1 000 000).

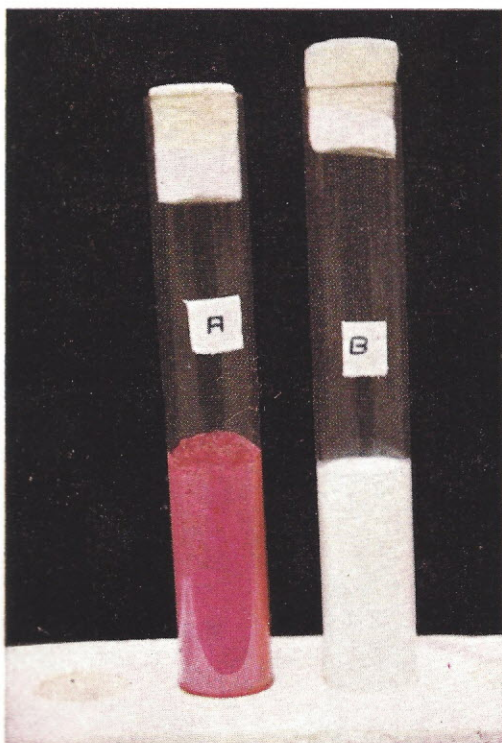


Fig. 6 — Leite cru, padrão.
Tubo A — cor vermelha — C.T.T. negativa para a presença de inibidores. Tubo B — cor branca — Azul de metileno já reduzido pela flora bacteriana. Relacionar com a fig. 4.

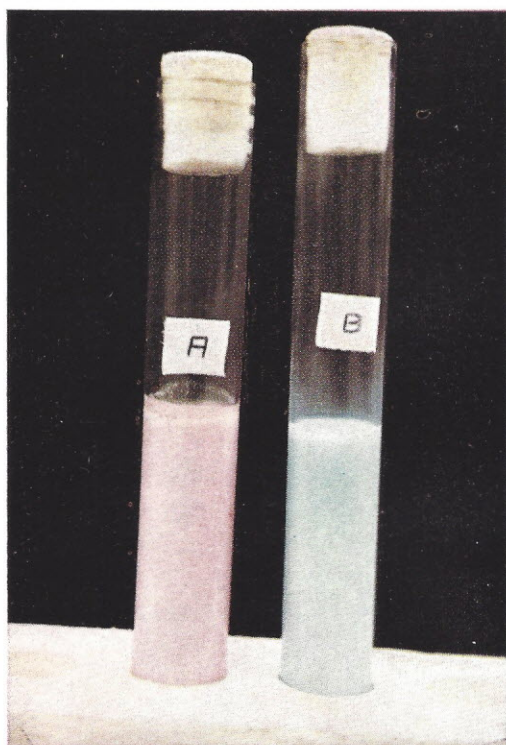


Fig. 7 — Leite cru ao qual se adicionou peróxido de hidrogênio.
Tubo A — cor róseo-clara — C.T.T. positiva para a presença de inibidores. Tubo B — cor azul — indicativa de azul de metileno, não reduzido. Relacionar com a fig. 5.

QUADRO VI

Leite cru Padrão examinado após 24 horas

Leite	Bacterimetria		Colimetria	Redutasi- metria	Acidez	Pesquisa de H ₂ O ₂		Pesquisa de inibidores em geral		
	Placas col./ml	Método Breed bactérias/ml				Placas col./ml	A. Metileno minutos	°D	Guaiacol	Iodeto
cru										
Frigorificado	89 000 000	118 000 000	6 100 000	1	35	—	—	—	coagulado	—
Em ambiente	55

... Sem condições de exame

QUADRO VII

Leite cru com H₂O₂ examinado após 24 horas

Leite	Bacterimetria		Colimetria	Redutasi- metria	Acidez	Pesquisa de H ₂ O ₂		Pesquisa de inibidores em geral		
	Placas col./ml	Método Breed bactérias/ml				Placas col./ml	A. Metileno minutos	°D	Guaiacol	Iodeto
cru										
Frigorificado	41 000 000	57 000 000	110 000	110	24	—	—	+	Líquido	—
Em ambiente	87 000 000	115 000 000	800 000	20	38	—	—	+	Líquido	—

Passemos agora às duas demais etapas da trilogia proposta no início do trabalho.

2. PESQUISA DA MAIS LONGA PERMANÊNCIA DETERMINÁVEL DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (1/1 000ml), QUANDO ADICIONADO AO LEITE PADRÃO — CRU, FERVIDO, PASTEURIZADO COM OS RECURSOS DOS MÉTODOS CLÁSSICOS.

No leite cru, quer em ambiente como sob refrigeração, após cerca de 5 a 6 horas, a ausência analítica do peróxido, sub-detectável, foi a norma. Entretanto, para o leite pasteurizado, mesmo conservado em meio ambiente, o tempo de positividade das provas clássicas foi bem mais amplo — 16 horas.

Na amostra do mesmo leite refrigerado a 8°C, 240 horas ou mais, o peróxido de hidrogênio continuou presente; ao fim de 10 dias, suspendemos as pesquisas a êle relativas. Com o mesmo leite, porém fervido, no qual a presença de peróxido foi constatada pelo método do guaiacol, auxiliado pelo processo de TAPERNOUX³², ou pelo da oxidação do iodeto, as respostas foram semelhantes, com permanência muito longa do peróxido de hidrogênio, não desdobrado, pela destruição térmica havida, das diastases do leite.

3. EXAME DO LEITE TIPO "B" E "C", DE CONSUMO NA CAPITAL PELOS MÉTODOS CLÁSSICOS E PELOS ATUALMENTE PROPOSTOS.

De posse dos dados já analisados, passamos ao exame diário de amostras de leite cru destinado à produção do leite tipo "C", chegadas a São Paulo nas condições correntes, isto é, refrigeradas, e amostras de leite tipo "C" adquiridas no Comércio e obtidas simultaneamente em pontos diversos, em dias diferentes e de tôdas as principais marcas comerciais existentes à venda, principalmente Leco, Paulista, Poços de Caldas, União e Vigor. Também foram adquiridas, nas mesmas condições, amostras do leite tipo "B": Itahyê, Leco, Paulista, União e Vigor.

Foram examinados cerca de 100 amostras de cada grupo, num total de 300 amostras.

Conforme noção conhecida, pela sua não utilidade no caso, deixamos de realizar, para os leites pasteurizados, a bacterimetria pelo método de Breed e a redutasimetria.

Pelos métodos clássicos, o peróxido de hidrogênio *não foi evidenciado*, estando ausentes os sulfamídicos, aldeído fórmico, compostos de amônio quaternário e outros conservadores.

Não obstante, a pesquisa da presença de inibidores pelo C.T.T. e coagulação de prova revelou, no leite tipo "C" e no seu homônimo em estado de cru, a presença ativa de inibidor do crescimento bacteriano, na percentagem de 8% das amostras examinadas. O processo das placas com agar-germe manteve-se silencioso, não acusando a presença de inibidores nestas amostras.

No leite tipo "B", os inibidores foram apontados em 11% das amostras, tendo o processo da placa-germe evidenciado, em uma delas, a presença da penicilina, na potência de 0,03 U/ml. Insistimos em assinalar que o peróxido de hidrogênio não foi identificado em nenhuma das amostras, com os recursos da técnica clássica.

DISCUSSÕES E CONCLUSÕES

Embora afirmem os autores que o peróxido de hidrogênio, quando colocado no leite cru, continua a agir, mesmo 10 a 20 ou mais horas após o seu adicionamento, não há meios conhecidos, pelo menos correntes, para determinar tal feito.

O mesmo não acontece com o aldeído fórmico, amônio quaternário, sulfamídicos, antibióticos e demais conservantes antissépticos, que continuam a ser determináveis, quantitativa e qualitativamente, dezenas de horas ou dias após a sua colocação.

O aldeído fórmico é evidenciado facilmente até em 10 p.p.m., o amônio quaternário, ou seus compostos, até 5 p.p.m., os sulfamídicos, em 0,005%, a penicilina, tetraciclina e cloranfenicol, a estreptomicina, respectivamente em 0,005 U/ml, 0,5 µg/ml e 5 U/ml^{20, 21 e 22}.

Em contraposição, a restrição horária se faz apenas para o peróxido de hidrogênio que, após 6 horas, não pode mais ser detectado no *leite cru*, quando pesquisado pelos métodos clássicos.

Dada a sua acentuada ação antisséptica, com redução de mais de 50 a 80% da flora microbiana, o seu baixo custo mesmo a 130 volumes, a pequena alteração do sabor do leite e principalmente a perda rápida da capacidade da determinação da sua presença, estes fatos constituem inegavelmente um considerável estímulo ao seu emprego.

Na verdade, no interior, o leite cru destinado à constituição do tipo "C" tem prazo de 24 horas para ser conduzido do local da ordenha e do entreposto de refrigeração à cidade, para a pasteurização. Pasteurizado, recebe mais 24 horas de prazo para a sua distribuição ao consumo, num total de 48 horas desde a ordenha^{5,6}.

Mas, excetuando o período inicial, nos locais de produção, onde geralmente o leite fica sob a refrigeração apenas da água corrente, a norma, no entreposto do interior, na usina de pasteurização e na distribuição, é a da rigorosa frigorificação do produto, em temperatura não superior a 5°C.

Então o calcanhar de Aquiles da produção leiteira, mesmo quando bem conduzida, reside juntamente naquele período inicial, quando após a ordenha é o leite transportado em latões, que aguardam à beira das estradas e rodovias, sob a proteção precária de abrigos rústicos, sob o impacto da temperatura ambiente, o momento de serem recolhidos e enviados ao entreposto.

Essa geralmente é a norma para os pequenos produtores de leite, devido à sua menor capacidade financeira, e que, embora não contribuam com o maior volume de leite *per capita*, se constituem na grande e absoluta maioria numérica.

E ao leite ordenhado principalmente pela madrugada, na chamada primeira ordenha, é facultado o prazo de até as 12 horas para dar entrada no entreposto de refrigeração, fornecendo portanto, à minoria infratora, mais de 6 horas habéis para o emprego do peróxido de hidrogênio, antes

da triagem higienico-sanitária realizada pela inspeção técnica, oficial.

Para o leite pasteurizado, o emprego desse conservante é desnecessário e impraticável. Desnecessário, dada a qualidade do tratamento térmico, e a ação cabal da frigorificação. Impraticável porque a redução calórica da flora bacteriana e das enzimas do leite permite uma longa permanência do peróxido de hidrogênio o que o torna facilmente determinável, mesmo pelos recursos clássicos.

Levando em consideração tais fatos e os resultados das pesquisas que fizemos em 1966 e 1967 — Presença de inibidores bacterianos no leite de consumo da Capital — com o encontro de 15 a 20% e de 9% de amostras do leite com inibidores, a maioria não identificada, a nossa atenção se voltou naturalmente para a possibilidade de ser o peróxido de hidrogênio essa presença incógnita^{19, 20}.

Os resultados obtidos experimentalmente com a colocação do conservador no leite cru e a sua pesquisa determinável, mesmo 24 horas após, já em pleno silêncio dos métodos clássicos, veio reforçar a nossa presunção.

E ressalta-se que, dos métodos clássicos, segundo os autores, os mais sensíveis são os que empregam as reações diastásicas^{27, 32} baseadas no fato de que a peroxidase no leite decompõe o peróxido de hidrogênio, libertando oxigênio atômico, nascente, capaz de se fixar sobre substâncias oxidáveis e, em muitas, produzir a formação de substâncias coloridas^{12, 14, 27}.

Entre essas substâncias oxidáveis, *em geral*, se encontram os polifenóis, como o guaiacol, certas aminas, como o p-fenileno-diamina, certos leuco-corantes, como a leuco-fenolfaleína e um número miscelânico de materiais, incluindo o ácido ascórbico, o triptofano, o ácido vanádico, os nitritos e os iodetos^{27, 30, 36}.

Entretanto, a reação rotineiramente empregada deriva do tradicional processo de Dupuy^{11, 18, 30} e põe em evidência a oxidação do guaiacol que, em presença do sistema peróxido-peroxidase, se transforma em guaiacoquinona, comunicando ao leite um nítida coloração vermelho-salmão.

Mas, se o leite foi fervido, houve destruição da peroxidase e o processo falha. Nesse caso, podemos lançar mão do meio prático de TAPERNOUX³², repondo no leite a peroxidase pelo acrescentamento da saliva ou utilizar um método puramente químico, como o da oxidação de potássio, ou do vanadato de amônio ou ácido vanádico, 1, 2, 30.

Mas quaisquer que sejam esses métodos, na prática esbarram com a restrição limitante daquele período máximo de 6 horas nas suas capacidades de determinação identificadora.

E quais seriam as conseqüências do emprego do peróxido de hidrogênio no leite, como conservador?

Do ponto de vista de Inspeção Sanitária, pelo falseamento induzido pela sua presença incôgnita, através da bacteriostase, na justeza da apreciação dos exames bacteriológicos e físico-químicos de rotina, só permitindo avaliar a qualidade atual do produto examinado, levando a considerar um leite altamente poluído como de boa qualidade, retira daqueles exames a sua elevada capacidade julgadora.

Tal prática, se disseminada, poderá, pela concorrência desleal, até o momento não passível de coibição, criar o desestímulo da produção higiênica do leite.

Na verdade o Regulamento Federal Brasileiro^{5, 6}, no seu artigo 540, estipula para o leite cru a prova da redutase, anunciando, no artigo 537, que só pode ser beneficiado leite considerado normal, proibindo o beneficiamento do leite que revele, na prova da redutase, contaminação excessiva, com descoramento em tempo inferior a 5 horas para o tipo "A", 3 h 30 m para o tipo "B" e 2 h 30 m para os demais tipos. Diz ainda, no artigo 540, parágrafo 2, que o número de germes por ml, antes da pasteurização, não deve ser superior a 10 000 para o leite tipo "A" e 500 000 para o tipo "B" e para os demais tipos, sem padrão bacteriológico determinado, quando em estado de cru que mantenha a acidez não inferior a 15°D nem superior a 20°D, e o seu tempo de redutase não inferior a 2 h 30 m.

E embora o artigo 514 advirta no seu parágrafo único que é proibido o emprego de substâncias químicas na conservação do leite, a não realização *em caráter liminar* da pesquisa da presença de substâncias inibidoras pode subverter a capacidade julgadora daqueles métodos de exame exigidos.

Então, podendo tôdas essas provas sofrer influência marcante dos inibidores, cuja presença é capaz de determinar um tipo fictício de leite, deve ser exigida liminarmente a sua ausência, para poderem ser aceitos como válidos os resultados fornecidos por aquelas provas de rotina.

Mas a veiculação, no leite, de conservantes antissépticos diversos, de antibióticos resultantes ou não do tratamento veterinário do rebanho leiteiro, de vestígios de substâncias químicas usadas na higienização em laticínios somente determináveis com o emprego de técnicas *ainda não correntes* no Brasil, traz implicações maiores do que as que possam imaginar *a priori*.

Como um *iceberg*, a parte visualizável do problema é muito pequena, e faz surgir uma reflexão ponderável: até a que ponto as estatísticas elaboradas pelos trabalhos que vêm sendo publicados, a respeito da avaliação bacterimétrica e colifórmica dos diversos tipos de leite consumidos no Brasil, podem ter sofrido a influência da presença incôgnita das substâncias inibidoras do crescimento bacteriano? E até que ponto o nosso Regulamento que periodicamente, ao se reformular se baseia nos dados obtidos por aqueles trabalhos, pode ter sido afetado?

Também é necessário entretanto ponderar, com TERPLAN e ZAADHOF³⁴, que no leite existe uma série de inibidores naturais, na verdade quase todos termo-lábeis, que, segundo a opinião dos autores, não teriam influência marcante nos processos vistos.

Do ponto de vista da industrialização do leite, principalmente na elaboração dos derivados fermentados — iogurte, coalhada e outros — as substâncias inibidoras inclusive o peróxido de hidrogênio, têm interferência sensível, com baixa da produção de ácido láctico e desmerecimento das suas boas qualidades organolépticas.

Sob o ponto de vista nutricional, ressaltaremos a redução do teor das diversas vitaminas, quando da presença do peróxido de hidrogênio no leite, ação desnaturante sobre as suas proteínas, produzindo modificação na estrutura macro-molecular das mesmas³⁵.

E com relação ao emprêgo oficial do peróxido de hidrogênio, como conservador, transcreveremos literalmente a opinião da Organização Mundial da Saúde, exarada já em 1960 e manifesta pelo seu Comité Mixto FAO/OMS d'Experts de l'Hygiène du Lait²⁵: "Le Comité approuve les conclusions auxquelles est parvenue la Réunion d'experts d'Interlaken (septembre 1957) sur l'emploi de l'eau oxygénée et autres agents de préservation du lait, à savoir: 1) Qu'en général l'emploi d'agents de préservation dans le lait n'est pas souhaitable et qu'en fait il ne peut être considéré que comme un mal nécessaire. Ce procédé ne peut être toléré que dans des cas exceptionnels et dans les pays chauds ou sous développés où il n'est pas possible de transporter rapidement le lait du lieu de production au centre de traitement ou d'assurer son refroidissement efficace..."

No item 5, adverte: "Qu'étant donné que l'eau oxygénée sert uniquement à retarder l'acidification du lait et qu'aux doses non nocives elle ne peut détruire certains types de micro-organismes pathogènes (notamment *Myco. tuberculosis*), le lait traité à l'eau oxygénée doit être soumis ensuite à un traitement thermique efficace avant sa distribution aux consommateurs ou au cours de sa transformation en produits laitiers.

No item 7, descreve: "Que si l'on a recours à la catalase pour faire disparaître les dernières traces d'eau oxygénée dans le lait, il faut s'assurer que la préparation soit irréprochable du triple point de vue enzymatique, chimique et bactériologique".

E assinala ainda no item 9: "En outre, le Comité voit un autre inconvénient très sérieux à employer l'eau oxygénée pour la préservation du lait dans le fait que cette pratique, si elle était appliquée systématiquement, inciterait presque certainement les producteurs de lait à abandonner tout nouvel effort pour améliorer les conditions

d'hygiène à la ferme et se traduirait sans doute par une baisse générale du rendement des élevages d'animaux laitiers".

Finalmente, consideramos que os dados dêste presente trabalho, tendo em vista o número pequeno das amostras examinadas, são relativamente deficientes para uma conclusão mais efetiva, julgamos que o mesmo deve ser repetido em carater mais amplo, de preferência com o leite cru advindo do interior e região por região, visando localizar os focos do leite inquinado e o seu saneamento dentro do prazo mais curto possível.

Tendo em vista o interesse do assunto, a Divisão de Contrôlo de Qualidade e Pesquisa da Cooperativa Central da Laticínios do Estado de São Paulo elaborou estas investigações, visando fornecer elementos que evitem a transgressão do Regulamento Federal, em legítima defesa dos interesses dos bons produtores de leite e dos mais elementares princípios de Saúde Pública, como incentivo à melhora da *real* qualidade do leite.

RESUMO

Conforme recomendação de regulamento federal brasileiro — Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal — o leite *in natura*, da fonte de produção ao centro de beneficiamento, somente poderá ser conservado por meios físicos, principalmente pela refrigeração e após, pasteurizado. O emprêgo de outros conservantes — químicos ou bioquímicos — constituirá flagrante transgressão regulamentar.

Além do mais, a longa permanência no leite dos conservadores a êle adicionados e a sua fácil determinação torna o emprêgo dessas substâncias impraticável para fins excusos. Porém, tal fato não acontece com o peróxido de hidrogênio que, após 6 horas da sua colocação, não mais pode ser detectado, o que constitui um considerável estímulo para o seu emprêgo.

Levando em consideração o exposto e os resultados das pesquisas que fizeram os autores, em 1966 e 1967, que evidenciaram respectivamente 15-20% e 9% de presença de substâncias inibidoras do cres-

cimento bacteriano no leite de consumo de São Paulo, Capital, e na sua maioria não identificadas, tomaram os autores a iniciativa de elaborar este trabalho, no intuito de relacionar o peróxido de hidrogênio com aquelas substâncias incógnitas. Os processos empregados foram bioquímicos e foram utilizadas, entre outras, a prova do C.T.T., redutase do azul de metileno e emprêgo da placa com agar-germe de prova.

Os autôres conseguiram determinar, mesmo 24 horas ou mais da sua colocação no leite cru, a presença atuante do peróxido de hidrogênio, portanto, muitas horas após a sua não mais determinação pelos métodos clássicos correntes. Tais processos foram a seguir empregados no exame de amostras do leite tipo "B" e tipo "C" do consumo da capital de São Paulo.

Agradecimentos — Externamos nossos agradecimentos aos técnicos do Laboratório da Cooperativa Central de Laticínios do Estado de São Paulo — Daniel Bastos de Matos, Antônio José Xavier, Jair Gentilin e Nelson Zumpano pela valiosa cooperação nas pesquisas realizadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION — Standard methods for the examination of dairy products. 10 ed. New York, A.P.H.A., 1960.
2. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION — Standard methods for the examination of dairy products. 12 ed. New York, A.P.H.A., 1967.
3. APPLIED RESEARCH INSTITUTE — SCHARER modified phosphatase test. Instructions. New York, Applied Research Institute, 1958. Catalogue.
4. BENDIXEN, H. C.; BLINK, G. J.; DRUMMOND, J. C.; LEROY A. M. & WILSON, G. S. — Le problème du lait. Bulletin Trimestriel de l'organisation H'Hygiene 6:193-539, 1937.
5. 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.
6. 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 de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, 1962.
7. BURUIANA, L. M. & PAVLU, U. — L'influence du peroxyde d'hydrogène sur les protéines du lait. Etude polarographique. Milchwissens. chatf 18(12):613-7, 1963.
8. CECILIA, C. A. — Enciclopedia de la leche. Madrid, Espasa-Calpa, 1956.
9. FOSTER, E. M.; NELSON, F. E.; SPECK, M. L.; DOETSCH, R. N. OLSON, J. C. — Dairy Microbiology. New Jersey, Prentice-Hall, 1957.
10. HAMMER, B. W. & HABEL, F. J. — Dairy Bacteriology. 4th ed. Chapman & Hall, London, 1957.
11. INSTITUTO ADOLFO LUTZ — Metodos de análises bromatológicas. I. Análises químicas. São Paulo, Rev. Tribunaís, 1951.
12. JENNESS, R. & PATTON, S. — Principles of Dairy Chemistry. New York John Wiley, 1959.
13. KOSIKOWSKY, F. V.; 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. 35:533-9, 1962.
14. LING, E. R. — A textbook of dairy chemistry. 3rd. ed. London, Chapman & Hall, 1956.
15. LOPES, C. F. — Observações sobre os fatores de insucesso e de recontaminação do leite pasteurizado. Bolm. Ind. Anim. 11:145-62, 1950.
16. LOPES, C. F. & FERRAZ, C. A. — Observações sobre o pre-aquecimento do leite. Sua influência sobre o teor bacteriano em geral e coliformes. Bolm. Ind. Anim. 15:139-84, 1956.
17. MELLO, A. & MASTROFRANCISCO, N. — Verificação sobre a presença do bacilo tuberculoso no leite da Capital. Rev. Ind. Anim. 1:25-42, 1938.
18. MELLO FILHO, A. — O leite: colimetria, fosfatimetria e contagem global. Rev. Inst. Adolfo Lutz 20:129-60, 1960.
19. MELLO FILHO, A.; SANDOVAL, L. A.; RODRIGUES, N. R. & XIMENES, J. — Pesquisas de substâncias inibidoras, em particular a penicilina, por métodos rápidos no leite tipo de consumo na Capital de São Paulo. Rev. Ass. Paul. Med., 69:264-5, 1966. Nota preliminar.

20. 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.
21. 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 28:27-42, 1968.
22. MELLO FILHO, A. — Penicilina no leite de consumo da Capital e risco de sensibilização. Rev. Assoc. Paul. Med. 75:21-34, 1969.
23. MILK INDUSTRY FOUNDATION — Laboratory manual of analysis of milk and its products. Washington, D. C., Milk Industry Foundation, 1959.
24. MOSIMAN, W. — Catalase preparati6n. Archs. Biochem. Biophys. 33:488, 1951.
25. 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.
26. ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ — Comité mixto FAO/OMS d'experts de l'hygiène du lait. Deuxième rapport. Genève, O.M.S., 1960. Sér. Rapp. Techn. 197.
27. PIEN, J.; DESIRENT, J. & LAFONTAINE, D. — La recherche de l'eau oxygenée dans le lait. Le lait 34:133-45, 1954.
28. ROGICK, F. A.; PORTO, E. & GONÇALVES, M. — A mastite sub-clínica no rebanho produtor do leite tipo "B" e "C". Bolm. Ind. Anim. 22:91-120, 1964.
29. ROGICK, F. A. — Doenças transmissíveis ao homem pelo leite e derivados. Zootecnica. São Paulo (Brasil) 4(3):31-52, 1966.
30. ROSSEL, J. M. & SANTOS, I. — Metodos analíticos de Laboratorio Lactológico y Microbiología de las Industrias Lácteas. Barcelona, Labor, 1952. v. 2.
31. SCHARER, H. — A rapid phosphomonoesterase test for the control of dairy pasteurization. J. Dairy Sci. 21:21-34, 1938.
32. TAPERNOUX, A. — Recherche de l'eau oxygené dans les laits pasteurisés. Le Lait 8(1):410. 11. 1928.
33. TEIXEIRA, C. G. — Aplicação da radiação na preservação de alimentos. Bolm.
34. TERPLAN, G. & ZAADHOF, J. — Zum Vorkommen und Nachweis von Hemmstoffen in der Milch — eine kurze Ubersicht. Milchwissenschaft 22(12):761-71, 1967.
35. VILLARES, J. B. — Qualidade do leite tipo "C" em São Paulo. Bolm. Ind. Anim. 17: 55-81, 1959.
36. ZINNER, K. — Ativação oxigenio por espécies não clássicas. São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras. Tese de doutorando. 1967.

Recebido para publicação em 23 de fevereiro de 1970.

