AFLATOXINA E INIBIDORES BACTERIANOS NO
LEITE TIPO "B" COMERCIALIZADO EM SÃO PAULO.
LEVANTAMENTO DAS QUATRO MARCAS DE MAIOR
CONSUMO.

JORGE LUIZ SEFERIN ^{ES} MARTINS

Tese apresentada à Faculdade de Saúde
Pública da Universidade de São Paulo,
Departamento de Nutrição, para obtenção
do título de "Doutor em Saúde Pública"

Orientador:

Prof. Dr. IGNEZ SALAS MARTINS

SÃO PAULO
1984

Aos meus pais,
pelo constante apoio.

*À Ida,
pelo amor e dedicação que sempre me proporcionou.*

*Ao Andr Luz,
com amor.*

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Ighes Salas Martins pela orientação da tese.

Ao Professor Dr. João Fernandes Magalhães por ter permitido o uso do laboratório da disciplina de Controle Farmacêutico de Qualidade II da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, para desenvolvimento desta tese e pela revisão.

Ao Professor Dr. Donald Wilson pelas críticas e sugestões apresentadas e pela revisão desta tese.

À Professora Dra. Eunice Pinho de Castro e Silva pela orientação na execução da amostragem.

Ao Professor Dr. José Cêzar Panetta pelas sugestões apresentadas.

A Maria Cecília Gonzaga Ferreira pela revisão das referências bibliográficas.

A Márcia Vallim, Shirlei V. M. Gonçalves Silva, pelos serviços prestados.

Ao Professor Henrique Vicente Della Rosa pelo apoio recebido.

Às colegas Erika Rosa Maria Hackmann e Maria Inês Rocha Miritello Santoro pela amizade.

Ao Dr. Oswaldo Luiz Marmo, da Cia. Industrial e Comercial Brasileira de Produtos alimentares, pelo fornecimento do padrão de aflatoxina.

Ao Dr. Bruno Nishikawara, da Chimie Test Produtos Químicos Ltda., pelo fornecimento dos meios de cultura.

Ao Dr. Antônio Felizes Pinto, das Indústrias Farmacêuticas Fontora Wyeth S.A., pelo fornecimento de penicilinase e do padrão de penicilina.

À CAPES e Biblioteca da FSP/USP pelo apoio bibliográfico durante o desenvolvimento da tese.

À Professora Dra. Takako Saito e aos auxiliares José Silvestre Campos Nogueira e Horilde de Oliveira Castaldi da disciplina de Controle Biológico de Qualidade da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pelo empréstimo de material e serviços prestados.

ÍNDICE

	pág.
RESUMO	xi
SUMMARY	xiii
1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - Aflatoxinas	4
1.2 - Antibióticos	15
1.3 - Água Oxigenada, Cloro e Formol	21
2 - OBJETIVO	27
3 - MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 - Amostragem	28
3.2 - Determinação de aflatoxina	33
3.3 - Detecção de antibióticos	36
3.4 - Identificação de água oxigenada	38
3.5 - Identificação de formol	38
3.6 - Identificação de cloro	39
4 - RESULTADOS	40
5 - DISCUSSÃO	48
6 - CONCLUSÕES	56
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

pág.

FIGURA 1 - Plano de amostragem - Relação dos dias correspondentes ao 1º período	29
FIGURA 2 - Plano de amostragem - Relação dos dias correspondentes ao 2º período	30
FIGURA 3 - Plano para sorteio das possíveis amostras sistemáticas de cada estrato	32
FIGURA 4 - Esquema do cromatograma bidimensional	35

ÍNDICE DE TABELAS

	pág.
TABELA 1 - Exemplos de incidência de aflatoxina em produtos agrícolas	6
TABELA 2 - Limites de tolerância para aflatoxina estabelecidos pelo F.D.A.	13
TABELA 3 - Limites de tolerância para aflatoxina em alimentos e rações estabelecidos pelos vários países	14
TABELA 4 - Incidência de aflatoxina nas amostras de leite correspondente as quatro marcas de maior consumo analisadas no 1º período (14.06.82 a 31.10.82)	42
TABELA 5 - Incidência de inibidores bacterianos nas amostras de leite correspondente as quatro marcas de maior consumo analisadas no 1º período (14.06.82 a 31.10.82) ..	42

TABELA 6 - Incidência de inibidores bacterianos nas amostras de leite correspondente as <u>qua</u> tro marcas de maior consumo analisadas no 2º período (01.11.82 a 20.03.82) ...	43
TABELA 7 - Incidência de penicilina nas amostras de leite correspondente as quatro marcas de maior consumo analisadas no 1º período (14.06.82 a 31.10.82)	43
TABELA 8 - Incidência de penicilina nas amostras de leite correspondente as quatro marcas de maior consumo analisadas no 2º <u>perí</u> odo (01.11.82 a 20.03.82)	44
TABELA 9 - Incidência de inibidores não identifica <u>dos</u> nas amostras de leite correspondente a quatro marcas de maior consumo ana <u>lis</u> adas no 1º período (14.06.82 a 31.10.82)	44

TABELA 10 - Incidência de inibidores não identifica <u>d</u> os nas amostras de leite correspon <u>d</u> ente as quatro marcas de maior consumo ana <u>l</u> isadas no 2º período (01.11.82 a 20.03.83)	45
TABELA 11 - Incidência de água oxigenada, formol e cloro nas amostras de leite correspon <u>d</u> ente as quatro marcas de maior consumo analisadas no 1º período (04.06.82 a 31.10.82)	46
TABELA 12 - Incidência de água oxigenada, formol e cloro nas amostras de leite correspon <u>d</u> ente as quatro marcas de maior consu <u>m</u> o analisadas no 2º período (01.11.82 a 20.03.83)	47

RESUMO

No leite tipo "B" comercializado em São Paulo foram pesquisados a presença de aflatoxina M_1 e de inibidores bacterianos (penicilina, água oxigenada, formol e cloro).

As amostras de leite utilizadas foram provenientes das quatro marcas de maior consumo pela população de São Paulo.

O trabalho constituiu-se em um estudo longitudinal, com amostragem probabilística, dividido em dois períodos iguais de 140 dias com 224 amostras analisadas.

No primeiro período, de 14 de junho a 31 de outubro de 1982, foram pesquisados todos os contaminantes propostos. No segundo período, de 01 de novembro de 1982 a 30 de março de 1983, a aflatoxina não foi pesquisada, pois, como sofre influência sazonal, há maior possibilidade de ser encontrada nos meses de temperaturas mais baixas.

A aflatoxina, embora em baixos níveis e em pequena proporção (1,8%), fez-se presente nas quatro marcas.

Foi constatada alta prevalência de inibidores bacterianos. No primeiro e no segundo período a proporção foi de 4,95% e 4,50% respectivamente.

No primeiro período a incidência de resíduos de penicilina e de inibidores não identificados foi de 0,9% e de 3,6% respectivamente. No segundo foi de 0,45% e de 3,15%.

Houve uma baixa proporção de amostras com água oxigenada e formol, e ausência de cloro.

De acordo com os resultados, concluiu-se que há necessidade do estabelecimento de limites de tolerância para a aflatoxina no leite, ausentes na nossa legislação; e pela necessidade da atuação da Saúde Pública através de inspeção, e através de amplos programas educativos junto aos produtores e indústrias.

SUMMARY

B-type milk sold in the city of São Paulo, Brazil, was examined for Aflatoxin M₁ and bacterial inhibitors, such as penicilin, hydrogen peroxide, formaldehyde and chlorine.

Samples were taken from the four most consumed brands.

The study was longitudinal, with probabilistic sampling, divided in two equals periods of 140 days each; the total number studied was 224 in each period.

During the first period, June 14th through October, 31st, 1982, all mentioned contaminants were studied where as aflatoxin was not studied in the second period, November 1st, 1982 through March, 30th, 1983, as its occurrence is seasonal and the probability of it being encountered is practically null.

Aflatoxin, although is small proportion (1.8%) and at low levels, was present in the four brands studied.

The prevalence of bacterial inhibitors was high in both periods (4.95% in the first period and 4.50% in the second).

During the first period the incidence of penicillin residues and non-identified inhibitors was 0.9% and 3.6% respectively, in the first period, and 0.45% and 3.15% respectively in the second.

The proportion of samples containing hydrogen peroxide, formaldehyde was low and chlorine was absent in all.

Our results show the need for establishing legal tolerance limits for aflatoxin in milk (which has not been done as yet) and the need for Public Health measures regarding inspection and education of producers and industrial plants.

1 - INTRODUÇÃO

O uso de aditivos químicos em alimentos é prática muito antiga, tendo surgido da necessidade de se conservar as propriedades físicas e organolépticas destes, preservando-os para o consumo humano

Atualmente, na maior parte dos alimentos industrializados há emprego de aditivos, com a finalidade de mantê-los íntegros.

Em laticínios, por exemplo, o sal é usado como preservativo na manteiga e nos queijos; o cloreto de cálcio é empregado como neutralizante no creme.

Apesar da necessidade de aditivos na indústria alimentícia, o seu emprego é rigorosamente mantido sob controle oficial pela Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA) do Ministério da Saúde, através dos decretos nº 55.871 de 26 de março de 1965 e o decreto lei de 21 de outubro de 1969.

A regulamentação¹⁵⁰ do uso de aditivos é feita por "listas positivas", isto é, listas em que aparecem os aditivos, sua função, os alimentos em que podem ser usados e os limites máximos desse uso. A sua utilização está também na dependência de ser tecnologicamente necessário e de não oferecer riscos à saúde pública.

O decreto nº 55.871 considera como aditivo para ali-

mento "toda substância intencionalmente adicionada ao mesmo com a finalidade de conservar, intensificar ou modificar suas propriedades, desde que não prejudique seu valor nutritivo".

O mesmo decreto define ainda, como aditivo incidental: "substância residual ou migrada, presente no alimento como decorrência das fases de produção, beneficiamento, acondicionamento, estocagem e transporte do alimento ou das matérias primas nele empregadas".

De acordo com o Decreto nº 55.871, pode-se agrupar os aditivos em duas categorias:

- 1 - intencional, com a finalidade sempre de trazer melhoria ao alimento;
- 2 - incidental, aquele que aparece em decorrência do tratamento preliminar do alimento.

O Decreto Lei nº 986 não encarou de modo diferente o problema e considera "aditivo intencional toda substância ou mistura de substâncias dotadas ou não de valor nutritivo, ajuntada ao alimento com finalidade de impedir alterações, manter, conferir ou intensificar seu aroma, cor e sabor, modificar ou manter seu estado físico geral ou exercer qualquer ação exigida para uma boa tecnologia de fabricação do alimento".

O mesmo decreto define "aditivo incidental como toda substância residual ou migrada presente no alimento em decorrência dos tratamentos prévios a que tenham sido submetidos a matéria prima alimentar e o alimento "in natura" e do contato do alimento com os artigos e utensílios empregados nas suas diversas fases de fabrico, manipulação, emba-

gem, estocagem, transporte ou venda ..."

Este último conceito¹⁵⁰ engloba o que hoje é considerado "Contaminante de Alimentos" pela Comissão de Peritos FAO/WHO e que abrange os resíduos de pesticidas, as toxinas e os contaminantes metálicos.

Entretanto, o emprego desses aditivos em alimentos é proibido quando:

- 1 - houver evidência ou suspeita de que o mesmo possui toxicidade atual ou potencial;
- 2 - interferir sensível e desfavoravelmente no valor nutritivo do alimento;
- 3 - servir para encobrir falhas no processamento e nas técnicas de manipulação;
- 4 - encobrir alteração ou adulteração na matéria prima ou no produto já elaborado;
- 5 - induzir o consumidor a erro, engano ou confusão.

Pela natureza dos aditivos incidentais e devido aos poucos conhecimentos a respeito, não existe ainda legislação específica que regule a presença destes em alimentos. Por esse motivo a identificação de toda substância residual ou migrada presente no alimento se torna indispensável.

Os aditivos incidentais são encontrados, em laticínios e derivados, quando ingeridos pelo animal produtor de leite, através da ração (micotoxinas), do medicamento (anti-biótico) ou de pastagem (resíduos de pesticidas)⁴⁶. Após metabolização, estes resíduos são incorporados ao leite. Também, podemos considerar como aditivos incidentais os resíduos de formol e de cloro presentes no leite e derivados muitas vezes remanescentes da higienização de utensílios e de

equipamentos.

Apesar da água oxigenada não ser considerada aditivo incidental, pois é adicionada ilegalmente ao leite com a finalidade de inibir o crescimento bacteriano, o seu controle também se faz necessário pelo fato de alterar as propriedades físico-organolépticas do produto.

Considerando a importância do leite na alimentação humana, principalmente na dieta infantil, a presença de contaminantes nesse alimento, por si só representa um problema de Saúde Pública que deve ser cuidadosamente examinado.

1.1 - Aflatoxinas

A presença de fungos nos alimentos além de ocasionar alterações indesejáveis no sabor e na qualidade, limitando sua aceitação, apresenta a possibilidade de produzir toxinas.

A relação entre as toxinas microbianas dos alimentos e as enfermidades produzidas no homem e animais baseia-se frequentemente na observação de sintomas após ingestão do produto contaminado, o que permite estabelecer uma relação clara entre causa e efeito. Entretanto, no caso das toxinas dos alimentos mofados, esta situação não é tão evidente; por exemplo, o envenenamento pelo ergot, toxina do centeio, que ocorre esporadicamente desde a antiguidade, somente em 1711, foi associado ao crescimento do fungo Claviceps purpurea. Em 1875 identificaram-se seus componentes tóxicos²⁹⁹.

Entre 1942 e 1947, em certas regiões da Rússia foi registrada uma forte epidemia de leucopenia tóxica alimentar

com elevada taxa de mortalidade atribuída a contaminação de grãos com fungos do genero Fusarium⁴². Na mesma época, no Japão também ocorreu um surto epidêmico grave por contaminação do arroz com fungos do gênero Penicillium⁴².

Em 1960, na Inglaterra a morte de mais de 100.000 peruzinhos e 14.000 patinhos foi relacionada à ingestão de torta de amendoim importadas do Brasil, que haviam sido misturadas à ração. As aves morriam no prazo de uma semana e apresentavam as células do parênquima hepático completamente degeneradas^{18,257}.

Simultaneamente, em diferentes países foram registrados episódios análogos em várias espécies animais relacionando-se à alimentação e, em particular, ao farelo de amendoim^{7,45,148,155,156,224}. Diante da grave ameaça à saúde animal, que o consumo de farelos contaminados representava, foram conduzidos estudos e análises que resultaram na extração e isolamento de uma substância tóxica.

Allcroft e colaboradores^{3,4}, verificaram que substâncias isoladas e extraídas da farinha contaminada eram tóxicas quando administradas em espécies sensíveis.

Asplin & Carnaghan¹⁸ demonstraram que um extrato de farinha de amendoim parcialmente purificado e a farinha de amendoim, quando administrados a patinhos produziam uma proliferação do epitélio do ducto biliar.

Sargeant e colaboradores^{223,224} mostraram que a toxicidade do extrato era causada por compostos tóxicos elaborados por certas cepas de A. flavus, que se desenvolviam na farinha.

Desde então, foi desenvolvido um importante esforço científico, centralizado no estudo dessa toxina, em virtude do grave risco que potencialmente podia, também, represen

TABELA 1 - Exemplos de incidência de aflatoxina em produtos agrícolas

Produto	Localização	Referências
Milho	U.S.A., França, Austrália, Yugoslávia, Egito, Argentina	21,36,53,102,119,120,146,210,237,238,239,241,242,243,258,262,286.
Amendoim	U.S.A., África, Indonésia, Índia, Tailândia, Brasil, Argentina, Egito.	37,82,83,89,118,122,138,139,153,210,287,
Caroço de algodão	U.S.A., América Central, Índia, Sudão	73,94,140,217,226.
Copra	Índia, Ceilão	17,25,139.
Centeio	França	146
Aveia,Sorgo, Trigo	França, U.S.A., Austrália	36,146,228,240,244,246.
Cevada	França, Grã-Bretanha, Austrália	36,146,246.
Soja	U.S.A., França, Alemanha, Egito	17,26,70,131,210,237,241,245.
Arroz	U.S.A., Vietnã do Sul, Asia.	101,146,157,228,235,237.
Linhaça	U.S.A., Alemanha	16
Alfafa	Canadá, Brasil	184
Cacau	França, Suíça	146
Girassol	Itália, França.	138
Trigo	U.S.A., Brasil, Egito	101,201,209,228,240,244,245.
Ração	U.S.A., Canadá, Polônia, Grã-Bretanha, Austrália, Brasil, Tunísia	1,20,32,37,82,203,218,231,246,254,268.
Feijão	Brasil	220

tar à saúde humana. A micotoxina isolada e identificada foi denominada aflatoxina. As aflatoxinas tem se mostrado carcinogênicas, sendo produzidas por várias espécies de fungos do gênero Arpergillus^{124,230}. São encontrados naturalmente em um grande número de produtos agrícolas em todas as zonas do mundo. Além disso, muitos desses produtos são utilizados como ingredientes de rações. Alguns exemplos de incidência de aflatoxina em produtos agrícolas estão indicados na Tabela 1.

As aflatoxinas também já foram detectadas em ovos, leite, produtos lácteos, carne e derivados e alimentos industrializados^{13,31,38,83,88,93,97,129,140,145,151,154,162,206,221,260,267,269,310}.

A contaminação desses alimentos por aflatoxina pode ser causada diretamente através do crescimento de fungos toxicogênicos em produtos agrícolas ou indiretamente através de resíduos derivados do metabolismo^{11,14,34,61,87,99,117,126,293,298}.

Na família das aflatoxinas são conhecidos mais de doze compostos; entre eles, somente aflatoxinas B₁ e M₁ apresentam interesse à saúde pública pelas seguintes razões:

- a - a aflatoxina B₁ por aparecer em maior teor, cerca de 80% das aflatoxinas e, também, por ser a mais potente em termos de toxicidade aguda, mutagenicidade e carcinogenicidade; esta toxina ao ser metabolizada pelo tecido animal produz seis metabólitos^{224,293,307}.
- b - a aflatoxina M₁, um dos seis metabólitos da B₁, entre eles o mais tóxico e por ser encontrado invariavelmente no tecido animal, excretas, no leite e derivados; a conversão em aflatoxina M₁ ocorre no fígado,

produzida pela hidroxilação do quarto carbono da mo
lêcula de aflatoxina B₁^{15,43}.

O primeiro resíduo de aflatoxina observado no tec
do de vacas e o mais intensamente estudado foi a aflatoxina
M₁ no leite^{18,104,168}. Muitos estudos foram realizados com
a finalidade de determinar a relação entre a ingestão e a
excreção desta aflatoxina. Nesses estudos concluiu-se que o
teor de aflatoxina M₁ excretada no leite é diretamente pro-
porcional a quantidade de aflatoxina B₁ ingerida. Também fi
cou evidenciado que a aflatoxina aparece quando o conteúdo de
aflatoxina B₁ na ração for superior a 46 ppb^{5,8,147,169,185,}
195,199.

A relação entre o teor de aflatoxina B₁ administra
da e a quantidade da M₁ produzida no leite pode depender da
via de administração e da espécie de animal que está sendo
estudada^{15,70}. Kiermeir¹²⁷ demonstrou que no leite de vaca
quando quantidades significativas são consumidas, a aflato-
xina aparece 12 horas após a alimentação, tempo necessário,
também, para a formação do próprio leite. Admite-se atual-
mente que a quantidade de aflatoxina M₁ excretada pela vaca
varia de 1 a 3% da dose da B₁ ingerida. Esta estimativa es-
tá baseada nos resultados experimentais obtidos após a admi-
nistração por um período limitado, de alimento fortemente con
taminado^{4, 6, 130, 147, 168, 169, 176, 183, 195, 199}.

O teor de aflatoxina M₁ no leite tem mostrado so-
frer uma influência sazonal^{255,278,285}. Fremy e colabora
dores⁸⁶ verificaram, na França, que as análises efetuadas no
leite, durante o inverno apresentam uma proporção mais eleva
da de aflatoxina, e conseqüentemente, mais mensurável do que
no verão. Durante o período de primavera e do verão, quan-
do o animal se encontra mais nos campos, o grau de contamina

ção do leite fica bastante reduzido em relação ao período de estabulação.

Na Bélgica²⁸⁵ foi constatado que no leite proveniente de grandes produtores havia maior incidência de aflatoxina do que naquele produzido em pequenas propriedades; a origem desta diferença mostrou ser decorrente do fato de que na exploração intensiva do gado em regiões de grande produção leiteira, exige-se grandes quantidades de alimentos, havendo necessidade de armazenamento ao ar livre propiciando condições adequadas ao crescimento de fungos. Também a variação regional da contaminação do leite, está relacionada com o uso de rações concentradas.

A qualidade e a procedência da fração é um fator importante na contaminação dos produtos lácteos. Por isso tem-se enfatizado sobre a importância de se estabelecer bons métodos de colheita, tratamento, transporte e distribuição, a fim de impedir o crescimento de fungos e consequentemente a produção de micotoxina^{57,95,198,255,278}.

Geralmente, 3 a 5 dias após a remoção da ração contaminada, a aflatoxina M₁ não é mais detectada no leite^{6,15,130,160,199}.

As aflatoxinas podem apresentar dois níveis de toxicidade: a aguda provocando a morte de animais por meio de rações fortemente contaminadas, e a crônica com efeito carcinogênico, mais frequente no homem, ocasionada pela ingestão direta de micotoxinas presentes no alimento ou pela contaminação secundária através do consumo de resíduos derivados do metabolismo animal^{9,10,40,65,69,99,117,152,299}.

Espécies de animais domésticos como boi, cão, porco, peru, galinha e animais de laboratório, consumindo quantidade sub-letal de aflatoxinas por vários dias, desenvolve-

ram uma síndrome tóxica, com danos no fígado^{39,41,49,71,189,194,215,222,250}. As quantidades tóxicas acumuladas variam de 0,3 a 15 p.p.m.⁷⁰.

O primeiro sintoma clínico de aflatoxicoses crônicas, em mamíferos, geralmente manifesta-se pela falta de apetite, redução do crescimento e perda de peso^{4,68,151,156,160}. Observações patológicas revelaram icterícia generalizada e cirrose do fígado com proliferação das células do ducto biliar e fibrose peritoneal^{39,188}.

Embora em menor extensão do que nos animais, a literatura tem apontado casos de aflatoxicoses agudas em humanos. Por exemplo, na Índia¹³⁶, altos níveis de aflatoxinas em grãos de milho ocasionaram hemorragia gastro intestinal, principalmente em crianças.

A incidência de aflatoxina M₁ no leite e derivados em determinadas regiões, tem representado um perigo para a saúde, especialmente de recém-nascidos e crianças que consomem mais o produto e portanto, são expostos a um risco maior quanto aos efeitos adversos dessa toxina²¹¹.

Não há evidência de que a aflatoxina M₁ seja carcinogênica ou mutagênica como a aflatoxina B₁. Entretanto, apresenta grande toxicidade, dependendo da dose pode causar necrose no fígado^{70,201,205}. Várias experiências foram realizadas sobre a toxicidade da aflatoxina M₁ em diferentes espécies animais, como na truta, porco, rato e vaca^{44,187,248,249,276,281,306,308}.

Na fabricação de derivados de leite, o desnatamento tem mostrado afetar a distribuição de aflatoxina M₁ no produto final. Como ela fica associada à caseína, durante o desnatamento do leite integral, 84% do total do conteúdo de aflatoxina M₁ fica retido no produto desnatado^{90,270}.

No processo de pasteurização, o efeito do aquecimento na estabilidade da aflatoxina M_1 foi estudado, mas os resultados foram conflitantes. Vários autores admitem que a pasteurização não afeta a sua estabilidade^{4,261,283,284,300,301,302,303}. Entretanto, outros consideram que cerca de 80% da aflatoxina é destruída durante a pasteurização^{85,128,173,208}.

Inspeções em outros países constataram a presença de altos níveis de aflatoxina M_1 no leite.

Na África do Sul, Purchase e Vorster²⁰⁷, em 21 amostras de leite cru analisadas encontraram 23,8% com aflatoxina. Na Holanda, Schuller e colaboradores²²⁹ em 95 amostras de leite pasteurizado, colhidas no período de dezembro de 1972 a abril de 1973 obtiveram 5 amostras positivas para aflatoxina. No Irã, em 96 amostras de leite cru analisadas entre 1973 e 1974, Suzangar e colaboradores²⁷¹ detectaram 38 amostras com aflatoxina (39,6%). Nos U.S.A., em 1975, Paul e colaboradores²¹¹ analisaram 81 amostras de leite cru e encontraram 6,2% positivas. Em 1977, nos U.S.A., houve uma grande incidência de aflatoxina em alimentos; em pesquisa realizada em 4 estados, Cobb⁵⁰, constatou que em 302 amostras de leite 19 excederam o limite de 0,5 ppb (limite estipulado pelo F.D.A.). Em 1975, na Bélgica, Van Pée²⁸⁵ encontrou em 68 amostras de leite pasteurizado, 61,7% com aflatoxina. Na Tchecoslováquia, Bartoš e Matyáš^{23,24} em 1978, analisando 70 amostras de leite pasteurizado, e em 1981, 77 amostras de leite cru, encontram respectivamente 25 e 5 amostras positivas. Em 1981, na França, Fremy e colaboradores⁸⁶ constataram maior prevalência de aflatoxina no inverno (45%) do que no verão (25%).

No Brasil, em 1975, Pozzobon e colaboradores²⁰² em

pesquisa realizada na cidade de Santa Maria no Rio Grande do Sul, já haviam constatado a presença de pequenas quantidades de aflatoxina M_1 (2%) em 50 amostras de leite cru comercializado. Entretanto essas amostras não foram probabilísticas, não havendo preocupação quanto a procedência do leite. A baixa incidência na ocasião fora atribuída à armazenagem adequada da ração, que teria evitado a presença de aflatoxina.

Sabino²¹⁹, em São Paulo, recentemente analisou 100 amostras de leite pasteurizado de 9 marcas comercializadas no estado. Essas amostras foram coletadas no período de julho de 1979 a setembro de 1981, detectando-se aflatoxina em somente uma delas. O objetivo principal desses trabalhos foi a padronização de método de análise para detecção de aflatoxina, e por isso, a amostragem não foi probabilística. Esses valores foram justificados pelo autor como sendo consequência do fato que as usinas recebem leite de diferentes procedências, havendo portanto uma mistura de leite com e sem toxina, ocasionando a diluição destas, impossibilitando a sua detecção.

Na maioria dos países a legislação sobre alimentos e rações proíbe a venda de produtos contaminados por substâncias venenosas ou nocivas. Entretanto, poucos dispõem de regulamentos, e quando os possuem são incompletos, estabelecendo os limites admissíveis de aflatoxinas nos alimentos. As legislações que abrangem o controle dessa micotoxina limitam-se na maioria das vezes, a certos produtos facilmente contamináveis, como óleos de sementes e derivados.

O F.D.A.^{80,81,259} elaborou várias especificações a respeito. Os níveis permissíveis constam da Tabela 2.

TABELA 2 - Limites de tolerância para aflatoxina estabelecidos pelo F.D.A.

Alimento	Nível ($\mu\text{g/kg}$)
Nozes brasileiras	20
Alimentos e rações	20
Leite	0,5
Amendoim e derivados	20
Nozes verdes	20

Fonte: Labuza, T.P. - Regulation of mycotoxins in foods.
J. Food Prot., 46:260-5, 1983¹⁴².

Na Tabela 3, estão reunidos os países cuja legislação apresenta regulamentação para a aflatoxina: Japão, Malásia, Polônia, Suécia, U.S.A., incluem todos os alimentos em seu controle; Canadá, Dinamarca, Itália, Malawi, Noruega, República Federal Alemã, Reino Unido e Rodésia somente incluem poucos produtos facilmente contamináveis; enquanto que a Índia estabeleceu limites de tolerância somente para produtos de exportação; a Bélgica, França e Israel apenas para rações.

A legislação brasileira⁵⁶ (Res. 34/76 da antiga CNNPA) estabeleceu para alimentos o limite de 30 $\mu\text{g/Kg}$ para as aflatoxinas calculadas pelas somas dos conteúdos das aflatoxinas B₁ e G₁; não existindo legislação específica para o leite.

TABELA 3 - Limites de tolerância para aflatoxinas em alimentos e rações.

País	µg/kg	Produto
Japão	10	todos
Malásia	0	todos
Polônia	5	todos
Suécia	5-10	todos
U.S.A.	15-20	todos
Canadá	15	amendoim e derivados
Dinamarca	5-10	amendoim e derivados
Holanda	5	amendoim e derivados
Itália	50	amendoim e derivados
Malawi	5	amendoim e derivados
Noruega	600	amendoim e derivados
Rodésia	25	amendoim e derivados
	50-400	ração
República Federal Alemã	5-10	frutos secos
Reino Unido	50	amendoim e derivados
Índia	30	amendoim e derivados (exportação)
Bélgica	50	ração
França	50	ração
Israel	20	ração

FONTE: KROGH, P. - Mycotoxin tolerances in foodstuffs. Ann. Nutr. Alim., 31: 411-4, 1977. Adaptação do original¹³⁷.

1.2 - Antibióticos

A contaminação de alimentos por substâncias empregadas nas práticas agropecuárias representa indiscutivelmente, sério problema de saúde pública, por ser uma das formas mais comuns de poluição alimentar. Entre os poluentes desta categoria, pelo largo e indiscriminado uso em medicina veterinária, situam-se os antibióticos.

A penicilina foi o primeiro antibiótico no combate da mastite. Mais tarde outros antibióticos foram empregados: estreptomicina, clorotetraciclina, oxitetraciclina, bacitracina, neomicina, subtilina e cloranfenicol^{2,19,67,121,164,165,166,172,198,251,289}. Atualmente existe no comércio um grande número de preparações com antibióticos destinados ao combate da mastite. Recentemente, foram identificados 54 produtos para aplicação intramamária contendo 20 diferentes substâncias antimicrobianas³⁰.

No Brasil os antibióticos são de venda livre, e amplamente empregados pelos criadores, o que deve provocar contaminação, principalmente do leite e das carnes de aves.

A presença nos produtos lácteos resulta, principalmente, do uso terapêutico de antibióticos em casos de mastites e nas carnes de aves por serem componentes normais das chamadas rações balanceadas^{133,266,297,309}.

No caso da mastite, por causar grande diminuição na produção leiteira, uma queda de 5 a 94%, generalizou-se o emprego de antibióticos no seu tratamento^{78,91,149,192,198}. Muitas vezes a ignorância do produtor sobre os problemas que o antibiótico pode causar, faz com que se utilize o leite dos animais em tratamento, misturando-o com aquele produzido pe

los animais sadios.

No Brasil, ao contrário de outros países, o emprego de penicilinas no tratamento de mastite não é tão intenso, pois, as espécies e as frequências dos agentes etiológicos costumam variar conforme a região, as condições de criação, etc.^{92,105,141,143,144,171}. Sua presença também é pequena nas associações de antibióticos, atualmente utilizadas em medicina veterinária. Ela é mais empregada no tratamento de infecções por via sistêmica.

Segundo Marth & Ellickson¹⁶⁶, a quantidade de antibiótico utilizada numa aplicação individual, por úbere varia de acordo com:

- 1 - a espécie de antibiótico utilizada;
- 2 - a gravidade da infecção;
- 3 - a frequência com a qual o antibiótico é administrado;
- 4 - o critério da pessoa que está administrando o antibiótico.

Após a aplicação no úbere, somente uma parte vai ser absorvida, e incorporada ao leite, a qual pode variar individualmente de vaca para vaca, estando sujeito a uma série de fatores^{2,29,35,72,75,79,100.163,180,225,279}, como:

- 1 - concentração e espécie de antibiótico utilizado;
- 2 - veículo empregado no medicamento;
- 3 - quantidade de leite excretado;
- 4 - intervalo de tempo entre o tratamento e a ordenha.

Os antibióticos administrados parenteralmente fornecem um modesto pico ($<10^{-1}$ µg/ml) de concentração no leite. Entretanto a aplicação intramamária de uma suspensão de antibióticos diretamente no quarto ou nos quartos infectados

do úbere é a via preferida para tratamento de mastites por causa da alta concentração local ($>10^{-3}$ µg/ml) que pode alcançar na glândula mamária³⁰⁴.

Os estudos realizados pelo Food and Drug Administration (FDA)² em 1953, mostraram que depois de uma aplicação intramamária com 100.000 unidades de penicilina, o nível do antibiótico na primeira e segunda ordenha foi de 8,15 µg/ml, para a quinta e sexta ordenha 0,042 µg/ml, e nada mais foi detectado nas ordenhas subsequentes; após este estudo estabeleceu-se que o leite produzido nos três dias seguintes ao tratamento (72 horas) não deve ser consumido.

Outros autores também confirmaram resultados encontrados pelo FDA, que quando uma dose moderada de penicilina é administrada haverá persistência de resíduos de antibióticos até 72 horas após o tratamento^{84,134,172,273,282}. A maior concentração de penicilina excretada ocorre nas primeiras 24 horas após o tratamento, principalmente na primeira ordenha, onde são excretados cerca de 17,6% da dose administrada¹⁹⁸. Entretanto, ao se empregar altas concentrações de penicilina resulta um longo período de eliminação, ultrapassando o tempo previsto (72 horas) pela legislação em vigor^{12,116,197,204,252,253,280}.

Em geral, a estreptomicina é encontrada no leite até 72 horas após o tratamento^{2,168,198}. A clortetraciclina e a oxitetraciclina apresentam um tempo variável de permanência podendo em casos de doses maiores persistirem até 5 dias no leite^{121,172,198}.

Os antibióticos mais utilizados no combate à mastite como clortetraciclina, cloranfenicol, estreptomicina, oxitetraciclina, neomicina e penicilina são todos termo-resistentes; as operações industriais como pasteurização, evapora

ção, secagem, etc., pouco afetam suas estabilidades^{125,233,234}. Conforme a natureza do antibiótico as diferentes frações do leite contêm maior ou menor quantidade de resíduos. Na nata, por exemplo, o cloranfenicol e a tetraciclina concentram-se em maior grau do que a penicilina e estreptomicona^{166,247,312}.

A presença de antibióticos no leite tem criado sérios problemas para a saúde pública e para a indústria de laticínios. Os riscos para a saúde associado ao consumo de produtos contaminados com antibióticos incluem:

- 1 - respostas alérgicas - A presença de penicilina no leite, pode ocasionar hipersensibilidade ao consumidor, em alguns casos até dermatite alérgica^{74,288,311};
- 2 - mudanças na função intestinal. Pode ocorrer alteração da flora intestinal do consumidor, reduzindo a síntese de vitaminas no trato intestinal^{264,265};
- 3 - desenvolvimento de bactéria patogênica resistente, devido a formação de estirpes bacterianas resistentes aos antibióticos; resistência, aliás que assume papel relevante após a comprovação de sua transferência extracromossomal para outras bactérias, em particular as entéricas, nas quais esse fenômeno é mais frequente^{265,294}.

Os antibióticos também provocam alterações nas propriedades organolépticas e tecnológicas dos produtos lácteos industrializados. Entre os principais problemas, podemos destacar:

- 1 - influência no amadurecimento natural do queijo durante a sua fabricação^{66,98,108,109,112,134,167,170,272,305};

- 2 - retardamento na produção de ácido lático e alteração no sabor dos derivados fermentados^{28,52,96,106,135,191,214};
- 3 - inibição do crescimento de culturas de "starter"^{114,123,124,186,232,236,263};
- 4 - interferência na interpretação dos resultados de alguns testes de controle de qualidade^{48,103,107,115,167}.

Possivelmente o primeiro levantamento sobre a presença de resíduos de antibióticos no leite tenha sido realizado em 1951,¹³¹ no estado de New York, U.S.A.. Foram analisadas 1794 amostras de leite fresco e pasteurizado provenientes de 36 cidades. Das amostras analisadas, 6% continham penicilina na proporção de 0,05 - 0,1 µg/ml de leite. Com o mesmo objetivo em 1954, 1955, 1956 e 1959, foram realizados levantamentos pelo FDA^{113,165,295,296}. Paralelamente às pesquisas, foi desenvolvida uma campanha educativa entre os produtores, o que resultou em decréscimo no índice de contaminação do leite.

Posteriormente, em vários países foram realizadas pesquisas sobre a incidência de antibióticos no leite. Welch²⁹⁵, no ano de 1950, em 474 amostras de leite cru e pasteurizado, provenientes de 16 estados dos U.S.A., encontrou penicilina em 11,6%. Na África do Sul, em 1959, Meara¹⁷⁴ encontrou respectivamente 5,37% e 3,09% de inibidores e de penicilina em 1.229 amostras de leite analisadas. Kosikowski¹³², no estado de New York (U.S.A.) durante o período de novembro de 1959 a março de 1960, encontrou proporção elevada de antibiótico no leite. Aproximadamente 10.000 amostras de leite provenientes de 4.000 produtores foram analisadas. Concomitantemen

te foi conduzido um programa educativo junto aos produtores, que resultou numa queda da incidência de 6,5% para 0,45%. O'Reilley¹⁹³ em 1970, pesquisando 1.765 amostras de leite cru e 174 amostras de leite pasteurizado na cidade de Dublin (Irlanda), constatou a presença de inibidores em índices de 8,2% e 5,7% respectivamente. A presença de penicilina foi verificada em 5,8% e 4,6% das amostras analisadas. Cook e colaboradores⁶⁰, em 1976, encontraram 3,2% de penicilina em 366 amostras de leite pasteurizado, comercializado na cidade de Johannesburg (África do Sul). Na Espanha, no ano de 1977, Polo Lara²⁰⁰, em 1.000 amostras de leite cru, encontrou 1,19% com penicilina e 9,3% com kanamicina.

No Brasil, na cidade de Belo Horizonte, em 1963, Reis e colaboradores²¹², abordaram o problema de antibióticos no leite. Em um total de 2.079 amostras de leite cru examinadas, foram encontrados 1,44% positivas para penicilina e 0,58% positivas para substâncias inibidoras indeterminadas.

Em 1960, Mello Filho e colaboradores¹⁷⁸ encontraram penicilina em 1,9% em 1.000 amostras analisadas de leite tipo "C" comercializado em São Paulo.

Em Niterói, em 1976, Tavares de Macedo e colaboradores¹⁶¹ em 136 amostras de leite cru detectaram 5,8% com resíduos de antibióticos.

Meller e colaboradores¹⁷⁵, em 1974, em Santa Maria (RS) constataram a presença de penicilina em 1% das 100 amostras de leite cru analisadas.

Em 1978, em Belo Horizonte, Fagundes e colaboradores⁷⁶, verificaram que a prevalência de antibióticos no leite tipo "B" foi de 5,49%, enquanto no leite tipo "C", foi de 1,25%.

A maior incidência de antibióticos no leite tipo

"B" parece estar relacionada com as condições de criação e tratamento do gado. A estabulação e a utilização da ordenha mecânica são fatores preponderantes para a formação de mastite⁵¹. O ambiente estando contaminado, e as vias de transmissão são presentes, facilmente haverá infecção do úbere, teta e mama^{64,213,216}.

As principais fontes de infecções costumam ser:

- a) vacas doentes^{47,51}
- b) teta suja internamente e externamente²⁷
- c) tratador⁶¹
- d) corpos estranhos²⁷
- e) fezes e palha^{33,141}
- f) vacas doentes provocam diarreia nos bezerros, aumentando a contaminação do estábulo^{47,51}
- g) serragem para cama²¹³

Segundo regulamento do F.D.A. de 1953, a presença de resíduos de antibióticos no leite e seus derivados constitui adulteração.

No Brasil, somente a partir de 1980, surgiu uma legislação para o leite¹⁸¹, permitindo sua comercialização somente após 72 horas, a partir da última aplicação de antibióticos, independentemente da via de inoculação. Entretanto, não se tomou nenhuma medida quanto à fiscalização junto ao produtor, tendo em vista a constatação da aplicação da lei.

1.3 - Água Oxigenada, Cloro e Formol

A Organização Mundial de Saúde (OMS) tem repetidamente feito recomendações, estabelecendo normas de utilização

de aditivos em geral e sugerindo medidas práticas, aos governos e autoridades competentes, a serem adotadas na tecnologia alimentar e na prática da medicina veterinária.

Há longos anos a técnica industrial vem estudando a possibilidade da obtenção do meio conservante ideal e capaz, pelo seu emprego, de suprimir operações onerosas e especializadas.

Entretanto, a maioria dos conservantes químicos e bioquímicos tem-se mostrado tóxico ou sensibilizante para o consumidor e de ação conservante limitada. No caso do leite tais aditivos alteram muitas vezes as suas propriedades organolépticas e sua composição, podendo prejudicar também a industrialização dos seus sub-produtos fermentados. Fato grave a salientar é que tais aditivos não destroem as toxinas bacterianas e certos tipos de microrganismos patogênicos¹⁷⁷.

Os conservantes no leite se distribuem em duas categorias principais: os que agem como neutralizantes e os que agem como antissépticos. Os neutralizantes atuam sobre o ácido láctico derivado da bioatividade das bactérias sobre a lactose, não reduzindo a flora microbiana, mas apenas evitando a coagulação do leite. Os conservantes antissépticos geralmente mostram relativo grau de toxidez, modificam profundamente as propriedades do leite. Entre os antissépticos, os mais conhecidos estão o formol, o cloro e a água oxigenada, todos proibidos por lei.

O formol, na concentração de 1/1.000 ou 1/2.000, produz nas primeiras 24 horas, um rápido decréscimo da flora bacteriana; após esse período ocorre uma lenta mas constante diminuição desta e, no fim de 5 dias, o leite estará estéril. Na proporção de 1/20.000 o formol conserva o leite duas ou três vezes melhor que o mesmo sem tratamento algum, e na con

centração de 1/5.000 ou 1/10.000 é realmente um bom conservante se não fosse o prejuízo que traz para a digestibilidade do produto devido a insolubilidade que provoca na caseína¹⁷⁷.

Quanto ao cloro, amplamente utilizado no saneamento da água de consumo nas cidades, no leite o seu índice de aproveitamento mostrou ser muito baixo, devido as grandes alterações que produz no gosto e aroma do produto, mesmo em concentrações de 50 a 100 p.p.m.; sabe-se que em concentrações menores a sua ação bacteriana no leite é bem pequena¹⁷⁷.

Algumas vezes o formol e o cloro, presentes no leite, podem ser remanescentes da higienização dos equipamentos e utensílios utilizados na produção e beneficiamento.

Entretanto, na fabricação dos derivados fermentados como iogurte, coalhada e outros, as substâncias inibidoras inclusive a água oxigenada, interferem nas suas qualidades organolépticas.

O peróxido de hidrogênio, amplamente conhecido em nosso país, pela maioria dos produtores de leite, como conservante efetivo sob o nome de água oxigenada, foi empregado desde os fins do século passado por Budder¹⁷⁷, na Alemanha, no processo conhecido como Budderização do leite.

A redução microbiana obtida no uso da H_2O_2 é da ordem de 50% ou mais, com ligeiro acréscimo de um sabor metálico ou maltado ao produto. O desaparecimento espontâneo do conservante decomposto pelas diastases libera oxigênio nascente¹⁷⁹.

A água oxigenada altera consideravelmente o teor em vitamina C, destruindo cerca de 70 a 90% de sua quantidade no leite, fato nocivo mesmo em se tratando de um alimento que não é fonte significativa desta vitamina. Afeta a vi

tamina B₁ e não há estudos conclusivos em relação à ação que provoca sobre as vitaminas lipossolúveis¹⁷⁶.

Ressalte-se, também, entre outros inconvenientes, que o emprego de água oxigenada como conservante em laticínios, se aplicado sistematicamente, poderá incitar os produtores a abandonar os esforços para melhorar as condições higiênicas de obtenção de tratamento e transporte do produto. Talvez por esse motivo não seja permitido o seu emprego, apesar de vários autores defenderem o seu uso como conservante para o leite, nos países de clima quente e tecnicamente pouco desenvolvidos, sem condições de transporte rápido, e capacidade de resfriamento eficaz^{54,55,158,159,274}.

Mello Filho e colaboradores^{178,179}, em 1966 e 1968 constataram, no leite "tipo C" e no leite em pó consumidos na cidade de São Paulo a presença de 9% e de 3,5% de inibidores. Os mesmos autores¹⁷⁷, em 1969, detectaram a presença de inibidores bacterianos, respectivamente, no nível de 8% e de 11%, nas amostras analisadas de leite tipo "C" e "B".

Recentemente, em 1981, Barros & Perches²², encontraram uma alta porcentagem de inibidores no leite distribuído ao consumo da Grande São Paulo, no produto recebido em latões nas plataformas dos postos de resfriamento e usinas de beneficiamento, e naquele resfriado e transportado nos carros tanques e no pasteurizado constataram, respectivamente, 1,50%, 21,25% e 21,87% de inibidores.

No Brasil, embora não especifique nomes de conservadores e inibidores, a Secretaria de Inspeção de Produtos Animais, proíbe a presença destes no leite destinado à alimentação humana, podendo somente ser utilizado na fabricação de sabão ou caseína industrial^{62,182}.

O Comitê Misto da Organização das Nações Unidas ,

para a Alimentação e a Agricultura e da Organização Mundial da Saúde, discutiu a utilização de água oxigenada para conservação do leite, admite o seu emprego somente em casos de situações adversas, como a falta de instalações de refrigeração para manter a qualidade do leite cru⁵⁸.

Do ponto de vista de saúde pública, o problema dos resíduos no leite, quer a origem destes seja um medicamento veterinário, um aditivo ou um contaminante administrado diretamente ao animal ou via alimentação (deliberadamente ou por contaminação das matérias primas), requer estudos tendo em vista o fornecimento de subsídios quer seja para o aperfeiçoamento da legislação sobre o assunto, quer seja para adoção de medidas preventivas e de fiscalização.

O estudo global dos resíduos de aditivos e de substâncias medicamentosas utilizadas em animais domésticos, abrange múltiplos aspectos, o que torna necessário estudos sobre suas implicações e riscos potenciais para a saúde pública²⁹². Por exemplo, a administração de uma determinada droga pode levar a formação de diferentes tipos de resíduos que as vezes se diferenciam por sua estrutura química e/ou por suas propriedades farmacológicas, fixando-se nos tecidos dos animais tratados²⁹¹. Nestes, a toxicidade poderá ser mantida, modificada ou aumentada em relação ao princípio ativo original. Por exemplo, um resíduo correspondente a uma entidade química definida, pode se transformar no organismo animal em várias formas (livre, ligada as proteínas, etc.) que poderão ter diferentes biodisponibilidades e toxicidades para o consumidor que os ingere⁷⁷. Alguns desses resíduos são dificilmente detectáveis mesmo com os métodos analíticos mais aperfeiçoados.

A legislação brasileira tendo em vista o controle de qualidade do leite estabeleceu normas relativas à adulte-

ração e a contaminação microbiológica. O controle implica na determinação de padrões higiênicos sanitários. Os primeiros testes são executados logo na recepção onde se detectam as adulterações, que possam alterar as propriedades organolêpticas. Posteriormente analisa-se a carga bacteriana em virtude da possibilidade do leite difundir patogênicos do rebanho, ou do meio ambiente para o homem.

Entretanto, a legislação é incompleta quanto a detecção da presença dos contaminantes citados quer seja junto ao produtor, quer seja junto às indústrias.

Os resultados de outros países e os estudos precários existentes entre nós, motivou o presente trabalho, que procurou mostrar por meio de uma amostragem probabilística, o risco pelo consumo desses contaminantes por populações do Estado de São Paulo.

2 - OBJETIVO

Com base nos fatos verificados no capítulo anterior, o presente trabalho tem como objetivo:

- a - análise das condições do leite tipo "B" comercializado em São Paulo, em relação à presença de aflatoxina;
- b - detecção da presença de outros contaminantes, como antibióticos, água oxigenada, formol e cloro.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Amostragem

As amostras de leite tipo "B" utilizadas na presente pesquisa foram provenientes das quatro marcas de maior consumo pela população de São Paulo.

O trabalho constituiu-se em um estudo longitudinal dividido em dois períodos iguais de 140 dias. No primeiro período, de 14 de junho a 31 de outubro de 1982, foram pesquisados todos os contaminantes propostos. Como a aflatoxina sofre influência sazonal, por isso era maior a possibilidade de ser encontrada nos meses de temperaturas mais baixas, no segundo período, de 01 de novembro de 1982 a 30 de março de 1983, esta não foi pesquisada.

Em cada período de 140 dias, houve 20 segundas-feiras, 20 terças-feiras, etc., de tal forma que cada dia da semana foi repetido 20 vezes (Figura 1 e 2).

A unidade amostral foi o conglomerado constituído pela totalidade dos sacos de leite produzido em um dia, em cada usina. Cada saco de leite foi representativo da produção diária por ser o leite homogeneizado antes de seu envasamento. Assim, cada usina apresentou 140 conglomerados neste período; as 4 usinas formaram 560 conglomerados que correspondem ao universo da pesquisa.

FIGURA 1 - Plano de amostragem - Relação dos dias correspondentes ao 1º período.

Mês	Ordem da Semana	2a. feira	3a. feira	4a. feira	5a. feira	6a. feira	Sábado	Domingo
Junho	1	14	15	16	17	18	19	20
	2	21	22	23	24	25	26	27
	3	28	29	30				
Julho					1	2	3	4
	4	5	6	7	8	9	10	11
	5	12	13	14	15	16	17	18
	6	19	20	21	22	23	24	25
Agosto	7	26	27	28	29	30	31	
								1
	8	2	3	4	5	6	7	8
	9	9	10	11	12	13	14	15
	10	16	17	18	19	20	21	22
Setembro	11	23	24	25	26	27	28	29
	12	30	31					
Outubro				1	2	3	4	5
	13	6	7	8	9	10	11	12
	14	13	14	15	16	17	18	19
	15	20	21	22	23	24	25	26
Outubro	16	27	28	29	30			
						1	2	3
	17	4	5	6	7	8	9	10
Outubro	18	11	12	13	14	15	16	17
	19	18	19	20	21	22	23	24
	20	25	26	27	28	29	30	31

FIGURA 2 - Plano de amostragem - Relação dos dias correspondentes ao 2º período.

Mês	Ordem da Semana	2a. feira	3a. feira	4a. feira	5a. feira	6a. feira	Sábado	Domingo
Novembro	1	1	2	3	4	5	6	7
	2	8	9	10	11	12	13	14
	3	15	16	17	18	19	20	21
	4	22	23	24	25	26	27	28
	5	29	30					
Dezembro				1	2	3	4	5
	6	6	7	8	9	10	11	12
	7	13	14	15	16	17	18	19
	8	20	21	22	23	24	25	26
	9	27	28	29	30	31		
Janeiro							1	2
	10	3	4	5	6	7	8	9
	11	10	11	12	13	14	15	16
	12	17	18	19	20	21	22	23
	13	24	25	26	27	28	29	30
Fevereiro	14	31						
			1	2	3	4	5	6
	15	7	8	9	10	11	12	13
	16	14	15	16	17	18	19	20
	17	21	22	23	24	25	26	27
Março	18	28						
			1	2	3	4	5	6
	19	7	8	9	10	11	12	13
	20	14	15	16	17	18	19	20

Pretendeu-se que todas as usinas ficassem representadas nos 7 dias da semana, por isso, adotou-se além do critério "usina" o "dia da semana". Desta forma, os 560 conglomerados foram estratificados de acordo com esses dois critérios, em 28 estratos.

- Processo de amostragem

Utilizou-se amostragem sistemática com intervalo de 2,5 obtendo-se alíquotas de tamanho 8, para cada dia da semana (Figura nº 3).

- Sorteio dos dias

Nos 140 dias de pesquisa tem-se 20 segundas-feiras, 20 terças-feiras, etc. Das 5 possíveis amostras que se pode obter, do estrato correspondente às segundas-feiras sortearam-se 4, aplicando-se o intervalo de 2,5; cada uma delas correspondeu por sorteio a uma das 4 usinas.

Desta forma, para cada usina selecionou-se uma amostra de 8 segundas-feiras sem que houvesse coincidência com as demais amostras e permitindo, também, devido as condições de recurso do trabalho, que no máximo duas usinas fossem sorteadas para cada segunda-feira.

Procedeu-se analogamente em relação aos demais dias da semana.

Esta forma de sorteio permitiu que todos os dias da semana ficassem representados para as 4 usinas (8 para cada uma delas) bem espaçadas ao longo dos 140 dias, compreendendo 56 amostras para cada usina, totalizando 224 ao todo em cada período da pesquisa.

FIGURA 3 - Plano para sorteio das possíveis amostras sistemáticas de cada estrato

Ordem da Semana	A	B	C	D	E
1	1			1	
2		2			2
3	3		3		
4		4		4	
5			5		5
6	6			6	
7		7			7
8	8		8		
9		9		9	
10			10		10
11	11			11	
12		12			12
13	13		13		
14		14		14	
15			15		15
16	16			16	
17		17			17
18	18		18		
19		19		19	
20			20		20

3.2 - Determinação de Aflatoxina

Na determinação de aflatoxina seguiu-se o método desenvolvido por Della Rosa⁶³. Somente na quantificação empregou-se a técnica proposta por Tuinstra²⁷⁷.

- Separação, extração e purificação

Em 100 ml de leite colocados em erlenmeyer de 500 ml adicionaram-se 10 g de Kieselguhr e 300 ml de acetona. Após a agitação de 3 minutos, filtrou-se através de papel de filtro para um bequer de 1 litro (filtrado I).

O erlenmeyer e o papel de filtro foram lavados com 250 ml de água, que foi recolhida para o mesmo bequer do filtrado I.

Ao filtrado I foram adicionados 25 ml de solução de acetato de chumbo e agitou-se por 1 minuto. Após repouso de 5 minutos acrescentaram-se 12,5 ml de solução saturada de sulfato de sódio, 12,5 g de Kieselguhr. Após agitação de 1 minuto, filtrou-se através de papel de filtro adaptado em um funil de separação de 1 litro (filtrado II).

Ao filtrado II foram adicionados 180 ml de hexano submetendo-se a uma agitação vigorosa de 1 minuto. Após repouso, a fase aquosa foi drenada para um bequer de 1 litro e o hexano retirado do funil de separação pela parte superior, foi desprezado.

A fase aquosa foi recolocada no funil de separação, juntando-se a ela 90 ml de solução de cloreto de sódio a 5%.

Em seguida procederam-se duas extrações com 180 ml

e 90 ml de clorofórmio, sendo a fase aquosa desprezada e os extratos clorofórmicos transferidos para o funil de separação. Adicionaram-se então, 180 ml de solução de cloreto de sódio a 5% e agitou-se vigorosamente por 1 minuto.

Após a separação das fases o clorofórmio foi drenado através de uma coluna de vidro com placa porosa e sem torneira, contendo 45 g de sulfato de sódio anidro para um balão de 500 ml. Lavou-se o bequer e a coluna de vidro com 40 ml de clorofórmio.

O solvente, sob atmosfera de nitrogênio, foi evaporado até à secura. Em seguida foi diluído novamente com clorofórmio e transferido para um balão de 100 ml e evaporado até à secura, mantendo-se a atmosfera de nitrogênio.

- Identificação e quantificação

O resíduo obtido na extração foi dissolvido com 100 μ l de clorofórmio. Agitou-se durante 1 minuto, e 20 μ l dessa solução foi aplicado em cromatoplaça (sílica Gel G 60, sem indicador de fluorescência) no ponto A (Figura nº 4). Foram aplicados na mesma cromatoplaça nos pontos, B, C, D, E, F e G (Figura 4) volumes da solução do padrão de aflatoxina M_1 (0,1 μ g/ml) respectivamente, correspondentes às quantidades de 0,2 ng; 0,5 ng; 1 ng; 2 ng; 1 ng e 1 ng.

A placa foi desenvolvida inicialmente em cuba equilibrada, completamente vedada à luz, utilizando-se um sistema de solventes formado por éter dietílico:metanol: água (94:4,5:1,5). Após o desenvolvimento desse solvente, a placa foi colocada em estufa a 60°C para evaporação do mesmo. Submeteu-se a cromatografia a um segundo sistema de solventes for

FIGURA 4 - Esquema do cromatograma bidimensional

mado por clorofórmio: acetona: metanol (90:10:2), em cuba vedada à luz, não equilibrada. Após desenvolvimento do solvente a placa foi colocada em estufa a 60°C. Depois de evaporado o solvente, a aflatoxina foi identificada e quantificada por comparação visual com o padrão sob luz UV (gabinete de luz ultravioleta Chromatovue) de longo comprimento de onda (366 nm).

3.3 - Detecção de antibióticos

Utilizou-se a dosagem microbiana para a detecção dos antibióticos, empregando-se o método de difusão em placas e os microrganismos Sarcina Lutea ATCC 9341²⁵⁶.

- Preparação das placas

Em placas esterilizadas foram colocados 10 ml do meio base, Penicillin Assay Base Agar esterilizado, quente. Após a solidificação desse meio, distribuiu-se em cada placa, 4 ml do meio de cultura de superfície, Penicillin Assay Sedd Agar, devidamente inoculado com Sarcina lutea.

- Preparação da solução padrão

As diluições para a obtenção da solução padrão foram feitas em solução tampão (pH 6). A última das diluições, na qual se obteve uma concentração de penicilina de 0,05 unid/ml,

foi feita com uma mistura da solução tampão pH 6 e de leite isento de antibiótico na proporção de 9:1.

- Exame da amostra

Todas as amostras de leite foram submetidas previamente a aquecimento de 80°C durante 5 minutos.

Usaram-se três placas para cada teste, sendo examinadas duas amostras por placa. Nas placas, utilizando-se um template colocou-se 0,2 ml da solução padrão e 0,2 ml de cada amostra a ser analisada. Incubou-se de 16 a 18 horas a $30 (\pm 1)^{\circ}\text{C}$. Depois da incubação mediu-se o diâmetro das zonas de inibição.

- Confirmação da presença de penicilina

Para identificar a atividade da penicilina, adicionou-se penicilinase concentrada na razão de 0,5 ml para 10 ml da amostra. Misturou-se e incubou-se por 30 minutos a 37°C . Usaram-se três placas para cada amostra. Em cada uma das três placas, colocaram-se 0,2 ml da solução padrão de 0,05 unid/ml, 0,2 ml da amostra não tratadas, e 0,2 ml da amostra tratada com penicilinase. Incubou-se por 16-18 horas por $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Mediu-se o diâmetro de cada zona de inibição, calculou-se a média das leituras do padrão, da amostra não tratada e da amostra tratada.

- Interpretação

Uma zona de inibição na amostra não tratada e a ausência de inibição na amostra tratada com penicilinase é considerado um teste positivo para penicilina. Se a média das leituras das zonas de inibição das amostras tratadas com penicilinase tiver o mesmo diâmetro das leituras produzidas pelas amostras não tratadas, considera-se que não há presença de penicilina. Se a média da zona de inibição produzida pela amostra tratada for menor em pelo menos, 0,1 mm que a média da zona de inibição produzida pela amostra não tratada, considera-se que há a presença de penicilina e de outro inibidor não específico.

3.4 - Identificação da água oxigenada

O método seguido foi o da reação com solução de óxido de vanádio^{110,290}.

Colocaram-se 10 ml da amostra em um tubo de ensaio. Adicionaram-se 15 gotas da solução de óxido de vanádio e agitou-se. Na presença de água oxigenada, aparece uma coloração rósea ou vermelha.

3.5 - Identificação do formol

Utilizou-se nesta identificação a reação com solução de fluoroglucina¹¹².

Colocaram-se 15 ml da amostra em um tubo de ensaio. Adicionaram-se 1 ml da solução de fluroglucina a 1% e 2 ml da solução de hidróxido de sódio a 10% e agitou-se. Na presença de formol aparece uma coloração salmão.

3.6 - Identificação do Cloro (hipoclorito)

A identificação foi feita por meio da reação com solução de iodeto de potássio¹⁹⁰.

Colocaram-se 5 ml da amostra em um tubo de ensaio. Adicionaram-se 1,5 ml da solução de iodeto de potássio e agitou-se. Na presença de cloro, aparece uma coloração amarela ou marrom clara.

4 - RESULTADOS

A aflatoxina, embora em baixos níveis e em pequena proporção (1,8%), fez-se presente nas quatro marcas, como indica a Tabela 4.

Foi constatada alta prevalência de inibidores bacterianos, nos dois períodos de trabalho. No primeiro e no segundo períodos a proporção foi de 4,95% e 4,50% respectivamente, conforme as Tabelas 5 e 6. Como pode-se verificar, houve uma distribuição relativamente uniforme dos inibidores bacterianos nas quatro marcas examinadas; as marcas A, B e C com 5,40% e a marca D com 3,60%, no primeiro período; as marcas A e B, com 3,60% e as marcas C e D com 5,40%, no segundo período. Nas tabelas seguintes podemos verificar separadamente a presença destes inibidores.

Os resultados referentes à pesquisa de penicilina podem ser vistos nas Tabelas 7 e 8. No primeiro período as marcas A e D apresentaram resíduos (1,8%) e no segundo a marca B (1,8%).

Os inibidores não identificados estão expressos nas Tabelas 9 e 10. Como pode-se constatar foi alta a incidência destes no decorrer do estudo. As marcas A e C apresentaram resultados positivos em 3,6% das amostras, a marca B em 5,40% e a marca D em 1,80%, no primeiro período; as mar-

cas A, B e C em 3,60% e a marca B em 1,80%, no segundo período.

A presença de água oxigenada, formol e cloro pode ser observada nas Tabelas 11 e 12. Houve uma baixa proporção de água oxigenada e formol e ausência de cloro. A partir dessa constatação, pode-se concluir que os inibidores não identificados presentes no leite, provavelmente serão outros antibióticos que não a penicilina. A possibilidade de serem inibidores bacterianos naturais do leite é descartada devido aos cuidados tomados na parte experimental (aquecimento a 80°C). Existe, obviamente, a possibilidade da presença de outras substâncias desconhecidas, que poderão atuar também como inibidores bacterianos. Entretanto, o fato de que há um uso abusivo e amplamente disseminado de antibióticos por parte dos pecuaristas no nosso meio, torna mais plausível a hipótese de serem resíduos de antibióticos.

TABELA 4 - Incidência de aflatoxina nas amostras de leite correspondente as quatro marcas de maior consumo analisadas no 1º período (14.06.82 - 31.10.82).

Marca	Total de amostras analisadas	nº de amostras positivas	µg/l	%
A	56	1	0,025	1,80
B	56	1	0,025	1,80
C	56	1	Traços	1,80
D	56	1	Traços	1,80
Total	224	4		1,80

TABELA 5 - Incidência de inibidores bacterianos nas amostras de leite correspondente as quatro marcas de maior consumo analisada no 1º período (14.06.82 - 31.10.82)

Marca	Total de amostras analisadas	nº de amostras positivas	%
A	56	3	5,40
B	56	3	5,40
C	56	3	5,40
D	56	2	3,60
Total	224	11	4,95

TABELA 6 - Incidência de inibidores bacterianos nas amostras de leite correspondente as quatro marcas de maior consumo analisadas no 2º período (01.11.82 - 20.03.83).

Marca	Total de amostras analisadas	nº de amostras positivas	%
A	56	2	3,60
B	56	2	3,60
C	56	3	5,40
D	56	3	5,40
Total	224	10	4,50

TABELA 7 - Incidência de penicilina nas amostras de leite correspondente as quatro marcas de maior consumo analisadas no 1º período (14.06.82 - 31.10.82).

Marca	Total de amostras analisadas	nº de amostras positivas	%
A	56	1	1,8
B	56	—	—
C	56	—	—
D	56	1	1,8
Total	224	2	0,9

TABELA 8 - Incidência de penicilina nas amostras de leite correspondente as quatro marcas de maior consumo analisadas no 2º período (01.11.82 - 20.03.83).

Marca	Total de amostras analisadas	nº de amostras positivas	%
A	56	—	—
B	56	1	1,80
C	56	—	—
D	56	—	—
Total	224	1	0,45

TABELA 9 - Incidência de inibidores não identificados nas amostras de leite correspondente as quatro marcas de maior consumo analisadas no 1º período (14.06.82 - 31.10.82)

Marca	Total de amostras analisadas	nº de amostras positivas	%
A	56	2	3,60
B	56	3	5,40
C	56	2	3,60
D	56	1	1,80
Total	224	8	3,60

TABELA 10 - Incidência de inibidores não identificados nas amostras de leite correspondente as quatro marcas de maior consumo analisadas no 2º período (01.11.82 - 20.03.83).

Marca	Total de amostras analisadas	nº de amostras positivas	%
A	56	2	3,60
B	56	1	1,80
C	56	2	3,60
D	56	2	3,60
Total	224	7	3,15

TABELA 11 - Incidência de água oxigenada, formol e hipoclorito nas amostras de leite correspondente as quatro marcas de maior consumo analisadas no 1º período (14.06.82 - 31.10.82).

Marcas	Total de amostras analisadas	Água oxigenada		Formol		Hipoclorito	
		nº de amostras positivas	%	nº de amostras positivas	%	nº de amostras positivas	%
A	56	—	—	—	—	—	—
B	56	—	—	—	—	—	—
C	56	1	1,8	—	—	—	—
D	56	—	—	—	—	—	—
Total	224	1	0,45	—	—	—	—

TABELA 12 - Incidência de água oxigenada, formol e hipoclorito nas amostras de leite correspondente as quatro marcas de maior consumo analisadas no 2º período (01.11.82 - 20.03.83).

Marcas	Total de amostras analisadas	Água oxigenada		Formol		Hipoclorito	
		nº de amostras positivas	%	nº de amostras positivas	%	nº de amostras positivas	%
A	56	—	—	—	—	—	—
B	56	—	—	—	—	—	—
C	56	—	—	1	1,8	—	—
D	56	1	1,8	—	—	—	—
Total	224	1	0,45	1	0,45	—	—

5 - DISCUSSÃO

Como já foi referido, as análises de aflatoxina M_1 no leite, foram efetuadas no período de 14 de junho a 31 de outubro de 1982, meses onde predominam temperaturas mais baixas. Também, por ser período de entressafra, geralmente o consumo de ração pelas vacas é bem mais elevado e, como há uma relação direta entre a ingestão de aflatoxina B_1 e a incidência de aflatoxina M_1 no leite, seria maior a probabilidade de ser encontrada.

A pequena proporção e os baixos níveis estão apresentados na Tabela 4. Nas quatro amostras as concentrações foram inferiores aos limites fixados pelo FDA ou seja 0,5 µg/kg. Entretanto, convém ressaltar que, especificamente, no ano em questão o inverno foi ameno não prejudicando as pastagens, ocorrendo conseqüentemente menor consumo de ração. Por outro lado, o fato de se ter encontrado amostras positivas constituiu-se uma alerta à saúde pública, quanto a necessidade de se estabelecer uma legislação específica sobre a presença deste contaminante no leite, paralelamente com uma ação educativa ao produtor.

Os estudos de Pozzobon²⁰² e Sabino²¹⁹ também mostraram pequena incidência de aflatoxina nas amostras de leite analisadas.

Entretanto, os resultados obtidos diferem dos encontrados em diversos países, onde a incidência e os níveis

de aflatoxina foram sempre mais elevados^{23,24,50,86,207,211,271,285}. Esta diferença foi atribuída a alimentação e as condições de armazenamento.

A qualidade e a procedência da ração é um fator importante na contaminação dos produtos leiteiros. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), para combater as micotoxinas há necessidade de se prevenir e de se reduzir a níveis inócuos a contaminação dos alimentos e das rações. Para tanto, o fundamental é estabelecer métodos adequados de colheita, tratamento, armazenamento, transporte e distribuição, a fim de impedir a formação desses contaminantes. Torna-se necessário manter uma vigilância contínua dos produtos de elevado risco, destinados à alimentação humana e animal.

No Brasil, as condições de fabricação e armazenamento de rações parecem não favorecer a formação e proliferação de micotoxinas. Além disso as condições climáticas por não serem muito rigorosas, torna desnecessário o armazenamento de grandes quantidades de rações.

Nos países onde foram realizadas pesquisas sobre a presença de aflatoxina no leite e derivados, as condições de armazenamento e fabricação são totalmente diversas às do Brasil. Nesses países, muitas vezes os ingredientes destinados à produção de rações são importados aumentando o risco de contaminação, em virtude das condições de armazenamento e de transporte.

A baixa incidência e a baixa concentração de aflatoxina M_1 poderia ter ocorrido pelo fato de que o leite tipo "B" tenha sido homogeneizado, misturando-se com o de várias procedências. Desta maneira, a mistura de produto com e sem aflatoxina levaria à diluição destas e à consequente dificuldade de detecção.

Entretanto, a constatação de aflatoxina no leite, embora em baixos teores, indica que está havendo ingestão de ração com *Aspergillus*. A magnitude pode ter sido pequena no momento da pesquisa, o que não dá segurança sobre o que possa ocorrer futuramente. Além disso, Sabino²¹⁸ constatou que alimentos e rações do Estado de São Paulo e de outras regiões do Brasil no período de 1971 a 1979, estavam contaminadas com aflatoxinas B₁, em limites que variaram de 50 a 7.800 µg/kg, superiores aos valores tolerados pela legislação brasileira (30 µg/kg). Por isso, não será exagero enfatizar a necessidade de uma vigilância constante pelas autoridades sanitárias, quanto à presença de aflatoxinas B₁ em alimentos e rações animais comercializadas.

Quanto aos inibidores bacterianos, a literatura tem mostrado que a presença destes no leite tem sido um problema mundial, embora ocorra variações nas proporções de contaminação de país para país^{60,113,131,132,193,200}. Nas pesquisas realizadas no Brasil também foram constatados diferentes valores de incidência, todos superiores aos deste trabalho, como mostram os estudos de Mello Filho^{177,178,179}, Reis²¹², Meller¹⁷⁵, Tavares de Macedo¹⁶¹, Fagundes⁷⁶ e Barros & Perches²².

Os problemas já referidos decorrentes da estabulação e da ordenha mecânica, aliados à preocupação do produtor em ter maiores cuidados com o gado, em virtude do investimento realizado, acentua o uso indiscriminado de antibióticos, sem se ter o cuidado de desprezar o leite das vacas doentes nas 72 horas subsequentes ao tratamento, contrariando assim a legislação em vigor.

Pelo que podemos ver, no primeiro período houve maior incidência de penicilina (Tabela 7) do que no segundo (Ta

bela 8). Esta pequena diferença pode ser atribuída ao acaso não havendo diferenças no tratamento e condições de criação de gado entre os meses frios e quentes. Nos países europeus a incidência é maior no inverno do que no verão, aumentando a tendência de contaminação durante o período de parição, quando o gado é mantido mais estabulado. Nestes países e mesmo nos U.S.A., a penicilina ainda é um dos antibióticos mais utilizados.

Na identificação de antibióticos, concentramos nossa atenção nos resíduos de penicilina, em virtude dos acidentes alérgicos observados nos consumidores de leite e dos problemas que acarretam à indústria de laticínios. O resíduo "peniciloila", surge no leite logo após a administração de penicilina por via intramamária. Inicialmente o teor é muito inferior ao dos resíduos de penicilina livre; três a quatro dias após o tratamento, não há mais detecção de traços de "peniciloila". O tempo de transporte, de comercialização e os processos industriais não provocam diminuição destes resíduos. Análises feitas após tratamento térmico no lugar de constatar diminuição do teor de resíduo de "peniciloila" como poderia se esperar, demonstraram o contrário; o efeito do calor ocasiona aumento do teor. Esse aumento ocorre pelo fato de que uma parte da penicilina livre é transformada sob a ação do calor em grupamentos "peniciloila" que se conjugam as proteínas do leite.

A prevalência de inibidores não identificados (Tabelas 9 e 10) foi bastante significativa nos dois períodos, com 3,57% e 3,21% de positividade. Embora estes inibidores não tenham sido identificados, seguramente não correspondiam à presença de formol, de água oxigenada e de cloro cujas identificações foram feitas. Este fato sugere que sejam resí-

duos de antibióticos, pelo uso indiscriminado entre os produtores sem nenhum critério e fiscalização. O cloranfenicol, por exemplo é normalmente utilizado no Brasil sem nenhuma restrição, embora o Food and Drug Administration (F.D.A.), e a Organização Mundial da Saúde (O.M.S.) já o tenham proibido nos produtos de origem animal e não deve ser empregado para nenhum fim que possa dar lugar à presença de alimentos.

A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (F.A.O.) e a Organização Mundial da Saúde (O.M.S.)⁵⁹ estabeleceram normas para a utilização de antibióticos em alimentos somente como aditivos intencionais. Permitem seu emprego como aditivos diretos de alimentos cujo uso terapêutico não seja de grande importância e que não ocasionem resistência cruzada ou não prejudiquem de nenhuma outra forma o emprego terapêutico de outros antibióticos em medicina humana ou veterinária.

Os resultados encontrados no presente estudo quanto à incidência de antibióticos no leite evidenciam que no ano em questão, milhares de pessoas do nosso estado o consumiram involuntariamente, com todos os danos que seu consumo pode ocasionar. Desnecessário se torna enfatizar a necessidade urgente de uma ampla ação educativa junto ao produtor e à população, seguida de uma fiscalização rigorosa das várias etapas da trajetória do produto desde o animal até o consumidor.

A incidência de água oxigenada foi pequena (Tabelas 11 e 12).

Sua presença no leite tem sido defendida por vários autores. Este assunto é constantemente abordado pela F.A.O e pela O.M.S., que estabeleceram critérios para o seu uso, quando por motivos técnicos ou econômicos não permitem

utilizar instalações de refrigeração para manter a qualidade do leite cru. Entretanto, essas organizações chamam a atenção para o fato de que o emprego desse processo em laticínios pode se tornar sistemático e incentivar os produtores a abandonarem todas as condições higiênicas de obtenção e de transporte do leite.

Muitas vezes, além dos conservantes antissépticos são identificados no leite outras substâncias, geralmente de correntes da higienização do vasilhame e do equipamento empregados na indústria de laticínios, capazes de agir como inibidores do crescimento bacteriano, mesmo em concentrações de 10 a 30 p.p.m. É o caso do formol e do cloro que apesar de apresentarem ação bactericida, não são indicados para uso em alimentos, porque produzem alterações na digestibilidade, gosto e aroma. Nas amostras analisadas houve baixa positividade para o formol e ausência de cloro (Tabelas 10 e 11).

Apesar da Legislação Brasileira ter abordado tardiamente o problema dos conservantes e inibidores, atualmente o leite beneficiado que apresentar esses contaminantes será considerado inadequado para a alimentação humana, podendo ser utilizado na fabricação industrial de sabão ou caseína; a legislação estabelece também que antes do empacotamento do produto, deverão ser efetuadas pesquisas de conservantes, inibidores, reconstituintes da densidade e neutralizantes. Entretanto, os antibióticos que parecem ser inibidores bacterianos mais encontrados não são analisados de forma específica. Apenas é feito esporadicamente um teste qualitativo (C.T.T.) que detecta a presença de qualquer inibidor, seja ele antibiótico ou não.

Podemos considerar os alimentos como um dos principais veículos de transferência de substâncias nocivas do

meio ambiente para o homem. Ele pode transportar resíduos de pesticidas, antibióticos, traços de fertilizantes e outros contaminantes.

Atualmente esse problema tem-se agravado, cada vez mais, em virtude do crescimento da população, que exige um aumento contínuo na produção de alimentos, provocando, consequentemente sérios problemas relacionados à conservação dos mesmos. A cadeia que se estende do produtor ao consumidor é longa, o que torna necessário a utilização de preservativos e aditivos que prolonguem a vida comercial e melhorem o sabor, a cor e a consistência dos produtos. Entretanto, em qualquer etapa dessa trajetória existe riscos de prejuízo na qualidade do alimento. Por exemplo, há a possibilidade de contaminação dos ingredientes e dos equipamentos, de contaminação cruzada durante a fabricação, de refrigeração deficiente e de falta de higiene. A ação da Saúde Pública deve ser planejada levando-se em consideração a totalidade desses fatores. Uma legislação por mais rigorosa que seja não terá condições de resolver o problema se não houver um sistema de inspeção eficiente apoiado por uma rede de laboratórios especializados. No caso específico do leite, atualmente há uma inspeção deficiente junto às indústrias de laticínios, precária nas plataformas de recepção e ausente nas propriedades rurais.

* Quanto a presença de aflatoxina M_1 no leite, o F.D.A. tem procurado resolver o problema mais pelo controle da aflatoxina B_1 em rações. Para tanto, estabeleceu um limite de 20 ng/g (ppb) para o total das aflatoxinas ($B_1 + B_2 + G_1 + G_2$) em todos os alimentos ou ingredientes para alimentos animal e humano que, se observado, será evitada a presença de aflatoxina M_1 no leite.

O F.D.A. também mantém um sistema de inspeção rigo

roso em relação a presença de antibióticos no leite. Embora, este sistema seja eficiente e tenha apoio de uma ampla rede de laboratórios especializados, o seu controle se torna bastante difícil pelos motivos já expostos. Entretanto, neste setor o governo recebe grande colaboração de empresas particulares. Segundo Schoech²²⁷ as grandes cooperativas do U.S.A., executam um sistema próprio de inspeção sobre os fornecedores do produto. Estas cooperativas possuem uma rede de laboratórios, onde são feitos testes de gordura e de antibióticos. Parte do leite recebido é separado para análise. Cada amostra analisada é constituída por uma mistura do leite proveniente de vários produtores. Como o leite recebido somente será beneficiado no dia seguinte há tempo suficiente também para pesquisa rápida de antibióticos. Caso haja algum resultado positivo, o leite fornecido por cada produtor correspondente aquela amostra, será testado individualmente, com a finalidade de identificar o infrator.

Atualmente, no Brasil, uma inspeção eficaz sobre qualidade do leite é muito difícil. No caso da aflatoxina, poderá ser adotado o exemplo do F.D.A.. Entretanto, para os antibióticos, já será mais complexo por falta de uma estrutura administrativa. Talvez uma maneira de resolver mais rapidamente este problema seja a adoção de testes rápidos para detecção de contaminantes, principalmente de inibidores bacterianos, e que possam ser realizados na plataforma de recepção.

Outro elemento de fundamental importância será educação dos produtores, dos fabricantes e do consumidor. O exemplo apontado pelo F.D.A.¹¹³ mostrou que a incidência de antibiótico no leite, no U.S.A., diminuiu em decorrência de uma atuação educativa junto ao produtor.

6 - CONCLUSÕES

De acordo com as condições e os resultados do presente trabalho, podemos concluir:

- A incidência de aflatoxina M_1 no leite tipo "B" comercializado na cidade de São Paulo representado pelas quatro marcas de maior consumo foi pequena e os níveis encontrados foram baixos. Entretanto, ficou colocado o problema da necessidade do estabelecimento de limites de tolerância deste contaminante no leite, ausentes na nossa legislação.
- A alta porcentagem de inibidores bacterianos encontrados nas amostras analisadas torna enfática a necessidade da atuação da Saúde Pública quer seja através da inspeção, quer seja através de amplos programas educativos junto a população envolvida na cadeia de produção.
- As contaminações detectadas mantiveram-se sempre dentro de um mesmo nível, nas quatro marcas estudadas, o que torna o problema mais grave na medida em que se detecta a má qualidade do leite comercializado em São Paulo.

- As marcas de leite objeto desta pesquisa, revelaram contaminação por inibidores bacterianos, contrariando a legislação em vigor.
- Hã a necessidade de se pesquisar e adotar testes rãpi-dos para detecção de contaminantes no leite que possam ser realizados na plataforma de recepção.
- Hã a necessidade do estabelecimento de uma legislação que trate especificamente da presença de antibiõticos no leite.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - AFZAL, M. et al. - Incidence of aflatoxins and aflatoxin producing fungi in animal feedstuffs. Mycopathologia, 69:149-51, 1979.
- 2 - ALBRIGHT, J.L. et al. - Antibiotics in milk: a Review. J. Dairy Sci., 44:779-807, 1961.
- 3 - ALLCROFT, R. & CARNAGHAN, R.B.A. - Groundnut toxicity. A. flavus toxin (aflatoxin) in animal products: preliminary communication. Vet. Rec., 74:863-86, 1962.
- 4 - ALLCROFT, R. & CARNAGHAN, R.B.A. - Groundnut toxicity: an examination for toxin in human food products from animal fed toxic groundnut meal. Vet. Rec., 75:259-63, 1963.
- 5 - ALLCROFT, R. & LEWIS, G. - Groundnut toxicity in cattle: experimental poisoning of calves and a report on clinical effects in older cattle. Vet. Rec., 75:487-93, 1963.

- 6 - ALLCROFT, R. & ROBERTS, B.A. - Toxic groundnut meal: the relationship between aflatoxin B₁ intake by cows and excretion of aflatoxin M₁ in milk. Vet. Rec., 82: 116-8, 1968.
- 7 - ALLCROFT, R. et al. - A toxic factor in Brazilian groundnut meal. Vet. Rec., 73:428-9, 1961.
- 8 - ALLCROFT, R. et al. - Metabolism of aflatoxin in sheep: excretion of the "milk toxin". Nature, London, 209: 154-5, 1966.
- 9 - ALPERT, M.E. et al. - Primary hepatoma in Uganda, a prospective clinical and epidemiologic study in forty - six patients. Amer. J. Med., 46:794-802, 1969.
- 10 - ALPERT, M.E. et al. - Association between aflatoxin content of food hepatoma frequency in Uganda. Cancer, 28:253-60, 1971.
- 11 - ANGSUBHAKORN, S. et al. - Aflatoxins in horses. J. Amer. vet. med. Ass., 178:274-8, 1981.
- 12 - ANIFANTAKIS, E.M. - Excretion rates of antibiotics in milk of sheep and their effect on yogurt production. J. Dairy Sci., 65:426-9, 1982.
- 13 - APPLEBAUM, R.S. & MARTH, E.H. - Fate of aflatoxin M₁ in cottage cheese. J. Food Protec., 45:903-4, 1982.
- 14 - APPLEBAUM, R.S. et al. - Aflatoxin: toxicity to dairy cattle and occurrence in milk and milk products - A review. J. Food Protec., 45:752-7, 1982.

- 15 - APPLEBAUM, R.S. et al. - Responses of dairy cows to dietary aflatoxin: feed intake and yield, toxin content and quality of milk of cows treated with pure and impure aflatoxin. J. Dairy Sci., 65:1503-8, 1982.
- 16 - ARMBRECHT, B.H. - Aflatoxin residues in food and feed derived from plant and animal sources. In: Gunther, F.A. & Gunther, J.D. Residue Rev., vol. 41, Springer-Verlag, New York, 1972, p. 13-54.
- 17 - ARSECULERATNE, S.N. & SILVA, L.M. - Aflatoxin contamination of coconut products. Ceylon J. med. Sci., 20:60-75, 1971.
- 18 - ASPLIN, F.D. & CARNAGHAN, R.B.A. - The toxicity of certain groundnut meals for poultry with special reference to their effect on ducklings and chickens. Vet. Rec., 73:1215-9, 1961.
- 19 - AYNSLEY, L.H. & HUGHES, D.L. - Neomycin as a treatment for bovine mastitis. Brit. vet. J., 110:403-10, 1954.
- 20 - BAINTON, J. & JONES, B.D. - Mycotoxins on foods and feeds their occurrence and significance. Ann. Nutr., 31:415-24, 1977.
- 21 - BALZER, I. et al. - Natural contamination of corn with mycotoxins in Yugoslavia. Ann. Nutr., 31:425-30, 1977.

- 22 - BARROS, V.R.M. & PERCHES, E.M.C. - Pesquisa de inibidores no leite tipo "B", distribuido ao consumo da grande São Paulo. Rev. Inst. Laticinios Candito Tostes, 36:39-42, 1981.

- 23 - BARTŮS, J. & MATYÁŠ, Z. - Viběr metod Pro Zvyšování přítomnosti aflatoxinů v tekutém Mléce. Vet. Med., Praha, 23:559-67, 1978.

- 24 - BARTŮS, J. & MATYÁŠ, Z. - Průzkum Přítomnosti Aflatoxinu M₁ V Mléce Z Průvůby. Vet. Med., Praha, 26:419-23, 1981.

- 25 - BAUR, F.J. & ARMSTRONG, J.C. - Collaborative study of a modified method for the determination of aflatoxins in copra meal and coconut. J. Ass. Offic. Anal. Chem., 54:874-8, 1971.

- 26 - BEAN, G.A. et al. - Occurrence of aflatoxins and aflatoxin-producing strains of *Aspergillus* spp. in soybeans. Appl. Microbiol., 24:437-9, 1972.

- 27 - BERNARD, H. - Le plan G.T.V. de lutte contre les mammites. Resultats pratiques dans le Departement de la Loire. Lion, 1979. (Tese de Doutorado). Apud: RUIZ, R.L. - O Problema das mastites nos bovinos. Prevenção e tratamento. Hig. Alim., 2:55-63, 1983.

- 28 - BERRIDGE, N.I. - 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.

- 29 - BLOBEL, H. - Concentration of penicillin in milk secretions and blood serums of cows following intramamary infusion of one or more quarters. J. Amer. vet. med. Ass., 137:110, 1960.
- 30 - BOOTH, J. - Antibiotic residues in milk. Practice, London, 4:100-9, 1982.
- 31 - BOUTIBONNES, P. & JACQUET, J. - Sur la fréquence de l'aflatoxine e de *Aspergillus* dans les aliments. C. R. Soc. Biol., 163:1119-24, 1969.
- 32 - BOUTRIF, E. et al. - Aflatoxin in Tunisian foods and foodstuffs. Ann. Nutr., 31:431-4, 1977.
- 33 - BRAMLEY, A.J. - Source of *Streptococcus uberis* in the dairy herd. I. Isolation from bovine faece and from straw bedding of cattle. J. Dairy Res., 49:369-73, 1982.
- 34 - BREWINGTON, C.R. et al. - Survey of commercial milk samples for aflatoxin M₁. J. Dairy Sci., 53:1509-10, 1970.
- 35 - BRIGHTLING, P. - Antibacterial activity of cows milk following therapy with oxytetracycline uterine pessaries. Aust. vet. J., 57:143-4, 1981.
- 36 - BRYDEN, W.L. et al. - Survey of Australian feedstuffs for toxigenic strains of *Aspergillus flavus* and for aflatoxin factor. Aust. vet. J., 51:491-3, 1975.

- 37 - BRYDEN, W.L. et al. - Aflatoxin contamination of Australian animal feeds and suspected cases of mycotoxicoses. Aust. vet. J., 56:176-80, 1980.
- 38 - BURDASPAL, P.A. - Aflatoxinas em alimentos. Alimentaria, 14:21-7, 1978.
- 39 - BUTLER, W.H. - Acute toxicity of aflatoxin B₁ in rats. Brit. J. Cancer, 18:756-62, 1964.
- 40 - BUTLER, W.H. - Review of the toxicology of aflatoxin. Pure Appl. Chem., 35:217-22, 1973.
- 41 - BUTLER, W.H. & CLIFFORD, J.I. - Extraction of aflatoxin from rats liver. Nature, London, 206:1045-6, 1965.
- 42 - CAMPBELL, T.C. & STOLOFF, L. - Implication of Mycotoxins for human health. J. Agr. Food Chem., 22:1006-15, 1974.
- 43 - CAMPBELL, T.C. & HAYES, J.R. - The role of aflatoxin metabolism in its toxic lesion. Toxicol. Appl. Pharmacol., 35:199-221, 1976.
- 44 - CANTON, J.H. et al. - The carcinogenicity of aflatoxin M₁ in rainbow trout. Food Cosmet. Toxicol., 13: 441-3, 1975.
- 45 - CARNAGHAN, R.B.A. & SARGEANT, K. - The toxicity of certain ground-nut meals to poultry. Vet. Rec., 73:726-7, 1961.

- 46 - CECÍLIA, C.A. - Enciclopedia de la inspección veterinaria y análisis de alimentos. Madrid, Espasa-Calpe, 1980, p. 1157.
- 47 - CECÍLIA, C.A. - Enfermedades infecciosas y colectivas de las reses de ordeño. Enciclopedia de la leche. Madrid, Espasa-Calpe, 1956, p. 126-48.
- 48 - CHURCHILL, E.S. et al. - A report on the modified phosphatase method of detecting antibiotic substances in milk. Milk Plant Monthly, 40:28-31, 1951.
- 49 - CLARKSON, J.R. - Aflatoxicosis in swine: a review. Vet. Hum. Toxicol., 22:20-2, 1980.
- 50 - COBB, W.Y. - Aflatoxin in the Southeastern. United States: was 1977 exceptional? Assoc. Food Drug Off-Q. Bull., 43:99-107, 1979.
- 51 - COELHO, W.P. Mastite bovina. In: MANUAL veterinário. 4.ed. Guarulhos, Pfeizer, 1979, p. 107-21.
- 52 - COGAN, T.M. - Susceptibility of cheese and yoghurt starter bacteria to antibiotics. Appl. Microbiol., 23:960-5, 1972.
- 53 - COLLET, J.C. & REGNIER, J.M. - Contamination par mycotoxines de mais conservés en cribs et visiblement altérés. Ann. Nutr., 31:447-57, 1977.

- 54 - COLLINS, E.B. & DIRAR, H.A. - Effects of hydrogen peroxide on growth of Pseudomonas fragi and Shelf life of pasteurized half-and-half. J. Dairy Sci., 52:962-7, 1969.
- 55 - COLLINS, E.B. - Preservatives in dairy products. J. Dairy Sci., 54:1482-92, 1971.
- 56 - COMISSÃO NACIONAL DE NORMAS E PADRÕES PARA ALIMENTOS - Resolução 34, de outubro de 1976. Diário Oficial, Brasília, 19 de janeiro de 1977, p.710.
- 57 - COMITE DE EXPERTOS DE LA OMS EN ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DE LA HIGIENE DE LOS ALIMENTOS REUNIDOS CON PARTICIPACION DE LA FAO, Ginebra, 1976. Informe. Ginebra, OMS, 1976 (OMS.ser.inf.tecn., 598).
- 58 - COMITE MIXTO FAO/OMS DE EXPERTOS EN ADITIVOS ALIMENTARIOS, Roma, 1980. 24^o informe Ginebra, OMS, 1980. (OMS-ser.inf.tecn., 653).
- 59 - COMITE MIXTO FAO/OMS DE EXPERTOS EN ADITIVOS ALIMENTARIOS, Ginebra, 1981. 25^o informe. Ginebra, OMS, 1981. (OMS - serv.inf.tecn., 669).
- 60 - COOK, et al. - The incidence and sources of penicilin in milk supplied to the city of Johannesburg. J.S. Afr. vet. med. Ass., 47:205-7, 1976.
- 61 - CORRÊA, W.M. & CORRÊA, C.N.M. - Mastites. Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos. São Paulo, J.M. Varela Livros s.d., p. 110-23, 134.

- 62 - DECRETO nº 1255 de 25 de junho de 1962. Altera o Decreto nº 30691 de 29 de março de 1952, que aprovou o regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária.
- 63 - DELLA ROSA, H.V. & MORAES, E.C.F. - Determinação de resíduos de aflatoxina M₁ em leite, por fluordensitometria. Rev. Farm. Bioquim. Univ. S. Paulo, 17:270-80, 1981.
- 64 - DODD, F.H. - Mastitis: progress on Control. J. Dairy Sci., 66:1773-80, 1983.
- 65 - DULLEY, J.R. & HOULIHAN, D. B. - An examination of queensland milk cheese for possible aflatoxin contamination. Aust. J. Dairy Technol., 34:12-3, 1949.
- 66 - DUMAIS, R. - L'effect nuisible de la peniciline dans a lait sur les ferments lactiques e le fromage Ceddar. Lait, 10:14-6, 1951.
- 67 - DURRELL, W.B. - An evaluation of neomycin oitments for the treatment of clinical mastitis in dairy cattle. Cornell. Vet., 49:429-38, 1959.
- 68 - DUTHIE, I.F. et al. - Toxic groundunt meal in fedds por pigs. Vet. Rec., 82:427-30, 1968.
- 69 - EDDS, Acute aflatoxicosis: a review. J. Amer. vet. med. Ass., 162:304-9, 1973.

- 70 - EDDS, G.T. et al. - Alfatoxin incidence in feeds, toxicology and possible residue hazards in foods. Proc. Annu. Meet. UD. Anim. Hlth Ass., 84:301-9, 1980.
- 71 - EDWARDS, G.S. & WOGAN, G.N. - Aflatoxin inhibition of template activity of rat liver chromatin. Biochim. biophys. acta, Amsterdam, 224:597-607, 1970.
- 72 - EGAN, J. et al. - Milk out rates for intramammary antibiotic preparations. Irish J. Food Sci. Technol., 5:129-41, 1981.
- 73 - EMANI, A. et al. - La contamination des graines du cotonnier e des tourteaux de ces grains par l'aflatoxine. Ann. Nutr., 31:531-7, 1977.
- 74 - ERSKINE, D. - Dermatitis caused by penicillin in milk. Lancet, 1:431-2, 1958.
- 75 - FAGUNDES, C.M. - Persistência de antibióticos no leite bovino e em condições experimentais. Rev. Inst. Laticínios Candido Tostes, 36:27-30, 1981.
- 76 - FAGUNDES, C.M. et al. - Prevalência de antibióticos no leite tipo "B" e "C" consumido em Belo Horizonte. Arq. Esc. Vet. UFMG, 34:203-6, 1982.
- 77 - FERRANDO, R. & TRUHAUT, R. - La toxicité de relais. Nouvelle approche pour la méthodologie d'évaluation toxicologique des additifs aux animaux d'élevage. C.R. Acad. Sci. Paris, sér. D. 278: 2067, 1972.

- 78 - FERREIRO, L. et al. - Influência da mastite bovina sub-clínica na produção de gado mestiço. Arq. Fac. Vet. UFRGS, P. Alegre, 7: 135-43, 1979.
- 79 - FOLEY, E.J. et al. - Studies on vehicles for sustaining penicillin levels in the bovine Mammary Gland. Amer. J. vet. Res., 10: 66-70, 1949.
- 80 - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION . Whole milk, lowfat milk, skim milk. Adulteration aflatoxin M. Guideline 7406-06, 1977. Apud STOLOFF, L. - Aflatoxin M in perspective. J. Food Protec., 43: 226-30, 1980.
- 81 - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Aflatoxin contamination of milk. Establishment of action level. Federal Regist. 42-61630, 1970. Apud STOLOFF, L. - Aflatoxin M in perspective. J. Food Protec., 43: 226-30, 1980.
- 82 - FONSECA, H. - Contribuição ao estudo da ocorrência de Aflatoxina em tortas, farelos e farinhas de Amendoim (Arachis Hypogaea L.) no Estado de São Paulo. An. Esc. sup. Agric. Luiz de Queiroz, 25: 47-9, 1968.
- 83 - FONSECA, H. & DEL NERY, H. - Ocorrência de Aflatoxina em pastas de Amendoim. An. Esc. sup. Agric. Luiz de Queiroz, 28: 181-90, 1970.
- 84 - FOSTER, J.W. & WOODRUFF, H.B. - Microbiological aspects of penicillin. I. Methods of Assay. J. Bacteriol., 46: 187-202, 1943.

- 85 - FRÉMY, J.M. & ROILAND, J.C. - Devenir de l'aflatoxine M_1 au cours de la fabrication du fromage de type camembert. Ann. Nutr., 33: 619-30, 1979.
- 86 - FRÉMY, J.M. et al. - Évaluation de la contamination en Aflatoxine M_1 dans le lait en poudre par H.P.L.C. for phase inversée. Ann. Fals. Exp. Chim., 74: 547-54, 1981.
- 87 - FRITZ, W. et al. - Bestimmung und Vorkommen von Aflatoxin M_1 und B_1 in Milch und Milchprodukten. Die Nahrung, 21: 79-84, 1977.
- 88 - FURTADO, R.M. - Aflatoxin residues in the tissues of pigs fed a contaminated diet. J. Agric. Food Chem., 27: 1351-4, 1979.
- 89 - GELDA, C.S. & LUYT, L.J. - Survey of aflatoxin content in peanuts, peanut butter, and other foodstuffs. Ann. Nutr., 31: 477-83, 1977.
- 90 - GRANT, D.W. & CARLSON, W.E. - Partitioning behavior of aflatoxin M in dairy products. Bull Environ. Contam. Toxicol., 6: 521-4, 1971.
- 91 - GRAY, D.M. & SCHALM, O.M. - Interpretation of the California Mastitis test results on milk from individual mammary quarters, bucket milk, and bulk herd milk. J. Amer. vet. med. Ass., 136: 195-8, 1960.
- 92 - GRUNERT, E. & BIRGEL, E.H. - Obstetrícia veterinária. Porto Alegre, Editora Sulina, 1982, p. 288, 308-9, 312.

- 93 - GUERGUE, I. & RAMIREZ, C. - Incidence of aflatoxin potential contamination of Spanish Sausages. Ann. Nutr., 31: 485-8, 1977.
- 94 - HALD, B. & KROGH, P. - Forekomst of aflatoksin i importerede bomuldsfrøprodukter. (Occurrence of aflatoxin in imported cottonseed products). Nord. Vet. Med., 22: 39-47, 1970.
- 95 - HAMILTON, P.B. - Proof of mycotoxicoses being a field problem and a simple method for their control. Poult. Sci., 54: 1706-8, 1975.
- 96 - HANSEN, H.C. et al. - Modern methods of mastitis treatment cause trouble in the manufacturing of fermented dairy products. J. Milk Food Technol., 13: 359-65, 1950.
- 97 - HANSEN, E. & JUNG, M. - Control of aflatoxins in the food industry. Pure Appl. Chem., 33: 239-50, 1973.
- 98 - HARGROVE, R.E. et al. - The effect of penicillin and streptomycin on swiss cheese startes. J. Dairy Sci., 33: 401, 1950.
- 99 - HAYES, A.W. - Biological activities of mycotoxins. Mycopathologia, 65: 29-41, 1978.
- 100 - HAWKINS, G.E. et al. - Concentration of penicillin in milk from non-infused quarters following infusion of one quarter. J. Dairy Sci., 45: 1020-2, 1962.

- 101 - HESSELTINE, C.W. - Natural occurrence of mycotoxins in cereals. Mycopathologia, 53: 141-53, 1974.
- 102 - HESSELTINE, C.W. et al. - Aflatoxin and mold flora in North Carolina in 1977 corn crop. Mycologia, 73: 216-28, 1981.
- 103 - HIBBS, R.A. & BOYD, J.C. - Some observations on testing milk samples for antibiotics. J. Milk. Food Technol., 20: 109-12, 1957.
- 104 - HOLZAPFEL, et al. - Isolation and structure of aflatoxins M_1 and M_2 . Tetrahedron Lett., 25: 2799-805, 1966.
- 105 - HUGHES, D.L. - Some epidemiological patterns in bovine mastitis. Vet. Rec., 72: 485-98, 1960.
- 106 - HUNTER, G.J.E. - The effect of penicillin on lactic streptococci. J. Dairy Res., 16: 39-45, 1949.
- 107 - HUNTER, G.J.E. - A note on the effect of penicillin in the redutase test for milk quality. J. Dairy Res., 16: 149-51, 1949.
- 108 - HUNTER, G.J.E. - The effect of penicillin in milk on the manufacture of cheddar cheese. J. Dairy Res., 16: 235-41, 1949.
- 109 - HUNTER, G.J.E. - The effect of penicillin in milk on the manufacture of cheddar cheese. J. Dairy Res., 16: 253-4, 1949.

- 110 - INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas. 2a. ed. São Paulo, 1976. v.1, p. 166-7.
- 111 - JACKSON, W.F. & BRYAN, C.S. - Penicillin milk levels in cows following intramammary administration. Vet. med., 45: 395-9, 1950.
- 112 - JACQUET, J. - La presence d'antibiotiques dans le lait et ses consequences pour l'industrie laitiere. Proc. 13th. Intern. Dairy Congr., 1143-5, 1953. Apud: ALBRIGHT, J. L. et al. Antibiotics in milk: a review. J. Dairy Sci., 44: 779-807, 1961.
- 113 - JESTER, W.R. et al. - Antibiotics in fluid milk. Antib. and Chemother., 9: 393-5, 1959.
- 114 - JOHNS, C.K. - Differences in sensitivity of lactic starters to antibiotics. J. Dairy Sci., 36: 1241-7, 1953.
- 115 - JOHNS, C.K. & DESMARIS, J.G. - The effect of residual penicillin in milk on the dye reduction tests for quality. Canad. J. Agric. Sci., 33: 91-7, 1953.
- 116 - JOHNSON, M.E. - Persistence of Antibiotics in Milk from Cows treated late in the dry period. J. Dairy Sci., 60: 1655-61, 1977.
- 117 - JONES, M.G.S. & EWART, J.M. - Effects on milk production associated with consumption of decorticated extracted groundnut meal contaminated with aflatoxin. Vet. Rec., 105: 492-3, 1979.

- 118 - JUNG, M. & HANSSEN, E. - Uber das Vorkommen von Aflatoxin M in Trockenmilcherzeugnissen. Food Cosmet. Toxicol., 12: 131-8, 1974.
- 119 - JUSZKIEWICZ, T. & PISKORSKA-PLISZCZYŃSKA - Zawartość aflatoksyn B₁, B₂, G₁ i G₂, ochratoksyn A i B, sterygmatozystyny i zearalenonu w sruach zbozowych. Occurrence of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ ochratoxins A and B, sterigmatocystin and zearalenone in cereals). Med. Wet., 32: 617-9, 1976.
- 120 - JUSZKIEWICZ, T. & PISKORSKA-PLESZCZYŃSKA - Mycotoxins in grain for animal feeds. Ann. Nutr., 31: 489-93, 1977.
- 121 - KATZ, S.E. et al. - Oxytetracycline residues in milk following intramammary infusion. J. Ass. Offic. Anal. Chem., 56: 706-13, 1973.
- 122 - KATZNELSON, H. & HOOD, E.G. - Penicillin in Relation to acid production in milk by starter culture used in cheeddar cheesemaking. Science, 109: 490-1, 1941.
- 123 - KATZNELSON, H. & HOOD, E.G. - Influence of penicillin and other antibiotics on lactic streptococci in starter cultures used in cheddar cheesemaking. J. Dairy Sci., 32: 961-8, 1949.
- 124 - KEPPLER, J.G. & IONGH, H. - Aflatoxin - occurrence and composition. Food Cosmet. Toxicol., 2: 675-7, 1964.

- 125 - KERSEY, R.C. et al. - Residual antibiotics levels in food products during storage and processing. Antibiot. Ann., p. 438-48, 1953-54.
- 126 - KIERMEIER, F. - Aflatoxin residues in fluid milk. Pure Appl. Chem., 35: 271-4, 1973.
- 127 - KIERMEIER, F. - The significance of aflatoxins in the dairy industry. Apud: WORLD HEALTH ORGANIZATION. Mycotoxins. Geneva, 1979. p. 40. (WHO - Environmental healt criteria, 11).
- 128 - KIERMEIER, F. & BUCHNER, M. - Verhalten von Aflatoxin M₁, während der Reifung und Lagerung von Kase. Z. Lebensmitt-Untersuch., 164: 87-91, 1977.
- 129 - KINOSITA, R. et al. - Mycotoxins in fermeted foods. Cancer Res., 28: 2296-311, 1968.
- 130 - KONG, Z.F. et al. - Studies on the secretion of aflatoxin M₁ in cow's milk after aflatoxin B₁ feeding. Acta vet. zootech. sin., 13(3): 119-204. Apud: Veterinary Bulletin, 53: 63, 1983. [resumo].
- 131 - KOSIKOWSKI, F.V. et al. - The incidence of antibiotics, sulfa drugs and quarternary ammonium compounds in the fluid milk supply of New York State. J. Dairy Sci., 35: 533-9, 1952.
- 132 - KOSIKOWSKI, F.V. - The control of antibiotics in milk through a sound test program. J. Milk Food Technol., 23: 285-7, 1960.

- 133 - KRIENKE, W.A. - Effects of various drugs in milk from mastitis treated cows. Sth. Dairy Prod. J., 47: 37, 132-4, 1950.
- 134 - KRIENKE, W.A. - Penicillin in milk. Amer. Milk Rev., 11: 24-5, 1950.
- 135 - KRIENKE, W.A. - Drug, mastitis and acid starters. Amer. Milk Rev., 12: 54-6, 1950.
- 136 - KRISHNAMACHARI, K.A. et al. - Hepatitis due to aflatox-
 xicosis. An outbreak in Western India. Lancet, 1: 1061-3, 1975.
- 137 - KROGH, P. - Mycotoxin tolerances in foodstuffs. Ann. Nutr., 31: 411-4, 1977.
- 138 - KROGH, P. & HALD, B. - Forekomst of aflatoxin i importerede jordnødprodukter (Occurrence of aflatoxin in imported groundnut products. Nord. Vet. Med., 21: 398-407, 1969.
- 139 - KROGH, P. et al. - Forekomst af aflatoksin i jordnød-
 -og Kokosprodukter indført til Finland. (Occurrence of aflatoxin in groundnut - and copra products imported to Finland). Nord. Vet. Med., 22: 584-9, 1970.
- 140 - KROGH, P. et al. - Aflatoxin residues in bacon pigs. Pure Appl. Chem., 35: 275-81, 1973.

- 141 - KRUIZE, J. & BRAMLEY, A.J. - Sources of Streptococcus
uberis in the dairy herd. II. Evidence of
colonization of the bovine intestine by Streptococ-
cus uberis. J. Dairy Res., 49: 375-9, 1982.
- 142 - LABUZA, T.P. - Regulation of mycotoxins in foods.
J. Food Protec., 46: 260-5, 1983.
- 143 - LACERDA Jr., P.M.G. et al. - Studies on bovine mastitis.
In: Congresso Panamericano de Medicina Veterinária,
12, São Paulo, 1954. Anais. São Paulo, p.209.
- 144 - LACERDA Jr., J.P.G. & VEIGA, J.M.S. - Mastite em eua
causada pelo Corynebacterium equi. Rev. Fac. Med.
Vet. e Zoot. Univ. S. Paulo, 6: 321-7, 1959.
- 145 - LAFONT, P. - Recherche et dosage d'aflatoxine dans les
aliments pour enfants. Ann. Hyg. L., (France),
11: 47-9, 1975.
- 146 - LAFONT, P. & LAFONT, J. - Contamination de produits
céréaliers et d'aliments du bétail par l'aflatoxine.
Food Cosmet. Toxicol., 8: 403-8, 1970.
- 147 - LAFONT, P. et al. - Étude de la contamination du lait
de vache lors de l'ingestion de faibles quantites
d'Aflatoxine. Ann. Nutr., 34: 699-708, 1980.
- 148 - LANCASTER, M.C. et al. - Toxity associated with certain
samples of groundnut. Nature, 192: 1095-6, 1961.
- 149 - LANDREY, J.S.A. - The effect of mastitis on herd milk
production and composition. J. S. Afr. vet. med.
Ass., 36: 515-9, 1965.

- 150 - LARA, W.H. - Aditivos para alimentos. Hig. Alim., 1: 148-50, 1982.
- 151 - LEWIS, G. et al. - The effect of feeding toxic groundnut meal to sheep over a period of 5 years. Vet. Rec., 80: 312-4, 1967.
- 152 - LIE, J.L. & MARTH, E.H. - Formation of aflatoxin in Cheddar cheese by Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus. J. Dairy Sci., 50: 1708-10, 1967.
- 153 - LING, K.H. et al. - Aflatoxin B₁ in unrefined peanut oil and peanut products in Taiwan. J. Formosan Med. Ass., 67: 309-14, 1968.
- 154 - LÖTZSCH, R. & LEISTNER, L. - Transmission of aflatoxins into eggs and egg products. Ann. Nutr., 31: 494-508, 1977.
- 155 - LOOSMORE, R.M. & HARDING, J.D.J. - A toxic factor in Brazilian groundnut causing liver damage in pigs. Vet. Rec., 73: 1362-4, 1961.
- 156 - LOOSMORE, R.M. & MARKSON, L.M. - Poisoning of cattle by Brazilian groundnut meal. Vet. Rec., 73: 813-4, 1961.
- 157 - LUCAS Jr., F.V. et al. - Mycotoxin contamination of Sout Vietnamese rice. J. trop. Med. Hyg., 74: 182-3, 1971.

- 158 - LUCK, H. - The manufacture of cheese from milk preserved with H_2O_2 (hydrogen-peroxide). Dairy Sci. Abstr., 18: 32, 1956.
- 159 - LUCK, H. - The use of hydrogen - peroxide as a dairy preservative. Dairy Sci. Abstr., 18: 363-85, 1956.
- 160 - LYNCH, G.P. - Mycotoxins in feedstuffs and their effect on dairy cattle. J. Dairy Sci., 55: 1243-55, 1972.
- 161 - MACEDO, L.R. et al. - Antibióticos no leite. Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes, 31: 21-4, 1976.
- 162 - MAIKE, J. & HANSSEN, E. - "Über das Vorkommen Von Aflatoxin M in Trockenmilcherzeugnissen. Food Cosmet. Toxicol., 12: 131-8, 1974.
- 163 - MARCINIAK, T. - Factors affecting the contamination milk after administration into the cow's uterins. Med. Weter., 38: 141-4, 1982.
- 164 - MARTH, E.H. - Aflatoxin in milk and milk products. J. Food Protec., 42: 841, 1979.
- 165 - MARTH, E. H. - Antibiotics in milk - A review. J. Milk Food Technol., 24: 36-44, 1961.
- 166 - MARTH, E.H. & ELLICKSON, B.E. - Antibiotic Residues in milk products. J. Milk Food Technol., 22: 241-9, 1959.

- 167 - MARTH, E.H. & ELLICKSON, B.E. - Problems created by the presence of antibiotics in milk and milk products. J. Milk Food Technol., 22: 266-72, 1959.
- 168 - MASRI, M.S. - Crystalline aflatoxin M₁ from urine and milk. Nature, London, 215: 753-5, 1967.
- 169 - MASRI, M.S. et al. - Aflatoxin M content of milk from cows fed known amounts of aflatoxin. Vet. Rec., 84: 146-7, 1969.
- 170 - MARTIN, W.H. et al. - Aureomycin content, bacterial development, starter activity and cheese quality of milk from cows fed an aureomycin supplement. J. Dairy Sci., 38: 47-52, 1955.
- 171 - MAUPOUMÉ, R. - Mammite des femelles bovines: prophylaxie et thérapeutique. L'emploi des antibiotiques et leur répercussion sur la qualité des produits laitiers. Bull. off. int. Epizooties, 40: 208-23, 1953.
- 172 - McCULLOCH, E.C. et al. - Aureomycin in the treatment of Staphylococcal Mastitis in cows. Vet. Med., 44: 253, 1949.
- 173 - McKINNEY, J.D. et al. - Effects of ammoniation of aflatoxins in rations fed lactating cows. J. Amer. Oil Chem. Soc., 50: 79-84, 1973.
- 174 - MEARA, O.J. - A survey of penicillin contamination of market milk supplies. S. Afr. med. J., 33: 821-2, 1959.

- 175 - MELLER, A.C. - Antibióticos no leite cru consumido na cidade de Santa Maria, R.S. Rev. Centro Ciências Rurais, 4: 169-72, 1974.
- 176 - MELLO FILHO, A. - Utilização da água oxigenada no tratamento do leite cru destinado ao consumo. Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes, 28: 37-40, 1973.
- 177 - MELLO FILHO, A. & CASTRO, L.C. - Conservação do leite "in natura" por meios físicos, químicos e bioquímicos, peróxido de hidrogênio como conservador. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 29/30: 85-103, 1969/70.
- 178 - MELLO FILHO, A. et al. - Inibidores bacterianos no leite de consumo da capital. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 25/27: 69-93, 1965/67.
- 179 - MELLO FILHO, A. et al. - Inibidores bacterianos em especial a penicilina, no leite em pó de consumo da capital. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 28: 27-41, 1968.
- 180 - MERCER, H.D. et al. - Milk out rates for antibiotics in intramammary infusion products used in the treatment of bovine mastitis. Relationship of somatic cell counts, milk production level and drug vehicle. Amer. J. Vet. Res., 31: 1549-60, 1970.
- 181 - Ministério da Agricultura - Divisão de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Portaria nº 005 de 24 de abril de 1980. Diário Oficial, Brasília, 25 de abril de 1980, p. 7349.

- 182 - Ministério da Agricultura - Divisão de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Portaria nº 0005 de 07 de março de 1983. Diário Oficial, Brasília, 14 de março de 1983, p. 4084.
- 183 - MOREAU, C. - Les mycotoxins dans les produits laitiers. Lait, (555-556): 286-303, 1976.
- 184 - MOREIRA, E.A. & CAMATI, R.M. - Ocorrência da aflatoxina B₁ em alfafa (Medicago sp) contaminado pelo Aspergillus flavus-orizal. Trib. Farmacêut., 36: 27-32, 1967.
- 185 - NABNEY, J. et al. - Metabolism of aflatoxin in sheep: excretion pattern in the lactating ewe. Food Cosmet. Toxicol., 5: 11-7, 1967.
- 186 - NEAL, C.E. & CALBERT, H.E. - Incidente of lactic starter inhibitory substances in individual herd milks of Wisconsin. Milk Prod. J., 47: 18-21, 1956.
- 187 - NELF, G.L. & EDDS, G.T. - Aflatoxins B₁ and M₁: Tissue residues and feed withdrawal profiles in young growing pigs. Food Cosmet. Toxicol., 19: 739-42, 1981.
- 188 - NEWBERNE, P.M. & BUTLER, W.H. - Acute and chronic effects of aflatoxin on the liver of domestic and laboratory animals. Cancer Res., 29: 236-50, 1969.
- 189 - NEWBERNE, P.M. et al. - Acute toxicology of aflatoxin B₁ in the dog. Pathol. Vet., 3: 331-40, 1966.

- 190 - NEWLANDER, J.A. & ATHERTON, H.V. - The chemistry and testing of dairy products. 3a. ed. Milwaukee, Wisconsin, Olsen Publishing, 1964. p. 201.
- 191 - NIKOLOV, N. - Effects of antibiotics on the microflora of yogurt. Dairy Sci. Abstr., 29: 75, 1966.
- 192 - O'DONOVAN, D. et al. - The effect of udder infections on the lactation yield of milk and milk solids. J. Dairy Res., 27: 115-20, 1960.
- 193 - O'REILLY, P.F. - A survey of the incidence of antibiotics contamination of milk in the Dublin liquid milk area. Irish vet. J., 26: 41-7, 1970.
- 194 - PATTERSON, D.S.P. & ALLCROFT, R. - Metabolism of aflatoxin in susceptible and resistant animal species. Food Cosmet. Toxicol., 8: 43-53, 1970.
- 195 - PATTERSON, D.S.P. & ANDERSON, P.H. - Recent aflatoxin feeding experiments in cattle. Vet. Rec., 110: 60, 1982.
- 196 - PATTERSON, D.S.P. et al. - The carry over of aflatoxin M₁ into the milk of cows fed rations containing a low concentration of aflatoxin B₁. Food Cosmet. Toxicol., 18: 35-7, 1980.
- 197 - PEARSON, J.K.J. - Further experiments in the use of penicillin in the prevention of C. pyogenes infections of the non-lactating bovine udder. Vet. Rec., 63: 215-22, 1951.

- 198 - PLASTRIDGE, W.N. - Bovine mastitis: A review. J. Dairy Sci., 41: 1141-81, 1958.
- 199 - POLAN, C.E. et al. - Consumption and fate of aflatoxin B₁ by lactating cows. J. Agric. Food Chem., 22: 635-8, 1974.
- 200 - POLO LARA, R. et al. - Antibiotics in milk from suthern Spain. Arch. Zootech., 26: 125-45, 1977.
- 201 - PONG, R.S. & WOGAN, G.N. - Toxicity and biochemical and fine structural effects of synthetic aflatoxins M₁ and B₁ in rat liver. J. nat. Cancer Inst., 47: 585-90, 1971.
- 202 - POZZOBON, E.D.T. et al. - Determinação de aflatoxina M₁ em leite cru consumido na cidade de Santa Maria. Rev. Centro Ciências Rurais, 6: 423-5, 1976.
- 203 - PRIOR, M.G. - Mycotoxin determinations on animal feedstuffs and tissues in Western Canada. Canad. Compr. Med., 40: 75-9, 1976.
- 204 - PUGH, K.E. et al. - Evaluation of a long-acting intramammary preparation containing high doses of penicillin and streptomycin for use in dry cows. Vet. Rec., 93: 212-6, 1973.
- 205 - PURCHASE, I.F.H. - Acute toxicity of aflatoxins M₁ and M₂ in one-day-old ducklings. Food Cosmet. Toxicol., 5: 339-42, 1967.

- 206 - PURCHASE, I.F.H. - Aflatoxin residues in food of animal origin. Food Cosmet. Toxicol., 10: 531-44, 1972.
- 207 - PURCHASE, I.F.H. & VORSTER, L.J. - Aflatoxin in commercial milk samples. S. Afr. med. J., 42: 219, 1968.
- 208 - PURCHASE, I.F.H. et al. - Reduction of the aflatoxin M content of milk by processing. Food Cosmet. Toxicol., 10: 383-7, 1972.
- 209 - PURCHIO, A. - Pesquisa de aflatoxina B₁ e substâncias fluorescentes similares em farinha de trigo. Rev. Microbiol., 1: 33-42, 1970.
- 210 - QUTET, S.M. et al. - Occurrence of aflatoxins in some egyptian food crops collected from two coastal regions. Food Chem., 10: 149-53, 1983.
- 211 - RAJ, P. et al. - Incidence of aflatoxins in milk and milk products. Indian J. Dairy Sci., 29: 318-21, 1976.
- 212 - REIS, R. et al. - Estudo sobre penicilina no leite. II. Pesquisas de penicilina no leite recebido pela cooperativa central dos produtores rurais de Belo Horizonte, Minas Gerais. Arq. Esc. Vet., 15: 81-91, 1963.
- 213 - REPORT of the panel of the colloquium on bovine mastitis. J. Amer. vet. med. Ass., 170:119-23, 1977.

- 214 - RICHARDS, R.J. et al. - Antibiotics resistance and acid production cultures belonging to the Genus Streptococcus. J. Milk Food Technol., 24: 317-20, 1961.
- 215 - ROGERS, A.E. & NEWBERNE, P.M. - Aflatoxin B₁ carcinogenesis in lipotrope-deficient rats. Cancer Res., 29:1965-72, 1969.
- 216 - RUIZ, R.L. - O problema das mastites nos bovinos. Prevenção e tratamento. Hig. Alim., 2: 55-63, 1983.
- 217 - RUSSEL, T.E. et al. - Field accumulation of aflatoxin in cotton-seed as influenced by irrigation termination dates and pink bollworm infestation. Appl. Environ. Microbiol., 31: 711-3, 1976.
- 218 - SABINO, M. - Variações de níveis de aflatoxina B₁ em alimentos e rações animais no período de 1971 a 1979. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 40: 153-8, 1980.
- 219 - SABINO, M. - Inquérito sobre aflatoxina "M" no leite de vaca comercializado no Estado de São Paulo. Padronização de método analítico por cromatografia líquida de alta resolução. São Paulo, 1983 |Dissertação de mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP|.
- 220 - SABINO, M. & CORRÊA, M.J.S. - Aflatoxin B₁ em feijão. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 41: 83-7, 1981.

- 221 - SABINO, M. et al. - Variação dos níveis de aflatoxina B₁ em pasta de amendoim e paçoca consumidas no Estado de São Paulo. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 42: 39-44, 1982.
- 222 - SAMARAJEIWA, V. - Spontaneous and experimental aflatoxicosis in goats. Res. Vet. Sci., 19: 269-77, 1975.
- 223 - SARGENT, K. et al. - The assay of a toxic principle in Brazilian groundnut meal. Vet. Rec., 73: 1219-23, 1961.
- 224 - SARGENT, K. et al. - Toxicity associated with certain samples of groundnuts. Nature, London, 192: 1096-7, 1961.
- 225 - SCHIPPER, I.A. - Comparison of vehicles in intramammary therapy of bovine mastitis. Vet. Med., 50: 111-3, 1955.
- 226 - SCHNEIDER, S. et al. - Determination of aflatoxin and aflatoxin producing cultures in recently ginned cottonseed in Central America. J. Amer. Oil Chem. Soc., 49: 700-1, 1972.
- 227 - SCHOECH, P.R. - Testing for antibiotics in milk. Field observations. J. Food Protec., 40: 138-41, 1977.
- 228 - SCHROEDER, H.W. & BOLLER, R.A. - Aflatoxin production of species and strains of the Aspergillus flavus group isolated from field crops. Appl. Microbiol., 25: 885-9, 1973.

- 229 - SCHULLER, P.L. et al. - Aflatoxin M₁ in liquid and powdered milk. Zesz. probl. Postep. Nauk roln., 189: 255, 1977.
- 230 - SCHULTZ, J. & MOTZ, R. - Toxinbildende Aspergillus flavus. Stämme in Futtermitteln. Arch. exp. Vet. Med., 21: 129-40, 1967.
- 231 - SCOTT, P.M. - Mycotoxins in feeds and ingredients and their origin. J. Food Protec., 41: 385-98, 1978.
- 232 - SCOTT, R. - Destruction of starter activity by penicillin. Dairy Ind., 16: 440-3, 1951.
- 233 - SHAHANI, K.M. et al. - Stability of small concentration of penicillin in milk as affected by heat treatment and storage. J. Dairy Sci., 39: 971-7, 1956.
- 234 - SHAHANI, K.M. - The effect of heat and storage on the stability of aureomycin in milk, buffer and water. J. Dairy Sci., 40: 289-96, 1957.
- 235 - SHANK, R.C. et al. - Dietary aflatoxins and human liver cancer. I. Toxigenic moulds in foods and foodstuffs of tropical southeast. Asia. Food Cosmet. Toxicol., 10: 51-60, 1972.
- 236 - SHIVELER, G. & WEISER, H. - The effect of selected antibiotics upon the survival of microorganisms in raw and pasteurised milk. J. Milk Food Technol., 16: 125-7, 1953.

- 237 - SHOTWELL, O.L. - Mycotoxins in hot spots in grains.
I. Aflatoxin and zearalenone occurrence in stored corn. Cereal Chem., 52: 687-97, 1975.
- 238 - SHOTWELL, O.L. - Aflatoxin M₁. Occurrence in stored and freshly harvested corn. J. Agric. Food Chem., 24: 683-4, 1976.
- 239 - SHOTWELL, O.L. - Aflatoxin in corn. J. Amer. Oil Chem. Soc., 54: 216A-24A, 1977.
- 240 - SHOTWELL, O.L. et al. - Survey of cereal grains and soybeans for the presence of aflatoxin. I. Wheat, grain sorghum and oats. Cereal Chem., 46: 446-54, 1969.
- 241 - SHOTWELL, O.L. et al. - Survey of cereal grains and soybeans for the presence of aflatoxin. II. Corn and soybeans. Cereal Chem., 46: 454-63, 1969.
- 242 - SHOTWELL, O.L. et al. - Survey of corn for aflatoxin, zearalenone and ochratoxin. Cereal Chem., 47: 700-7, 1970.
- 243 - SHOTWELL, O.L. et al. - Incidence of aflatoxin in southern corn. Cereal Sci. Today, 18: 192-5, 1973.
- 244 - SHOTWELL, O.L. et al. - Survey of U.S. wheat for ochratoxin and aflatoxin. J. Ass. Off. Anal. Chem., 59: 122-4, 1976.

- 245 - SHOTWELL, O.L. et al. - Survey of 1975 wheat and soybeans for aflatoxin, zearalenone and ochratoxin. J. Ass. Off. Anal. Chem., 60: 778-83, 1977.
- 246 - SHREEVE, B.J. et al. - Investigation of suspected cases of mycotoxicosis in farm animals in Britain. Vet. Rec., 97: 275-8, 1975.
- 247 - SIDDIQUE, I.H. et al. - Antibiotic residues in milk transferred from treated to untreated quarters in dairy cattle. J. Amer. vet. med. Ass., 146: 589-93, 1965.
- 248 - SINNHUBER, R.O. et al. - Aflatoxin M₁, a potent liver carcinogen for rainbow trout. Fed. Proc., 29: 568 (Abstr.), 1970.
- 249 - SINNHUBER, R.O. et al. - Hepatic carcinogenesis of aflatoxin M₁ in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and its enhancement by cyclopropene fatty acids. J. nat. Cancer Inst., 53: 1285-8, 1974.
- 250 - SINNHUBER, R.O. & WALES, J.H. - Aflatoxin B₁ hepatocarcinogenicity in rainbow trout embryos. Fed. Proc., 38: 274, 1974.
- 251 - SLANETZ, L.W. & ALLEN, F.E. - Penicillin therapy in Streptococcal mastitis. J. Amer. vet. med. Ass., 111: 125-7, 1947.
- 252 - SMITH, A. et al. - The persistence of cloxacillin in the mammary gland when infused immediately after the last milking of lactation. J. Dairy Res., 34: 47-57, 1967.

- 253 - SMITH, A. et al. - The persistence of penicillin G in the mammary gland when infused immediately after the last milking of lactation. J. Dairy Res., 34: 59-64, 1967.
- 254 - SMITH, J.W. & HAMILTON, P.B. - Aflatoxicosis in the broiler chicken. Poultry Sci., 49: 207-15, 1970.
- 255 - SMITH, J.W. et al. - Survey of aflatoxicosis in farm animals. Appl. Environ Microbiol., 31: 385-8, 1976.
- 256 - STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF DAIRY PRODUCTS - American Public Health, 14 ed., Washington, D.C., 1978, p.141-50.
- 257 - STEVENS, A.J. et al. - Investigations into descase of turkey poults. Vet. Rec., 72: 627-8, 1960.
- 258 - STOLOFF, L. - Report on mycotoxins. J. Ass. Off. Anal. Chem., 60: 348-53, 1977.
- 259 - STOLOFF, L. - Aflatoxin M in perspective. J. Food Protec., 43: 226-30, 1980.
- 260 - STOLOFF, L. & WOOD, G. - Aflatoxin M in manufactured dairy products produced in the united states in 1979. J. Dairy Sci., 64: 2426-30, 1981.
- 261 - STOLOFF, L. et al. - Stability M in milk. J. Dairy Sci., 58: 1789-93, 1977.

- 262 - STOLOFF, L. et al. - Survey for aflatoxins and zearalenone in 1973 crop corn stored on farms and in country elevators. J. Ass. Off. Anal. Chem., 59: 118-21, 1976.
- 263 - STOLTZ, E.I. & HANKINSON, D.J. - Antibiotics and lactic acid starter cultures. Appl. Microbiol., 1: 24-9, 1953.
- 264 - STOLTZ, E.I. & HANKINSON, D.J. - The effects of antibiotics in milk on the human intestinal coliform bacteria. J. Milk Food Technol., 17: 76-8, 1954.
- 265 - STOLZ, E.I. & HANKINSON, D.J. - The effects of antibiotics on the bacterial plate counts of normal raw milk. J. Milk Food Technol., 16: 157-9, 1953.
- 266 - STORRS, F.C. & HIETT BROWN, W. - The incidence of penicillin in milk supplies. J. Dairy Res., 21: 337-41, 1954.
- 267 - STRZELECKI, E.L. - Extraction and determination of Aspergillus flavus metabolites - aflatoxins from meat products. Pure Appl. Chem., 35: 297-307, 1973.
- 268 - STRZELECKI, E.L. & GASIOROWSKA, V.W. - Aflatoxin B₁ in feedstuffs. Zbl. vet. med., 21: 395-440, 1974.
- 269 - STUART JONES, M.G. & EWART, J.M. - Effects of milk production associated with consupction of decorticated extracted groundnut meal contaminated with aflatoxin. Vet. Rec., 105: 492-3, 1979.

- 270 - STUBBLEFIELD, R.D. & SHANNON, G.M. - Aflatoxin M_1 :
Analysis in dairy products and distribution in dairy
foods made from artificially contaminated milk.
J. Ass. Off. Anal. Chem., 57: 847-51, 1974.
- 271 - SUZANGAR, M. et al. - Aflatoxin contamination of village
milk in. ISFAHAN, IRAN - Trop. Sci., 18: 155-9,
1976.
- 272 - THOMAS, S.B. and PANES, J.J. - Further studies on the
effects of penicillin in milk used for the manufacture
of cheshire chesse. J. Soc. Dairy Technol., 9: 87-
92, 1956.
- 273 - THORP, W.T.S. et al. - Concentration of penicillin in
the bovine mammary gland following infusion
penicillin tolerance of certain streptococci. Amer.
J. vet. Res., 8: 157-65, 1947.
- 274 - TOMA, C. et al. - Studies on the use of hydrogen peroxide
for preserving milk for liquid consumption and
processing. Dairy Sci. Abstr., 26: 417, 1964.
[resumo].
- 275 - TREMBATH, R.H. - Effect of penicillin in milk on starter
cultures. Aust. J. Dairy Technol., 5: 143-6, 1950.
- 276 - TRUCKSESS, M.W. - Aflatoxicol and aflatoxins B_1 and M_1
in the tissues of pigs receiving aflatoxin. J. Ass.
Off. Anal. Chem., 65: 884-7, 1982.
- 277 - TUINSTRA, L.G.M. Th. & BRONGSEEST, J.M. - Determination
of aflatoxin M_1 in milk at the parts per trillion
level. J. Cromatogr., 111: 448-51, 1975.

- 278 - TUNG, H.T. & HAMILTON, P.B. - Decreased plasma carotenoids during aflatoxicosis. Poult. Sci., 52: 80-3, 1973.
- 279 - ULBERG, S. et al. - Distribution of aqueous penicillin and penicillin in oil in normal goat udders following intramammary injection. An autoradiograph study. Amer. J. vet. Res., 19: 135-8, 1958.
- 280 - UVAROV, O. - The concentration of some antibiotics in the milk after intramammary infusion. Vet. Rec., 72: 1228-32, 1960.
- 281 - VAID, J. et al. - Chronic aflatoxicosis in cattle. Vet. Hum. Toxicol., 23: 436-8, 1981.
- 282 - VAID, Y. et al. - Penicillin levels in milk following parenteral administration of procaine penicillin. J. Dairy Sci., 43: 842, 1960.
- 283 - Van EGMOND, H.P. - Mycotoxins in Dairy Products. Food Chem., 11: 289-307, 1983.
- 284 - Van EGMOND, H.P. et al. - The effect of processing on the aflatoxin M₁ content of milk and milk products. Arch. Inst. Pasteur (Tunis), 54: 381-90, 1977.
- 285 - Van PEE, W. et al. - La detection et le dosage de l'aflatoxine M₁ dans le lait et le lait en poudre. Rev. Agr., 30: 403-14, 1977.
- 286 - VARSAVSKY, E. et al. - Aflatoxinas: Su detección en maní y suelos de la Prov. de Córdoba, Rev. Asoc. argent. Microbiol., 5: 3-4, 1973.

- 287 - VARSAVSKY, E. & SOMMER, S.E. - Determination of aflatoxin in peanuts. Ann. Nutr., 31: 539-44, 1977.
- 288 - VICKERS, H.R. et al. - Dermatitis caused by penicillin in milk. Lancet, 1: 351-2, 1958.
- 289 - VIGUE, R.F. - Relative efficacy of three antibiotic combinations in bovine mastitis. J. Amer. vet. med. Ass., 124: 377-8, 1954.
- 290 - VOGEL, A.I. - Química analítica qualitativa. 5a. ed. São Paulo, Mestre Jou, 1981, p. 575.
- 291 - WAL, J.M. & BORIES, G. - Elimination de pénicilline libre et fixée sous forme de conjugués penicilloy-proteins dans le lait de vache après traitement par voie intramammaire. Ann. Biol. anim., 15: 615-17, 1975.
- 292 - WAL, J.M. - Evolution du concept de résidu dans les produits animaux des antibiotiques utilisés en élevage. Ann. Nutr., 33: 325-41, 1979.
- 293 - WEI, C. & HSIEH, D.P.H. - Aflatoxin in human and animal health. Proc. Ann. Meet. U.S. Hlth Ass., 84: 283-97, 1980.
- 294 - WELCH, H. - Problems of antibiotics in food as the Food and Drug Administration sees them. Amer. J. public Hlth, 47: 701-5, 1957.
- 295 - WELCK, H. et al. - Antibiotics in fluid milk. Antib. and Chemother., 5: 571-3, 1955.

- 296 - WELCH, H. et al. - Antibiotics in fluid market milk. Antibiot. and Chemother., 6: 369-74, 1956.
- 297 - WELSH, H. et al. - Antibiotics in fluid milk. Antibiot. and Chemother., 5: 571-3, 1955.
- 298 - WESSEL, J.K. & STOLOFF, L. - Regulatory surveillance for aflatoxin and other mycotoxins in feed, meat and milk. J. Amer. vet. med. Ass., 163: 1284-7, 1973.
- 299 - WILSON, B.J. - Hazards of mycotoxins to public health. J. Food Protec., 375-84, 1978.
- 300 - WISEMAN, D.W. & MARTH, E.H. - Behavior of aflatoxin M₁ in yogurt, buttermilk and kefir. J. Food Protec., 46: 115-8, 1983.
- 301 - WISEMAN, D.W. & MARTH, E.H. - Stability of aflatoxin M₁ during manufacture and storage of a butter-like spread, non-fat dried milk and dried buttermilk. J. Food Protec., 46: 633-6, 1983.
- 302 - WISEMAN, D.W. & MARTH, E.H. - Behavior of aflatoxin M₁ during manufacture and storage of queso blanco and baker's cheese. J. Food Protec., 46: 910-3, 1983.
- 303 - WISEMAN, D.W. et al. - Distribution and resistance to pasteurization of aflatoxin M₁ in naturally contaminated whole milk, cream and skim milk. J. Food Protec., 46: 530-2, 1983.

- 304 - WISHART, D.F. - Antibiotics in milk. Vet. Ann., 23: 71-8, 1983.
- 305 - 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.
- 306 - WOGAN, G.N. - Chemical nature and biological effects of the aflatoxins. Bact. Rev., 30: 460-70, 1966.
- 307 - WOGAN, G.N. et al. - Structure - activity relationship among aflatoxin and analogs. Acute toxicity and carcinogenic potency. Cancer Res., 31: 1936-42, 1971.
- 308 - WOGAN, G.N. & PAGLIALUNGA, S. - Carcinogenicity of shynthethic aflatoxin M₁ in rats. Food Cosmet. Toxicol., 12: 381-4, 1974.
- 309 - WRIGHT, C.L. - Antibiotic residues in milk. Vet. Rec., 108: 20, 1981.
- 310 - YNDESTAND, M. & UNDERDAL, B. - Aflatoksin i naeringsmidler pa det. norske. marked. (Aflatoxin in foods on the Norwegian market). Nord. vet.-med., 27: 42-8, 1975.
311. - ZIMMERMAN, M.C. - Chronic penicillin urticaria from dairy products proved by penicilinase cures. Archs. Derm. Syph., 79: 1-6, 1959.