

DETECCIÓN DE ANTIBIÓTICOS EN LECHE COMERCIALIZADA EN LA CIUDAD DE MÉXICO

Acacia Ramírez*, R. Gutiérrez*, Clementina González*, Irma Escobar*, G. Castro*, G. Díaz* y M. Noa**

*Departamento de Producción Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, Colonia Villa Quietud, México, D.F., C.P. 04960;

**Departamento de Farmacología y Toxicología, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, La Habana, Cuba, C.P. 32700

RESUMEN: El uso de antibióticos en el control de la mastitis ha propiciado un incremento mundial de la producción lechera, pero su manejo inadecuado trae como resultado la contaminación de la leche con residuos de los mismos, lo cual representa un serio problema para la salud pública y la industria láctea. El propósito de este trabajo fue determinar la presencia de residuos de antibióticos en leches pasteurizadas en la Ciudad de México. Para ello se tomaron 102 muestra de leche de las cuatro marcas comerciales más consumidas en la Ciudad de México durante 12 meses, que fueron analizadas para detectar residuos de ampicilina, cloranfenicol, dicloxacilina, eritromicina y penicilina G, utilizando un método de análisis basado en cromatografía en capa delgada de alta resolución combinada con bioautografía (HPTLC- B). Se encontró una frecuencia superior al 50% de muestras positivas en todas las marcas, siendo la frecuencia relativa del 65,22%, 69,56%, 73,91% y 86,96% para las marcas A, B, C y D respectivamente. Los valores de Rf promedio del compuesto encontrado con más frecuencia ($\approx 0,40$), indican que presumiblemente se trata de la misma sustancia, pero su identificación no fue posible, al no coincidir con ninguno de los antibióticos utilizados como referencia. Se identificaron residuos de cloranfenicol en 5 muestras, lo que indica que la prohibición de su uso en animales lactantes no se cumple realmente. Los resultados evidencian que la gran mayoría de las muestras contenían residuos de antibióticos, lo cual es altamente preocupante, y coincide con los señalamientos de otros autores en tal sentido.

(Palabras clave: residuos; antibióticos; cromatografía en capa delgada de alta resolución; HPTLC; bioautografía; leche; cloranfenicol)

DETECTION OF ANTIBIOTICS IN COMMERCIALIZED MILK IN MEXICO CITY

ABSTRACT: The presence of antibiotic residues in milk is undesirable due to their harmful effects on human health and the production of dairy products. The purpose of this work was to determine the presence of antibiotic residues in four of the highest consumption pasteurized milk brands in Mexico City. 102 samples were collected from milk during 12 months and tested for antibiotic residues using a high performance thin- layer chromatography- bioautographic method (HPTLC-B). The antibiotic residues tested were ampicilline, chloramphenicol, dicloxacillin, erythromycin and penicillin G. The total relative frequency of positive samples was higher than 50%; the incidence of contaminated samples by trademark was 62,22%, 69,56%, 73,91% and 86,96 % for trademarks 1, 2, 3 and 4. The Rf values for the most frequently found residue (0,40) indicate the presence of the same substance in all the cases. The identity of this inhibitor was not established, because of the absence of the appropriate analytical standards. Chloramphenicol residues were found in 5 samples, indicating that the prohibition of the use for this drug is not carried out. These results indicate that most of the milk samples showed antibiotic residues. The situation is highly worrying, and the coincidence with other authors is outstanding.

(Key words: antibiotic residues; high performance thin-layer chromatography; HPTLC; bioautography; milk; chloramphenicol)

INTRODUCCIÓN

Los antibióticos constituyen posiblemente el grupo de fármacos más utilizado en la industria pecuaria, ya sea como aditivos o como sustancias terapéuticas (18). La producción de leche en el mundo se ha incrementado, favorecido, entre otros factores, por el uso de agentes antimicrobianos para tratar enfermedades infecciosas, particularmente mastitis, pero el uso clínico inadecuado de estas sustancias da como resultado la contaminación de la leche con residuos, (11) lo cual plantea un serio problema para la salud pública y la industria láctea.

En este sentido, la presencia de residuos de antibióticos en leche, resulta indeseable, ya que estos pueden causar daños adversos a la salud del consumidor, como el desencadenamiento de procesos alérgicos, el origen de microorganismos patógenos resistentes y cambios en el comportamiento de la flora gastrointestinal, así como efectos tóxicos directos. Para la industria procesadora, los residuos representan pérdidas millonarias por la imposibilidad de producir derivados lácteos debido a la inhibición de los procesos de fermentación.

Para la detección de antibióticos en la leche se emplean tres tipos de métodos de análisis: microbiológicos, físico- químicos e inmunoenzimáticos. Cada uno de estos métodos posee ventajas y desventajas en aspectos de costo, rapidez de respuesta y especificidad, que los hacen adecuados o no para cada fin propuesto (1, 2, 3, 14).

Por lo anterior se recomienda usar un método de monitoreo para la detección de inhibidores y un segundo método de confirmación para identificar específicamente los inhibidores detectados (8). La combinación de procedimientos físico- químicos instrumentales (HPLC y CGL), también conocidos como métodos de confirmación, ofrecen como ventajas cuantificar la cantidad de un compuesto específico o su tipo e identifican positivamente al compuesto, ofreciendo la mayor confiabilidad para la cuantificación e identificación de su estructura al nivel de interés (7).

En México las autoridades sanitarias suelen desatender en sus programas de control los efectos nocivos a largo plazo que pueden presentar muchas sustancias y esto favorece su uso ilegal e indiscriminado. Mientras en otros países tienen aproximadamente 40 años con programas oficiales de control de residuos, en México son prácticamente inexistentes y por desgracia el nivel técnico-científico cuando menos a lo que a residuos se refiere, es poco estudiado (15).

En México se encuentran actualmente en el listado de antibióticos aprobados para uso pecuario, la Amoxicilina, Ampicilina, Cloxacilina, Dicloxacilina, Penicilina G, Tetraciclina, Oxitetraciclina, Estreptomina, Dihidroestreptomina, Neomicina, Gentamicina, Kanamicina, Lincomicina y la Pirlimicina (6).

Sobre la base de las consideraciones anteriores, el objetivo de este trabajo es contribuir al estudio de la presencia de residuos de antibióticos en la leche consumida en la Ciudad de México, utilizando HPTLC con bioautografía, un método de análisis que combina los principios de separación físico- químicos con la detección microbiológica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se colectaron 102 muestras de leche pasteurizada procedentes de las cuatro marcas más distribuidas en la Ciudad de México, tomadas aleatoriamente en supermercados, con una frecuencia quincenal, durante 12 meses, así como 23 muestras de leche cruda tomadas simultáneamente, y que se utilizaron como control negativo.

Las muestras se analizaron dentro de las 24 horas de obtenidas hasta la obtención del extracto final listo para ser analizado, lo que se efectuó dentro de las 48 horas siguientes. Para el análisis se utilizó un método de cromatografía en capa delgada de alta resolución (HPTLC) /bioautografía (HPTLC-B), que permite obtener los resultados del análisis en menos de 24 horas, y que, descrito brevemente, es como sigue: las muestras de leche se calentaron en baño de agua a 40°C y se homogeneizaron por agitación manual, ajustando su pH entre 5 y 6 con ácido clorhídrico 0,1 M. Los residuos de antibióticos se extrajeron con acetonitrilo, se desgrasó con n- hexano, seguido de una purificación por partición líquido- líquido con diclorometano. Para la identificación de cada antibiótico se aplicó el extracto de las muestras en placas cromatográficas de HPTLC de silicagel 60 de 5x5 cm. La placa cromatográfica se corrió en una fase móvil consistente en diclorometano: metanol: acetona: glicerina (64:20:15:1 v/v), se secó y enfrentó a una bioplaca, consistente en placas de Petri desechables de 150 mm de diámetro conteniendo (10 ml de Agar de Mueller-Hinton inoculada con *Bacillus subtilis* ATCC 6633. La bioplaca se tapó e incubó invertida hasta el siguiente día.

Conjuntamente con las muestras, se aplicaron concentraciones conocidas de los antibióticos analizados (Ampicilina, Cloranfenicol, Dicloxacilina, Eritromicina

y Penicilina G), así como de muestras contaminadas con concentraciones de 0,01 mg/l de 2 antibióticos, como control positivo.

La aparición de inhibiciones en la bioplaaca al mismo valor de Rf de los patrones de trabajo aplicados en la misma placa cromatográfica indica la presencia del antibiótico coincidente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La presencia de inhibiciones registrada en los 23 muestreos realizados en leches pasteurizadas de cuatro marcas comerciales y en leche cruda se muestra en la Tabla 1. Se encontró una frecuencia relativa mayor al 50%(n>12), tanto en las marcas comerciales,

TABLA 1. Frecuencia de inhibiciones en leches pasteurizadas de 4 marcas comerciales y en leche cruda./ *Frequency of inhibitions in pasteurized milks of 4 commercial brands and in raw milk*

Muestreo	Marcas				Leche cruda
	A	B	C	D	
1	+	+	+	+	+
2	+	-	+	+	+
3	+	+	+	+	+
4	-	-	+	+	-
5	-	-	-	-	-
6	+	+	+	+	-
7	-	-	-	-	-
8	-	-	-	+	+
9	+	+	+	-	+
10	+	+	+	+	+
11	+	-	+	+	-
12	+	+	+	+	+
13	+	+	+	+	-
14	+	+	-	+	-
15	+	+	-	+	+
16	-	+	+	+	-
17	+	+	+	+	+
18	+	+	+	+	+
19	+	+	+	+	+
20	-	+	+	+	+
21	-	-	-	+	+
22	+	+	+	+	-
23	-	+	+	+	+
Frecuencia	15	16	17	20	14
Porcentaje	65.22	69.58	73.91	86.96	60.87

+ : Muestra positiva
 - : Muestra negativa

como en la leche cruda utilizada como control negativo. De esta manera, la marca D presentó inhibiciones en 20 muestras correspondiendo al 86.96% y, en forma descendente la marca C: 17, la marca B: 16, la marca A: 15 y la leche cruda: 14 con un 73.91%, 69.56%, 65.22% y 60.87%, respectivamente que se presentan en la Figura 1. Estos elevados porcentajes se deben seguramente al amplio uso de antimicrobianos en el control de la mastitis del ganado lechero y por el incumplimiento en el periodo de espera a que estos compuestos sean eliminados por el metabolismo animal, problema común en México, que ya ha sido señalado anteriormente por varios autores (18).

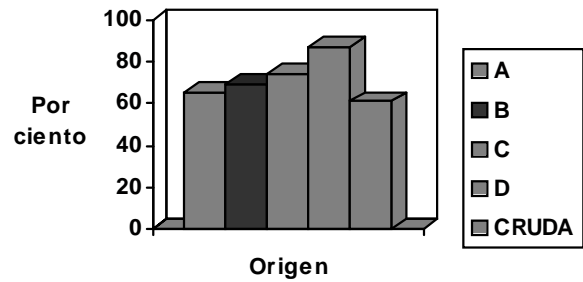


FIGURA 1. Por ciento de inhibiciones en leches pasteurizadas y cruda por marca./ *Percent of inhibitions in pasteurized and raw milks.*

A los antibióticos utilizados como estándares de referencia, así como a las muestras analizadas se les calculó su Rf, los cuales se muestran en la Tabla 2. Se identificó el cloranfenicol en 5 muestras; dos de la marca C, dos de leche cruda y una muestra de la marca D. La presencia del Cloranfenicol en algunas muestras de leche demuestra que aún tiene vigencia su uso en las actividades agropecuarias del país a pesar de que oficialmente ha sido prohibido en la medicina veterinaria (6).

Los valores de Rf promedio del compuesto más frecuentemente encontrado fueron de 0.41 para la marca A, 0.40 para la B y C, 0.39 para la marca D y 0.42 para la leche cruda lo que presumiblemente indican que se trate de la misma sustancia. No obstante, la identificación de dicho residuo no fue posible, ya que su Rf no coincidió con ninguno de los antibióticos utilizados como estándares de referencia, y no fue posible su análisis por métodos confirmatorios más potentes como espectrometría de masas.

TABLA 2. Valores de Rf para los antibióticos analizados y muestras de leche./ *Rf values for the analyzed antibiotic residues and milk samples*

Antibiótico	Rf	Leche	Rf
Ampicilina	0.12	MARCA A	0.41
Cloranfenicol	0.79	MARCA B	0.40
Dicloxacilina	0.19	MARCA C	0.40
Eritromicina	0.20		0.79*
Penicilina	0.21	MARCA D	0.39
			0.79**
		LECHE CRUDA	0.42
			0.75*

*: identificado como cloranfenicol en 2/23 muestras

**: identificado como cloranfenicol en 1/23 muestras

La metodología aquí descrita ha sido probada con anterioridad en otros países como Cuba y Canadá, permitiendo la detección de antibióticos en leche y carne (12), pero en nuestro caso no fueron determinadas las concentraciones de los residuos identificados.

La inhibición manifiesta anteriormente señalada con un $Rf > 0.40$ puede deberse a la presencia de inhibidores naturales presentes en la leche cruda que aún los procesos de pasteurización no eliminan por completo, pero también es muy probable que se trate de algún antibiótico o metabolito activo, cuestión que no fue posible demostrar.

Los patrones de referencia utilizados en este trabajo son los de mayor uso en la práctica agropecuaria del país; no obstante, es recomendable continuar con estos estudios para cubrir el espectro de dichos medicamentos por el significado en la identificación de residuos, en la productividad, sanidad animal y salud pública.

Existe gran diferencia entre países respecto a la incidencia de residuos de antibióticos en leche. Así por ejemplo, en China, Lidong (10) refirió un 80% de muestras positivas con sustancias extrañas, entre ellas antibióticos, en leches crudas procedentes de diferentes regiones del país. Sevyan *et al.* (17) reportaron en Armenia un 7% de positividad a penicilina en 43 muestras estudiadas, mientras que en 9 países europeos, de 337 muestras analizadas sólo el 1,2-1,5% fueron positivas en dependencia del método de prueba utilizado para la detección. En Grecia, Kalogridou-Vassiliadou *et al.* (9) encontraron un 20,2% de residuos de antibióticos en 336 muestras analizadas.

En Cuba, Noa y Cabrera (12) encontraron un 58% de positividad a antibióticos en leche que presentó problemas de coagulación en una industria láctea, con una incidencia en orden decreciente de penicilina G, tetraciclina y cloranfenicol, utilizando para el análisis CCD combinada con bioautografía.

En México, Cruz *et al.* (5) analizaron 125 muestras de leche pasteurizada de diferentes marcas comerciales por el método de cilindro en placa, encontraron que 9,6% de las muestras resultaron libres de antibióticos, el 25% contenían penicilina, el 60% estreptomycinina, el 70% tetraciclina y más del 80% contenían 2 o los 3 antibióticos. Por otro lado, Chombo (4) estudió muestras de leche procedentes de Jalisco y Michoacán, encontró 12% y 4% de positividad en dos zonas de Jalisco respectivamente, mientras que en Michoacán no se encontraron muestras positivas. La ausencia de casos positivos en Michoacán se atribuyó a la falta de recursos para la adquisición de antibióticos por parte de los productores lecheros de esa zona.

Los resultados del presente trabajo reflejan que el uso de antibióticos en la producción lechera de México es muy diverso, y consecuentemente, la detección de antibióticos específicos requiere de la inclusión de otros estándares de referencia para garantizar su identificación en las muestras de leche por analizar, aunque ello no es, por sí sólo, capaz de resolver el problema de la presencia de estas sustancias nocivas en la leche. El propio concepto de inocuidad de los alimentos, en este caso de la leche y sus derivados, está, en opinión de algunos autores, estrechamente ligado al de calidad, ya que se sabe que esta será inocua cuando carezca de adulterantes y la contaminación química y biológica no rebasa los límites máximos permitidos por la legislación sanitaria (16).

La prevención de la presencia de residuos en el suministro de la leche corresponde a la industria láctea, pero es el productor quien controla la aplicación de los tratamientos al ganado productor de leche. Estos factores hacen necesaria la implementación de programas de vigilancia de residuos en los alimentos. Los programas de vigilancia de residuos mediante la ejecución de monitoreos, tienen el objetivo de detectar la presencia de niveles nocivos en la leche antes de la elaboración y/o la venta de la misma, pero no están destinados en sí a resolver los problemas de la contaminación, ya que ni aún la metodología analítica más compleja disponible en la actualidad es capaz de detectar todas las sustancias posibles contaminantes de la leche, pero sí pueden ayudar en gran medida a controlarla mediante la aplicación de medidas apropiadas, tendientes a prevenir esta situación (13).

Los niveles de contaminación encontrados como resultado de este trabajo son alarmantemente elevados. Si bien el beneficio logrado mediante programas de vigilancia en países desarrollados es innegable, y en países con recursos económicos limitados como México, la vigilancia constante, a la fecha, utópica (19), es indispensable para la toma de medidas preventivas en su control.

REFERENCIAS

1. Andrew, S.M.; Frobish, R.A.; Paape, M.J.; Maturin, L.J. (1997): Evaluation of selected antibiotic residue screening tests from individual cows and examination of factors that affect the probability of false- positive outcomes. *J. Dairy Sc.* 80: 3050-3057.
2. Biancotto, G.; Angeletti, R.; Piro, R.D.M. (1996): Detection of veterinary drugs in foodstuffs using gel permeation. *Analyst.* 121: 229- 232.
3. Carson, M.C.; Pank-Sin C.; von Bredow, J. (1996): Procedures for determination of (- lactam antibiotics in milk, in *Veterinary Drug Residues*, edited by Moats, W. A. and Medina, M. B., ACS Symposium series 636, published by the American Chemical Society. 108- 120.
4. Chombo, M.P. (1999): El reto que sobre calidad enfrentan los productores mexicanos, en *Dinámica del Sistema Lechero Mexicano en el Marco Regional y Global*, coordinado por Martínez, B., E., Álvarez, M., A., del Valle, M.C. Plaza y Valdés Editores, México, D.F.
5. Cruz, A.M.; Pérez, D.M. y Velázquez, Q.F. (1986): Frecuencia de la contaminación de la leche disponible en el Valle de México con estreptomycin, tetraciclina y penicilina. *Salud Pública de México.* 28(4): 438-432.
6. Directorio de Medicina Veterinaria, Nutrición y Zootecnia. (1997): 1ª Edición. Mercadeo Estadístico, S. C., México, D.F.
7. Heesch, W.H.; Blüthgen, A. (1991): *Veterinary drugs and pharmacologically active compounds. Monograph on Residues and Contaminants in Milk and Milk Products.* FIL/IDF. 16-39.
8. Heesch, W.H.; Suhren, G. (1996): Principles of and practical experiences with an integrated system for the detection of antimicrobials in milk. *Milchwissenschaft.* 51(3): 154-160.
9. Kalogridou-Vassiliadou, D.; Tsigoida, A.; Manolkidis, K. (1992): Relation between methylene blue reduction time and plate count in milk samples with or without antibiotic residues. *Microbiologie, Aliments, Nutrition.* 10(1): 77- 81.
10. Lidong, F. (1992): Adulteration of farm milk in China. *Food Lab. News.* 8(1): 39-42.
11. Monge, R.; Arias, L. y Ellner, R. (1993). Contamination of bovine milk with residues of inhibitory substances in Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 41(3): 855-856.
12. Noa, M.; Cabrera, M.C. (1992). Residuos de antibióticos en leche no apta para yogurt por cromatografía en capa delgada/bioautografía (CCD-B). *Rev. Salud Anim.* 14: 181-186.
13. Noa, M.; Pérez, N.; Gutiérrez, R.; Escobar, A. (1999): *Los residuos químicos en la leche: Importancia y problemática actual.* Universidad Autónoma Metropolitana- Xochimilco. Serie Académicos C.B.S. Inédito.
14. Nows, J.F.M.; Loeffen, G.; Schouten, J.; van Egmond, H.; Keukens, H.; Stegeman, H. (1998): Testing of raw milk for tetracycline residues. *J. Dairy Sc.* 81: 2341-2345.
15. Ramírez, A. (1993): *Empleo de la Norma Oficial Mexicana (NOM-F-425 83) en el monitoreo de residuos de inhibidores en leche.* 17 al 21 mayo de 1993. México, D.F., editado por la UAM-X. 58-65.
16. Ramírez, A. (1995): *Conceptos normativos respecto a la higiene alimentaria.* 1er. Curso- Taller sobre Higiene y Tecnología de la Leche, Universidad de Guadalajara, Jalisco, México.
17. Sevyan, T.K.; Akopyan, Z.M.; Shakaryan, G.A. (1989): Levels of antibiotic residues in products of animal origin. *Biologicheskii Zhurnal Armenii.* 42(5): 485-487.
18. Suhren, G.; Hammer, P.; Shakaryan, G.A. (1994): Inhibitor substances, antibiotics and sulfonamides. *Kieler Milchw. Forcsch.* 46(3): 247-248.
19. Sumano, H.S.; Ocampo, L. (1997): *Farmacología Veterinaria.* Segunda Edición. McGraw- Hill Interamericana, Healthcare Group, México, D.F.

(Recibido 11-11-99; Aceptado 5-6-2000)