

PENICILINA G EN LECHE PASTEURIZADA PRODUCIDA EN EL ESTADO ZULIA - VENEZUELA

Penicillin G in Pasteurized Milk Produced in Zulia State - Venezuela

María Allara, Pedro Izquierdo, Gabriel Torres y Belkis Rodríguez

Unidad de Investigación Ciencia y Tecnología de Alimentos (UDICTA), Facultad de Ciencias Veterinarias. La Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela. Apartado 15252. E-mail: allara@mipunto.com izquier@cantv.net

RESUMEN

La legislación venezolana sobre leche cruda no acepta la adición de compuestos diferentes a su naturaleza, sin embargo, algunos estudios demuestran la presencia de inhibidores microbianos en leches crudas y procesadas del país. Entre los posibles inhibidores se encuentra la Penicilina G, que puede hallarse en la leche posterior al uso terapéutico en vacas con mastitis. La presencia de este antibiótico en leche, puede causar reacciones alérgicas en personas susceptibles. Por otra parte, contribuye a la resistencia en microorganismos patógenos. En esta investigación se determinó la presencia de Penicilina G en leche pasteurizada elaborada en el estado Zulia. Se analizaron 104 muestras, de 8 marcas comerciales. La determinación del antibiótico se hizo por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), utilizando la técnica de extracción con fosfato diácido de amonio y metanol, propuesta por Faría y col en el año 2000. La fase móvil consistió en buffer fosfato - metanol (65:35 v/v). El cromatógrafo líquido estaba equipado con una bomba (sistema isocrático), una columna C18, un detector UV Visible, a una longitud de onda de 230 nm y un integrador Class-Vp. Los resultados indicaron que 1 muestra (0,96%), presentó Penicilina G, en una concentración de 0,95 ppm. Esta baja incidencia pudo deberse al descarte del ordeño del animal bajo tratamiento, o a que se estén utilizando antibióticos diferentes a Penicilina G en el tratamiento de la mastitis. Estos resultados son favorables para la población sensible a la penicilina, consumidora del producto, y para la industria encargada de la producción de alimentos derivados de la leche.

Palabras clave: Penicilina G, leche pasteurizada, HPLC.

ABSTRACT

Venezuelan legislation on raw milk prohibits addition of non-natural milk compounds. However, several studies show the presence of antibiotics on raw and processed milk in this country. Among possible inhibitors Penicillin G can be present in milk after treatment for bovine mastitis. The presence of this antibiotic could cause allergic reactions in people. Penicillin can also increase resistance in pathogenic microorganisms. The objective of this research was to detect the presence of Penicillin G in pasteurized milk produced in Zulia State. A total of 104 samples from 8 commercial milk brands were analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC), using the method proposed by Faria et al (2000). In order to detect Penicillin G, ammonium diacid phosphate and methanol were added to milk. The mobile phase consisted of phosphate buffer: and methanol (65:35 v/v) as an effluent. The equipment consisted of a pump (isocratic condition), a C18 reverse-phase column, an UV-VIS detector at 230 nm and a Class-VP integrator. Results showed that only 1 sample (0.96%) contained Penicillin G, at a concentration of 0.95 ppm. This low incidence could be attributed to the withdrawal of treated cows or to the use of antibiotics different of Penicillin G. The results are favorable to milk consumers and for the dairy industry.

Key words: Penicillin G, pasteurized milk, HPLC.

INTRODUCCIÓN

La Penicilina G es un antibiótico utilizado para el tratamiento de infecciones del tracto respiratorio, gastrointestinal y urinario del ganado bovino, además de ser frecuentemente utilizado en el control de la mastitis [1, 3, 8, 9, 27], enfermedad que ocasiona pérdidas económicas en muchos países. En la Cuenca del Lago de Maracaibo, estado Zulia-Venezuela, se han estimado pérdidas anuales causadas por la mastitis bovi-

na en el orden de 54 millones de litros de leche, mientras que en la zona Sur del Lago de Maracaibo, ha conllevado a una disminución del 17,91% de la producción de leche, lo que representa un total de 24.656.735 litros por año [4].

La Penicilina G no es un constituyente normal de la leche, su presencia en este alimento es indicativo de contaminación, producida por el ordeño del animal que ha sido tratado con antibióticos, sin el respeto del tiempo de retiro de la leche, y representa un riesgo para la Salud Pública, debido al desarrollo de reacciones alérgicas en personas sensibles, estimándose que aproximadamente un 5% de la población mundial es sensible a la Penicilina [3, 28, 41].

Es probable que por el consumo de leche contaminada con Penicilina G se produzca la ingestión de bacterias resistentes a los antibióticos, incrementándose la resistencia bacteriana [9, 39]. Trabajos realizados en el área de resistencia a los antimicrobianos [5, 13, 30, 31], han reportado un aumento en los patrones de resistencia en microorganismos aislados de leche de vacas con mastitis, positiva a la presencia de antibióticos.

Staphylococcus aureus y *Streptococcus agalactiae* se encuentran entre los principales microorganismos causantes de mastitis bovina, aislados de fincas lecheras de los estados Aragua y Carabobo - Venezuela [37]. A pesar que en 1976 se reportó una elevada sensibilidad *in vitro* a la Penicilina (89 cepas de un total de 100) de estafilococos hemolíticos aislados de leche procedentes de vacas con mastitis en el estado Zulia [16], recientemente se ha encontrado una resistencia a la Penicilina del 100% en cepas de estafilococos aislados de leche cruda contaminada con antibióticos [19]. Estudios en cepas de *Pseudomonas sp.* y *Acinetobacter sp.* [21], así como también Enterobacterias [22], *Bacillus sp.* [18], y *Enterococcus sp.* [23], aisladas de leche cruda contaminada con antibióticos, proveniente del estado Zulia, han mostrado resistencia a varios de los antimicrobianos utilizados comúnmente para el tratamiento de la mastitis, entre estos Penicilina.

Adicionalmente, la presencia de antibióticos en leche, causa inhibición de las bacterias iniciadoras utilizadas en la elaboración de productos lácteos como el yogurt, el queso y la mantequilla [3, 9, 10]. En Venezuela, Cabrera y col. [12], estudiaron el efecto de diferentes concentraciones de Penicilina sobre la producción de ácido láctico por cepas usadas como cultivos iniciadores del queso tipo palmita venezolano, y encontraron que 18,2% de los cultivos de *E. faecalis* resultaron resistentes al antibiótico en concentraciones de 20 Unidades Internacionales/mL (UI/mL), mientras que la totalidad de los cultivos resultaron inhibidos a concentraciones de 40 UI/mL.

La legislación venezolana sobre leche cruda no acepta la adición de compuestos diferentes a su naturaleza, siendo la refrigeración el único medio de conservación permitido para su preservación [14]. Sin embargo, algunos estudios demuestran la presencia de inhibidores microbianos en leches crudas y procesadas del país. En tal sentido, la incidencia de antimicrobianos en leche cruda ha incrementado de 20,4% en 1994 [35]

a 22,5% en 1996 [20]. En el año 1977 se reportó un porcentaje de inhibidores microbianos en leche pasteurizada de 31%, mientras que en 1990 fue 67% [11]. Santiago en 1986 [36] detectó la presencia de antibióticos en el 68% de las muestras de leche pasteurizada, así mismo también se ha reportado la presencia de antibióticos en leche en polvo [40].

A pesar de que en Venezuela se han realizado estudios con la finalidad de detectar la presencia de antibióticos en alimentos por métodos cualitativos, se tiene muy poca información acerca de la concentración de estos compuestos. Considerando esto como un problema de Salud Pública se realizó esta investigación, que tuvo como objetivo determinar por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), la presencia y concentración de Penicilina G en varias marcas comerciales de leche pasteurizada que se expenden en la ciudad de Maracaibo, y conocer si las concentraciones halladas se encuentran dentro de los límites permitidos internacionalmente por la Organización Mundial de la Salud.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección y preparación de la muestra de leche pasteurizada

Se recolectaron 104 muestras de leche pasteurizada, de 8 marcas comerciales, (13 por marca comercial), adquiridas en establecimientos (panaderías y supermercados), ubicados en el Municipio Maracaibo del estado Zulia. Para cada marca comercial las muestras de leche pasteurizada tenían diferentes fechas de elaboración y números de lote. Posterior a la obtención de las muestras, estas fueron transportadas en sus envases originales, bajo refrigeración, al Laboratorio para su análisis.

La extracción y cuantificación de Penicilina G en leche por HPLC se realizó según la metodología desarrollada por Faría y col. [17], que utiliza como solución extractora fosfato diácido de amonio ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) 0,01 M y metanol (15:10 v/v).

Especificaciones del cromatógrafo

La determinación cualitativa y cuantitativa del antibiótico se realizó con un Cromatógrafo Líquido (Shimadzu Corporation), de la serie 6, integrado por un sistema controlador de inyección automática SCL-6B, con un loop de inyección de 100 μL , una bomba LC6A, un detector ultravioleta UV-VIS modelo SPD6AV, que se colocó a una longitud de onda de 230 nm, y un computador Class VP. La columna utilizada fue de Fase Reversa C18 Ultrasphere ODS marca Beckman (125 mm x 4 mm \varnothing x 5 μm).

Fase móvil

Se utilizó el sistema isocrático propuesto por Faría y col. [17], con una fase móvil constituida por buffer fosfato 0,01 M, pH 7 - metanol, en una proporción de 65:35. El flujo de la fase móvil fue de 1,2 mL/min.

Cálculo de la concentración de Penicilina

Para la identificación y cuantificación del antibiótico se preparó un estándar de Penicilina G (Sigma) de 50 ppm en una solución de metanol: (NH₄H₂PO₄) (10:15 v/v). El cálculo de concentración de Penicilina G en las muestras de leche pasteurizada, se realizó utilizando el método del estándar externo [34], el cual compara el área del pico en la muestra, con el área correspondiente al estándar de referencia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la presente investigación, de un total de 104 muestras de leche pasteurizada analizadas, el 0,96% (1) de las muestras resultó positivo a la detección de Penicilina G. La concentración de Penicilina encontrada en la muestra que resultó positiva fue de 0,95 ppm, la cual supera el límite de antibióticos en leche establecido por la Organización Mundial de la Salud, que corresponde a 0,2 ppm [25].

Investigadores de la Región Zuliana [11, 20, 36, 40], han reportado cifras elevadas de inhibidores microbianos en leche cruda, pasteurizada y en polvo, resultados no comparables con los obtenidos en la presente investigación, debido a la especificidad del método empleado. Adicionalmente, a pesar que la Penicilina G constituye uno de los antibióticos de elección en el tratamiento de la mastitis bovina [3, 26], es posible que se esté utilizando otros antibióticos tales como Cefalosporinas, Tetraciclinas, Aminoglicósidos y Sulfonamidas, situación esta que ha sido reportada en otros países [29]. Por otro lado, la implementación de medidas profilácticas como el descarte de la leche de vacas en tratamiento con antibióticos y el control de la dosis administrada al animal [3, 24], por parte del productor ganadero, también pudiesen explicar estos resultados.

Los hallazgos del presente estudio, difieren de los realizados en Costa Rica, Trinidad y México [6, 2, 15], quienes en leche pasteurizada reportaron una incidencia de Penicilina G de 88%, 90,3% y 25%, respectivamente. Cruz y col [15] reportaron una concentración promedio del Penicilina G de 0,11 UI/mL. A diferencia de trabajos desarrollados en otros países como Argentina, Brasil y Alemania [33, 32, 38], donde se reportaron en leche pasteurizada porcentajes de 1,5, 0,70 y 0,17, respectivamente. Así mismo, un reciente trabajo realizado en Costa Rica en el año 1999 reporta 0% de antibióticos en leche [7].

En Estados Unidos de Norteamérica, desde el año 1992 es obligatorio el estudio de residuos de antibióticos en leche, por lo que se ha implementado un Protocolo para la Prevención de Residuos en Leche, el cual está constituido por una lista de 10 aspectos que promueven el concepto de Análisis de Peligro de Puntos Críticos de Control (HACCP). El HACCP, entre otros aspectos contempla el uso de pruebas de detección de antibióticos y la correcta administración de medicamentos, cumpliendo con los tiempos de descarte de la leche [1]. Las campañas de concientización al productor y la aplicación de severas multas,

conllevó en este país a una reducción significativa en la incidencia de antibióticos en leche, de 5,2% a 0,54%, entre el período de 1950-1960, respectivamente [1, 3].

CONCLUSIONES

La incidencia de Penicilina G en el total de muestras analizadas fue baja con relación a la reportada por otros autores, en el estado Zulia y a nivel internacional. Quizás el tiempo de descarte del ordeño proveniente del animal que está recibiendo tratamiento, o la utilización de antibióticos diferentes de Penicilina G en el tratamiento de la mastitis, puedan estar influyendo en los resultados.

El alto porcentaje de muestras de leche exentas de Penicilina G es un hallazgo favorable para el consumidor zuliano así como para la industria encargada de la producción de alimentos derivados de la leche.

Se recomienda que se realicen trabajos de investigaciones similares, considerando la aplicación de métodos cromatográficos específicos para otros antibióticos usados en el tratamiento terapéutico de la mastitis bovina, entre los cuales se encuentran: Clortetraciclina, Cefalosporina, Tetraciclinas, Aminoglicósidos y Sulfamidas.

AGRADECIMIENTO

Los autores desean agradecer al Consejo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES-LUZ) por el soporte financiero, sin el cual no hubiese sido posible realizar esta investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ADAMS, J. Symposium: Impact of Drug Control Measures. Result of Drug screening from a producer's view. **J. Dairy Sci.** 77 (7): 1933-1935. 1994.
- [2] ADESIYUN, A.; WEBB, L.; BALBIRSINGH, V. Prevalence of antimicrobial residues in pre-processed and processed cow's milk. **J. Food Safety.** 16(4): 301-310. 1997.
- [3] ALBRIGTH, J.; TUCKEY, S.; WOODS, G. Antibiotics in milk. A review. **J. Dairy Sci.** 44: 779-807. 1961.
- [4] ALONSO, F. Programas de Control de Mastitis Subclínica Bovina en la Cuenca del Lago de Maracaibo. Su estrategia, resultados y economía. **Revista Veterinaria Venezolana.** XLVII (272-273): 11, 67. 1981.
- [5] ANDERSEN, N. Acute clinical mastitis in agriculture practice. **Dansk Veterinaer.** 79 (11): 569-574. 1987.
- [6] AREAS, M.; ANTILLON, F.; CUBILLO, Z. Residuos de Penicilina en leche bovina en Costa Rica. **Rev. Costarric. Cienc. Med.** 9 (2): 125-129. 1988.

- [7] BAYNES, R.; LYMAN, R.; ANDERSON, K.; BROWNIE, C.A. Preliminary survey of antibiotic residues and viable bacteria in milk from three Caribbean basin countries. **J. Food Prot.** 62(2): 177-180. 1999.
- [8] BOISON, J.; KENG, L.; MAC NEIL, J. Analysis of Penicillin G in milk by liquid chromatography. **J. AOAC International.** 77(3): 565-569. 1994.
- [9] BOOTH, J.; HARDING, F. Testing for antibiotics residues in milk. **Vet. Rec.** 119: 565-569. 1986.
- [10] BOOTH, J. Intramammary antibiotic preparations and their withholding times. **Vet. Rec.** 119: 34-35. 1986.
- [11] BOSCÁN, L.; FARÍA, J.; SÁNCHEZ, M. Calidad química y microbiológica de la leche en Venezuela. Capítulo XXIX. P 605-629. In: **Ganadería Mestiza de Doble Propósito**. Carlos González-Stagnaro Editor. Maracaibo, Venezuela. 1992.
- [12] CABRERA, L.; FERRER, A.; OJEDA, G.; SULBARÁN, B. Efecto de la penicilina y la estreptomina sobre cultivos iniciadores utilizados en la elaboración del queso tipo palmita venezolano. **Revista Científica, FCV-LUZ.** IX (1): 5-10. 1999.
- [13] COSTA, R.; CARVALHO, F.; ANDRADE, M. Mastite Bovina Sensibilida de Agentes Etiológicos a Antibióticos e Quimioterápicos. **Anais Esc. Agron. Vet.** 14/15/16 (1): 79-85. 1984/1985/1986.
- [14] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES COVENIN. Norma 1200-81. Leche cruda. Determinación de Sustancias Conservadoras. Ministerio de Fomento, Caracas. 1981.
- [15] CRUZ, M.; PÉREZ, M.; VELÁSQUEZ, F. Frecuencia de la contaminación de la leche disponible en el Valle de México con estreptomina, tetraciclina y penicilina. **Salud Pública Méx.** 28 (4): 438-442. 1986.
- [16] D'POOL, G. Susceptibilidad "In vitro" de Estafilococos Hemolíticos aislados de Mastitis Bovina en el Estado Zulia. La Universidad del Zulia. Facultad de Ciencias Veterinarias. Trabajo de Ascenso. 42 pp. 1976.
- [17] FARÍA, J.; ALLARA, M.; ARENAS, L.; MÁRQUEZ, E. Extracción y Cuantificación de Penicilina G en Leche Cruda por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). **Revista Científica, FCV-LUZ.** X (3): 212-221. 2000.
- [18] FARÍA, J.; ALLARA, M.; IZQUIERDO, P.; D'POOL, G.; GARCIA, A.; VALERO, K. Resistencia a los antimicrobianos de especies de *Bacillus* aislados de leche cruda. **Revista Científica, FCV-LUZ.** XI (6): 479-484. 2001.
- [19] FARÍA, J.; GARCÍA, A.; MÁRQUEZ, A.; MANZANILLA, B.; MORALES, D.; GARCÍA, A. Resistencia a los antimicrobianos de *Staphylococcus* aislados de leche cruda. **Revista Científica, FCV-LUZ.** IX (4): 343-348. 1999.
- [20] FARÍA, J.; MANZANILLA, B.; MÁRQUEZ, A.; MORALES D. Aislamiento de Gram Positivos en Leche Cruda con Antibióticos. Maracaibo: La Universidad del Zulia, Facultad de Medicina. Escuela de Bioanálisis. Trabajo de Grado. 50 p.p. 1996.
- [21] FARÍA, J.; RIVERO, Z.; GALLEGO, B.; ALLARA, M. Resistencia a los antimicrobianos y Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de BGNNFG Aislados de Leche Cruda. **Revista Científica, FCV-LUZ.** IX (1): 11-16. 1999.
- [22] FARÍA, J.; RIVERO, Z.; GALLEGO, B.; GARCIA, A. Resistencia a los antimicrobianos y Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de Enterobacterias aisladas de Leche Cruda. **Revista Científica, FCV-LUZ.** VIII (4): 315-322. 1998.
- [23] FARÍA, J.; VALERO, K.; IZQUIERDO, P.; GARCIA, A.; ALLARA, M. Resistencia a los antimicrobianos de *Enterococcus* aislados de leche cruda. **Revista Científica, FCV-LUZ.** XII (1): 29-35. 2002.
- [24] GUEST, G.; PAIGE, C. The magnitude of the tissue Residue Problems with Regard to Consumer Needs. **JAVMA.** 198 (5): 805-808. 1991.
- [25] INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION BULLETIN. Document 157. 1983.
- [26] JAWETZ, E.; MELNICK, J.; ADELBERG, E. **Microbiología Médica.** Décima Cuarta Edición. Editorial Manual Moderno México. p.p. 162-163. 1992.
- [27] KIRCHMANN, E.; WELCH, L. High performance liquid chromatographic separation and electrochemical determination of Penicillins. **J. Chrom.** 633: 111-118. 1993.
- [28] KITCHEN, D. Reactions to Penicillin. **Am. J. Syphilis, Gonorrhea and Venereal Diseases.** 35: 578-594. 1951.
- [29] KANEENE, J.; MILLER, R. Description and Evaluation of the Influence of Veterinary Presence of the use Antibiotics and Sulfonamides in Dairy Herds. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 68-76. 1980.
- [30] LANGLOIS, B.; FIZENSTAT, J.; BULL, L.; HEMKEN, R. Antibiotic Resistance of Enteric Bacteria isolated from Milk and Faeces. **J. Dairy Sci.** 63 (Suppl 1): 124. 1980.
- [31] MACKIE, D.; LOGAN, E.; POLLOCK, D.; RODGERS, S. Antibiotic sensitivity of bovine staphylococcal and coliform mastitis isolated over four years. **Vet. Rec.** 123 (20): 515-517. 1988.
- [32] MARTINS, J.; MARTINS, I. Inibidores bacterianos no leite tipo "B" comercializado no municipio de São Paulo, SP (Brasil). **Rev. Saúde Pública.** 19 (5): 421-430. 1985.
- [33] POSTIGO, C.; VAUTIER, H. Hallazgo de penicilina y otras drogas antibacterianas en leche destinada a consumo. **Rev. Asoc. Méd. Argent.** 98 (1/4): 22-24. 1985.

- [34] QUATTROCCHI, O.; ABELARIA, S.; LABA, R. **Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica.** Impreso en la Argentina. Gráficas Farro. p.p. 407. 1992.
- [35] RIVERO, Z.; FARÍA, J.; SANTORO, R. Aislamiento de Gram Negativos de Leche Cruda con Antibióticos. **Revista Científica FCV-LUZ.** IV (1): 11-16. 1994.
- [36] SANTIAGO, B. **Determinación de Aditivos Químicos en Leche Pasteurizada.** Facultad Experimental de Ciencias. LUZ. Maracaibo. Venezuela. Tesis de Grado. p.p. 46. 1986.
- [37] SCARAMELLI, A.; FERRARO, L.; TROYA, H. Recuento electrónico de células somáticas aplicado a la detección de mastitis subclínica bovina en fincas lecheras de los estados Aragua y Carabobo, Venezuela. **Revista Científica, FCV-LUZ.** IX (6): 508-518. 1999.
- [38] SCHUETTELE, M.; APEL, J.; RIEDEL, C. Quality checking by the milk enactmentlen: results from heat treated milk, analyzed between January 1997 and June 1999. **Archiv. fuer Lebensmittelhygiene.** 51(2): 36-42. 2000.
- [39] SCHUMAN, J.; ZOTTOLA, E.; HARLANDER, S. Preliminary Characterization of a Food-borne Multiple-Antibiotic-resistant *Salmonella typhimurium* strain. **App. Env. Microb.** 2292-2296. 1986.
- [40] SULBARÁN, B. **Adulteraciones Químicas en Leche en Polvo.** Facultad Experimental de Ciencias. La Universidad del Zulia. Maracaibo – Venezuela. Trabajo de Ascenso. 51 p.p. 1986.
- [41] WILCHER, K.; REISMAN, R.; ARBESMAN, L. Allergic Reaction to Penicillin present in milk. **J.A.M.A.** 208 (1): 143-145. 1969.