

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**  
**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS**  
**POSGRADO INTERINSTITUCIONAL EN CIENCIAS PECUARIAS**



**“EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE  
ANTIMICROBIANOS EN LECHE EN EL ESTADO DE  
JALISCO”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS PECUARIAS**

**PRESENTA:**

**L.Q. ELIZABETH NOA LIMA**

**COMITÉ TUTORAL:**

**DRA. DELIA G. GONZÁLEZ AGUILAR (DIRECTORA)**

**DR. TEÓDULO QUEZADA TRISTÁN**

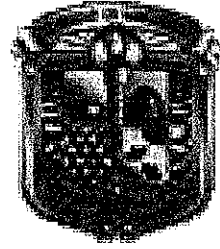
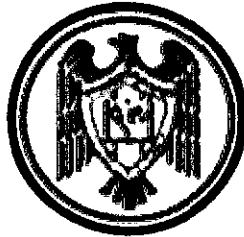
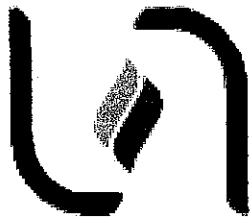
**DR. EFRAÍN PÉREZ TORRES**

**ASESORES:**

**DR. MARIO NOA PÉREZ**

**DR. AGUSTÍN RAMÍREZ ÁLVAREZ**

**Las agujas, Zapopan, Jalisco. Enero de 2009**



# **POSGRADO INTERINSTITUCIONAL EN CIENCIAS PECUARIAS**

**Universidad de Aguascalientes**

**Universidad de Colima**

**Universidad de Guanajuato**

**Universidad de Guadalajara**



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS**



**DIVISIÓN DE CIENCIAS VETERINARIAS**

**DEPARTAMENTO DE SALUD PÚBLICA**

**DRA. ESTHER ALBARRÁN RODRÍGUEZ**

Coordinadora del Posgrado Interinstitucional en Ciencias Pecuarias  
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias  
PRESENTE.-

Por este conducto me permito comunicarle que he revisado la tesis "**Evaluación de la presencia de antimicrobianos en leche en el estado de Jalisco**" presentada por la **L. Q. Elizabeth Noa Lima**, encontrando que cumple con los requisitos establecidos para tesis de maestría por lo que no encuentro inconvenientes para autorizar su impresión.

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Nexti, Zapopan, Jalisco, 14 de enero de 2009

**DRA. DELIA GUILLERMINA GONZÁLEZ AGUILAR**

Asesor de Tesis y Comité Tutorial



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

Dra. Esther Albarrán Rodríguez  
Coordinadora del Posgrado Interinstitucional en Ciencias Pecuarias (PICP)  
Universidad de Guadalajara  
Presente

En base en el Reglamento del Posgrado Interinstitucional de Ciencias Pecuarias (PICP), le comunico que he revisado el trabajo de Tesis de la L.Q. ELIZABETH NOA LIMA titulado EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE ANTIMICROBIANOS EN LECHE EN EL ESTADO DE JALISCO, que presenta como candidata para obtener el grado de Maestría en Ciencias Pecuarias.

El trabajo de investigación de la L.Q. ELIZABETH NOA LIMA cumple con los requisitos necesarios por lo que otorgo mi VOTO APROBATORIO para que se imprima la tesis y se programe la fecha de examen para la defensa de dicha investigación.

Se extiende la presente a los siete días del mes de enero de 2009, para los trámites administrativos necesarios de la interesada.

ATENTAMENTE

Dr. Teódulo Quezada Tristán

Profesor Investigador

Centro de Ciencias Agropecuarias  
Universidad Autónoma de Aguascalientes



# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS



*DIVISIÓN DE CIENCIAS VETERINARIAS*

**DEPARTAMENTO DE SALUD PÚBLICA**

**DRA. ESTHER ALBARRÁN RODRÍGUEZ**

Coordinadora del Posgrado Interinstitucional en Ciencias Pecuarias  
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias  
PRESENTE.-

Por este conducto me permito comunicarle que he revisado la tesis "**Evaluación de la presencia de antimicrobianos en leche en el estado de Jalisco**" presentada por la **L. Q. Elizabeth Noa Lima**, encontrando que cumple con los requisitos establecidos para tesis de maestría por lo que no encuentro inconvenientes para autorizar su impresión.

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Nexti, Zapopan, Jalisco, 14 de enero de 2009

**DR. EFRAÍN PÉREZ TORRES**

Asesor de Tesis y Comité Tutorial

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que de una forma u otra han intervenido en la realización de este trabajo.

A la Dra. Delia González, directora de esta tesis, y amiga, por su dedicación y por su confianza.

Al resto del comité tutorial, integrado por los doctores Efraín Pérez y. Teódulo Quezada por sus comentarios y la crítica que ha permitido mi crecimiento como profesional.

Al Dr. Agustín Álvarez y la Dra. Esther Albarrán, por la oportunidad y especialmente al Dr. Mario Noa, como profesional y como padre, por la paciencia, por el desvelo, y porque sin él nada de esto habría sido posible.

A la Dra. Waldina Reyes, Patricia Landeros, Yolanda López, Federico Rojo y Eduardo González por su colaboración directa en este trabajo.

A mis compañeros del Departamento de Salud Pública por su amistad.

A mis padres y esposo por ser mi apoyo.

A todos: Muchas Gracias

# ÍNDICE GENERAL

	<b>Página</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>i</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>i</b>
<b>SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....</b>	<b>ii</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>iv</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2 ANTECEDENTES.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. LA LECHE.....</b>	<b>3</b>
2.1.1. La industria lechera en el mundo.....	4
2.1.2. Producción Nacional.....	5
<b>2.2. FUENTES DE CONTAMINACIÓN DE LA LECHE.....</b>	<b>9</b>
2.2.1. Antimicrobianos utilizados en veterinaria.....	10
2.2.2. Efectos de la presencia de antimicrobianos en leche.....	14
<b>2.3. NIVELES PERMISIBLES DE XENOBIÓTICOS EN LECHE.....</b>	<b>16</b>
<b>2.4. TIPOS DE MÉTODOS ANALÍTICOS DE ACUERDO CON EL RENDIMIENTO.....</b>	<b>18</b>
2.4.1 Monitoreo de antimicrobianos. Situación en México.....	20
2.4.1.1. Métodos microbiológicos. Prueba de inhibición del yogurt.....	21
2.4.1.2. Métodos inmunológicos. Inmunoensayo de flujo lateral. Twin Sensor.....	22
2.4.1.3 Separaciones cromatográficas. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.....	24
<b>3 HIPÓTESIS.....</b>	<b>30</b>
<b>4 OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
4.1. OBJETIVO GENERAL.....	31
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
<b>5 MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
5.1. MUESTREO.....	33
5.2. DETERMINACIONES ANALÍTICAS.....	37
5.2.1. Prueba de inhibición del yogurt.....	37
5.2.1.1. Oxidantes.....	38
5.2.1.2. Derivados Clorados.....	39

5.2.2.	Twin sensor.....	39
5.2.3.	Análisis cromatográfico.....	40
5.2.3.1.	Extracción.....	41
5.2.3.2.	Purificación.....	41
5.2.3.3.	Condiciones Cromatográficas.....	42
6	<b>RESULTADOS</b> .....	44
6.1.	PRUEBA DE INHIBICIÓN DEL YOGURT.....	44
6.1.1.	Frecuencia de contaminación por mes de muestreo.....	47
6.1.2.	Contaminación por antimicrobianos en centros de acopio y marcas de leche pasteurizada.....	48
6.1.3.	Presencia de derivados clorados y oxidantes.....	49
6.2.	CONTAMINACIÓN CON $\beta$ -LACTÁMICOS Y TETRACICLINAS.....	49
6.3.	CONTAMINACIÓN CON SULFONAMIDAS, NITROFURANOS Y CLORANFENICOL.....	50
7	<b>DISCUSIÓN</b> .....	53
8	<b>CONCLUSIONES</b> .....	61
8.1.	CONCLUSIÓN GENERAL.....	61
8.2.	CONCLUSIONES PARTICULARES.....	61
9	<b>CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES</b> .....	62
10	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	63



## ÍNDICE DE FIGURAS

1	Producción nacional anual de leche en México desde 1990 hasta 2007.....	6
2	Sistemas de producción y su participación en la producción nacional.....	7
3	Principales estados productores de leche en México.....	7
4	Destino de la leche comercializada en México en la actualidad.....	9
5	Esquema de las líneas de detección para la prueba Twin Sensor.....	23
6	Interpretación de los resultados del Twin Sensor.....	24
7	Esquema del proceso de separación cromatográfica.....	26
8	Metodología propuesta para la determinación de antimicrobianos en leche.....	36
9	Frecuencia de detección de antimicrobianos por mes.....	47
10	Frecuencia de detección de antimicrobianos en los centros de acopio muestreados.....	48
11	Frecuencia de detección de antimicrobianos en marcas de leche pasteurizada.....	49
12	Leche cruda. Frecuencia de contaminación por sulfonamidas.....	50
13	Leche pasteurizada. Frecuencia de contaminación por sulfonamidas.....	51

## ÍNDICE DE TABLAS

1	Captación de leche fresca en centros de acopio del estado de Jalisco de enero a julio de 2006...	8
2	Antimicrobianos registrados para el tratamiento de la mastitis y metritis en vacas lecheras en México.....	12
3	Total de antimicrobianos por familia química en diferentes compuestos comerciales.....	13
4	Límites Máximos de Residuo (LMR) de inhibidores microbianos en leche.....	16
5	Tipos de separaciones cromatográficas existentes.....	25
6	Marcas de leche pasteurizada entera muestreadas y zona del estado de Jalisco.....	33
7	Centros de acopio muestreados y zona del estado de Jalisco.....	34
8	Grupos de derivados clorados y oxidantes más utilizados como desinfectantes.....	38
9	Límites de detección del Twin Sensor para $\beta$ -lactámicos y tetraciclinas.....	40
10	Frecuencia de contaminación con antimicrobianos en leche cruda y pasteurizada.....	44
11	Antimicrobianos detectados en muestras positivas de leche cruda.....	44
12	Antimicrobianos detectados en muestras positivas de leche pasteurizada.....	45
13	Límites de detección de la prueba de inhibición del yogurt en las condiciones de trabajo.....	46
14	Rango de concentraciones de sulfonamidas detectadas en muestras de leche cruda.....	51
15	Rango de concentraciones de sulfonamidas detectadas en muestras de leche pasteurizada.....	52

## SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

°C.....	Grado Celsius
%.....	Porcentaje
μL.....	Microlitro
mL.....	Mililitro
nm.....	Nanómetro
μm.....	Micrómetro (Micra)
mm.....	Milímetro
cm.....	Centímetro
mg.....	Miligramo
Kg.....	Kilogramo
v/v.....	Volumen sobre volumen
min.....	Minuto
h.....	Hora
UV.....	Ultravioleta
M.....	Concentración Molar
±.....	más o menos que
ppb.....	Partes por billón
ppm.....	Partes por millón

Evaluación de la presencia de antimicrobianos en leche en el estado de Jalisco  
Evaluation of the presence of antimicrobial residues in milk in the state of Jalisco

**RESUMEN**

Elizabeth Noa Lima, Delia G. González Aguilar, Efraín Pérez Torres, Teódulo Quezada Tristán,  
Mario Noa Pérez, Agustín Ramírez Alvarez.

La Normatividad Mexicana vigente referida a leche cruda de vaca establece que esta no debe contener inhibidores y de forma análoga, los productos lácteos como leche pasteurizada tampoco deben contener ningún tipo de inhibidor, explícitamente desinfectantes que contengan derivados clorados, oxidantes, formaldehído, o inhibidores microbianos. Sin embargo, no existe en el país, ni en Jalisco en particular, un sistema de vigilancia permanente o control de esta potencial contaminación. Teniendo en cuenta dicha situación, el objetivo general del presente trabajo fue determinar la frecuencia de aparición de algunos antimicrobianos en leche cruda y pasteurizada del estado de Jalisco entre junio de 2007 y mayo de 2008. Para ello se combinaron la prueba del Yogurt como método de selección, simultáneamente con la determinación de desinfectantes clorados y oxidantes, y la confirmación de las muestras positivas con un método grupo específico (Twin Sensor) para  $\beta$ -lactámicos y tetraciclinas, así como HPLC para sulfonamidas y nitrofuranos. Se analizaron mensualmente 10 centros de acopio de leche cruda y el total (12 marcas) de leche pasteurizada comercializada en el estado de Jalisco. De las 264 muestras analizadas mediante la prueba de inhibición de yogurt se encontraron 26 muestras de leche positivas a presencia de antimicrobianos, lo cual representa un 9.8 % de contaminación total. El mayor porcentaje corresponde a la leche pasteurizada, en donde se hallaron 20 muestras positivas, equivalente a un 13.8%. En las leches crudas analizadas el porcentaje fue inferior (5%). El mes del año en que se presentó el mayor porcentaje de contaminación fue el de agosto con 27.3%. De las 26 muestras positivas a la prueba del yogurt, 11 contenían derivados clorados, y 3 presentaron también oxidantes. De las 20 muestras de leche pasteurizada analizadas, 6 mostraron contaminación con  $\beta$ -lactámicos y solo 2 de ellas resultaron positivas a tetraciclinas, mientras que en leche cruda se detectaron 3 muestras positivas a  $\beta$ -lactámicos y 3 a tetraciclinas. El 77% de las muestras detectadas como positivas contenía al menos 1 sulfonamida, siendo la sulfamerazina y sulfamonometoxina las más frecuentes. Tanto en leche cruda como en pasteurizada se detectaron muestras con niveles de sulfonamidas por encima del LMR. No se detectaron muestras positivas a nitrofuranos ni cloranfenicol. Se puede concluir que existe un problema de contaminación con residuos de antimicrobianos en la leche destinada al consumo humano en el estado de Jalisco, que viola la Normatividad vigente al respecto.

**Palabras claves:** Leche, antimicrobianos,  $\beta$ -lactámicos, tetraciclinas, sulfonamidas, nitrofuranos, cloranfenicol

## ABSTRACT

Mexican Regulations concerning raw and pasteurized cow's milk establish that it should not contain inhibitors, including chlorine disinfectants, oxidizers, formaldehyde, or microbial inhibitors. However, a permanent monitoring program on this potential contamination is not conducted on a regular basis, so the objective of this work was to determine the frequency of detection of some of the most frequently used antimicrobials in raw and pasteurized milk in Jalisco, Mexico since June 2007 to May 2008. To this aim, a combination of the yogurt inhibition test as screening method was conducted simultaneously with the determination of chlorinated disinfectants and oxidizers. The confirmation of the positive samples was conducted using Twin Sensor for  $\beta$ -lactam and tetracycline antibiotics and High Pressure Liquid Chromatography for sulfonamides, nitrofurans and chloramphenicol. From 264 tested samples, 26 gave positive results to the presence of antimicrobials, representing a 9.8 %. The largest percentage corresponded to pasteurized milk, with 20 positive samples, equivalent to a 13.8 %. In raw milk the positive rate was lower (5%). August month showed the overall highest percentage of contamination (27.3 %). From 20 pasteurized milk analyzed, 6 contained  $\beta$ -lactam antibiotics, while only 2 of them were positive to tetracycline. Three raw milk samples were positive samples to  $\beta$ -lactam and another 3 to tetracyclines residues. 77 % of the positive samples to yogurt test contained at least 1 sulfonamide, identifying sulfamerazine and sulfamonomethoxine as the most frequent. Both raw and pasteurized milk showed samples above the MRLs for sulphonamides. There were no positive samples to nitrofurans or chloramphenicol. We can conclude that there is a problem with antimicrobial residues in milk for human consumption in the state of Jalisco, which violates the established Regulations concerning raw destined to human consumption.

**Keywords:** Milk, antimicrobials,  $\beta$ -lactam, tetracycline, sulfonamides, nitrofurans, chloramphenicol

# 1. INTRODUCCIÓN

La leche es un alimento cuyos componentes se encuentran en la proporción adecuada, y que contienen en forma balanceada la mayoría de los nutrientes esenciales para la alimentación de la especie a la que está destinada. El hombre ha aprovechado las propiedades nutritivas de la leche para utilizarla en su propia alimentación, sin embargo, la leche destinada a consumo humano deben cumplir con determinados criterios de calidad, que abordan aspectos tan complejos como diversos. La calidad de un producto, cualquiera que sea su naturaleza, está dada por disposiciones legales en sanidad y composición y la aceptación del consumidor (Ruvalcaba *et al.* 2007)

Se ha demostrado que después de la administración de cualquier tratamiento veterinario, los residuos de medicamentos aparecen en los productos comestibles obtenidos de los animales tratados. Los posibles peligros para la salud a causa de éstos residuos en la leche pueden dividirse por su naturaleza en tres grupos principales: toxicológicos, microbiológicos (relativos a la resistencia transmisible) e inmunopatológicos (Codex, 1997).

Los residuos de antimicrobianos en los alimentos, especialmente antibióticos, producen numerosos problemas en el humano, siendo el de mayor importancia la aparición de resistencia múltiple en bacterias patógenas al ser sometidas a bajas concentraciones sub-terapéuticas, lo cual representa un peligro potencial para la salud del consumidor y además, para la industria láctea representa pérdidas millonarias, ya que los cultivos iniciadores empleados en la producción de derivados lácteos fermentados, tales como queso y yogurt, son extremadamente sensibles a bajas concentraciones de antibióticos en la leche (Cogan, 1972; Schiffmann, 1992)

Los antimicrobianos son empleados en la ganadería en tres formas básicas: terapéutica, profiláctica y como promotores del crecimiento. El uso de los antibióticos en la farmacoterapia de la mastitis de la vaca lechera, que es la infección de más importancia en la producción de leche, causada por microorganismos patógenos, es de vital importancia para cualquier sistema moderno de producción lechera en el mundo, pero los tratamientos

intramamarios empleados resultan en la práctica la mayor fuente de contaminación de la misma con residuos de antibióticos (Volkert, 1992)

El *Codex Alimentarius*, organismo internacional integrado por expertos de la Organización Mundial para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), ha establecido un compendio de normas aceptadas internacionalmente cuyo objetivo es proteger la salud del consumidor.

La cantidad de un xenobiótico (sustancia extraña de naturaleza ajena al alimento) que puede legalmente aparecer en la leche de forma segura se conoce como Límite Máximo de Residuo (LMR). Al igual que las demás sustancias xenobióticas, los antimicrobianos o inhibidores microbianos poseen un LMR establecido en la leche por el *Codex Alimentarius*.

La Normatividad Mexicana vigente referida a leche cruda de vaca, establece que la misma debe ser negativa a la presencia de inhibidores microbianos (NMX-F-700-COFOCALEC, 2004), sin embargo, estudios realizados anteriormente han demostrado la presencia de antimicrobianos en leche cruda destinada a la industria procesadora (Noa *et al*, 2008).

La prevención de la presencia de residuos y contaminantes en la leche corresponde al productor, lo que unido a la conciencia de la necesidad de respetar los períodos de espera tras la aplicación de los tratamientos, son las mejores medidas a tomar para evitar la contaminación en la materia prima de la industria láctea, pero estos conceptos todavía en la actualidad no están arraigados en el productor lechero mexicano promedio.

Esta problemática, aunada a la inexistencia de un sistema de vigilancia permanente o control mediante monitoreo de la leche cruda acopiada por varias empresas, así como en los productos terminados, como leche pasteurizada por parte de las autoridades correspondientes, hacen que la contaminación con residuos de antibióticos en la leche sea un problema en México, y en especial en Jalisco, como estado mayor productor de leche en el país.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. LA LECHE

La leche es un alimento cuyos componentes se encuentran en la proporción adecuada, y que contiene en forma balanceada la mayoría de los nutrientes esenciales para la alimentación de la especie a la que está destinada, además de ser fácilmente digerible y contener los anticuerpos de la madre necesarios para el sistema inmunológico de la cría recién nacida.

El hombre ha aprovechado las propiedades nutritivas de la leche para utilizarla en su propia alimentación, especialmente, la proveniente de las dos especies de mayor valor comercial debido a su elevado grado de especialización en la producción lechera: la vaca y la cabra (Ruvalcaba *et al.*, 2007)

Según la normatividad referida al producto leche, se define como leche cruda de vaca, a la secreción natural de las glándulas mamarias, sin calostro y sin substracción alguna de sus componentes, que no ha sido sometida a tratamientos térmicos (NMX-F-700-COFOCALEC, 2004).

La leche destinada a consumo humano deben cumplir con determinados criterios de calidad, que abordan aspectos tan complejos como diversos. La calidad de un producto, cualquiera que sea su naturaleza, está dada por disposiciones legales en sanidad y composición y la aceptación del consumidor, por lo que se considera que un alimento apto para consumo humano deberá ser:

1. Sano
2. Inocuo
3. Libre de: Alteración, Contaminación, Adulteración

Como consecuencia de los crecientes adelantos científico-técnicos aplicados en la esfera industrial, crecen también los requisitos de la materia prima correspondiente, en lo referente

a calidad, para aproximarse lo más posible a los estándares propuestos (Ruvalcaba *et al.*, 2007).

Debe entenderse por calidad de la leche cruda el conjunto de características que determinan su grado de idoneidad para los fines previstos de tratamiento y utilización. Se trata entonces de una heterogénea combinación de factores que influyen sobre las propiedades nutritivas, tecnológicas, higiénicas y de aptitud para la utilización de la leche cruda, así como de los productos obtenidos a partir de ella.

Partiendo de esto, pueden expresarse los siguientes criterios generales aplicables a la calidad de la leche cruda, que determinan a su vez la aptitud para el tratamiento industrial y la calidad de los productos terminados.

1. Características organolépticas adecuadas.
2. Composición físico-química acorde con la normatividad vigente en México.
3. Bajo contenido de gérmenes saprófitos y ausencia de microorganismos patógenos.
4. Escaso contenido de células como expresión de una composición normal de la leche, sin alteración por mastitis y trastornos secretorios.
5. Ausencia de sustancias que puedan perjudicar la salud del consumidor, como contaminantes y residuos nocivos, inhibidores del crecimiento microbiano, micotoxinas, plaguicidas, medicamentos, etc.
6. Ausencia de adulterantes que enmascaren defectos del producto o sustituyan sus componentes naturales (Codex, 1997)

El seguimiento de estos indicadores de calidad en la leche tiene como objetivo garantizar la obtención de un producto lácteo de calidad adecuada tanto para la industria como para el consumidor.

### **2.1.1. La industria lechera en el mundo**

El mercado mundial de leche está dominado por países que mantienen una alta intervención gubernamental y disfrutan de fuertes subsidios e incentivos a la producción y a la



exportación de excedentes, mismos que han desarrollado alta tecnología y sistemas administrativos y de organización eficientes como la Unión Europea, Estados Unidos, Canadá y los países que tienen condiciones agroclimáticas muy favorables y bajos costos de producción, lo que les da ventajas competitivas. Existen países con potencial productivo, como México, con una producción limitada debido a que tienen condiciones climáticas desfavorables, no cuentan con infraestructura tecnológica y dependen de los programas internacionales de ayuda. Por consiguiente, siguen apoyando el mantenimiento de los subsidios de los países proteccionistas (LALA, 2000; FIRA 2001).

Según datos de la Organización Mundial para la Agricultura y la Alimentación (FAO) durante los años de 1992 a 2001, la producción mundial de leche de bovino fue cercana a 5 mil millones de toneladas, destacando la participación de la Unión Europea con el 26%, seguida de los Estados Unidos (15%), Rusia (8%), India (6%) y Brasil (4%), países que conjuntamente participaron con el 60 % de la producción total. Como país productor México ocupa el treceavo lugar, con un promedio de 8 millones de toneladas anuales (FIRA, 2001).

Se estima que la población mundial consume anualmente cerca de 500 millones de toneladas en equivalente leche en diversas presentaciones para alimento humano. El 85 % corresponde a la leche de vaca y el resto a otra especies (búfala 11 %, cabra 2 %, y otras 2 %) (SAGARPA, 2000)

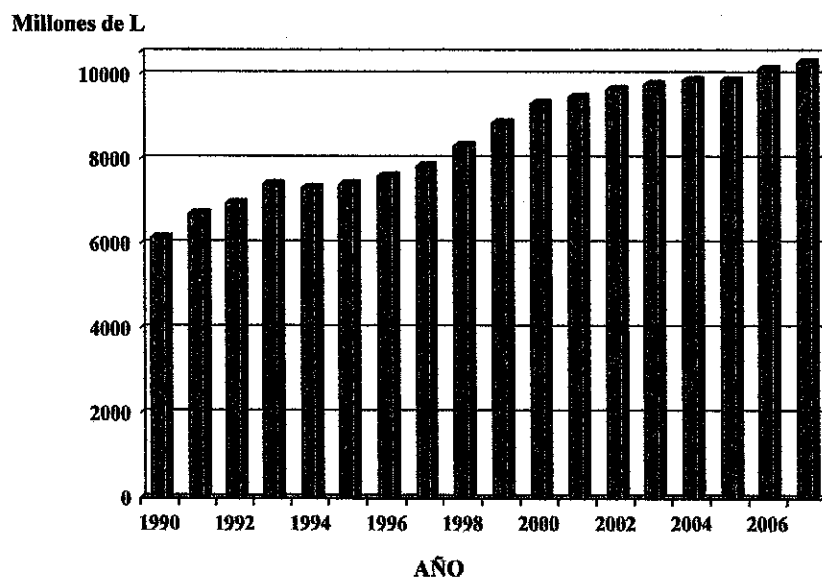
En los años de 1992 a 2001 el consumo humano total de leche ha crecido a una tasa media anual de 1.6 % observándose dos comportamientos paralelamente, entre los países desarrollados y en desarrollo (SIAP, 2001).

### **2.1.2. Producción Nacional**

La industria de leche en México se consolidó hasta los años cuarenta, debido al desarrollo industrial y la expansión del mercado interno. Durante el periodo de 1950 a 1970 se efectuó un proceso de integración de la actividad lechera, dando como resultado el surgimiento de

algunas pasteurizadoras e industrializadoras de lácteos importantes, las cuales actualmente se encuentran ubicadas en regiones favorecedoras del producto en nuestro país (ASERCA, 2000).

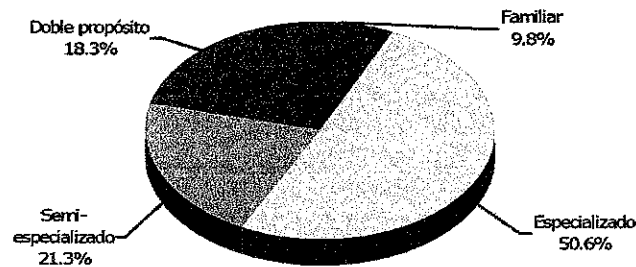
La producción de leche de bovino en México es muy heterogénea desde el punto de vista tecnológico, agroecológico y socioeconómico, incluyendo la gran variedad de climas regionales y características de tradiciones y costumbres de las poblaciones. Según cifras del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), durante los años de 1992 a 2001 la producción total de leche de bovino fue de 80 millones de litros, y tuvo una tendencia de crecimiento constante, debido principalmente a que las expectativas para el sector lechero fueron más favorables gracias a los programas de apoyo concertados entre las instancias gubernamentales, los productores organizados y los industriales de la leche (FIRA, 2001). En la Figura 1 se muestran los valores de la producción de leche de bovino en México desde 1990 hasta 2007. En este período se ha presentado un incremento promedio anual del 3,1% (COFOCALEC, 2008 (a))



Fuente: COFOCALEC, 2008 (a).

**Figura 1. Producción nacional anual de leche en México desde 1990 hasta 2007**

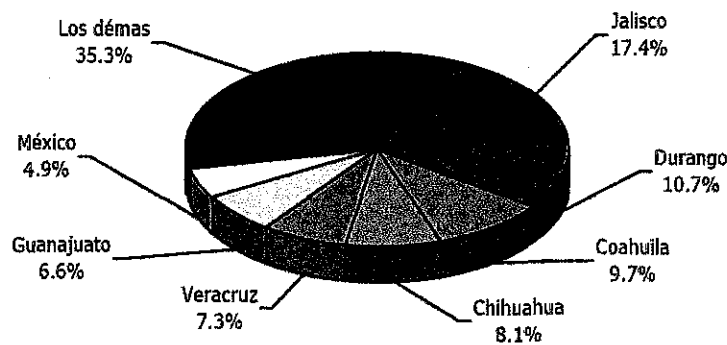
La producción de leche se realiza en todo el país, bajo sistemas que van desde el tecnificado, hasta los de subsistencia. Se distinguen, de forma general, cuatro sistemas: el especializado, el semiespecializado, el de doble propósito y el familiar; de los cuales, por los volúmenes de producción, el primero es el más importante según se muestra en la Figura 2.



Fuente: Sistema de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera, SAGARPA.

**Figura 2. Sistemas de producción de leche y su participación en la producción nacional.**

De la producción obtenida en 2007, el 70 % corresponde tan solo a 8 entidades federativas, destacan en orden de importancia, los estados de Jalisco (17,4 %), Coahuila (10,7 %), Durango (9.7 %) y Chihuahua (8.1 %) que ocupan los cuatro primeros lugares en la producción de leche nacional (COFOCALEC, 2008), como se muestra en la Figura 3.



Fuente: Sistema de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera, SAGARPA.

**Figura 3. Principales estados productores de leche en México**

Las compras de leche en Jalisco por parte de LICONSA ascendieron en 2006 a cerca de 180 millones de litros, es decir, 500 mil litros diarios. En ese año la captación de enero a julio fue la más importante con un promedio diario de poco más de 600 mil litros (COFOCALEC, 2007). Los datos referentes a la captación de leche fresca por parte de los centros de acopio del estado se relacionan a continuación en la Tabla 1.

**Tabla 1. Captación de leche fresca en centros de acopio del estado de Jalisco de enero a julio de 2006.**

<b>CENTRO DE ACOPIO</b>	<b>CAPTACIÓN ACUMULADA ENERO-JULIO/06</b>	<b>ACOPIO EN JULIO 1-31 DE JULIO/06</b>	<b>CAPTACIÓN PROMEDIO X DÍA</b>
Gerencia Estatal Jalisco	121,046	19,279,410	621,917
San Juan de Los Lagos	17,812,028	2,391,938	77,159
Encarnación de Díaz	11,706,372	2,077,647	67,021
Jalostotitlán	5,018,136	595,426	19,207
Teocaltiche	2,546,375	476,891	15,384
Bajío de San José	9,123,987	1,439,786	46,445
Lagos de Moreno	18,733,735	3,002,381	96,851
Unión de San Antonio	3,333,334	578,345	18,656
San José de Los Reynoso	10,789,180	1,796,654	57,957
San Diego de Alejandría	2,161,201	412,490	13,306
San Julián	9,424,923	1,677,286	54,106
San Miguel del Alto	9,602,959	2,052,125	66,198
Tepatitlán	7,196,679	528,311	17,042
Matatlán-Zapotlanejo	2,941,720	515,942	16,643
Valle de Guadalupe	1,989,476	309,119	9,972
Capilla de Guadalupe	4,113,656	727,791	23,477
Capilla de Milpillás	2,268,799	344,507	11,113
Tlajomulco	2,281,548	352,771	11,380

**Fuente: COFOCALEC, 2007**

La producción lechera en México está dirigida fundamentalmente a dos destinos: leche industrializada y leche procesada con fines artesanales (Fig. 4):

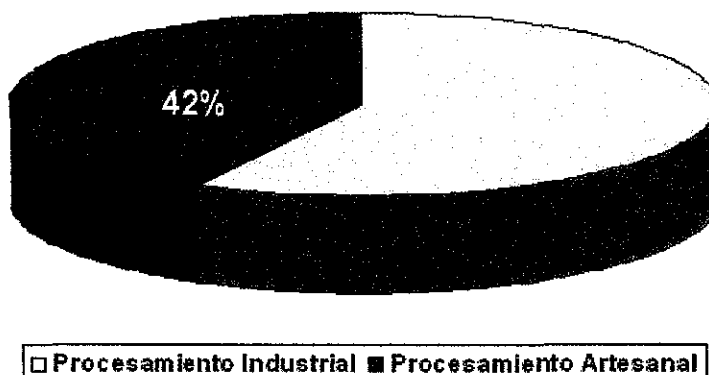


Fig. 4.- Destino de la leche comercializada en México en la actualidad

## 2.2. FUENTES DE CONTAMINACIÓN DE LA LECHE

Entre las posibles fuentes generales de contaminación de la leche, que ocurren durante el proceso de producción del alimento se encuentran las siguientes:

1. Residuos y contaminantes
2. Aditivos
3. Adulterantes
4. Sustancias químicas originadas por procesos industriales

Aun cuando puede haber un solapamiento de estos términos, es beneficioso en condiciones prácticas diferenciarlos. Si por ejemplo, se utilizan medicamentos veterinarios en animales, o plaguicidas en el tratamiento de los pastos o para el control de ectoparásitos, los compuestos remanentes en la leche producida por los animales tratados se definen como residuos (Heeschen *et al.*, 1997).

Dentro de las sustancias que pueden aparecer más comúnmente en la leche se encuentran:

- Toxinas bacterianas
- Antimicrobianos (antibióticos y quimioterapéuticos)
- Antiparasitarios (externos e internos)
- Hormonas
- Plaguicidas
- Metales pesados y elementos traza
- Nitratos, nitritos y nitrosaminas
- Micotoxinas
- Polihalogenados persistentes (PCB Y PCDD/FS)
- Detergentes y desinfectantes

La presencia en leche de los llamados inhibidores, dentro de los cuales se encuentran los antimicrobianos, está unida a una reducción del precio u otros arreglos desventajosos para el productor, de igual manera representan un peligro potencial para la salud del consumidor.

### **2.2.1. Antimicrobianos utilizados en veterinaria**

Los antimicrobianos están incluidos dentro de las sustancias capaces de inhibir el crecimiento bacteriano, conocidas comúnmente como inhibidores.

Los antibióticos constituyen posiblemente el grupo de fármacos más utilizado, en la ganadería son empleados fundamentalmente en tres formas básicas: terapéutica, profiláctica y como promotores del crecimiento (Suhren *et al.*, 1994).

El grupo de antibióticos al que pertenecen las penicilinas y las cefalosporinas se denomina  $\beta$ -lactámico por su estructura química común. La mayor fuente de contaminación de la leche con sustancias químicas es justamente este grupo, que incluye igualmente a las sulfonamidas, nitrofuranos y otras sustancias. La penicilina G (Benzilpenicilina) es uno de los antibióticos más antiguos y que ha gozado de gran utilidad en la clínica veterinaria, con el desarrollo de las penicilinas de amplio espectro, tales como la ampicilina y la

amoxicilina, la actividad terapéutica de este grupo de antibióticos se amplió e incluye hoy día como ventaja la eficacia frente a los organismos gram-negativos (Huber, 1988).

El uso de los antibióticos en la farmacoterapia de la mastitis de la vaca lechera, este padecimiento de la ubre es la infección de mayor importancia en la producción de leche, la cual es causada por varios microorganismos patógenos, y es considerada de vital importancia para cualquier sistema moderno de producción lechera en el mundo. Los tratamientos intramamarios empleados con el fin resolver los problemas de mastitis clínica y subclínica también pueden ser aplicados durante el período de secado de la vaca como medida de prevención de la adquisición de infecciones, cualquiera de las dos formas de tratamiento utilizado constituye una posible fuente de contaminación de la leche con residuos de antibióticos, resultando de hecho en la práctica la mayor fuente de contaminación de la misma con residuos de antibióticos (Volkert, 1992; Heeschen y Blüthgen, 1991).

Un ejemplo del grado de impacto que puede representar el tratamiento con penicilina para el procesamiento industrial, cita que la concentración máxima excretada en leche después de un tratamiento con 200 mg de penicilina G, es capaz de contaminar la leche de 8000 vacas (Allison, 1985). En general, las propiedades tóxicas directas de las penicilinas son mínimas, sin embargo, la capacidad para provocar reacciones de hipersensibilidad en animales o en la especie humana es un problema que requiere cierta consideración. Estos efectos pueden ocurrir con las penicilinas naturales, biosintéticas o semisintéticas. Son comunes las reacciones cruzadas entre las penicilinas utilizadas y, en algunos casos, las cefalosporinas (OMS, 1990). De este grupo de antibióticos, en México se encuentran en uso la amoxicilina, ampicilina, cloxacilina, dicloxacilina y penicilina G. El tiempo de retiro de la leche tras aplicaciones intramamarias durante el período de lactancia oscila entre 60 y 144 horas en dependencia del vehículo por regla general para estos antibióticos (PEV, 2005).

Las sulfonamidas son ampliamente utilizadas en el tratamiento de algunas de las enfermedades más frecuentes en bovinos menores de 10 días, como las diarreas infecciosas, causadas principalmente por *Escherichia coli*, neumonías, que constituyen una

causa importante de muertes en becerros, y onfaloflebitis, inflamación del cordón umbilical que puede ser, en ocasiones un serio problema en los hatos, afectando el 40-50% de todos los becerros nacidos (Sumano y Ocampo, 1997)

Los nitrofuranos más usados en medicina veterinaria son: furazolidona, furaltadona, nitrofurazona y nitrofurantoina, empleados fundamentalmente en la terapéutica de diarreas infecciosas en becerros, sin embargo, el uso de los mismos en animales destinados al consumo humano se ha limitado en algunos países como Estados Unidos. Esto se debe a que se les ha relacionado con modificaciones genéticas y del estímulo estrogénico (Sumano y Ocampo, 1997).

El número de productos utilizados en la práctica veterinaria en México para los tratamientos de la mastitis y otras afecciones de la vaca lechera es amplio y cambiante, pero el número de principios activos en éstos es más reducido. El listado de antimicrobianos para el tratamiento de mastitis y metritis en infusión mamaria o intrauterina registrado en el Prontuario de Especialidades Veterinarias (PEV, 2005) se muestra en la Tabla 2. Éste grupo, resumido en las familias químicas a las que pertenecen se muestra en la Tabla 3.

**Tabla 2. Antimicrobianos registrados para el tratamiento de la mastitis y metritis en vacas lecheras en México:**

<b>NOMBRE</b>	<b>N° DE MEDICAMENTOS</b>
<b>Amoxicilina</b>	<b>37</b>
<b>Ampicilina</b>	<b>28</b>
<b>Clorhexidina</b>	<b>2</b>
<b>Enrofloxacina</b>	<b>85</b>
<b>Fosfomicina</b>	<b>7</b>
<b>Gentamicina</b>	<b>51</b>
<b>Oxitetraciclina</b>	<b>106</b>
<b>Penicilina G</b>	<b>153</b>



<b>Tetraciclina</b>	<b>14</b>
<b>Quinolona</b>	<b>31</b>
<b>Nitrofuranos</b>	<b>23</b>
<b>Sulfonamidas</b>	<b>88</b>
<b>Cloranfenicol</b>	<b>30</b>
<b>Cefalosporina</b>	<b>30</b>

**Fuente:** PEV, 2005

**Tabla 3. Total de antimicrobianos por familia química en diferentes compuestos comerciales para tratamiento de mastitis y metritis.**

<b>GRUPOS</b>	<b>CANTIDAD</b>	<b>PORCENTAJE RELATIVO</b>
<b>β- Lactámicos</b>	<b>651</b>	<b>80</b>
<b>Sulfonamidas</b>	<b>88</b>	<b>10.9</b>
<b>Tetraciclinas</b>	<b>137</b>	<b>16.8</b>
<b>Nitrofuranos</b>	<b>37</b>	<b>4.7</b>
<b>Cloranfenicol</b>	<b>30</b>	<b>3.7</b>

**Fuente:** PEV, 2005

Actualmente, el control de la presencia de inhibidores en leche se realiza solo a nivel de empresas recolectoras con fines de protección de su flujo de producción (Noa et al, 2008), no así para productos terminados como la leche pasteurizada, a la cual en muchos casos se destina toda la materia prima, en tanto existen evidencias de que la leche contaminada con antibióticos se deriva a la producción como leche pasteurizada (Ramírez *et al.*, 2001; Gutiérrez *et al.*, 2005).

### 2.2.2. Efectos de la presencia de antimicrobianos en leche

Después de la administración de cualquier tratamiento veterinario, sus residuos aparecen en los productos comestibles obtenidos de los animales tratados. Los posibles peligros para la salud a causa de los residuos en la leche pueden dividirse por su naturaleza en tres grupos principales: toxicológicos, microbiológicos (relativos a la resistencia transmisible) e inmunopatológicos (Codex, 1997).

El impacto de la presencia de residuos antimicrobianos en alimentos, puede provocar de forma general los siguientes efectos sobre la salud humana:

- Efectos tóxicos
- Efectos hipersensibilizantes
- Inducción de resistencia microbiana
- Efectos mutagénicos
- Efectos teratogénicos
- Efectos sobre la conducta sexual

Aún en pequeñas cantidades, los antimicrobianos pueden tener efectos carcinogénicos, teratogénicos, mutagénicos, provocar inhibición o inducción enzimática, e interactuar con otros compuestos químicos del medio ambiente (Arnold, 1990), además, una vez presentes en la leche no pueden ser eliminados empleando las vías normales de procesamiento industrial o doméstico (Moats, 1998; Yingprayoon, 1989). Numerosos microorganismos patógenos, como la *Salmonella spp*, adquieren resistencia múltiple al ser sometida a bajas concentraciones de antibióticos, lo cual representa un serio peligro potencial para el ser humano (Shahani y Whalen, 1986).

Se ha demostrado que los residuos de estos medicamentos específicos, pueden presentar, en casos extremos, algunos de los siguientes efectos secundarios:

- Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, aún en pequeñas concentraciones, pueden desencadenar reacciones de sensibilización cruzadas en consumidores: a partir de las múltiples

posibilidades de degradación del núcleo 6-apa, por la hidrólisis ácida o la acción de betalactamasas bacterianas, se originan intermediarios extremadamente reactivos de muy corta vida media, que pueden fijarse a proteínas del organismo funcionando como haptenos capaces de desarrollar graves reacciones alérgicas en individuos previamente sensibilizados (Sumano y Ocampo, 1997).

- Las sulfonamidas constituyen uno de los fármacos que con mayor frecuencia desencadenan el síndrome de DRESS (Drug Rash with Eosinophilia and Systemic Symptoms), una toxicodermia grave caracterizada por alteraciones hematológicas y afectación visceral. Algunas como la sulfadimidina son consideradas cancerígenos potenciales. (Cervigón, *et al.*, 2006)
- El cloranfenicol se prohibió en 1990 para uso en medicina veterinaria, la principal razón es que en cantidades tan pequeñas como 1.0 ppm tiene la capacidad de producir anemia aplásica en individuos susceptibles. La condición es rara (1/10 000 a 1/100 000 habitantes), aunque fatal en el 50% de los casos (Yunis, 1989).
- Los nitrofuranos afectan nocivamente las gónadas, deprimen la espermatogénesis y movilidad de espermatozoides, son neurotóxicos frecuentemente irreversible, producen alteraciones hematopoyéticas y algunos derivados como la furazolidona poseen acción carcinogénica (Sumano y Ocampo, 1997).

La presencia de antimicrobianos en leche tiene además un fuerte impacto sobre la industria productora de derivados lácteos, ya que los cultivos iniciadores empleados en la producción de derivados lácteos fermentados, tales como queso y yogurt, son extremadamente sensibles a bajas concentraciones de sustancias inhibitoras en la leche (Cogan, 1972; Schiffmann, 1992).

El control de la presencia de antimicrobianos es, por lo tanto, una necesidad tanto desde el punto de vista científico, económico y social por las implicaciones que la presencia de estas sustancias tiene sobre la salud del consumidor y sobre la industria procesadora de derivados lácteos.

La prevención de la presencia de residuos y contaminantes en la leche corresponde al productor, que es quien controla la aplicación de los tratamientos del animal. La adquisición de conocimientos en este sentido por parte del veterinario, unido a la conciencia de la necesidad de implementar el respeto a los períodos de espera tras la aplicación de cualquier tratamiento, son las mejores medidas a tomar, pero estos conceptos aun en la actualidad no están arraigados en general en el productor lechero mexicano.

### 2.3. NIVELES PERMISIBLES DE XENOBIÓTICOS EN LA LECHE.

El *Codex Alimentarius*, organismo internacional integrado por expertos de la Organización Mundial para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), ha establecido un compendio de normas aceptadas internacionalmente cuyo objetivo es proteger la salud del consumidor.

La cantidad de un xenobiótico (sustancia extraña de naturaleza ajena al alimento) (Albert y Molina, 1998) que puede legalmente aparecer en la leche de forma segura se conoce como límite máximo de residuo (LMR). Se entiende por LMR a la concentración máxima de un contaminante resultante de su uso, aceptable para estar presente en la leche. Se expresa en mg/Kg (ppm) ó µg/Kg (ppb).

Al igual que otras sustancias xenobióticas, los inhibidores microbianos poseen un LMR establecido en la leche por el *Codex Alimentarius*, sin embargo esta normatividad no es de aplicación en México. Algunos de estos valores de LMR se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 4. Límites Máximos de Residuo (LMR) de inhibidores microbianos en leche.**

Antibiótico	LMR (µg/ Kg)
<b>PENICILINAS</b>	
<b>Bencilpenicilina</b>	4

<b>Ampicilina</b>	4
<b>Amoxicilina</b>	4
<b>Oxacilina</b>	30
<b>Cloxacilina</b>	30
<b>Dicloxacilina</b>	30
<b>TETRACICLINAS</b>	
<b>Tetraciclina</b>	100
<b>Oxitetraciclina</b>	
<b>Clorotetraciclina</b>	
<b>MACRÓLIDOS</b>	
<b>Espiramicina</b>	105
<b>Tilosina</b>	50
<b>Eritromicina</b>	40
<b>AMINOGLICÓSIDOS</b>	
<b>Espectinomicina</b>	200
<b>Estreptomicina</b>	200
<b>Dihidroestreptomicina</b>	200
<b>Gentamicina</b>	100
<b>Neomicina + Framicetina</b>	500
<b>POLIMIXINAS</b>	
<b>Colistina</b>	50
<b>OTROS QUIMIOTERAPÉUTICOS</b>	
<b>Cloranfenicol</b>	0
<b>Dapsona</b>	0
<b>Novobiocina</b>	0
<b>Sulfadimidina</b>	25
<b>Sulfonamidas totales</b>	100

**Fuente:** CODEX, 1997

La Normatividad Mexicana vigente referida a leche cruda de vaca establece que la misma no debe contener inhibidores (NMX-F-700-COFOCALEC, 2004), y de forma análoga, los productos lácteos como leche pasteurizada tampoco deben contener ningún tipo de inhibidor, explícitamente desinfectantes conteniendo sales cuaternarias de amonio, derivados clorados, oxidantes, formaldehído, o inhibidores microbiológicos (NOM-184). Sin embargo, no existe en el país, ni en Jalisco en particular, un sistema de vigilancia permanente o control mediante monitoreo de la leche cruda acopiada por varias empresas, así como en los productos terminados, como leche pasteurizada por parte de las autoridades correspondientes, lo que hace que la contaminación con residuos de antibióticos en leche sea un problema potencial en México, y en especial en Jalisco.

#### **2.4. TIPOS DE MÉTODOS ANALÍTICOS DE ACUERDO CON EL RENDIMIENTO.**

El *Codex Alimentarius* ha clasificado los métodos de análisis de residuos de medicamentos veterinarios en alimentos en relación con las características de rendimiento, como una alternativa a su clasificación de acuerdo con el uso propuesto o finalidad. Este enfoque alternativo diferencia a los métodos analíticos en función de la información y los detalles específicos que brinda el mismo, relativos a la cantidad y naturaleza del compuesto o compuestos de interés (Noa *et al.*, 2001)

Los **Métodos de Nivel I** determinan 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. Estos métodos pueden constituir un solo procedimiento que determina la concentración y la identidad de la sustancia, o una combinación de métodos para cuantificar y confirmar la estructura del residuo. Un buen ejemplo de esto último es una técnica de cromatografía combinada con un procedimiento de Espectrometría de Masas. Aunque los métodos de Nivel I son generalmente procedimientos instrumentales, la observación de un cambio patológico o morfológico que identifique específicamente la exposición a una clase de sustancia podría potencialmente ser un método de Nivel I, dada la suficiente sensibilidad y precisión.

Los **Métodos de Nivel II** determinan la concentración de un compuesto al nivel de interés, pero no ofrecen una identificación inequívoca de la estructura. Estos métodos pueden utilizar una estructura, grupo funcional o las propiedades inmunológicas como base para el esquema analítico. Una práctica común es utilizar un método de Nivel II como prueba de determinación y un segundo método del mismo tipo como procedimiento de identificación positiva. Estos métodos pueden también utilizarse para verificar la presencia de un compuesto o clase de compuestos. Dos métodos de Nivel II pueden brindar información adecuada, comparable con un método de Nivel I, cuando utilizan diferentes procedimientos químicos. La mayoría de los métodos de análisis utilizados comúnmente para respaldar los LMR son métodos de laboratorio cuantitativos de Nivel II.

Los **Métodos de Nivel III** son aquellos que producen información menos definitiva, pero útil. Estos procedimientos de prueba generalmente determinan la presencia o la ausencia de un compuesto o clase de compuesto a un nivel de interés determinado. Con frecuencia están basados en técnicas no- instrumentales. Por estas razones, comúnmente se hace referencia a los métodos de Nivel III como **métodos de selección** o **métodos semi-cuantitativos**. Los resultados que ofrecen no son tan confiables como los resultados de los métodos de Niveles I y II, y por lo general, necesitan información confirmatoria para establecer medidas reguladoras. Por ejemplo, los métodos de Nivel III pueden brindar información semi-cuantitativa adecuada, pero una pobre identificación. Como alternativa, pueden brindar una identificación sólida o inequívoca con muy poca información cuantitativa. Los métodos de Nivel III no son métodos mal descritos o desordenados, deben tener un protocolo de operación y características e información de rendimiento adecuadamente definidas.

La decisión de utilizar métodos de Nivel III debe ser determinada, en parte, por las características de rendimiento, así como por la necesidad de analizar grandes números de muestras dentro de un período de tiempo determinado. Dos características claves que deberán tomarse en cuenta para los métodos de Nivel III son los porcentajes de lecturas negativas. Estas deben ser bajas en los niveles de interés (< 5 %), a la vez que se puede aceptar un poco más de flexibilidad para los falsos positivos (< 10 %).

#### 2.4.1. Monitoreo de antimicrobianos. Situación en México

En condiciones prácticas, las pruebas de monitoreo microbiológicas empleadas en leche (Método de referencia, Delvotest P/SP) son menos sensibles que la mayoría de los métodos de confirmación empleados. Los métodos basados en principios microbiológicos no reúnen los requerimientos necesarios impuestos por las legislaciones de los diferentes países. La mejor opción para este tipo de trabajo, que constituyen la base de los programas de control regulador de la presencia de residuos de antimicrobianos en leche, emplea un método de selección (de Nivel III), y un segundo método de confirmación grupo-específico (generalmente de Nivel II) para confirmar o identificar y de ser posible cuantificar específicamente a la sustancia causante (Heeschen y Suhren, 1996).

La situación actual en cuanto a los niveles de contaminación por antimicrobianos en leche en México, y en particular en Jalisco es poco conocida. Si bien el beneficio logrado mediante programas de vigilancia en países desarrollados es innegable, en países con recursos económicos limitados como México, la vigilancia constante es, a la fecha, inexistente, por lo que solo existen publicados escasos reportes de monitoreos de este tipo de sustancias en leche (Ramírez *et al.*, 2001; Gutiérrez *et al.*, 2005).

De acuerdo a la Normatividad Mexicana vigente para leche cruda (NMX-F-700-COFOCALEC, 2004), no se permite la presencia de inhibidores, sin especificar detalles, mientras por su parte para productos lácteos, la NOM-184-SSA1 (2002), especifica que la leche pasteurizada debe estar libre de inhibidores, especificando que sean éstos de naturaleza físico- química (derivados clorados, sales cuaternarias de amonio, oxidantes o formaldehído), o microbiológicos (detectados por cualquier prueba microbiológica), pero en ninguna de éstas se especifican valores de LMR, por lo que como niveles de referencia se hace necesario aplicar la del *Codex Alimentarius*, que son establecidos como valor de referencia dentro de la NMX-F-719. (COFOCALEC, 2008).

Aunque algunas empresas que realizan el control de antimicrobianos en la leche cruda acopiada, con fines de protección de sus propios intereses efectivamente han alcanzado niveles muy reducidos de incidencia, trabajos anteriores realizados (Ramírez *et al.*, 2001;



Gutiérrez *et al.*, 2005; Noa *et al.*, 2008) evidencian de que la industria láctea en general efectivamente destina a consumo leche fluida conteniendo antimicrobianos.

Los métodos de prueba normalizados en México para detección de antimicrobianos hasta la fecha sólo comprenden métodos rápidos (NMX-F-719 COFOCALEC, 2008), y aunque existen solicitudes por parte de diversos organismos implicados en la temática para la adopción de métodos de prueba específicos, estos documentos aun no han sido aprobados.

#### **2.4.1.1. Métodos microbiológicos. Prueba de inhibición del Yogurt.**

El incremento de acidez (expresada como ácido láctico), resultado de la inoculación de la muestra con un cultivo de la mezcla de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*, previo calentamiento de la misma para eliminar su carga microbiana inicial e incubación posterior a 45 °C por 2,5 h a 3.0 h, es comparado contra el de un control. Se considera que las sustancias inhibidoras están presentes cuando el incremento en la acidez de la muestra es menor a la mitad del incremento de acidez desarrollada en el control. La acidez de la muestra y control se determina mediante titulación con hidróxido de sodio.

Las muestras deben ser analizadas tan pronto como sea posible y preferiblemente dentro de las 10 horas después de su recolección, manteniéndolas a no más de 5 °C. Si no es posible analizarlas dentro de las 10 horas se deben mantener en congelación (-30 °C a -50 °C), para minimizar la inactivación de la penicilina, y analizarse dentro de las próximas 24 horas.

Para la interpretación de resultados debe tenerse en cuenta que una muestra contiene sustancias inhibidoras cuando el aumento de su acidez es menor que la mitad del valor del control. En ausencia de sustancias inhibidoras el aumento del grado de acidez en la muestra es similar al del control.

En presencia de sustancias inhibidoras en la muestra, las células del *S. thermophilus* se hinchan y llega a ser irregular. Por otra parte se observa el alargamiento de las cadenas. En concentraciones más altas de sustancias inhibidoras *S. thermophilus* se limita el

crecimiento. Las células del *L. bulgaricus* crecen hacia fuera como largos filamentos (NMX-719-COFOCALEC, 2004).

Cabe señalar que la prueba de inhibición del yogurt detecta cualquier tipo de inhibidor, lo que incluye cualquier tipo de desinfectante (utilizados en la desinfección de equipo de ordeña o industrial) como los derivados clorados, oxidantes y formaldehído, pero fundamentalmente los antibióticos, que provienen de un animal bajo tratamiento antiinfeccioso o directamente adicionado al alimento, así como otras sustancias químicas con efecto antimicrobiano, como el ácido benzoico (NMX-F-425, 1983).

#### **2.4.1.2. Métodos inmunológicos. Inmunoensayo de flujo lateral Twin Sensor.**

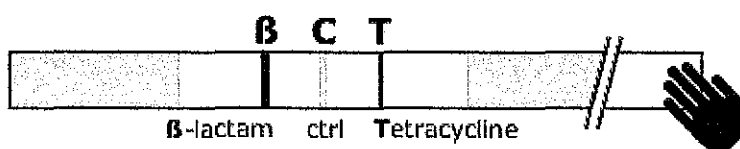
Los métodos inmunológicos basados en la utilización de la interacción **antígeno-anticuerpo** han demostrado ser una alternativa muy válida a las técnicas instrumentales clásicas para la detección de residuos (Shan *et al.*, 2002). Se han desarrollado anticuerpos para la detección específica de moléculas de bajo peso molecular obteniendo reconocimientos específicos y con una alta sensibilidad. Las aplicaciones basadas en el uso de anticuerpos son numerosas y existen varios juegos de reactivos o *kits* comerciales para la detección de residuos de diferentes sustancias en alimentos. Algunos de los formatos en los que se utilizan anticuerpos como elemento de reconocimiento son el inmunoensayo de flujo lateral (LFI) (Shim *et al.*, 2006), inmunoensayo enzimático (ELISA) y los inmunosensores.

En la técnica de inmunoensayo de flujo lateral se utilizan detectores como oro coloidal y receptores específicos con afinidad para diferentes familias de antibióticos e inhibidores ( $\beta$ -lactámicos, tetraciclinas, aminoglicósidos, quinolonas, sulfonamidas, etc.). Estos receptores se encuentran colocados en una tira de soporte sólido y se hacen móviles al ser rehidratados con la muestra de leche. El complejo leche/receptor fluye de manera lateral a través de la tira mientras los residuos de inhibidores o antibióticos que estuvieran presentes en la leche se unen a los receptores. La fase móvil atraviesa una línea de prueba donde el conjugado del inhibidor o antibiótico y el receptor microbiano se unen para formar una línea colorida. Los receptores libres continúan su flujo hasta una línea control, donde se

encuentran fijos anticuerpos anti-receptores que al unirse a éstos forman otra línea colorida. La comparación de la intensidad del color entre las líneas permite determinar la presencia o ausencia de los antibióticos de la familia química específica a los niveles de detección de la prueba seleccionada.

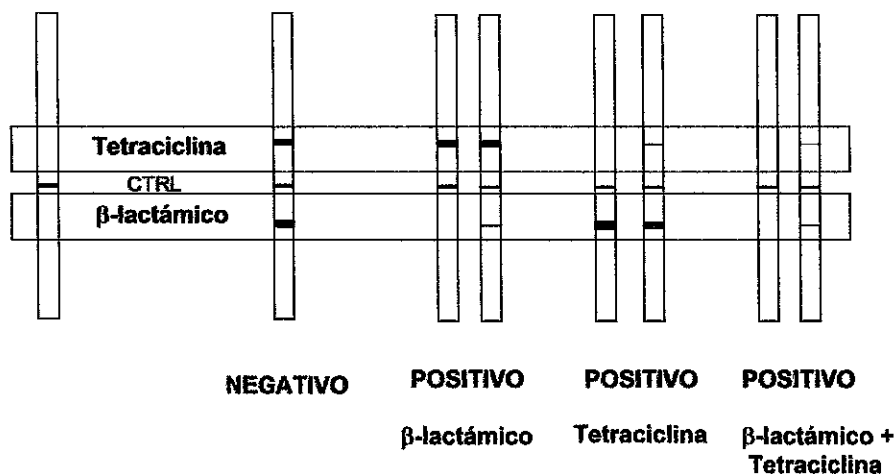
El Twin Sensor es un juego de reactivos comercial basado en inmunoensayo de flujo lateral, con receptores en formato de tiras, que permite la determinación rápida y simultánea de  $\beta$ -lactámicos y tetraciclinas presentes en muestras de leche. Es una prueba competitiva que involucra dos receptores específicos en una sola operación y es apropiado para hacer pruebas en centros de acopio, vaquerías, industrias lecheras e incluso en laboratorios analíticos.

En cada tira o indicador existen 3 líneas características, dos líneas de prueba situadas a ambos lados (por encima y por debajo) de una línea control central, que se encuentra ligeramente visible. La línea de prueba que se encuentra por debajo del control es la correspondiente a  $\beta$  lactámicos, y la línea de prueba superior es la correspondiente a compuestos de tetraciclinas (Figura 5).



**Figura 5. Esquema de las líneas de detección para la prueba Twin Sensor: C: Línea control,  $\beta$ : beta lactámicos, T: Tetraciclinas.**

La lectura final se realiza mediante interpretación visual, comparando la intensidad de las líneas de prueba con respecto al control de según se muestra en la Figura 6.



**Figura 6. Interpretación de los resultados del Twin Sensor.**

- Cuando las líneas de prueba  $\beta$ -lactámicos (abajo) y tetraciclinas (arriba) están más visibles que la línea control, la muestra se considera negativa o contiene una concentración de antibióticos por debajo de los límites de detección.
- Cuando las líneas de prueba son iguales o menos visibles que la línea control, la muestra se considera positiva y contiene una concentración de antibióticos igual o mayor al límite de detección.
- Cuando no aparecen líneas de prueba la muestra se considera altamente positiva para ambos compuestos. Cuando esto ocurre se debe considerar la muestra como positiva y confirmar mediante una segunda interpretación 4 minutos después de la primera lectura.

#### **2.4.1.3. Separaciones Cromatográficas. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC)**

La cromatografía es uno de los métodos físico-químicos de separación de más amplia utilización en el mundo, ya que cubre prácticamente todos los campos de análisis de las ciencias. Según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) La cromatografía es un método, usado primariamente para la separación de los componentes

de una muestra, en la que los componentes se distribuyen en dos fases, una de las cuales es estacionaria, mientras la otra es móvil. La fase estacionaria puede ser un sólido, un líquido retenido sobre un sólido o un gel. La fase estacionaria puede estar extendida o distribuida como una película, etc. La fase móvil puede ser líquida o gaseosa” (IUPAC, 1993). La cromatografía no solo permite la separación de los componentes de una mezcla, sino también su identificación y cuantificación.

De acuerdo a la naturaleza de ambas fases se pueden distinguir los diferentes tipos de separaciones cromatográficas según se muestran en la Tabla 5.

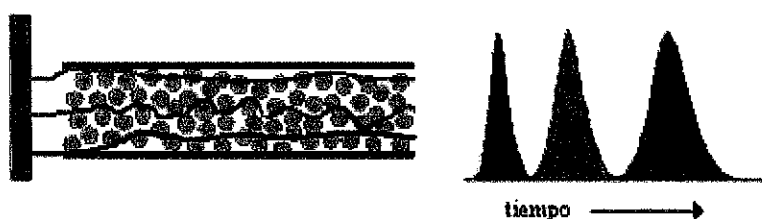
**Tabla 5. Tipos de separaciones cromatográficas existentes**

FASES		ESTACIONARIA	
		Sólida	Líquida
MÓVIL	Gaseosa	Cromatografía Gas-Sólido (CGS)	Cromatografía Gas-Líquido (CGL)
	Líquida	Cromatografía de adsorción en columna y cromatografía de capa fina (TLC)	Cromatografía líquido-líquido o de partición (Cromatografía de papel, fase reversa)

Las técnicas cromatográficas pueden ser **manuales** como la de capa fina y papel, o **instrumentales**, en dependencia de la utilización o no de equipamiento en el análisis cualitativo y cuantitativo. En este aspecto las técnicas analíticas instrumentales, como la cromatografía de gases (CG) y de líquidos de alta resolución (HPLC), aventajan a otras técnicas cromatográficas en que una vez terminado un análisis, el sistema está en condiciones de continuar con otro, sin necesidad de efectuar cambios de condiciones experimentales o en el equipo (Noa *et al.*, 2005).

Cuando se introduce en el sistema cromatográfico una muestra, esta pasa instantáneamente a la fase móvil que fluye constantemente por el sistema. La fase móvil arrastra la muestra, que al llegar al lecho de la fase estacionaria se retiene, adsorbiéndose las sustancias

contenidas en el mismo de forma reversible, mientras avanzan a través del lecho de la fase estacionaria empujadas por el avance constante de la fase móvil. Las moléculas contenidas en la muestra son adsorbidas y desorbidas sucesivamente, durante su paso a través del sistema cromatográfico, el grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. Este proceso se mantiene durante todo el trayecto de la columna, de esta forma las moléculas de cada sustancia migran a través de la columna transmitiendo una señal en forma de bandas, tal como se muestra en la Figura 7.



**Figura 7. Esquema del proceso de separación cromatográfica**

La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC), se desarrolló a mediados de los años 70 y rápidamente adquirió un gran número de aplicaciones gracias a la generación de nuevas fases estacionarias, así como los detectores “en línea” que hoy se conocen. Hacia finales de la década apareció la cromatografía líquida de fase reversa, que permitió la separación de compuestos muy similares entre sí. Las ventajas del HPLC vinieron dadas, en resumen por tres cualidades: resolución, rapidez y reproducibilidad (Noa *et al.*, 2005).

Es una técnica cromatográfica de reparto o posición en la que la muestra se fracciona entre una fase móvil que es líquida y una fase estacionaria. Utiliza una presión muy elevada para forzar el paso del disolvente por una columna que contiene partículas muy finas, consiguiendo así separaciones de gran resolución. Debido a estas presiones el equipo para HPLC es elaborado y costoso (Bermejo, 1991). Los componentes básicos de un sistema para HPLC son:

- A) Depósitos para la fase móvil (disolventes)
- B) Sistema de bombeo de la fase móvil
- C) Sistema de inyección de muestras
- D) Columna cromatográfica
- E) Termostato para la columna (opcional)
- F) Detector
- G) Sistema para el tratamiento de datos o registrador

A) Como algunas de las fases móviles usadas en HPLC pueden ser químicamente activas como ácidos, bases o líquidos corrosivos, es esencial que los componentes del sistema estén fabricados con materiales resistentes, por lo que la mayoría de las partes en contacto con la fase móvil suelen estar fabricadas con acero inoxidable. Los disolventes más usados en HPLC son agua, disoluciones tampón acuosas y disolventes orgánicos como el metanol. Deben ser espectroscópicamente puros, exentos de partículas sólidas y desgasificados, esto se lleva a cabo con un gas inerte muy poco soluble como el helio. Como fase estacionaria lo más común es usar partículas microporosas esféricas de sílice muy puro, que son permeables al disolvente (Harris, 2001).

Los recipientes que se utilicen para almacenar la fase móvil tienen que ser inertes, es decir, el disolvente no deberá extraer especie alguna del material con el que estén contruidos. Suelen ser botellas de vidrio y tubos de teflón. Están provistos de unos filtros, indispensables para eliminar los gases disueltos y partículas que pueda contener la fase móvil.

B) Debido a las elevadas presiones de trabajo originadas por la resistencia de la fase estacionaria que llena la columna, debida a su vez al pequeño diámetro de las partículas de la misma, es indispensable utilizar una bomba que es la encargada de hacer fluir la fase móvil a través de la columna. Los sistemas de bombeo deberán reunir las siguientes características: (Hernández, 2002).

- Generar presiones superiores a 6000 psi.
- Capaces de cubrir un amplio rango de flujo entre 0.1 y 10 mL/min con una precisión del 0.5 % y que esté libre de pulsaciones.
- Construidos con materiales inertes respecto a los disolventes empleados.

C) Los volúmenes que se inyectan de muestra deberán ser pequeños para evitar la sobrecarga de la columna.

D) En las columnas cromatográficas es donde se produce la velocidad diferencial de los solutos que permite su separación. El material de las columnas cromatográficas suele ser de acero inoxidable cuya longitud varía de 5 a 30 cm y un diámetro de 1 a 5 mm. La eficacia de las columnas aumenta al disminuir el tamaño de las partículas de la fase estacionaria. El tamaño típico de las partículas es de 3-10  $\mu\text{m}$ . Las columnas son caras y se degradan con facilidad, por eso, se protege la entrada de la columna con otra más corta, la precolumna, que retiene por adsorción las impurezas de forma irreversible (Harris, 2001).

E) No es necesario el control estricto de la temperatura de la columna, pero las separaciones resultan más reproducibles cuando la temperatura se mantiene constante. Los instrumentos comerciales modernos están equipados con calentadores que regulan la temperatura de la columna.

F) El papel del detector es indicar los momentos de aparición de los componentes, y proporcionar indicación cuantitativa y cualitativa de los mismos. El detector utilizado depende de la naturaleza de la muestra y deberá reunir una serie de características como son, tener una sensibilidad elevada, buena estabilidad y reproducibilidad. Amplio margen de respuesta lineal, insensible a cambios en la presión y la temperatura. El detector se coloca al final de las columnas, responde a la concentración del soluto y se registra en función del tiempo y obteniéndose una serie de picos, generándose un gráfico que se denomina cromatograma. La posición de los picos en el eje del tiempo puede servir para



identificar los componentes de la muestra (Hernández, 2002). En HPLC existen 3 tipos fundamentales de detectores:

Detectores basados en una propiedad del soluto que no la suele presentar la fase móvil. Suelen ser muy selectivos y sensibles:

- Detectores de absorbancia ultravioleta
  - Detectores de fluorescencia
  - Detectores electroquímicos
1. Detectores basados en una propiedad de la disolución, responden a un conjunto amplio de solutos, pero suelen ser poco sensibles:
    - Detectores de índice de refracción
    - Detectores de conductividad
  2. Detectores de transformación de fases. No es muy usado, ya que generalmente operan mediante eliminación de la fase móvil por evaporación antes de medir el soluto.
    - Espectrómetro de masas acoplado al HPLC (HPLC-MS)

La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución es, en la actualidad, una de las técnicas más usadas para el análisis de residuos de plaguicidas, ácidos orgánicos, lípidos, aminoácidos, toxinas y contaminantes, dentro de los cuales se encuentran los residuos de antimicrobianos (Noa *et al.*, 2005).

### **3. HIPÓTESIS**

Existen residuos de antimicrobianos en la leche destinada al consumo humano en el estado de Jalisco.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. OBJETIVO GENERAL**

Determinar los niveles de residuos de algunos antimicrobianos presentes en leche cruda y pasteurizada del estado de Jalisco durante junio de 2007 hasta mayo de 2008 mediante métodos de selección, confirmación de grupo específico y Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

## **4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1.- Determinar la presencia de los principales antimicrobianos posibles en leche cruda de 10 centros de acopio y 12 marcas de leche pasteurizada mediante la prueba de inhibición del yogurt como método rápido de selección.
  
- 2.- Cuantificar los niveles de 6 sulfonamidas (sulfadiazina, sulfametoxazol, sulfamerazina, sulfadimidina, sulfatiazol y sulfamonometoxina) 3 nitrofuranos (furazolidona, furaltadona y nitrofurazona) y cloranfenicol, en muestras de leche positivas, mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.
  
- 3.- Determinar la presencia de antibióticos  $\beta$ -lactámicos y tetraciclinas en muestras positivas, mediante el Twin Sensor.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio consiste en una investigación del tipo prospectiva, observacional, descriptiva y longitudinal, la cual se lleva a cabo en el Laboratorio de Residuos Toxicológicos II del Departamento de Salud Pública del CUCBA, Universidad de Guadalajara.

### 5.1. MUESTREO

Se obtuvieron muestras de leche a partir de 10 centros de Acopio y de 12 marcas de leche pasteurizada entera comercializadas en la zona metropolitana de Guadalajara y en 3 municipios del estado de Jalisco. El muestreo se realizó durante 12 meses, con un número total de 264 muestras.

Las diferentes marcas de leche pasteurizada entera y los centros de acopio muestreados se relacionan a continuación en las Tablas 6 y 7 respectivamente.

**Tabla 6. Marcas de leche pasteurizada entera muestreadas y zona del estado de Jalisco.**

<b>MARCAS DE LECHE PASTEURIZADA</b>	<b>ZONAS DEL ESTADO DE JALISCO</b>
MUY BUENA	Metropolitana de Guadalajara
SELLO ROJO	Metropolitana de Guadalajara
LA PUREZA	Metropolitana de Guadalajara
VAKITA	Metropolitana de Guadalajara
LALA	Metropolitana de Guadalajara
MONARCA	Metropolitana de Guadalajara
19 HERMANOS	Metropolitana de Guadalajara

FRIZIA	Metropolitana de Guadalajara
AL DÍA	Lagos de Moreno
muestreados TARETAN	Atotonilco
LOS CUATES	Ciudad Guzmán
**SAN MARCOS	Estado Aguascalientes

**Tabla 7. Centros de acopio muestreados y zona del estado de Jalisco.**

<b>CENTROS DE ACOPIO</b>	<b>MUNICIPIO DE JALISCO</b>
Matatlán-Aguacate	Zapotlanejo
Matatlán- Colimilla	
Matatlán-Centro	
Matatlán	
La Gloria	
San Gabriel	
Los Dolores	San Ignacio Cerro Gordo
Cecoopal	Tepatitlán de Morelos
La Hacienda	Juanacatlán
San Isidro	

Las muestras colectadas se analizaron dentro de las 24 horas posterior a su recolección y para la toma de muestras y transportación de las mismas al laboratorio se siguieron los lineamientos propuestos en la Norma Mexicana (NMX-718-COFOCALEC, 2006) que establece las recomendaciones generales para la toma, manejo y transporte de muestras de leche y productos lácteos, desde el punto de producción, fabricación o comercialización de los mismos, hasta su entrega al laboratorio para el análisis.

Se realizó previamente como método de selección la Prueba de Inhibición del yogurt, descrito en el Proyecto de Norma Mexicana (NMX-719-COFOCALEC, 2008) para la

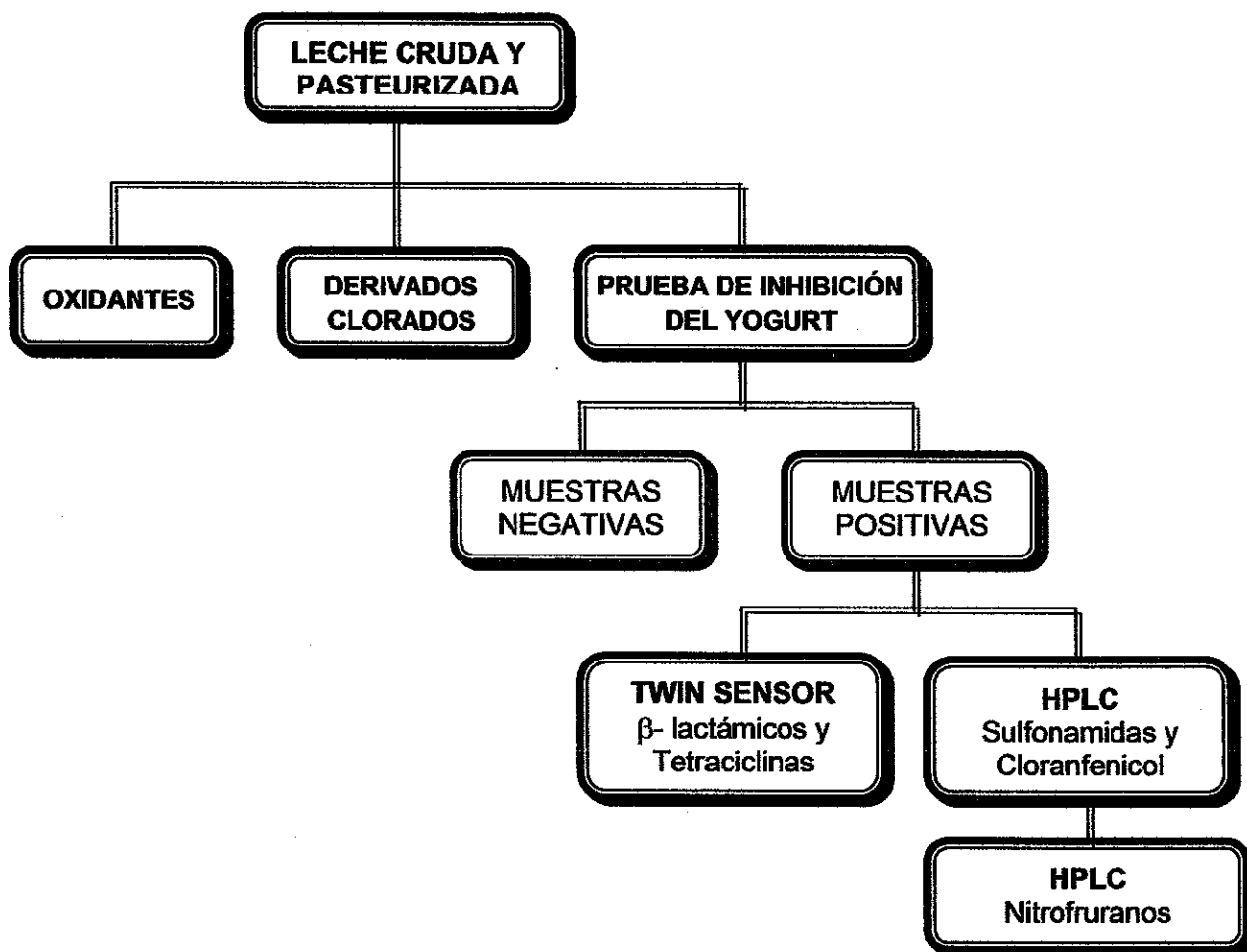
determinación de inhibidores microbianos en leche, con el objetivo de descartar muestras positivas de negativas.

Debido a la sensibilidad del método para cualquier inhibidor microbiano se respaldó el estudio con determinaciones simultáneas de oxidantes y derivados clorados de acuerdo a la NOM-184-SSA1-2002, ya que éstos compuestos pueden presentarse fundamentalmente en leches pasteurizadas debido a malas prácticas higiénicas de fabricación.

Las muestras detectadas como positivas se analizaron de acuerdo al método correspondiente para la determinación de grupo específico, mediante el juego de reactivos Twin Sensor en el caso de  $\beta$ -lactámicos y tetraciclinas según NMX-719 (2008), y de acuerdo a los procedimientos de AOAC (1995) y Pérez *et al.*, 2002 para sulfonamidas, nitrofuranos y cloranfenicol.

Para la detección de residuos de sulfonamidas y nitrofuranos se utilizaron las metodologías analíticas de acuerdo a los lineamientos propuestos por la comisión del *Codex Alimentarius* para residuos de medicamentos veterinarios en leche.

En la Figura 8 se ilustra la metodología propuesta en este trabajo para la determinación de antimicrobianos en leche.



**Figura 8. Metodología propuesta para la determinación de antimicrobianos en leche.**



## 5.2. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

### 5.2.1. Prueba de inhibición del yogurt

Se tomaron 10 mL de muestra se calentaron e inocularon por duplicado con un cultivo de la mezcla de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* (3:1) recién preparado. Se determinó la acidez previa de las muestras y un control (leche libre de sustancias inhibidoras cultivada con los mismos microorganismos) mediante titulación utilizando hidróxido de sodio 0.1 M y fenolftaleína como indicador.

Para determinar el control se probaron tres marcas de leche en polvo, (Alpura, Mix & Drink y Carnation) reconstituidas al 10 % en agua bidestilada, y se utilizó finalmente la marca comercial Mix & Drink (USA) ya que brindó los mejores resultados.

Se realizó la incubación de la muestra y el control a 45 °C por 2 h y posteriormente se tituló nuevamente para determinar el incremento de la acidez.

El incremento de la acidez en la muestra fue comparado con el del control. Se consideraron positivas a sustancias antibióticas e inhibidoras aquellas muestras en que el incremento en la acidez fue menor a la mitad del incremento de acidez desarrollada en el control.

Los métodos analíticos empleados en el trabajo fueron estandarizados teniendo en cuenta que las referencias de sensibilidad documentadas se consideran como un estimado más que como valores absolutos, puesto que las pruebas empleadas pueden ser susceptibles a la influencia de factores tales como la naturaleza de la leche muestreada, entre otros.

En el caso de la prueba de inhibición del yogurt se estima que los límites de detección de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* (3:1) pueden variar dependiendo de la cepa utilizada, por lo que se determinaron los límites de detección del método de prueba correspondientes según la recomendación de FIL/ IDF, 1987.

Debido a que la prueba del yogurt es sensible también a otros inhibidores como derivados clorados y oxidantes como el peróxido de hidrógeno, se realizaron además los métodos de prueba correspondientes para la determinación de estos compuestos en todas las muestras de leche analizadas, siguiendo los métodos de prueba descritos en la normatividad mexicana (NOM-184-SSA1-2002).

Los derivados clorados y el peróxido de hidrógeno son utilizados separados o bien incorporados a los detergentes para garantizar limpieza y desinfección como parte del proceso de higienización de los equipos de ordeña o la industria. En la tabla 8 se muestran los grupos de compuestos clorados y oxidantes más utilizados como desinfectantes.

**Tabla 8. Grupos de derivados clorados y oxidantes más utilizados como desinfectantes.**

<b>DESINFECTANTES</b>		
<b>DERIVADOS CLORADOS</b>	Hipoclorito de sodio o calcio	$\text{NaOCl}$ , $\text{Ca}(\text{OCl})_2$
	Diclorodimetilhidantoina	$\text{C}_5\text{H}_6\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_2$
	Ortofosfato Trisódico Clorado	$(\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O})\text{NaOCl}$
	Cloramina B	$\text{C}_6\text{H}_5\text{ClNO}_2\text{SNa}$
	Cloramina T (Tosilcloramina)	$\text{C}_7\text{H}_7\text{ClNO}_2\text{SNa}$
	Biguanidinas (ej, clorhexidina)	$\text{C}_2\text{H}_7\text{N}_5$
	Dicloro isocianurato de sodio	$\text{NaC}_3\text{N}_3\text{O}_3\text{Cl}_2$
<b>OXIDANTES</b>	Ácido peracético	$\text{CH}_3\text{COOOH}$
	Peróxido de Hidrógeno	$\text{H}_2\text{O}_2$

#### 5.2.1.1. Oxidantes

Para la detección de oxidantes en leche se utilizó el método descrito en la NOM-184-SSA1-2002 y AOAC. (2006)

Se colocaron 10 mL de cada muestra de leche en tubos de ensayo, y se le añadió 0.5-1.0 mL del reactivo pentóxido de vanadio. La aparición de un color rosa o rojo indicó la presencia de peróxido de hidrógeno (oxidante).

#### **5.2.1.2. Derivados Clorados**

Se tomaron 10 mL de cada muestra de leche y se pasaron a tubos de ensayo. Se le agregaron 1.5 mL de solución de yoduro de potasio al 7% y 4 mL de ácido clorhídrico diluido y se mezclaron perfectamente con una varilla de vidrio.

Los tubos se colocaron en un baño de agua a 85 °C y se dejaron reposar 10 minutos. Posteriormente fueron retirados, se enfriaron y se colocaron en baño de hielo. Se filtró y se recolectó el filtrado en otro tubo de ensayo, agregando 0.5-1.0 mL de solución de almidón.

La aparición de un color amarillo que va desde el azul hasta el azul morado (de acuerdo con la concentración del cloro presente) indicó la presencia de cloro en la muestra.

#### **5.2.2. Twin Sensor**

Se añadieron 200 µL de las muestras de leche dentro de cada pocillo y se homogenizó hasta obtener un color uniforme, se colocó el pocillo en un bloque de calentamiento a una temperatura de  $50^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  para la primera incubación durante un periodo de tres minutos. Una vez finalizada la primera incubación se introdujo la tira o indicador dentro del pocillo que contiene la muestra de leche y se hizo una segunda incubación a la misma temperatura por otros tres minutos. Una vez terminada la segunda incubación se interpretó el resultado a partir de la intensidad del color de cada línea.

La interpretación de los resultados se realiza mediante comparación de la intensidad del color desarrollado por las líneas de prueba con respecto a la línea control, mediante interpretación visual.

Los límites de detección o sensibilidad del método para compuestos  $\beta$ -lactámicos y tetraciclinas se muestran a continuación en la Tabla 9.

**Tabla 9. Límites de detección del Twin Sensor para  $\beta$ -lactámicos y tetraciclinas.**

	<b>LÍMITES DE DETECCIÓN (ppb)</b>	
<b><math>\beta</math>-lactámicos</b>	Ampicilina	3 - 4
	Amoxicilina	4 - 5
	Bencilpenicilina	2 - 3
	Cefazolina	20 - 25
	Cefoperazona	2 - 3
	Ceftiofuro	10 - 15
	Cefapirina	6 - 8
	Cloxacilina	6 - 8
	Nafcilina	40 - 50
<b>Tetraciclinas</b>	Clortetraciclina	25 - 30
	Doxiciclina	10 - 20
	Oxitetraciclina	30 - 40
	Tetraciclina	40 - 50

### 5.2.3. Análisis cromatográfico

Este método se basa en la extracción selectiva de los residuos de antimicrobianos presentes en la leche con una mezcla cloroformo- acetona (v/v). El extracto se evapora hasta sequedad a presión reducida y se redisuelve en buffer fosfato de potasio 0.1 M, desgrasándose por partición con hexano. La fase acuosa (buffer) contendrá los residuos de sulfonamidas y nitrofuranos y cloranfenicol. El extracto obtenido es filtrado por membrana milipore de 0.45  $\mu$ m e inyectado posteriormente al cromatógrafo de líquidos de alta resolución con detección UV- visible y columna de fase reversa (C18).

### **5.2.3.1.Extracción**

Se midieron 10 mL de leche previamente homogenizada y se transfirieron a un embudo de separación de 250 mL con 50 mL de la solución de extracción. Se agitó la mezcla vigorosamente durante 1 minuto venteando el embudo ocasionalmente por el tapón, no por la llave. Este proceso se repitió dos veces. Se dejaron separar las fases por 5 minutos y se filtró la fase inferior a través de papel de filtro previamente lavado con solvente de extracción y colocado en un embudo de vidrio. El filtrado fue colectado en un matraz de fondo redondo de 100 mL. Se repitió el proceso con otros 25 mL de solución de extracción, y posteriormente se unieron los extractos en el matraz de fondo redondo. Se lavó el papel de filtro 2 veces con 5 mL de la solución de extracción cada vez y se evaporó justo a sequedad en el evaporador rotatorio, cuidando que la temperatura del baño no excediera  $30 \pm 2$  °C.

Para verificar la calidad de la extracción en cada grupo de muestras se incluyó una muestra control negativo (no contaminada) y una muestra contaminada a la concentración de 0.05 µg/mL de cada estándar. Para ello, se tomaron 50 µL de la mezcla de estándares (solución de trabajo a 10 µg/mL) y se aplicó a la muestra que se va a contaminar directamente en el embudo separador antes de iniciar las extracciones. Ambas muestras se procesaron conjuntamente con el resto de las muestras de interés.

### **5.2.3.2. Purificación**

El residuo del matraz de ebullición se recuperó con un mL de buffer fosfato agitando en Vortex durante un minuto y trasvasando con pipeta Pasteur a un tubo de centrifuga de 15 mL. Se adicionaron inmediatamente 5 mL de hexano y nuevamente agitación en Vortex.

Una vez separadas las fases se extrajo la inferior (buffer fosfato) con pipeta Pasteur, transfiriendo el extracto a un vial de 2 mL. El extracto se cargó en una jeringa de plástico y se filtró por filtro de membrana de 0.45 µm. El filtrado de la muestra fue colocado en otro vial de 2 mL quedando listo para inyectar al HPLC.

## 5.2. Condiciones cromatográficas

Para analizar las muestras de sulfonamidas y cloranfenicol se utilizó el siguiente gradiente binario:

Solvente A: Buffer acetato de sodio pH 4.8: acetonitrilo (95:5) (v/v)

Solvente B: Buffer acetato de sodio pH 4.8: acetonitrilo (80:20) (v/v)

TIEMPO	% B
0	0
5	0
20	100
30	100
35	0
45	0

Flujo de fase móvil durante todo el gradiente: 1 mL/min. (Constante).

Detección: 275 nm.

Para el análisis de nitrofuranos se utilizó una composición de la fase móvil isocrática con la composición correspondiente al solvente B (Buffer acetato de sodio) pH 4,8: acetonitrilo (80:20) (v/v).

Detección: 370 nm.

Flujo de fase móvil: 1.2 mL/min.

Para el cálculo de la concentración de las muestras se emplea el método del estándar externo.

Se inyecta la solución de estándares de trabajo (5  $\mu$ L) al inicio del trabajo del día, hasta lograr reproducibilidad en las áreas de cada estándar y de los tiempos de retención. A continuación se

inyectaron las muestras control negativo (blanco) y control positivo (contaminada a 0.05 µg/mL) en un volumen superior a 70 µL. Con este volumen de inyección se garantiza llenar completamente el *loop* de 20 µL del inyector del equipo.

La muestra control negativo no debe arrojar picos de interferencias en los tiempos de retención correspondientes a los picos de interés. Se debe inyectar estándar al finalizar el trabajo para corregir pequeñas variaciones analíticas.

Los cálculos de concentración se realizan utilizando el método del estándar externo, empleando la siguiente ecuación simplificada:

$$\text{Concentración } (\mu\text{g/mL}) = \frac{A_m \times 0.25}{A_p \times R}$$

Donde:

$A_m$  y  $A_p$  = áreas del pico correspondiente en la muestra y el estándar respectivamente.

$R$  = factor de recobrado unitario, calculado mediante la siguiente expresión:

$$R = \frac{C_{\text{real}}}{0.05}$$

Donde:

$C_{\text{real}}$  = concentración real de cada compuesto obtenida del análisis de la muestra control positivo.

0.05 = concentración con la que se contaminó la muestra control positivo.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. PRUEBA DE INHIBICIÓN DEL YOGURT

De las 264 muestras analizadas mediante la prueba de inhibición de yogurt como método de selección, se encontraron 26 muestras de leche positivas a presencia de antimicrobianos, lo cual representa un 9.8 % de contaminación total.

El mayor porcentaje corresponde a la leche pasteurizada, en donde se hallaron 20 muestras positivas, equivalente a un 13.8%. En leches crudas captadas en centros de acopio hubo 6 muestras positivas, lo que corresponde a un 5% de contaminación (Tabla 10)

**Tabla 10. Frecuencia de contaminación con antimicrobianos en leche cruda y pasteurizada**

TIPO DE LECHE	N	Positivas	Porcentaje
Cruda	120	6	5
Pasteurizada	144	20	13.8
Total	264	26	9.8

El desglose por muestra de leche cruda y pasteurizada se muestra en las tablas 11 y 12 respectivamente.

**Tabla 11. Antimicrobianos detectados en muestras positivas de leche cruda**

No de Muestra	Centro de Acopio	$\beta$ -lactámicos	Tetraciclinas	Sulfonamidas
32	CECOOPAL	-	+	+
46	Matatlán	-	-	+
50	La Gloria	-	+	+
77	Los Dolores	+	+	+



178	San Isidro	+	-	-
231	San Gabriel	+	-	+

**Tabla 12. Inhibidores detectados en muestras positivas de leche pasteurizada.**

No	Marca Comercial	$\beta$ -lactámicos	Tetraciclinas	Derivados Clorados	Oxidantes	Sulfonamidas	Indet.
11	19 hermanos	-	-	+	-	+	-
21	Los cuates	-	-	+	-	+	-
34	Los cuates	-	-	+	-	+	-
39	Lala	-	-	-	-	+	-
41	19 hermanos	-	+	+	-	+	-
56	Los cuates	-	-	+	-	-	-
60	Vakita	-	-	-	-	+	-
63	19 hermanos	-	-	+	-	+	-
66	Taretan	-	+	-	-	+	-
85	19 hermanos	-	-	+	-	+	-
88	Taretan	+	-	-	-	+	-
108	19 hermanos	-	-	+	+	+	-
111	Taretan	-	-	-	-	-	+
132	Taretan	+	-	-	-	+	-
196	19 hermanos	+	-	+	-	+	-
217	19 hermanos	+	-	+	+	+	-
220	Taretan	-	-	-	-	-	+
235	19 hermanos	-	+	-	-	+	-
239	Taretan	+	-	+	+	-	-
263	Taretan	-	-	-	-	-	+

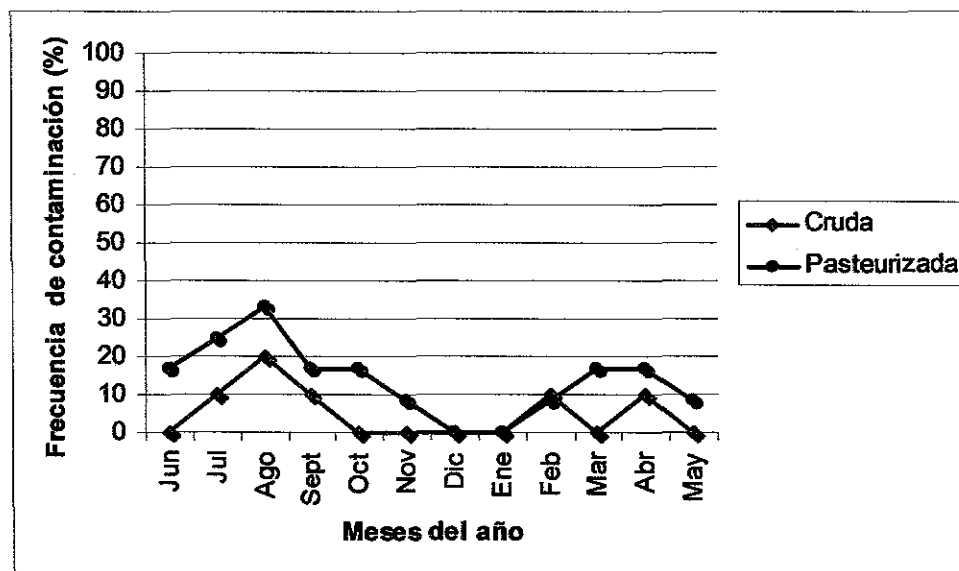
Los límites de detección de la Prueba de inhibición del yogurt utilizando la cepa *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* (3:1) y para los diferentes antimicrobianos de interés en nuestro trabajo se muestran a continuación en la tabla 13.

**Tabla 13. Límites de detección de la prueba de inhibición del yogurt en las condiciones de trabajo.**

<b>ANTIMICROBIANO</b>	<b>LÍMITES DE DETECCIÓN µg/ mL</b>	<b>LMR µg/ mL</b>
<b>Tetraciclina</b>	<b>0.1 – 0.05</b>	<b>0.1</b>
<b>Oxitetraciclina</b>	<b>0.1 – 0.05</b>	<b>0.1</b>
<b>Penicilina G</b>	<b>0.004 – 0.002</b>	<b>0.004</b>
<b>Ampicilina</b>	<b>0.01 – 0.005</b>	<b>0.02</b>
<b>Amoxicilina</b>	<b>0.032 – 0.016</b>	<b>0.008</b>
<b>Enrofloxacina</b>	<b>0.1 – 0.05</b>	<b>0.02</b>
<b>Penicilina V</b>	<b>0.05 – 0.025</b>	<b>NE</b>
<b>Sulfadimidina</b>	<b>20.0 – 15.0</b>	<b>0.1</b>
<b>Sulfamerazina</b>	<b>15.0 – 10.0</b>	
<b>Sulfamonometoxina</b>	<b>22.0 – 20.0</b>	
<b>Sulfatiazol</b>	<b>15.0 – 10.0</b>	
<b>Sulfametoxazol</b>	<b>15.0 – 10.0</b>	
<b>Sulfadiazina</b>	<b>10.0 – 8.0</b>	
<b>Furaltadona</b>	<b>0.8 – 0.4</b>	<b>NE</b>
<b>Furazolidona</b>	<b>0.8 – 0.4</b>	
<b>Nitrofurazona</b>	<b>4.0 – 2.0</b>	
<b>Cloranfenicol</b>	<b>2.0 – 1.0</b>	

### 6.1.1. Frecuencia de contaminación por mes de muestreo

En la figura 9 se muestra la frecuencia de contaminación correspondiente a los meses comprendidos en el periodo de muestreo y por cada tipo de leche.

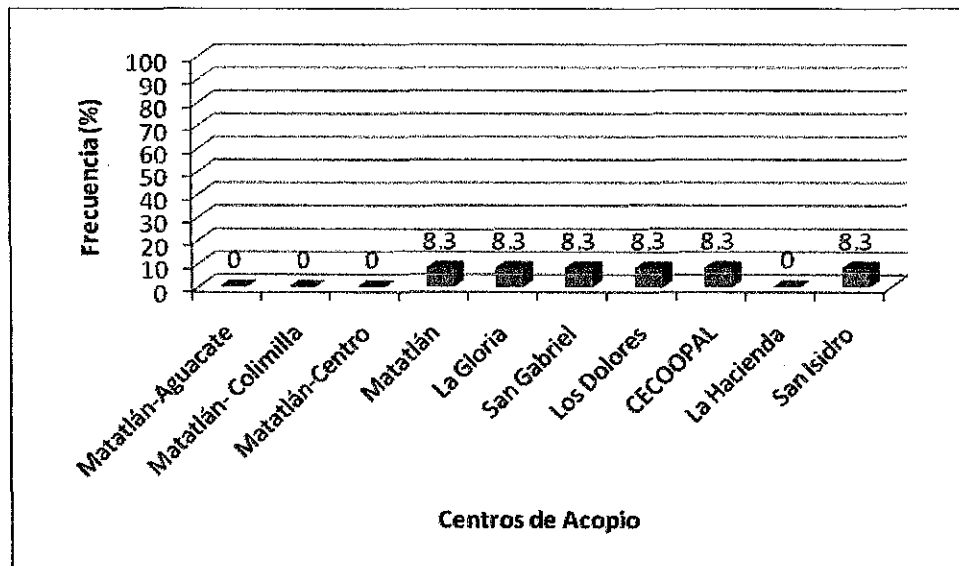


**Figura 9. Frecuencia de detección de antimicrobianos por mes**

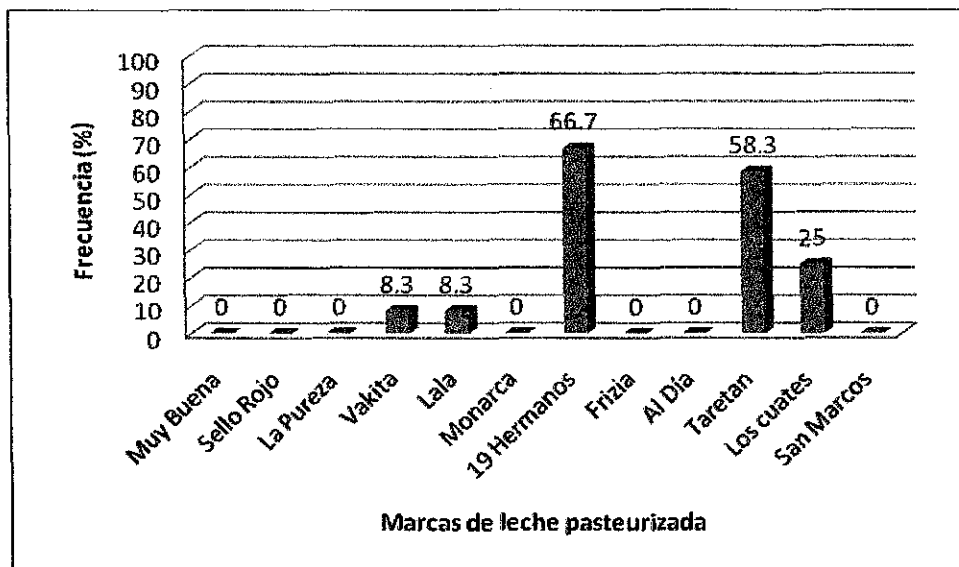
En los meses del año en que se realizó la investigación, el mayor porcentaje de contaminación por antimicrobianos se registró en el mes de agosto, 27.3% con 6 muestras positivas. En el periodo comprendido entre junio hasta noviembre se encontraron 18 muestras positivas, correspondiente a un 69.2 % del total de muestras detectadas como positivas a antimicrobianos en todo el muestreo. En los meses de diciembre y enero no se encontraron muestras positivas, mientras que a partir del mes de febrero y hasta mayo se identificaron 8 (30.8%).

### 6.1.2. Contaminación por antimicrobianos en centros de acopio y marcas de leche pasteurizada

Se determinó la frecuencia de contaminación correspondiente a cada centro de acopio y marca comercial de leche analizada para determinar los que presentan mayores dificultades en cuanto a control de calidad de la leche. La frecuencia de contaminación por antimicrobianos correspondiente a cada centro de acopio y cada marca de leche pasteurizada estudiada en el periodo de trabajo se muestran en las Figura 10 y 11 respectivamente.



**Figura 10. Frecuencia de detección de antimicrobianos en los centros de acopio muestreados**



**Figura 11. Frecuencia de detección de antimicrobianos en marcas de leche pasteurizada**

### 6.1.3. Presencia de derivados clorados y oxidantes.

En las 26 muestras identificadas como positivas mediante la prueba del yogurt 11 de ellas contenían derivados clorados, de las cuales 3 presentaron también contaminación por oxidantes. Las 11 muestras que resultaron positivas fueron de leche pasteurizada, y solo 1 de ellas presentó únicamente contaminación por derivados clorados, en el resto se detectó la presencia de algún otro antimicrobiano.

## 6.2. CONTAMINACIÓN CON $\beta$ -LACTÁMICOS Y TETRACICLINAS

En las 26 muestras que resultaron positivas a antimicrobianos mediante la prueba del yogurt se encontraron un total de 13 muestras positivas a  $\beta$ -lactámicos o tetraciclinas mediante el juego de reactivos Twin Sensor.

De 20 muestras de leche pasteurizada analizadas 6 mostraron contaminación con  $\beta$ -lactámicos mientras que solo 2 de ellas resultaron positivas a tetraciclinas.

Por su parte de las 6 muestras de leche cruda detectadas por la prueba del yogurt, 3 fueron positivas a  $\beta$ -lactámicos (50%) e igual número de muestras se reportó contaminada por tetraciclinas, presentándose una contaminación cruzada por ambos antimicrobianos en una de las muestras.

### 6.3. CONTAMINACIÓN CON SULFONAMIDAS, NITROFURANOS Y CLORANFENICOL

De las 26 muestras positivas a antimicrobianos se detectó la presencia al menos de una sulfonamida en 20 de ellas, equivalente a un 77%, sin embargo, no se encontraron muestras positivas a nitrofuranos ni cloranfenicol.

En leche cruda 5 de las 6 muestras analizadas presentaron contaminación por sulfonamidas. La mayor frecuencia de contaminación se presentó por sulfamerazina, presente en 5 muestras seguido por sulfatiazol, sulfadimidina y sulfamonometoxina presentes en 3 de las muestras analizadas, sulfadiazina con 2 muestras y sulfametoxazol en 1 (Figura 12).

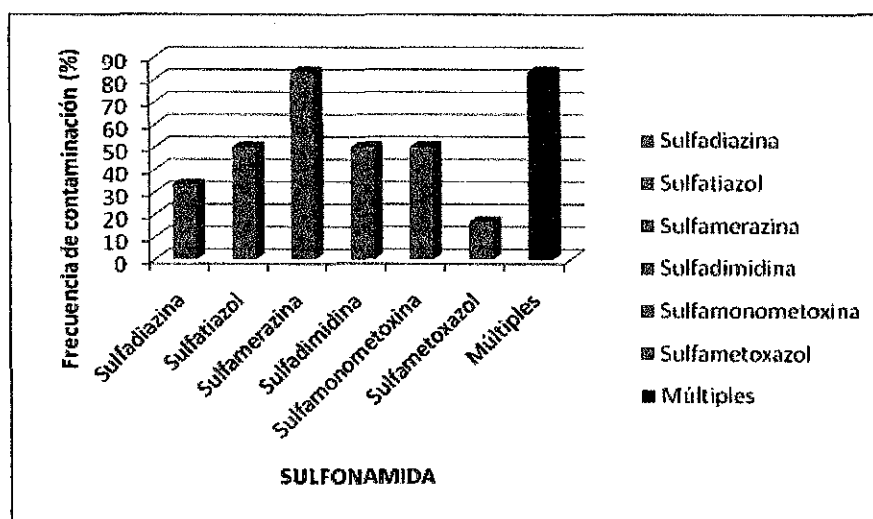
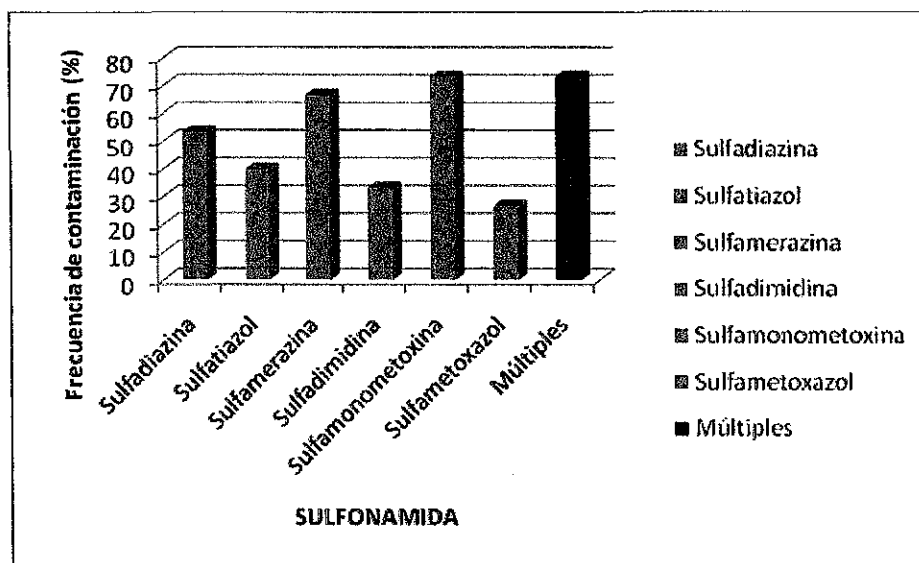


Figura 12. Leche cruda. Frecuencia de contaminación por sulfonamidas.

En leche pasteurizada se detectaron 15 muestras positivas de las 20 analizadas. La mayor contaminación se presentó con sulfamonometoxina presente en 11 muestras, seguido de

sulfamerazina en 10, sulfadiazina en 8, sulfatiazol en 6, sulfadimidina en 5 y sulfametoxazol en 4 (Figura 13).



**Figura 13. Leche pasteurizada. Frecuencia de contaminación por sulfonamidas**

Las sulfonamidas en leche fueron detectadas mediante Cromatografía de líquidos de Alta Resolución, lo que permitió identificar y cuantificar los niveles de cada compuesto por separado (Método de Nivel II) en las diferentes muestras de leche y comparar con los valores de LMR establecidos por el *Codex Alimentarius*. Tanto en leche cruda como en pasteurizada se detectaron muestras con niveles de sulfonamidas por encima del LMR (Tablas 14 y 15)

**Tabla 14. Rango de concentraciones detectadas de sulfonamidas en muestras de leche cruda**

SULFONAMIDA	RANGO DE CONCENTRACIÓN	No MUESTRAS POR ENCIMA DEL LMR	LMR
Sulfadimidina	0 – 0.02	0	0.025
Sulfadiazina	0 – 0.03	0	0.1
Sulfatiazol	0 – 0.002	0	
<b>Sulfamerazina</b>	<b>0 – 0.14</b>	<b>1</b>	
Sulfamonometoxina	0 – 0.1	0	

Sulfametoxazol	0 – 0.26	1	
----------------	----------	---	--

**Tabla 15. Rango de concentraciones detectadas de sulfonamidas en muestras de leche pasteurizada.**

SULFONAMIDA	RANGO DE CONCENTRACIÓN	No MUESTRAS POR ENCIMA DEL LMR	LMR
Sulfadimidina	0 – 0.02	0	0.025
Sulfadiazina	0 – 0.24	1	0.1
Sulfatiazol	0 – 0.02	0	
Sulfamerazina	0 – 0.16	2	
Sulfamonometoxina	0 – 0.12	2	
Sulfametoxazol	0 – 0.01	0	



## 7. DISCUSIÓN

De manera general, mediante la prueba de inhibición del yogurt empleada como método cualitativo (de Nivel III), se detectaron 26 (9.8%) muestras positivas de un total de 264 analizadas, de ellas 20 fueron de leche pasteurizada en un total de 144 muestras, y 6 de leche cruda en las 120 muestras recibidas en todo el periodo de muestreo. Estos resultados son similares a los publicados en Corea por Hiun-Hee Chung *et al.* en 2008, quien reportó 21 muestras positivas de 269 analizadas mediante un método microbiológico. Si bien no hay correspondencia entre la leche cruda acopiada para la mayoría de las marcas de leches pasteurizadas analizadas (sólo la marca Frizia se corresponde en éstas), la naturaleza de los inhibidores identificados positivamente permite confirmar la violación de la Normatividad vigente con respecto a la ausencia de antimicrobianos en leche, lo que constituye un incumplimiento de las normas establecidas en México, que especifican que la presencia de residuos de inhibidores microbianos está prohibida, ya sea en leche cruda (NMX-F-700-COFOCALEC-2004) o pasteurizada (NOM-184-SSA1-2002).

Por otra parte los derivados clorados, usados como desinfectantes y los oxidantes son también considerados inhibidores microbianos, por esta razón se realizó la determinación de los mismos en todas las muestras de leche recibidas para descartar posibles falsos positivos en el método de selección utilizado. Los resultados obtenidos mostraron que en leches pasteurizadas el 5 % de las muestras contenían al menos uno de estos inhibidores, lo que indica que son ampliamente utilizados en la industria lechera para la desinfección del equipo de trabajo, no obstante, su presencia en el alimento es objetable porque encubren malas prácticas higiénicas de fabricación.

De las 11 muestras detectadas como positivas a derivados clorados u oxidantes 10 fueron positivas a su vez a otros antimicrobianos de interés, mientras que solo una de ellas presentó únicamente contaminación por derivados clorados. Esto implica, que independientemente de la contaminación por antimicrobianos de uso veterinario, existe un problema en cuanto al control de la limpieza y desinfección de las instalaciones y utensilios empleados en el procesamiento industrial, almacenamiento y transporte de la leche, ya que

son los procesos higiénicos en los que se usan cantidades considerables de detergentes y desinfectantes. Si bien no se especifica la posibilidad de que estas sustancias puedan constituirse en inhibidores dentro de la NMX-F-720 (COFOCALEC, 2006), en su Apéndice Informativo se declara como precauciones generales “asegurar el completo drenado de las soluciones de limpieza y desinfección”. Si esta operación se realizara de forma correcta, por pura lógica no deben aparecer concentraciones inhibitorias en leche. En reglas generales es común que existan concentraciones por debajo de los 2 ppm, este valor se incrementa especialmente cuando el drenaje del equipo es inadecuado, cuando el equipo no ha sido lavado correctamente con agua, o cuando la cantidad de leche es insuficiente para remover todo el desinfectante (Reybroeck,1997).

En el caso de las muestras que presentan contaminación por oxidantes, ello pudiera considerarse además como producto de una adulteración o adición intencional de peróxido de hidrógeno u otra sale precursora del mismo u otro oxidante, para ajustar la calidad bacteriológica de la leche. Debe tenerse presente que esta sustancia no constituye un desinfectante de uso común, menos aun en leche pasteurizada, teniendo en cuenta que se trata de sustancias que se descomponen fácilmente con cualquiera de las temperaturas que se aplican durante el proceso de pasteurización.

Ello viola además el artículo 246 de la Ley General de Salud, donde en su pleca III se especifica que una leche se considera adulterada cuando haya sufridos un tratamiento que disimule su alteración o encubra defectos en el proceso.

Por lo tanto, la presencia de éstos compuestos en la leche constituye un engaño conciente y mal intencionado del productor, industrializador y/o comerciante para con el consumidor. De acuerdo con esta misma Ley se considera que un producto ha sido objeto de adulteración cuando:

- Haya sido objeto de tratamiento que disimule su alteración, contaminación o encubra defectos en su proceso o en la calidad de materias primas o ingredientes.

- La naturaleza o composición no corresponden a las etiquetadas.
- No corresponda a las especificaciones de su autorización

De esta manera se consideran adulterantes aquellas sustancias que permitan incrementar el volumen, las adicionadas para enmascarar la mala calidad del producto y las que pretenden sustituir los componentes propios del mismo.

En cuanto a aspectos tecnológicos, los residuos de desinfectantes y detergentes causan la inhibición de la actividad de los cultivos iniciadores en la producción de derivados lácteos fermentados, razón por la cual la leche contaminada con estos productos es destinada a leche fluida (Ramírez *et al.*, 2001; Gutiérrez *et al.*, 2005)

La concentración inhibitoria mínima de clorados para iniciadores de quesos está en el rango de 5-500 mg/l de leche, dependiendo del tipo de cultivo y tiempo de exposición. Una inhibición total de la acidificación puede esperarse a concentraciones de clorados entre 100-500 mg/l de leche, mientras que la inhibición parcial de la proteólisis ocurre a un nivel de 8 mg de clorados por litro de leche. Los cultivos iniciadores del yogurt son generalmente menos sensibles a residuos de clorados con respecto a los de quesos (Reybroeck, 1997).

Los derivados clorados una vez presentes en leche no pueden ser eliminados por las vías convencionales como los tratamientos térmicos, por lo que estarán presentes en la leche fluida destinada al consumidor. Esto, representa un riesgo para la salud humana. Estudios toxicológicos en Japón mostraron que la administración de peróxido de hidrógeno en ratas podía causar cáncer de duodeno, asimismo se conoce que la dosis letal de hipoclorito para humanos es de 0.5 a 1 g (Palmer, 1991).

Al relacionar la estacionalidad con la frecuencia de contaminación para cada tipo de leche observamos un incremento en el uso de antimicrobianos en la época de lluvias, comprendida entre los meses de junio a septiembre, alcanzándose un nivel máximo en el mes de agosto, esta tendencia puede explicarse teniendo en cuenta que en climas subtropicales el calor proporciona las condiciones ideales para la proliferación de

microorganismos patógenos y aumenta el nivel de estrés en los animales, lo que a menudo desencadena en un incremento de las células somáticas y mastitis con respecto al nivel de las mismas durante otras estaciones del año (Yamaki *et al.*, 2004; González, 2008).

Este comportamiento es consistente con resultados obtenidos en los Estados Unidos al correlacionar la incidencia de casos de mastitis en vacas lecheras con la época del año (Philpot y Nickerson, 2002). Otro factor a considerar es la técnica de la ordeña, que resulta más tardada en época de lluvia, lo que pudiera considerarse en un incremento en los casos de enfermedad (González, 2008).

En el caso de leches crudas, se encontró igual número de muestras positivas a  $\beta$ -lactámicos que a tetraciclinas, en cada caso se reportó un valor de 1.6% del total de muestras analizadas, de las cuales, una de ellas presentó contaminación con ambos antimicrobianos. El número de muestras positivas detectadas se concentra fundamentalmente en los meses de verano de lluvias más intensas, es decir entre julio y septiembre, meses en los que factores como la temperatura y la humedad provocan un incremento en los casos de mastitis y por consiguiente se incrementa el uso de antimicrobianos para su control. Este comportamiento se observa de igual manera en leches pasteurizadas. En Cuba, Noa y Cabrera en 1992 encontraron un 58% de positividad a antibióticos en leche que presentó problemas de coagulación en una industria láctea, con una frecuencia en orden decreciente de penicilina G y tetraciclina. En Pakistan, Khaskheli *et al.* (2008) y Arora y Chhabra en 2004 también reportan frecuencias de contaminación muy superiores a las nuestras, con valores de 36.5% y 23.8% de contaminación por  $\beta$ -lactámicos respectivamente.

En México, Cruz *et al.* en 1986 analizaron 125 muestras de leche pasteurizada de diferentes marcas comerciales por el método de cilindro en placa, encontraron que el 25% contenían penicilina, el 60% estreptomina, el 70% tetraciclina y más del 80% contenían 2 o los 3 antibióticos.

En leche pasteurizada, el valor de muestras positivas a  $\beta$ -lactámicos fue mayor que las que contenían tetraciclinas. Esto podría explicarse teniendo en cuenta que las tetraciclinas presentes en alimentos de origen animal no son estables térmicamente (Rose, *et al.*, 1996),

además los tratamientos térmicos empleados para reducir la presencia de estos antimicrobianos son más efectivos en el caso de las tetraciclinas que en  $\beta$ -lactámicos (Kühne, *et al.* 2001).

En el caso específico de la leche, los resultados obtenidos por Zorraquino *et al.* en 2008 muestran que la pasteurización (60 °C/ 30 min) produce una leve inactivación sobre los  $\beta$ -lactámicos (6-20%), efecto que es mayor en las tetraciclinas (18-31%), por lo que su detección en leche pasteurizada indica que no fue demasiado drástico dicho tratamiento o que las concentraciones de los mismos eran muy elevadas en la leche cruda, según Allison (1985) la concentración máxima excretada en leche después de un tratamiento con 200 mg de penicilina G, es capaz de contaminar la leche de 8000 vacas.

Se detectaron residuos de al menos una sulfonamida en el 7.5% del total de muestras analizadas, este valor es superior a otros reportados en leche por países como Costa Rica (2%; Mongue *et al.*, 1993) e inferior a un 37 % reportado por Italia en el año 1994 por Ferrini y colaboradores, sin embargo, la frecuencia de residuos de antimicrobianos en leche en estos países ha disminuido considerablemente en la última década al implementarse los sistemas regulatorios de análisis de residuos.

El monitoreo de residuos de antimicrobianos en leche pasteurizada realizado por Gutiérrez *et al.* en la Ciudad de México en 2005 mostró niveles alarmantes de sulfonamidas en leche, con valores por encima de un 40 % de contaminación en cada caso, no obstante, aunque nuestros resultados muestran valores muy inferiores, la presencia de estos antimicrobianos en la leche fluida indica la falta de un programa eficiente de control de residuos de antimicrobianos que pueda reflejar la problemática actual referente a la calidad de la leche en México.

Las sulfonamidas con más alta frecuencia de contaminación fueron sulfamerazina (66.7% leche pasteurizada, 83.3% leche cruda), sulfamonometoxina (73.3% leche pasteurizada, 50% leche cruda) y sulfatiazol (40% leche pasteurizada, 50% leche cruda), lo que se corresponde con resultados obtenidos por Gutiérrez *et al.* en 2005 y Hyun-Hee Cheng en

2008, donde la mayor frecuencia de contaminación por sulfonamidas fue por sulfamerazina.

Se detectaron 7 muestras con niveles de sulfonamidas por encima de los valores de LMR establecidos por el *Codex Alimentarius* para la leche. Las muestras con niveles violatorios de estos residuos se concentran entre los meses de junio a noviembre. Estos valores pueden ser el resultado de no respetar los periodos de espera luego de un tratamiento veterinario o el uso de dosis mayores a la recomendada (Gutiérrez *et al.*, 2005).

En ninguna de las muestras analizadas se detectaron nitrofuranos. En México los nitrofuranos son recomendados en el tratamiento de mastitis en vacas secas (DMVNZ, 1997). Nuestros resultados por tanto muestran que estos antimicrobianos al parecer son usados de forma correcta, o bien su uso es escaso. También podría suponerse que los residuos de nitrofuranos, si estuvieran presentes se encuentran por debajo del límite de detección del método utilizado (4, 8 y 13 µg/Kg para nitrofurazona, furazolidona y furaltadona respectivamente).

El cloranfenicol tampoco fue detectado en ninguna de las muestras analizadas, puesto que su uso está prohibido en animales destinados al consumo humano (DOF, 2004)

En cuanto a los centros de acopio muestreados durante el periodo de trabajo podemos decir que puesto que la frecuencia de contaminación fue baja, correspondiente a una muestra (8.3%) en cada caso durante todo un año, pudiéramos considerar la contaminación como casos aislados.

En el caso de las marcas de leche pasteurizada analizadas en este trabajo, que se corresponden con el 100% de las comercializadas en el estado de Jalisco, resultaron preocupantes los niveles de contaminación reportados por empresas como “19 Hermanos” (66.7%) y “Taretan” (58.3%), estas empresas no cuentan con productos certificados de acuerdo a la NOM-155-SCFI-2003, ya que de las marcas comerciales de leche pasteurizada de interés incluidas en nuestro trabajo, solamente Sello Rojo, Al- Día y Lala presentan

certificados de calidad otorgados por el Comité de Certificación de COFOCALEC, mientras que Lechera San Marcos de Aguascalientes se encuentra actualmente en proceso de certificación (COFOCALEC, 2008 (b)). No obstante, a pesar de contar con dos certificaciones por su calidad e inocuidad en sus procesos de producción de leche a nivel mundial y nacional, la empresa Lala resultó positiva en el mes de julio, y aunque éste valor representa un porcentaje bajo, reiteramos que resulta muy necesario fortalecer los mecanismos de vigilancia efectiva y oportuna de las Normas Oficiales Mexicanas, y la necesidad de promover la certificación de los productos como una forma de asegurar, al menos en mayor medida, el cumplimiento de las normas oficiales mexicanas y normas mexicanas.

La responsabilidad de la industria lechera recae al personal de control de la calidad, quienes son responsables para la formación de los productores lecheros en cuanto a buenas prácticas de manipulación de la leche y ensayos preliminares en leche cruda para la detección de residuos de medicamentos. Dicha responsabilidad incluye el personal de control de calidad en la planta procesadora, quienes hacen la evaluación final y realizan el ensayo preliminar de la leche cruda antes de su elaboración. Después de que la leche sale de la granja para su elaboración, la industria tiene la responsabilidad de los programas de monitoreo ensayos preliminares para la determinar si la leche cruda mezclada es libre de residuos no aceptables de antimicrobianos (Codex, 2000).

De las 26 muestras identificadas como positivas, en 3 (11.5%) de ellas no logramos identificar el inhibidor microbiano presente. Debido al amplio uso de macrólidos y aminoglucósidos para el tratamiento de la mastitis en los últimos años, pudiera sospecharse que fuera alguno de los compuestos correspondientes a estas familias químicas, sin embargo, no fue objetivo de nuestro trabajo la identificación de estos compuestos, por lo que se recomienda en estudios posteriores abarcar otros antimicrobianos utilizados en bovinos, incluyendo aquellos de más reciente utilización.

La determinación de todos los posibles grupos de medicamentos veterinarios que pudieran estar presentes en la leche resulta casi imposible y extremadamente costoso, por lo que para

este tipo de trabajo, que constituyen la base de los programas de control regulador de la presencia de residuos de antimicrobianos en leche, la mejor opción es emplear un método de selección (de Nivel III), y un segundo método de confirmación grupo-específico (generalmente de Nivel II) para confirmar o identificar y de ser posible cuantificar específicamente a la sustancia causante (Heeschen y Suhren, 1996).

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 (Noa *et al.* 2001)



## **8. CONCLUSIONES**

### **8.1. CONCLUSIÓN GENERAL:**

Existen residuos de antimicrobianos en la leche destinada al consumo humano en el estado de Jalisco.

### **8.2. CONCLUSIONES PARTICULARES:**

1. En el periodo desde junio del 2007 hasta mayo del 2008 se encontró un 4.1% de contaminación con antimicrobianos en las leches crudas y un 5.5% en las leches pasteurizadas del estado de Jalisco.
2. En leche cruda el 1.6 % contenía  $\beta$ -lactámicos, mientras que el 1.6% fueron positivas a tetraciclinas, de las cuales una muestra contenía ambos antimicrobianos. En las leches pasteurizadas se encontraron  $\beta$ -lactámicos en un 3.7% de las muestras y tetraciclinas en el 2% de las muestras analizadas en el periodo de trabajo.
3. El 7.5% del las muestras analizadas durante todo el periodo de muestreo contenían residuos de al menos 1 sulfonamida. No se detectaron muestras positivas a nitrofuranos ni cloranfenicol.
4. Se detectó la presencia de derivados clorados y/o oxidantes en el 4.2% de las muestras analizadas.

## 9. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES 2007-2008																									
ACTIVIDADES	1er. SEMESTRE					2do. SEMESTRE					3er. SEMESTRE					4to. SEMESTRE									
	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D		
Revisión de literatura	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Implementación de metodologías	X	X	X	X	X																				
Redacción del protocolo de tesis		X	X	X	X																				
Presentación del Seminario 1					X																				
Análisis de muestras						X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X									
Presentación del Seminario 2											X														
Presentación del Seminario 3																	X								
Análisis de resultados																	X	X	X						
Redacción de tesis																		X	X	X	X				
Presentación del Seminario 4																									X

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Albert, L. A.; Molina, A. 1998. Contaminación y Ecosistemas. En: Albert, L. A. (editora). *Curso Básico De Toxicología Ambiental*. México. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, Organización Panamericana de la Salud, Ed. LIMUSA. Grupo NORIEGA EDITORES.
- Allison J.R.D. 1985: Antibiotic residues in milk. *British Veterinary Journal*: 141(1): 9- 16.
- AOAC 2006: Handbook Of Official Analytical Methods Of Analysis. Association Of Official Analytical Chemists. Official Analytical Method. 993.32.
- Arnold, D. 1990. Propuestas para la evaluación de los residuos de medicamentos veterinarios y la seguridad del consumidor. *Noticias del Registro de Medicamentos Veterinarios*. 4(2):15-35.
- Arora, A.; Chhabra, D. 2004. Screening for antimicrobial residues in milk by disc assay. *Ind Vety.J.*, 81:1400-1401.
- ASERCA, 2000. Situación actual y perspectiva de la producción de leche de ganado bovino. *Revista electrónica. Claridades Agropecuarias* 77. Enero 2000, México.
- Bermejo, M. F. 1991. *Química analítica general, cualitativa e instrumental*. Vol. 2. Ed. Paraninfo, S. A. Madrid.
- Cervigón, I.; Sandín S.; Pérez, C.; Bahillo, C.; Vélez, C.; García, D. 2006. Síndrome de DRESS (Drug Rash with Eosinophilia and Systemic Symptoms) por sulfonamidas. *Med. Cutan. Iber. Lat. Am.* 34 (3): 120-126.
- CODEX, 1997. ALINORM 97/31a. Comisión Del *Codex Alimentarius*. Programa Conjunto FAO/ OMS Sobre Normas Alimentarias. Comisión Del *Codex Alimentarius*. 22º Período De Sesiones, Ginebra.
- COFOCALEC, 2007. Datos sobre la producción de leche en centros de acopio del estado de Jalisco. Información personal. Dr. Sergio Soltero Gardea, Director General de COFOCALEC.
- COFOCALEC, 2008 (a): EL SISTEMA PRODUCTO- LECHE DESDE UNA PERSPECTIVA GLOBAL, NACIONAL Y REGIONAL, Dr. Sergio Soltero Gardea, Director General de COFOCALEC. Conferencia impartida a los estudiantes de la Licenciatura en Ciencia de los Alimentos. 26 de septiembre de 2008, CUCBA, Universidad de Guadalajara.

- COFOCALEC, 2008 (b): Productos certificados de acuerdo con la NOM-155-SCFI-2003. Consejo Para el Fomento de la Calidad de la Leche y sus Derivados, A.C. Dirección de Certificación.
- Cogan, M. T. 1972. Susceptibility of Cheese and Yoghurt Starter Bacteria to Antibiotics. *Applied Microbiology*. 23 (5) p. 960-965.
- DMVNZ, 1997. *Directorio de Medicina Veterinaria, Nutrición y Zootecnia*. Mercadeo Estadístico SC. México.
- DOF, 2004. ACUERDO por el que se establece la clasificación y prescripción de los productos farmacéuticos veterinarios por el nivel de riesgo de sus ingredientes activos. Publicado en el Diario Oficial de la Federación el 12 de Julio de 2004. Estados Unidos Mexicanos. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
- Ferrini, A. M.; filesi, C.; Mannovi, V.; Sanzini, E.; Aureli P.; Bellomonte, G. 1994. Indagine sulla presenza di residui di sulfamidici in latti dell' Agro Pontino. *La industria del latte*. 30: 31-39.
- FIL/IDF. 1987. Yogurt Inhibitor Test in FIL/IDF. *Milk & Milk Products*. Detection of Inhibitors. 38-40.
- FIRA, 2001. Tendencias y oportunidades de desarrollo de la red leche en México. Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura. Banco de México. Boletín Informativo Núm. 317. Vol XXXIII.
- González, E. 2008. Aspectos generales sobre la mastitis. Información personal. MVZ. Eduardo González.
- Gutiérrez, R., M. Noa, G. Díaz, S. Vega Y León, M. González and G. Prado. 2005. Determination of the presence of 10 Antimicrobial Residues In Mexican Pasteurized Milk. *Interciencia*. 30(5): 291- 294.
- Harris, D. C. 2001. *Análisis Químico Cuantitativo*. Ed. Reverte. S. A. Barcelona.
- Heeschen, W. H., Blüthgen, A. 1991. Veterinary drugs and pharmacologically active compounds. In: *Monograph on Residues and Contaminants in Milk and Milk Products*, p.p. 16-83, Brussels, Belgium: International Dairy Federation.
- Heeschen, W. H.; Blüthgen, A.; Burt, R. 1997. Definitions (Basic Terms). In: *Monograph on Residues and Contaminants in Milk and Milk Products*, Brussels, Belgium: International Dairy Federation.

- Heeschen, 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.
- Hernández, L., González, C. 2002. Introducción al análisis instrumental. Ed. Ariel Ciencia.
- Huber, W. G. 1988. En: *Farmacología y Terapéutica Veterinaria*, Ed. Booth, N. H. y McDonald, L. E., Editorial Acribia S. A., Zaragoza: 15.
- Hyun-Hee Cheng; Jung-Bin Lee; Yun-Hee Cheng; Kwan-Geun Lee. 2008. Analysis of sulfonamide and quinolone antibiotic residues in Korean milk using microbial assays and high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*. Volume 113, Issue 1, 1 March 2009, Pages 297-301
- Khaskheli, M.; Malik, R.S.; Arain, M. A.; Soomro, A. H.; Arain, H. H. 2008. Detection of  $\beta$ -lactam antibiotic residues in market milk. *Pakistan Journal of Nutrition* 7 (5): 682-685.
- Kühne, M., Köne, U., Wenzel, S. 2001. Tetracycline residues in meat and Contaminants. Vol. 18, No. 7, 593-600.
- LALA. 2000. El Impacto Social y Económico de la Ganadería Lechera en la Región Lagunera. Grupo Industrial LALA SA de CV. 7ª Edición. Torreón, Coahuila, México. 207 p. (Trabajo de investigación colectivo).
- Moats, W. A. 1998. Inactivation of Antibiotics by Heating in foods and other substrates- A review. *Journal of Food Protection*.51:491-497.
- Mongue, R.; Arias, M. L.; Ellner, R. 1993. Contamination of bovine milk with residues of inhibitory substances in Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*. 41: 855-856.
- NMX-F-425-1983. Productos alimenticios para uso humano. Determinación de inhibidores microbianos en leche fluida. Food products for human use. Determination of microbial inhibitors in fluid milk. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.
- NMX-F-700-COFOCALEC-2004. Norma Mexicana. Sistema Producto Leche. Alimento Lácteo. Leche Cruda De Vaca. Especificaciones Fisicoquímicas, Sanitarias Y Métodos De Prueba. Organismo Nacional De Normalización Del COFOCALEC.
- NMX-F-718-COFOCALEC-2006. Sistema Producto Leche. Alimentos Lácteos. Guía para el muestreo de leche y productos lácteos, declaratoria de vigencia publicada en el **Diario Oficial de la Federación** el 09 de noviembre de 2006.

- NMX-F-719-COFOCALEC-2008. Norma Mexicana. Sistema Producto Leche. Alimentos. Lácteos. Proyecto de Norma Mexicana para Métodos de prueba para la determinación de antibióticos en leche.
- NMX-F-720-COFOCALEC-2006. Sistema Producto Leche – Especificaciones para el transporte de leche cruda, así como para el enfriamiento y almacenamiento de la misma en centros de acopio.
- Noa, M., Pérez, N., Díaz, G., Vega, S. 2005. Cromatografía de Gases y de Líquidos de Alta Resolución. Aplicación en el análisis de alimentos. 1<sup>ra</sup> Edición, Universidad Autónoma Metropolitana- Xochimilco, México. Ed. Casa abierta al tiempo. Serie Académicos CBS, Num. 57.
- Noa, M., Pérez, N., Gutiérrez, R., Escobar, A. 2001. Los residuos químicos en la leche: Importancia y problemática actual en México y en el mundo: Texto Serie Académicos CBS Universidad Autónoma Metropolitana: ISBN. 970-654-607-3.
- Noa, M., Ruvalcaba S., Morales H. 2008: Frecuencia de residuos de antibióticos en leche cruda en Jalisco. Agrociencia. En prensa.
- Noa, M.; Cabrera, M.C. 1992. Residuos de antibióticos en leche no apta para yogurt por cromatografía en capa delgada/bioautografía (CCDB). *Rev. Salud Anim.* 14: 181-186.
- NOM-155-SCFI-2003. Leche, Fórmula Láctea Y Producto Lácteo Combinado. Denominaciones, Especificaciones Físico-Químicas y Métodos De Prueba.
- NOM-184-SSA1-2002. Productos y servicios. Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado. Especificaciones sanitarias.
- NOM-184-SSA1-2002. Productos y servicios. Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado. Especificaciones sanitarias, publicada en el **Diario Oficial de la Federación** el 23 de octubre de 2002.
- OMS. 1990. Evaluación de ciertos residuos de fármacos de uso veterinario en alimentos. 36° *Informe del Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios*. Organización Mundial de la Salud. Serie de Informes Técnicos No. 799.
- Palmer, J. 1991. Detergents & Disinfectants in FIL/IDF. Monograph on Residues and Contaminants in Milk and Milk Products. 173-189.

- Pérez, N., R. Gutiérrez, M. Noa, G. Díaz, H. Luna, I. Escobar, Z. Munibe. 2002. Liquid Chromatographic determination of multiple sulfonamides, nitrofurans, and chloramphenicol residues in pasteurized milk. *J. AOAC International* 85(1): 20-24.
- PEV 2005. *Prontuario De Especialidades Veterinarias, Farmacéuticas, Biológicas Y Nutricionales*. 2004-2005. 24° Edición. Thomson PLM. México.
- Philpot, N., Nickerson, S. 2000. *Ganando la lucha contra la mastitis*. Ed. Westfalia-Surge, Inc: USA., p 31.
- Ramírez Acacia, R. Gutiérrez, C. González, I. Escobar, G. Castro, G. Días, G. Díaz Y M. Noa. 2001. Detección de antibióticos en leche comercializada en la Ciudad de México. *Rev. Salud Anim.* 23(1): 37- 41. ISSN 0253-570x.
- Reybroeck, W. 1997. *Detergentes & Desinfectants in FIL/IDF. Monograph on Residues and Contaminants in milk and Milk Products*. 109-119.
- Rose, M. D., Bygrave, J., Farrington, W. H. H., Shearer, G. 1996. The effect of cooking on veterinary drug residues in food:4. Oxitetracycline. *Food Aditives and Contaminants*, 13, 275-286.
- Ruvalcaba, S., Noa, M., Pérez, G. 2007. *Ciencia de la Leche*. Libro de texto. Universidad de Guadalajara, México.
- SAGARPA, 2000. *Situación actual y perspectiva de la producción de leche de ganado bovino en México 1990-2000*. Centro de Estadística Agropecuaria, México.
- Schiffmann, A. P. 1992. *Methological and Legal problems relating to the detection of inhibitory substances in milk*. Thesis Thierarztliche Hochschule, Hanover, Germany.
- Shahani, K. M., Whalen, P.J. 1986. Significance of antibiotics in foods and feeds, in *Agricultural Uses of Antibiotics*, edited by Moats, W.A, A.C.S. Symposium series 320, Washington, D.C.: 88-99.
- Shan, G.; Lipton, C.; Gee, S. J.; Hammock, B. D. 2002. Immunoassay, biosensors and other nonchromatographic methods. In *Handbook of Residue Analytical methods for Agrochemicals*; P. W. Lee, Ed.; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. 623-679.
- Shim, W.-B., Yang, Z.-Y., Kim, J.-Y., Choi, J.-G., Je, J.-H.; Kang, S.-J., Kolosova, A. Y., Eremin, S. A., Chung, D.-H. 2006. Immunochromatography Using Colloidal Gold-Antibody Probe for the Detection of Atrazine in Water Samples. *J. Agric. Food Chem.* 54, 9728-9734.

- SIAP, 2001. Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera. Boletín de Leche., México.
- Suhren, G., Hammer, P., Shakaryan, G.A. 1994. Inhibitor substances, antibiotics and sulfonamides. *Kieler Milchw. Forsch.* 46(3): 247-248.
- Sumano, H. S., Ocampo, L. 1997. *Farmacología Veterinaria*. Segunda edición. Mac Graw-Hill Interamericana Healthcare Group. México, D.F.
- Volkert, T. 1992. Successful management of clinical chronic mastitis. II. Influence of antibiotic drying off on udder health. *Praktische Tierarzt.* 73(3):207-208.
- Yamaki, M.; Berruga, M. I.; Althaus, R. L.; Molina M. P.; Molina, A. 2004. Occurrence of antibiotic residues in milk from manchega ewe dairy farms. *J. Dairy Science.* 87:3132-3137.
- Yingprayoon, P. 1989. Effect of heat treatment of milk on the detection of antibiotics. Inaugural dissertation. Fauchbereich Veterinar-Medizin, Freie Universitat, Berlin, FRG.
- Yunis A. A. 1989. Chloramphenicol toxicity: 25 years of research. *The American Journal of Medicine,* 87(3):44-48.
- Zorraquino, M. A., Roca, M., Fernández, N., Molina, M. P., Althaus, R. 2008. Heat inactivation of beta-lactam antibiotics in milk. *Journal of Food Protection.* 71 (6):1193-8. 3-8.