

CONTAMINACION CON RESIDUOS DE CLORAMFENICOL Y NOVOBIOCINA DE LA LECHE PASTEURIZADA Y ENVASADA EN EL AREA METROPOLITANA DEL DISTRITO FEDERAL

CESAR R. SANCHEZ H.

FRANCISCO VELAZQUEZ Q.

MARCELO PEREZ D.

RESUMEN

Se llevó a cabo una encuesta sobre la contaminación de la leche pasteurizada que se consume en el Distrito Federal y su área metropolitana. Se colectaron 200 muestras que primero se ensayaron por el método microbiológico rápido, con *Bacillus stearothermophilus*. Ciento diez muestras resultaron contaminadas con inhibidores del crecimiento de *Bacillus stearothermophilus* (55%). Estas 110 muestras se ensayaron por cromatografía en capa delgada, para detectar residuos de cloramfenicol y de novobiocina. La contaminación por cloramfenicol apareció en seis muestras (3%) y por novobiocina en dos (1%). Aunque pequeñas en número, estas contaminaciones son preocupantes debido al peligro que representan para la salud pública.

Hasta la fecha se han considerado como rastreadores de la contaminación de alimentos de origen animal, tales como leche, carne, vísceras y huevos, a las tres familias de antibióticos de uso más frecuente en la producción de alimentos y en la práctica veterinaria: estreptomycinas, penicilinas y tetraciclina. Debido a que el cloramfenicol y la novobiocina se emplean en forma creciente, se decidió hacer una encuesta con leches pasteurizadas y envasadas disponibles en el área metropolitana.

Proyecto de Investigación en Mastitis, Sector Pecuário, INIFAP-SARH, Km. 15.5 Carr. México-Toluca, México, D.F., C.P. 05110. Palo Alto, México, D.F., C.P. 05110.

Tec. Pec. Méx. Vol. 25, No. 3 (1987)

na del Distrito Federal, con el fin de conocer en qué proporción se encuentran estos contaminantes en la leche.

Las excelencias de la leche como alimento para el hombre quedan invalidadas si está contaminada con residuos de quimioterápicos que pueden ejercer acción nociva en quienes la consumen, como en el caso de los antibióticos cloramfenicol y novobiocina.

El cloramfenicol es un antibiótico bacteriostático de amplio espectro que se obtiene por síntesis. Su uso en medicina humana es específico para el tratamiento de la fiebre tifoidea (Ott y col., 1978). En el caso de animales, su uso es demasiado generalizado, ya que de manera indiscriminada se aplica en el tratamiento de diferentes enfermedades. La novobiocina, también llamada estreptonevicina, ardelmicina y biotensín, tiene acción bactericida y bacteriostática contra gérmenes gram-positivos, en especial *Streptococcus grupo A* y *viridans*, y algunos gérmenes gram-negativos: *Proteus*, *Salmonella*, *Pasteurella* y *Klebsiella*. Es producida por *Streptomyces niveus* y *Streptomyces sphaeroides*. Se utiliza en el tratamiento de mastitis, en combinación con penicilina (Fuentes, 1985).

La contaminación por residuos de cloramfenicol y de novobiocina es muy peligrosa para la salud pública, debido

a los graves daños que produce en la población que los ingiere.

En estudios realizados en niños recién nacidos cuyas madres ingirieron cloramfenicol durante el embarazo, mostraron deficiencias hepáticas para degradar el antibiótico, lo que produce niveles séricos muy altos de la droga y un cuadro caracterizado por colapso circulatorio, cianosis y muerte -síndrome gris- (Gotuzzo, 1979). La administración prolongada de cloramfenicol en el hombre provoca discracias sanguíneas y destrucción de células nerviosas en desarrollo (Jawetz y col., 1981; Litter, 1983; Tópicos de la Glándula Mamaria, 1986).

Estudios en niños recién nacidos cuyas madres ingirieron novobiocina durante el embarazo sufren daño hepático que se manifiesta por hiperbilirrubinemia (Gotuzzo, 1979).

Debido al demostrado peligro que estos antibióticos representan para los humanos y su empleo frecuente en las explotaciones lecheras, el presente trabajo se enfoca a la detección de cloramfenicol y novobiocina en leche pasteurizada comercial que se consume en el área metropolitana del Distrito Federal.

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación en Mastitis, Sección Antibióticos, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. Se colectaron 200 muestras de leche pasteurizada de marcas comerciales, tomadas al azar en diferentes zonas del área metropolitana del Distrito Federal. La colección se hizo en frascos de vidrio o de plástico en casas particulares, expendios de leche y establecimientos comerciales. Se conservaron en refrigeración (4°C) hasta el momento del análisis, que fue siempre al día siguiente de su obtención. Se registraron los datos correspondientes a nombre y presentación comercial, fecha de envasado, zona y fecha de la colecta.

El primer paso fue analizar las 200 muestras de leche por el método microbiológico rápido con **Bacillus stearothermophilus**, para identificar las que contienen inhibidores (Velázquez y Pérez, 1983).

Las 110 muestras que resultaron positivas (55%) se sometieron al análisis por cromatografía en capa delgada (CCD) para identificar en forma específica las que contenían cloramfenicol, novobiocina o ambas (Allen, 1985; Betina, 1972; Moatz, 1985).

El método utilizado es el siguiente: En un embudo de separación se colocan 5 ml de leche más 30 ml de acetomitrilo-agua (6:1) y se agitan bastante fuerte; se agregan 10 ml de hexano Q.P. concentrado, se agita y se deja reposar. Se separa la fase inferior de acetomitrilo-agua y se recoge en otro embudo de separación en el que se agregan otros 10 ml de hexano concentrado, se agita y se separa la fase inferior en un matraz de bola con boca esmerilada. Este matraz se acopla en un aparato rotatorio de evaporación al vacío y se evapora a sequedad, a 55°C y 0.05 kg/cm². El residuo seco se redisuelve con 2.5 ml de metanol absoluto y se recoge en tubo con tapón de rosca.

La separación del cloramfenicol y la novobiocina se efectuó por CCD (Allen, 1985; Betina, 1972; Moats, 1985). Para el cloramfenicol se colocan en forma alternada en una cromatoplaça de sílice gel G (20 x 20 cm) 1 y 5 µl de extracto y 1 y 5 µl de estándar de cloramfenicol con una concentración de 1 µg/µl. Se corren en cámara cromatográfica con 100 ml de cloroformo saturado con 1/5 de su volumen de una mezcla 1:1 de metanol absoluto-ácido fórmico al 4% en agua, hasta que el frente del solvente asciende a 10 cm. Después de secarse a temperatura ambiente las manchas se revelan mediante el rociado de una mezcla compuesta de 3 ml de

C U A D R O 1

MUESTRAS DE LECHE ANALIZADAS: MUESTRAS POSITIVAS A INHIBIDORES EN GENERAL, MUESTRAS POSITIVAS A CLORANFENICOL Y A NOVIOBIOCINA.

MUESTRAS DE LECHE	NUMERO	%
Muestras analizadas.	200	100
Muestras positivas a - inhibidores en general	110	55
Muestras positivas a cloramfenicol	6	3
Muestras positivas a novobiocina	2	1

cloruro estañoso al 15% en ácido clorhídrico concentrado, 15 ml de ácido clorhídrico concentrado y 180 ml de agua destilada. Se deja secar a temperatura ambiente y se rocía con otra mezcla formada por 5 ml de p-dimetilbenzaldehído al 10% en ácido clorhídrico concentrado, 10 ml de ácido clorhídrico concentrado y 20 ml de acetona. El hRF (lectura x 100) de cloramfenicol es 9 y las manchas se ven, a ese nivel, de color amarillo (Betina, 1972).

Para novobiocina se emplea un cromatofolio Merck PL de sílice gel 60 F₂₅₄, de 20 x 20 cm. Se colocan en forma alternada 1 y 5 µl de extracto y 1 y 5 µl de estándar de novobiocina con una concentración de 1 µg/µl. Se corren en cámara cromatográfica con una mezcla de etanol-amoniaco concentrado-agua (8:1:1), hasta que el frente del solvente asciende a 10 cm. Se seca a temperatura ambiente. La lectura x 100 (hRF) de la novobiocina es de 82. Con luz ultravioleta de 254 nm las manchas se ven oscuras sobre un fondo verdoso (Betina, 1972).

Por no contar con un densitómetro, tanto los residuos de cloramfenicol

como los de novobiocina sólo se evidenciaron por la aparición cualitativa de las manchas amarillas en el caso de cloramfenicol, después de rociado el cromatograma con las dos soluciones reveladoras que se describen y por la aparición de manchas oscuras en un fondo verdoso al colocar el cromatograma de novobiocina bajo la luz ultravioleta de 254 nm. La sensibilidad de ambas técnicas permite detecciones mínimas de entre 10 y 1000 ppb.

Los resultados se presentan en el Cuadro 1. De las 200 muestras analizadas, 110 mostraron contaminación por inhibidores no especificados (inhibidores del crecimiento de *Bacillus stearothermophilus* variedad *calidolactis*), que equivale al 55% del total. De estas 110 muestras analizadas por CCD, seis mostraron contaminación por cloramfenicol, muestras que representan el 3% del total, y dos contenían residuos de novobiocina, que representan el 1% del total.

La contaminación evidenciada para cloramfenicol (3%) y para novobiocina (1%) en la leche pasteurizada y envasada en el Distrito Federal y su área metropolitana, aunque pequeña en número, es importante por los daños

que puede producir en la población que los ingiere.

SUMMARY

A survey on milk contamination with chloramphenicol and novobiocin residues was conducted on 200 milk samples obtained in México City and it's suburbs. An initial screening for the presence of inhibitors was done to all samples using the microbiologic assay with *Bacillus stearothermophilus*. One hundred and ten samples (55%) were positive to inhibitors. These samples were assayed for chloramphenicol and novobiocin by thin layer chromatography following recommended procedures. Six milk samples contained chloramphenicol and two novobiocin.

LITERATURA CITADA

ALLEN, E.D., 1985. Review of chromatographic methods. Chloramphenicol residues in milk, eggs, and tissues from Food-Producing Animals. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 68 (5):990.

BETINA, V., 1972. "Antibiotics"; in: "Pharmaceutical applications of thin-layer and paper chromatographie", Maceck Karell ed., Ed. Elsevier Publishing Co. Amst.-Lon-N.Y., p. 501.

FUENTES, H.V., 1985. Farmacología y Terapéutica Veterinaria. Ed. Inter-americana, México, D.F. pp. 108 y 124.

GOTUZZO, E., 1979. Uso de antibióticos en gestantes. *Rev. San. Mimest. Int.*, 40 (1):95.

JAWETZ, E., MELNICK, J.L., y ADELBERG, E.E., 1981. Manual de Microbiología Médica, 9ª Ed. Ed. El Manual Moderno, México, D.F., p. 171.

LITTER, M., 1983. Farmacología Experimental y Clínica, 6ª Ed. Ed. El Ateneo, Argentina. p. 1607.

MOATS, W.A., 1985. Chromatographic methods for determination of macrolide antibiotics residues in tissues and milk of food-producing animals. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 68 (5):980.

OTTH, R.C., TEJERO, P.A. y WILSON, S.G., 1978. Aislamiento de las cepas de *Salmonella typhi* resistentes al cloramfenicol. *Bol. Inst. Bacte.* Chile XX (1-2):62.

TOPICOS SOBRE LA GLANDULA MAMARIA, 1986. Ed. Laboratorio de Investigación en Mastitis, INIFAP-SARH 1 (8): 3.

VELAZQUEZ, Q.F., PEREZ, D.M., 1983. Evaluación del método microbiológico rápido para la determinación de residuos de antibióticos en la leche. *Rev. Inv. Pec. Méx.* p. 595.