



UNIVERSIDAD NACIONAL
“PEDRO RUIZ GALLO”



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA
Y PARASITOLOGÍA

DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS Y PERÓXIDO DE
HIDRÓGENO (H₂O₂) EN LECHE FRESCA COMERCIALIZADA EN EL
DISTRITO DE CHICLAYO, MAYO - NOVIEMBRE 2013.

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO DE LICENCIADO EN:
BIOLOGÍA – MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

Presentado por:

Bach. Carrasco Vega Jessica Patricia
Bach. Obando Atoche Aurea Susetty

LAMBAYEQUE – PERÚ
2013

UNIVERSIDAD NACIONAL “PEDRO RUIZ GALLO”

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

**DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS Y PERÓXIDO DE
HIDRÓGENO (H₂O₂) EN LECHE FRESCA COMERCIALIZADA EN EL
DISTRITO DE CHICLAYO, MAYO - NOVIEMBRE 2013.**

Bach. Carrasco Vega Jessica Patricia

Bach. Obando Atoche Aurea Susetty

TESIS

**PARA OPTAR EL TÍTULO DE LICENCIADO EN:
BIOLOGÍA – MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA**

APROBADO POR:

Dra. Martha Vergara Espinoza

PRESIDENTE

Mg. José Reupo Periche

SECRETARIO

Lic. Julio Silva Estela

VOCAL

Dra. Graciela Albino Cornejo

PATROCINADORA

“Siempre sueña y apunta más alto de lo que sabes que puedes lograr”

William Faulkner

DEDICATORIA

A Dios nuestro padre celestial por haberme dado la sabiduría e iluminado mi mente y mi ser en este camino de la vida con esfuerzos, salud y paciencia para salir airosa ante cualquier adversidad.

En memoria de mi madre Julia por haberme dado la vida, por su amor y apoyo incondicional en este reto cumplido, que desde el lado del señor me da fuerzas, me cuida e ilumina mi vida.

A mi padre Antero quien con su esfuerzo incondicional, apoyo y comprensión supo orientarme para llegar a cumplir el anhelo más grande de mi vida.

A mis hermanos Luis y Edgard con quienes siempre conté para superar cada dificultad, por su valorable y desinteresado apoyo.

A mis sobrinos Mariagracia y André por contagiarme las alegrías y fantasías y enseñarme lo sencillo de la vida como el sonreír, cantar y amar.

Jessica Patricia

A Dios y a la Santísima Cruz de Motupe por iluminar mi camino, cuidar mis pasos y permitirme llegar hasta donde estoy, logrando lo que me propuse hasta ahora.

A mis padres Luis Obando y Martha Atoche por su apoyo incondicional y su esfuerzo por darme lo mejor hasta hacer de mí la persona y profesional que esperaron.

A mis nueve hermanitos, en especial a Priscilla, John y Gemma, por ser lo más importante en mi vida y para los que espero ser un ejemplo en su vida profesional.

A mis abuelitos Isidora y florentino por amarse como lo hicieron. Por tus bendiciones desde el cielo abuelita y a ti viejito lindo por tus consejos, cuentos, anécdotas y el gran cariño al que nos tienes acostumbrados.

A Juan Rosas por quererme como una hija, criarme, nunca negarme su apoyo y por ser para mí un ejemplo de perseverancia.

A mis guapísimas tías (Magda, Isabel, Rosario, Elisa) a mis primos, mis primas y mis sobrinitos especialmente a mi Nao por celebrar conmigo cada triunfo.

Y obviamente A ti mi amor, por tu motivación, tu amistad y por todos los sueños que tenemos juntos.

Aurea Susetty

AGRADECIMIENTOS

Nuestro agradecimiento a la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, por formarnos profesionalmente.

A la Dra. Graciela Albino Cornejo, por su gran apoyo en la realización de este proyecto y por sus exigencias que permitieron la culminación de la presente investigación de manera satisfactoria.

A los docentes de la Facultad de Ciencias Biológicas especialmente a: Lic. Carlos Espinoza, Dra. Martha Vergara, Lic. Gianina Llontop, Mg. Teresa Silva, Lic. Mario Moreno y Lic. Guillermo Delgado por su excelente labor como docentes de nuestra facultad y por ser para nosotras un ejemplo a seguir.

Al Mg. José Reupo Periche por su amistad, sus ideas y consejos y a todo el jurado calificador que nos corrigió y aconsejó para enmendar errores y llegar al final de nuestra investigación.

Al CMDT. Blgo. PNP. Carlos Alberto Paz Campos, por ser un ejemplo de lucha, de conocimiento y trabajo hasta llegar a lo que te propones.

A nuestros padres orgullosos por vernos terminar la carrera que por vocación elegimos, y porque nunca dejaron de apoyarnos.

Muchas gracias

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS	9
ÍNDICE DE FIGURAS	10
ÍNDICE DE ANEXOS	11
I. INTRODUCCIÓN	12
II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	14
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
3.1 MATERIALES.....	18
3.1.1. Material Biológico.....	18
3.1.2. Población y Muestra.....	18
3.2. METODOLOGÍA.....	19
3.2.1. Obtención y transporte de las muestras (Llanos 1990 - 1991).....	19
3.2.2. Procesamiento de las muestras.....	19
IV. RESULTADOS.....	24
4.1 Residuos de antibióticos y Peróxido de Hidrógeno en leche fresca comercializada en el distrito de Chiclayo. Mayo – Noviembre 2013	24
4.2. Residuos de antibióticos en leche fresca que se comercializa en Chiclayo.	26

4.2.1. Residuos de antibióticos en leche fresca comercializada a nivel de mercados de Chiclayo	27
4.2.2. Residuos de antibióticos en leche fresca comercializada a nivel de las calles de Chiclayo.	29
4.2.3. Residuos de antibióticos en leche fresca obtenida a nivel de establos de Chiclayo	29
4.2.4. Residuos de antibióticos en leche fresca obtenida a nivel de centros de acopio de Chiclayo.....	30
4.3 Según el tipo de antibiótico	30
4.4. Peróxido de hidrógeno en leche fresca comercializada en Chiclayo	32
4.4.1. Peróxido de hidrógeno en leche fresca comercializada a nivel de calles de Chiclayo.	32
V. DISCUSIÓN.....	34
VI. CONCLUSIONES.....	38
VII. RECOMENDACIONES.....	39
VIII. RESUMEN.....	40
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
X. ANEXOS	44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Residuos de Antibióticos y Peróxido de Hidrógeno (H ₂ O ₂) en leche fresca comercializada en el distrito de Chiclayo. Mayo - Noviembre 2013.....	25
Tabla 2: Residuos de antibióticos en leche fresca en relación al lugar de distribución para su comercialización. Chiclayo. Mayo - Noviembre 2013	26
Tabla 3: Residuos de antibióticos en leche fresca comercializada a nivel de mercados de Chiclayo. Mayo - Noviembre 2013	28
Tabla 4: Residuos de Antibióticos en leche fresca comercializada a nivel de las calles de Chiclayo. Mayo - Noviembre. 2013.....	29
Tabla 5: Residuos de Antibióticos en leche fresca obtenida a nivel de establos de Chiclayo. Mayo - Noviembre 2013.....	30
Tabla 6: Residuos de antibióticos en leche fresca obtenida a nivel de los centros de acopio de Chiclayo. Mayo – Noviembre 2013.....	30
Tabla 7. Tipo de Antibiótico presente en la leche fresca comercializada en Chiclayo. Mayo a Noviembre 2013.	31
Tabla 8: Peróxido de Hidrógeno (H ₂ O ₂) en leche fresca en relación al lugar de distribución para su comercialización. Chiclayo. Mayo - Noviembre 2013.....	32
Tabla 9: Peróxido de Hidrógeno (H ₂ O ₂) en leche fresca comercializada a nivel de calles de Chiclayo. Mayo - Noviembre 2013.....	33

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1:** Determinación de Residuos de Antibióticos por el método de cultivo de la cepa de *Bacillus stearothermophilus* en la leche fresca que se comercializa en Chiclayo. Mayo - Noviembre 2013..**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 2:** Determinación de Residuos de Antibióticos por el Combo test kit MilkGuard que detecta antibioticos β - lactamicos y tetraciclinas en la leche fresca que se comercializa en Chiclayo. Mayo - Noviembre 2013, 23
- Figura 3:** Determinación de Peróxido de hidrógeno por el método de Kremenchuzky (2009)24
- Figura 4:** Residuos de Antibióticos en leche fresca comercializada en el distrito de Chiclayo. Mayo - Noviembre 2013 25
- Figura 5:** Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) en leche fresca comercializada en el distrito de Chiclayo. Mayo - Noviembre 2013 26
- Figura 6:** Residuos de Antibióticos en leche fresca en relación al lugar de distribución para su comercialización. Chiclayo. Mayo – Noviembre 2013.....27
- Figura 7:** Residuos de Antibióticos en leche fresca comercializada a nivel de mercados de Chiclayo. Mayo - Noviembre 2013.....28
- Figura 8:** Tipo de antibiótico presente en la leche fresca comercializada en Chiclayo entre Mayo a Noviembre 2013.31

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Concentraciones permitidas de antibióticos en leche.....	44
Anexo 2: Preparación de Acido vanádico al 1% en H ₂ SO ₄ 4N.....	45
Anexo 3: Preparación del H ₂ SO ₄ 4N.....	46
Anexo 4: Resultados para residuos de antibióticos y Peróxido de Hidrógeno en leche fresca comercializada en Chiclayo. Mayo – noviembre 2013.....	47
Anexo 5: Residuos de antibióticos en leche fresca comercializada en Chiclayo. Mayo – noviembre 2013.....	48
Anexo 6: Peróxido de Hidrógeno en leche fresca comercializada en Chiclayo. Mayo – Noviembre 2013.....	49
Anexo 7: Procedimiento del Combo Test Kit MilkGuard para detectar Residuos de antibióticos β- lactámicos y tetraciclinas	50
Anexo 8: Lectura del Combo Test kit MilkGuard para detectar antibióticos β- lactámicos y tetraciclinas.....	51

I. INTRODUCCIÓN

La leche es un producto universal de origen animal que por su alto valor nutritivo y alto grado de digestividad es de suma importancia en la alimentación humana; asimismo de acuerdo con los organismos internacionales de referencia, la leche y sus derivados pertenecen al grupo de alimentos de mayor riesgo en salud pública, no sólo por tratarse de un alimento básico y por lo tanto de amplio consumo, sino por su susceptibilidad para transmitir enfermedades debido a la presencia de microorganismos y contaminantes como medicamentos veterinarios, hormonas, plaguicidas y antibióticos.

Los residuos o inhibidores en leche han sido definidos como toda sustancia química o biológica, que al ser administrada o consumida por el animal, se elimina y/o permanece como metabolito en la leche con efectos nocivos para el consumidor (Cotrino, 2008). De los medicamentos veterinarios más usados en la práctica veterinaria se encuentran los empleados para controlar infecciones, estas últimas incluyen a los antibióticos empleados en el tratamiento de enfermedades infecciosas; los desinfectantes y detergentes en los procesos de limpieza y desinfección y los pesticidas en el control de garrapatas, moscas y malezas. Son varios los antibióticos cuyo uso está ampliamente difundido en la ganadería lechera, constituyéndose los principales contaminantes de la leche. El uso indiscriminado de estos fármacos especialmente cuando no es aplicado por el profesional médico Veterinario, determina su presencia en la leche con consecuencia grave en la salud del consumidor (Lewis, 1967); constituyendo un riesgo constante para la población el consumo de leche fresca o sus derivados contaminados con residuos de antibióticos y a la vez la hace inapta para el consumo humano por contravenir el Reglamento Sanitario de Alimentos.

Por otro lado el Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2), es usado para reducir el contenido bacteriano de la leche y para aumentar la capacidad conservadora de ésta, reduciendo las pérdidas consecutivas del agriado durante el transporte, que hacen la leche inutilizable para la pasteurización y el consumo. (Infortambo, 2000).

Los riesgos del uso de Peróxido de Hidrógeno, entre otros radican en su posible toxicidad, provocando síntomas como dolor abdominal, ardor de garganta al ingerirse y según la cantidad que se tome, podría generar vómitos.

Es importante la determinación de residuos de antibióticos y H_2O_2 por las repercusiones que puedan tener en la salud de los consumidores sobre todo en niños, es también importante su análisis por los problemas tecnológicos que pueden presentarse en fabricación de algunos productos como queso o yogurt al utilizar materia prima con residuos de antibióticos y/o H_2O_2 , sin embargo son escasos los estudios que demuestren la presencia de estos residuos en la leche fresca que se consume en nuestro departamento; de allí que en el presente estudio se planteó la siguiente interrogante : ¿Posee residuos de antibióticos y Peróxido de Hidrógeno la leche fresca comercializada en el distrito de Chiclayo. Mayo – Noviembre 2013?, para lo cual se planteó el objetivo general:

- Determinar Residuos de Antibióticos y Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) en leche fresca comercializada en el distrito de Chiclayo. Mayo – Noviembre 2013.

II. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

Llanos 1990 - 1991. Investigó la presencia de Residuos de antibióticos en 216 muestras de leche fresca provenientes de diferentes lugares de expendio de la ciudad de Cajamarca, como mercados, tiendas y algunos fundos, utilizando para este propósito el método de cultivo de la cepa de *Bacillus stearothermophilus* y la prueba de difusión estándar Delvostest para cada una de las muestras, encontrando un 20.83% de muestras positivas para la presencia de Residuos de antibióticos con porcentajes similares entre las muestras provenientes de mercados y las provenientes de tiendas y fundos (20.67% y 21.1% respectivamente). Tales resultados obtenidos confirmaron el existente uso indiscriminado de los antibióticos en el tratamiento de las vacas lecheras y no es controlado especialmente cuando esta leche va a la comercialización.

Guerreo, et al. 2009. Analizaron 40 muestras de leche cruda comercializada en diferentes mercados del distrito del Callao para determinar Residuos de antibióticos β - lactámicos y/o tetraciclinas empleando para este objetivo el método presuntivo de IDEX Laboratorios - Kit para detectar residuos de antibióticos β - lactámicos y tetraciclinas y realizando a cada muestra el análisis por duplicado. De tal estudio se encontró un alto porcentaje de muestras con resultado positivo para residuos de antibióticos β - lactámicos (40%) y no se encontraron muestras positivas para residuos de tetraciclinas, demostrando la clara existencia de contaminación de la leche fresca con residuos de antibióticos, siendo los β - lactámicos los de mayor uso.

Reyna, 2099. Detectó la presencia de residuos de antibióticos β lactámicos y de tetraciclinas en muestras de leche cruda, leche UHT y leche esterilizada envasada utilizando el Snap IDEXX como método presuntivo, que pudo detectar la presencia de individual o en mezcla de residuos de ampicilina, amoxicilina, penicilina de ceftiofur a semejanza del método de *Bacillus stearothermophilus* modificado. De tal investigación resultó un 41.66% de muestras positivas a la presencia de residuos de β - lactámicos en leche cruda, en leche UHT no se obtuvieron resultados positivos en ninguna de las muestras estudiadas y en la leche esterilizada envasada se encontró 66.66% de resultados positivos y no se detectaron residuos de tetraciclinas en ninguna de las muestras de leche evaluadas.

Noa, et al. 2010. Evaluaron la presencia de residuos de antibióticos y quimioterapéuticos en 264 muestras de leche cruda pasteurizada en Jalisco – México analizadas con una combinación de métodos; empleando como método de selección la prueba del yogurt sometiendo por tal motivo las muestras a un kit colorimétrico Twin sensor para la detección de β -lactámicos y tetraciclinas y a Cromatografía líquida de alta resolución para detectar sulfamidas, cloranfenicol y nitrofuranos. Con la prueba del yogurt los resultados arrojaron un 13.8% de contaminación total de la leche pasteurizada de la cuales 6 muestras contenían residuos de β -lactámicos y 2 muestras de tetraciclinas, además el 77% de las muestras positivas al menos contenía una sulfonamida y no se encontraron muestras positivas a nitrofuranos ni cloranfenicol.

Allara, et al. 2002. Analizaron 104 muestras de leche pasteurizada de 8 marcas comerciales diferentes en Maracaibo – Zulia para determinar residuos de Penicilina G, esta determinación del antibiótico se hizo por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizando para tal estudio la técnica de extracción con fosfato diácido de amonio y metanol. Del total de muestras analizadas se obtuvo una muestra positiva representando un 0.96% a la presencia de Penicilina G, a concentración de 0.95 ppm la cual superó el límite de antibióticos en leche establecido por la organización mundial de la salud que corresponde a 0.2ppm.

Camacho, et al. 2010. Analizaron 129 muestras de leche cruda comercializada en Tierra Caliente – México para determinar presencia de residuos de antibióticos, usando en la metodología el kit comercial Delvostet SP para detectar residuos de antibióticos. Del total de muestras analizadas, el 66.67% procedían de productores quienes la comercializan directamente al público mientras que el restante 33.33% fue comercializada por revendedores o boteros. Como resultados se encontraron 24 muestras positivas representando el 18.60% y 105 (81.40%) fueron negativas, Además la leche comercializada por los productores, mostro mayor presencia de residuos de antibióticos (11.63%), que la comercializada por los revendedores.(6,97)

Benzunce (1988). Determinó la presencia de residuos de antibióticos en leche fresca comercializada en las campiñas de Cajamarca. Perú. Analizando 100 rutas distribuidas en calles, caminos, establos, centros proveedores, comerciantes, etc. Utilizó para tal motivo el método de cultivo de la cepa de *Bacillus stearothermophilus* y el kit Delvotest. las rutas 20 – 25 consistieron en establos y centros proveedores de leche encontrando un 14% de positividad en la ruta 23 y las rutas 50 – 75 consistieron en calles, encontrando el mayor porcentaje en la ruta 73 con un 25.75% , haciendo un 11.7% de positividad del total de las 100 muestras.

Barrera y Ortez, 2012. Determinaron presencia de residuos de antibióticos β - lactámicos y tetraciclinas en leche cruda proveniente de cinco ganaderías del municipio de San Luis Talpa y leche pasteurizada de dos empresas procesadoras, basándose en el Manual de Análisis Bacteriológico BAM, el cual consistió en la siembra de las muestras de leche en medios de cultivo especiales observándose halos de inhibición en el crecimiento de bacterias específicas, las cuales indican la cantidad de antibiótico presente. De las 25 muestras de leche cruda para el análisis de tetraciclinas, solamente tres estaban por debajo del valor establecido (100 $\mu\text{g/L}$); mientras que las leches procesadas mostraban valores muy superiores que iban desde 449 $\mu\text{g/L}$ hasta 8649 $\mu\text{g/L}$. Por otra parte, en el análisis de β - lactámicos las 25 muestras de leche cruda superaron el valor establecido (4 $\mu\text{g/L}$) y las muestras de leche pasteurizada registraron valores mucho mayores que iban desde 546 $\mu\text{g/L}$ hasta 1740 $\mu\text{g/L}$.

Cabrera, 2009, Realizó un estudio para determinar residuos de Triclabendazol en leche y quesos provenientes de ganado vacuno en la ciudad de Cajamarca, Los niveles más altos de residuos de antibióticos de TCBZ – SO, y TCBZ – SO₂ se encontraron a uno y tres días 160mg/Kg y 640mg/Kg después del tratamiento, respectivamente. Se investigó los niveles más altos en el hígado y el riñón, encontrándose los niveles más bajos en el músculo y la grasa, siendo el TCBZSO₂ el principal residuo presente con determinación de bajos niveles de TCBSO y se demostró que el 1.5% de las dosis administradas de estos fármacos se excreta en la leche.

Matter et al., 2009. Analizaron 50 muestras de una empresa acopiadora de leche en la ciudad de Montería – Colombia y de leche pasteurizada de 6 marcas comerciales. A todas las muestras de leche se les determinó la presencia del antiséptico Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) y posteriormente se detectó la presencia de antibióticos mediante la prueba rápida Bio-X-Total antibiotic Bio K 331 de BioX Diagnostic (Jemelle, Belgique). Los resultados arrojaron un 0% de positividad para residuos de antibióticos en la leche pasteurizada pero si se observa presencia de antibióticos en leches crudas en alto porcentajes (31.7), además un 2.0% de muestras provenientes de la empresa acopiadora estaban adulteradas con el antiséptico Peróxido d Hidrógeno (H_2O_2) y no se encontraron muestras positivas para este antiséptico en las leches pasteurizadas.

López, et al. 1977. Analizaron la presencia de residuos de Penicilina, Estreptomina, Tetraciclina, Bacitracina, Neomicina y/o Kanamicina en 1346 muestras de leche natural, procedentes de la región sur de España: Córdoba, Jaén, Granada, Málaga, Cádiz, Huelva y Sevilla, realizándose dos pruebas microbiológicas: a) Detección de sustancias inhibidoras inespecíficas, b) la prueba de detección de las sustancias antibióticas indicadas con gérmenes sensibles. Los gérmenes sensibles utilizados fueron para la penicilina, la *Sarcina lutea*; para la estreptomina, el *Bacillus subtilis*; para las tetraciclinas, el *Bacillus cereus* var *mycoides*; para la bacitracina, la *Sarcina subflav*; para la neomicina, el *Staphylococcus epidermidis* y para la Kanamicina, el *Staphylococcus aureus*, encontrando un 15% para penicilina un 2% para kanamicina, con resultados negativos para el resto de antibióticos.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1. Material biológico

- Leche fresca comercializada en Chiclayo durante los meses de Mayo a Noviembre 2013.
- Cepa de *Bacillus stearothermophilus* (Aislada en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la UNPRG).

3.1.2. Población y Muestra

a. Población

La población estuvo representada por la leche fresca comercializada en Chiclayo.

b. Muestra

Se analizaron 250 muestras de leche fresca comercializada en Chiclayo durante los meses de Mayo a Noviembre 2013, recolectándose 120 a nivel de mercados, 50 en calles, 20 en establos y 50 en centros de acopio.

El número de muestras fue calculado según la fórmula mencionada por Alvites, 2000, tomando en cuenta una prevalencia del 21% (Llanos. 1990 - 11991)

$$n = \frac{z^2 (p \cdot q)}{t^2}$$

Dónde:

n = Tamaño de la muestra

z = 1,96 ($\alpha = 0,05$); valor estándar.

p = Tasa de prevalencias (0,21).

q = Tasa de ausencia 1-p: (0,79).

t = Error permitido (0,05)

$$n = \frac{(1.96)^2 (0.21)(0.79)}{(0.05)^2}$$

$$n = 250$$

3.2. METODOLOGIA

3.2.1. Obtención y transporte de las muestras (Llanos 1990 – 1991)

Las muestras fueron recolectadas en frascos de vidrio boca ancha esterilizados, de 500ml y convenientemente etiquetados directamente del balde donde se comercializaba en calles y mercados o del porongo que contenía la leche en establos o centros de acopio y posteriormente fueron transportadas en coulers y trasladadas al laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas - Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Lambayeque para su procesamiento inmediato.

3.2.2. Procesamiento de las muestras

3.2.2.1. Determinación de Residuos de antibióticos

Se utilizó para esta prueba dos métodos: El método de cultivo de la cepa de *Bacillus stearothermophilus* y el Combo Test Kit MilkGuard para detectar residuos de β – lactámicos y tetraciclinas.

A. Determinación de Residuos de Antibióticos por el Método de cultivo de la Cepa de *Bacillus stearothermophilus* (Llanos 1990 – 1991).

a) Preparación del inóculo. (Figura 1.a)

Inocular a un frasco con 10 ml de caldo triptona, la cepa de *Bacillus stearothermophilus*.

Incubar a 55°C durante 18h.

b) Preparación del medio de cultivo (Agar de Recuento en Placa). (Figura 1.b)

Repartir 5 mL de agar de recuento en placa previamente esterilizado en frascos pequeños.

Dejar enfriar y conservar en refrigeración hasta ser utilizado.

c) Realización de la prueba. (Figura 1.c)

Llevar un frasco con los 5mL de agar de recuento en placa a baño María a 45°C.

Una vez disuelto, se vierten 3 mL en una placa Petri estéril.

Agregar 1 ml de caldo cultivado con la cepa de *Bacillus Stearothermophilus*.

Por último los 2 ml restantes del medio licuado (Agar de Recuento en placa).

Agitar la placa en forma rotatoria por unos minutos.

Dejar enfriar.

Invertir la placa con el medio ya solidificado y dividirla en 9 recuadros numerados del 1 al 9, utilizando el marcador.

d) Preparación de la Solución de antibiótico (Figura 1.d)

Matraz I.

Colocar 150 mL de agua estéril.

Agrega una pastilla de penicilina o tetraciclina de 15, 000 U.I. y agitar suavemente hasta disolver.

Matraz II.

Colocar 99 mL de agua destilada estéril.

Agrega 1 mL de la solución del matraz I.

Matraz III.

Colocar 49 mL de leche fresca libre de antibióticos.

Agrega 1 mL de la solución de matraz II.

e) Preparación de los discos (Figura 1.e)

Los discos utilizados en la placa, son discos de celulosa de 4 mm de diámetro.

Tomar con una pinza estéril 3 de ellos y embeberlos en la solución del matraz III, éstos vienen a ser discos controles identificados con los números 1,5 y 9.

Seis discos son embebidos en las muestras de leche problema, los que son colocados en los recuadros numerados con los números 2, 3, 4, 6, 7 y 8 respectivamente de la placa con cultivo. La placa de cultivo con los 9 discos es identificado y se encuba a 55°C por 150 min.

f) Lectura (Figura 1.f)

Después del período de incubación los discos controles números 1, 5 y 9 presentarán un halo transparente que significa inhibición del desarrollo del *Bacillus* como consecuencia de la presencia de penicilina o tetraciclina en el disco, y de igual manera en los recuadros cuyas muestras son positivas a la presencia de antibiótico. Cuando no se presenta el halo transparente, indica que la leche no contiene antibióticos, y como consiguiente el resultado es negativo.

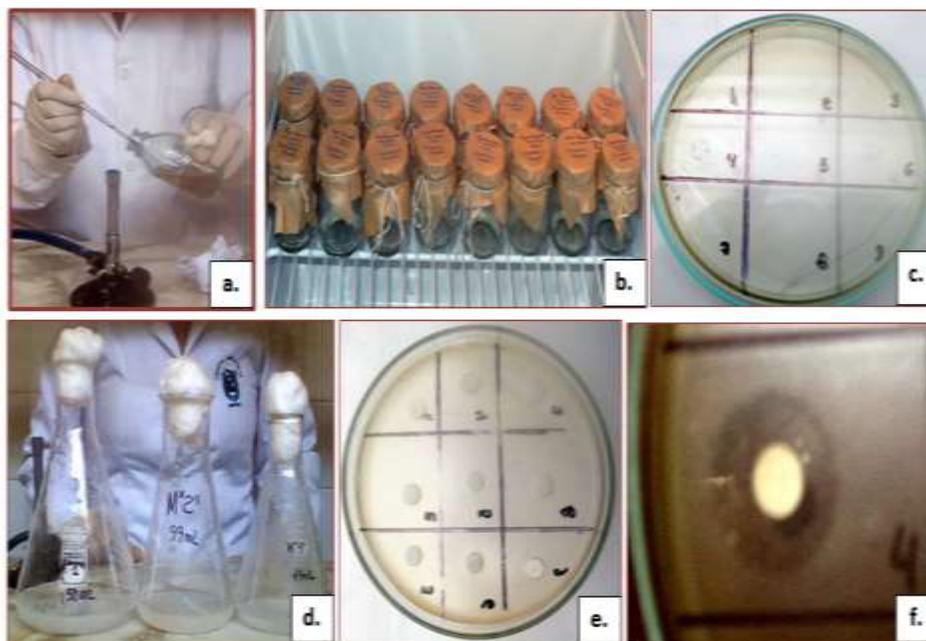


Figura 1: Determinación de Residuos de antibióticos por el método de cultivo de la cepa de *Bacillus stearothermophilus*: a) Preparación del inóculo de *Bacillus stearothermophilus* en 10 mL de caldo Triptona. b) Agar Recuento en Placa (5 mL). c) División de la placa ya inoculada en 9 recuadros iguales. d) Solución de Penicilina (Matraz 1, 2 y 3). e) Placa con los 9 discos ya colocados. f) halo de inhibición.

B. Determinación de Residuos de antibióticos con el Combo Test Kit MilkGuard para determinar Residuos de β -lactámicos y tetraciclinas. (Anexo 7)

- a) Llevar el kit de prueba y las muestras a temperatura ambiente (Las muestras de leche deben estar completamente líquidas sin cúmulos ni coágulos)
- b) Sacar los pocillos y tiras necesarias del kit, usándolas en un periodo no mayor a 1h y tomar aproximadamente 200ul (hasta donde indica la línea de la pipeta del kit) de las muestras de leche y vaciar en los pocillos.
- c) Absorber y soltar 5 veces para mezclar y disolver por completo la pastilla hasta observarse un color rosa.
- d) Incubar durante 5 min a temperatura ambiente (25°) y luego insertar las tiras reactivas en los pocillos con el extremo “MAX” totalmente sumergido en la mezcla.
- e) Incubar durante 5 min a temperatura ambiente y observar el resultado.

Lectura (Anexo 8)

- ✓ En las tiras reactivas se observan tres líneas, una que es la línea control, la segunda que detecta residuos de antibióticos β - lactámicos, y la tercera para las Tetraciclinas, representadas con las letras C, B y T respectivamente. El resultado de la prueba dependerá del color de estas líneas.

RESULTADO NEGATIVO: la línea control, la línea B y la línea T, todas se colorean de rojo.

RESULTADO POSITIVO PARA β – LACTÁMICOS: La línea control y la línea T son de color rojo, la línea B no se colorea.

RESULTADO POSITIVO PARA TETRACICLINAS: La línea control y la línea B son de color rojo, la línea T no se colorea.

POSITIVO PARA AMBOS ANTIBIOTICOS: La línea control de color rojo, las líneas B y T no se colorean

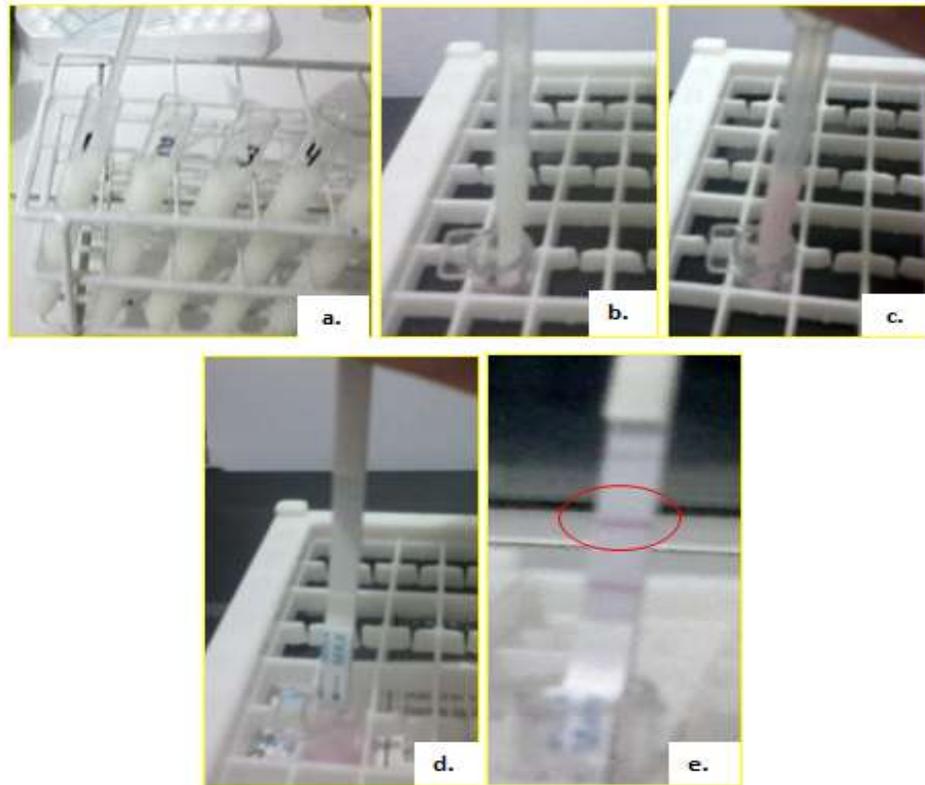


Figura 2: Determinación de Residuos de antibióticos por el Combo Test kit MilkGuard para detectar Residuos de β lactámicos y tetraciclinas: a) llenar la pipeta con la muestra de leche, b) vaciar al pocillo. c) pipetear hasta disolver la pastilla. d) introducir la cinta. e) observar las bandas

3.2.2.2 Descripción del Método para determinar la presencia de Peróxido de Hidrógeno en leche. (Kremenchuzky 2009)

Colocar 2 mL de cada muestra de leche problema en un tubo de ensayo.

Agregar II gotas de solución de ácido vanádico 1% en $H_2SO_4 4N$ a cada tubo.

Lectura

Si la leche contiene Peróxido de Hidrógeno, se observara un cambio de color a rojo ladrillo, si el color no varía el resultado es negativo.

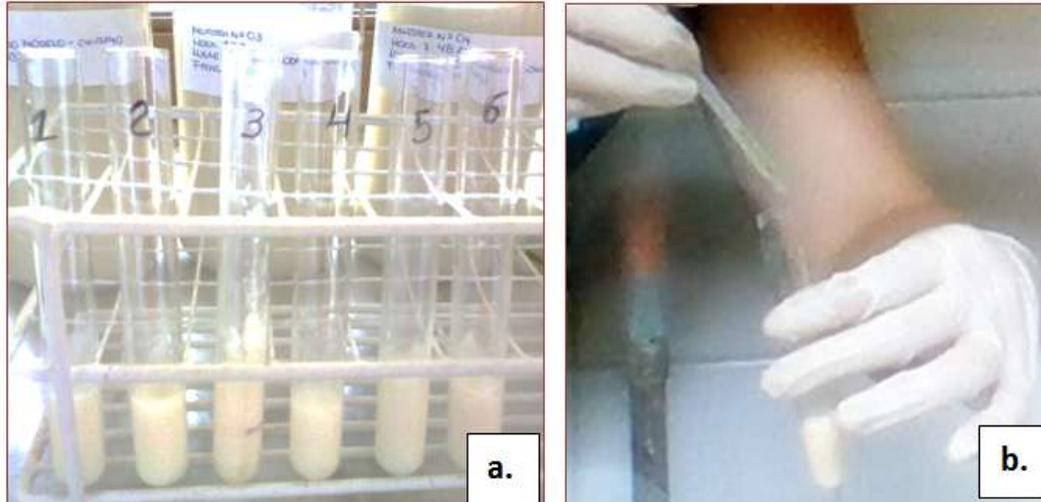


Figura 3: Prueba de determinación de Peróxido de Hidrógeno en leche fresca: a) 2 mL de leche problema. b) II gotas de Ácido vanádico 1% en H_2SO_4

IV. RESULTADOS.

4.1 Residuos de antibióticos y Peróxido de Hidrógeno en leche fresca comercializada en el distrito de Chiclayo. Mayo – Noviembre 2013

Se analizaron 250 muestras de leche fresca, encontrándose 43 muestras positivas para Residuos de Antibióticos y 02 para Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) representando 17.2% y 0.8% respectivamente, tal y como muestra la Tabla 1 y Figuras 4 y 5.

Tabla 1: Residuos de Antibióticos y Peróxido de Hidrógeno en leche fresca comercializada en Chiclayo. Mayo - Noviembre 2013

Resultado	Residuos de Antibióticos		Peróxido de hidrogeno	
	N°	%	N°	%
Positivos	43	17.2	02	0.8
Negativos	207	82.8	248	99.2
Total	250	100	250	100

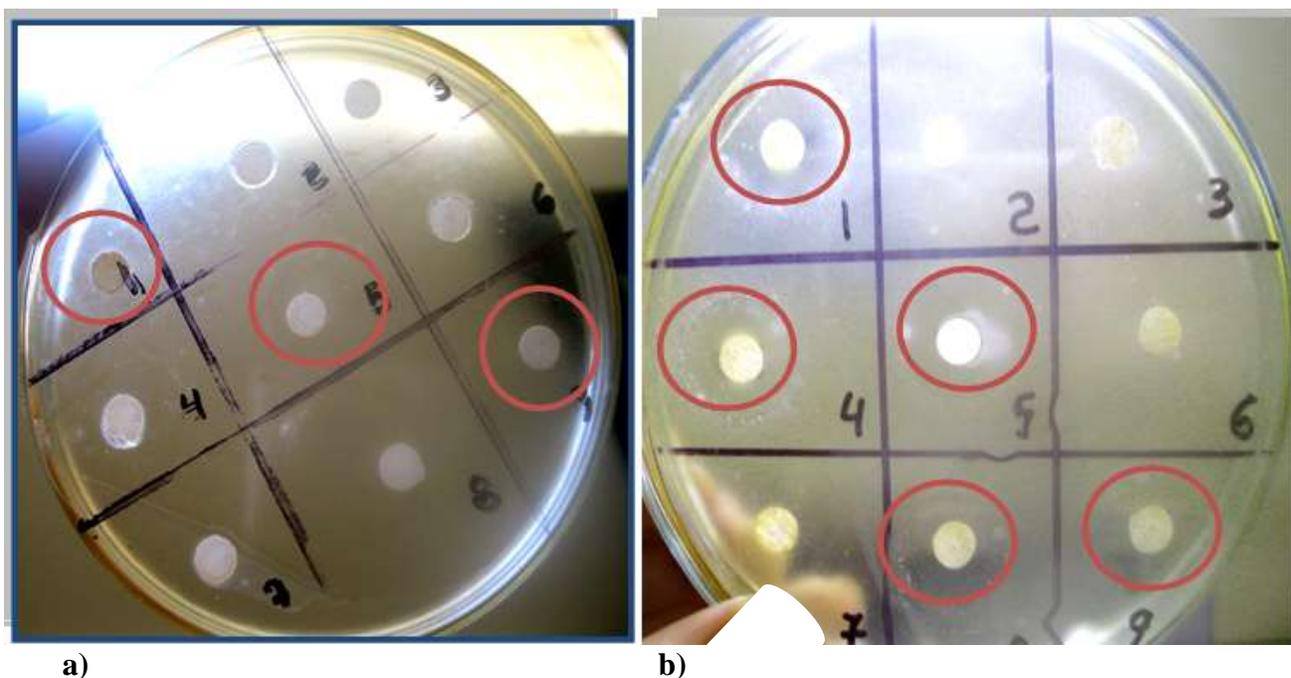


Figura 4: Residuos de Antibióticos en leche fresca comercializada en Chiclayo. Mayo – Noviembre 2013. a) Resultado negativo (Solo se observan halos de inhibición en los discos 1, 5 y 9 que son los discos controles. b) Resultado positivo (las muestras 4 y 8 presentan residuos de antibióticos).



Figura 5: Peróxido de Hidrógeno en leche fresca comercializada en Chiclayo. Mayo – Noviembre 2013.: A la derecha Resultado Positivo y a la izquierda Resultado Negativo.

4.2. Residuos de antibióticos en leche fresca que se comercializa en Chiclayo.

Las 250 muestras fueron seleccionadas de 04 lugares diferentes, encontrándose la mayor cantidad de muestras positivas a nivel de mercados, representando un 8.0% y la menor cantidad en establos representando un 0.4% tal como se muestra en la Tabla 2 y Figura 6.

Tabla 2: Residuos de antibióticos en leche fresca en relación al lugar de distribución para su comercialización. Chiclayo. Mayo - Noviembre 2013

LUGAR DE DISTRIBUCION	MUESTRAS					
	Positivas		Negativas		Total	
	N°	%	N°	%	N°	%
Mercados	20	8.0	110	44	130	52.0
Calles	12	4.8	38	15.2	50	20.0
Establos	01	0.4	19	7.6	20	8.0
Centros de acopio	10	4.0	40	16.0	50	20.0
Total	43	17.2	207	82.8	250	100
	X^2_c 26.5		>	X^2_t 9.28	Significativo	

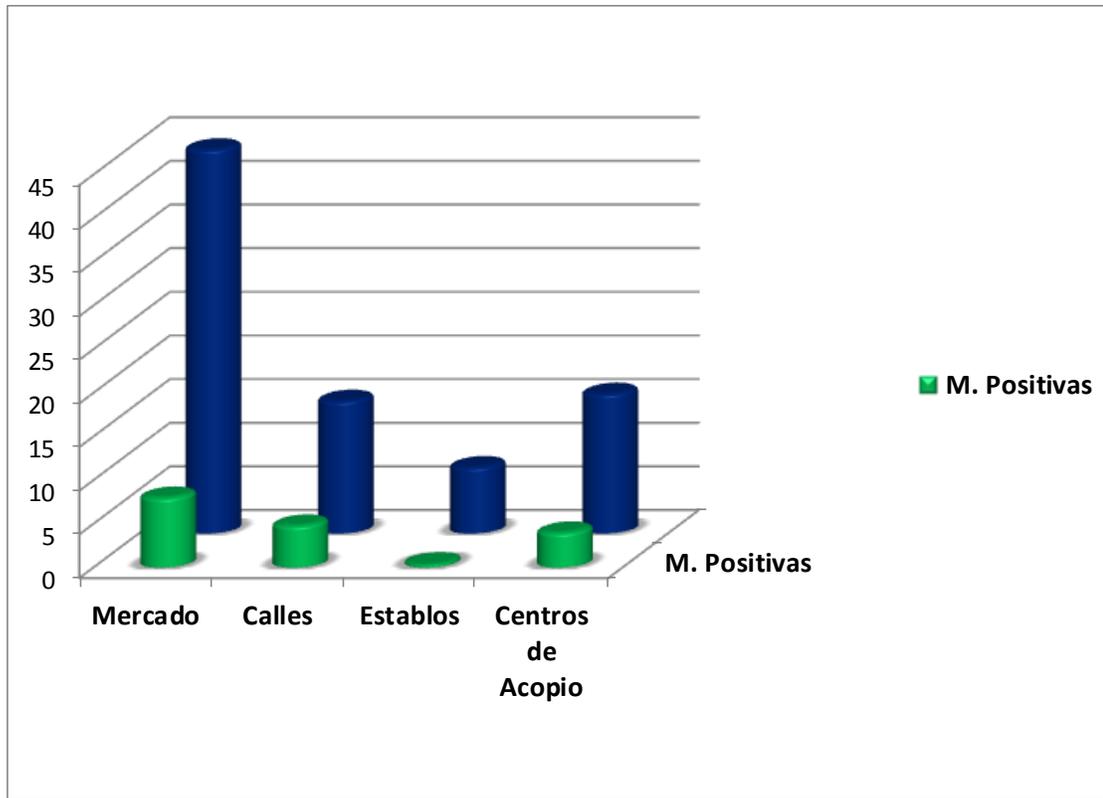


FIGURA 6: Residuos de antibióticos en leche fresca en relación al lugar de distribución para su comercialización. Mayo - Noviembre 2013

4.2.1. Residuos de antibióticos en leche fresca comercializada a nivel de mercados

Se eligieron 130 muestras seleccionadas de 05 mercados diferentes, encontrándose la mayor cantidad de muestras positivas para residuos de antibióticos en el Mercado Mochoqueque – J.L.O, representando un 6.20% a diferencia del mercado central, donde todas las muestras resultaron negativas, tal como se muestra en la Tabla 3y Figura 7.

Tabla 3: Residuos de antibióticos en leche fresca comercializada a nivel de mercados. Chiclayo. Mayo - Noviembre 2013

MERCADOS	MUESTRAS					
	Positivas		Negativas		Total	
	N°	%	N°	%	N°	%
“Modelo”	07	5.38	19	14.60	26	20.0
“Central”	00	0.00	26	20.00	26	20.0
“La Paradita”	01	0.76	25	19.24	26	20.0
“Mochoqueque”	09	6.92	17	13.07	26	20.0
“El Inca”	03	2.30	23	2.30	26	20.00
TOTAL	20	15.30	110	84.7	130	100.0

X^2_c 9.59 > X^2_t 6.16 Significativo

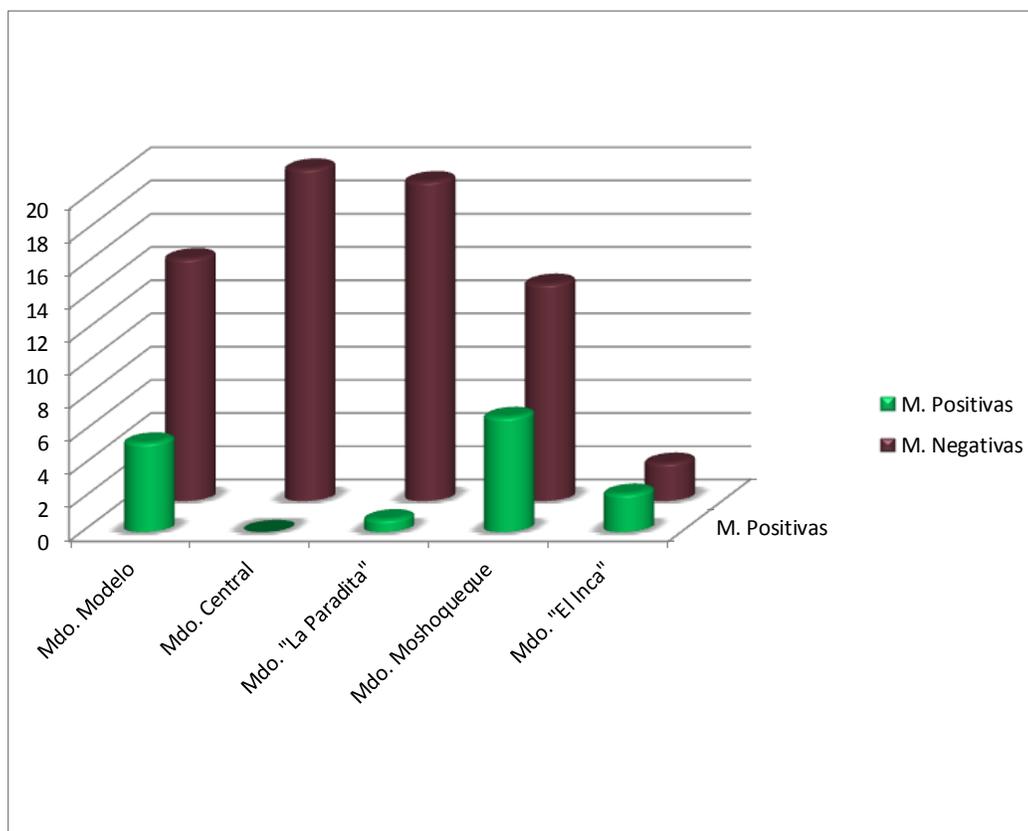


Figura 7: Residuos de Antibióticos en leche fresca comercializada a nivel de mercados. Chiclayo. Mayo - Noviembre. 2013

4.2.2. Residuos de antibióticos en leche fresca comercializada a nivel de las calles de Chiclayo.

Se eligieron 50 muestras en 05 calles diferentes, encontrándose la mayor cantidad de muestras positivas para residuos de antibióticos en la Calle Arica, representando un 10% . No se encontraron muestras positivas en las calles: José Balta y Luis Gonzales, tal como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4: Residuos de Antibióticos en leche fresca comercializada a nivel de las calles de Chiclayo. Mayo - Noviembre. 2013

CALLES	MUESTRAS					
	Positivas		Negativas		Total	
	N°	%	N°	%	N°	%
“José Balta”	00	0.00	10	20.00	10	20.0
“Luis Gonzales”	00	0.00	10	20.00	10	20.0
“Augusto B. Leguía”	04	8.00	06	12.00	10	20.0
“Pedro Ruiz”	03	6.00	07	14.00	10	20.0
“Arica”	05	10.00	05	10.00	10	20.00
Total	12	24.00	38	76.00	50	100.0

4.2.3. Residuos de antibióticos en leche fresca obtenida a nivel de establos

Se tomaron 20 muestras de diferentes establos encontrándose un 5% de positividad para la presencia de Residuos de Antibióticos como se muestra en la Tabla 5.

**Tabla 5: Residuos de Antibióticos en leche fresca obtenida de los establos de Chiclayo.
Mayo - Noviembre 2013**

MUESTRAS	N°	%
Positivas	01	5.0
Negativas	19	95.0
Total	20	100.0

4.2.4. Residuos de antibióticos en leche fresca proveniente de diferentes centros de acopio de Chiclayo.

Se tomaron 50 muestras de diferentes centros de acopio lechero, encontrándose un 20% de muestras positivas para Residuos de Antibióticos como se observa en la Tabla 6.

Tabla 6: Residuos de antibióticos en leche fresca obtenida en los centros de acopio de Chiclayo. Mayo – Noviembre 2013

MUESTRAS	N°	%
Positivas	10	20.0
Negativas	40	80.0
Total	50	100.0

4.3 Según el tipo de antibiótico

Se obtuvieron 43 muestras positivas para residuos de antibióticos, analizándose con el Combo Test Kit MilkGuard para determinar β -lactámicos y tetraciclinas, las cuales en un 100% tenían Residuos de β - lactámicos como se indica en la Tabla 7 y Figura 8.

Tabla 7. Tipo de Antibiótico presente en la leche fresca comercializada en Chiclayo entre Mayo a Noviembre 2013.

ANTIBIOTICO	NUMERO	PORCENTAJE
β – lactámicos	43	100.0
Tetraciclinas	0	0.00
Total	43	100.0

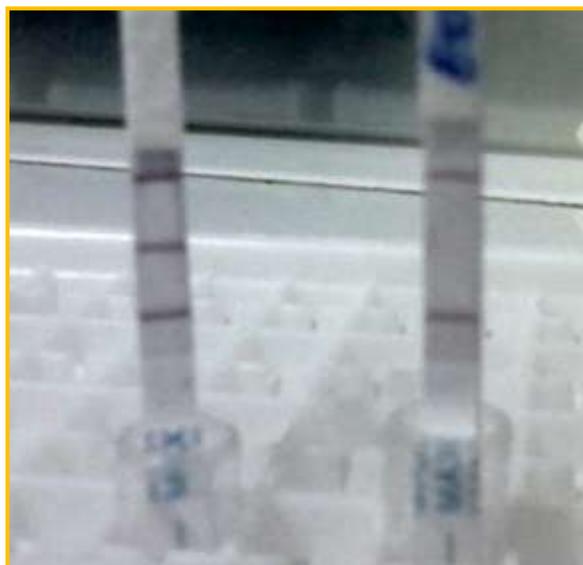


Figura 8: Tipo de antibiótico presente en la leche fresca comercializada en Chiclayo entre Mayo a Noviembre 2013.: A la derecha resultado positivo para Residuos de antibióticos β - lactámicos, A la izquierda resultado negativo para ambos antibióticos.

4.4. Peróxido de hidrógeno en leche fresca comercializada en Chiclayo

Se analizaron 250 muestras de leche fresca para determinar la presencia de Peróxido de Hidrogeno, encontrándose 02 muestras positivas a nivel de calles tal y como se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8: Peróxido de Hidrógeno en leche fresca en relación al lugar de distribución para su comercialización. Chiclayo. Mayo - Noviembre 2013

LUGARES DE DISTRIBUCION	MUESTRAS					
	Positivas		Negativas		Muestras	
	N°	%	N°	%	N°	%
Mercados	00	00.0	130	52.0	130	52.0
Calles	02	4.00	48	16.0	50	20.0
Establos	00	0.0	20	8.0	20	8.0
Centros de acopio	00	0.0	40	20.0	50	20.0
Total	02	4.00	207	96.0	250	100

4.4. 1. Peróxido de hidrógeno en leche fresca comercializada a nivel de calles de Chiclayo.

Se analizaron 50 muestras de leche fresca en 05 calles seleccionadas, para determinar presencia de Peróxido de Hidrógeno, encontrándose muestras positivas en la Calle Arica con un 4%, tal como se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9. Peróxido de Hidrógeno en leche fresca comercializada a nivel de calles de Chiclayo. Mayo – Noviembre 2013.

CALLES	MUESTRAS					
	Positivas		Negativas		Total	
	N°	%	N°	%	N°	%
“José Balta”	00	0.00	10	20.00	10	20.0
“Luis Gonzales”	00	0.00	10	20.00	10	20.0
“Augusto B. Leguía”	00	0.00	10	20.00	10	20.0
“Pedro Ruiz”	00	0.00	10	20.00	10	20.0
“Arica”	02	4.00	08	16.00	10	20.00
Total	02	4.00	48	96.00	50	100.0

V. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se analizaron 250 muestras de leche fresca para determinar presencia de Residuos de antibióticos y Peróxido de Hidrógeno. Como se puede observar en la Tabla 1, de las 250 muestras de leche analizadas, resultaron positivas un 17.2% y 82.8% fueron negativas. De un trabajo similar efectuado en los lugares de expendio de la ciudad de Cajamarca por Llanos (1990 - 1991), se encontró 20.83% de positividad a la presencia de residuos de antibióticos en la leche fresca, resultado algo superior al del presente trabajo, el cual muestra que la contaminación de la leche con residuos de antibióticos en Cajamarca es mayor, debido posiblemente a un escaso control higiénico-sanitario por parte de los ganaderos y veterinarios en esta zona y al año en el que se realizó este trabajo, ya que actualmente existe normas y programas de control tratando de disminuir la contaminación de la leche fresca por residuos de antibióticos, demostrando con la presente investigación que aún esta contaminación no es controlada por completo, y que se pone en riesgo la salud humana.

De igual modo, se encuentran marcadas diferencias con los reportes de Allara, *et al* (2012), Venezuela, donde un escaso 0.8% de muestras de leche son positivas a la presencia residuos de antibióticos. Estos resultados son inferiores a comparación de los obtenidos en el presente trabajo debido entre otros factores, al control estricto y a las condenas y/o castigos impuestos a la leche contaminada en dicho país. Así mismo los criterios de rechazo y/o condena de la leche con antibióticos en países como Venezuela es considerada no detectable la penicilina a menos de 0,004 mg/1mL, corroborando de esta forma las condiciones de calidad requeridas, debido a los bajos niveles de contaminación.

Analizando los resultados obtenidos teniendo en cuenta los lugares de distribución de la leche fresca (TABLA 2) el mayor porcentaje fue encontrado a nivel de mercados 8.0% y el menor a nivel de establos con un 0.4%. Esta diferencia se debe posiblemente a la población de este estudio, ya que se analizaron establos ubicados en Chiclayo, los cuales en su mayoría cumplen un control sanitario puesto que la leche fresca proveniente de éstos es distribuida a empresas industriales de importancia en nuestra ciudad, quienes exigen una cantidad nula de antibióticos en la leche fresca. Y con respecto a la leche que se comercializa en los mercados su gran mayoría es procedente de distritos cercanos en los

que el control higiénico – sanitario es menor y a que la mayoría de expendedores son pequeños ganaderos o revendedores, los mismos que no cuentan con asesoramiento técnico y administran los fármacos indiscriminadamente en forma empírica desconociendo las consecuencias que trae consigo la leche contaminada con residuos de antibióticos.

En el presente trabajo se estudiaron 05 mercados de Chiclayo, analizando un total de 130 muestras de leche fresca, de las cuales resultaron positivas un 15.30% para Residuos de antibióticos (TABLA 3). De estos 05 mercados el porcentaje mayor de positividad fue encontrado en el mercado Mochoqueque (6.92%) y un 0% en el mercado Central de Chiclayo, esta diferencia puede deberse principalmente al lugar de procedencia de la leche fresca ya que algunos vendedores son pequeños ganaderos que no tienen conocimiento del riesgo de contaminación de la leche con antibióticos u otros que aún conociendo estos riesgos distribuyen la leche al público para no producir pérdidas económicas.

Al compararse con los resultados obtenidos por Llanos (1990 - 1991), un 20.67% total de positividad a nivel de mercados; este porcentaje es superior en relación a los obtenidos en el trabajo presente debido posiblemente a dos factores: uno de ellos es el menor control del uso de antibióticos de las vacas lecheras existente en la ciudad de Cajamarca ya sea por el incumplimiento de los tiempos de retiro, el desconocimiento de su existencia y por la ignorancia de los efectos que puede ocasionar la leche contaminada con residuos de antibióticos, por ende se está poniendo en riesgo la salud pública. Otro factor puede deberse a la época en que se realizaron los estudios, puesto que en entre los años 1990 - 1991 el control para el uso de antibióticos era casi nulo.

De igual manera se estudiaron 05 calles ubicadas en Chiclayo, analizándose un total de 50 muestras, de las cuales en un 24% resultaron positivas, obteniéndose el mayor porcentaje en la calle Arica (10%) y un 0% en las calles José Balta y Luis Gonzales, (TABLA 4), Comparando con los resultados obtenidos por Benzunce (1988) quien determinó presencia de residuos de antibióticos en la ciudad de Cajamarca divididas en 75 rutas de las cuales de la 50 -75 eran calles, Encontrando la mayor cantidad en la ruta 73 con un 25.75%, valor muy elevado a comparación del trabajo presente en el cual la mayor cantidad fue encontrada en la calle Arica con un 10%, que siendo bajo no es completamente satisfactorio

para la población chiclayana, puesto que aun cuando la contaminación es menor a comparación de años atrás aún no se ha podido controlar por completo el uso indiscriminado de antibióticos.

En lo que respecta a Establos y Centros de acopio, (TABLA 5 y TABLA 6), se encontró un 05% y un 20% de positividad respectivamente; porcentajes bajos comparados con los encontrados a nivel de mercados y calles, debido posiblemente a que los establos y centros de acopio estudiados son los proveedores principales de leche a las empresas industriales de Chiclayo y cumplen normas para evitar la contaminación de la leche con residuos de antibióticos, ya que los tratamientos térmicos no eliminan estos residuos presentes en leche fresca y la pasteurización elimina solo un 8% de la actividad de la penicilina y no es capaz de eliminar residuos de tetraciclina.

Comparando con las rutas 20 – 25 de Benzunce (1988) que analizó establos y centros proveedores de leche, dio un resultado de 8.0% en la ruta 20, resultado mayor a comparación con el encontrado en la presente investigación a nivel de establos (05%), esta diferencia se debería principalmente a que su estudio y su población fue más amplia y abarcó tanto establos grandes como pequeños ganaderos que son proveedores de leche ya sea para la comercialización o industrialización. y analizando la ruta 23 con un 14% obtenido en dicho trabajo para centros proveedores la diferencia es mayor, esto debido a que en la mayoría de centros de acopio de la población del presente estudio se realiza la prueba DELVOTEST para determinar residuos de antibióticos, y toda muestra positiva se elimina siempre y cuando la leche estuviera destinada a empresas industriales; de lo contrario puede ésta misma distribuirse a los vendedores ambulantes en algunos casos.

De las 250 muestras estudiadas en el presente trabajo, dio positivo un 17.2% para residuos de antibióticos, de las cuales en un 100% se detectó β – lactámicos y un 0% de tetraciclinas. (TABLA 7). Este resultado es similar a los obtenidos por Guerrero (2009) y Reyna (2009), en lo que respecta a residuos de β – lactámicos y tetraciclinas quienes trabajaron en leche fresca comercializada en el Callao (Perú) encontrando 16 y 20 muestras positivas para residuos de antibióticos respectivamente, representando para ambos un 100% de β - lactámicos y un 0% de tetraciclina. Esto puede deberse al bajo uso de tetraciclina por los

ganaderos y veterinarios en el tratamiento de la mastitis bovina por la incidencia de esta enfermedad en las vacas lecheras, utilizando con mayor frecuencia los antibióticos β – lactámicos.

Otro trabajo realizado por Noa, *et al.* (2010) en México quienes encontraron un 13.8% de positividad para residuos de antibióticos, arrojando un 98% para β – lactámicos y un 2% de positividad para residuos de tetraciclina, comprobando que estos antibióticos son menos utilizados con respecto a los β - lactámicos.

Con respecto a la determinación de Peróxido de Hidrógeno (TABLA 01), en el estudio realizado por Matter, *et al.* (2009) en Montería- Colombia, que analizó leche fresca, encontró un 1.8% de positividad para este antiséptico, valor más alto que el encontrado en el presente trabajo (0.8%), valores que a pesar de ser bajos indican que en Chiclayo se vende leche adulterada que puede ocasionar peligro en la salud de los consumidores.

Según la distribución de muestras en la presente investigación, el 100% de las muestras positivas para Peróxido de Hidrógeno se encontraron a nivel de calles, es posible que la leche que comercializan estos vendedores ambulantes este adulterada para que se conserve por más tiempo la leche fresca y no tener pérdidas económicas.

VI. CONCLUSIONES

1. La leche fresca comercializada en Chiclayo presenta 17.2% (mercados, 8%; calles, 4.8%; establos, 0.4% y centros de acopio, 4%) de residuos de antibióticos B – lactámicos.
2. Un bajo porcentaje (0.8%) de leche fresca que consume la población Chiclayana es adulterada con conservantes como el Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂).
3. Aun cuando los porcentajes de residuos de antibióticos y Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂) son bajos, las autoridades no logran hacer cumplir lo estipulado por el D.S.007-98., donde dice que la leche cruda que se comercializa al público debe estar libre de antibióticos, plaguicidas u otros.

VII. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda realizar estudios detallados para determinar Residuos de antibióticos en forma cuantitativa, indicando las concentraciones de los residuos presentes en la leche fresca.
2. Realizar estudios complementarios acerca de otros tipos de residuos (plaguicidas, herbicidas, y metales, entre otros) en la leche de vaca.
3. Tomar medidas a corto plazo para lograr la reducción del porcentaje de positividad de residuos de antibioticos en leche, como son, marcaje apropiado de las vacas tratadas, descarte de la leche contaminada y la implementación de pruebas de campo para evaluar la presencia o no de antibioticos en la leche.
4. Realizar seguimientos periódicos en centros de acopio, mercados, calles y establos con el fin de disminuir al máximo la presencia de estos inhibidores en este producto de primer orden y así tomar las medidas estrictas necesarias para un control efectivo.

VIII. RESUMEN

En el presente trabajo de investigación, se analizaron 250 muestras de leche fresca comercializada en diferentes lugares de expendio de Chiclayo (mercados, calles, establos y centros de acopio), con el propósito de determinar la presencia de Residuos de antibióticos y/o Peróxido de Hidrógeno durante los meses de Mayo – Noviembre 2013, para lo cual se utilizaron: El método de Cultivo de *Bacillus stearothermophilus* (Llanos 1990 - 1991) y el Combo Test Kit MilkGuard para detectar residuos de antibióticos β -lactámicos y tetraciclinas , y el método para determinar la presencia de Peróxido de Hidrógeno (Kremenchuzky 2009) ; encontrándose 43 muestras positivas para Residuos de antibióticos y 2 muestras positivas para Peróxido de Hidrógeno con un 17.2% y un 0.8% respectivamente. Estos resultados muestran que la leche fresca que consume la población chiclayana está contaminada con residuos de antibióticos (en un 100% β – lactámicos), y aunque en un bajo porcentaje en algunos lugares se comercializa leche adulterada con Peróxido de Hidrógeno lo que significa un serio riesgo para la salud de los consumidores en especial lactantes y niños.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allara, M., Izquierdo, P., Torres, G. & Rodríguez, B. (2002). Penicilina G en leche pasteurizada producida en el estado de Zulia – Venezuela. *Revista científica FCV – LUZ*, 6.
- Barrera, A. & Ortez, E. (2012). *Determinación de residuos de antibióticos β -lactámicos y Tetraciclinas en leche cruda de cinco ganaderías ubicadas en el Municipio de San Luis Talpa y en leche pasteurizada*. El Salvador. (Tesis para obtener título de licenciado en Medicina Veterinaria y Zootécnica). Universidad De El Salvador.
- Boggio, J (2010). *Presencia de antimicrobianos en leche*. Sitio Argentino de Producción Animal: OVER Organización Veterinaria Regional S.R.L.
- Cabrera, M (2009). Determinación de Residuos de Triclabendazol en Leche y Quesos provenientes de Ganado Vacuno en Cajamarca. *Sistema de Revisiones en Investigación: Seminario Avanzado de Investigación*.
- Camacho, L., Cipriano, M., Cruz, B., Gutiérrez, I., Hernández, P., Peñaloza, I. & Nambo, O. (2010). Residuos de antibióticos en leche cruda comercializada en la región Tierra Caliente de Guerrero México. *Revista electrónica de Veterinaria*, 2, 1-11.
- CODEX ALIMENTARIOS. (2011). Límites Máximos de Residuos para Medicamentos Veterinarios en los Alimentos - *FAO-OMS*. 4-9.
- COTRINO V. (2008). Los antibióticos: recurso no renovable. Carta Fedegan. 2003; No. 81 [Internet]. Disponible en: www.fedegan.org.co/81sanidad.html-46k; Consultado en 23/09/2008.

- Engebretson, D. (2010). *Diez razones comunes por las cuales ocurre la contaminación con antibióticos en los tanques de leche a granel.*
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2012). *Anteproyecto de Límites máximos para residuos de Medicamentos Veterinarios.*
- Guerrero, D., Motta, R., Gamarra, G., Benavides, E., Roque, M. & Salazar, M. (2009). Detección de Residuos de Antibióticos β -lactámicos y Tetraciclinas en leche cruda comercializadora en el Callao. *Revista Ciencia e Investigación*, 2, 79 – 82.
- Harrigan, W. & Mc Cance, M. (1966). *Métodos de Laboratorio en Microbiología de Alimentos y Productos lácteos.* España: Academia.
- Infortambo (2000). Recuperado de:
www.infortambo.com.ar/admin/upload/arch/aguaogenada.pdf
- Kremenchuzky, L. (2009). Bioquímica de alimentos. *Guía de Trabajos prácticos.* Escuela Técnica ORT.
- Llanos, A. (1990 - 1991). *Determinación de residuos de antibióticos en la leche fresca que consume la población de Cajamarca, Cajamarca, Perú.* (Tesis para obtener título de licenciado en Medicina Veterinaria) Universidad Nacional de la Amazonía Peruana.
- López, R., Pozo, R., Herrera, A., Polo, L., Iglesias, J. & Jodral, M. (1977). Investigación sobre la presencia de antibióticos en la leche en la región sur de España. *Archivos de Zootécnica*, 26, 125 – 145.
- Magariños, H. (2000). *Producción higiénica de la leche cruda.* Chile: Producción y Servicios Incorporados S.A. 90p.

- Mattar, S., Calderón, A., Sotelo, D., Sierra, M. & Tordecilla, G. (2009). Detección de Antibióticos en Leches: Un Problema de Salud Pública. *Revista de Salud Pública*, 4, 579 – 590.
- Mora, N y García, A. 2007. Susceptibilidad de bacterias ácido lácticas (BAL) frente a diversos antibióticos. México. (Tesis para obtener título de licenciado). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Noa, E., Noa, M., Gonzales, D., Landeros, P. & Reyes, W. (2010). Evaluación de la presencia de residuos de antibióticos y quimioterapéuticos en leche en Jalisco, México. *Revista de salud animal*, 1.
- NORMA CUBANA (1983). *Método de ensayo*: Determinación de peróxido de hidrógeno. CDU 637.16: 006.354 (729.1).
- OMS (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD) (1960) *Comité mixto FAO/OMS de expertos en higiene de la leche*. Ginebra.
- Prado, G, Carabias, R., Rodríguez, E. & Herrero, E. (2002). Presencia de residuos y contaminantes en leche humana. *Revista Española de Salud Pública*, 2, 133 – 147.
- Reyes, B. (2006). *Acciones para evitar los efectos indeseables de la aplicación de Antibióticos al ganado productor de leche*. Consultado en: www.cofocalec.org.mx/docs/Antibioticos%20en20%leche.doc
- Reyna, GE. 2009. Detección de residuos de antibióticos β -lactámicos y tetraciclinas en leche comercializada en el mercado del Callao. *Revista Ciencia y Tecnología*, 1, 25, - 31.
- Veisseyre Roger. (1980). *Lactancia Técnica*. Editorial Acribia. Segunda Edición- España. 640p

X. ANEXOS

Anexo 1:

Concentraciones de antibióticos en leche.

Límites máximos permitidos para antibióticos en la leche.

Límites máximo de residuos para Clortetraciclina/ Oxitetraciclina/Tetraciclina				
Especie	Tejido	LMR	Año de adopción	Nota
Vacuno/Vaca	Leche	4µg/L	1999	
Límites máximo de residuos para Clortetraciclina/ Oxitetraciclina/Tetraciclina				
Especie	Tejido	LMR	Año de adopción	Nota
Vacuno/Vaca	Leche	100 µg/L	2013	

Fuente: CODEX ALIMENTARIOS. 2011.

Ingesta Diaria Admisible de residuos de antibióticos en leche.

Compuesto	IDA (Ingesta diaria admisible)	Definición del Residuo
Bencilpenicilina/ Bencilpenicilina procainica	30 µg de penicilina por persona por día.	Bencilpenicilina
Clortetraciclina/Oxitetraciclina/ Tetraciclina	0 – 30 µg/Kg de peso corporal. Una IDA de grupo para clortetraciclina, oxitetraciclina y tetraciclina.	Compuesto originario, solo o combinado

Fuente: CODEX ALIMENTARIOS. 2011.

Anexo 2

Preparación de la solución de ácido vanádico al 1% en H₂SO₄ 4N.

Acido vanádico	1g
----------------	----

H ₂ SO ₄ 4N	100mL
-----------------------------------	-------



1. Pesar 1g de Acido vanádico



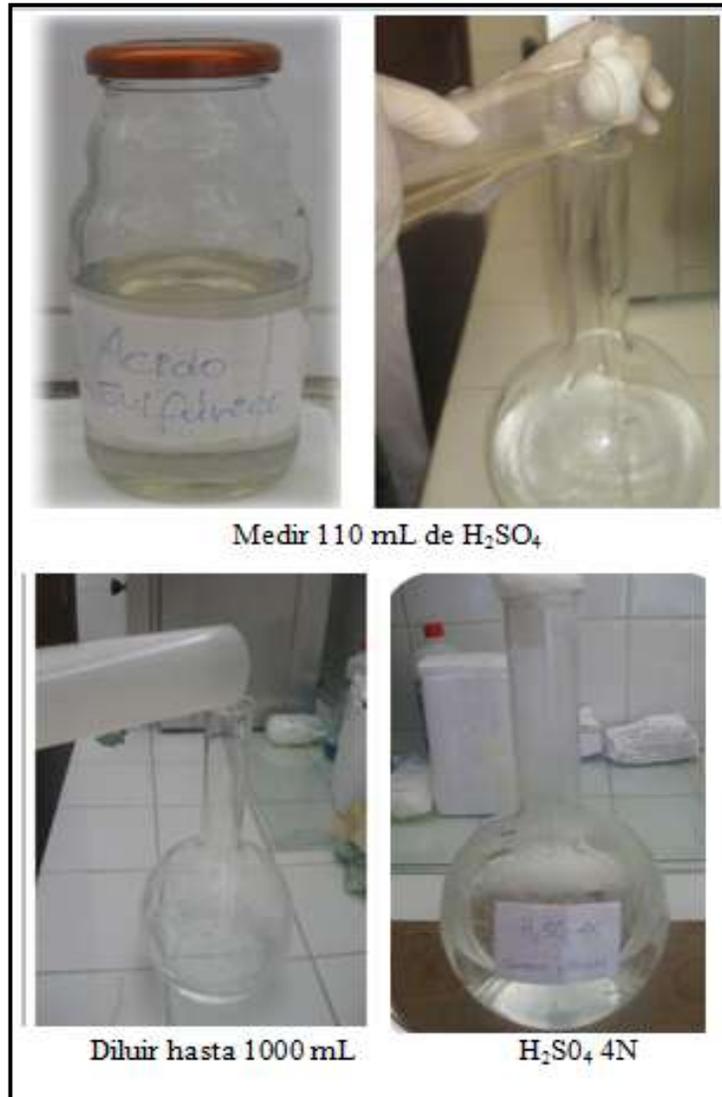
2. Verter en 100 mL de H₂SO₄ y mezclar



3. Acido Vanádico al 1% en H₂SO₄4N

Anexo 3

Preparación del H_2SO_4 4N



Anexo 4:

**Resultados para residuos de antibióticos y Peróxido de Hidrógeno en leche fresca.
Chiclayo. Mayo – noviembre 2013.**



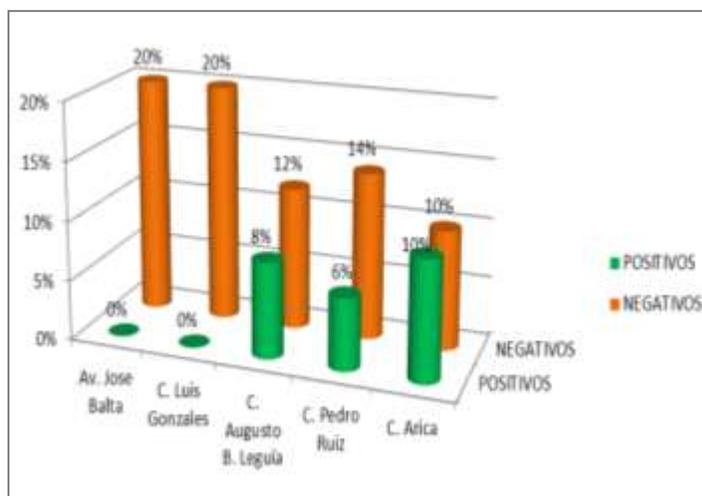
Residuos de antibióticos en leche fresca comercializada en Chiclayo entre los meses de Mayo – Noviembre 2013



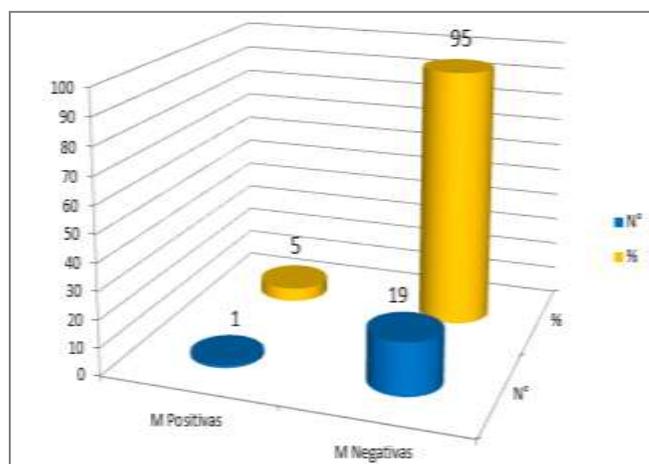
Peróxido de Hidrógeno en leche fresca comercializada en Chiclayo entre los meses de Mayo – Noviembre 2013

Anexo 5:

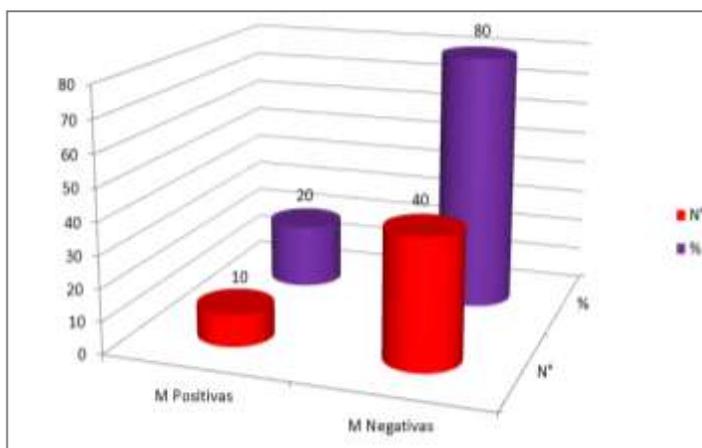
Residuos de antibióticos en leche fresca comercializada en Chiclayo entre los meses de Mayo a Noviembre del 2013.



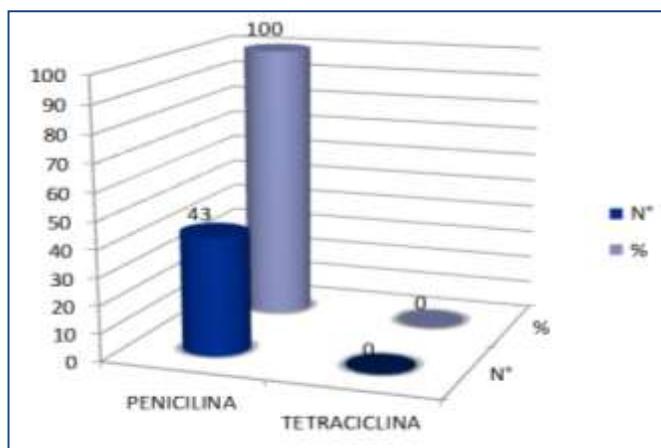
Residuos de antibióticos en leche fresca a nivel de calles. Chiclayo. Mayo – Noviembre 2013



Residuos de antibióticos en leche fresca a nivel de establos. Chiclayo. Mayo – Noviembre 2013



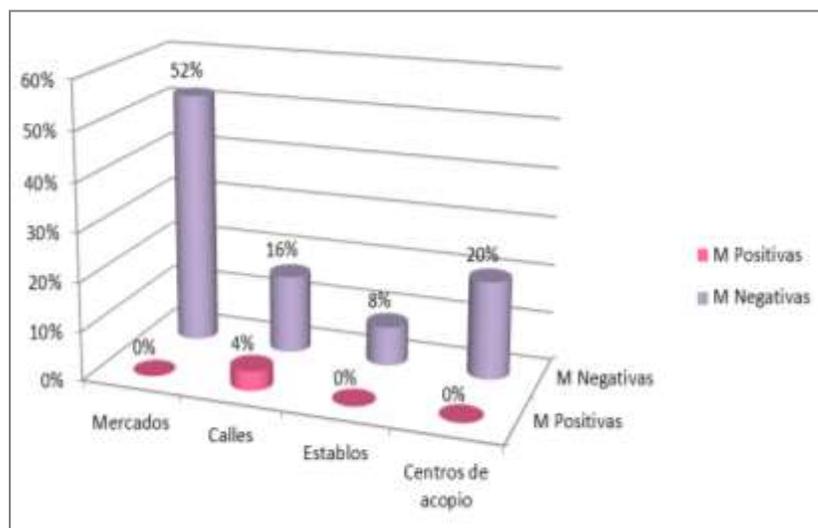
Residuos de antibióticos en leche fresca a nivel de centros de acopio. Chiclayo. Mayo – Noviembre 2013



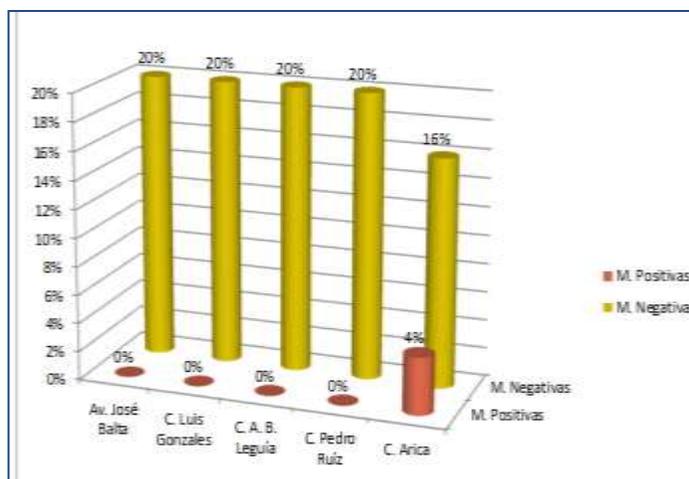
Tipo de antibiótico presente en leche fresca comercializada en Chiclayo. Mayo – Noviembre 2013

Anexo 6

Peróxido de Hidrógeno en leche fresca comercializada en Chiclayo. Mayo – noviembre 2013



Peróxido de Hidrógeno en leche fresca en relación a los lugares de distribución. Chiclayo. Mayo – Noviembre 2013

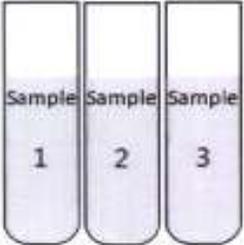


Peróxido de Hidrógeno en leche fresca a nivel de calles. Chiclayo. Mayo – Noviembre 2013

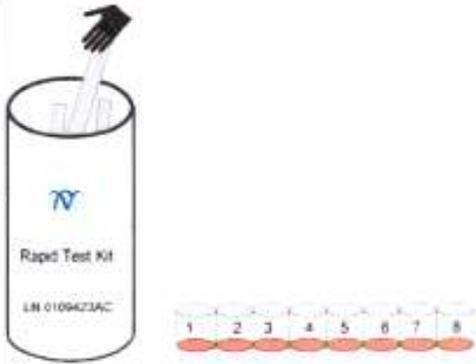
Anexo 7:

Procedimiento del Combo Test Kit MilkGuard para detectar Residuos de antibióticos B lactámicos y tetraciclinas.

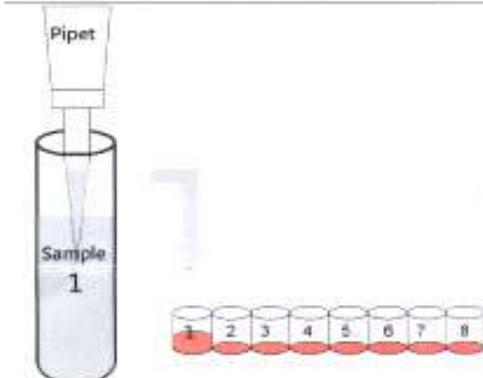
Assay Steps



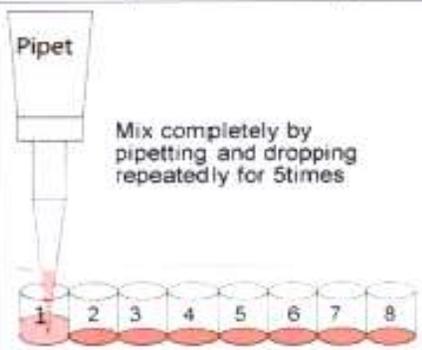
1. Prepare the test samples. Make proper marks, bring them to room temperature.



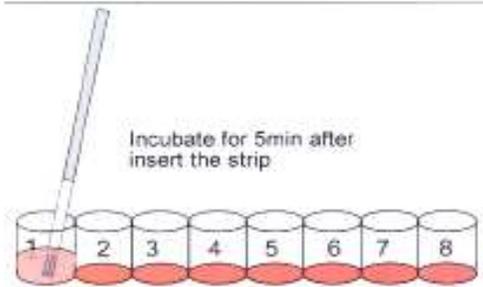
2. Take out required test wells, make proper marks.



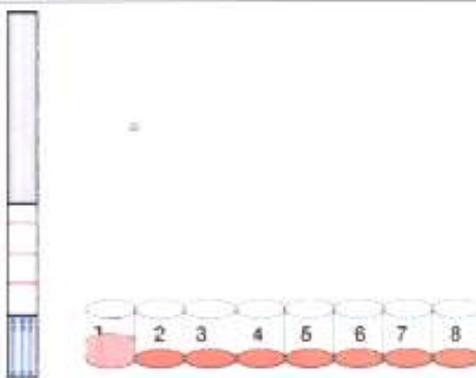
3. Take 200ul test sample into the wells.



4. Mix the sample and reagent in the well completely by pipetting and dropping repeatedly for 5 times. Start the timer when the mixture is pink. Incubate for 5min at room temperature.



5. Insert the test strips into the wells with the "MAX" end fully dipped in to the mixture. Incubate for 5min at room temperature again.



6. Take out the strip; judge the result according to Part 6.

Anexo 8:

Lectura del Combo Test kit MilkGuard para detectar antibióticos β - lactámicos y tetraciclinas.

