

## RESIDUOS DE PENICILINA EN CARNE Y VISCERAS DE POLLO

*Por Antonio Calles Enriquez*

### INDICE

CAPITULO I. INTRODUCCION.-CAPITULO II. ELECCION DE METODOS PARA EL ENSAYO CUANTITATIVO DE RESIDUOS DE PENICILINA EN TEJIDOS ANIMALES.-CAPITULO III. MATERIAL Y METODOS GENERALES.-CAPITULO IV. RESIDUOS DE PENICILINA G BENZATINA EN TEJIDOS DE POLLOS ALIMENTADOS CON PIENSOS ADICIONADOS DE ESTE ANTIBIOTICO.-CAPITULO V. RESIDUOS DE PENICILINA G PROCAINA EN TEJIDOS DE POLLOS INOCULADOS CON DOSIS TERAPEUTICAS DE ESTE ANTIBIOTICO.-CAPITULO VI. ESTABILIDAD DE LOS RESIDUOS DE PENICILINA G PROCAINA EN MUSCULO DE POLLO.-CAPITULO VII. INFLUENCIA DEL pH Y DEL ACIDO LACTICO DEL MUSCULO EN LA PRODUCCION DE HALOS DE INHIBICION NO ESPECIFICA DEL CRECIMIENTO DE SARCINA LUTEA.-CONCLUSIONES.-BIBLIOGRAFIA.

### CAPITULO V

#### INTRODUCCION

##### RESIDUOS DE PENICILINA G PROCAINA EN TEJIDOS DE POLLOS INOCULADOS CON DOSIS TERAPEUTICAS DE ESTE ANTIBIOTICO

La penicilina se utiliza frecuentemente en el tratamiento por vía parenteral de diversas enfermedades de los animales domésticos. De sus diversas formas, la penicilina G procaina es muy empleada por vía intramuscular, en razón de

---

(Los capítulos I, II, III y IV de esta Tesis fueron publicados en *Anales de la Facultad de Veterinaria de León*, XXI (1975), 449-505).

su lenta absorción a partir del lugar de inoculación y de su más lenta eliminación renal, lo que determina niveles efectivos del antibiótico durante tiempos mayores. Las dosis para mamíferos oscilan entre las 6.000 y las 20.000 UI/Kg de peso vivo. En aves, estas dosis son normalmente mayores.

La utilización de la penicilina, como la de otros antibióticos, en el tratamiento de enfermedades de los animales domésticos presenta para el higienista de los alimentos el problema de la presencia de residuos en los alimentos de origen animal. Los riesgos para el consumidor derivados de la presencia en los alimentos de estos residuos ya han sido señalados en el capítulo I (referidos a los antibióticos en general) y en el capítulo IV (en relación con la penicilina en particular). En lo que respecta a la carne y despojos comestibles procedentes de animales tratados con dosis terapéuticas de penicilina, es necesario señalar, además, que los riesgos se ven potenciados por el hecho de que los residuos presentes en estos alimentos son muy superiores a los encontrados como consecuencia de la administración de este antibiótico con el pienso.

Estos hechos han llamado la atención de los higienistas de los alimentos. En los últimos años, se han publicado una serie de trabajos tendentes a determinar la cuantía de los residuos presentes en los tejidos de animales a los que se les administró por vía parenteral diversas dosis de antibióticos. Algunos de estos trabajos referidos a la penicilina se citan más adelante en este mismo capítulo. Existe, además, una extensa bibliografía sobre la presencia de sustancias antimicrobianas en carne y vísceras de animales declaradas aptas para el consumo y de animales sacrificados de urgencia. Parte de esta bibliografía se cita en el capítulo I (Introducción). Consecuencia práctica de todos estos trabajos ha sido el que en la legislación sobre inspección de carnes de muchos países se hayan incluido normas relativas a la prohibición del sacrificio de animales tratados con antibióticos y al período de tiempo que debe transcurrir entre el tratamiento y el sacrificio para que éste pueda verificarse. En algún país (Alemania, por ejemplo) es ya obligatorio practicar en los mataderos y en la carne importada pruebas sistemáticas de detección de residuos de antibióticos (ANÓNIMO, 1974). En otros países (Dinamarca), es obligatoria la prueba de detección de antibióticos en todos los casos de sacrificios de urgencia y de enfermos sometidos a análisis bacteriológico, o cuando se sospeche o se tenga evidencia de que el animal fue tratado con antibióticos dentro de los seis días anteriores al sacrificio (JEPSEN y PEDERSEN, 1965).

En el presente capítulo de esta tesis se pretende aportar algunos datos al conocimiento de la cuantía y la persistencia de los residuos de penicilina G procaina en músculo, hígado y riñón de pollos inoculados por vía intramuscular con dosis de 5.000, 10.000, 20.000 y 100.000 UI/Kg de peso vivo.

## MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron pollos broiler de una edad comprendida entre uno y dos meses (peso medio 1,6-1,7 Kg). Estos pollos habían sido alimentados desde los 15-20 días con un pienso exento de antibióticos (véase Tabla VII). A cuatro lotes distintos de estos animales se les inoculó individualmente por vía intramuscular (región del muslo) dosis de 5.000, 10.000, 20.000 y 100.000 UI de penicilina G procaina en un vehículo acuoso por Kg de peso vivo. De cada uno de estos cuatro lotes se tomaron tres pollos a los tiempos 2, 12, 24 y 48 horas después de la inoculación. Sacrificados los animales por corte profundo en la región cervical, se tomaban muestras de la pechuga, del hígado y del riñón de cada uno. Inmediatamente después de su obtención, las muestras se sometían a ensayo.

A cada uno de los tiempos señalados antes, se sacrificaba también un pollo testigo, correspondiente a un lote de animales alimentados con el mismo pienso, pero no inoculados con antibiótico, y sus tejidos se muestreaban y ensayaban del mismo modo.

Teniendo en cuenta que los residuos de penicilina presentes en los tejidos iban a ser elevados, para la determinación cuantitativa de estos residuos se consideró adecuado, por ser suficientemente sensible (0,0625 UI/gr de tejido), el método biológico de difusión en placas de agar inoculadas con *Sarcina lutea* ATCC 9341, según la técnica de KRAMER *et al.* (1968), con las modificaciones señaladas en el capítulo III (Material y Métodos Generales). La curva patrón utilizada para las valoraciones del antibiótico fue la representada en la Fig. 6. Tanto para la curva patrón, como para todas las determinaciones analíticas, la preparación de la suspensión bacteriana se llevó a cabo siguiendo la técnica de GROVE y RANDALL (1955), con las modificaciones señaladas en el capítulo III (Material y Métodos Generales).

Cada una de las tres muestras procedentes de cada animal se ensayaba en una placa distinta y de ella se hacían tres determinaciones en otros tantos cilindros, alternando con los otros tres cilindros donde se ensayaba la concentración de referencia del antibiótico. Por lo tanto, referido a los tres animales sacrificados a cada uno de los tiempos mencionados, se utilizaron nueve placas y las lecturas efectuadas fueron 27. Interesa resaltar, sobre todo, que las concentraciones de residuos que se dan más adelante se calcularon llevando a la curva patrón un valor que representa la media de los valores obtenidos (previamente corregidos) con el mismo tejido de los tres animales (nueve determinaciones).

## RESULTADOS

En la Tabla XIII se señalan los residuos encontrados en los animales a los que se les inoculó una dosis de 5.000 UI de penicilina G procaina por Kg de

peso vivo. La máxima concentración se observó en riñón a las 2 horas después de la inoculación (0,310 UI/gr), siguiendo hígado y músculo. La permanencia fue semejante en riñón, hígado y músculo. No se detectaron residuos en ninguno de los tres tejidos mencionados a las 24 horas post-inoculación.

Los resultados del experimento correspondiente a la dosis de 10,000 UI/Kg de peso vivo se dan en la Tabla XIV. También en este caso la máxima concentración de los residuos correspondía al riñón a las 2 horas (0,640 UI/gr). Seguían hígado y músculo. La permanencia de los residuos fue máxima en hígado y riñón; a las 48 horas era evidente la presencia de residuos, aunque su cuantía no era medible por la técnica utilizada.

En la Tabla XV se dan los datos relativos a la dosis de 20,000 UI/Kg. Lo mismo que con las dosis anteriores, la máxima concentración de residuos se detectó en el riñón a las 2 horas. Cantidad menores se encontraron en el hígado y en el músculo, en este orden. A las 12 horas, los residuos eran algo superiores en el hígado que en el riñón y en el músculo, diferencia que se mantuvo a las 24 horas. A las 48 horas, los tres tejidos eran positivos de residuos, aunque su cuantía era inferior al límite de sensibilidad de la técnica (0,0625 UI/gr).

TABLA XIII

Residuos de penicilina G procaina, expresados en UI/gr de muestra, en tejidos de pollos inoculados por vía intramuscular con 5.000 UI/Kg de peso vivo

TEJIDO	Tiempo en horas después de la inoculación			
	2	12	24	48
Músculo	+	+	-	-
Hígado	0,090	+	-	-
Riñón	0,310	+	-	-

+= Positivo, pero no medible cuantitativamente.

- = Negativo (ausencia de residuos).

TABLA XIV

Residuos de penicilina G procaina, expresados en UI/gr de muestra, en tejidos de pollos inoculados por vía intramuscular con 10.000 UI/Kg de peso vivo

Tejido	Tiempos en horas después de la inoculación			
	2	12	24	48
Músculo	+	+	+	-
Hígado	0,109	0,075	0,069	+
Riñón	0,640	+	+	+

+= Positivo, pero no medible cuantitativamente.

- = Negativo (ausencia de residuos).

TABLA XV

Residuos de penicilina G procaina, expresados en UI/gr de muestra, en tejidos de pollos inoculados por vía intramuscular con 20.000 UI/Kg de peso vivo

Tejido	Tiempo en horas después de la inoculación			
	2	12	24	48
Músculo	0,1	0,068	+	+
Hígado	0,4	0,084	0,0625	+
Riñón	>1	0,063	+	+

+= Positivo, pero no medible cuantitativamente.

- = Negativo (ausencia de residuos).

Por último, la Tabla XVI recoge los resultados del experimento en el que los animales fueron inoculados con una dosis de 100,000 UI/Kg de peso vivo, dosis muy elevada que no se alcanza normalmente en la práctica. Como puede verse, también a las 2 horas la cuantía de los residuos era en este orden: riñón, hígado, músculo. El nivel se mantuvo algo superior en hígado que en riñón, siendo el músculo el tejido donde este nivel descendió antes.

En la Tabla XVII se reúnen los datos de los cuatro experimentos.

## DISCUSION

Considerados en conjunto los experimentos realizados, puede concluirse que la concentración máxima de residuos se observó siempre a las 2 horas después de la inoculación del antibiótico en el riñón, siguiendo hígado y músculo. A los restantes tiempos (12, 24 y 48 horas), la máxima concentración correspondió al hígado y después al riñón. El músculo fue el tejido donde la concentración fue mínima.

TABLA XVI

Residuos de penicilina G procaina, expresados en UI/gr de muestra, en tejidos de pollos inoculados por vía intramuscular con 100.000 UI/Kg de peso vivo

Tejido	Tiempo en horas después de la inoculación			
	2	12	24	48
Músculo	0,1	0,092	+	+
Hígado	>1	0,1	0,072	0,066
Riñón	>1*	0,11	0,064	0,063

+= Positivo, pero no medible cuantitativamente.

\* = Los residuos en riñón eran superiores a los residuos en hígado.

TABLA XVII

Residuos de penicilina G procaina, expresados en UI/gr de muestra, en tejidos de pollos inoculados por vía intramuscular con dosis distintas de este antibiótico por Kg de peso vivo

Dosis	Tejido	Tiempo en horas después de la inoculación			
		2	12	24	48
5.000	M	+	±	-	-
	H	0,090	+	-	-
	R	0,310	+	-	-
10.000	M	+	+	+	-
	H	0,109	0,075	0,069	+
	R	0,640	+	+	+
20.000	M	0,1	0,068	+	+
	H	0,4	0,084	0,0625	+
	R	>1	0,063	+	+
100.000	M	0,1	0,092	+	+
	H	>1	0,10	0,072	0,066
	R	>1*	0,11	0,064	0,063

M = Músculo, H = Hígado, R = Riñón.

+= Positivo, pero no medible cuantitativamente.

- = Negativo (ausencia de residuos).

\* = Los residuos en riñón eran superiores a los residuos en hígado.

Dada la limitada sensibilidad de la técnica de determinación utilizada, no es posible concluir acerca de la persistencia límite de los residuos de penicilina en los tejidos estudiados. Cabe, únicamente, señalar que ya a las 12 horas con la dosis de 5.000 UI/Kg, y a las 48 horas con las de 10.000 y 20.000 UI/Kg, los residuos presentes en los tres tejidos investigados eran inferiores al límite de sensibilidad de la técnica (0,0625 UI/gr de tejido).

Si tenemos en cuenta que la OMS (1970) considera como inocuos los residuos de penicilina presentes en la carne cuando estos estén por debajo de 0,1 UI/gr, cabe concluir que con las dosis terapéuticas de penicilina más corrientemente utilizadas en aves (10.000-20.000 UI/Kg, peso vivo) a las 48 horas post-inoculación los residuos presentes en los tejidos son poco significativos. Es conveniente señalar aquí que aun siendo la penicilina utilizada una forma de absorción retardada, el hecho de haberla inoculado en solución acuosa determina que su absorción haya sido más rápida que si hubiéramos utilizado esta misma penicilina en un vehículo oleoso o en una suspensión oleosa de un gel de monoestearato de aluminio. En este caso, también la persistencia en los tejidos hubiera sido más prolongada. La penicilina G benzatina es eliminada más lentamente del suero y de los tejidos que la penicilina G procaina (LOFTSGAARD *et al.*, 1968; VINCENT, 1969; HUBER, 1971).

El tiempo de excreción del antibiótico hay que relacionarlo, además de con la forma de penicilina administrada, con la especie animal. El tiempo

necesario para su excreción por la orina es diferente en las distintas especies animales. En pollos, según HUBER (1971), la eliminación es mucho más rápida que en cerdos y en vacuno, por ejemplo. Las aves por lo general, metabolizan y eliminan la penicilina más acentuadamente que otras especies. Por lo tanto, los resultados obtenidos en pollos no pueden aplicarse a otros animales.

Por lo que respecta a la forma de penicilina de absorción retardada utilizada, penicilina G procaina, es necesario también considerar la posibilidad de que el producto sea secuestrado en el tejido muscular, lo que aumentaría el peligro para el consumidor (HUBER, 1971).

Existe un número reducido de trabajos sobre residuos de penicilina en carne y vísceras de animales a los que se inocularon dosis distintas de este antibiótico por vía parenteral. COOPER *et al.* (1957) no encontraron residuos de penicilina G procaina en hígado y riñón de pollos a los que 2 horas antes se les había administrado por vía intramuscular dosis de 5.000 y 10.000 UI/libra de peso vivo. LOFTSGAARD *et al.* (1968) investigaron los residuos presentes en orina, riñón, músculo e hígado de cerdos a los que se les había inoculado por vía intramuscular una dosis de 12.000 UI/Kg de penicilina G procaina. La técnica utilizada por estos autores (con extracción y concentración) era muy sensible: 0,002 UI/gr de tejido. A los cuatro días post-inoculación no detectaron residuos ni en la orina ni en los tejidos mencionados. A las 24 horas, los residuos en músculo, hígado y riñón (0,03, 0,019 y 0,1 UI/gr, respectivamente) eran algo superiores a los encontrados por nosotros a este mismo tiempo con la dosis de 10.000 UI/Kg. Los autores mencionados investigaron también los residuos presentes en cerdos a los que inocularon dosis de 8.000 UI/Kg de penicilina G benzatina. Con esta forma de penicilina, se observó una persistencia mayor de los residuos, puesto que éstos eran detectables en músculo, hígado y riñón hasta los 7 días después de la inoculación, aunque su cuantía era muy pequeña (0,003, 0,002 y 0,092 UI/gr, respectivamente). BAROUTCHIEVA (1969) encontró residuos en hígado (no en músculo) de pollos a los que 2 días antes del sacrificio había inoculado por vía intramuscular 10.000 UI/ave de penicilina G sódica. Los resultados del trabajo de SCHORNHORST (1969) han de ser interpretados en función de la escasa sensibilidad de la técnica utilizada (0,1 UI/gr de tejido). Además, no se menciona la forma de penicilina utilizada. Este autor no encontró residuos de penicilina en carne y vísceras de terneros a las 27 horas después de la administración de unas 10.000 UI/Kg de peso vivo por vía intramuscular. En cerdos inoculados con unas 15.000 UI/Kg, a las 26 horas post-inoculación solamente detectó residuos en riñón.

HUBER *et al.* (1969) estudiaron los residuos de penicilina G procaina presentes en suero y orina de cerdos a los que se les había inoculado este antibiótico en suspensión acuosa por vía intramuscular a la dosis de 3.900 UI/Kg. A las 48 horas después de la inoculación, detectaron residuos en suero, y a las 72 horas, en orina. A partir de la cifra de residuos en la orina, estos

autores calculan teóricamente los residuos en músculo, hígado y riñón, obteniendo los siguientes valores: de 0,01 a 0,12 UI/gr en músculo, de 0,10 a 0,95 UI/gr en hígado, y de 0,06 a 0,56 UI/gr en riñón. No está claro, sin embargo, el tiempo post-inoculación a que corresponden estos residuos.

Las dificultades económicas que lleva consigo la utilización para este tipo de trabajos de animales de matadero, son la causa de que algunos investigadores hayan recurrido a animales de laboratorio, aun sabiendo que los resultados obtenidos en estas especies no son aplicables a aquéllos. VIDEAU (1969) da una serie de datos sobre residuos de diversos antibióticos en ratas. Después de la administración parenteral de 10.000 UI de penicilina G procaina por Kg de peso vivo, ya a las 4 horas no detecta residuos en músculo ni en hígado, aunque sí en riñón (0,06 UI/gr). En cambio, después de la inoculación de igual dosis de penicilina G benzatina, encuentra residuos hasta las 24 horas en hígado (0,08 UI/gr), y hasta las 72 horas en riñón (0,10 UI/gr). El músculo no presentaba residuos ya a las 4 horas. La sensibilidad de la técnica utilizada era de 0,02 UI/gr para el hígado y de 0,01 UI/gr para el riñón y el músculo.

A la vista de nuestros propios resultados y de los resultados de los trabajos mencionados es evidente la dificultad de un estudio comparativo por varias razones, entre ellas la diferente sensibilidad de las técnicas de determinación utilizadas, las distintas formas de penicilina empleadas, la especie animal, etc. En líneas generales, estos trabajos coinciden con nuestros resultados en que en las primeras horas después de la inoculación es el riñón el tejido donde la concentración del antibiótico es mayor, pero que después la cuantía y la persistencia de los residuos en riñón e hígado varía de unos trabajos a otros. El músculo siempre registra concentraciones y persistencias menores.

En el capítulo anterior se han discutido ya los posibles riesgos derivados del consumo de alimentos con residuos de penicilina. Aun cuando no se conoce la dosis necesaria vía alimentos para determinar una sensibilización, ni para desencadenar un choque anafiláctico en personas previamente sensibilizadas, parece evidente que estos riesgos deben ser mucho mayores cuando se consume carne o despojos de animales que fueron tratados previamente con dosis terapéuticas de este antibiótico ya que la cuantía de los residuos presentes es mayor en este caso que cuando los animales se alimentan con piensos antibióticosuplementados. También en el capítulo anterior se han discutido una serie de datos relativos al desarrollo de resistencias bacterianas a la penicilina por parte de la flora intestinal.

No están aún determinadas de modo general las tolerancias en cuanto a residuos de penicilina en carne y vísceras animales. Mientras que la FAO-OMS (1969) considera como inocuos los residuos de penicilina inferiores a 0,1 UI/gr de tejido, la F. D. A. americana (FEDERAL REGISTER, 1972) no admite ninguna tolerancia para la carne de pollo y otras aves, cerdo, huevos y leche,

Los resultados por nosotros obtenidos en carne de pollos indican que con las dosis terapéuticas más corrientemente utilizadas (10.000-20.000 UI/Kg) ya a las 12 horas después de la inoculación los residuos presentes en los tejidos son inferiores a 0,1 UI/gr, pero que aún a las 48 horas se detectan residuos, aunque inferiores a 0,0625 UI/gr.

Para reducir la cuantía de los residuos de antibióticos presentes en los alimentos de origen animal, existen ya en algunos países normas que prohíben el sacrificio de los animales que fueron tratados con antibióticos y señalan el periodo de tiempo que debe transcurrir entre el tratamiento y el sacrificio para que éste pueda verificarse. Aún cuando, en general, se consideran suficientes 4 días, parece generalizarse el periodo de 6 días, exigido por el reglamento danés de inspección de carnes (PANTALEÓN, 1966).

De los resultados obtenidos por nosotros puede deducirse que incluso el periodo de cuatro días puede ser suficiente por lo que respecta a la penicilina en pollos.

## CAPITULO VI

### INTRODUCCION

#### ESTABILIDAD DE LOS RESIDUOS DE PENICILINA G PROCAINA EN MUSCULO DE POLLO

En los capítulos anteriores de esta tesis se ha estudiado la cuantía de los residuos de penicilina presentes en riñón, hígado y músculo de pollos alimentados con piensos adicionados de este antibiótico a distintos niveles e inoculados por vía intramuscular con dosis terapéuticas del mismo. A la vista de los resultados obtenidos, surge la pregunta de si estos residuos se mantienen en los músculos y en las vísceras hasta que estos alimentos son consumidos o, por el contrario, si los fenómenos bioquímicos que llevan consigo los procesos *post-mortem*, primero, y la refrigeración o congelación de la carne y su final tratamiento térmico culinario después, determinan una inactivación o destrucción total o parcial de los mismos, lo que disminuiría los riesgos para el consumidor.

El estudio de la estabilidad de los residuos de penicilina, como de otros antibióticos, en alimentos de origen animal tiene una considerable importancia práctica. En la actualidad, no se lleva a cabo sistemáticamente en los mataderos la detección de estos residuos, pero aún en el caso de que llegue a imponerse esta práctica, es evidente que nunca se tendrá la garantía absoluta de que la carne esté exenta de antibióticos, por el grave inconveniente que supone la limitada sensibilidad de las técnicas de detección utilizadas.

Existen muy pocos trabajos relativos a la estabilidad de los residuos de penicilina en tejido muscular y vísceras de animales.

En el presente capítulo se estudia la estabilidad de los residuos de penicilina G procaina en músculo de pollo mantenido en refrigeración y en congelación, así como la inactivación por calentamiento de estos residuos.

## MATERIAL Y METODOS

Los experimentos de estabilidad de los residuos de penicilina G procaina en carne de pollo frente a la refrigeración y a la congelación se llevaron a cabo con muestras de músculo procedente de pollos a los que se les había inoculado dosis distintas de este antibiótico, manteniendo estas muestras a temperaturas de  $4 \pm 1^\circ\text{C}$  y  $-18 \pm 2^\circ\text{C}$ , respectivamente.

Las dosis utilizadas fueron de 50.000, 10.000 y 5.000 UI/Kg de peso vivo. Con cada una de estas dosis se inocularon tres pollos por vía intramuscular en la región del muslo. Los pollos habían sido alimentados con un pienso exento de antibióticos. Los animales se sacrificaron dos horas después de la inoculación y, acto seguido, se obtuvieron muestras de los músculos de la pechuga. Las muestras correspondientes a los tres animales inoculados con la misma dosis se mezclaron a partes iguales y los tejidos se trituraron convenientemente, procurando una mezcla homogénea. Todas estas operaciones se realizaron con el máximo cuidado para evitar contaminaciones. El triturado de tejido correspondiente a cada dosis se distribuyó en distintas样的 de unos 15 gr, que se colocaron en bolsas de plástico estériles y éstas a su vez en placas de Petri también estériles. La mitad de las placas se llevaron a un refrigerador a  $4 \pm 1^\circ\text{C}$  y la otra mitad a un congelador a  $-18 \pm 2^\circ\text{C}$ , donde se mantuvieron durante el tiempo del experimento. Al tiempo 0, dos样的 se sometieron a valoración cuantitativa de residuos. Las muestras conservadas en refrigeración se valoraron con un intervalo de 5 días durante un período de un mes. Las mantenidas en congelación con un intervalo de 10 días durante un período de tres meses. En todos los casos, se pesaron 10 gr de cada muestra y se sometieron a ensayo de valoración.

Para las dosis de 50.000 y 10.000 UI/Kg de peso vivo, la determinación cuantitativa de residuos se llevó a cabo por el método biológico de difusión en placas de agar inoculadas con *Sarcina lutea* ATCC 9341, según la técnica de KRAMER *et al.* (1968), con las modificaciones señaladas en el capítulo III (Material y Métodos Generales). La sensibilidad de esta técnica es de 0,0625 UI/gr de tejido. Para la dosis de 5.000 UI/Kg de peso vivo, se consideró que la técnica de extracción anterior no era suficientemente sensible, por lo que se utilizó la técnica de extracción y concentración de PEDERSEN (1965). La sensibilidad de esta técnica, con las modificaciones introducidas por nosotros (véase capítulo III), es de 0,00250 UI/gr de tejido.

Para el estudio de la sensibilidad frente al calentamiento de la penicilina G procaina se llevaron a cabo dos grupos de experimentos: el primero de ellos

con soluciones puras en tampón fosfato y el segundo con músculo procedente de pollos inoculados previamente con este antibiótico. La finalidad de estos experimentos era, en primer lugar, conocer la cuantía de la inactivación de los residuos microbiológicamente activos presentes en el tejido muscular y, en segundo, establecer posibles relaciones entre la inactivación del antibiótico en soluciones puras y tal como se encuentra en los tejidos animales.

En los experimentos de estabilidad frente al calor de la penicilina G procaina en soluciones puras, se prepararon soluciones de una concentración de 0,1 UI/ml en tampón fosfato bipotásico-monopotásico 0,05 M de diferentes pHs: 5,3, 5,6, 5,9, 6,2, 6,5, 6,8 y 7,1. El calentamiento se llevó a cabo añadiendo 5 ml de cada una de las soluciones de distintos pH a tubos de vidrio Pyrex de 160 × 16 mm y manteniendo estos tubos en baños termostatados a las temperaturas y durante los tiempos de tratamiento. Las temperaturas ensayadas fueron 60, 80 y 100°C y los tiempos de calentamiento a cada una de estas temperaturas de 30, 60 y 90 minutos. Para las temperaturas de 60 y 80°C se utilizó un baño de agua SELECTA (sensibilidad =  $\pm 0,1^\circ\text{C}$ ) y para la de 100°C un baño de aceite TECAM (sensibilidad =  $\pm 0,1^\circ\text{C}$ ). El tiempo de tratamiento se contó siempre a partir del momento en que se alcanzaba la temperatura deseada en la masa del líquido. Pasado este tiempo, los tubos se enfriaban por inmersión en agua de hielo y las muestras se ensayaban a continuación. Como control se utilizó la misma solución del antibiótico a iguales pHs mantenida a temperatura ambiente durante el tiempo del experimento.

En los experimentos de estabilidad frente al calor de la penicilina G procaina en músculo de pollo, se utilizaron muestras de tres animales que habían sido inoculados por vía intramuscular en la región del muslo con 100.000 UI / Kg de peso vivo una hora antes del sacrificio. Los pollos fueron alimentados con un pienso exento de antibióticos. Como muestra de ensayo se utilizó un triturado de tejido muscular obtenido por mezcla de igual cantidad de músculo de la pechuga de cada uno de los tres animales. Se pesaron样的 de 10 gr de esta muestra en tubos de centrifuga de 100 ml de capacidad con tapón de rosca y a continuación el tejido se tamponó con 40 ml de un tampón fosfato bipotásico-monopotásico 0,4 M, de tal forma que los pHs finales eran de 5,3, 5,6, 5,9, 6,2, 6,5, 6,8 y 7,1 (iguales a los utilizados para las disoluciones puras). Estos pHs cubren el rango fisiológico de variación del pH en el músculo *post-mortem*. Acto seguido, los tubos se colocaron en baños termostatados en la misma forma, a las mismas temperaturas y durante el mismo tiempo que en el experimento anterior. También en este caso el tiempo de tratamiento se contó a partir del momento en que se alcanzaba la temperatura deseada en el interior del contenido de los tubos. El enfriamiento se llevó a cabo por inmersión en agua de hielo. Una vez enfriadas, las muestras se homogeneizaban y a continuación se tomaba una样的 que se sometía a

centrifugación. El sobrenadante constituía el líquido de ensayo. Como control se utilizó una aliquota igual del mismo triturado de tejido muscular tamponada a iguales pHs y mantenida a temperatura ambiente durante el tiempo del experimento.

El ensayo de las muestras en todos los experimentos de inactivación por el calor se llevó a cabo por la técnica de KRAMER *et al.* (1968), con las modificaciones anteriormente mencionadas.

## RESULTADOS

En la Tabla XVIII se señalan los resultados obtenidos en los experimentos de estabilidad de los residuos de penicilina G procaina en músculo de pollo mantenido en refrigeración a  $4 \pm 1^\circ\text{C}$ . Estos resultados se representan gráficamente en las Figs. 7, 8 y 9. Por lo que respecta a los residuos presentes en el tejido muscular de los animales a los que se les había inoculado 50.000 UI/Kg de peso vivo, su cuantía disminuyó progresivamente hasta el día 30, momento en que no se detectaron residuos microbiológicamente activos. A los 20 días, los residuos presentes eran, aproximadamente, la tercera parte de los residuos iniciales. Los residuos correspondientes a la dosis de 10.000 UI/Kg fueron desde el tiempo 0 sólo ligeramente superiores al límite de detección cuantitativa de la técnica (0,0625 UI/gr). No obstante, se mantuvieron así sin modificación hasta el día 15, descendiendo después por debajo del mencionado nivel de detección, para ser negativa su presencia al final del experimento (día 30). En la gráfica de la Fig. 8 no se representan los puntos correspondientes a las determinaciones de los días 20 y 25, porque, aún siendo positivos de presencia de residuos, éstos no pueden expresarse cuantitativamente. Finalmente, los residuos relativos a la dosis de 5.000 UI/Kg fueron disminuyendo también a lo largo del período de mantenimiento en refrigeración del músculo, no habiéndose detectado su presencia, aún con la gran sensibilidad de la técnica utilizada en este caso (0,00250 UI/gr), al final del experimento (día 30).

TABLA XVIII

Estabilidad de los residuos de penicilina G procaina en músculo de pollo mantenido a  $4 \pm 1^\circ\text{C}$  (Las cifras representan UI/gr de tejido) \*

Dosis inoculada (UI/Kg peso)	Tiempo (días)						
	0	5	10	15	20	25	30
50.000	0,18	0,16	0,097	0,071	0,064	0,063	-
10.000	0,065	0,064	0,063	0,063	>0,062	>0,062	-
5.000	0,024	0,023	0,015	0,015	0,016	0,003	-

\* Para las dosis de 50.000 y 10.000 UI/Kg, la sensibilidad de la técnica utilizada era de 0,0625 UI/gr y para la dosis de 5.000 UI/Kg de 0,00250 UI/gr.

- = Negativo (ausencia de residuos).

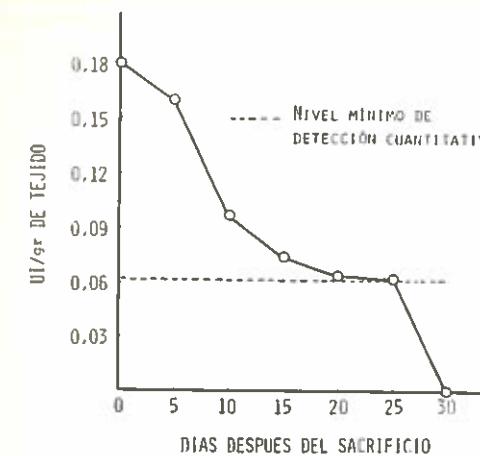


Fig. 7.—Estabilidad de los residuos de penicilina G procaina en músculo de pollo mantenido en refrigeración a  $4 \pm 1^\circ\text{C}$  (Los animales habían sido inoculados por vía intramuscular, dos horas antes del sacrificio, con 50.000 UI/Kg de peso vivo).

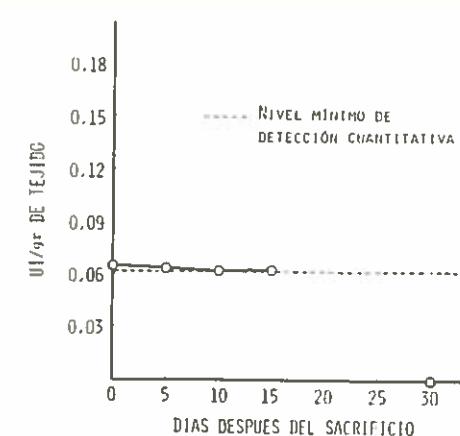


Fig. 8.—Estabilidad de los residuos de penicilina G procaina en músculo de pollo mantenido en refrigeración a  $4 \pm 1^\circ\text{C}$  (Los animales habían sido inoculados por vía intramuscular, dos horas antes del sacrificio, con 10.000 UI/Kg de peso vivo).

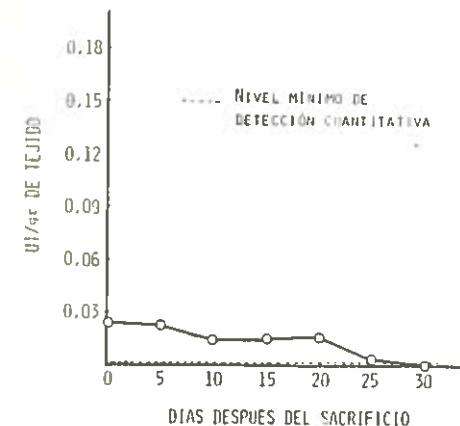


Fig. 9.—Estabilidad de los residuos de penicilina G procaina en músculo de pollo mantenido en refrigeración a  $4 \pm 1^\circ\text{C}$  (Los animales habían sido inoculados por vía intramuscular, dos horas antes del sacrificio, con 5.000 UI/Kg de peso vivo).

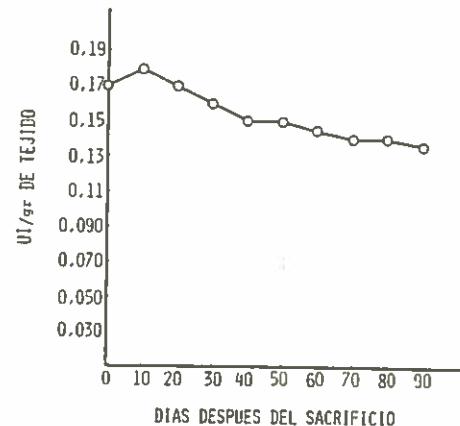


Fig. 10.—Estabilidad de los residuos de penicilina G procaina en músculo de pollo mantenido en congelación a  $-18 \pm 2^\circ\text{C}$ . (Los animales habían sido inoculados por vía intramuscular, dos horas antes del sacrificio, con 50.000 UI/Kg de peso vivo).

Los resultados de los experimentos de estabilidad de los residuos de penicilina G procaina en músculo de pollo mantenido en congelación a  $-18 \pm 2^\circ\text{C}$  durante un período de tres meses se expresan en la Tabla XIX y se representan gráficamente en las Figs. 10, 11 y 12. Como puede observarse, los residuos presentes en los músculos de los animales inoculados con la dosis de

50.000 UI/Kg se mantuvieron muy estables. Se aprecia, sin embargo, una disminución gradual, aunque muy poco significativa, en la cuantía de estos residuos. Las cifras de residuos correspondientes a las otras dos dosis de inoculación (10.000 y 5.000 UI/Kg) son muy semejantes a lo largo del periodo de tres meses que duraron los experimentos.

En la Tabla XX se recogen los resultados de los experimentos de estabilidad frente al tratamiento térmico a 60, 80 y 100°C de la penicilina G procaina en solución tampón fosfato de diferentes pHs. En la gráfica de la Fig. 13 se representan los resultados obtenidos después del tratamiento a estas tres temperaturas durante 30 minutos. Las Figs. 14 y 15 corresponden a las gráficas de 60 y 90 minutos, respectivamente.

**TABLA XIX**  
Estabilidad de los residuos de penicilina G procaina en músculo de pollo mantenido en congelación a  $-18 \pm 2^\circ\text{C}$ . (Las cifras representan UI/gr de tejido)\*

Dosis inoculada (UI/Kg peso)	Tiempo (días)									
	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90
50.000	0,17	0,18	0,17	0,16	0,15	0,15	0,145	0,14	0,14	0,135
10.000	0,075	0,085	0,065	0,067	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063	0,063
5.000	0,032	0,040	0,036	0,031	0,030	0,033	0,029	0,029	0,033	0,031

\* Para las dosis de 50.000 y 10.000 UI/Kg, la sensibilidad de la técnica utilizada era de 0,0625 UI/gr y para la dosis de 5.000 UI/Kg de 0,00250 UI/gr.

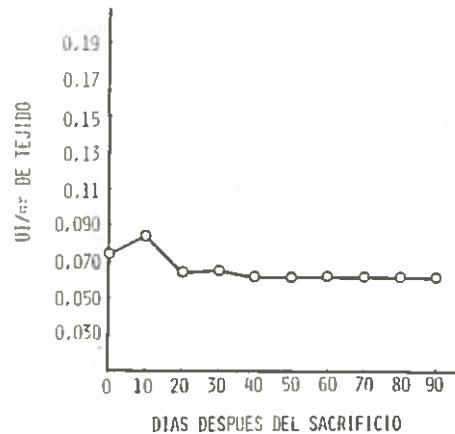


Fig. 11.-Estabilidad de los residuos de penicilina G procaina en músculo de pollo mantenido en congelación a  $-18 \pm 2^\circ\text{C}$ . (Los animales habían sido inoculados por vía intramuscular, dos horas antes del sacrificio por vía intramuscular, con 50.000 UI/Kg de peso vivo).

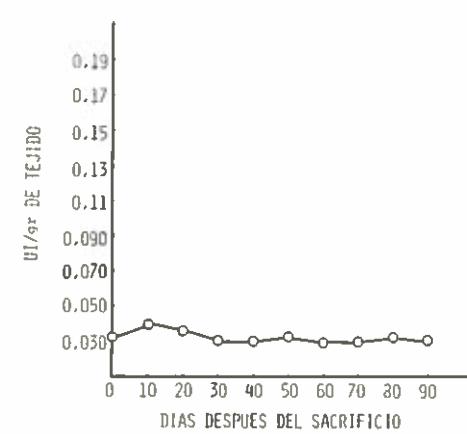


Fig. 12.-Estabilidad de los residuos de penicilina G procaina en músculo de pollo mantenido en congelación a  $-18 \pm 2^\circ\text{C}$ . (Los animales habían sido inoculados por vía intramuscular, dos horas antes del sacrificio, con 10.000 UI/Kg de peso vivo).

**TABLA XX**  
Estabilidad de la penicilina G procaina en solución tampón fosfato de distintos pHs frente a diferentes tratamientos térmicos. (Los valores representan los diámetros en mm de los halos de inhibición)

Tratamiento	pH						
	5.3	5.6	5.9	6.2	6.5	6.8	7.1
60°C	30'	20,56	20,16	20,51	20,31	21,31	21,31
	60'	19,81	20,16	20,31	20,16	20,21	21,01
	90'	19,31	19,11	19,56	19,86	20,06	20,06
80°C	30'	17,60	17,86	20,06	19,26	18,46	19,16
	60'	17,11	17,76	18,76	19,70	18,46	19,61
	90'	15,96	17,16	18,21	18,86	17,61	18,96
100°C	30'	13,11	15,76	16,06	18,16	18,51	18,51
	60'	10,66	12,36	15,56	17,01	17,36	16,51
	90'	-	9,81	13,01	15,71	16,11	14,06
Control (1)	0'	-	-	-	-	-	-
	30'	-	-	-	-	-	-
	60'	22,30	22,30	21,64	21,34	21,90	22,37
	90'	-	-	-	-	-	21,85

(1) = Los resultados obtenidos en estas cuatro determinaciones a cada pH eran muy semejantes. El valor que se da corresponde a la media de los cuatro valores.  
- = Negativo (ausencia de residuos).

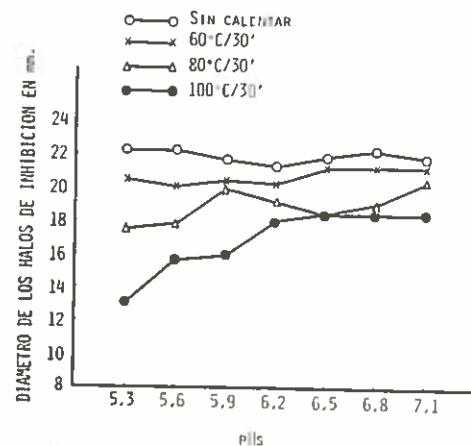


Fig. 13.-Inactivación de la penicilina G procaina en solución tampón fosfato de distintos pHs por tratamiento térmico durante 30 minutos a temperaturas de 60, 80 y 100°C.

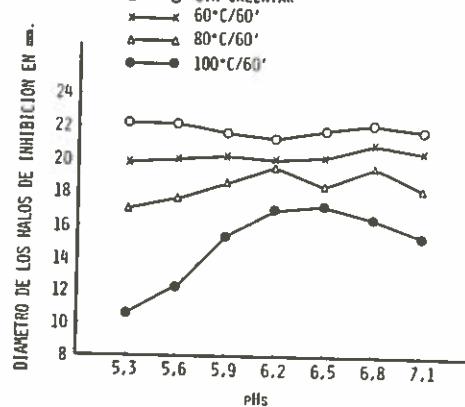


Fig. 14.-Inactivación de la penicilina G procaina en solución tampón fosfato de distintos pHs por tratamiento térmico durante 60 minutos a temperaturas de 60, 80 y 100°C.

Los resultados que se dan en la Tabla XX, y que figuran en las gráficas citadas, correspondientes a la muestra control (sin calentar) representan la media de las cuatro determinaciones (tiempos 0, 30, 60 y 90 minutos) realiza-

das a cada pH. Se consideró que, dadas las mínimas diferencias existentes entre los valores de estas cuatro determinaciones, la media podía expresar mejor la ausencia de inactivación del antibiótico en estas muestras control durante los tiempos de los experimentos. Por lo demás, estos resultados se consideran más adelante en este capítulo. De forma paralela en la Tabla XXI se dan los resultados de los experimentos relativos a la estabilidad frente al calor del antibiótico presente en músculo de pollo, resultados cuya representación gráfica se hace en las Figs. 16, 17 y 18. También estos resultados se consideran más adelante.

## DISCUSION

Considerados en conjunto los resultados de los experimentos de estabilidad de los residuos de penicilina G procaina en músculo de pollo mantenido en refrigeración a  $4 \pm 1^\circ\text{C}$ , es posible concluir que para los tres niveles estudiados, que cubren la variación de la cuantía de los residuos encontrados en la práctica después de la administración por vía parenteral de penicilina, se detectaron residuos durante todo el período de vida útil del alimento, puesto que cuando aquéllos eran negativos (día 30), la carne ya mostraba signos claros de alteración. Evidentemente, los residuos correspondientes a la dosis de 5.000 UI/Kg fueron de menor cuantía y si se detectaron hasta el día 25 fue debido a que la técnica utilizada era mucho más sensible que la empleada para las dosis de 50.000 y 10.000 UI/Kg.

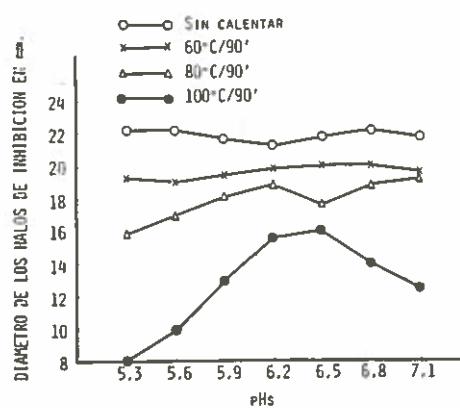


Fig. 15.-Inactivación de la penicilina G procaina en solución tampon fosfato de distintos pHs por tratamiento térmico durante 90 minutos a temperaturas de 60, 80 y 100°C.

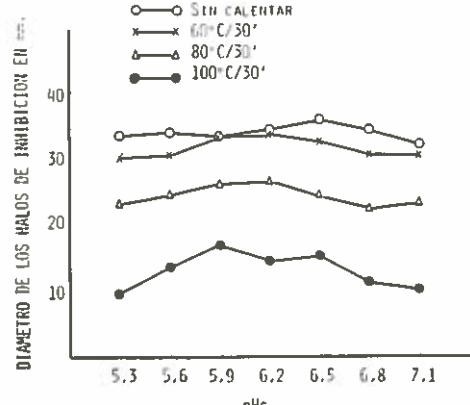


Fig. 16.-Inactivación de los residuos de penicilina G procaina en músculo de pollo a distintos pHs por tratamiento térmico durante 30 minutos a temperaturas de 60, 80 y 100°C.

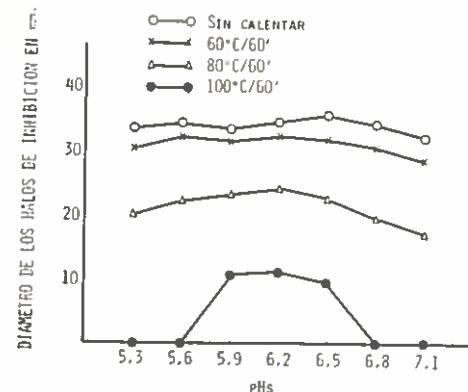


Fig. 17.-Inactivación de los residuos de penicilina G procaina en músculo de pollo a distintos pHs por tratamiento térmico durante 60 minutos a temperaturas de 60, 80 y 100°C.

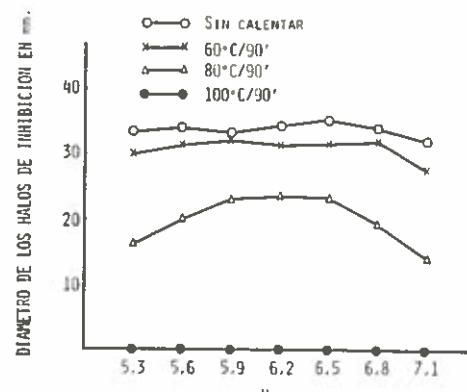


Fig. 18.-Inactivación de los residuos de penicilina G procaina en músculo de pollo a distintos pHs por tratamiento térmico durante 90 minutos a temperaturas de 60, 80 y 100°C.

**TABLA XXI**  
Estabilidad de los residuos de penicilina G procaina en músculo de pollo a distintos pHs frente a diferentes tratamientos térmicos. (Los valores representan diámetros en mm de los halos de inhibición)

Tratamientos	pH							
	5.3	5.6	5.9	6.2	6.5	6.8	7.1	
60°C	30°	30.01	30.41	33.81	33.86	32.46	30.26	30.46
	60°	30.16	32.06	31.41	32.31	31.51	30.76	28.46
	90°	29.81	31.51	32.06	31.86	31.93	32.01	27.66
80°C	30°	23.50	21.61	26.01	26.56	21.46	22.56	23.51
	60°	20.30	22.21	23.46	24.01	22.56	19.71	17.01
	90°	16.11	20.26	23.26	23.86	23.41	19.16	14.66
100°C	30°	9.90	13.96	16.96	14.66	15.61	11.21	10.21
	60°	-	-	10.41	10.76	9.90	-	-
	90°	-	-	-	-	-	-	-
Control (1)	0°	-	-	-	-	-	-	-
	60°	33.50	33.93	33.46	31.39	35.80	31.30	31.96
	90°	-	-	-	-	-	-	-

(1) = Los resultados obtenidos en estas cuatro determinaciones a cada pH eran muy semejantes. El valor que se da corresponde a la media de los cuatro valores.  
- = Negativo (ausencia de residuos).

Los resultados obtenidos en los experimentos de estabilidad de la penicilina G procaina en músculo de pollo mantenido en congelación a  $-18 \pm 2^\circ\text{C}$  ponen de manifiesto que este antibiótico es muy estable en estas condiciones, ya que la cuantía de sus residuos a los diferentes niveles se mantuvo casi

constante a lo largo de tres meses. Existen muy pocos trabajos sobre la estabilidad de la penicilina en carne refrigerada y en carne congelada. SHAKARYAN y SEUYAN (1973) no encontraron residuos de este antibiótico en músculo de pollo conservado a temperaturas de -2 a -3°C durante 210 días. Los animales habían sido inoculados por vía parenteral con dosis de 50.000 y 100.000 UI/Kg. De nuestros propios resultados puede deducirse que, si bien durante la conservación en refrigeración tiene lugar una cierta inactivación de los residuos microbiológicamente activos, esta inactivación es poco significativa y, por supuesto, no se puede confiar en la refrigeración, y mucho menos en la congelación, a la hora de asegurar que la carne no contenga residuos cuando es consumida.

En la Fig. 13 se representa la estabilidad de la penicilina G procaina en solución de tampón fosfato frente al calentamiento durante 30 minutos a 60, 80 y 100°C. Como puede observarse a la vista de esta gráfica, la estabilidad del antibiótico fue mayor a los valores de pH más próximos a la neutralidad, siendo menor progresivamente a los pHs más ácidos. Destaca también la considerable resistencia del antibiótico a todos los tratamientos, puesto que incluso después de 30 minutos a 100°C se registró una actividad importante. La cuantía del antibiótico microbiológicamente activo (en UI/ml) después de este tratamiento al pH de mayor estabilidad (6,5) era, aproximadamente, la mitad del antibiótico presente en la muestra control no calentada (porcentaje exacto de destrucción 44%). Al pH más ácido ensayado (5,3) el porcentaje de destrucción fue del 75%, y al más alcalino (7,1) del 40%. Comparados estos resultados con los obtenidos por iguales tratamientos térmicos en músculo de pollo (Fig. 16) destaca el hecho de que, aún siguiendo las curvas de inactivación una tendencia semejante, existen menos diferencias entre la estabilidad del antibiótico a los pHs más ácidos y a los más próximos a la neutralidad. La máxima estabilidad de los residuos del antibiótico se registró a pHs de 5,9 a 6,5.

La inactivación fue poco significativa después del calentamiento a 60°C, más importante a 80°C y muy considerable a 100°C. Aún cuando no es posible determinar porcentajes de inactivación, ya que los valores correspondientes a la muestra control sin calentar no pueden transformarse en UI/gr de tejido por caer fuera del rango de lectura que permite la curva patrón utilizada en todos nuestros experimentos, es evidente que la inactivación de los residuos presentes en el músculo fue muy superior porcentualmente a la que tuvo lugar en la solución pura del antibiótico en tampón fosfato. Este hecho fue más marcado para la temperatura de 100°C. Si se examina la gráfica de la Fig. 14, que representa la estabilidad de la penicilina G procaina en solución tampón fosfato frente al tratamiento térmico a iguales temperaturas durante 60 minutos, puede verse que la tendencia de las curvas de inactivación es la misma que la observada después de estos mismos tratamientos durante 30 minutos,

También en este caso la estabilidad del antibiótico fue mayor a los valores más próximos a la neutralidad, siendo menos progresivamente a los pHs más ácidos, diferencia que se acentúa en el tratamiento a 100°C. A este tratamiento, también se observó la estabilidad máxima a pH 6,5. Los porcentajes de destrucción a los pHs 7,1, 6,5 y 5,3 fueron, respectivamente, de 61, 51 y 83%. Al comparar estos resultados con los resultados paralelos obtenidos al calentar músculo de pollo a iguales temperaturas y durante el mismo tiempo (Fig. 17), se observa que, lo mismo que sucedía en el tratamiento durante 30 minutos, existen menos diferencias entre la estabilidad del antibiótico a los pHs más ácidos y a los más próximos a la neutralidad en los tejidos que en la solución tampón. Como ocurría en el calentamiento del músculo durante 30 minutos, también en el calentamiento durante 60 minutos la máxima estabilidad de los residuos musculares se registró a pHs entre 5,9 y 6,5. Una vez más, la inactivación de los residuos presentes en el tejido muscular fue más significativa que la que tuvo lugar en la solución pura del antibiótico. Así, por ejemplo, a 100°C no se detectaron residuos a los pHs 5,3, 5,6, 6,8 y 7,1, siendo estos mínimos a los pHs de 5,9, 6,2 y 6,5.

Al comparar las curvas de inactivación de las Figs. 15 y 18, que corresponden al calentamiento durante 90 minutos de la solución de penicilina G procaina en tampón fosfato y del músculo con residuos de este antibiótico, respectivamente, pueden hacerse parecidas deducciones que en los experimentos de calentamiento durante 30 y 60 minutos. Destaca, sin embargo, el hecho de que en el tratamiento durante 90 minutos los residuos presentes en el músculo fueron inactivados totalmente por el tratamiento a 100°C a todos los pHs, incluso a los que el antibiótico mostró su máxima estabilidad (5,9 a 6,5).

Considerados en conjunto estos experimentos, es posible concluir que, en el rango de las concentraciones sometidas a calentamiento (0,1 UI/ml para la solución en tampón fosfato y 0,5 UI/ml, aproximadamente, para los residuos en músculo), la inactivación por el calor de la penicilina G procaina no tiene lugar del mismo modo cuando se encuentra en forma de disolución pura en tampón fosfato que cuando está presente en el músculo, siendo aquélla en este último caso más acusada. No obstante, y aún estando incluida la penicilina en el grupo de antibióticos termosensibles, en el tejido muscular los residuos de penicilina G procaina microbiológicamente activos son considerablemente resistentes al tratamiento térmico, puesto que fueron necesarios 100°C durante 90 minutos para inactivarlos completamente. Por esta razón, parece lógico concluir que no debe confiarse en el calentamiento que, por lo general, sufre la carne antes de ser consumida para eliminar los riesgos derivados de la presencia de residuos de este antibiótico. Este criterio es compartido por otros autores en relación con los residuos de antibióticos en alimentos (PANTALEÓN, 1966; HUBER, 1970; BARNUM, 1973).

PRIET y TOMA (1969) estudiaron la destrucción de la penicilina disuelta en

agua destilada, caldo nutritivo, leche y extracto de músculo de pollo en solución salina, por calentamiento a 100°C. De los resultados obtenidos por estos autores puede deducirse que el porcentaje de destrucción de este antibiótico es distinto en los diferentes medios, si bien parece razonable preguntarse si esta diferencia se debía a los componentes de los medios donde se disolvía el antibiótico o en parte también al diferente pH de cada uno de ellos. Los porcentajes de destrucción fueron mayores cuando el antibiótico se disolvió en un extracto de músculo en suero fisiológico, hecho que coincide con los resultados por nosotros obtenidos, aunque en nuestro caso el antibiótico no fue añadido al extracto muscular, sino que se encontraba ya en el músculo. Existe una serie de trabajos que demuestran que la degradación de la penicilina en solución puede retardarse en ciertos tampones o en presencia de ciertos aditivos químicos (HOU y POOLE, 1971). Por otra parte, se sabe también que la penicilina puede unirse o interaccionar en los tejidos con ciertas proteínas, unión que según PILET y TOMA (1969) podría hacer al antibiótico más sensible al calor. En nuestro caso, la diferente estabilidad de la penicilina G procaina en solución tampón fosfato y en tejido muscular habría que interpretarla a la luz de estos hechos.

VAN SCHOTHORST (1969) estudió el efecto del calor sobre la pérdida de la actividad antibacteriana de la penicilina. En la carne calentada a 100°C durante 12 minutos, los residuos del antibiótico disminuyeron de 2 a 0.25 UI/gr, mientras que cuando se encontraba en solución se obtenía una inactivación semejante por un tratamiento a 60°C durante 85 minutos.

LUCASS (1971) ha estudiado la inactivación por calentamiento de soluciones puras de penicilina G procaina en tampón fosfato de pH 5,4 a 6,6 y de mezclas de penicilina con otros antibióticos presentes en tejidos de terneros sacrificados en el matadero. Por lo que respecta a la penicilina en disolución, este autor destaca su notable resistencia al tratamiento térmico: a 100°C no fue posible su inactivación completa en 120 minutos y las pérdidas a 65°C durante 30-120 minutos fueron poco significativas. Se pone también de manifiesto en este trabajo la influencia del pH en la inactivación del antibiótico por calentamiento, mayor a temperaturas más elevadas y a tiempos de calentamiento más prolongados, y la estabilidad máxima del mismo a pHs entre 6 y 6,4. Todos estos resultados coinciden con los obtenidos por nosotros.

SHAHANI *et al.* (1956) estudiaron la inactivación por calentamiento de la penicilina K (concentraciones de 0,13 a 1,07 UI/ml) en leche, en tampón fosfato de pH 6 y en agua. Este antibiótico fue más estable en la leche que en el tampón, y en éste más que en el agua. La pasterización de la leche inactiva únicamente una pequeña parte de los residuos de penicilina presentes en este alimento (KRIENKE y FOUTS, 1950; SHAHANI *et al.*, 1956; MUNRO y MORRISON, 1970).

Al considerar los resultados obtenidos en los experimentos de inactivación

por calentamiento de la penicilina en alimentos en relación con los posibles riesgos para el consumidor, es necesario tener en cuenta, además, que algunos productos de degradación de este antibiótico podrían comportarse como agentes sensibilizantes. Tal es el caso del ácido penicilénico (WECK y EISEN, 1960). De hecho, se cree que el verdadero agente sensibilizante no es la propia molécula de penicilina, sino un metabolito o un derivado (WECK y EISEN, 1960). Esta posibilidad tiene gran interés en el sentido de que la inactivación por calentamiento de la penicilina microbiológicamente detectable puede no suponer la eliminación de los riesgos derivados del consumo de alimentos con residuos de este antibiótico.

Finalmente, si no se puede confiar en la conservación de la carne por refrigeración o por congelación, ni tampoco en el tratamiento térmico culinario a que se somete este alimento antes de ser consumido, para liberarlo de los posibles residuos de penicilina, queda únicamente reducir al máximo la cuantía de estos residuos en la fase de producción, controlando los niveles añadidos a los piensos y los tratamientos terapéuticos, y asegurando un período entre la última administración y el sacrificio de los animales en el matadero, durante el cual el antibiótico pueda ser metabolizado y eliminado de los tejidos.

## CAPITULO VII

### INTRODUCCION

#### INFLUENCIA DEL pH Y DEL ACIDO LACTICO DEL MUSCULO EN LA PRODUCCION DE HALOS DE INHIBICION NO ESPECIFICA DEL CRECIMIENTO DE *Sarcina lutea*

En los experimentos que se describen en capítulos anteriores de esta tesis de determinación de residuos de penicilina por la técnica de extracción y concentración de PEDERSEN (1965) y valoración por el método biológico de difusión en placas de agar inoculadas con *Sarcina lutea* ATCC 9341 (KRAMER *et al.*, 1968), en músculo, hígado y riñón de pollos inoculados previamente con dosis distintas de este antibiótico o alimentos con piensos adicionados del mismo a distintos niveles, hemos observado en algún caso la aparición de halos o zonas de inhibición no específica, entendiendo por tales aquéllos que no podían ser atribuidos a antibióticos dados directamente a los animales de los que se obtuvieron las muestras, ya que éstos habían sido alimentados durante tres semanas, al menos, antes del sacrificio con un pienso exento de antibióticos.

Los halos de inhibición no específica del crecimiento de *Sarcina lutea* observados son de contornos poco claros; en realidad se trata de un enrareci-

miento del crecimiento, mayor en las zonas más próximas a la circunferencia externa de contacto del cilindro con el agar. Por el contrario, los halos producidos por los antibióticos presentan límites perfectamente definidos y dentro de estos límites no existe crecimiento en absoluto. A medida que aumenta el tiempo de incubación, los halos no específicos tienden a desaparecer por crecimiento del germen, lo que no sucede con los halos producidos por los antibióticos que permanecen completamente nítidos.

La aparición de halos de inhibición del crecimiento no específicos se ha observado por distintos investigadores, principalmente con extractos concentrados de músculo, aunque las causas posibles han sido únicamente apuntadas.

HANSEN *et al.* (1963), citado por PEDERSEN (1965), consideran como probable causa de la aparición de halos de inhibición no específica al ácido láctico presente en el músculo. PEDERSEN (1965), utilizando un método de extracción con oxalato-EDTA-acetona y concentración posterior, encuentra frecuentemente halos de inhibición no específica del crecimiento de *Sarcina lutea* principalmente con muestras de músculo de pollo, y señala como posibles causas al ácido láctico presente en los tejidos. LOFTSGAARD *et al.* (1967) comparan diferentes métodos de extracción de la penicilina de tejidos porcinos y los relacionan con la aparición de halos de inhibición no específica. Para evitar la producción de estos halos aconsejan utilizar como solvente extractante acetonitrilo para hígado y riñón, y acetonitrilo tamponado para músculo, además de resuspender los residuos de la evaporación en tampón fosfato. Cuando utilizan como solvente extractante oxalato-EDTA-acetona encuentran principalmente halos no específicos con muestras de músculo a las 24 horas *post mortem*. Con acetona-agua destilada, la frecuencia de halos no específicos es mayor, por lo que estos autores concluyen que el efecto inhibidor del crecimiento puede deberse a sustancias solubles en el agua.

Además del pH (tanto del tejido inicial como del residuo que se ensaya) y del contenido en ácido láctico del músculo, se han sugerido otras causas posibles como responsables de la producción de halos de inhibición no específica, entre las que destaca el efecto antimicrobiano de los residuos de los líquidos utilizados para la extracción y la presencia en los tejidos y en los fluidos orgánicos de sustancias bacteriostáticas. SKARNES y WATSON (1957) han revisado los factores antimicrobianos presentes en los tejidos y en los fluidos normales. Menos importancia tendrían la limpieza no adecuada del material contaminado con antibióticos u otros antimicrobianos, seguida de esterilización insuficiente (LOFTSGAARD *et al.* 1968), y la presencia en los tejidos de antibióticos sintetizados por la flora intestinal.

En nuestra experiencia, una posible causa de aparición de halos no específicos, en algunos casos, puede ser el líquido que, en mayor o menor cantidad, cubre muchas veces la superficie de agar próxima a la circunferen-

cia externa de contacto del cilindro con el agar. Debido a la sensibilidad de *Sarcina lutea* al oxígeno, el germen no crece o lo hace sólo parcialmente en la zona cubierta por el mencionado líquido. SCHLIER (1972), considera como un factor importante en la presentación de halos de inhibición no específica la sensibilidad de *Sarcina lutea* a la relativa falta de oxígeno.

TERPLAN *et al.* (1973) han tratado de diferenciar las sustancias difusibles inhibidoras del crecimiento microbiano presentes en los tejidos animales y en los alimentos de origen animal (por ejemplo, antibióticos) de las sustancias no difusibles con acción inhibidora, mediante experimentos de diálisis.

En el presente capítulo de esta tesis, nos proponemos aportar algunos datos al conocimiento de la influencia de los dos factores considerados como más importantes, el pH (tanto del músculo como del residuo de evaporación que se ensaya) y el contenido en ácido láctico del músculo de pollo, en la aparición de halos de inhibición no específica del crecimiento de *Sarcina lutea*.

## MATERIAL Y METODOS

**Muestras.** Se utilizaron pollos broiler de unos 20 días en el momento de iniciar la alimentación con el pienso exento de antibióticos. Los animales recibieron este pienso *ad libitum* durante tres semanas al menos. El pienso utilizado correspondía a una fórmula para broilers (se da esta fórmula en otra parte de esta tesis).

Inmediatamente después del sacrificio se tomaban, lo más rápidamente posible, tres muestras de los músculos de la pechuga. Una de ellas, la correspondiente a la hora cero, se ensayaba inmediatamente. Las otras dos se conservaban en refrigeración a 4-5°C hasta el momento de su ensayo (horas 4 y 24). En cada muestra se determinaba simultáneamente el pH y el contenido en ácido láctico, a la vez que se ensayaba su capacidad de producción de halos de inhibición no específica.

**Medida del pH.** Se llevó a cabo mediante pHmetro, previa maceración durante unos diez minutos de un triturado muscular en agua destilada, en la proporción 1 : 1 (ply).

**Determinación del contenido en ácido láctico del músculo.** El ácido láctico se determinó por la técnica enzimática de HONORST (1963).

Las medidas espectrofotométricas se hicieron en un espectrofotómetro de doble haz Beckman DBGT, provisto de registrador automático con expansor de escala, conectado a un ultrathermostato Colora modelo N. Se trabajó a una longitud de onda de 366 milímicras y el paso de luz de las cubetas, de 3 ml de capacidad, fue de 1 cm.

**Reactivos.** Hidrazina-glicina-buffer (hidrazina 0.4 M, glicina 1 M, pH 9.5). Se suspendieron 7.5 gr de glicina, 5.2 gr de sulfato de hidrazina y 0.2 gr de

EDTA-Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O en agua bidestilada. Se añadieron 51 ml de NaOH 2N y se diluyó hasta 100 ml con agua bidestilada.

DPN. Se disolvieron 40 mg en 1 ml de agua bidestilada.

Lactato deshidrogenasa (L-Lactate: NAD oxidoreductase EC 1.1.1.27, Boehringer).

Solución de ácido perclórico. Se diluyeron 7,7 ml de ácido perclórico hasta 150 ml con agua bidestilada.

Solución de CO<sub>3</sub>K<sub>2</sub> (5 M). Se disolvieron 69 gr de CO<sub>3</sub>K<sub>2</sub> en agua bidestilada completando hasta 100 ml.

Preparación del extracto desproteinizado. Se añadieron 7,25 ml de la solución de ácido perclórico a 1 gr de tejido en un homogeneizador de vidrio. Se mezcló bien la suspensión, cuidando de recoger las partículas adheridas a las paredes, y se centrifugó el contenido a un mínimo de 3.000 g durante 5 minutos. Se recogió el sobrenadante en un vaso de precipitado con camisa de hielo. Se tomó 1 ml y se diluyó en 9 ml de agua bidestilada. Se neutralizó con la solución de CO<sub>3</sub>K<sub>2</sub> hasta un pH, determinado con pHmetro, de 3,5. Una vez que hubo cesado la producción de burbujas de CO<sub>2</sub> y precipitado el perclorato, se tomaron los 0,4 ml necesarios para el ensayo.

Técnica. El contenido de la cubeta «muestra» fue:

0,9 ml, hidrazina-glicina-buffer

0,1 ml, solución de DPN

0,6 ml, agua bidestilada

0,4 ml, extracto desproteinizado.

Y el de la cubeta «control»:

0,9 ml, hidrazina-glicina-buffer

0,1 ml, solución de DPN

1,0 ml, agua bidestilada.

Se mezclaron bien los contenidos y se esperó hasta alcanzar la temperatura de 25°C, leyéndose entonces la densidad óptica (E<sub>1</sub>) dos veces con un intervalo de tres minutos. Acto seguido, se mezclaron en la cubeta experimental 0,02 ml de la suspensión enzimática.

Al completarse la reacción (10-20 minutos después de la adición del enzima) se leyó la densidad óptica (E<sub>2</sub>) dos veces con un intervalo de tres minutos.

Los cálculos se efectuaron según la fórmula:

$$\frac{\Delta E \times \text{dil.}}{z \times d} = \mu \text{ moles L-(+)-lactato/gr tejido, donde,}$$

ΔE = diferencia entre las densidades ópticas (E<sub>2</sub>-E<sub>1</sub>).

dil. = dilución total de la muestra.

z = coeficiente de extinción (cm<sup>2</sup>/μ mol).

d = paso de luz (cm).

**Extracción, concentración y ensayo de las muestras.** Para estudiar la posible producción de halos de inhibición no específica, las muestras se sometieron a un proceso de extracción con una mezcla de oxalato-EDTA-acetona y concentración hasta desecación total con ayuda de vacío según la técnica de PEDERSEN (1965), ensayándose los residuos obtenidos, previamente resuspendidos en 2 ml de un tampón fosfato bisódico-monopotásico de pH 7 (113 gr de PO<sub>4</sub>HNa<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O y 18 gr de PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>K, disueltos en 1 litro de agua destilada), por el método biológico de difusión en placas de agar inoculadas con *Sarcina lutea* ATCC 9341 (KRAMER *et al.*, 1968). Se modificaron las cantidades de agar base y agar siembra (21 y 4,5 ml, respectivamente) en placas de Petri de fondo plano, de un diámetro interno de unos 10,3 cm. En cada placa de Petri se colocaron cuatro cilindros de acero inoxidable de un diámetro externo de 8 mm, interno de 6 mm y de una altura de 10 mm.

La suspensión bacteriana se preparó según la técnica de GROVE y RANDALL (1955), modificada del modo que se indica en el capítulo III. En la estandarización del inóculo se utilizó un colorímetro «BAUCH & LOMB» modelo Spectronic 20 y la lectura se realizó en tubo redondo a 650 milímetros, ajustando la transmitancia al 10% frente a un blanco de «Antibiotic Medium 3» (DIFCO). El inóculo estandarizado se añadió al agar siembra a razón de 0,4 ml por 100 ml de medio.

Las placas, una vez sembradas y colocados los cilindros con la muestra a ensayar, se mantenían a 4-5°C durante 90-120 minutos, incubándose después a 32°C durante 16-18 horas. Como agar base se utilizó el «Antibiotic Medium 1» y como agar siembra el «Antibiotic Medium 4» (ambos DIFCO).

**Limpieza y esterilización del material.** Los cilindros se limpiaron y esterilizaron escrupulosamente en la forma descrita por KAVANAGH (1963). Con el resto del material se tomaron las precauciones convenientes para evitar la posible presencia de sustancias antibacterianas.

## RESULTADOS

Con el fin de relacionar la magnitud de los halos de inhibición con el pH del músculo y su contenido real en ácido láctico, así como para comprobar la posible influencia de los procesos *post-mortem* del músculo sobre la aparición de estos halos se llevó a cabo un experimento con diez animales, en los que a los tiempos 0, 4 y 24 horas después de la muerte se determinaron en los músculos de la pechuga el pH y el contenido en ácido láctico, a la vez que se ensayó la producción de halos de inhibición no específica con muestras de los referidos músculos.

En la Tabla XXII se expresan los pHs y el contenido en ácido láctico de los diez animales estudiados a los distintos tiempos, junto con los diámetros de los halos de inhibición producidos. Como puede verse, los valores de pH

descienden a medida que aumenta el tiempo después del sacrificio, siendo mínimos a las 24 horas. Por el contrario, las cantidades de ácido láctico presentes en el músculo van aumentando, siendo máximas a las 24 horas. A las 0 horas no fue significativa la aparición de halos, ya que en ningún caso fueron éstos cuantitativamente medibles. A las 4 horas, se observaron halos medibles con la mayoría de las muestras, y a las 24 horas la presencia de halos fue general, siendo máximo su diámetro.

**TABLA XXII**  
Relación entre el pH y el contenido en ácido láctico del músculo, y la aparición de los halos no específicos de inhibición del crecimiento de *Sarcina lutea*

Pollo nº	Tiempo después del sacrificio (horas)								
	0		4		24				
	pH	Ac. láctico (mg/gr músc.)	Halo*	pH	Ac. láctico (mg/gr músc.)	Halo*	pH	Ac. láctico (mg/gr músc.)	Halo*
1	6,1	9,89	+	5,8	10,11	9,5	5,7	10,99	9,9
2	6,2	7,08	+	5,85	8,52	9,6	5,7	9,19	9,9
3	6,25	6,95	+	5,8	10,55	9,6	5,65	11,57	10,7
4	6,1	9,5	+	5,75	9,66	9,47	5,65	10,89	10,8
5	6,35	7,48	+	5,8	10,1	9,32	5,65	11,15	10,1
6	6,15	9,2	-	5,7	9,95	+	5,6	11,26	10,02
7	6,3	9,22	-	5,8	9,63	+	5,6	11,26	9,00
8	6,3	7,56	+	5,75	10,32	10,05	5,6	10,66	10,47
9	5,9	10,34	+	5,65	10,56	10,00	5,6	10,53	10,55
10	6,25	8,94	-	5,75	10,03	9,05	5,7	10,84	9,9

\* Las cifras corresponden a la media de los cuatro cilindros de cada placa. Diámetro externo de los cilindros 8 mm.

+= Ligeramente positivo, no medible.

- = Negativo, ausencia de halo.

Los resultados anteriores permiten, a primera vista, asociar la aparición de halos de inhibición no específica con un pH bajo y un contenido elevado de ácido láctico del músculo. Con el fin de comprobar la influencia «per se» del pH en la aparición de halos de inhibición no específica del crecimiento de *Sarcina lutea*, se llevaron a cabo dos experimentos. En el primero de ellos, se ensayó el efecto de un tampón fosfato hipotásico-monopotásico 0,4 M a diferentes valores de pH (5,3 a 7,1). Como puede verse en la Tabla XXIII, ninguno de los pHs ensayados determinó la aparición de halos de inhibición.

En el segundo experimento, se utilizó un tampón fosfato bisódico-moniopotásico (PEDERSEN, 1965) de molaridad aparente 0,71, a valores de pH entre 5 y 7. En la Tabla XXIV se señalan los resultados obtenidos. Únicamente a pH 5 se observaron halos de inhibición.

**TABLA XXIII**  
Influencia del pH (1) en la aparición de halos no específicos

Halos de inhibición (2) (mm)	pH						
	5,3	5,6	5,9	6,2	6,5	6,8	7,1
-	-	-	-	-	-	-	-

(1) Tampón fosfato hipotásico-monopotásico 0,4 M.

(2) Diámetro externo de los cilindros: 8 mm. Por cada pH se hicieron cuatro determinaciones; los valores señalados corresponden a la media.

- = Ausencia de halo de inhibición.

A la vista del efecto negativo del pH sobre la aparición de halos no específicos de inhibición del crecimiento de *Sarcina lutea*, se ensayó la acción del ácido láctico. Para ello, se utilizaron seis concentraciones distintas de este ácido, cada una a tres diferentes pHs, como se indica en la Tabla XXV. Dos de estas concentraciones (1 y 40 mg/ml) son extremas por defecto y por exceso, respectivamente, no esperables en el músculo de pollo. Las otras cuatro (10, 12, 16 y 20 mg/ml) pueden considerarse como más próximas al rango fisiológico normal en el músculo de pollo *post mortem*. Los tres pHs ensayados cubren también la variación normal de la acidez del músculo durante el período de *rigor mortis*. En la Tabla XXV se expresan los resultados obtenidos.

No se observaron halos de inhibición a las concentraciones de 1, 10, 12 y 16 mg/ml. A la concentración de 20 mg/ml, aparecen ligeros halos y éstos fueron mayores a la concentración de 40 mg/ml.

Al objeto de conocer la posible influencia de los residuos de los líquidos de extracción (oxalato-EDTA-acetona) en la aparición de halos no específicos, se ensayaron estos residuos disueltos en 2 ml de tampón fosfato bisódico-moniopotásico 0,7 M, de tal modo que los pHs finales fueron de 5, 5,5, 6, 6,5 y 7 (igual tampón e iguales pHs que en el experimento de la Tabla XXIV). Como puede verse en la Tabla XXVI, únicamente se apreciaron halos de inhibición a pH 5.

**TABLA XXIV**  
Influencia del pH (1) en la aparición de halos no específicos

Halos de inhibición (2) (mm)	pH				
	5	5,5	6	6,5	7
10,05	-	-	-	-	-

(1) Tampón bisódico-moniopotásico, molaridad aparente 0,71.

(2) Diámetro externo de los cilindros: 8 mm. Por cada pH se hicieron cuatro determinaciones; los valores señalados corresponden a la media.

- = Ausencia de halo de inhibición.

TABLA XXV

Efecto de distintas concentraciones de ácido láctico, a diferentes pHs (1), sobre la aparición de halos no específicos

pH	Diámetro en mm de los halos de inhibición producidos (2) a las distintas concentraciones de ácido láctico (mg/ml)						
	1	10	12	16	20	40	Control
6,5	-	-	-	-	9,7	10,6	-
6,0	-	-	-	-	9,1	10,1	-
5,5	-	-	-	-	+	9,4	-

(1) Tampón fosfato hipotáxico-monopotáxico 0,5 M.

(2) Diámetro externo de los cilindros 8 mm. Por cada concentración de ácido láctico se hicieron cuatro determinaciones; los valores señalados corresponden a la media.

+ = Ligeramente positivo, no medible.

- = Ausencia de halo de inhibición.

Otro de los factores que podría influir en la aparición de halos de inhibición no específicos es el pH del residuo de evaporación resuspendido en tampón (muestra que se ensaya), por lo que se consideró conveniente estudiar la influencia de dicho factor.

El experimento se llevó a cabo ensayando los residuos de evaporación de músculo de pollo (24 horas *post mortem*) resuspendidos en 2 ml de tampón fosfato bisódico-monopotáxico 0,7 M, siendo los pHs finales de 5, 5,5, 6, 6,5 y 7. Los resultados obtenidos aparecen en la Tabla XXVII, en la que puede observarse que a pHs 5 y 5,5 se produjeron halos de inhibición considerables, mientras que a pHs 6 y 6,5 los halos apenas eran apreciables. A pH 7 no aparecieron halos.

TABLA XXVI

Influencia de los residuos de los líquidos de extracción, disueltos en tampón fosfato (1) de diferentes pHs, en la aparición de halos no específicos

Halos de inhibición (mm) (2)	pH				
	5	5,5	6	6,5	7
10,2	-	-	-	-	-

(1) Tampón fosfato bisódico-monopotáxico de molaridad aparente 0,71.

(2) Diámetro externo de los cilindros 8 mm. Por cada pH se hicieron cuatro determinaciones; los valores señalados corresponden a la media.

- = Ausencia de halo de inhibición.

TABLA XXVII

Influencia del pH final del residuo de evaporación de músculo de pollo suspendido en tampón (1) en la aparición de halos no específicos

Halos de inhibición (mm) (2)	pH final				
	5	5,5	6	6,5	7
12,1	10,6	+	+	-	-

(1) Tampón fosfato bisódico-monopotáxico de molaridad aparente 0,71.

(2) Diámetro externo de los cilindros 8 mm. Por cada pH se hicieron cuatro determinaciones; los valores señalados corresponden a la media.

+ = Ligeramente positivo, no medible.

- = Ausencia de halo de inhibición.

## DISCUSION

Los valores de pH del músculo de pollo a las 0, 4 y 24 horas *post mortem* señalados en la Tabla XXII son del mismo orden que los obtenidos por otros autores (LOPEZ LORENZO *et al.*, 1964; DE FREMERY y LINEWEAVER, 1964; SAYRE, 1970; LEÓN CRESPO, 1973). Igual puede decirse de los contenidos en ácido láctico (VAN DEN BERG, 1964; LEÓN CRESPO, 1973). Como puede verse en la mencionada Tabla XXII, y cabía esperar, existe una relación tiempo *post mortem*-contenido en ácido láctico-pH, en el sentido de que a tiempos *post mortem* mayores corresponden pHs más bajos y contenidos de ácido láctico más elevados. Pero lo que es importante en el sentido de este trabajo es que existe también una relación entre tiempo *post mortem*-pH-contenido de ácido láctico, por un lado, y diámetro de los halos de inhibición, por otro, correspondiendo a tiempos *post mortem* mayores, a pHs más ácidos y a contenidos de ácido láctico mayores, halos de inhibición también mayores. En la gráfica de la Fig. 19 se representa la evolución del pH y del contenido en ácido láctico, así como el diámetro de los halos no específicos producidos en función del tiempo *post mortem*. Los puntos de esta gráfica corresponden a la media de los valores expresados en la Tabla XXII.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por LOFTSGAARD *et al.* (1967) con músculo de cerdo en un estudio de la influencia del pH y del contenido en ácido láctico del músculo de dos cerdos sobre la aparición de halos de inhibición no específica del crecimiento de *Sarcina lutea*. Utilizaron como solvente extractante acetonitrilo y el residuo de la evaporación lo resuspendieron en 2 ml de un tampón fosfato de pH 6. Aún sin dar valores concretos, diversos autores (HANSEN *et al.*, 1963, citado por PEDERSEN, 1965) concluyen de su experiencia en la determinación de residuos de antibióticos en tejidos animales que la frecuencia de presentación de halos de inhibición no específica es mayor con muestras de músculo y cuando estas muestras tienen un pH bajo y, consiguientemente, un contenido elevado de ácido láctico.

Desde el punto de vista práctico es, pues, aconsejable para reducir la

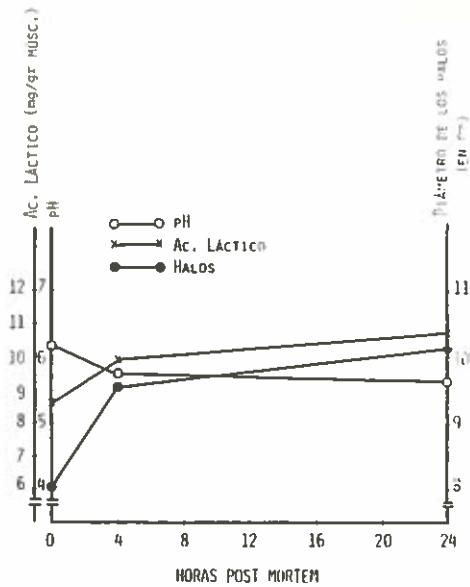


Fig. 19.-Evolución del pH y del contenido en ácido láctico del músculo de pollo (pechuga) post mortem y diámetro de los halos no específicos producidos. (Los puntos de esta gráfica corresponden a la media de los valores expresados en la Tabla XXII).

presentación de estos halos, que las muestras para la determinación de residuos de antibióticos por técnicas de extracción-concentración se tomen inmediatamente después del sacrificio de los animales y se ensayan a continuación.

De los resultados de la Tabla XXII puede deducirse que siendo nulos o poco significativos los halos de inhibición producidos al tiempo cero después del sacrificio y aumentando su diámetro a medida que aumenta el tiempo *post mortem*, deben ser las modificaciones que sufre el músculo después de la muerte las determinantes de la producción de halos no específicos de inhibición. Siendo el descenso del pH y el aumento en el contenido en ácido láctico del músculo las modificaciones quizás más importantes en el músculo *post mortem*, parece lógico asociar la presentación de halos con estos factores. Sin embargo, los resultados obtenidos en los experimentos de influencia del pH (véanse Tablas XXIII y XXIV) en la aparición de estos halos indica que este factor «per se», en el rango fisiológico que es normal en el músculo de pollo *post mortem*, no tiene efecto inhibidor del crecimiento de *Sarcina lutea*.

Igual puede concluirse del experimento sobre influencia de distintas concentraciones de ácido láctico a diferentes pHs (Tabla XXV). Siendo de 10,83 mg/gr la cifra media de contenido de ácido láctico que hemos encontrado en el músculo de pollo a las 24 horas *post mortem* y de 5,64 el valor del pH, de los resultados del mencionado experimento puede deducirse que el ácido láctico

«per se», a las concentraciones y pHs que son normales en el músculo de pollo *post mortem*, no tiene efecto inhibidor apreciable sobre el crecimiento de *Sarcina lutea*.

Otro de los factores que se ha investigado ha sido los residuos de los líquidos de extracción (oxalato-EDTA-acetona). De los resultados señalados en la Tabla XXVI, que indican la presentación de halos de inhibición únicamente a pH 5, cabe deducir la ausencia de efecto inhibidor por parte de estos residuos, ya que la acción inhibidora observada a pH 5 debe relacionarse con el propio pH y no con los residuos de los extractantes, puesto que en el experimento de la Tabla XXIV se aprecia una inhibición parecida al mismo pH. La ausencia de acción inhibidora de los extractantes utilizados fue demostrada ya por PEDERSEN (1965), aunque LOFTSGAARD *et al.* (1967) encontraron cierto efecto inhibidor de los residuos de estos mismos extractantes. Posiblemente, este efecto no era debido a los mencionados residuos, sino al pH (6) y a la baja molaridad del tampón utilizado para redisolverlos.

La importancia del pH del residuo de evaporación resuspendido en tampón (muestra que se ensaya) puede apreciarse a la vista de los resultados de la Tabla XXVII. De estos resultados puede concluirse que el pH del residuo que se ensaya es un factor decisivo en la aparición de halos de inhibición no específicos, y que para evitar el que estos halos aparezcan es preciso recoger el residuo de evaporación en suficiente cantidad de un tampón de pH y molaridad adecuados, de tal forma que el pH final resulte próximo a 7. PEDERSEN (1965), utilizando el mismo solvente extractante (oxalato-EDTA-acetona) y ensayando el residuo final de evaporación de extractos musculares de pollo sin diluir en solución tampón encontró diferencias ostensibles entre muestras no neutralizadas y neutralizadas con una solución N de NaOH, en el sentido de que las muestras neutralizadas no determinaban la aparición de halos de inhibición no específica. Otros autores (HANSEN *et al.*, 1963, citado por PEDERSEN, 1965; LOFTSGAARD *et al.*, 1967) han comprobado la eficacia de la neutralización de las muestras de tejido antes de someterlas a los procesos de extracción y evaporación, como medio de evitar la presentación de halos no específicos.

Si se comparan los resultados de la Tabla XXVII (extractos de músculo de pollo a distintos pHs) con los de la Tabla XXIV (el mismo tampón e iguales pHs, pero sin extracto muscular) se observará que los halos de inhibición producidos a iguales pHs son mayores en el primer caso, de lo que puede deducirse que el mayor efecto inhibidor del extracto muscular se debe a las sustancias procedentes del músculo y presentes en el extracto (descartada la acción de los residuos de los líquidos extractantes).

En los experimentos que se describen en los capítulos anteriores de esta tesis la importancia del pH del residuo que se ensaya debe ser nula, ya que, habiendo empleado un tampón fosfato de pH 7 y molaridad alta, el pH final del

residuo resuspendido en 2 ml de tampón está próximo a la neutralidad. Experimentos realizados para conocer este extremo con músculo de pollo a las 24 horas *post mortem*, indicaron que el pH del residuo resuspendido era de 6,9-7 en todos los casos. Otra circunstancia que con toda seguridad ha minimizado la presentación de halos no específicos en los experimentos descritos en otros capítulos de esta tesis es el hecho de haber tomado siempre las muestras a la hora cero después del sacrificio y haberlas ensayado a continuación y sólo en contadas ocasiones después de un periodo de congelación en todos los casos inferior a una semana. Además, nunca se dio como válido un experimento en el que los controles diesen halos de inhibición no específicos.

## CONCLUSIONES

1. Se propone una modificación del método microbiológico de determinación de residuos de penicilina en tejidos animales de KRAMER y col. (1968). La sensibilidad de este método, con la modificación introducida, es de 0,0625 UI de penicilina por gramo de tejido.

Para muestras de tejidos en los que se espera una mínima cuantía de los residuos de penicilina presentes, se propone también una modificación de la técnica de PEDERSEN (1965) de preparación por extracción y posterior concentración de las muestras para su ensayo. Con esta modificación, la sensibilidad alcanzada es de 0,00250 UI de penicilina por gramo de tejido.

2. La cromatografía en lámina fina de silice gel G, utilizando como fase móvil n-butanol-metanol-ácido acético-agua en la proporción de 37,5 : 25 : 7,5 : 16 y como revelador reactivo cloroplatínico, se ha mostrado eficaz para la separación e identificación de mezclas de penicilina y tetracielinas. Sin embargo, esta técnica no se considera adecuada para la determinación de residuos de penicilina en tejidos animales por su escasa sensibilidad. Combinada con la extracción y concentración previa de las muestras, permite detectar únicamente cantidades de penicilina iguales o superiores a 0,4 UI/gr de tejido.

3. Despues de la administración con el pienso a pollos de penicilina G benzatina a niveles de 10, 50, 100 y 500 ppm, tanto la cuantía como el tiempo de permanencia de los residuos en músculo, hígado y riñón, son, como cabe esperar, mayores a los niveles más altos. El hígado es el órgano donde se encuentra la máxima concentración y el riñón donde se registra la permanencia más prolongada. En el músculo, la concentración del antibiótico y su permanencia son inferiores. Al nivel de 500 ppm, se detectaron residuos del antibiótico hasta los cinco días después de haber cesado la administración. Al nivel de 10 ppm, hasta los dos días.

4. Despues de la administración a pollos por vía intramuscular de dosis terapéuticas de penicilina G procaina en solución acuosa, la concentración de

residuos es inicialmente mayor en el riñón que en el hígado y en el músculo. La persistencia de estos residuos es semejante en riñón e hígado. El músculo siempre registra concentraciones y persistencias menores. A las 48 horas después de la inoculación, los residuos detectados en los tejidos mencionados son inferiores a 0,625 UI/gr.

5. Durante la conservación de la carne de pollo en congelación, los residuos de penicilina G procaina se mantienen muy estables. En refrigeración, estos residuos experimentan una inactivación poco significativa.

Los residuos de este antibiótico en músculo de pollo son considerablemente resistentes al tratamiento térmico. Cuando son elevados, son necesarios 90 minutos a 100°C para inactivarlos completamente. La inactivación por calentamiento de la penicilina G procaina no tiene lugar del mismo modo cuando se encuentra en forma de disolución pura en tampón fosfato que cuando está presente en el músculo. En este último substrato los residuos de este antibiótico son menos estables. La inactivación depende también del pH del medio. Los valores de pH a los que el antibiótico se muestra más estable están comprendidos entre 5,9 y 6,5.

6. En la determinación de residuos de penicilina a partir de extractos concentrados de músculo, se ha observado con frecuencia la aparición de halos o zonas de inhibición no específica del crecimiento de *Sarcina lutea*. La frecuencia de estos halos y su diámetro son mayores a medida que aumenta el tiempo *post mortem*. El pH «per se» no es el factor determinante de la producción de estos halos, así como tampoco el ácido láctico, ni la acción combinada de ambos factores. Carecen también de efecto en este sentido los residuos de los solventes utilizados para la extracción (oxalato-EDTA-acetona). La neutralización de los residuos de evaporación antes de su ensayo con un tampón adecuado reduce la presentación de halos no específicos.

## RESUMEN

En esta tesis se ha determinado la cuantía y la permanencia de los residuos de penicilina presentes en músculo y vísceras de pollo, consecuentes a la administración por vía oral con el pienso y por vía intramuscular de diferentes dosis del referido antibiótico.

Se ha estudiado también la estabilidad de los residuos frente a la refrigeración, a la congelación y al tratamiento térmico.

Finalmente, se han investigado las posibles causas de la presentación de halos o zonas de inhibición no específica del crecimiento de *Sarcina lutea*.

## RÉSUMÉ

Dans cette thèse on a déterminé la teneur et la permanence des résidus de pénicilline présents dans le muscle, le foie et le rein des poulets, après

l'administration intramusculaire et dans les aliments de doses différentes du dit antibiotique.

On a étudié aussi la stabilité des résidus face à la réfrigération, à la congélation et au traitement thermique.

Finalement, on a recherché les causes possibles de la présentation des zones d'inhibition non spécifique de la croissance de *Sarcina lutea*.

## SUMMARY

The amount and prevalence of penicillin residues in muscle and organs of chicken after intramuscular and oral administration with feed of different dosis of this antibiotic has been investigated.

The stability of residues upon refrigeration, freezing and thermal treatment has also been studied.

Finally, the work here described deals as well with the possible causes of the occurrence of non specific growth inhibition of *Sarcina lutea* by muscle extracts.

## AGRADECIMIENTOS

El autor agradece profundamente al Prof. B. Moreno García su constante dedicación como director de esta tesis.

Igualmente desea expresar su gratitud al Prof. V. Díez Fernández y a don Francisco J. Pérez-Pinto por su ayuda material en muchas ocasiones.

Da las gracias también a los Profs. doctor J. Burgos González y doctor F. J. Sala Trepot y a todo el personal del Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de León por la asistencia de todo tipo recibida.

Una mención especial desea hacer de las facilidades recibidas de Antibióticos, S. A., Fábrica de León.

Finalmente, agradece a la señorita Pilar Fernández su paciente labor en la escritura de esta tesis.

Para la realización de este trabajo, el autor fue beneficiario de una Beca de Iniciación a la Investigación durante los cursos 1971-72, 1972-73 y 1973-74.

## BIBLIOGRAFIA

- ABRAHAM, E. P., CHAIN, E., FLETCHER, C. M., FLOREY, H. W., GARDNER, A. D., HEATLEY, N. G. y JENNINGS, M. A. (1941).-Further observations on penicillin. *Lancet*, **2**, 177.  
AKIBA, T., TOKOMA, K., ISHIKI, Y., KIMURA, S. y FUKUSHIMA, T. (1960). Citados por JKES, T. H. (1972).-Public health significance of feeding low levels of antibiotics to animals. *Adv. in Applied Microbiology*, (1972).  
ANDERSON, E. S. (1967).-Facteurs de transfert et résistance aux antibiotiques chez les entérobactéries. *Annales de l'Institute Pasteur*, **112**, 547-563.  
ANDERSON, E. A. (1968).-Drug resistance in *Salmonella typhimurium* and its implications. *Brit. med. J.*, **3**, 333-339.  
ANDERSON, E. S. y DAVIA, N. (1965).-Resistance to penicillins and its transfer in enterobacteriaceae. *Lancet*, **1**, 407-409.  
ANÓNIMO (1974).-Allemagne Federale: Nouvelles dispositions en matière d'inspection des viandes et produit carnes-renforcement des contrôles vétérinaires et recherche des oestrogènes, des antibiotiques, etc. RTVA, n.º 102, pág. 630.  
AYRES, J. C. (1973).-Antibiotic, inhibitory and toxic metabolites elaborated by microorganisms in foods. *Acta Alimentaria Academica Scientiarum Hungaricarum*, **2**, (3), 285-302.

- BALDINI, P., FRATE, G., PEZZANI, G. y AMBANELLI, G. (1973).-Ricerca e determinazione degli antibiotici nelle carni e nei prodotti carnei. I. Ricerche preliminari. *Industria Conserve*, **3**, 135-139.  
BARNUM, D. A. (1973).-Antibiotic Feeding of farm animals and resistance factors in bacteria. *Can. Inst. Food. Sci. Technol. J.*, **6**, 2, 68-79.  
BAROUTCHIEVA, M. «1969». -Antibiotic residues in poultry. Proceedings V Symposium of the World Association of veterinary food hygienists. Opatija, Yugoslavia.  
BERKOWITZ, M., GLASER, J. y JOHNSTONE, D. (1953).-Incidence of allergy to drugs in pediatric. *Ann. Allergy*, **11**, 561.  
BETHKE, H. H. y POSCHNER, J. (1972).-Bericht über antibiotika; testbefunde bei 33000 schlachttieren. *Schlacht- und Viehhof-Zeitung*, **72** (6), 212-214.  
BETINA, V. (1973).-Bioautography in paper and this. *Journal of Chromatography*, **78**, 41-51.  
BOISSIER, J. R. y DUMONT, C. (1961).-Etude de l'action toxique des antibiotiques chez l'animal. *Thérapie*, **VII**, 896-933.  
BORRIE, P. y BARRET, J. (1961).-Dermatitis caused by penicillin in bulked milk supplies. *Bull. Med. Journ.*, **2**, 1,267.  
CANADA DEPARTMENT OF AGRICULTURE (1971).-Compendium of medicating ingredient brochure. Plant Products Division, Canadá Dept. Agric.  
COUGH, J. R. y ATKINSON, R. L. (1950).-Vitamina B<sub>12</sub> APF concentrates and antibiotics in turkey rations. *Feedstuffs*, **22** (30), 57.  
COVER, M. S. y LUDWIG, D. R. (1957).-Antibiotic levels in the serum and tissues of chickens following various therapeutic dosages. *Poultry Science*, **36**, 993-999.  
CURRAN, H. R. y EVANS, F. R. (1945).-Penicillin as a sporicidal agent. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **58**, 262.  
CURRAN, H. R. y EVANS, F. R. (1946).-The activity of penicillin in relation to bacterial spores and the preservation of milk. *J. Bact.*, **52**, 89.  
CURRAN, H. R. y EVANS, F. R. (1946a).-The activity of streptomycin in relation to bacterial spores and the preservation of milk. *J. Bact.*, **52**, 142.  
CHAIN, E., FLOREY, H. W., GARDNER, A. D., HEATLEY, N. G., JENNINGS, M. A., ORR-EWING, J. y SANDER, A. G. (1940).-Penicillin as a chemotherapeutic agent. *Lancet*, **2**, 226.  
DAUZIER, L. (1970).-Catalogue français des additifs autorisés en alimentation animale. Dunod, París.  
DEFRENERY, D. y LINEWEAVER, H. (1964).-Early post-mortem chemical and tenderness changes in poultry. First. Intern. Congress of Food Sci. and Technol.  
ERSKINE, D. (1958).-Dermatitis caused by penicillin in milk. *The Lancet*, **1**, 431.  
FAO/OMS (1969).-Specifications for identity and purity of some antibiotics. *FAO Nutrition Meetings Report Series*, n.º 45A, WHO/Food Add./69.34.  
FAO/OMS (1970).-Normas de identidad y pureza para los aditivos alimentarios y evaluación de su toxicidad: diversos antibióticos. Duodécimo informe del Comité Mixto FAO/OMS de expertos en Aditivos Alimentarios. OMS, Ser. Inf. Téc., n.º 430.  
F. D. A. TASK FORCE (1972).-Vease F. D. A. task force report on the use of antibiotics in animal feeds (1972).  
F. D. A. TASK FORCE REPORT ON THE USE OF ANTIBIOTICS IN ANIMAL FEEDS (1972).-U. S. Department of Health Education and Welfare, P. H. S., Food and Drug Administration.  
FEDERAL REGISTER (1972).-Code of federal regulations Title 21: Food and drugs, Parts 130 to 146c. Published by the Federal Register U.S.A.  
FEDERAL REGISTER (1973).-Title 21: Foods and drugs, Part 135: New animal drugs, **38**, 76, April 20, 9811-9814.  
FEED ADDITIVE COMPENDIUM (1972).-Miller Publishing Co., Minneapolis, Minn.  
FEVRIER, R., VACHEL, J. P. y MICHEL, M. (1955).-Citados por PANTALEÓN, J. (1966).-Problèmes de santé publique posés par l'utilisation des antibiotiques en thérapeutique et nutrition animales. *Riv. Méd. Jér.*, **142**, 743-771.  
FLEMING, A. (1929).-On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Brit. J. Exptl. Path.*, **10**, 226.  
FRERES, D. y BORRIE, G. (1970).-Les résidus de substances auxiliaires et de leurs métabolites dans les denrées alimentaires d'origine animale. *Bull. Tech. Inform. Ministère Agri.*, France, n.º special, aout-sep., 587.  
FRERES, D., VALDEBOUZE, P. y DELORT-LAVAL, J. (1971).-Recherche de résidus à activité antibiotique dans les tissus animaux. II. Enquête sur les viandes du commerce. *Bull. Acad. Vét.*, **44**, 123-134.  
GALESLOOT, Th. E. y HASSING, F. (1962).-Een snelle en gevoelige methode om met papierstrepen penicilline in melk aan te tonen. *Neth. Milk & Dairy J.*, **16**, 89-95.  
GOUNELLE, H. y SZAKVARY, A. (1966).-Antibiotiques et aliments. I. Les accidents allergiques liés aux résidus. *Bull. Acad. Nat. Med.*, **150** (5-6), 76-82.

- GORDON, W. (1956).—Citado por PANTALEÓN, J. (1966).—Problèmes de santé publique posés par l'utilisation des antibiotiques en thérapeutique et nutrition animales. *Rec. Méd. Vét.*, **142**, 743-771.
- GROVE, C. D. y RANDALL, A. W. (1955).—Assay methods of antibiotics. A laboratory manual. Edit. Medical Encyclopedia, Inc., New York.
- HANSEN, J., ROBIN, F. y MADELING, P. (1963).—Citados por PEDERSEN, H. (1965). The use of concentrated extracts from tissues in the determination of penicillin and tetracyclines in slaughtered poultry to which fodders containing antibiotics have been fed. In *Yearbook 1965 Royal Veterinary and Agricultural College*, Copenhagen, Denmark, 33-60.
- HAYS, V. W. (1969).—Biological basis for the use of antibiotics in livestock production. *Proc. of Symposium. The use of drugs in animal feeds*. Pub. 1679, 11-30. National Academy of Science, Washington, D. C.
- HELLBERG, H. (1968).—Separation of penicillins by paper and thin-layer chromatography. *Journal of the A. O. A. C.*, **51** (3), 552-557.
- HERNÁNDEZ, J. E. (1968).—Utilización de antibióticos en la conservación de alimentos. *Alimentaria*, **21**, 5-22.
- HOHORST, H. J. (1963).—L-(+)-Lactate determination with lactic dehydrogenase and DPN. In «Methods of Enzymatic Analysis». Edited by H. V. Bergmeyer, Academic Press, New York, 266.
- HOU, J. P. y POOLE, J. W. (1971).— $\beta$ -lactam antibiotics: their physicochemical properties and biological activities in relation to structure. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **60** (4), 503-532.
- HUBER, W. G. (1970).—The public health hazards associated with the non-medical and animal health usage of antimicrobial drugs. *Pure Appl. Chem.*, **71**, 377-388.
- HUBER, W. G. (1971).—The impact of antibiotic drugs and their residues. *Adv. Vet. Sci. and Comp. Med.*, **15**, 101-132.
- HUBER, W. G., CARLSON, M. S. y LEPPER, M. H. (1969).—Penicillin and antimicrobial residues in domestic animals at slaughter. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, **154** (12), 1.590-1.595.
- INSOF, O., GUTHRIE, T., WILCOX, R. R. y DE WECK, A. L. (1968).—Nature and extent of penicillin side-reactions, with particular reference to fatalities from anaphylactic shock. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, **38**, 159-188.
- JEPSEN, A. y PEDERSEN, H. (1965).—The control of biological residues, especially antibiotics in food of animal origin. *Fourth Symposium of the World Association of Veterinary Food-Hygienists*, Lincoln, Nebraska, U. S. A.
- JOINT COMMITTEE ON THE USE OF ANTIBIOTICS IN ANIMAL HUSBANDRY AND VETERINARY MEDICINE (SWANN REPORT) (1971).—Report, Her Majesty's Stationery Office, London.
- JUKES, T. H. (1972).—Public health significance of feeding low levels of antibiotics to animals. *Adv. in Applied Microbiology*, 1972.
- JUKES, T. H., STOKSTAD, E. L. R., TYLOR, R. R., CUNHA, T. J., EDWARDS, H. M. y MEADOWS, G. B. (1950).—Growth promoting effect of aureomycin on pigs. *Arch. Biochem.*, **26**, 234.
- KAMPELMACHER, E. H., GUINEE, P. A. M. y VAN NOORLE JANSEN, L. M. (1962).—Een eenvoudige onderzoeks methode ter vaststelling van antibiotica bij slachtdieren, die tijdens het leven therapeutisch met antibiotica werden behandeld. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde*, **87**, 16-29.
- KAVALAGI, F. (edit.) (1963).—Analytical microbiology theory and practice. New York.
- KRAMER, J., CARTER, G. G., ARRET, B., WILNER, J., WRIGTH, W. W. y KITSHBAUM, A. (1968).—Antibiotic residues in milk, dairy products and animal tissues: methods, reports, and protocols. National Center for Antibiotic and Insulin Analysis, Food and Drugs Administration, Department of Health, Education and Welfare, Washington, D. C. 20204.
- KRIENKE, W. A. y FOOTS, E. L. (1950).—Effects of storage on penicillin in dairy products. *S. Dairy Sci.*, **33**, 403-404.
- LANGNER, H. J. y TEUFEL, U. (1972).—Chemical and microbiological detection of antibiotics. 1. Thin-layer chromatographic separation of various antibiotics. *Die Fleischwirtschaft*, **52** (12), 1.610-1.614.
- LANGNER, H. J., TEUFEL, U., SIEGERT, M. y FROMMOLD, M. (1973).—Chemical and microbiological detection of antibiotics. 2. Microbiological detection of various antibiotics. *Die Fleischwirtschaft*, **53** (2), 243-249.
- LANGNER, H. J., TEUFEL, U. y BIENEK, H. (1973a).—Chemical and microbiological detection of antibiotics. 3. Problems of and suggestions for the further standardisation of the general inhibitor test. *Die Fleischwirtschaft*, **53** (3), 409-412.
- LANGNER, H. J., TEUFEL, U., SIEGERT, M., FROMMOLD, M. y SEIDLER, H. (1973b).—Determination of antibiotic mixtures in the ultra-micro scale by means of a new method of «short-time, low tension electrophoresis». *Die Fleischwirtschaft*, **53** (4), 557-559.
- LANGNER, H. J. y TEUFEL, U. (1973c).—Chemical and microbiological detection of antibiotics. 4. Quantitative microbiological determination of various antibiotics in the lower critical range with *Bac. subtilis* (ATCC 6633). *Die Fleischwirtschaft*, **53** (8), 1.125-1.128.
- LANGNER, H. J. y TEUFEL, U. (1973d).—Chemical and bacteriological detection of antibiotics. 5. La mise en évidence microbiologique de divers antibiotiques à l'aide de *Bac. subtilis* ATCC 6633 et de *Bac. subtilis* BGA (Firma E. Merck). *Die Fleischwirtschaft*, **53** (12), 1.748-1.750.
- LEÓN CRESPO, F. (1973).—Estudio sobre la composición química, características físicas y cambios post-mortem de los músculos blancos y rojos de las gallinas retiradas de la puesta. *Tesis Doctoral*, Universidad de Córdoba (Facultad de Veterinaria).
- LOFTSGAARD, G., BRISKEY, E. J. y OLSON, C. (1967).—Use of concentrated extracts for microbiological assays of penicillin residues in porcine tissues. *Am. J. Vet. Res.*, **28** (12), 167-172.
- LOFTSGAARD, G., BRISKEY, E. J., NES, N. y OLSON, C. (1968).—Residual penicillin in the tissues of pigs. *Am. J. Vet. Res.*, **29**, 1.613-1.618.
- LÓPEZ LORENZO, P., BURGOS, J. y SANS PÉREZ, B. (1964).—La rigidez cadavérica en las aves. Modificaciones inducidas por el 2-dinitrofenol. *Anales de Bromatología*, **16**, 211.
- LÓPEZ, P. A. (1972).—Estudio de la composición lipídica de esporas y micelio de 48 horas de *Hemispora stellata*. *Tesis Doctoral*, Facultad de Veterinaria, León.
- LUKASS, H. (1971).—Untersuchungen über die auswirkung der erhitzung antibiotischer reinsubstanzen und antibiotika in organ und fleischgruben normalgeschlachteter kalber auf die biologische aktivität in mikrobiologischen heminstofftest. Inaugural-dissertation zur Erlangung des Grades eines doctor medicinae veterinariae durch die Tierärztliche Hochschule Hannover.
- MCGILVERAY, I. J. y STRICKLAND, R. D. (1967).—Detection and separation of penicillins by thin-layer chromatography. *Journal of pharmaceutical sciences*, **56** (1), 77-79.
- MESSERSMITH, R. E., SASS, B., BERGER, H. y GALE, M. S. (1967).—Safety and tissue residue evaluations in swine fed rations containing chlortetracycline, sulfamethazine, and penicillin. *J. A. V. M. A.*, **151**, 719-724.
- MOORE, P. R., EVERSON, A., LUCKEY, T. D., MCCOY, E., ELVENDEN, C. A. y HARR, E. B. (1946).—Use of sulfasuxidine, streptomycin and streptomycin in nutritional studies with the chick. *J. Biol. Chem.*, **165**, 437.
- MUNCH-PEDERSEN (1962).—Citado por GOUNELLE, H. y SZAKVARY, A. (1966).—Antibiotiques et aliments. I. Les accidents allergiques liés aux résidus. *Bull. Acad. Nat. Med.*, **150** (5-6), 76-82.
- MUNRO, I. C. y MORRISON, A. B. (1970).—Drug residues in foods of animal origin: their significance to man. *Journal of the A. O.A.C.*, **53** (2), 211-218.
- NUSSBAUMER, P. A. (1962).—Application de la chromatographie en couche mince à l'analyse de quelques pénicillines usuelles. *Pharmaceutica acta helvetica*, **37** (2), 65-72.
- OMS (1963).—Problemas de salud pública relacionados con el uso de antibióticos en los alimentos y en los piensos. Informe de un Comité de Expertos. OMS, Ser. Inf. Téc. n.º 260.
- PANTALEÓN, J. (1966).—Problèmes de santé publique posés par l'utilisation des antibiotiques en thérapeutique et nutrition animales. *Rec. Méd. Vét.*, **142**, 743-771.
- PEDERSEN, H. (1965).—The use concentrated extracts from tissues in the determination of penicillin and tetracyclines in slaughtered poultry to which fodders containing antibiotics have been fed. In *Yearbook 1965 Royal Veterinary and Agricultural College*, Copenhagen, Denmark, 33-60.
- PILET, Ch. y TOMA, B. (1969).—Essais sur la thermostabilité de quelques antibiotiques. *Les Cahiers de Médecine Vétérinaire*, **38** (6), 227-234.
- PILET, Ch. y TOMA, B. (1969).—Recherche de résidus de penicillin et de néomycine dans les tissus de poulets recevant une alimentation antibiosupplémentée. *Ann. Nutr. Alim.*, **23**, 277-281.
- POTOFSKI, I. I., POPOV, G. I., ZAVAROV, T. F. y SEROPYAN, K. A. (1962).—Antimicrobial and therapeutic agents. *Symposium Dermatologorum. Corpus lectionum, 1st*, 1960, 1, 220.
- POKORNÝ, M., VITĚZL, N. y ŠAPELK, M. (1973).—Detection of penicillins with chloroplatinic acid on thin-layer chromatoplates. *J. of Chromatography*, **77**, 458-460.
- RAYNAUD, J. P. (1969).—Généralités sur le problème des résidus. Cas particulier des résidus d'antibiotics utilisés par voie orale. *Les Cahiers de Médecine Vétérinaire*, **38** (6), 201-215.
- SAYRE, R. N. (1970).—Chicken miobrill fragmentation in relation to factors influencing tenderness. *J. Food Sci.*, **35** (1), 7-10.
- SCHOTHSÖTT, M. Van (1969).—Antibiotics residues in slaughter animals. V. *Symposium of the World Association of Veterinary Food-Hygienists*, Opatija, September 22-27, Yugoslavia.
- SCHÜTER, A. Von (1972).—Beitrag zum nachweis von antibiotika-rückständen im fleisch. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, **114**, 413-418.
- SHAHANI, K. M., GOULD, I. A., WEISER, H. H. y STATTER, W. L. (1956).—Stability of small concentrations of penicillin in milk as affected by heat treatment and storage. *J. Dairy Sci.*, **39**, 971-977.

- SHAKARYAN, G. A. y SEYAN, T. K. (1973). Persistence of penicillin in chicken meat and byproducts. Resumen en *Food Science and Technology Abstracts*, **6** (10), 1974, Abstract 10S 1.309.
- SKARNES, R. C. y WATSON, D. W. (1957).-Antimicrobial factors of normal tissues and fluids. *Bacteriol. Reviews*, **21**, 273-294.
- SIEGEL, B. B. (1959).-Hidden contacts with penicillin. *Bull. World Health Organ.*, **21**, 703-713.
- STOKSTAD, E. L. R., JUKES, T. H., PIERCE, J., PAGE, A. C. y FRANKLIN, A. L. (1949).-The multiple nature of the animal protein factor. *J. Biol. Chem.*, **180**, 647.
- STOKSTAD, E. L. R. y JUKES, T. H. (1950).-Further observation on the «animal protein factor». *Proc. Soc. Expt. Biol. Med.*, **73**, 523.
- SWANN REPORT (1971).-Véase Joint Committee on the us of antibiotics in animal husbandry and veterinary medicine (REPORT) (1971).
- TAKACS, J. y KOVACS, S. (1969).-Demonstration of antibiotic residues in the meat of slaughtered animals. *Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae*, **19** (1), 11-19.
- TARR, H. L. A. (1944).-Citado por HERNANDEZ, J. E. (1968).-Utilización de antibióticos en la conservación de alimentos. *Alimentaria*, **21**, 5-22.
- TARR, H. L. A. y DEAS, C. P. (1948).-Action of sulfa compounds, antibiotics and nitrate on growth of bacteria in fish flesh. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, **7**, 221.
- TAYLOR, K. E. (1963).-Citado por PANTALEÓN, J. (1966).-Problèmes de santé publique posés par l'utilisation des antibiotiques en thérapeutique et nutrition animales. *Rec. Med. Vet.*, **142**, 743-771.
- TERPLAN, G. Von, ZAADHOF, K. J., ANGERSBACH, H. y SKARLAKIDOU, M. (1973).-Zur abgrenzung unspezifischer hemmungen von *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* beim nachweis von hemmstoffen in lebensmittelintirischen ursprungs (vorläufige Mitteilung). *Archiv für Lebensmittelhygiene*, **24** (4), 90-92.
- VAN DEN BERG, L. (1964).-Physico-chemical changes in some frozen foods. *J. Food Sci.*, **29**, 540.
- VAN SCHOTHORST, M. (1969).-Residuen von antibiotica in Stachtdieren. Tesis para el grado de Doctor en Medicina Animal. Ruksuniversiteit at Utrecht. Publicado por Bronder Offset, N. V. Rotterdam, Holanda.
- VAN SCHOTHORST, M. y PEFFEN-KNOLL, G. (1970).-Detection and identification of some antibiotics in slaughter animals. *Neth. J. Vet. Sci.*, **3** (2), 85-93.
- VICKERS, H. R., BRAGATUNI, L. y ALEXANDER, S. (1958).-Dermatitis caused by penicillin in milk. *The Lancet*, **1**, 351.
- VIDEAU, D. (1969).-Résidus dans les aliments après conservation et antibiothérapie parentérale. *Les Cahiers de médecine vétérinaire*, **38** (6), 216-226.
- WALLACE, H. D. (1970).-Biological responses to antibacterial feed additives in diets of meat producing animals. *J. Anim. Sci.*, **31**, 1.118-1.126.
- WATANABE, T. (1963). Citado por JUKES, T. H. (1972).-Public health significance of feeding low levels of antibiotics to animals. *Adv. in Applied Microbiology*, 1972.
- WATANABE, T. y FUJISAWA, T. (1961).-Citados por JUKES, T. H. (1972).-Public Health significance of feeding low levels of antibiotics to animals. *Adv. in Applied Microbiology*, 1972.
- WECK, A. L. y EISEN, H. N. (1960).-Some immunochemical properties of penicilline acid. *J. Exp. Med.*, **112**, 1.227-1.247.
- WEISS, P. J., TALIAFERRO, B., HUCKINS, R. y CHASTONAY, R. (1967).-Identification of antibiotics in pharmaceutical preparations. I. Identification of penicillin types. *Journal of the A. O. A. C.*, **50** (6), 1.294-1.297.
- WENZEL, VON D. (1972).-Tierärzliche lebensmittelkunde und fleischhygiene in ihrer bedeutung für umweltschutz. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, **23** (4), 86-89.
- WHITEHILL, A. R., OLSON, J. J. y HUTCHINGS, B. L. (1950).-Stimulatory effect of aureomycin on the growth of chicks. *Proc. Soc. Expt. Biol. Med.*, **74**, 11.
- WILLIAMS SMITH, H. (1969).-Citado por JUKES, T. H. (1972).-Public health significance of feeding low levels of antibiotics to animals. *Adv. in Applied Microbiology*, 1972.
- WILLERET, A. (1968).-Contribution à la recherche de substances antibiotiques dans les viandes. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, **110**, 523-531.
- ZIMMERMAN, C. (1959).-Chronic penicillin urticaria from dairy products proved penicillinase cures. *A. M. A. Arch. of Dermatology*, **79**, 1.