

EFFECTO DE LOS TRATAMIENTOS TÉRMICOS SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE TETRACICLINAS EN LECHE

ZORRAQUINO, M. A.²; ALTHAUS, R. L.³; NAGEL, O. G.³; ROCA, M.¹ & MOLINA, P.¹

RESUMEN

La presencia de residuos de antibióticos en la leche no solamente produce un potencial riesgo para la salud del consumidor, sino que además, ocasiona serios problemas en los procesos fermentativos utilizados en la industria láctea. Por este motivo, el presente trabajo evalúa el efecto que producen aquellos tratamientos térmicos utilizados en la industria láctea (40°C-10 minutos, 60°C-30 minutos, 83°C-10 minutos, 120°C-20 minutos y 140°C-10 segundos) sobre la actividad antimicrobiana de muestras de leche fortificadas con tetraciclinas (clortetraciclina, doxiciclina, oxitetraciclina y tetraciclina). Para la medición de la pérdida de actividad antimicrobiana se empleó un bioensayo basado en la inhibición del crecimiento de *Bacillus cereus* subssp. *mycoides* ATCC11778. Para cada antibiótico se ensayaron tres concentraciones. Los datos se analizaron utilizando el modelo de regresión lineal múltiple. Los resultados señalan que la esterilización clásica (120°C-20 minutos) produce pérdidas que superan el 90% para clortetraciclina, 84% para doxiciclina, 89% para oxitetraciclina y 91% para tetraciclina, mientras que el calentamiento a 140°C-10 s produce bajas pérdidas de actividad antimicrobiana (29% clortetraciclina, 39% doxiciclina, 17% oxitetraciclina y 29% tetraciclina), similares a la baja pasteurización (60°C-30 minutos) (31% clortetraciclina, 18% doxiciclina, 23% oxitetraciclina y 21% tetraciclina). Los tratamientos térmicos de laboratorio (40°C-10 minutos y 83°C-10 minutos) ocasionan pérdidas de actividad antimicrobiana aún menores.

Palabras clave: antibióticos, tetraciclinas, termoestabilidad, inactivación térmica, leche.

SUMMARY

Heat treatment effects on the antimicrobial activity of tetracycline in milk.

The presence of antibiotic residues in milk is not only a potential consumer risk, but may also cause serious problems in the fermentation processes used in the dairy industry. The aim of the study was, therefore, to analyze the effect of different heat treatments (40°C-10 min, 60°C-30 min, 83°C-10 min, 120°C-20 min and 140°C-10 s) on the antimicrobial activity of milk samples fortified with tetracycline (chlortetracycline, doxycycline, oxytetracycline and tetracycline). To measure the loss

1.- Instituto de Ciencia y Tecnología Animal. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera, 14, 46071 Valencia, España.

2.- Departamento de Producción Agraria. Universidad Pública de Navarra. Campus de Arrosadía, 31006 Pamplona, España

3.- Cátedra de Biofísica, Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Nacional del Litoral. Kreder 2805 (3080) Esperanza, provincia de Santa Fe.

Manuscrito recibido el 10 de noviembre de 2010 y aceptado para su publicación el 10 de febrero de 2011.

of antimicrobial activity a bioassay based on inhibition of growth of *Bacillus cereus* subsp. *mycoides* ATCC11778 was used. For each antibiotic three concentrations were tested. The data were analyzed using a multiple linear regression model. The results showed that classic sterilization (120°C-20 min) produced losses that exceeded 90% for chlortetracycline, 84% doxycycline, 89 % oxytetracycline and 91% tetracycline, while the heat treatment 140°C-10 s produced little loss in antimicrobial activity (29 % chlortetracycline, 39% doxycycline, 17% oxytetracycline and 29% tetracycline), similar to low temperature pasteurization (60°C-30 min) (31% chlortetracycline, 18% doxycycline, 23% oxytetracycline and 21% tetracycline). Laboratory heat treatments (40 ° C-10 min and 83 ° C-10 min) caused little loss of antimicrobial activity.

Key words: antibiotics, tetracycline, thermostability, heat inactivation, milk.

INTRODUCCIÓN

Las tetraciclinas (TCs) constituyen un grupo de antibióticos naturales (clortetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina) y semisintéticos (metaciclina, doxiciclina, minociclina, limeciclina, rolitetraciclina y glicilciclina-tigeciclina) derivados de diferentes especies de *Streptomyces* spp. que se caracterizan por inhibir la biosíntesis proteica.

En su forma de acción, las TCs acceden al interior celular por un doble mecanismo de difusión pasiva y transporte activo. Luego, se unen a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano bloqueando la fijación del aminoacil-tRNA al sitio aceptor del complejo formado por el mRNA y la subunidad 50S del ribosoma. De esta forma, actúan como bacteriostáticos, al impedir la elongación de la cadena peptídica en crecimiento (Klein & Cunha, 1995; Joshi & Miller, 1997; Smilack, 1999; Pérez-Trallero & Iglesias, 2003).

Estas moléculas presentan un amplio espectro antibacteriano y buena actividad antibacteriana contra microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos, incluyendo los géneros *Spirochaeta*, *Actinomyces*, *Rickettsia* y *Mycoplasma* (Epstein y col., 1997; Cué & Morejón, 1999).

En medicina veterinaria, se emplean en el tratamiento de infecciones sistémicas como enteritis bacterianas, metritis, neumonías, entre otras, e infecciones locales como queratoconjuntivitis infecciosa en ganado bovino, clamidiasis y actinobacilosis, entre otras enfermedades (Zorraquino, 2005).

Sin embargo, el uso sistémico de estos fármacos puede dar lugar a la presencia de residuos de medicamentos en leche y/o carne. Estos residuos de antibióticos, en general, no poseen efectos tóxicos verdaderamente intrínsecos, pero pueden desencadenar síntomas alérgicos en personas con hipersensibilidad, shock anafiláctico (McManus 1997; Demoly & Romano 2005) y problemas en la elaboración de productos fermentados (Perreten & Teuber 1995; Packham et al., 2001; Berruga et al., 2007).

A fin de prevenir los inconvenientes asociados a la presencia de antibióticos, la Unión Europea (CEC, 1991) y el Codex Alimentarius (Codex Alimentarius, 2001) establecieron los Límites Máximos de Residuos (LMRs) de clortetraciclina, tetraciclina y oxitetraciclina en un valor de 100 g/kg para los alimentos de origen animal, tales como carne, leche y huevo. Sin embargo, existe limitada información acerca de los efectos que producen los

residuos de TCs en leche sobre los procesos tecnológicos.

Además, la información disponible acerca de la inactivación que experimentan las TCs frente a los diferentes tratamientos térmicos en las industrias lácteas es muy escasa y evalúa algunos tratamientos térmicos, como la pasteurización a bajas temperaturas, sobre la actividad antimicrobiana de los residuos de clortetraciclina y tetraciclina (Shahani, 1957, 1958, Jacques y Auxepaules, 1978). Por ello, la Comisión del Codex Alimentarius (Codex Alimentarius, 2001) señala la necesidad de llevar a cabo estudios más detallados acerca de las consecuencias que producen los tratamientos industriales sobre los antibióticos presentes en los alimentos, tales como la pasteurización y la esterilización.

Debido a la escasa información disponible, el objetivo de este trabajo fue analizar el efecto que producen los diferentes tratamientos térmicos utilizados en laboratorios de control de calidad de leche (40°C-10 minutos y 83°C-10 minutos) y en las industrias lácteas (60°C-30 minutos, 120°C-20 minutos y 140°C-10 segundos) sobre la actividad antimicrobiana de las TCs en leche.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental. Las muestras de leche libre de antibióticos se fortificaron con tres concentraciones (C1, C2 y C3) de cada una de las cuatro TCs detalladas en el Cuadro 1.

Los tratamientos térmicos ensayados fueron los que habitualmente se emplean en los laboratorios lactológicos para la homogenización de las muestras de leche para su posterior análisis de composición (40 °C-10 minutos) y para la posible inactivación de los inhibidores naturales en el análisis de residuos (83 °C-10 minutos). También se estudiaron calentamientos similares a los utilizados en la industria láctea para la elaboración de leches de consumo, tales como la pasteurización a bajas temperaturas (60 °C-30 minutos), la esterilización (120 °C-20 minutos) y la esterilización a ultra alta temperatura (140 °C-10 segundos).

Para cada TC se emplearon quince placas de agar conteniendo los nutrientes y esporas de *Bacillus cereus*, utilizando tres placas para cada uno de los cinco tratamientos térmicos antes mencionados.

En cada placa se ensayaron 36 perfora-

Cuadro 1. Concentraciones (g/l) de las tetraciclinas utilizadas en el estudio de inactivación térmica

Tetraciclina	C ₁	C ₂	C ₃	Referencia
Clortetraciclina	40	80	160	Sigma C-4881
Doxiciclina	15	30	60	Sigma D-9891
Oxitetraciclina	100	200	400	Sigma O-5750
Tetraciclina	100	200	400	Sigma T-3258

C1, C2, C3: concentraciones.

ciones según un diseño 6 x 6. Cada perforación se llenó con un volumen de muestra de leche fortificada que se distribuyeron en forma aleatoria según un diseño cuadrado latino que se representa en la Figura 1. En este diseño, seis replicas de cada una de las tres concentraciones de las muestras sin tratamiento térmico (S1, S2 y S3) y las tres concentraciones de las muestras tratadas térmicamente (T1, T2 y T3) se distribuyeron de modo tal de ubicar cada una de ella en una única fila y una única columna, sin que se repita su ubicación.

Muestras de leche fortificadas y disoluciones patrones de tetraciclinas: Se trabajó con patrones de clortetraciclina, doxiciclina, oxitetraciclina y tetraciclinas suministrados por Sigma (St. Louis, MO). Se prepararon disoluciones estándares conteniendo 1 mg/ml mediante la disolución de los compuestos en metanol. Las disoluciones se prepararon antes de su uso y cada vez que se ensayó un tratamiento térmico, a fin de evitar la pérdida de la actividad antimicrobiana por

efecto del tiempo de elaboración o por la acción de la luz.

A continuación, las disoluciones de TCs en leche se prepararon mediante la fortificación de leche comercial calidad UHT con las disoluciones estándares. Se utilizó leche que presentó resultados negativos al método Delvotest® SP (DSM, The Netherlands) y a la placa específica para TCs que emplea *Bacillus cereus* (Nouws *et al.*, 1999).

Tratamientos térmicos: Cada muestra de leche fortificada con los niveles de TCs del Cuadro 1 se dividió en seis alícuotas con el propósito de evaluar los diferentes tratamientos: ST: sin tratamiento térmico, T1: 40°C-10 minutos, T2: 80°C-10 minutos, T3: 60°C-30 minutos, T4: 120°C-20 minutos y T5: 140°C-10 segundos. Los calentamientos a 40°C-10 minutos, 80°C-10 minutos y 60°C-30 minutos se llevaron a cabo en un calentador termostático de baño de agua con regulador de temperatura de + 0.1°C, mientras que el tratamiento a 120°C-20 minutos se realizó colocando las muestras de leche en un auto-

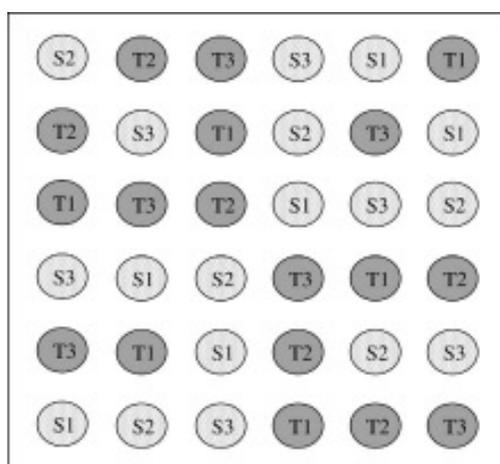


Fig. 1. Distribución de la muestras de leche según el diseño cuadrado latino utilizado para el bioensayo cuadrado. S: Sin tratamiento térmico, T: Tratada térmicamente. 1, 2 y 3: concentraciones de tetraciclinas en leche.

clave con sensibilidad de 1°C. Por último, el tratamiento a 140°C-10 segundos se desarrolló según la técnica descrita por Pagliarini *et al.* (1990). Para ello, las muestras de leche conteniendo las tetraciclinas se colocaron en tubos capilares de acero inoxidable de 1.6 mm de diámetro interno, 0.5 mm de espesor de la pared y 1 m de longitud plegado en forma de espiral. El volumen de muestra de leche fue de 3 ml. Una vez lleno, se colocó a calentar en un baño compacto de aceite de siliconas a 140+1°C durante 10 segundos. Inmediatamente después del calentamiento, los tubos se transfirieron en un baño de agua con hielo a 0°C para detener el calentamiento.

Preparación de las placas: Para la detección de residuos de TCs en leche se empleó la placa específica propuesta por Nouws *et al.* (1999). Se utilizó medio de cultivo STD II (Standar II Nähragar) suplementado con KH₂PO₄ e inoculado con una suspensión de esporas de *B. cereus* var. *mycoides* ATCC11778, de modo tal de obtener una concentración final de 105 esporas/ml en agar de a pH 6.0 ± 0.1.

Se utilizaron placas cuadradas de 243 mm x 243 mm x 18 mm (NUNC Ai, Roskilde, Denmark). En cada placa se depositó 115 ml de medio de cultivo de modo tal de obtener un espesor de 2.2 mm. Se dejó enfriar en ambiente estéril de flujo laminar en una superficie totalmente horizontal perfectamente nivelada para garantizar el mismo espesor de agar.

Una vez que el medio estaba solidificado, se practicaron 36 perforaciones de 14 mm de diámetro en el agar. Los orificios se distribuyeron según un cuadrado de 6 filas por 6 columnas (Fig. 1). En cada orificio se colocó 250 µl de las muestras de leche fortificadas con TCs según el diseño cuadrado latino descrito en el diseño experimental. Las pla-

cas cuadradas se colocaron a temperatura ambiente durante 30 minutos y luego se incubaron a 30 ± 1°C por un tiempo de 16 a 18 h.

Trascurrido este tiempo, los diámetros de los halos inhibitorios (incluido el diámetro de la perforación de 14 mm) se midieron con un calibre digital electrónico (rango 0-150 mm, sensibilidad ± 0.02, Selecta, España).

Análisis estadístico de los resultados:

Con el propósito de evitar las posibles diferencias entre las distintas placas utilizadas para cada tratamiento y antibiótico, se aplicaron las recomendaciones de corrección de los diámetros de las zonas de inhibición propuestas por AOAC International (2000). Para evaluar el efecto de los tratamientos térmicos sobre los diámetros de los halos inhibitorios se empleó un modelo de regresión lineal múltiple aditivo. Dicho modelo contempla un efecto constante de cada tratamiento térmico sobre la actividad antimicrobiana, que es independiente de la concentración de tetraciclina presente en la muestra de leche. De este modo, el efecto de cada tratamiento térmico se visualizará por un desplazamiento en la ordenada al origen con respecto a la recta construida a partir de las muestras de leche no tratadas. El modelo utilizado fue el siguiente:

$$y_{ij} = \beta_0 + \beta_1 \log C_i + \sum \beta T_j + \epsilon_{ij}$$

Donde: y_{ij} : diámetro de la zona de inhibición (en milímetros); $\log C_i$: logaritmo decimal de la concentración de tetraciclina (en g/l); 0: intercepto; 1: pendiente de la recta; T_j : corrección del intercepto de las rectas debido a los efectos de los diferentes tratamientos térmicos "i"; T_j : efecto del tratamiento térmico "i" en términos de variable dummy (no tratada: T1 = 0, T2 = 0, T3 = 0, T4 = 0, T5 = 0; 40°C-10 minutos: T1 = 1, T2 = 0, T3 = 0, T4 = 0, T5 = 0; 83°C-10 minutos: T1 = 0, T2 =

1, T3 = 0, T4 = 0, T5 = 0; 60°C-30 minutos: T1 = 0, T2 = 0, T3 = 1, T4 = 0, T5 = 0; 120°C-20 minutos: T1 = 0, T2 = 0, T3 = 0, T4 = 1, T5 = 0 y 140°C-10 s: T1 = 0, T2 = 0, T3 = 0, T4 = 0, T5 = 1) y ij : error residual del modelo lineal.

Los resultados se obtuvieron mediante la aplicación de la opción stepwise del procedimiento REG contenido en el paquete estadístico SAS® (SAS, 2001). Esta opción permite incorporar al modelo en forma secuencial únicamente aquellas variables significativas ($p < 0.05$), de modo tal de ingresar aquellos tratamientos que presentaron efecto significativo y dejar fuera del modelo aquellos tratamientos que no lo fueron. Por último, para cada TCs, se calcularon los porcentajes de inactivación térmica (%IT) relativos debido al efecto de cada uno de los tratamientos térmicos, según la siguiente expresión:

$$\% IT = [1 - 10 (-\beta T_j / \beta_0)] \times 100$$

Donde: 0: Intercepto; T_j : corrección del intercepto de la recta debido al efecto del tratamiento "i" calculado mediante los términos dummy de la Ecuación (I). Los porcentajes de inactivación térmica calculados mediante esta ecuación son independientes de la concentración de tetraciclina presente en la muestra de leche.

Para las TCs que no presentaron zonas de inhibición cuando se sometieron al tratamiento térmico de 120°-20 segundos, se estimó el porcentaje mínimo inhibitorio como el porcentaje relativo entre la concentración máxima ensayada y la mínima concentración estimada por el modelo de regresión que no produce zona de inhibición (14 mm), utilizando la siguiente expresión:

$$\% IT = [(C_{\text{máx}} - C_{14\text{mm}}) / C_{\text{máx}}] \times 100$$

Donde los nuevos términos son: $C_{\text{máx}}$: concentración máxima ensayada para cada

antibiótico, $C(14\text{mm})$: concentración mínima estimada por el modelo de regresión lineal que no produce zona de inhibición (14 mm).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el análisis estadístico de los datos no se consideró el calentamiento a 120°C-10 minuto porque produjo grandes pérdidas de la actividad antimicrobiana de las cuatro tetraciclinas ensayadas y no fue posible obtener halos inhibitorios. Por ello, los resultados obtenidos mediante la opción stepwise del Modelo de Regresión Lineal Múltiple (Cuadro 2) para el resto de los tratamientos térmicos estudiados señalan efectos significativos ($p < 0,05$) para los calentamientos de 83°C-10 min, 60°C-30 min y 140°C-10 seg en las cuatro tetraciclinas. Además, el tratamiento a 40°C-10 min afectó a la actividad de doxiciclina y tetraciclina. Los ajustes logrados mediante la aplicación del modelo de regresión lineal múltiple fueron buenos, con coeficientes de correlación comprendidos entre 0,9773 (oxitetraciclina) y 0,9863 (doxiciclina).

En la Figura 2 se muestran los efectos que producen los tratamientos térmicos de laboratorio y las industrias lácteas sobre los diámetros de los halos inhibitorios. Los tratamientos de laboratorio producen bajas pérdidas de actividad antimicrobiana, con disminuciones de los diámetros de las zonas de inhibición que van desde 0,32 mm para la tetraciclina (40°C-10 minutos) hasta 1,15 mm para la clortetraciclina (83°C-10 minutos).

Con respecto a los tratamientos industriales, a excepción del calentamiento a 120°C-20 min, las mayores pérdidas de actividad se obtienen en muestras de leche sometidas a 140°C-10 segundos, con disminuciones en los diámetros de los halos inhibitorios com-

prendidas entre 1,57 mm (clortetraciclina) y 2,51 mm (doxiciclina) y aquellas muestras de leche calentadas a 60°C-30 min, ya que causan disminuciones importantes en los diámetros de inhibición que se hallan dentro del rango 1,05 mm (doxiciclina) y 1,72 mm (clortetraciclina). Con respecto al tratamien-

to UHT (140°C-10 s), doxiciclina mostró pérdidas más importantes (2,51 mm) que el resto de las TCs.

En el Cuadro 3 se muestran las pérdidas de las actividades antimicrobianas calculadas para las cuatro TCs. El calentamiento a 40°C-10 min no produce prácticamente

Cuadro 2. Efecto de los tratamientos térmicos y las concentraciones de tetraciclinas en leche sobre los diámetros de los halos de inhibición de *B. cereus*

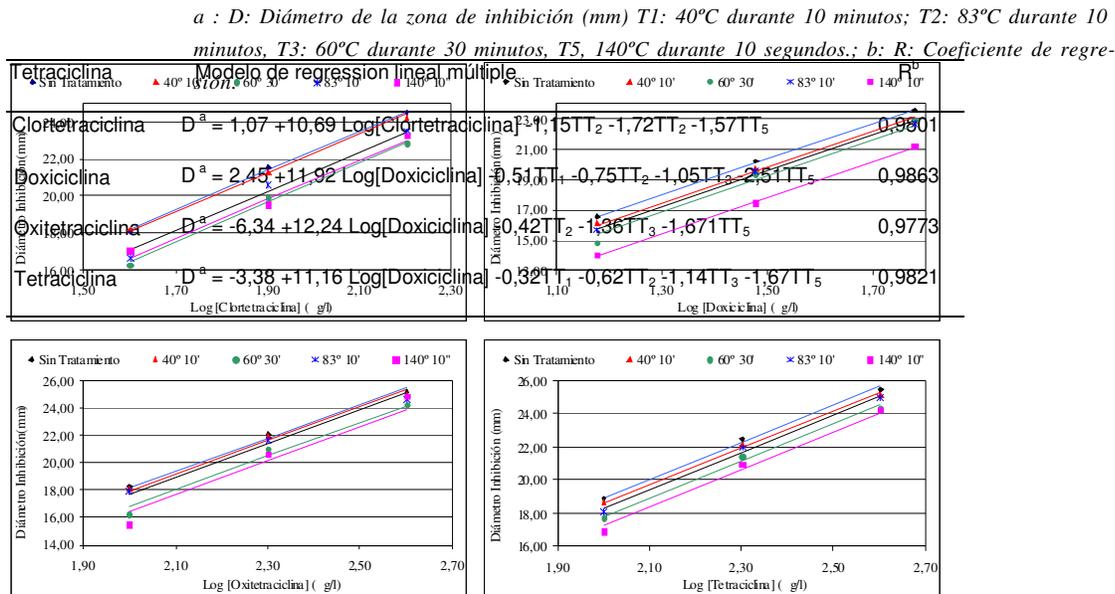


Figura 2. Efectos de los tratamientos térmicos de laboratorios e industrias sobre los diámetros de los halos inhibitorios de tetraciclinas en leche.

inactivaciones sobre estas moléculas, por tratarse de una calefacción suave para lograr la homogeneización de las muestras de leche antes de realizar los análisis físico-químicos en los laboratorios. También, la pasteurización a 83°C-10 minutos causa leves pérdidas de TCs, comprendidas entre el 8% (oxitetraciclina) y 22% (clortetraciclina).

Por el contrario, el calentamiento a 120°C-20 min presenta mayor pérdida de la actividad antimicrobiana que el resto de los tratamientos térmicos ensayados, si bien no se pudieron medir los diámetros de los halos inhibitorios, se estimaron las pérdidas que superaron el 84% en todos los casos. Los otros dos tratamientos industriales produjeron una pérdida menor (18-39%) en la actividad antimicrobiana de las TCs.

En las revisiones realizadas por Moats (1988, 1999) se citan los trabajos de Shahani y col. (1954) y Shahani (1957, 1958) donde evalúan el efecto del tratamiento a 62°C-30 min sobre la actividad antimicrobiana de clortetraciclina y tetraciclina en leche. Estos trabajos señalan pérdidas en la actividad de clortetraciclina (16,6%) y tetraciclina (23,6%) similares a las determinadas en este trabajo

(Cuadro 3). Por el contrario, Jacquet y Auxepaules (1978) luego de someter muestras de leche fortificadas con clortetraciclina y tetraciclina a una pasteurización baja (63°C-30 min) obtienen menores porcentajes de inactivación (2,5% y 6,1%, respectivamente) que los señalados en el Cuadro 3.

Para la esterilización clásica, Shahani (1957, 1958) señala una inactivación total (100%) para tetraciclina y clortetraciclina cuando se someten a un calentamiento de 121°C durante 15 minutos, semejantes a las elevadas pérdidas que se estiman en el Cuadro 3 para el calentamiento de 120°C durante 10 minutos.

También, Pilet *et al.* (1969) al calentar muestras de leche a 100°C-30 min observan porcentajes de inactivaciones comprendidos entre el 75 y 100% para residuos de oxitetraciclina y tetraciclina. Se debe destacar que en la bibliografía consultada no se encontraron datos de pérdida de actividad antimicrobiana para doxiciclina y oxitetraciclina en leche.

Para otros agentes antimicrobianos, también se señalan elevadas pérdidas de actividad antimicrobiana durante la esterilización

Cuadro 3. Porcentaje de inactivación (%) de tetraciclinas en la leche según los diferentes tratamientos térmicos

Tetraciclina	Tratamientos de laboratorio		Tratamientos industriales		
	40°C-10 min	83°C-10 min	60°C-30 min	120°C-20 min	140°C-10 s
Clortetraciclina	NS	22	31	> 90	29
Doxiciclina	9	14	18	> 84	39
Oxitetraciclina	NS	8	23	> 89	27
Tetraciclinas	6	12	21	> 91	29

*NS: efecto no significativo en comparación con las muestras sin tratamiento térmico; *: mínimo porcentaje de inactivación calculado a partir de la concentración estimada que no produce zona de inhibición (14 mm).*

a 120°C-20 minutos y menores pérdidas para la pasteurización a 60°C-30 minutos y la pasteurización a ultra alta temperatura de antibióticos betalactámicos (Zorraquino *et al.*, 2009a), aminoglucósidos (Zorraquino *et al.*, 2009b) y macrólidos (Zorraquino *et al.*, 2010). Por el contrario, las quinolonas son moléculas termoestables que manifiestan baja pérdida de actividad antimicrobiana cuando se las calientan a 120°C-20 minutos (Zorraquino *et al.*, 2008).

CONCLUSIONES

A modo de síntesis, se puede establecer que los tratamientos térmicos empleados en los laboratorios lactológicos causan bajas pérdidas de la actividad antimicrobiana de las tetraciclinas. Los tratamientos térmicos industriales producen pérdidas moderadas (inferiores al 31%) de la actividad antimicrobiana de doxiciclina, clortetraciclina, oxitetraciclina y tetraciclina en leche cuando se someten a 60°C-30 min (pasteurización baja) y 140°C-10 s (UHT), mientras que la esterilización clásica (120°C-20 minutos) ocasionan una elevada pérdida de la actividad antimicrobiana de las cuatro tetraciclinas ensayadas, superando al 84%. Al respecto, resulta interesante llevar a cabo estudios tendientes a evaluar la posible toxicidad de los metabolitos producidos mediante este calentamiento a fin de garantizar una inocuidad para el consumidor.

AGRADECIMIENTO

El presente trabajo de investigación fue llevado a cabo con aportes del proyecto AGL2003-03663 financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia (Madrid, España). Además, los autores agradecen a la Univer-

sidad Politécnica de Valencia (UPV, España) por su colaboración para hacer posible la estancia del Dr. Rafael Althaus en el Instituto de Ciencia y Tecnología Animal de la UPV.

BIBLIOGRAFIA

- AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS)**. 2000. Official methods of analysis, 17th ed., pp. 39-44. AOAC International, Arlington, VA.
- BERRUGA, M. I.; MOLINA, M. P.; NOVES, B.; ROMAN, M. & A. MOLINA**. 2007. In Vitro study about the effect of several penicillins during the fermentatio of yogurt made from ewe's milk. *Milchwissenschaft*, 62: 303-305.
- CEC (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES)**. 1991. Establishment by the European Community of Maximum Residue Limits (MRLs) for residues of veterinary medical products in foodstuffs of animal origin. The rules governing medical products in European Community VI. ECSC-EEC-EAEC. Brussels. Belgium.
- CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION**. 2001. Committee on Residues of Veterinary Drugs in Foods, Document Control of Veterinary Drug Residues in Milk and Milk Products CX/RVDF, 01/8. Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations-World Health Organization Program, Rome, Italy.
- CUÉ, M. & M. MOREJÓN**. 1999. Antibióticos de acción sistémica. Parte III. Sulfonamidas y tetraciclinas. *Rev Cub Med Gen Integr*; 15:156-67.
- DEMOLY, P. & A. ROMANO**. 2005. Update on beta-lactam allergy diagnosis. *Curr. Allergy Asthma Rep.*, 1: 9-14.
- EPSTEIN, M.; AMODIO-GROTON, M. & N. SADICK**. 1997. Antimicrobial Agents for the Dermatologist. II. Macrolides, Fluro-quinolones,

- Rifamicicycins, Tetracyclines, Trimethoprim-Sulfamethoxazole, and Clin-damycin. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 37: 365-81.
- JACQUES, J. & M. AUXEPAULES.** 1978. Le problème de la pollution du lait par les antibiotiques. État actuel de la question. *Bull. Acad. Vét. de France*, 51: 73-79.
- JOSHI, N. & D. MILLER.** 1997. Doxycycline revisited. *Arch Intern Med*, 157:1421-1428.
- KLEIN, N. & B. CUNHA.** 1995. Tetracyclines. *Med Clin North Am*, 79:789-801.
- MCMANUS, M. C.** 1997. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Am. J. Health Syst. Pharm.*, 54: 1420-1433.
- MOATS, W. A.** 1988. Inactivation of antibiotics by heating in foods and other substrates - A review. *J. Food Prot.*, 51: 491-497.
- MOATS, W. A.** 1999. The effect of processing on veterinary residues in foods. 233-241. In *Impact of processing on Food Safety*. Ed. Kluwer Academic, Plenum Publishers, New York.
- NOUWS, J.; VAN EGMOND, H.; SHULDERS, I.; LOEFFEN, G.; SCHOUTEN, J. & H. STEGEMAN.** 1999. A microbiological assay system for assessment of raw milk exceeding EU maximum residue level. *Int. Dairy J.*, 9: 85-90.
- PACKHAM, W.; BROOME, M. C.; LIMSOWTIN, G. K. & H. ROGINSKI.** 2001. Limitations of standard antibiotic screening assays when applied to milk for cheesemaking. *Aust. J. Dairy Tech.*, 56: 15-18.
- PAGLIARINI, E.; VERNILE, M. & C. PERI.** 1990. Kinetic study on colour changes in milk due to heat. *J. Food Sci.*, 55: 1766-1767.
- PÉREZ-TRALLERO, E. & L. IGLESIAS.** 2003. Tetraciclinas, Sulfamidias, Metronidazol. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 21(9):520-529.
- PERRETEN, V. & M. TEUBER.** 1995. Antibiotic resistance bacteria in fermented dairy products a new challenge for raw milk cheese. In *Residues of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk*. IDF S.I. 9505. Kiel, Germany, 144-148.
- PILET, C.; TOMA, B.; MUZET, J. & F. RENARD.** 1969. Essais sur la thermostabilité de quelques antibiotiques (Investigation of the thermostability of several antibiotics). *Cahier. Med. Vet.*, 38: 227-234.
- SAS®.** 2001. Institute Inc. SAS users guide: statistics version 9.1. SAS Institute, Cary, NC.
- SHAHANI, K. M.; GOULD, I. A.; WEISER, H. H. & W. L. SLATTER.** 1954. Effect of heat treatments on streptomycin and chlortetracycline (aureomycin) in milk. *Antibiotic Ann.* (1954-55), p. 353, Medical Encyclopedia, Inc., New York.
- SHAHANI, K. M.** 1957. The effect of heat and storage on the stability of Aureomycin in milk, buffer, and water. *J. Dairy Sci.*, 40: 289-296.
- SHAHANI, K. M.** 1958. Factors affecting Terramycin activity in milk, broth, buffer, and water. *J. Dairy Sci.*, 41: 382-391.
- SMILACK, J.** 1999. The Tetracyclines. *Clin Proc.*, 74:727-729.
- ZORRAQUINO, M. A.** 2005 Inactivación térmica de sustancias antimicrobianas en la leche. Ph.D. Diss., Universidad Pública de Navarra, Navarra, España.
- ZORRAQUINO, M. A.; ROCA, M.; CASTILLO, M.; ALTHAUS, R. & M. P. MOLINA.** 2008. Effect of thermal treatments on the activity of quinolones in milk. *Milchwissenschaft*, 63 (2): 192-195.
- ZORRAQUINO, M. A.; ROCA, M.; FERNANDEZ, N.; MOLINA, M. P. & R. ALTHAUS.** 2009a. Heat inactivation of beta lactam antibiotics in milk. *Journal of Food Protection*, 71 (6): 1193-1198.
- ZORRAQUINO, M. A.; ALTHAUS, R. L.; ROCA, M. & M. P. MOLINA.** 2009b. Effect of Industrial Heat Treatments on the Antimicrobial Activity of Aminoglycosides in Milk. *Journal of Food Protection*, 72: 1338-1341.
- ZORRAQUINO, M. A.; ALTHAUS, R. L.; ROCA, M. & M. P. MOLINA.** 2010. Heat treatment effects on the antimicrobial activity of macrolide and lincosamide antibiotics in milk. *Journal of Food Protection*. En Prensa