

# EVALUACIÓN DE LA DEGRADACIÓN DE ANTIBIÓTICOS EN LECHE MEDIANTE EL USO DE ENZIMAS

REY, Fabiana S.<sup>1\*</sup>; LÓPEZ, Victoria<sup>1</sup>; CARDOZO, Gonzalo<sup>1</sup>; OLAZÁBAL, Laura<sup>2</sup>; DE TORRES, Elena<sup>3</sup>; ESCOBAR, Daniela<sup>1</sup>

1 LATITUD - Fundación LATU. Montevideo, Uruguay. 2 LATU. Montevideo, Uruguay. 3 Campo experimental N°2, Facultad de Veterinaria, UdelaR. San José, Uruguay. \*rey@latitud.org.uy



## INTRODUCCIÓN

Los antibióticos son utilizados en los tambos para el tratamiento y prevención de enfermedades en ganado bovino lechero, como la mastitis, cojera, infecciones respiratorias y diarreas. Los más usados pertenecen al grupo de los betalactámicos (penicilinas y cefalosporinas), tetraciclinas, macrólidos, quinolonas y sulfamidas (Oliver, 2011; Giannechini, 2005; USDA, 2016). Los residuos de antibióticos pueden generar problemas en la población en forma de alergias y resistencia antimicrobiana; así como en la industria, los tambos y el medio ambiente (Martínez 2009). Es por este motivo que existen reglamentaciones nacionales e internacionales que prohíben el procesamiento de leche con antibióticos y regulan su reúso y disposición final, por lo que es de importancia el estudio de alternativas para mitigar el impacto de su descarte y/o posibilitar su reutilización (Decreto N°359/013; MVOTMA, 2016; Decreto 182/013; Codex Alimentarius, 2017). Las enzimas constituyen una muy buena alternativa para la degradación de residuos de antibióticos. Se ha reportado estudios el uso de lacasa, manganoso peroxidasa, lignina peroxidasa, glutatión transferasa y  $\beta$ -lactamasa para la degradación de antibióticos y otros productos farmacéuticos con buenos resultados (Wen, 2009; Wen, 2010; Singh, 2017; Deshpande, 2014, Korycka-Dahl, 1985). El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del tratamiento con  $\beta$ -lactamasa (BL) y peroxidasa de rábano (HRP), para la degradación de penicilina G (PG) y oxitetraciclina (OTC) en leche.

## MATERIALES Y MÉTODOS

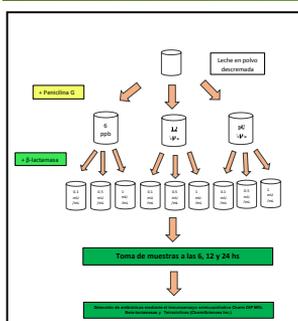


Figura 1. Condiciones de trabajo para la degradación de PG con BL.

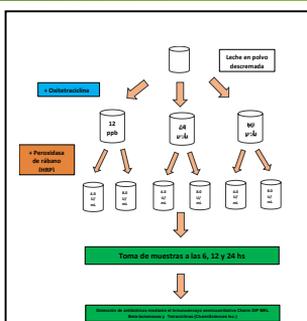


Figura 2. Condiciones de trabajo para la degradación de OTC con HRP.

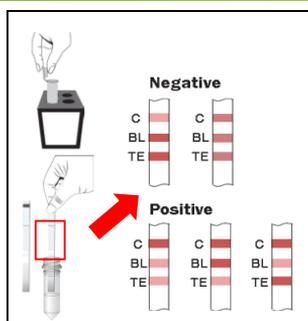


Figura 3. Prueba Charm DIP MRL  $\beta$ -lactamasas y tetraciclinas para leche cruda mezclada (Charm Sciences Inc.) para detección de antibióticos.

En las figuras 1, 2 y 3 se observa la metodología de trabajo. Todos los ensayos se hicieron por duplicado. Se realizaron blancos: negativo (leche en polvo descremada), positivo (leche + antibiótico), y leche + enzima. Las condiciones de incubación de la leche con enzima y antibiótico fueron 23°C y 50 rpm. Se trabajó sin ajuste de pH.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 1. Resultados de degradación de PG con BL

Atb	Concentración enzima BL (mU/mL)	Límite detección atb final (ppb)	Concentración atb final (ppb)	% degradación	3 hs	6 hs	9 hs
PG	0,1	3	6	50	+	-	-
		3	12	75	+	+	-
		3	30	90	+	+	+
	0,5	3	6	50	-	-	-
		3	12	75	+	+	-
		3	30	90	+	+	-
	1	3	6	50	-	-	-
		3	12	75	-	-	-
		3	30	90	-	-	-

Tabla 2. Resultados de la degradación de OTC con HRP

Atb	Concentración enzima HRP (U/mL)	Límite detección atb final (ppb)	Concentración atb final (ppb)	% degradación	6 hs	12 hs	24 hs
OTC	4,0 (0,1mM H2O2)	6	12	50	+	-	-
		6	24	75	+	+	-
		6	60	90	+	+	+
	8,0 (0,1mM H2O2)	6	12	50	+	-	-
		6	24	75	+	+	-
		6	60	90	+	+	+

En la tabla 2 se observan los resultados de degradación de la oxitetraciclina con la peroxidasa de rábano. En este caso, por el tipo de enzima se agregó a la reacción H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como aceptor de electrones para catalizar la oxidación del antibiótico. Se probaron distintas concentraciones pero la más eficiente fue 0,1 mM. Como puede verse a las 24 horas se obtuvo por lo menos un 90 % de degradación de los 60 ppb de antibiótico con 8,0 U/mL de enzima. A las 12 horas con 4 U/mL de enzima se llegó a degradar por lo menos 75 % del antibiótico presente.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Codex Alimentarius. 2017. Maximum residue limits (MRLs) and risk management recommendations (RMRs) for residues of veterinary drugs in food. CAC/MRL 2-2017.Rome, Italy. Ministerio de Salud Pública. 2013. Reglamento Bromatológico Nacional. Decretos 182/013 y 359/013. Montevideo, Uruguay.
- Deshpande, A.D., Bahlé, K.G., Chatterjee N.R., 2004. Degradation of  $\beta$ -lactam antibiotics. *En: Curr. Sci.* 87 (12), pp1684-1695.
- Giannechini, R., Concha, C., Rivero, R., J. Gil y Moreno-Lopez, J. (2005). Monitoreo de la resistencia de *Staphylococcus aureus* aislados en rodeos lecheros de la cuenca lechera tradicional de Uruguay. XXXIII Jornadas Uruguayas de Biotecnología. Paysandú 9 al 11 de junio 2005-Uruguay. pp. 205-207
- Korycka-Dahl, M.; Richardson, T.; Bradley, R.L., 1985. Use of Microbial/ $\beta$ -Lactamase to Destroy Penicillin Added to Milk. *En: J Dairy Sci* 68, pp.1910-1916
- Martínez, D.E., 2009. *Determinación de residuos de antibióticos betalactámicos y tetraciclinas en leche cruda en productores de Coahuila*. [En línea]. Guatemala: Universidad San Carlos de Guatemala. [Consulta 28/8/2019]. Disponible en <http://www.repositorio.usac.edu.gt/3291/>
- MVOTMA. 2016. Manual para la gestión ambiental de tambos. Montevideo, Uruguay.
- Oliver, S.P.; Murinda, S.E.; Jayarao, B.M., 2011. Impact of Antibiotic Use in Adult Dairy Cows on Antimicrobial Resistance of Veterinary and Human Pathogens: A Comprehensive Review. *En: Foodborne Pathogens and Disease* 8 (3), pp. 337-355.
- Singh, S.K.; Khajuria, R.; Kaur, L., 2017. Biodegradation of ciprofloxacin by white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *En: 3 Biotech* 7 (69), pp.2-9
- USDA. 2016. "Dairy 2014, Milk Quality, Milking Procedures, and Mastitis in the United States, 2014" USDA-APHIS-VS-CEAH-NAHMS. Fort Collins, CO #704.0916
- Wen, X., Jia, Y., Li, J., 2009. Degradation of tetracycline and oxytetracycline by crude lignin peroxidase prepared from *P. chrysosporium* a white rot fungus. *En: Chemosphere* 75, pp. 1003-1007
- Wen, X., Jia, Y., Li, J., 2010. Enzymatic degradation of tetracycline and oxytetracycline by crude manganese peroxidase. *En: J. Haz. Mat.* 177, pp. 924-928

## CONCLUSIONES

Las enzimas estudiadas presentan un gran potencial para degradar antibióticos en leche en condiciones de temperatura, pH y tiempo, razonables para su aplicación en la industria. Los datos obtenidos son una base que permitirá optimizar la metodología, cuantificando el contenido de antibióticos por HPLC/MS-MS.

Con respecto a los productos de degradación de los antibióticos se planea hacer estudios cromatográficos y toxicológicos para determinar cuales son y su impacto. De esta forma se podría pensar en un descarte seguro para el ambiente, o posibles usos seguros de estas leches tratadas para alimentación de ganado por ejemplo.

La investigación que da origen a estos resultados presentados en la presente publicación recibió fondos de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación bajo el código FSA I\_2017\_1\_138926