

NIVELES DE BENZOATO DE SODIO EN LECHE CRUDAS PROVENIENTES DE VACAS SANAS Y VACAS MASTÍTICAS

Levels of Sodium Benzoate in Raws Milks from Health and Mastitic Cows

Nancy López
 Aura Scaramelli
 Lucy Páez
 Freddy Cordero

Departamento de Salud Pública. Facultad de Ciencias Veterinarias.
 Universidad Central de Venezuela. Apartado 4563
 Maracay, Estado Aragua, Venezuela

RESUMEN

Se determinó la concentración de benzoato de sodio, presencia de mastitis y tipo de patógenos mastitogénicos, en muestras de leche cruda procedentes de la totalidad de los animales en ordeño de seis fincas lecheras de los Estados Aragua, Carabobo y Apure, Venezuela. La concentración de benzoato se determinó por espectrofotometría a 224 nm; el diagnóstico de mastitis se realizó mediante la prueba de California para mastitis subclínica y Contaje Electrónico de células; el tipo de patógenos presentes en las muestras, mediante cultivo bacteriológico convencional. Los resultados obtenidos revelan variabilidad en los niveles de benzoato de sodio entre animales y entre fincas, no asociados a presencia o no de mastitis o a patógenos específicos. La concentración de benzoato de sodio en los 182 animales estudiados, varió entre 2,16 mg/l y 24,8 mg/l, con promedio de $9,16 \pm 4,48$ mg/l; la concentración promedio por fincas varió entre $6,47 \pm 2,39$ mg/l y $11,01 \pm 2,12$ mg/l, encontrándose diferencias significativas al nivel 1%.

Palabras clave: Benzoato, mastitis.

ABSTRACT

The sodium benzoate concentration, presence of mastitis and mastitogenic pathogens in cow's raw milk from six farms of Aragua, Carabobo and Apure states, Venezuela was determined. The benzoate concentration was determined by Spectrophotometry at 224 nm; mastitis was detected using the California Mastitis test and Electronic Cell Count; pathogenic

bacteria were determined through conventional bacteriological culture. The results showed variation in the benzoate concentration between animals and between farms, without association with mastitis or specific pathogens; the values obtained varied between 2.16 mg/l and 24.8 mg/l with average of 9.16 ± 4.48 mg/l for 182 animals, and 6.47 ± 2.39 mg/l and 11.01 ± 2.12 mg/l for farms, with significance at level 1%.

Key word: Benzoate, mastitis.

INTRODUCCIÓN

El ácido benzoico en estado libre o en forma de derivados sencillos como sales, éteres o amidas, se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza. El benjuí puede contener hasta 20% de ácido benzoico en estado libre o en combinaciones que se descomponen fácilmente por el calentamiento [8]. La resina acaroide de la *Xanthorrea hastilis*, contiene de 4,5% a 7%; encontrándose en estado libre porciones más pequeñas en productos naturales de índole diversa como la corteza del cerezo negro silvestre, los arándanos, las ciruelas, el clavo maduro y el aceite volátil del anís [10].

En leche fluida y otros productos lácteos se ha encontrado en forma natural, cantidades variables de ácido benzoico, de allí que en el año de 1977, Chandan y col. [7] recomendaron revisar la legislación sobre aditivos, en el sentido de considerar la presencia natural de benzoato en productos lácteos.

Overstrom y col. [22], en Suiza, encontraron concentraciones variables de ácido benzoico en quesos de diferentes edades, así como variación entre la superficie y la parte interna del queso; Kurizaki y col. [18] en Tokio, determinaron con-

centraciones entre 1 ppm-40 ppm en quesos; Svensen [30] en Noruega, encontró entre 0,2 ppm -0,7 ppm en leche cruda y de 1ppm - 5ppm en quesos; Chandan y col. [7], en Michigan, EE.UU., reportan concentraciones entre 3 ppm-5 ppm en leche cruda, leche descremada y mantequilla, de 9ppm - 15ppm en queso Cottage y de 16ppm - 56ppm en yoghurt; Friedrich y Guenter [13] en Alemania, refieren concentraciones de 0,2 ppm en leche fresca, de 5ppm - 7ppm en yoghurt y de 11,6ppm a 23,6ppm en quesos procesados; Toppino y col. [31] en Italia, consiguieron concentraciones de 7ppm - 26ppm en quesos, de 7ppm - 25ppm en yoghurt y de 12ppm en suero fermento, el cual es utilizado como iniciador para la elaboración del queso grana padano.

Todos estos investigadores están de acuerdo al sugerir que el ácido benzoico se presenta en forma natural en leche y derivados, como un producto del metabolismo bacteriano, siendo Jarczyński Kiermeir, citado por Overstrom y col. [22] los primeros en señalar la posibilidad de que el ácido benzoico encontrado en concentraciones de 3,8 ppm en queso Romadur, fuese el resultado de la degradación de la tirosina durante la maduración del queso; posteriormente, otros investigadores como Nishimoto y colaboradores citado por Overstrom y col. [22] propusieron al ácido hipúrico como precursor del benzoato.

El ácido hipúrico ha sido identificado por Stuart [29] en 1953, como un constituyente del nitrógeno no proteico de la leche, encontrándose en concentraciones que varían entre 3,1 mg/100 ml a 6,4 mg/100 ml de leche descremada con promedio de 5,1 mg/100 ml.

En trabajos en los que se mide la concentración de ácido benzoico en las distintas etapas de preparación de queso Gouda y Heergard (Overstrom y col.) [22] y queso Cottage (Chandan y col.) [7], se corrobora la formación de ácido benzoico como producto del metabolismo bacteriano al encontrar una correlación entre la producción de benzoato y el crecimiento de bacterias empleadas en los cultivos lácticos.

En Venezuela, la prevalencia de mastitis subclínica, aunque variable entre fincas, es en general alta [1,2,12,24,25], siendo los agentes causales más frecuentes *Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus aureus* [1,12,15,24,25] capaces de degradar el ácido hipúrico hasta benzoato y glicina [4,11].

En base a estos argumentos se establecieron los objetivos del presente trabajo, en el cual se propuso evaluar la relación existente entre los niveles de benzoato de sodio en leches crudas, con la presencia o no de procesos inflamatorios de la ubre debidos a causas microbianas, y con el tipo de gérmenes patógenos involucrados en el proceso.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fincas y animales

El estudio se realizó sobre 182 animales provenientes de cuatro fincas comerciales (A-D), una finca experimental de

la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela (E), y una finca de búfalas (F). Las fincas comerciales y la experimental son de ganado lechero, ubicadas en los estados Aragua y Carabobo; la finca (F) está ubicada en el estado Apure.

Las muestras de leche se obtuvieron durante el ordeño vespertino, a partir de todos los cuartos de los animales en ordeño, inmediatamente después de realizar la prueba de California (CMT) y siguiendo las recomendaciones de la Federación Internacional Ganado Lechero (FIGL) [14]. Para ello se descartaron los primeros chorros de leche de cada cuarto, se desinfectaron los pezones mediante frotación de la punta con una gasa impregnada en alcohol de 70° y luego, se recolectaron 20ml-25ml de leche de cada cuarto por separado, en frascos de vidrio limpios, estériles, con tapa de rosca, de 30 ml de capacidad. Las muestras fueron transportadas al laboratorio en cavas con hielo y mantenidas en refrigeración hasta su procesamiento, dentro de las 36 horas siguientes a su recolección.

Diagnóstico de mastitis y patógenos mastitogénicos

A las muestras obtenidas de los cuartos de los animales en producción se les realizó el diagnóstico de mastitis y la determinación de patógenos mastitogénicos, mediante:

CMT: siguiendo las especificaciones originales para la realización e interpretación de la prueba [26]. A cada animal se le asignó un resultado de CMT igual al del cuarto con el más alto grado de gelificación [23].

Cultivo bacteriológico de las muestras de leche: Las muestras fueron sacadas del refrigerador y mantenidas a temperatura ambiente hasta alcanzar una temperatura aproximada de 18°C. Posteriormente se sembraron alícuotas de 25 µl de cada muestra, usando asas de platino calibradas, en placas de Agar Sangre, medio de Edwards y Manitol Sal Agar. Todas las placas se incubaron a 37°C por 24-48 horas. Las placas de Agar Sangre y de medio de Edwards se incubaron en atmósfera contentiva de 5-10% de CO₂. Los resultados del cultivo se interpretaron de acuerdo a criterios previamente establecidos [6,14,23]. Para la identificación de los aislados se aplicaron esquemas y métodos previamente descritos y recomendados [14,17,21,32,33].

Contaje Electrónico de Células (CEC): Para ello se utilizó un contador electrónico de partículas (Coulter Counter, modelo ZM), calibrado con partículas látex de 4,5 µm de diámetro y se siguieron las indicaciones técnicas de la FIGL [14]. Para la clasificación de los cuartos como positivos o negativos a mastitis, se tomó como límite de normalidad el contaje de 700.000 células/ml, toda vez que, en el primer estudio al respecto, realizado en el país por miembros del Departamento de Salud Pública y de Sanidad Animal de la FCV-UCV, se encontró que este valor era el que permitía el menor error en la clasificación de los cuartos [24]. Para la clasificación de los animales se utilizó un criterio semejante al aplicado en el caso del

CMT, es decir, se le asignó a cada animal el mayor valor de contaje encontrado en sus cuartos.

Determinación de benzoato

La determinación del benzoato se realizó sobre muestras compuestas de los cuatro cuartos, tomando cantidades proporcionales de cada uno y utilizando la técnica descrita por Anderson y col. [3], pero variando la longitud de onda para medir la absorbancia.

Se prepararon patrones de benzoato de sodio a las concentraciones de 5-10-15-20-25-30 y 35 ppm, a fin de obtener una curva patrón.

A los valores obtenidos con los patrones elaborados, se les aplicó un análisis de regresión, resultando una relación lineal hasta las concentraciones de 30 ppm, con un coeficiente de regresión de 0,99, lo cual permitió aplicar una fórmula, con la finalidad de determinar la concentración de las muestras analizadas.

Dicha fórmula fue la siguiente:

$C = A - \text{Constante} / \text{Coeficiente}$

$C = A + 0,030952 / 0,0255543$

C= Concentración

A= Absorbancia

Constante= -0,030952

Coeficiente= 0,0255543

Tratamiento estadístico

A fin de evaluar la influencia de los microorganismos encontrados y del proceso inflamatorio de la ubre sobre la concentración de benzoato en la leche, se procedió a categorizar las muestras de acuerdo a:

1. Agentes patógenos aislados de las ubres de los animales muestreados, clasificados en patógenos menores (*C. bovis*, *Micrococcus* y *S. epidermidis*), y patógenos mayo-

res (*S. agalactiae*, *S. aureus* y cualquier otro no incluido como menor);

2. Animales positivos o negativos a mastitis, de acuerdo a los resultados obtenidos en el CMT y al contaje de células somáticas;
3. Animales mastitis positivos-cultivos positivos y animales mastitis negativos-cultivos negativos;
4. Cultivos bacterianos en los cuales se encontró un solo tipo de agente o asociado a otros.
5. Concentración de benzoato por fincas.

A fin de evidenciar si existen diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de benzoato para las categorizaciones, se aplicó análisis de varianza y comparación de medias de SCHEEFFE, usando el software Statistix, versión 4.0.

RESULTADOS

En la TABLA I se muestra la prevalencia de los microorganismos patógenos causantes de mastitis en las diferentes fincas, siendo detectado el *Staphylococcus aureus* en todas las fincas bajo estudio, seguido por el *Micrococcus spp.*; el *S. aureus* fue el germen de mayor prevalencia para la mayoría de las fincas (B,C,D,E,F).

Los resultados obtenidos para las categorizaciones de patógenos mayores y patógenos menores, animales positivos y negativos a mastitis, animales mastitis positivo-cultivos positivos y mastitis negativos-cultivos negativos, asociación o no de microorganismos y concentración de benzoato por fincas, se evidencian en las TABLAS II,III,IV,V,VI y VII respectivamente. Al aplicar análisis de variancia a dichas categorizaciones, se encontraron diferencias altamente significativas al nivel 1%, entre las fincas muestreadas; sin embargo, no se encontraron diferencias para las concentraciones de benzoato categorizadas por patógenos mayores y patógenos menores, mastitis, asociación de mastitis con cultivos positivos y negativos y mi-

TABLA I
PREVALENCIA DE LOS MICROORGANISMOS EN LAS DIFERENTES FINCAS

Germen	A	B	F	C	D	E
<i>C. bovis</i>	23,33	11,54				
<i>S. aureus</i>	26,66	65,38	32,14	10,42	21,74	19,44
<i>S. agalactiae</i>	51,67	7,69				
<i>S. dysgalactiae</i>	18,33					
<i>Micrococcus spp.</i>	6,67	1,9	1,78	2,08	8,69	
<i>S. hyicus</i>	8,33					
<i>Enterococcus spp.</i>		9,6		6,25		
<i>S. epidermidis</i>			1,78		73,9	2,77

Prevalencia: Nº de veces en que se encuentra el germen/población x 100.

TABLA II
CONCENTRACIÓN DE BENZOATO (mg/l) POR FINCAS Y POR CATEGORÍA DE PATÓGENOS MAYORES Y MENORES

Categoría de Patógenos		Fincas						
		A	B	C	D	E	F	Total
0	número	5	10	24	5	16	34	94
	promedio	5,83±1,55	10,52±3,69	6,41±2,49	6,49±1,76	11,05±2,38	8,11±2,48	8,23±3,07
1	número	5	1	-	10	1	2	19
	promedio	10,93±8,96	8,2	-	9,5±5,07	10,48	8,69±0,72	9,77±5,6
2	número	35	33	3	1	3	17	92
	promedio	8,76±4,49	10,66±4,43	6,95±1,51	8,22	10,96±0,29	8,14±1,70	9,33±4,04
3	número	2	2	-	-	-	-	4
	promedio	3,00±1,07	12,32±5,77	-	-	-	-	7,66±6,36
4	número	13	6	-	4	-	-	23
	promedio	7,23±4,73	13,14±5,05	-	10,75±5,01	-	-	9,38±5,32
Total	número	60	52	27	20	20	53	
	promedio	8,17±4,92	10,94±4,33	6,47±2,39	8,93±4,39	11,01±2,12	8,14±2,20	

Categorías de patógenos: 0= negativo en los cultivos bacterianos. 1= patógenos menores. 2= patógenos mayores. 3= contaminadas. 4= asociación de patógenos mayores y menores.

TABLA III
CONCENTRACIÓN MEDIA DE BENZOATO (mg/l) EN MUESTRAS POSITIVAS Y NEGATIVAS A MASTITIS EN LAS DIFERENTES FINCAS

Fincas	Positivos a Mastitis		Negativos a Mastitis		Total	
	Nº	\bar{X}	Nº	\bar{X}	Nº	\bar{X}
A	23	7,95±4,53	36	8,39±5,25	59	8,22±4,95
B	30	10,3±4,04	23	11,89±5,18	53	10,99±4,59
C	2	8,25±0,97	25	6,32±2,42	27	6,47±2,39
D	7	10,74±5,37	13	7,96±3,63	20	8,93±4,39
E	5	12,12±2,9	15	10,64±1,76	20	11,01±2,12
F	15	8,23±2,55	24	8,09±2,12	39	8,14±2,26
Total	82	9,36±4,11	136	8,76±4,26		

\bar{X} = media.

TABLA IV
PORCENTAJE DE ANIMALES POSITIVOS A MASTITIS CON CULTIVOS NEGATIVOS Y DE ANIMALES NEGATIVOS A MASTITIS CON CULTIVOS POSITIVOS

Fincas	Animales Mastitis+ y Animales Mastitis - y Cultivos Negativos Cultivos Positivos	
A	3,23	33,33
B	8,45	38,03
F	15,79	21,05
C	18,52	29,63
D	15,38	69,23
E	40,00	35,00

croorganismos presentes en asociación o no. La prueba de comparación de medias de SCEEFFE evidenció diferencias altamente significativas entre las fincas A y B y entre las fincas C con B y E (TABLA VIII).

DISCUSIÓN

Alonso [1]; Jiménez y col. [15]; Scaramelli [24,25]; y Ferraro [12]; señalaron que los microorganismos principalmente involucrados en las mastitis subclínicas de diferentes zonas del país, eran el *Streptococcus agalactiae* y el *Staphylococcus aureus*; en el presente trabajo se encontró como patógeno más comúnmente implicado, al *S. aureus*.

TABLA V
CONCENTRACIÓN MEDIA DE BENZOATO (mg/l) EN ANIMALES POSITIVOS A MASTITIS, CON CULTIVOS POSITIVOS Y ANIMALES NEGATIVOS A MASTITIS CON CULTIVOS NEGATIVOS

Fincas	Mastitis +, Cultivos +		Mastitis -, Cultivos -	
	Nº	\bar{X}	Nº	\bar{X}
A	23	7,95±4,53	4	5,87±1,79
B	22	10,94±4,03	5	12,44±3,62
C	-	-	22	6,24±2,53
D	3	15,93±3,32	1	5,06
E	2	10,90±0,38	13	10,62±1,9
F	8	7,70±2,07	16	7,91±2,46
Total	58	9,56±4,39	61	8,07±3,20

TABLA VI
CONCENTRACIÓN MEDIA DE BENZOATO (mg/l) POR FINCAS Y POR ASOCIACIÓN DE PATÓGENOS

Fincas	Código Asociación Bacteriana (CAB)									
	0		1		2		3		Total	
	Nº	\bar{X}	Nº	\bar{X}	Nº	\bar{X}	Nº	\bar{X}	Nº	\bar{X}
A	5	5,83±1,55	27	9,7±5,32	27	7,30±4,5	1	2,24	60	8,17±4,92
B	10	10,52±3,69	29	10,52±4,09	12	12,53±5,39	1	8,24	52	10,94±4,33
C	24	6,41±2,49	3	6,95±1,51	-	-	-	-	27	6,47±2,39
D	5	6,49±1,76	10	9,46±5,08	5	10,32±4,44	-	-	20	8,93±4,39
E	16	11,05±2,38	4	10,84±0,33	-	-	-	-	20	11,01±2,12
F	34	8,11±2,48	18	8,17±1,66	1	8,73	-	-	53	8,14±2,20
Total	94	8,23±3,08	91	9,60±4,19	45	9,06±5,16	2	5,24±4,24		

CAB: 0=negativo. 1= un solo tipo de germen. 2= asociación de gérmenes. 3= contaminados. X= media.

TABLA VII
CONCENTRACIÓN MEDIA DE BENZOATO (mg/l) ENCONTRADAS EN LOS ANIMALES EN LAS DIFERENTES FINCAS

Fincas	Nº	Promedio	Valor Máximo	Valor Mínimo
A	60	8,17±4,92	24,8	2,24
B	58	10,93±4,43	21,6	3,44
C	27	6,47±2,39	10,20	2,16
D	20	8,93±4,39	18,47	3,06
E	20	11,01±2,12	16,75	7,63
F	56	8,16±2,14	11,94	2,35
Total	241	8,94±3,80		

TABLA VIII
COMPARACIÓN DE MEDIAS DE SCHEFFE APLICADA A LAS CONCENTRACIONES DE BENZOATO POR FINCA

Finca	Promedios	E	B	D	A	F
E	11,007					
B	10,933	0,00				
D	8,9335	0,60	0,82			
A	8,1732	1,67	3,11*	0,12		
F	8,1582	1,66	3,04	0,12	0,00	
C	6,4663	3,28*	5,09*	0,97	0,75	0,72

Valor crítico F: 3,096. Nivel de rechazo: 0,010.

Diversos autores han señalado la presencia de ácido benzoico en leche cruda. Los valores en leche cruda señalados por Svensen [30], entre 0,2 ppm y 0,7 ppm; Chandan [7], entre 3 ppm y 5 ppm; Friedrich y Guenter [13], 0,2 ppm difieren de los encontrados en este trabajo, donde se obtuvieron valores mínimos de 2,24 ppm y valores máximos de 24,8 ppm; tal diferencia pudiese ser debida a:

1. En el presente trabajo se tomaron muestras de leche a nivel de ubre y no mezclas de varios animales como los otros autores;
2. La mayoría de las muestras analizadas provenían de animales con diversos grados de proceso inflamatorio a nivel de la ubre;
3. Las diferencias de orden técnico y metodológico aplicadas para la determinación de la concentración de benzoato.

El ácido benzoico en el organismo animal puede provenir de dos fuentes: la primera de ellas, a través de la alimentación, siendo particularmente ricas las frutas [28] y los alimentos ordinarios de los herbívoros [20]; la otra fuente de ácido benzoico está constituida por la degradación microbiana de la tirosina a nivel del rumen, el cual es un aminoácido aromático [19,27,28]. Balba y Evans [5] en 1980, demostraron *in vitro* la formación de ácido benzoico como un compuesto intermedio, a través de una fermentación metanogénica por una asociación bacteriana.

El organismo cuenta con un mecanismo de protección contra la intoxicación con ácido benzoico, mediante su conjugación con la glicina y síntesis del ácido hipúrico, el cual es un producto inofensivo y rápidamente excretado en la orina [20]. La síntesis del ácido hipúrico tiene lugar en el riñón, pero puede realizarse también en el hígado [28], pudiendo ser éste el mecanismo a través del cual se excrete por la leche. Stuart [29], identificó al ácido hipúrico como un constituyente del nitrógeno no proteico de la leche.

Baird-Parker [4], al igual que Deibel y Seeley [11] señalan al *Streptococcus agalactiae* y al *Staphylococcus aureus*, como capaces de degradar al ácido hipúrico hasta benzoato y glicina.

Estos planteamientos y la variación en cuanto a concentración de benzoato en fincas conseguida en el presente trabajo, sugieren un efecto por la alimentación y tipo de agente, ya que en los patógenos mayores conseguidos se encuentran los señalados como capaces de degradar al ácido hipúrico.

Clark y Fina [9] así como Kaiser y Hanselman [16], demostraron la utilización de ácido benzoico por bacterias anaeróbicas facultativas, gran negativas, a través de la vía aeróbica y anaeróbica, siempre que estén presentes poblaciones simbióticas. Esto pudiese explicar los resultados encontrados, por cuanto en la leche cruda existe una flora microbiana variada, que difiere entre animales.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El ácido benzoico se encontró naturalmente presente en leche cruda con valores comprendidos entre 2,16 mg/l y 24,8 mg/l, no asociada esta variación a presencia o no de mastitis, pudiendo ser la alimentación uno de los factores que hacen variar estas concentraciones.

A fin de determinar realmente la influencia de la alimentación sobre la concentración de benzoato, deben realizarse ensayos controlados; así mismo deben realizarse determinaciones del ácido benzoico en leches mezcladas a nivel de tanques, a fin de establecer patrones de referencia en el país.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas (CONICIT), por el financiamiento otorgado para realizar el presente trabajo con la subvención Nº S1-2307.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALONSO, F. R. Programas de control de mastitis subclínica bovina en la Cuenca del Lago de Maracaibo. **Rev. Vet. Ven.** Vol. XLVII: 11-29 y 67-93. 1981.
- [2] ALONSO, F.R.; MALDONADO, C.; CASTILLO, A. Perfiles de Incidencia de Mastitis Bovina. **Seminario sobre Producción de Leche en Venezuela.** Maracaibo, Edo. Zulia. Actas del Seminario. Cons. Nac. de Inv. Agr.:126-137. 1973.
- [3] ANDERSON, G. VILLALBA DE.; GUERRERO, M. ALCALÁ DE.; FERRAIZ, M.; RIVERA, S. Identificación y determinación de benzoato de sodio en leches fluidas. **Rev. del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangé"**. XIII (4): 81-89. 1980.
- [4] BAIRD-PARKER, A.C. Genus II. Staphylococcus. In: **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.** 8va ed. EDIT. R.E. Buchanan & N.E. Gibbons. Williams & Wilkins ed. Baltimore: 483-490. 1973.
- [5] BALBA, M.T.; EVANS, CH.A. Methanogenic fermentation of the naturally occurring aromatic amino acids by a microbial consortium. **Bioch. Soc. Trans.** Vol. 8: 625-627. 1980.
- [6] BROWN, R.W.; MORSE, G.E.; NEWBOLD, F.H.S.; SLANETZ, L.W. **Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Mastitis.** National Mastitis Council Inc., Washington, DC: 26pp, 1969.
- [7] CHANDAN, R.C.; GORDON, J.F.; MORRISON, A. Natural benzoate content of dairy products. **Milchwissenschaft.** Vol. 32. Nº 9: 534-537. 1977.

- [8] CHICHESTER, D.F.; TANNER, F.W. Antimicrobial food additives. In: **Handbook of food additives**. C.R.C. Second edition. Ed. Thomas E. Furia: 115-184. 1981.
- [9] CLARK, F.M.; FINA, L.R. The anaerobic decomposition of Benzoic acid during methane fermentation. **Arch. Biochem. Biophysics**. Vol. 35/36: 26-32. 1952.
- [10] CONOVER, C.; DAWES, A.; ROSENBERG, H. Benzoico (ácido), En: **Enciclopedia de Tecnología Química**. Kirk-Othmer 1a. edición. Ed. U.T.H.E.A. Tomo III: 192-240. 1962.
- [11] DEIBEL, R.H.; SEELEY, H.W. JR. Family II. Streptococcaceae fam. nov. In: **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 8va ed. EDIT. R.E. Buchanan & N.E. Gibbons. Williams & Wilkins ed. Baltimore: 490-511. 1973.
- [12] FERRARO, L. Análisis de prevalencia de mastitis subclínica en vacas lecheras en Venezuela, mediante la prueba de California Mastitis Test (CMT) y bacteriología. Universidad Central de Venezuela. Facultad Ciencias Veterinarias. Trabajo de Ascenso. 80pp. 1992.
- [13] FRIEDRICH, D.; GUENTER, L. Presence of benzoic acid in milk and milk products. **Lebensmittelchem Gerichtl. Chem.** Vol. 32. Nº 4:76-77. 1978.
- [14] INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Laboratory methods for use in mastitis work. **International Dairy Federation**. Doc.132:1-26. 1981.
- [15] JIMÉNEZ, M.; ROSAS DE GARCÉS, M.; GAVIDIA, M.; DIAZ, A. Estudio preliminar de la mastitis subclínica en vacas productoras de ciertas zonas altas del Estado Mérida. **XII Jornadas Nacionales de Microbiología**. Edo. Mérida, Venezuela. 31pp. 1981.
- [16] KAISER, J.P.; HANSELMANN, K.W. Aromatic Chemicals through anaerobic microbial conversion of lignin monomers. **Experientia**. Vol. 38:167-176. 1982.
- [17] KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; DOWELL, V.R.; SOMMERS, H.M. **Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**. 3ª edición. Lippincott, Philadelphia: 840. 1988.
- [18] KURIZAKI, J., SASAGO, K., TSUGO, T.; YAMAUCHI, K. Formation of benzoic acid in cheese. **J. of The Food Hyg. Soc. Japan**. Vol. 14. Nº 1:25-30. 1973.
- [19] MARTIN, A.K. Urinary aromatic acid excretion by fed and fasted sheep in relation to protein metabolism in the rumen". **Br. J. Nutr.** Vol. 30: 251-267. 1973.
- [20] MAYNARD, L. Las proteínas y su metabolismo. En: **Nutrición Animal**. Ed. U.T.H.E.A. 30ª Edición: 93. 1968.
- [21] McFADDIN, J.F. **Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria**. 2da. ed. Williams y Wilkins, Baltimore: 184.1980.
- [22] OVERSTROM, H.; REIGO, J.; BORGSTROM, S. Preliminary study concerning formation of benzoic acid in cheese. **Milchwissenschaft**. Vol. 27. Nº 11: 705-708. 1972.
- [23] POUTREL, B.; RAINARD, P. California Mastitis Test: guide of selective dry cow therapy. **J. Dairy Sci.** Vol. 64: 241-248. 1981.
- [24] SCARAMELLI, A.M. Comparación de tres métodos indirectos de detección de Mastitis subclínica. Facultad Ciencias Veterinarias. Universidad Central de Venezuela. (Tesis de Grado). 109pp. 1988.
- [25] SCARAMELLI, A.M. Evaluación de la aceptación y efectividad de un programa de control de mastitis basado en Higiene y Terapia de Vaca seca en once fincas en Venezuela. Facultad Ciencias Veterinarias. Universidad Central de Venezuela. (Trabajo de Ascenso). 130pp. 1993.
- [26] SCHALM, O.W.; NOORLANDER, D.O. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** Vol.130: 199-204. 1957.
- [27] SCOTT, T.W.; WARD, P.F.V.; DAWSON, R.M.C. The formation and metabolism of phenyl-substituted fatty acids in the ruminant. **Biochem. J.** Vol. 90:12-23. 1964.
- [28] SPINETTI B., M. Manual de Bioquímica. 40ª ed. Edit. Científico-Médica. Barcelona: 791-794. 1964.
- [29] STUART, P.A. The presence of hippuric acid in milk. **J. Dairy Sci.** Vol. 36:943-947. 1953.
- [30] SVENSEN, A. Hippuric acid and benzoic acid in milk and dairy products. **Meieroposten**. Vol. 63. Nº 33/34:704-707. 1974.
- [31] TOPPINO, P.M.; VOLPATO, R.; AMELOTI, G.; CONTARINI, G. Determinazione quantitativa HPLC di acido sorbico e acido benzoico nei prodotti lattiero-caseari. **Sci. Tec. Latt. Casearia**. Vol. 41. Nº 2:137-152. 1990.
- [32] WATTS, J.L. Isolation and Identification of mastitis pathogens, In: **Dairy Research Report**. Ed. S.C. Nickerson. Luisiana State University:357-358. 1990.
- [33] WATTS, J.L.; OWENS, W.C. Laboratory Procedures on Bovine Mastitis, In: **Dairy Research Report**. Ed. S.C. Nickerson. Luisiana State University:359-365. 1990.