

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO, CALIDAD DE LA  
CARNE Y DETECCIÓN DE RESIDUOS DE  $\beta$ -  
AGONISTAS EN MUESTRAS DE HÍGADO DE  
TORETES ESTABULADOS EN EL TRÓPICO**

**TESIS  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**PRESENTA  
FERNANDO SÁNCHEZ BARRÓN**

**Asesor:**

**MVZ MC Fernando Livas Calderón**

**México, D. F.**

**2005**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## DEDICATORIAS

A mis Padres: Fernando Sánchez Carmona y María Terecita Barrón Manrique por su amor, apoyo, ayuda, confianza, tiempo, por estar siempre conmigo, por preocuparse por mi, por darme ánimos cada vez que los necesitaba, por ser el pilar más importante de mi vida, porque sin ellos, no existirían estas líneas, porque gracias a ustedes he escalado un peldaño más en mi vida y me he forjado como hombre responsable, son mi ejemplo a seguir como personas, como pareja y como familia. Parte de este logro es por ustedes

A mi segunda madre y tía Carolina G. Barrón Manrique a quien quiero mucho y que desde bebé siempre me ha cuidado y ha visto por mi en todo momento porque es una de las personas mas importantes en mi vida y como una muestra de gratitud respeto y cariño, ya que por sus sabios consejos, apoyo, cariño y confianza que ha puesto en mi a lo largo de toda mi vida he podido concluir esta etapa de mi vida.

A mi hermano Luis Felipe Sánchez Barrón por los buenos y malos ratos y por apoyarme siempre.

A toda mi familia porque son parte de este logro, porque han recorrido a mi lado este camino, porque jamás perdieron la confianza en mi, porque cuando encontré oscuridad ellos me iluminaron porque cuando caí me levantaron y porque han llegado a la meta conmigo.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por darme la vida, ser la luz a seguir y estar conmigo en todos los momentos de mi vida y ponerme en este hermoso mundo de la Medicina Veterinaria.

A mis padres por ser el motivo de superación, por ser tan pacientes conmigo y por darme su apoyo incondicional.

Al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical (CEIEGT), Rancho el “Clarín” y a todo su personal académico y administrativo por todo el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

En especial doy un profundo y más sincero agradecimiento a mis asesores MVZ MC Fernando Livas Calderón y MVZ René Rosiles Mortínez por llevarme de la mano en el proceso de éste trabajo, por su confianza, tiempo y apoyo que me brindaron desinteresadamente en la elaboración de este trabajo, por su sincera amistad, por sus valiosos consejos y por enseñarme a ser un profesional capacitado y responsable.

Al MVZ MC. Miguel Ángel Alonso Díaz y al personal del laboratorio Sr. Jorge Becerra López: Gracias por sus consejos, por ser unos grandes amigos y por los conocimientos que me enseñaron para ser un mejor profesional y poder salir adelante.

Mi más grande reconocimiento a los miembros del honorable jurado: MVZ Evaristo Barragán Hernández, MVZ Edgardo Canizal Jiménez, MVZ José Fernando Núñez Espinosa, MVZ Fernando Livas Calderón, MVZ Miguel Ángel Alonso Díaz por su pronto apoyo en la revisión de éste trabajo y sus amables comentarios.

Al Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal (CENAPA) en especial al MVZ Hugo Fragoso Sánchez, MVZ Ofelia Flores

Hernández, QFB Maria Elena González Ruiz por las facilidades y el apoyo que gentilmente me brindaron en el CENAPA para la realización de éste trabajo.

Al Ingeniero Químico Orlando Quintero Martínez por su paciencia, amistad y enseñanza en el uso del Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) con detector de fluorescencia

Al Biólogo Xavier Ontiveros Fernández por su amistad y enseñanza en el uso de la prueba de inmunoensayo enzimático (ELISA) para la detección de clenbuterol.

Al propietario del rastro frigorífico “Carnes Supremas del Golfo”: Lic. Jesús Mercado por permitir la realización de las evaluaciones de calidad para este trabajo.

Al jefe de matanza Sr. Miguel Cabrera por brindarme su confianza, por su contribución y aportaciones que fueron bases importantes en esta investigación.

A una gran amiga Josefina López Bonilla por brindarme siempre su apoyo desinteresado, su simpatía, su sinceridad y ante todo su gran amistad que me hizo vivir momentos muy padres y que me apoyo en los momentos difíciles. ¡Gracias por siempre!

Al Dr. Martín Camacho Eslava, por su valiosa colaboración en la obtención de las muestras de hígado

A mis amigos de generación 2000 – 2004 por compartir conmigo su amistad y conocimientos en la formación como profesionistas.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por mi formación profesional, por las vivencias, por los amigos, por los doctores, por los conocimientos adquiridos en ella, por las oportunidades que dentro de ella pude tener.

A mi Alma Mater: La Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por permitirme formar parte de esta institución, es para mi un honor y prestigio pertenecer a la máxima casa de estudios de Latinoamérica, por lo que siempre tendré un gran compromiso, el cual es poner muy en alto el nombre de México y de la UNAM.

Es para mi un orgullo, llevar el escudo universitario y sus colores azul y oro grabados en mi corazón, los cuales siempre los portaré con gran satisfacción y respeto.

La realización de éste trabajo es la manera de regresar un poco de lo mucho que me ha dado la Universidad, así que espero que el presente, sea de gran ayuda a todos los futuros profesionistas de la Medicina Veterinaria y Zootecnia o afines, teniendo para mi una gran satisfacción, el saber que el esfuerzo realizado durante la carrera, ha dado frutos.

<b>DEDICATORIAS</b> .....	i
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	ii
<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	3
<b>2. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	5
2.1 Generalidades de los $\beta$ -adrenérgicos .....	5
2.2 Estructura Química de la ractopamina y el Clenbuterol .....	7
2.3 Propiedades físicas del Clenbuterol.....	8
2.4 Propiedades fisicoquímicas de la Ractopamina .....	8
2.5 Mecanismo de acción de los $\beta$ -adrenérgicos .....	9
2.6 Tiempo de eliminación del Clenbuterol .....	10
2.7 Efectos de los $\beta$ -agonistas en los animales.....	10
2.8 Dosificación y Tiempo de Retiro .....	11
2.9 Residuos Máximos Permisibles en Tejidos de acuerdo a la FAO/OMS ..	12
2.10 Relación entre la Estructura y la Actividad de los $\beta$ -adrenérgicos.....	12
2.11 Utilización en la Producción de Carne Bovina .....	13
2.12 Técnicas Analíticas para Detección de Residuos de $\beta$ - agonistas en Hígado .....	14
2.13 Concentraciones Permisibles de Clenbuterol en Diferentes Tejidos de Bovinos de acuerdo a la Comunidad Económica Europea (CEE). .....	16
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	17
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	18
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	18
5.1 GENERALGeneral .....	18
5.2 ESPECÍFICOS.....	18
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	19
6.1 Localización del área donde se llevó a cabo el estudio.....	19
6.2 Tratamientos .....	19
6.3 Estimación del rendimiento de canal .....	19
6.4 Determinación de $\beta$ -adrenérgicos en muestras de hígado .....	20
6.5 Análisis estadístico .....	20
<b>7. RESULTADOS</b> .....	21
<b>8. DISCUSION</b> .....	23
8.1 Peso de la canal caliente (PCC) y fría (PCF) .....	23

8.2 Rendimiento en canal (RC) .....	24
8.3 Color de la carne .....	26
8.4 Distribución (DGD) y grosor de la grasa dorsal (GGD).....	26
8.5 Color de la grasa dorsal .....	27
8.6 Residuos de $\beta$ - agonistas en muestras de hígado .....	28
<b>9. CONCLUSIONES</b> .....	<b>32</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>33</b>



## **INDICE DE FIGURAS**

### **FIGURA 1**

Peso promedio de la canal caliente (PCC) de toretes estabulados en el trópico con el uso de beta agonistas..... 44

### **FIGURA 2**

Peso promedio de la canal fría (PCF) de toretes estabulados en el trópico con el uso de beta agonistas ..... 44

### **FIGURA 3**

Rendimiento de la canal caliente (RCC) de toretes estabulados en el trópico con el uso de beta agonistas..... 45

### **FIGURA 4**

Rendimiento de la canal fría (RCF) de toretes estabulados en el trópico con el uso de beta agonistas ..... 45

### **FIGURA 5**

Color de la carne (CC) de toretes estabulados en el trópico con el uso de beta agonistas..... 46

### **FIGURA 6**

Color de la grasa dorsal (CGD) de toretes estabulados en el trópico con el uso de beta agonistas ..... 46

### **FIGURA 7**

Distribución de la grasa dorsal (DGD) de toretes estabulados en el trópico con el uso de beta agonistas ..... 47

### **FIGURA 8**

Grosor de la grasa dorsal (GGD) de toretes estabulados en el trópico con el uso de beta agonistas ..... 47

### **FIGURA 9**

Promedio de edades de toretes estabulados en el trópico con el uso de beta agonistas..... 48

### **FIGURA 10**

Concentraciones de clenbuterol en muestras de hígado de toretes estabulados en el trópico con el uso de beta agonistas ..... 49

### **FIGURA 11**

Concentraciones de ractopamina en muestras de hígado de toretes estabulados en el trópico con el uso de beta agonistas ..... 49

## **INDICE DE CUADROS**

### **CUADRO 1**

Parámetros de clasificación de calidad de la carne..... 50

### **CUADRO 2**

Concentraciones de clenbuterol en muestras de hígado de toretes estabulados en el trópico por ELISA. Veracruz, México, 2005. .... 51

### **CUADRO 3**

Concentraciones de ractopamina en muestras de hígado de toretes estabulados en el trópico por HPLC con detector de fluorescencia. Veracruz, México, 2005..... 52

## **INDICE DE ANEXOS**

**ANEXO 1**..... 53

Glosario de Términos..... 53

Normatividad..... 54

**ANEXO 2**..... 56

Determinacion de ractopamina por el método de HPLC..... 56

Determinacion de clenbuterol por el metodo de inmunoensayo enzimático (ELISA) ..... 61

**FERNANDO SÁNCHEZ BARRÓN. Evaluación del rendimiento, calidad de la carne y detección de residuos de  $\beta$ -agonistas en muestras de hígado de toretes estabulados en el trópico. (Bajo la dirección de: MVZ. MC Fernando Livas Calderón).**

**RESUMEN**

Se evaluó el efecto de 2  $\beta$ -agonistas sobre el rendimiento de la canal caliente (RCC) y fría (RCF), calidad de la carne (color de la carne (CC), color de la grasa dorsal (CGD), distribución de la grasa dorsal (DGD), grosor de la grasa dorsal (GGD)) y la detección de residuos en muestras de hígado en toretes estabulados en el trópico. El trabajo se realizó en el rastro frigorífico “Carnes Supremas del Golfo” y tuvo una duración de 120 días. Se utilizaron 50 canales de toretes provenientes de 2 ranchos de engorda, diferentes, las cuales fueron asignadas a los tratamientos. T1: canales de ganado alimentado con 300g de ractopamina/ton de alimento 42 días antes del sacrificio sin tiempo de retiro y T2: canales de ganado alimentado con 1g de clenbuterol/ton de alimento 60 días antes del sacrificio sin tiempo de retiro. Las muestras de hígado para la detección de residuos (n=10), 5/clenbuterol y 5/ractopamina fueron procesadas por la prueba cuantitativa de ELISA para clenbuterol y HPLC para ractopamina en el Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal (CENAPA). El análisis estadístico se realizó por medio del paquete SPSS (Statistical Package for Social in Science) 10.0 para Windows con el cual se realizo la prueba de t de “student” para comparación de medias y la prueba de “U de Mann-Witney” como estadística no paramétrica para comparar los promedios con distribución anormal. Los pesos de la canal caliente (PCC) para T1 y T2 fueron estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ ), siendo los valores de 296.2kg y 320kg respectivamente. Los pesos de la canal fría (PCF) fueron de 288kg y 314.4kg para T1 y T2, respectivamente, existiendo diferencias entre si ( $P < 0.05$ ). En cuanto al RCC para el T1 y T2 fue de 67% para ambos, no observándose diferencias estadísticamente significativas entre si ( $P > 0.05$ ). Para el RCF se observó que fue del 65% tanto para T1 como para T2 sin mostrar diferencias estadísticamente significativas entre si ( $P > 0.05$ ). En cuanto al CC para T1 y T2 fue de 3 (rojo claro) y 4 (rojo oscuro) respectivamente, existiendo diferencias significativas entre si ( $P < 0.05$ ).

De la misma manera para el CGD se encontró un color más claro en el T1 con 2 mientras que para T2 fue 3 ( $P < 0.05$ ). Por otro lado, la DGD para T1 fue de 53% y en T2 de 67%, encontrándose diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ). Para el GGD no se observaron diferencias estadísticas ( $P > 0.05$ ) siendo los resultados para T1 y T2 de 5mm y 6mm, respectivamente. En cuanto a los residuos de clenbuterol en el hígado, las concentraciones fueron de 12,758.0, 13,344.1, 11,667.9, 16,365.1 y 10,445.6 ppt (partes por trillón) para las muestras del 1 al 5. Con respecto a los residuos de ractopamina en hígado, estos no fueron detectados en las muestras analizadas debido a la sensibilidad del equipo cuya escala de detección fue de 1.30 a 7.81 ug (microgramos). Para conocer la dosis de detección calculada, multiplicamos la cantidad mínima detectable en la escala de detección por el tamaño de la muestra y es de  $1.30 \text{ ug} \times 40\text{g} = 52 \text{ ug}$  (microgramos).

Estos 52 ug está muy por encima del límite máximo permisible de ractopamina por la FAO y OMS.

Se puede concluir que con el clenbuterol mejoró el peso de la canal en caliente y frío, así como la distribución de la grasa dorsal; sin embargo el color de la carne presentó un color indeseable para el consumidor; en cambio la ractopamina mejoró el color de la carne y el color de la grasa dorsal. En cuanto a los residuos de éstos dos fármacos en el hígado, se obtuvieron concentraciones de clenbuterol por encima de los límites permisibles ( $< 2000$  ppt) según la Unión Europea. Con respecto a la ractopamina la sensibilidad del método y el tamaño de la muestra no permitieron llegar hasta las concentraciones máximas permisibles; por esto resultaron negativas.

# 1. INTRODUCCIÓN

En Veracruz, los ganaderos productores de carne venden su ganado en pie a precios variables y poco estables, lo que hace poco atractiva y rentable dicha actividad. Una alternativa de comercialización en donde se obtiene un precio más justo es la venta del ganado en canal, siendo importante el peso vivo ya que está directamente relacionado con la comercialización, pero lo que determina el precio final es el peso de la canal o sea el rendimiento; por esto, las canales de mayor valor económico son las de mejor rendimiento y calidad (1, 2, 3).

El conocimiento de las diferencias de calidad entre canales repercute económicamente al grado que en muchas ocasiones ha marcado cambios en el curso de la industria cárnica a nivel internacional (4). Entre los factores que más afectan el rendimiento en canal, está el tipo de alimentación, raza, edad y peso al sacrificio (5).

La tendencia en la comercialización de carne bovina de México, indica las canales de mayor calidad y rendimiento serán las que tengan también el mayor rendimiento económico. Sin embargo, resulta necesario adoptar criterios para valorar la calidad de la carne producida en el trópico, así como considerar la opinión del consumidor, la cual se relaciona con una combinación de características organolépticas que son: sabor, suavidad, jugosidad y color (6).

Las características más importantes que se consideran en la estimación de la calidad de la carne son el rendimiento en canal, deposición, textura y color de la grasa dorsal; textura, color, marmoleo y área del ojo de la costilla (7).

El color de la carne es el factor de calidad más importante que afecta la decisión del consumidor final valorándose positivamente el color rojo brillante y rechazándose un color rojo oscuro, es decir con un color atractivo el producto se vende fácilmente (8).

La presencia de la grasa en la carne tiene una gran importancia en la calidad de la misma, ya que influye en la textura, jugosidad y sabor. Moderadas cantidades de grasa en la carne, son necesarias para lubricar las fibras musculares y favorecen la jugosidad y sabor del producto, además de que la grasa de cobertura o dorsal protege a la carne del acortamiento por el frío y las

pérdidas durante la conservación evitando las quemaduras en el músculo durante la congelación (9). Otro factor importante de calidad es el color de la grasa dorsal, con valores de 1 (blanco aperlado) a 6 (amarillo naranja). Generalmente el ganado alimentado con grano, produce más grasa de color blanco aperlado en contraste con los forrajes verdes que producen grasa de color amarillo por los  $\beta$ -carotenos que se acumulan, precursores de vitamina A. Actualmente el consumidor de carne bovina exige un producto suave y con poca grasa. Para lograr esto, desafortunadamente los engordadores utilizan en las dietas de finalización algunos  $\beta$ -adrenérgicos como el clenbuterol, clorhidrato de zilpaterol y la ractopamina, los cuales son derivados de las catecolaminas como las fenetanolaminas (adrenalina, noradrenalina y dopamina) y están clasificados dentro de los agentes repartidores de energía, los cuales actúan sobre el metabolismo del músculo y células adiposas para modificar la utilización normal de los nutrientes y la energía para formar masas musculares más prominentes y con menos tejido graso. Su acción sobre el metabolismo de la grasa es aumentar la lipólisis y reducir la lipogénesis. En el tejido muscular reduce la proteólisis (10).

El clorhidrato de ractopamina es un nuevo aditivo alimenticio para el ganado utilizado durante la finalización, para incrementar la ganancia diaria de peso, aumenta el rendimiento de la canal, incrementa el área de ojo de la costilla “rib eye” en mas de  $\frac{1}{2}$  pulgada, incrementa el nivel muscular en el “sirloin” y aumenta la eficiencia alimenticia en un 14-21%, manteniendo el sabor natural de la carne, jugosidad y terniza; presenta un mínimo impacto en el grado de marmoleo, no tiene periodo de retiro que se le denomina periodo de retiro “cero” (que en realidad es de 12 horas). Es un aditivo para uso en novillos y novillotas al mercado durante los últimos 28 – 42 días de estabulación. La dosis señalada es de 70 – 430 mg/cabeza/día (11).

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Generalidades de los $\beta$ -adrenérgicos

El uso de  $\beta$ -adrenérgicos se está incrementando para mejorar el rendimiento en canal de varias especies domésticas. Entre estos destacan el clenbuterol, zilpaterol y la ractopamina del grupo de las fenetanolaminas. Se puntualiza como es que afectan al equilibrio de las especies animales y como repercuten en el bienestar de salud pública en México y el mundo. El exceso de este tipo de compuestos ha llegado a presentar complicaciones para la salud humana como intoxicaciones por residuos de sustancias químicas ( $\beta$ -agonistas) (10).

El clenbuterol fue aprobado para utilizarse en Medicina Veterinaria en 1978 por vía parenteral y oral en más de 20 países y por su eficacia se considera que el clenbuterol es una parte esencial en el arsenal disponible para el clínico tanto en medicina humana como en medicina veterinaria. El uso indebido del clenbuterol inicia desde que la patente expira y se convierte en un producto genérico entre 1985 y 1988. El mal uso de los  $\beta$ -agonistas es el resultado de un manejo y comercialización no controlada de compañías que venden el clenbuterol como sal pura o a granel. En 1984 era ya ampliamente conocido que los  $\beta$ -agonistas incluyendo al clenbuterol podría influenciar el desempeño productivo de los animales destinados para consumo humano (12).

El clenbuterol, es peligroso para la salud pública en término de estimulación cardiovascular que se deriva de la ingestión de productos cárnicos provenientes de animales tratados con éste fármaco y en los que no se observó un tiempo de retiro y representa un acto ilegal y por tanto reprobable. Sin embargo, y como consecuencia de que se obtienen importantes ganancias en el rendimiento de la canal, se sabe de su uso clandestino en el ganado de engorda.

A partir de la década de los 90, el clenbuterol se está usando en forma clandestina por los engordadores de ganado para incrementar el peso del animal y lograr mejores resultados de apariencia en carne, puesto que resulta más jugosa y magra, dado que es un fármaco que se absorbe bien por vía oral, que después de su absorción se distribuye ampliamente hacia los tejidos,

traspasando incluso en algunas especies la barrera placentaria (bovinos y cerdos) (13).

El 19 de septiembre del 2002, la Secretaría de Salud autorizó el uso de otro  $\beta$ -agonista llamado ractopamina para la alimentación animal. Respecto a la inocuidad para el consumo de la carne y vísceras, manifestó que la dosis utilizada bajo el registro, implica un margen de seguridad para que los usuarios no tengan ningún riesgo (14).

El 28 de enero de 2004, el laboratorio Elanco (Elanco Animal Health) fabricó la ractopamina comercial aceptada por la SAGARPA como un aditivo alimentario medicado para uso exclusivo en la engorda de novillos o novillas para abasto. La ractopamina es tan débil farmacológicamente en el ser humano que se biotransforma y depura con rapidez en los animales, tanto que es imposible considerar que induzcan efectos cardiovasculares adversos aun consumiendo productos cárnicos provenientes de bovinos en los que no se guardo ningún tiempo de retiro (15).

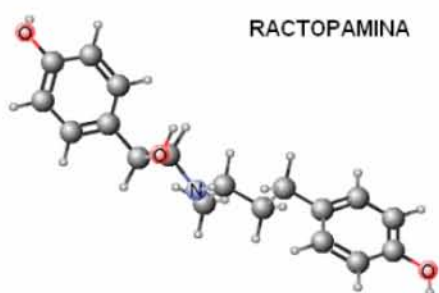
Son medicamentos que requieren la presencia de un anillo aromático con un grupo hidroxilo en la posición  $\beta$  del grupo alifático para mostrar actividad. La presencia del grupo nitrogenado y la sustitución de R por un grupo voluminoso, a menudo cíclico, no alifático, hace más específica a la molécula por los receptores  $\beta$ - adrenérgicos. Con excepción de este último las catecolaminas naturales epinefrina y norepinefrina son muy similares a los  $\beta$ - adrenérgicos. Pero el clenbuterol como la ractopamina muestran importantes diferencias en las actividades intrínsecas. Para los  $\beta$ - adrenérgicos las sustituciones del anillo aromático son importantes para obtener una actividad definida.

Algunos  $\beta$ -agonistas se biotransforman e inactivan rápidamente por las catecol-o-metil-transferasas (COMT) tisulares que mutilan los hidroxilos en el anillo aromático tal es el caso de la dobutamina e isoproterenol. En contraparte la ractopamina y otros no son sustratos para la COMT y solo son biotransformados por glucoronidación hepática. Cuando los OH- son sustituidos por un halógeno como es el caso del clenbuterol (cloro), se evita la biotransformación hepática (16).

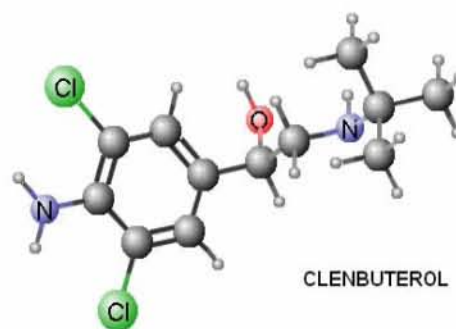


Al mismo tiempo la presencia del cloro lo hace sea más liposoluble que sus análogos y tiende a difundir más profundamente en los tejidos y la grasa animal (17, 18, 19, 20). Sin embargo, la ractopamina y los demás  $\beta$ - adrenérgicos serían más liposolubles de no ser porque la amina que todos tienen se encuentra protonada a pH fisiológico o menor, como el del estómago. Esta amoníaco les confiere valores de pKa de, por lo menos, 8.5 y generalmente superiores a 10. (21, 22, 23, 24, 25, 26, 27). Con estas características no son solubles en solventes orgánicos a pH fisiológico y la mayoría son solubles en agua o metanol (21, 28, 29).

## 2.2 Estructura Química de la ractopamina y el Clenbuterol



Peso Molecular: 301.38 g/mol  
Fórmula molecular: C<sub>18</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>3</sub>  
Nombre químico: Benzenemethanol, 4-hydroxy-alpha-3-(4-hydroxyphenyl)-1-methylpropyl-amino-methyl.



Peso Molecular: 277.19 g/mol  
Fórmula molecular: C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O  
Nombre químico: 4-amino-3,5-dicloro- $\alpha$ -terbutil-aminometil-bencil alcohol.

## **2.3 Propiedades físicas del Clenbuterol**

Puede tener 2 presentaciones, en sólido y otra en líquido. En sólido como polvo es incoloro o como sustancia líquida de color blanco amarillento, un punto de fusión de 174 °C. El polvo es muy soluble en agua, metanol y etanol, ligeramente soluble en cloroformo y el líquido, es soluble en agua, metanol y etanol y muy soluble en cloroformo. Es estable en agua caliente (100 °C) y en aceite caliente (260 °C), por lo que no se descompone con los procesos de ebullición, rostizado, freído ni en microondas.

El clenbuterol es una arilamina de acción prolongada, se metaboliza por reacciones de N-oxidación en ocho metabolitos, dos de los cuales (N-hidroxyarilamina y N-nitrosoclenbuterol) son más tóxicos que el compuesto original. Presenta una eliminación bifásica, la primera ocurre a las 10 horas después de haberse suspendido la administración y la segunda después de varios días y se excreta por orina (30).

## **2.4 Propiedades fisicoquímicas de la Ractopamina**

El clorhidrato de ractopamina se puede encontrar de 2 maneras: líquida y sólida (polvo blanco con granulometría controlada). Es muy soluble en agua sin importar su pH, es soluble en metanol y prácticamente insoluble en otros solventes orgánicos.

Es altamente estable a temperatura ambiente. Farmacológicamente el clorhidrato de ractopamina es considerado como un  $\beta$ -agonista repartidor de nutrientes. Los repartidores de nutrientes actúan directamente sobre el metabolismo del tejido muscular y tejido adiposo para modificar la utilización que normalmente realizan estos tejidos de los nutrientes ingeridos en la dieta. Su efecto principal es el aumento del tejido muscular y la disminución del tejido graso. El clorhidrato de ractopamina es extraído de los tejidos con metanol ácido/ agua (90:10 v/v). Una alícuota del extracto es diluido con una solución de ácido acético al 2%. Una alícuota de la muestra diluida es analizada por cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de fluorescencia (31).

## 2.5 Mecanismo de acción de los $\beta$ -adrenérgicos

Los  $\beta$ -adrenérgicos son moléculas orgánicas que se unen a los receptores  $\beta_2$  dando lugar al complejo agonista-receptor, que a su vez activa a la proteína Gs. La subunidad  $\beta$  de la proteína Gs activa a la adenilato-ciclasa, enzima que produce el monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), una de las principales moléculas de señalización intracelular. Esta molécula produce sus efectos al unirse a la subunidad reguladora de la cinasa proteínica A para liberar la subunidad catalítica que fosforila a un buen número de proteínas intracelulares. Estas proteínas tienen papeles funcionales vitales para una variada gama de funciones que van desde permitir la entrada de calcio a la célula, hasta mediar la síntesis de proteínas clave para el funcionamiento celular (18, 32, 33).

La magnitud de la actividad fisiofarmacológica de un  $\beta$ -agonista dependerá de su denominada actividad intrínseca en el receptor y distribución en los tejidos blancos. Uno de los efectos más obvios derivado de la administración oral de los  $\beta$ -agonistas en el ganado es el aumento de la masa muscular (34) por el aumento de la síntesis proteínica muscular y una disminución en la degradación de proteína muscular (35).

La aplicación de  $\beta$ -agonistas causa incremento en la cantidad de ARNt para varias proteínas del músculo esquelético. En este contexto se incrementan el ARNm para la miosina de cadena ligera (34), el ARNm de la  $\beta$ -actina (36) y el inhibidor de la proteasa calpaina calpastatina (37). Los  $\beta$ -agonistas pueden incrementar el flujo sanguíneo a ciertas regiones del cuerpo. Este aumento permite el proceso de hipertrofia en el músculo esquelético al transportar mayores cantidades de sustratos y fuentes de energía para la síntesis de proteína.

Otra de las principales acciones de los  $\beta$ -agonistas es la disminución en la cantidad de grasa de la canal debido a una actividad lipolítica aumentada y una actividad lipogénica disminuida (38, 39, 40, 41). Se ha demostrado *in vitro* la degradación de triglicéridos en adipositos y la inhibición de la síntesis de ácidos grasos y de triacilglicerol (42, 43). La elevación de la concentración plasmática de ácidos grasos no esterificados después de la administración de un  $\beta$ -agonista, confirma la actividad lipolítica que ocurre en los adipositos.

## 2.6 Tiempo de eliminación del Clenbuterol

Para el clenbuterol se tiene un tiempo de eliminación de la siguiente manera:

(31).

- Hígado – 56 días
- Retina – 5 meses
- Riñón – 17 a 21 días
- Músculo – 6 a 7 días
- Pelo – Hasta que el animal mude el pelo
- Orina – 17 a 21 días
- Suero – 3 días

En un estudio realizado por Sauer, *et al* en 1994 (44), se administró clenbuterol vía oral a diez veces la dosis terapéutica (10mg/kg de peso cada 12 horas durante 21 días) en becerros Holstein Friesian y se determinaron las principales variables farmacocinéticas y el patrón de eliminación de los residuos en los órganos y tejidos habituales. Se determinaron residuos a las 6 horas y a los 1, 2, 4, 8 y 16 días después de haber terminado el tratamiento. Las concentraciones de clenbuterol, fueron más elevadas en el hígado que en el riñón, bilis y orina, a partir del día dos de retiro. Sin embargo las concentraciones en la retina fueron diez veces mayores que en el hígado en todos los tiempos después de terminar el tratamiento.

La situación de los residuos es distinta para la ractopamina, su tiempo de eliminación por matriz es mucho más rápida. Se ha calculado que en tan solo 24 – 48 horas se reducen las concentraciones del fármaco y metabolitos. Sin embargo, durante la medicación con ractopamina se encuentran en la orina concentraciones de 44 – 473ng/ml (ppt) y se les sigue detectando hasta las dos semanas posteriores al final de la medicación (45).

## 2.7 Efectos de los $\beta$ -agonistas en los animales

La adición de clenbuterol al alimento de los animales a dosis elevadas y carentes de control, que además se mantienen hasta el momento del sacrificio, conduce a la acumulación de grandes cantidades en los tejidos comestibles, especialmente en el hígado. Estos acúmulos pueden originar intoxicaciones en

las personas que consumen dichos tejidos cuando el periodo de retiro del fármaco, no ha sido suficiente como para que desaparezca totalmente de los productos destinados a consumo humano. El consumo de hígado con concentraciones elevadas de clenbuterol ha dado lugar a episodios de intoxicación que cursan con temblores musculares, taquicardias y palpitaciones acompañados frecuentemente de nerviosismo, cefaleas y mialgias con una duración aproximada de 40 horas (46, 47).

Existen reportes que indican que la persistencia de clenbuterol en plasma y orina es baja, pero este persiste en el hígado a niveles mucho más altos, que en otros tejidos comestibles y es detectable en el hígado por arriba de 2 semanas después del retiro de la droga del alimento de los animales (48).

En bovinos el clenbuterol induce a dosis bajas, consideradas como promotoras del rendimiento productivo: aumento de la presión sanguínea, incremento transitorio de la frecuencia cardiaca durante 24 horas aproximadamente incremento de la tasa metabólica, se ha informado que aumenta la tasa de cojeras (49). No se tienen documentados los efectos de una sobre dosis de clenbuterol en esta especie, pero no deben diferir de lo anterior en su magnitud (13). Por otro lado no se han documentado efectos tóxicos de la ractopamina en bovinos sobredosificados y, evidentemente, menos en el ser humano, ya que este producto es de uso veterinario exclusivo y a la fecha no se ha sospechado de un efecto tóxico por la ingesta de productos cárnicos derivados del uso de ractopamina (50).

## **2.8 Dosificación y Tiempo de Retiro**

La dosis promotora del crecimiento óptima del clenbuterol en el ganado, es aproximadamente de 0.8mg/kg de peso. Pero como se ha visto que se pueden mejorar aún más los rendimientos de las canales, no es raro que los productores administren al ganado bovino de cinco hasta diez veces la dosis mencionada. El incremento en el rendimiento en canal no es lineal al incremento en la dosis, se afecta a dosis elevadas el bienestar del animal y se puede afectar su salud, por lo que ésta práctica no es justificable y el razonamiento es más bien primitivo (32, 51, 52).

Con base en el criterio de cero residuos, Elliot (45), recomienda un tiempo de retiro de cuatro semanas cuando se utiliza una dosis convencional para mejorar el rendimiento en canal, sin embargo, no hace referencia al tiempo requerido utilizando otras dosificaciones.

La ractopamina está indicada para el ganado bovino de carne en la etapa de finalización (28 a 42 días antes del sacrificio) a una dosis de 70 – 430mg/cabeza/día. La FDA (Food and Drug Administration) le ha concedido un tiempo de retiro de cero días en virtud del Límite de no efecto tan alto que se ha derivado de estudios de toxicidad (53).

## **2.9 Residuos Máximos Permisibles en Tejidos de acuerdo a la FAO/OMS y Union Europea**

El método aprobado para determinar la seguridad del consumidor, se basa en los conceptos de consumo diario aceptado (CDA) y el límite de residuos permisibles (LMR). El CDA se calcula con el nivel máximo sin efecto del medicamento, multiplicado por el peso del consumidor sobre el factor de seguridad. El LMR se determina tomando en cuenta los consumos locales de los alimentos y un factor de seguridad. Para el clenbuterol el CDA es de 0.04mg/kg según la FAO/OMS. Los LMR para el músculo y grasa del ganado es 0.2mg/kg, de 0.05mg/kg en leche y de 0.6mg/kg en hígado y riñón (54). Cada kg de producto de origen animal puede contener 125ng (125 ppt) de clenbuterol activo y no se presentarán reacciones adversas en el hombre (55). Según la FAO Y OMS los niveles permisibles en hígado son de  $\leq 0.15$  ppm para ractopamina y el CENAPA en México y la Unión Europea en el 2005, señalan un LMR para el clenbuterol de <2000 ppt (partes por trillón) (15,31).

\* Los LMR cambian de acuerdo al tipo de tejido (Matríz) analizado.

## **2.10 Relación entre la Estructura y la Actividad de los $\beta$ -adrenérgicos**

Los residuos hepáticos del clenbuterol permanecen en un rango de ppb (partes por billón) entre los días 16-39 después de terminado el tratamiento y en el rango de ppt hasta 56 días después del retiro (56, 57), de manera tal que con un retiro adecuado los residuos de clenbuterol dejan de ser un peligro. Así,

pues, el problema no sería su uso sino el abuso motivado por ignorancia y ambición (58).

Después de su absorción, el clenbuterol residual se deposita a nivel principalmente de hígado y riñón, la proporción extraíble es de 1-2 % de los residuos en estos dos órganos (13).

En lo referente a los residuos de ractopamina en hígado con un tiempo de retiro denominado “cero” (que en realidad es de 12 horas), se ha informado que se han encontrado residuos iguales o inferiores a  $\leq 0.013$  ppm; siendo el MRL para ractopamina de 0.15 ppm (59, 60).

## **2.11 Utilización en la Producción de Carne Bovina**

En la producción animal para conseguir el engorde artificial se han utilizado diversas sustancias muchas de ellas prohibidas, como el clenbuterol (61, 62)

En Medicina Veterinaria, el clenbuterol se utiliza como medicamento, en el tratamiento de bronconeumonias por su acción broncodilatadora en caballos y bovinos a 0.8mg/kg para activar el aparato mucociliar. Este compuesto también retarda el proceso del parto en yeguas, ovejas y vacas a 300 – 450 mg/animal; es útil en la profilaxis de alergias en bovinos y equinos y como aditivo en la alimentación de ganado en donde genera un efecto anabolizante a 0.8mg/kg que produce una hipertrofia muscular (46, 61, 63). Al ejercer su acción lipolítica y favorecer la síntesis de proteína (arriba del 15%), permite la producción de la canal libre de grasa con un desarrollo extraordinario de la masa muscular (64). Ha tenido un efecto favorable sobre el peso, la conversión alimenticia y la carne magra (65).

La ractopamina es un nuevo ingrediente para la alimentación del ganado y se usa durante el último periodo de la finalización (28 a 42 días antes del sacrificio del ganado). Tiende a: incrementar la ganancia de peso, el rendimiento de la carne y la eficiencia alimenticia. Presenta una alta resolución durante el tiempo de confinamiento y tiene beneficios hasta el final de la cadena alimenticia porque: Mantiene el sabor, jugosidad y suavidad natural de la carne, tiene un mínimo impacto en el grado de calidad del marmoleo.

## **2.12 Técnicas Analíticas para Detección de Residuos de $\beta$ -agonistas en Hígado**

Considerando que los métodos de laboratorio son una herramienta indispensable en el desarrollo de programas de monitoreo y control de residuos tóxicos y contaminantes, la elección de técnicas adecuadas es fundamental.

Tratándose del monitoreo de sustancias prohibidas, en donde el límite máximo de residuos permisible es cero (o bien el límite mínimo de detección del método), las características para la elección de la metodología a usar en el laboratorio, deben ser perfectamente evaluados en función de la cantidad y tipo de muestra a procesar, la rapidez y costo por muestra y la confiabilidad de los resultados (31). La tendencia internacional es monitorear residuos utilizando la combinación de métodos presuntivos y confirmatorios, lo que permite trabajar un mayor número de muestras e incrementar la confiabilidad del resultado final. Para la detección de residuos es esencial identificar el tipo de muestra adecuada, en concordancia con el metabolismo del fármaco en el organismo, potencial de acumulación, tiempo de degradación, facilidad de muestreo, facilidad de extracción en el laboratorio, cantidad de muestras, tiempo estimado de análisis y límites máximos permisibles, principalmente (31).

Los métodos analíticos oficiales para la detección de los  $\beta$ -agonistas, son cualquiera de los siguientes: (66)

- ✓ Ensayo inmuno-enzimático (ELISA)
- ✓ Cromatografía de gases
- ✓ Cromatografía de líquidos de alta resolución

La “High Performance Liquid Chromatography” (HPLC) con detección electroquímica o fluorescencia proporciona sensibilidad para una combinación de  $\beta$ -agonistas. El detector de luz ultravioleta tiene una sensibilidad escasa pero con la formación de un fluorocromo esta se incrementa hasta 1000 veces. La prueba de ELISA es una reacción antígeno anticuerpo y se usa para la vigilancia del uso ilegal del clenbuterol y otros  $\beta$ -agonistas (31).

ELISA tiene una ventaja de que se puede manejar un elevado número de muestras lo que repercute en la disminución del precio por muestra analizada,



es un método muy sensible y rápido, requiere de inversión mínima de equipo, materiales y reactivos; están disponibles diversos procedimientos de extracción para muestras: suero, orina, leche, bilis, hígado, riñón, músculo, retina, pelo, ingredientes y alimentos terminados para animales (31, 46, 64, 67, 68, 69). De las ventajas de los métodos inmunoenzimático, se pueden señalar el número importante de muestras que se procesan en una corrida  $n=96$ ; donde se debe restar el número de controles positivos, negativos y estándares, si se comparan con las diez muestras por HPLC, el tiempo de análisis de aproximadamente 15 minutos, con la posibilidad de utilizar el automuestreador y una sensibilidad de 0.1 ppb (partes por billón), siendo la principal desventaja las reacciones de entrecruzamiento con otros  $\beta$ -agonistas (clenbuterol, brombuterol, mabuterol, pirbuterol, carbuterol, metilclenbuterol, mapenterol, salbutamol y terbutalina), lo que reduce su aplicabilidad para el control de residuos. La ventaja principal de la HPLC es la confiabilidad de sus resultados de un 99.9%, una sensibilidad del orden de las partes por trillón (ppt), siendo su mayor desventaja el tiempo en el análisis que es de 72 horas (54).

La cromatografía de gases (CG) o líquidos (HPLC), resulta la mejor elección en cuanto a niveles de detección ( $\geq 0.5\mu\text{g}/\text{kg}$ ), cuantificación ( $\geq 1\mu\text{g}/\text{kg}$ ), recuperación (80 – 110%), correlación (coeficiente  $\geq 0.999$ ) y repetibilidad ( $\text{CV} \leq 4$ ). Aunque ambas tienen el inconveniente del elevado costo por muestra analizada, la necesidad de contar con patrones (estándares de referencia) certificados, mantenimiento y calibración especializada de manera constante, solventes con un grado adecuado al tipo de cromatografía, la inversión inicial en equipo y sus aditamentos es elevada, el personal que desarrolle los análisis y opere el equipo debe tener un grado de especialización y actualización adecuado (31).

El análisis de residuos y contaminantes en los alimentos supone la determinación de sustancias que se encuentran en cantidades muy pequeñas (del orden de  $\text{mg}/\text{kg}$  o  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) en matrices muy complejas como lo es hígado, riñón, músculo, retina, pelo, orina entre otros. Es preciso por tanto realizar en primer lugar una extracción cuantitativa de la sustancia y purificar y/o concentrar el extracto obtenido antes de proceder a su detección y cuantificación.

### **2.13 Concentraciones Permisibles de Clenbuterol en Diferentes Tejidos de Bovinos de acuerdo a la Comunidad Económica Europea (CEE).**

La Comunidad Europea tiene las siguientes especificaciones para decidir si una muestra de tejido es positiva o negativa al uso de clenbuterol:

▪ Hígado	2000 ppt .....	2 ppb
▪ Alimento para consumo animal	10000 ppt .....	10 ppb
▪ Orina	2000 ppt .....	2 ppb
▪ Retina	3000 ppt .....	3 ppb
▪ Suero	2000 ppt .....	2 ppb
▪ Pelo	6000 ppt .....	6 ppb

Se tiene un rango analítico de 0 – 8100 ppt. Hay que realizar la muestras por duplicado antes de dar un resultado oficial. Si salen positivas las muestras por ELISA se hace otro estudio más específico (Cromatografía de gases/masas) para comprobar que la muestra este positiva (31).

En cuanto al análisis de la ractopamina es una prueba que se esta validando por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC); por lo tanto no se ha identificado el límite de cuantificación en tejido ni tampoco el límite de detección (31).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

En México, los consumidores de carne bovina buscan una carne suave, de color agradable y costo accesible. La carne que se consume en muchas ocasiones proviene de sistemas de engorda en confinamiento donde se busca obtener un producto con características deseables por el consumidor como serían: grasa escasa y blanca, carne rojo cereza y suave. Por esto, en el trópico la producción de carne bovina, se está intensificando y se están utilizando con más frecuencia los  $\beta$  adrenérgicos para aumentar el rendimiento de la canal y obtener canales magras, aunque esto representa un riesgo ya que se utilizan de una manera indiscriminada y pueden quedar residuos que al consumirse, representan un peligro para la salud; por otra parte, los productores no respetan las dosis recomendadas por el fabricante y su tiempo de retiro. Considerando lo anterior, se hace necesario generar investigación que permita conocer la concentración de estos residuos en el tejido animal y asimismo concientizar a los productores de carne sobre el uso correcto de los adrenérgicos en el ganado bovino estabulado.

## **4. HIPÓTESIS**

El uso de 2  $\beta$ -adrenérgicos en la alimentación de toretes de engorda en estabulación, podrá afectar de forma distinta el rendimiento de la canal y calidad de la carne dejando diferentes concentraciones de residuos en tejidos como el hígado.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 GENERAL**

Evaluar el rendimiento y algunas características de calidad de la canal de toretes estabulados en el trópico, sujetos al uso de  $\beta$ -agonistas (clenbuterol y ractopamina), así como detectar sus residuos en hígado.

### **5.2 ESPECÍFICOS**

1. Determinar el peso de la canal caliente y el peso de la canal fría en toretes de engorda con el uso de 2  $\beta$ - adrenérgicos (ractopamina y clenbuterol)
2. Estimar el rendimiento de canal caliente y fría
3. Evaluar la calidad de la canal: por color de la carne, color, distribución y grosor de la grasa dorsal
4. Determinar concentraciones de clenbuterol y ractopamina en muestras de hígado

## **6. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **6.1 Localización del área donde se llevó a cabo el estudio**

El estudio tuvo una duración de 120 días (julio - octubre, 2005) y se realizó en el rastro frigorífico “Carnes Supremas del Golfo” ubicado en la Carretera Federal México – Nautla Km. 62 Martínez de la Torre, Ver. La temperatura y precipitación pluvial medias anuales del área son de 23.4 °C y 1991 mm, respectivamente (70). El clima es cálido húmedo tipo Af (m) w” (e), con lluvias todo el año, sin estación seca definida (71).

### **6.2 Tratamientos**

Se utilizaron 50 canales de toretes provenientes de 2 ranchos de engorda diferentes (25 y 25) las cuales fueron asignadas a los tratamientos de:

T1: 25 Canales de toretes alimentados con 300g de ractopamina/ton de alimento 42 días antes del sacrificio sin tiempo de retiro.

T2: 25 Canales de toretes alimentados con 1g de clenbuterol/ton de alimento 60 días antes del sacrificio sin tiempo de retiro.

### **6.3 Estimación del rendimiento de canal**

El peso de la canal caliente (PCC) y fría (PCF) se determinó obteniendo los pesos de las canales inmediatamente después de la maquila de los toretes (PCC) y el PCF se obtuvo 12 horas después de la maquila antes del embarque de las canales y se sacó un promedio.

El rendimiento en la canal caliente (RCC) y fría (RCF) (expresado como %) se obtuvo directamente de los datos que se colectaron en el rastro. La determinación fue la siguiente:  $\text{Peso de canal caliente/peso de arribo} \times 100$ .

El color de la carne (CC) se estimó en el músculo semimembranoso y semitendinoso con la clasificación de 1 (rojo cereza muy brillante) a 6 (rojo oscuro).

La estimación de la edad se realizó por medio de la osificación de las espinas dorsales y se obtuvieron asignándose valores que van del 1 (joven) y 2 (maduro) (72, 73, 74).

La distribución de la grasa dorsal (DGD) fue valorada mediante observación directa y se expresó de acuerdo al porcentaje en grados del 1 al 10, correspondiendo a 10% y 100% respectivamente. El color de la grasa dorsal (CGD), se estimó utilizando una escala de 1 (blanco aperlado) a 6 (amarillo anaranjado) (75) (Cuadro 1). Todos los datos de las características de la canal fueron tomados inmediatamente después del sacrificio de los animales, excepto los de rendimiento de la canal fría los cuales se obtuvieron a las 12 horas posteriores al día de sacrificio.

Es importante mencionar que las características de la canal no se realizaron haciendo un corte transversal entre la 12 y 13ava costilla debido a que no se permitió por parte del propietario.

#### **6.4 Determinación de $\beta$ -adrenérgicos en muestras de hígado**

Los residuos de dichos  $\beta$ -adrenérgicos se analizaron tomando muestras de hígado (10 cm) y se enviaron envueltas en papel aluminio en bolsas de plástico en congelación previamente identificadas al Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal (CENAPA) donde se utilizó el método de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con detección de Fluorescencia (HPLC) (76) para la ractopamina y la prueba cuantitativa de ELISA para el clenbuterol.

#### **6.5 Análisis estadístico**

Se utilizaron dos métodos estadístico por medio del paquete SPSS (Statistical Package for Social in Science) 10.0 para Windows en la cual se realizó la prueba de t de “student” para comparación de medias para las variables PCC, PCF, DGD y la prueba de “U de Mann-Witney” como estadística no paramétrica para comparar las distribuciones de la variables CC, CGD, GGD, RCC y RCF.

## 7. RESULTADOS

En el cuadro 2, se presentan los resultados de las concentraciones de clenbuterol en las muestras de hígado, observándose que todas resultaron positivas fluctuando las concentraciones entre 10,445.6 hasta 16,365.1 ppt. Asimismo en el cuadro 3, se muestran las concentraciones de ractopamina en el hígado, resultando todas negativas con 0.000 ppm

En la figura 1, se presentan los pesos de las canales como: PCC (peso de la canal caliente) de toretes engordados con ractopamina (T1) y clenbuterol (T2), observándose que el PCC para T1 fue del 296.2 kg y en T2 de 320.3 kg, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre sí ( $P < 0.05$ ).

En la figura 2, se compara el PCF (peso de la canal fría) entre T1 y T2, observándose que los toretes engordados con ractopamina tuvieron un peso menor que fue de 288.0 Kg en relación con los del uso de clenbuterol que fue de 314.4 kg; dichos valores mostraron ser estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

En la figura 3, se compara el RCC (rendimiento de la canal caliente) de los toretes tratados con los 2  $\beta$ -agonistas siendo el valor para T1 y T2 de 67%, no observándose diferencias estadísticamente significativas entre sí ( $P > 0.05$ ).

En la figura 4, se compara el RCF (rendimiento de la canal fría) de los toretes tratados con los 2  $\beta$ -agonistas siendo el valor para T1 y T2 de 65%, no observándose diferencias estadísticamente significativas entre sí ( $P > 0.05$ ).

En la figura 5, se comparó el CC (color de la carne) de los toretes tratados con los 2  $\beta$ -agonistas, observándose que se presentó un mejor color con el uso de la ractopamina de 3, mientras que para el clenbuterol se obtuvo un color menos deseable calificándose como 4, presentándose diferencias estadísticamente significativas entre sí ( $P < 0.05$ ).

En la figura 6, se compara el CGD (color de la grasa dorsal) en el T1 y T2, observándose que las canales de los toretes engordados con ractopamina presentaron un color más claro en relación a los de clenbuterol, siendo los valores de clasificación de 2 y 3 respectivamente. En ambos valores se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí ( $P < 0.05$ ).

En la figura 7, se comparó la DGD (distribución de la grasa dorsal) entre los 2 tratamientos, observándose que en los toretes engordados con clenbuterol se presentó una distribución de grasa del 6.7 o 67%, mientras que en los toretes tratados con ractopamina se presentó una distribución del 5.3 o 53% respectivamente, siendo los valores estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

En la figura 8, se compara el GGD (grosor de la grasa dorsal) para T1 y T2, observándose que para el T1 fue de 5mm mientras para T2 fue de 6 mm, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0.05$ ).

En la figura 9, se presentan la edad promedio de los animales sacrificados y se observó que los animales se clasificaron entre jóvenes a maduros.

En la figura 10, se observan los residuos de clenbuterol (ppt) determinados por la prueba de ELISA, en 5 muestras de hígado obtenidas en el rastro frigorífico de Martínez de la Torre, Veracruz; encontrándose todas positivas al uso de este fármaco tóxico, siendo las concentraciones de 31,895.1, 33,360.2, 29,169.8, 40,912.8, 26,114.1 ppt, las cuales son superiores a los límites permisibles ( $< 2000$  ppt).

En la figura 11, no se observan residuos de ractopamina en 5 muestras de hígado, debido a la poca sensibilidad del equipo y el gran tamaño de la muestra.



## **8. DISCUSION**

### **8.1 Peso de la canal caliente (PCC) y fría (PCF)**

En el presente estudio se observó que el peso de las canales calientes fueron mayores en el tratamiento con clenbuterol comparado con el lote de ractopamina. Los resultados de ractopamina son menores a los encontrados en un estudio, realizado por Elanco, 2005 (77) donde probaron el efecto de la alimentación con el uso de ractopamina en novillos Holstein estabulados, en los cuales se usó una dosis de 200mg/cabeza/día y otra dosis de 300mg/cabeza/día 38 días antes del sacrificio. Después del sacrificio se obtuvieron los pesos de la canal en caliente siendo de 331.0kg y 343.0kg respectivamente.

En otro estudio realizado por Schroeder y col. en el 2004 (78) evaluó el efecto de la alimentación con ractopamina en el desarrollo de novillos estabulados. El estudio se realizó con 880 novillos a los cuales se les asignaron 4 tratamientos 0, 10, 20, 30ppm de ractopamina en el alimento (0, 100, 200 y 300mg/cabeza/día) durante los últimos 28 días previos al sacrificio. Los resultados obtenidos fueron 341.7kg, 344.6kg, 348.1kg, 350.0kg para T1, T2, T3, T4 respectivamente encontrando diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) para T1 con respecto a T2, T3 y T4.

En otro estudio realizado por Hancock y col, en el 2004 (79), se evaluaron los efectos de la ractopamina en la composición de la calidad de la canal en novillos estabulados. Para este estudio se utilizaron 30 novillos (10/corral) a los cuales se les ofreció la ractopamina a dosis de 0, 100, 200mg/cabeza/día para los 3 tratamientos de 28 a 42 días en el último periodo de la finalización antes del sacrificio. Todos los novillos fueron implantados con un anabólico a base de estradiol y acetato de trenbolona 90 días antes del sacrificio. Posteriormente al sacrificio de los novillos se midió el PCC y se encontró que para el T1=374.4kg, T2=376.8kg, T3=380.0kg encontrando diferencias estadísticas  $P < 0.05$  entre los 3 tratamientos. Estos resultados demostraron que el uso de la ractopamina incrementa el PCC cuando se da en el alimento a niveles de 100 y 200mg/cabeza/día.

En un estudio realizado por Schroeder y col, en el 2001 (80) desarrollaron un trabajo para medir el efecto del uso de ractopamina en el crecimiento y desarrollo de novillos y novillas así como la calidad de la canal.

La ractopamina se les ofreció en el alimento durante los últimos 28 o 42 días del periodo de finalización antes del sacrificio en 10 pruebas. La ractopamina fue mezclada en el alimento a una dosis de 0.0, 9.1, 18.2 y 27.3g/ton de alimento. Esto proporcionó aproximadamente 0, 100, 200 y 300mg/cabeza/día en novillos (T1, T2, T3 y T4) y 0, 94, 189 y 283mg/cabeza/día para las novillas (T5, T6, T7 y T8). Los resultados obtenidos para PCC fue de 323.6kg, 326.7kg, 330.0kg, 331.7 para T1, T2, T3 y T4, encontrándose diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) para los demás tratamientos con respecto al grupo control para los novillos. Para las novillas los resultados fueron de 299.0kg, 299.8kg, 301.7kg, 303.9kg para T5, T6, T7, T8 encontrándose diferencias estadísticamente significativas; no se encontraron diferencias estadísticas ( $P < 0.05$ ) para T7 y T8 con respecto a T5 y T6.

## **8.2 Rendimiento en canal (RC)**

La evaluación de las canales es una herramienta que tiene disponible la industria de la carne para verificar la eficiencia de la producción ganadera de un país, ya que el estudio de la cantidad de carne que se obtiene de una canal y calidad de ésta dan información necesaria para detectar los tipos de producción que son más eficientes y sobresalientes.

En general, la evaluación de las carnes facilita un lenguaje común entre mercados y provee un instrumento para expresar y comparar precios, por lo tanto, mejora la comercialización de la carne, pues hace eficiente la relación que existe entre un buen productor y un consumidor exigente.

La evaluación de las canales puede realizarse objetiva y subjetivamente, la mayor parte de estas evaluaciones esquematizan los grados de calidad y rendimiento mediante una combinación de parámetros asociados a la canal. En la mayoría de los sistemas de evaluación, la predicción del rendimiento esta en función del peso de la canal, y de uno o varios de los siguientes criterios: espesor y distribución de la grasa subcutánea, área de la chuleta, conformación y desarrollo muscular (81). Los rendimientos de canal en el ganado bovino

tropical, varían ampliamente dependiendo de la raza, tipo de pasto consumido, edad, peso al sacrificio y uso de anabólicos.

En el trópico, los menores rendimientos de canal se observan en el ganado Cebú en pastoreo extensivo (54 – 56%), seguidos del Suizo x Cebú en semi-intensivo (58%) y con el mejor rendimiento el ganado engordado en estabulación con 60 – 62% (82).

En el presente estudio, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $P>0.05$ ) tanto para el RCC como para el RCF, con el uso de clenbuterol y ractopamina.

En un estudio realizado por Schroeder y col, en el 2004 (78), evaluaron el rendimiento de las canales en 880 novillos asignados a 4 tratamientos: 0, 10, 20, 30 ppm de clorhidrato de ractopamina. Los novillos consumieron aproximadamente 0, 100, 200 y 300mg/cabeza/día de clorhidrato de ractopamina para cada tratamiento. El porcentaje de rendimiento para el T1 fue de 61.9%, T2=61.7%, T3=62.2% y T4=62.3% existiendo diferencias estadísticamente significativas ( $P<0.05$ ) para el T3 y T4 con respecto al T1 y T2, respectivamente.

En otro estudio realizado por Hancock y col, en el 2004 (79), midió el rendimiento de las canales y se encontró que el T1= 63.85%, T2= 63.87% y T3= 64.08% encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre T1 y T2 con respecto a T3 ( $P<0.05$ ). Estos resultados sugieren que la ractopamina incrementa el rendimiento cuando se suministra a una dieta en razón de 200mg/cabeza/día en los últimos 28 a 32 días del periodo de finalización en una engorda estabulada normal.

En otros estudios realizados por Vogel y col, en el 2004 (83) con 1914 novillos Holstein con el uso de la ractopamina de 28 a 32 días en el último periodo de la finalización a una dosis de 0, 200, 300 mg/cabeza/día, se obtuvo un rendimiento de canal de 61.2%, 61.2% y 61.4%, respectivamente. Estadísticamente no se encontraron diferencia entre los tratamientos ( $P>0.05$ ).

Los resultados publicados por los diversos autores en cuanto a el rendimiento en canal fueron menores en relación a los del presente estudio.

### **8.3 Color de la carne**

En el presente estudio, se observó que el color de la carne fue más oscuro con el uso de clenbuterol y de color rojo cereza brillante con la ractopamina. Al parecer el Clenbuterol provoca que la carne presente un color menos deseable para el consumidor ya que en algunas ocasiones se llega a encontrar un color rojo oscuro que es indeseable en el mercado nacional, especialmente en las tiendas de autoservicio, donde los consumidores son más exigentes.

En un estudio realizado por Laudert y col, en el 2004 (84), se midieron los efectos de la alimentación con clorhidrato de ractopamina sobre las características físicas de la canal y calidad de la carne en 40 novillos estabulados en distintos corrales asignados a 4 tratamientos con diferentes dosis de ractopamina: 0, 10, 20, 30 ppm en 28 o 42 días antes del sacrificio donde se obtuvo una clasificación promedio de 1.0 (rojo cereza brillante).

En otro estudio realizado por Schroeder y col, en el 2004 (78); se evaluó el color de la carne encontrándose para los novillos clasificaciones de 6.02, 6.10, 6.07, 6.03, según la dosis de ractopamina utilizada, habiendo correspondencia en los resultados de esta investigación con la interpretación de esta escala numérica y la utilizada en el estudio (122).

### **8.4 Distribución (DGD) y grosor de la grasa dorsal (GGD)**

Se considera que la DGD en el ganado de engorda tropical es baja (menos del 20%). Esto afecta la calidad de la carne debido a que cuando las canales pasan a las cámaras de refrigeración la baja distribución y grosor de la grasa no protege la carne del "shock" térmico, provocando el oscurecimiento de la misma (85). En el trópico, los toretes de engorda presentan un GGD bajo (menos de 6mm); debido a que los animales consumen dietas altas en forraje con bajos aportes de energía. En pocas ocasiones se ofrecen suplementos energéticos o se adiciona grano en las dietas, por lo que las canales presentan una baja cantidad de grasa dorsal (86). En el presente trabajo se obtuvo una DGD de 53% y 67% para T1 y T2 respectivamente siendo diferentes estadísticamente entre si ( $P < 0.05$ ) y un GGD de 5mm y 6mm para T1 y T2 no encontrando diferencias entre los tratamientos ( $P > 0.05$ ).

En el mismo trabajo realizado por Elanco Animal Health, 2005 (77) se evaluó el GGD utilizando ractopamina en novillos Holstein estabulados en donde después del sacrificio se obtuvo el GGD en el cual se determinó 6.6mm, 6.3mm y 5.8mm para el T1, T2 y T3 en el cual el T1 no tuvo diferencias estadísticas  $P > 0.05$  con respecto al T2 pero el T1 y T2 con el T3 si tuvieron una diferencia estadística ( $P < 0.05$ ) respectivamente.

## **8.5 Color de la grasa dorsal**

Se ha observado que el tejido adiposo de los bovinos para abasto puede presentar una coloración casi amarilla. A pesar de que la coloración de la grasa no afecta el sabor ni el valor alimentario de las porciones comestibles, la presencia de los pigmentos representa un problema económico que provoca el rechazo por parte del consumidor y la consecuente pérdida económica para el productor (87). Según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada el término carotenoide se aplica a un gran número de compuestos liposolubles que colorean de amarillo a rojo (88).

Esta característica cromófera se debe a la presencia de una serie de dobles enlaces conjugados. Esta gran familia de pigmentos se ha agrupado como hidrocarbonatos (licopeno, a, b, g carotenos) y los derivados oxigenados (oxicarotenoides o xantofilas) (89, 90). Los carotenoides están ampliamente distribuidos en la naturaleza y son sintetizados únicamente por medio de las plantas y las bacterias fotosintéticas. Los animales dependen completamente del alimento como fuente de carotenoides y no tienen vías metabólicas para la síntesis de "novo" de estos compuestos (90, 91).

Está suficientemente documentado que los carotenoides son constituyentes normales de la sangre y tejidos de los humanos, bovinos, equinos, hurones, gerbos, peces, aves y algunos crustáceos (92, 93, 94), lo cual probablemente se debe a que no todos estos compuestos se convierten eficientemente en vitamina A y parte de ellos son absorbidos y depositados como carotenoides. En los bovinos el color amarillo de la grasa se debe a la presencia de este tipo

de pigmentos, de los cuales domina el  $\beta$  – caroteno, aunque también han sido detectadas pequeñas cantidades de luteína (95, 96, 97).

En los animales para abasto la apariencia es muy importante, sin embargo en los bovinos lo deseable es el color blanco de la grasa, pero estos en estos animales los carotenoides se depositan de manera natural cuando consumen forrajes verdes (96, 97, 98).

Para tratar de eliminar la pigmentación amarilla de la grasa se señala (99) que mantener a los animales durante periodos de 28 a 56 días en corral disminuye el color de aquella, de manera que resulta aceptable para el mercado canadiense. Sin embargo se desconoce si el cambio de color al alimentar a los animales con dietas con base en granos se debe a la movilización y oxidación de los carotenoides de los depósitos grasos, a la dilución del efecto por la engorda o ambos (97). Por lo anterior se puede observar que el color de la grasa dorsal es un punto importante en el que se basa el consumidor para evaluar la calidad de la carne, teniendo mayor aceptación los colores blancos aperlados y menor o nula aceptación los colores amarillo o naranja; por tal motivo es importante la clasificación y valoración de esta característica (82).

En el presente estudio se encontró que los toretes tratados con ractopamina tuvieron un color de grasa blanca claro con clasificación 2 a comparación de los de clenbuterol que fue blanco ligeramente amarillo con clasificación de 3 encontrándose diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) entre ellos.

## **8.6 Residuos de $\beta$ - agonistas en muestras de hígado**

Los métodos analíticos capaces de identificar estos dos  $\beta$ - agonistas son la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con detector de fluorescencia (HPLC) en Tandem con Espectometría de gases/masas (MS). Estos métodos son los más adecuados para el control de los residuos de estos dos  $\beta$ -agonistas en hígado y orina (100).

En el presente estudio, se observaron concentraciones alarmantes de clenbuterol en las muestras de hígado de toretes engordados con este fármaco, a diferencia de la ractopamina que no se observaron en el laboratorio residuos en el hígado. El hallazgo negativo de los residuos de ractopamina resultó de la poca sensibilidad del método y del gran tamaño de la muestra que

en este caso fue de alrededor de 52 ug y los residuos de ractopamina en el hígado son de <0.15 ppm según la FAO y OMS. En otras palabras el método para detectar residuos de ractopamina por HPLC cuando se usa el detector de luz ultravioleta no es el adecuado. Aunque no se detectaron cantidades de ractopamina por este método sin embargo si se observó un efecto sobre el color de la carne y color de la grasa dorsal (CC, CGD) posiblemente derivados de la supuesta escasa cantidad de ractopamina.

Los resultados encontrados en éste estudio fueron mayores a los encontrados en el trabajo realizado por Cisneros AJV y Vázquez MMS (101) en el 2005 en el cual midieron los niveles de clenbuterol en muestras de hígados, tomadas de bovinos sacrificados en el rastro TIF No. 40 ubicado en la Ciudad de Torreón Coah; se recolectaron al azar 88 muestras de hígado para el inmunoanálisis, para ello se utilizó el kit clenbuterol fast marca RIDA " C18 Ridascreen clenbuterol. Las concentraciones residuales encontradas en los hígados fluctuaron entre 1,243.6 a 3,851.6ng/kg (ppt), situándose el mayor número de muestras positivas (13.63%) entre 3,000 y 4,000ng/kg (ppt) (101).

En un estudio realizado por el investigador Moran, 2004 (102) se utilizaron 2 tratamientos: el T1 fue alimentado con 30 ppm de ractopamina, 30g/ton monensina sódica y 10g/ton tilosina (RMT), mientras que el T2 fue alimentado con 0.05 ppm de ractopamina en combinación con acetato de melengestrol 0.5mg/animal/día, monensina y tilosina (RMT + MGA). Los animales fueron sacrificados con un tiempo de retiro del fármaco de 0 días (12 horas) y se colectaron las muestras de hígado.

Las muestras de hígado para residuos de ractopamina fueron analizadas por HPLC. Los residuos que se encontraron fueron de 0.0074 ppm para el T1 y 0.0041 ppm para el T2 lo que es menor para la tolerancia establecida para el ganado de 0.09 ppm.

Por otro lado Smith y Shelver en el 2002 (103), realizaron un estudio sobre residuos en hígado y excreción de metabolitos en orina de ractopamina en animales tratados 7 días con ractopamina a una dosis de 300mg/cabeza/día durante 7 días consecutivos. Fueron sacrificados a diferentes días de periodos de retiro: T1= 0 días, T2= 3 días y T3= 7 días. Se tomaron las muestras de hígado después del sacrificio de los animales y fueron determinadas usando el

método aprobado por la FDA (HPLC), encontrándose residuos de 9.3 ppb para el T1, 2.5 ppb para el T2 y 0 ppb para el T3 respectivamente.

En otro estudio realizado por Shishani y col, en el 2003 (104) se determinaron los niveles de ractopamina en tejido animal por HPLC y MS. Se tomaron 6 muestras de hígado de porcino y 3 de bovino. Las recuperaciones de ractopamina fueron en promedio de 97% para las muestras de cerdo y de 103% para las muestras de bovino. Ambas muestras tuvieron un pico de rango de 1 - 4 ppb.

En cuanto a los residuos de clenbuterol en hígado Posyniak y col en el 2002 (105) realizaron un estudio sobre los procedimientos para determinar residuos de clenbuterol en muestras de hígado y orina utilizando la prueba de Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) y HPLC. Aunque las técnicas de inmunoensayo tienen mucha sensibilidad, el potencial de la especificidad está disminuyendo. Las técnicas instrumentales de cromatografía pueden proveer resultados definitivos cualitativos y cuantitativos (106, 107, 108, 109, 110, 111). El objetivo del estudio fue investigar el uso de la preparación de la misma muestra analítica por ELISA y HPLC. Las muestras fueron colectadas como parte del Programa de Monitoreo Nacional de Polonia para ver los residuos químicos de los tejidos en el ganado. Se tomaron 6 muestras de hígado y 6 de orina de novillos con una historia clínica ya conocida y con un certificado de libres de beta agonistas. Las muestras de hígado fueron homogenizadas y fueron pesadas exactamente a 10g de masa húmeda y fueron congeladas a -20° C hasta su utilización. Los resultados encontrados tuvieron un pico de  $1\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ . Los residuos en las muestras de hígado por ELISA fueron 1.25, 1.36, 1.25, 0.72, 0.85, 0.81  $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$  y por HPLC 0.67, 0.85, 0.82, 0.77, 0.86, 0.85  $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ .

En un estudio realizado por Elliot en 1993 (112), observó los efectos de largos periodos de retiro en la composición de la canal y concentración de residuos por el método de ELISA en vacas medicadas con clenbuterol. Este estudio se realizó con 20 novillos medicados con clenbuterol por un periodo de 30 días. La concentración de residuos fue monitoreada a través de éste periodo y los subsecuentes 140 días. El clenbuterol fue detectado en hígado arriba de los 56 días de retiro a una concentración de 0.35ng/g.



Los residuos de clenbuterol encontrados en el hígado de toretes de engorda en estabulación en Veracruz, México son considerados altos lo que representa un riesgo de salud para el público. Este riesgo no está siendo controlado por ninguna autoridad sanitaria, por lo que a pesar de esto no está autorizado su uso en la producción animal.

Es una realidad que para que un engordador pueda comercializar sus animales, los toretes deben ir medicados con clenbuterol ya que de forma contraria no se comercializarán o bien serán castigados económicamente por el introductor de ganado.

## 9. CONCLUSIONES

1. La utilización de los 2  $\beta$ -adrenérgicos en la alimentación de toretes de engorda en estabulación, no afectó el rendimiento de la canal caliente y fría, así como el grosor de la grasa dorsal.
2. La adición de Clenbuterol en la dieta mejoró el peso de la canal caliente y fría; sin embargo, el color de la carne presentó un color indeseable para el consumidor (rojo oscuro) en relación con el uso de ractopamina.
3. El clenbuterol propició una mayor distribución de grasa dorsal y además las canales con este fármaco presentaron un color de grasa no deseado por el consumidor el cual fue blanco ligeramente amarillo, en relación a la ractopamina que fue blanca.
4. Las muestras de hígado provenientes de los animales suplementados con clenbuterol, presentaron concentraciones por encima de los límites permisibles; con respecto a la ractopamina la sensibilidad del método y el tamaño de la muestra no permitieron llegar hasta las concentraciones máximas permisibles; por esto resultaron negativas.
5. Las determinaciones de clenbuterol por ELISA resultaron ser confiables aunque no son confirmativas. El análisis para ractopamina mediante HPLC, resultó ser confiable y adecuada pero sin alcanzar los residuos máximos permisibles en muestras de hígado de bovinos.
6. El uso del clenbuterol tiene un efecto negativo sobre la calidad de la carne oscureciéndola dando mala apariencia para el consumidor.
7. El uso indiscriminado del clenbuterol en la dieta y la falta de un periodo de retiro antes del sacrificio de los animales, promueve elevados niveles de residuos en hígado, lo que representa un peligro de toxicidad para la salud pública.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. García RD. Rendimiento en canal de Ganado bovino para abasto sacrificado en el rastro de Texcoco, Edo de México (tesis de licenciatura). México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM 1995.
2. Medina GR. Determinación de la eficiencia técnica y económica de una empresa ganadera dedicada a la engorda de ganado de toretes en la Región Centro norte del Estado de Veracruz. (tesis de licenciatura). México (D.F.) FMVZ UNAM 1997.
3. López PMG, Rubio LMS. Tecnologías para la evaluación objetiva de las canales de animales de abasto. Veterinaria México, 1998; 29, 3: 279 – 289.
4. Garcés YP. Clasificación de las canales de bovino producidas en el trópico. Memorias “Día de ganadero 1998”. México: CIRGOC. INIFAP. SAGAR 1998; 1-13.
5. Ibarra VO. Clasificación de acuerdo a la norma oficial mexicana (NOM-FF-78-1991) y evaluación del rendimiento en canal de las razas de ganado bovino Charolais, Hereford y cebú, sacrificados en un establecimiento TIF. Veterinaria México, 1995; 26, 2: 165.
6. Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura en el Banco de México. Boletín informativo. Oportunidades para el desarrollo de la industria de la carne de bovino en México. México (Mich.): FIRA, 1999; 312 : 35 – 40.
7. Homer DB, Cuthbertson A, Homer DL, Mc Menamin P. Eating quality of beef from different sire breeds. Anim Sci 1997; 64 : 403 – 408.
8. Kropf HD. El color y su estabilidad: Los factores que afectan el color en la carne fresca. Carnetec 1995. (Marzo): 20 – 24.
9. Sañudo C. Calidad de la canal por tipos. En: Buxadé CC, editor. Vacuno de carne. Barcelona: Mundi Prensa, 1998: 467 – 492.
10. Sumano LH. Uso de los  $\beta$ - adrenergicos (clenbuterol) como promotores de crecimiento en bovinos y su repercusión en la salud pública. FMVZ UNAM., 2005.

11. <http://ruminantlameness.com/es/publicidad/elanco.htm>. Consultada en Julio del 2005.
12. Cajal, M. C y A. R. Álvarez 2002. El lado positivo del uso de clenbuterol en ganadería, como broncodilatador y tocolítico. Simposium Internacional sobre  $\beta$ -agonistas y su uso en Medicina Veterinaria. 29 y 30 de julio.
13. Kuiper H.A, Noordman M.Y, Dooren-Flipsen MMH, Van Schilt R, Roos AH. Illegal use of  $\beta$ -adrenergic agonist: European Community. Journal of Animal Science 1998;76:195-207.
14. <http://www.senado.gob.mx/sgsp/sesión=2004/06/09/1&documento=8>. Consultada en Julio del 2005.
15. Sumano LH, Ocampo CL, Gutiérrez OL. Clenbuterol y otros  $\beta$ -agonistas, una opción para la producción pecuaria o un riesgo para la salud pública. Vet Méx 2002; Vol. 33(2):137-160.
16. Courtheyn D, Moermans R, Schilt R, Boenke A. Beta-agonists in animal feed. II. Optimization of the extraction. Food Additives Contam 1996;13:493-509.
17. Martin LE, Hobson JC, Page JA, Harrisson AC. Metabolic studies of Salbutamol-3H: a new bronchodilator in rat, rabbit, dog, and man. Eur J Pharmacol 1971;14: 183-199.
18. Ruffolo RE. Chirality in  $\alpha$  and  $\beta$ -adrenoceptor agonists and antagonists. Tetrahedron 1991;47:9953-9980
19. Martín R, Hernández PE, Sanz B. Revisión: residuos de tratamientos veterinarios y salud pública. Rev Esp Cienc Aliment 1992;32:5.
20. Waldeck B, Widmark E. Steric aspects of agonism and antagonism at  $\beta$ -adrenoceptors: experiments with the enantiomers of clenbuterol. Pharmacol Toxicol 1995;56:221-227.
21. Kaiser G, Wiemer G, Kremer G, Dietz J, Palm D. Identification and quantification of  $\beta$ - adrenoceptor sites in red blood cells. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 1978;305:41-51.
22. Mersmann HJ, McNeel RL. Ligand binding to the porcine adipose tissue beta-adrenergic receptor. J Anim Sci 1992;70:787-797.
23. Mazzoni L, Naef R, Chapman ID, Morley J. Hyperresponsiveness of the airways following exposure of Guinea-pigs to rasemic mixtures and

- distomers of  $\beta$ -selective sympatomimetics. *Pulm Pharmacol* 1994;7:367-376.
24. Thompson MJ, Huss P, Unverferth DV, Fasola A, Leier CV. Hemodynamic effects of intravenous butopamine in congestive heart failure. *Clin Pharmacol Ther* 1980;28:324-334.
  25. Yen TT, Anderson DB, Veehuizen EL. Phenethanolamines: reduction of fat and increase of muscle from mice to pigs. In: Lardy H, Stratman, editor. *Hormones, thermogenesis, and obesity*. New York: Elsevier, 1989:455-464.
  26. Ricke EA, Larson GL, Smith DJ, Feil VJ, Caton JS. Influence of intraperitoneal administration of ractopamine HCl stereoisomers on growth, protein retention, and carcass composition in rats fed commercial diets. *J Anim Sci* 1996;74:210.
  27. Jeppson AB, Johansson U, Wldeck B. Steric aspect of agonism and antagonism at beta-adrenoceptors: experiments with the enantiomers of terbutaline and pindolol. *Pharmacol Toxicol* 1984;54:285-291.
  28. Shaw WN, Schmiegel KK, Yen TT, Toomey RE, Meyers DB, Mills J. LY7977A novel compound for weight control. *Life Sci* 1981;29:2091-2101.
  29. Yen TT, McKee MM, Stamm NB, Bemis KG. Stimulation of cyclic AMP and lipolysis in adipose tissue of normal and obese Auy / a mice by LY/), a phenethanolamine and stereoisomers. *Life Sci* 1983;32:1515-1522.
  30. Zalco D; Debrauwer L; Bories G y Tuilliez; 1997. Evidence for a new and mayor metabolic pathway of clenbuterol involving in vivo formation of an N-hidroxarylamine. *Che. Res. Toxicol*, 10: 197-204.
  31. Flores, H. O; J. L. M. Delgadillo y E. F. Ontiveros. 2002. Técnicas analíticas para  $\beta$ -agonistas. *Simposium Internacional sobre  $\beta$ -agonistas y su uso en Medicina Veterinaria*. 29 y 30 de julio.
  32. Sillence MN, Mathews ML, Badran TW, Pegg GG. Effects of clenbuterol on growth in underfed cattle. *Austr J Agric Res* 2000;51:401-406.
  33. Peters AR.  $\beta$ -agonists as repartitioning agents: a review. *Vet Rec* 1989;124:417-420.

34. Smith SB, Gracia DK, Anderson DB. Elevation of a specific mRNA in longissimus muscle of steers fed ractopamine. *J Anim Sci* 1989;67:3495-3520.
35. Yang YT, McElligott MA. Multiple actions of  $\beta$ -adrenergic agonists on skeletal muscle and adipose tissue. *Biochemistry* 1989;261:1-10.
36. Helferich WG, Jump DB, Anderson DB, Skjaerlund DM, Merkel RA, Bergen WG. Skeletal muscle  $\beta$ -actin synthesis is increased pretranslational in pig fed the phenetholamine ractopamine. *Endocrinology* 1990;126:3096-3100.
37. Higgins y col, 1988 Higgins JA, Lasslett YV, Bardsley RG, Buttery PJ. The relation between dietary restriction or clenbuterol treatment on muscle growth and calpain proteinase (EC 3.4.22.17) and calpastain activities in lambs. *Br J Nutr* 1988;60:645-652.
38. MacNeel RL, Mersmann HJ.  $\beta$ -adrenergic receptor subtype transcripts in porcine adipose tissue. *J Anim Sci* 1995;73:1962-1971
39. Mersmann HJ. Acute metabolic effects of adrenergic agents in swine. *Am J Physiol* 1987;252:85-95.
40. Mersmann HJ. Evidence of classic  $\beta$ -adrenergic receptors in porcine adipocytes. *J Anim Sci* 1996;74:984-992.
41. Mersmann HJ. Acute changes in blood flow in pigs infused with  $\beta$ -adrenergic agonists. *J Anim Sci* 1989a;67:2913-2920.
42. Adeola O, McBride BW, Young LG. Metabolic responses induced by isoproterenol in ractopamine-fed pigs. *J Nutr* 1992;122:1280-1286.
43. Preitner F, Muzzin P, Revelli JP, Seydoux J, Galitzky J, Berlan M, *et al.* Metabolic response to various beta-adrenoceptor agonists in beta 3-adrenoceptor knockout mice: evidence for a new beta-adrenergic receptor in brown adipose tissue. *Br J Pharm* 1998;124:1684-1688.
44. Sauer MJ, Anderson SPL. *In vitro* and *in vivo* studies of drug residue accumulation in pigmented tissues. *Analyst* 1994;119:2553-2556.
45. Elliott CT, Thompson CS, Arts CJM, Crooks SRH, Baak MJ, Van Verheij ER, *et al.* Screening and confirmatory determination of ractopamine residues in calves treated with growth promoting doses of the beta-agonist. *Analyst* 1998;123:1103-1107.

46. Blass, A; J.C. Illera; G. Silvan y M. Illera. 1998. Cinética del anabolizante clenbuterol en plasma medida mediante ELISA. Invest. Agri. Prod. Sanid. Anim. 13 (1, 2 y 3); 135-144.
47. Luño, M; A.J. Beltrán; I. Jaime and P. Roncales. 1999. Textural Assessment of Clenbuterol Treatment in Beef. Meat Science. 51, 297-303.
48. O'Keeffe, M.J; M. O'Keeffe, J.D. Glennon, A.R. Lightfield and R.J. Maxwell. 1998. Supercritical fluid extraction of clenbuterol from bovine liver tissue. The Analyst. 123, 2711-2714.
49. Jones RW, Easter RA, McKeith FK, Dalrymple RH, Maddock HM, Bechtel PJ. Beta-agonists. J Anim Sci 1985;61:905.
50. Mitchell GA, Glora D. Illegal use of ( $\beta$ -adrenergic agonists in the United States. J Anim Sci 1998; 76:208-211.
51. Sauer MJ, Dave M, Lake BG, Manchee GR, Howells LC, Coldham NG. Beta2-agonist abuse in food producing animals: use of *in vitro* liver preparations to assess biotransformation and potential target residues for surveillance. Xenobiotic 1999;29:483-497.
52. Moloney A, Allen P, Joseph R, Tarrant V. Influence of beta-adrenergic agonists and similar compounds on growth. New York: Elsevier Science Publishing, 1991:455-513.
53. <http://ruminantlameness.com/es/publicidad/elanco,htm>. Consultada en Julio del 2005.
54. Peña, B.S.D. 2002. El uso del clenbuterol en la producción animal y sus riesgos a la salud humana. Seminario aditivos empleados en la alimentación animal y sus implicaciones en la salud pública. Abril 18-19, México, D.F.
55. Boenisch B, Quirke JF. Safety assessment of  $\beta$ -agonists. In: Kuiper HA, Hoogenboom LAP, editors. *In vitro* toxicological studies and real time analysis of residues in food. Wageningen, The Netherlands: RIKILT-DLO-Wageningen, 1992:102-124.
56. Elliot CT, McCaughey WJ, Crooks SR, McEvoy JD, Kennedy DG. Residues of clenbuterol in cattle receiving therapeutic doses: implications for differentiating between legal and illegal use. Vet Q 1995;17:100-102.

57. Elliot CT, McEvoy JD, Shortt HD, Crooks SRH. Effective laboratory monitoring and the abuse of the beta agonist clenbuterol in cattle. *Analyst* 1993;118:447-448.
58. Dalidowicz JE, Thomson TD, Babbitt GE, Hutson DH. Ractopamine hydrochloride, a phenethanolamine repartitioning agent: metabolism and tissue residues. *Xenobiotics Food Producing Ann* 1992;503:234-243.
59. Poletini A, Montagna M, Hogendoorn EA, Dijkman E, Van Zoonen P, Van Ginkel LA. Applicability of coupled-column liquid chromatography to the analysis of beta-agonists in urine by direct sample injection I. Development of a single-residue reversed-phase liquid chromatography-UV method for clenbuterol and selection of chromatographic conditions suitable for multi-residue analysis. *J Chroma* 1995;695:19-31.
60. Anonymous. Evaluation of certain veterinary drug residues in food. World Health Organization Technical Report Series 1993;Issue 832:1-62.
61. Galmés A.T; A.C. Mariano; P.J. Oliver; P.F. González y C. de la Calleja. 1995. Descripción de un brote producido por consumo de carne tratada con clenbuterol en Baleares. *Alimentaria*. 23-25.
62. Ramos, F; C. Santos; A. Silva y M.I.N. Da Silveira. 1998a.  $\beta$ 2-adrenergic agonista residues: simultaneous methyl- and butylboronic for confirmation análisis by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 716, 366-370.
63. Ramos, F; C.M. Castillo and N.M.I. Da Silveira. 1998b. Occurrence of  $\beta$ 2-Adrenergic Agonist Residues in urine of animal meta procedures in Portugal. *Journal of AOAC Internacional*. 81:3, 544-548.
64. González, G.P; T.F. Fernández; O.C. Martí; C.A.F. Sampayo; C.F. Abuín and A.C. Sáez. 1996. Rapad and simple determination of clenbuterol residues in retina by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B*. 677, 167-171.
65. Alpizar, S.O; F, Pérez; G.E. Avila; S.V. Valles; C.C. López y L.C. Ocampo. 1993. Efecto de un agonista  $\beta$ -adrenérgico en la alimentación de pollos de engorda. *Veterinaria México*. 24 (1), 37-41.
66. NOM-EM-015-ZOO-2002, Especificaciones técnicas para el control del uso de beta-agonistas en los animales. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 11 de octubre del 2000.



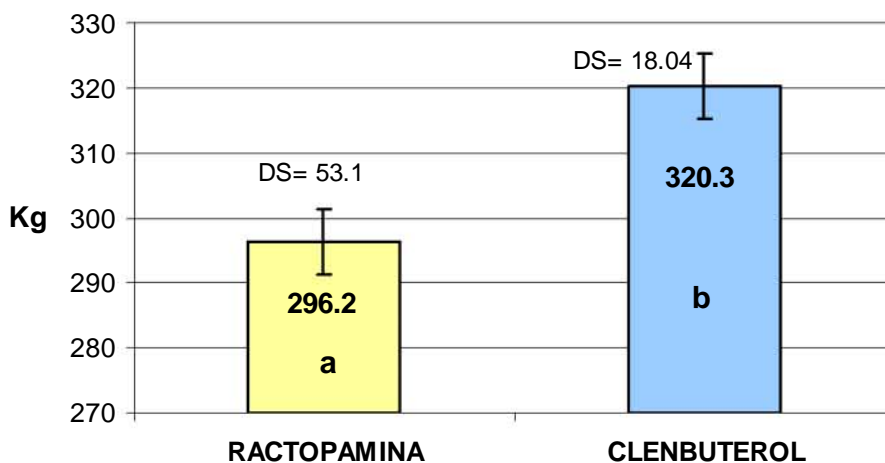
67. Morgrado, M; M. Juárez, M. Ramos y J. Gómez. 1993. Drogas de uso veterinario que pueden interferir en la detección de  $\beta$ -agonistas en placa fina. Alimentaria. Noviembre. 25-28.
68. Boyd, D; M. O'Keefe. Amd M.R. Smyth. 1996. Methods for the determination of  $\beta$ -agonist in biological matrices. A Review. The Analyst. 121, 1R-10R.
69. García, T; P.E. Hernández; B. Sanz y R. Martín. 1997. Revisión: Los residuos en la inspección de la carne. Food Science and Technology Internacional. 3: 391-403.
70. Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical. Boletín Informativo 1995. CEIEGT – FMVZ - UNAM. 1998.
71. García E. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. 3ª edición. México D.F., 1981.
72. Mc Caughey WP, Cliplef RL. Carcass and organoleptic characteristics of meat from steers grazed on alfalfa/ grass pastures and finished on grain. Can J Anim Sci 1996; 76 : 149 – 152.
73. Hilton GG, Tatum JD, Williams SE, Belk KE, Williams FL, Wise JW, et al. An evaluation of current and alternative systems for quality grading carcasses of mature slaughter cows. J Anim Sci 1998; 76: 2094 – 2103.
74. Mandell IB, Buchanan – Smith JG, Campbell CP. Effects of forage vs grain on carcass characteristics, fatty acid composition, and beef quality in Limousin – cross steers when time on feed is controlled. J Anim Sci 1998; 76 : 2619 – 2630.
75. Gwartney BL, Calkins CR, Rasby RJ, Stock RA, Vieselmayer BA, Gosey JA. Use of expected progeny differences for marbling in beef: II. Carcass and palatability traits. J Anim Sci 1996; 74 : 1014 – 1022.
76. Smith, J.D. 1998. The Pharmacokinetics, Metabolism and Tissue residues of  $\beta$ - Adrenergic Agonist in Livestock. Journal of Animal Science. 76, 173-194.
77. Elanco Animal Health Update. 2005. Effect of Feeding Ractopamine to Calf-Fed Holstein Steers Plains Nutrition Council Spring Conf., Apr. 14-15, San Antonio, Texas.
78. Schroeder A, Hancock D, Mowrey D, Laudert S, Vogel G, and Polser D. Elanco Animal Health, Greenfield, IN. Dose titration of Optaflexx

- (ractopamine HCL) evaluating the effects on growth performance in feedlot in steers. *Journal of Animal Science* 2004;83:111 (Supplement).
79. Hancock D, Mowrey D, Laudert S, Vogel G, and Polser D. Elanco Animal Health, Greenfield, IN. Dose titration of Optaflexx (ractopamine HCL) evaluating the effects on standard carcass characteristics in feedlot steers. *Journal of Animal Science* 2004;83:111 (Supplement).
80. Schroeder AL, Polser DM, Laudert SB, Vogel GJ. The Effect of Optaflexx on Growth Performance and Carcass Traits of Steers.. *Scientific Update from Elanco Animal Health* 2001:1, 2. (Five-trial Registration Summary)
81. Lopez PMG, Rubio LMS. Tecnologías para la Evaluación Objetiva de las Canales de Animales de Abasto. *Vet. Mex.* 1998; 29: 279-289.
82. García GI. Evaluación de las Características de la Canal de Toretos Cebú y Cruzas de Suizo x Cebú Provenientes de Diferentes Sistemas de Alimentación en el Trópico. 2001. Tesis de licenciatura. CEIEGT-FMVZ.UNAM. 11-17.
83. G. Vogel, A. Schroeder, W. Platter, M. Van Koeving, A. Aguilar, S. Laudert, J. Beckett, R. Delmore, J. Drouillard, G. Duff, and J. Elam. Elanco Animal Health, Greenfield, IN. Effect of ractopamine on carcass characteristics of calf-fed Holstein steers. *Journal of Animal Science* 2004;83:112 (Supplement).
84. S. Laudert, G. Vogel, A. Schroeder, W. Platter, and M. Van Koeving. Elanco Animal Health, Greenfield, IN. Effects of ractopamine fed to finishing steers, II Summary of six studies – carcass traits. *Journal of Animal Science* 2004;83:112 (Supplement).
85. Jarrige R, Beranger C, *Beef Cattle Production*. Elsevier. Netherlands. 1992.
86. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. clasificación de Canales de Bovino Producido en el Trópico. CIR-Golfo Centro, INIFAP, Día del ganadero 2000.
87. Internacional Union of Pure and Applied Chemistry - Internacional Union of Biochemistry. Nomenclature of carotenoids. *Pure Appl Chem* 1975;41:407.
88. Hasenmaier, J. El punto de vista de la industria farmaceutica sobre el proceso intensivo de producción de carne. *Memorias de la XXXIV*

- Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. 1998 octubre 27-31. Juriquilla, (Qro). Juriquilla, (Qro): Fundación Produce-Queretaro, 1998:109-119.
89. Gross J. Pigments in vegetables. Portland (Or): Book News Inc., Avi Publishing, 1991.
90. Tee SE. Carotenoids and retinoids in human nutrition. Crit Rev Food Sci Nutr 1992;31:103-163.
91. Hencken H. Chemical and physiological behaviour of feed carotenoids and their effects on pigmentation Poultry Sci 1992;71:711-717.
92. Ribaya MJ, Holmgren SC, Fox JG, Russell RM. Dietary  $\beta$ - carotene absorption and metabolism in ferrets and rats. J Nutr 1989; 119:665-668.
93. White W, Peck K, Ulman E, Erdman J. The ferret as a model for evaluation of the bioavailabilities for all-trans- $\beta$ -carotene and its isomers. J Nutri 1993;123:1129-1139.
94. Pollack J, Campbell J, Potter S, Erdman J. Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) absorb  $\beta$ -carotene intact from a test meal. J Nutri 1994;124:869-873.
95. Barton RA, Pleasants AB. Fat colour and meat colour in different breeds of steers in five consecutive years raised on pasture and slaughtered at 30 months of age. Proc NZ Soc Anim Prod 1993;53:389-391.
96. Strachan D, Yang A, Dillon R. Effect of grain feeding on fat colour and other carcass characteristic in previously grass-fed *Bos indicus* steers. Austr J Exp Agric 1993;33:269-273.
97. Yang A, McLennan S, Armstrong J, Larsen T, Shaw F, Tume K. Effect of short-term grain feeding on bovine body-fat colour: a cautionary note. Austr J Agric Res 1993;44:215-220.
98. Knight T, Ridland M, Hill F, Death A, Wyeth T. Effects of steers and nutritional changes on the ranking of cattle on plasma carotene concentration. Proc NZ Soc Anim Prod 1993;53:455-456.
99. Forrest RJ. Effect of high concentrate feeding on the carcass quality and fat coloration of grass-reared steers. Can J Anim Sci 1981;61:575-580.

100. José Blanca, Patricia Muñoz, Miguel Morgado, Nely Méndez, Angela Aranda, Thea Reuvers and Henny Hooghuis; *Analytica Chimica Acta*, Volume 529, Issues 1-2, 24 January 2005, p.p 199-205.
101. Cisneros AV, y Vázquez MS. Identificación de clenbuterol en hígados de bovinos sacrificados en un establecimiento (rastro) TIF de Torreón Coah. *Memorias XXIX Congreso Nacional de Buiatria*, 2005.
102. J.W. Moran and J.M. Buck Tissue Residue Non-Interference Study in Cattle Treated with Ractopamine, Monensin, Tylosin and Melengestrol Acetate. *Elanco Animal Health*, 2004
103. D.J. Smith and W. L. Shelver; Tissue residues of ractopamine and urinary excretion of ractopamine and metabolites in animals treated for 7 days with dietary ractopamine; *J. Anim Sci.* 2002 80: 1240-1249.
104. Shishani EI, Chi CS, Jamokha S, Aznar G, Hoffman MK. Determination of ractopamine in animal tissues by liquid chromatography – fluorescence and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analitica chimica acta.* 483 (2003) 137-145.
105. Posyniak A, Zmudzky J, Niedzielska J. Screening procedures for clenbuterol residue determination in bovine urine and liver matrices using enzyme-linked immunosorbent assay and liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta* 483 (2003) 61–67.
106. I.K. Abukhalaf, D.A. von Deutsch, B.A. Parks, L. Wineski, D. Paulsen, H.Y. Aboul-Enein, D.E. Potter, *Biomed. Chromatogr.* 14 (2000) 99.
107. L.X. Whaites, E.J. Murby, *J. Chromatogr, B* 728 (1999) 67.
108. M.K. Henze, G. Opfermann, H. Spahn-Langguth, W. Schanzer, *J. Chromatogr, B.* 751 (2001) 93.
109. M. Hernandez – Carrasquilla, *Anal. Chim. Acta* 408 (2000) 285.
110. C.A. Fende, B.J. Vezquez, C. Franco, A. Cepeda, P.G. Gigosos, *J. Chromatogr, B.* 726 (1999) 113.
111. F.J. dos Ramos, *J. Chromatogr, A.* 880 (2000) 69.
112. Elliot CT, Crooks SR, McEyoy JG, McCaughey WJ , Hewitt SA, Paterson D, Kilpatrick D. Observations on the effects of long-term withdrawal on carcass composition and residue concentrations in clenbuterol-medicated cattle. *Vet Res Commun.* 1993;17(6):459-68.
113. NMX-FF-078-SCFI-2002

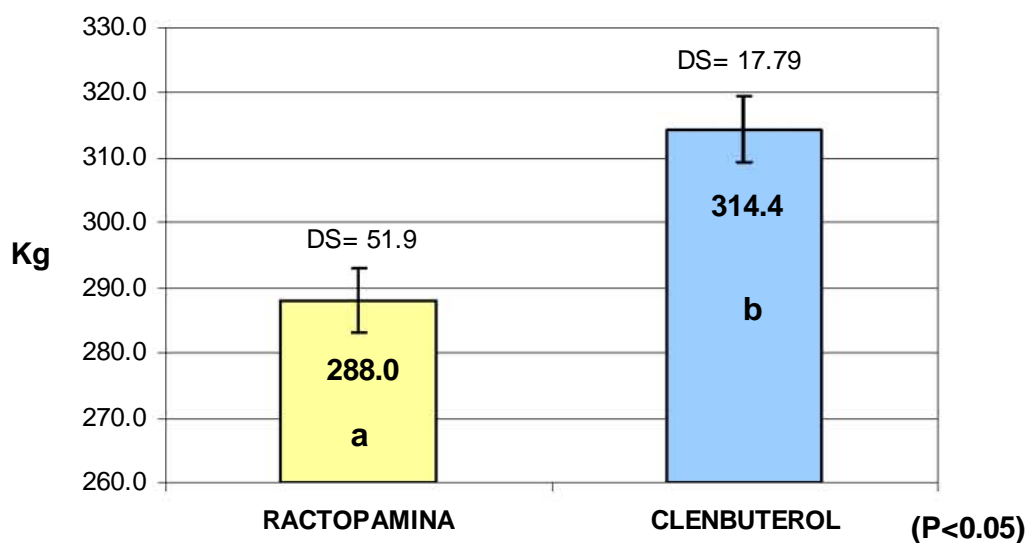
114. NOM-004-ZOO-1994. Control de residuos tóxicos en carne, grasa, hígado, músculo y riñón en aves, bovinos, caprinos, cérvidos, equinos, ovinos y porcinos. Residuos tóxicos. Límites máximos permisibles y procedimientos de muestreo. Publicado en el Diario Oficial de la Federación el 20 de julio de 1999.
115. NOM-061-ZOO-1999. Especificaciones zoonutricionales de los productos alimenticios para consumo animal. Publicado en el Diario Oficial de la Federación el 10 de agosto de 1999.
116. <http://www.senado.gob.mx/sgsp/gaceta/?sesion=2004/04/20/1&documento=6>. Consultada en Julio del 2005
117. Procedimiento Analítico para la determinación de ractopamina: Laboratorios: Eli Lilly and Company. Procedimiento No. B04372. Revisión 3, 2004 (Modificado).
118. Meyer HHD, et al. Residue screening for the beta agonist clenbuterol, salbutamol and cimaterol in urine using enzyme immunoassay and high performance liquid chromatography. Journal Chromatography. 1991:564, 551.
119. R- analysis of clenbuterol and other beta agonist. Art. No. R-1701 Biopharm, Ridascreen Clenbuterol Fast. Enzyme immunoassay for the quantitative
120. Hunsley ER, Walcom BW. Livestock Judging, Selection and Evaluation. 3<sup>rd</sup>. Ed USA: THE INTERSTATE Printers and Publishers Inc, 1988.



DS= Desviación Estándar

(P<0.05)

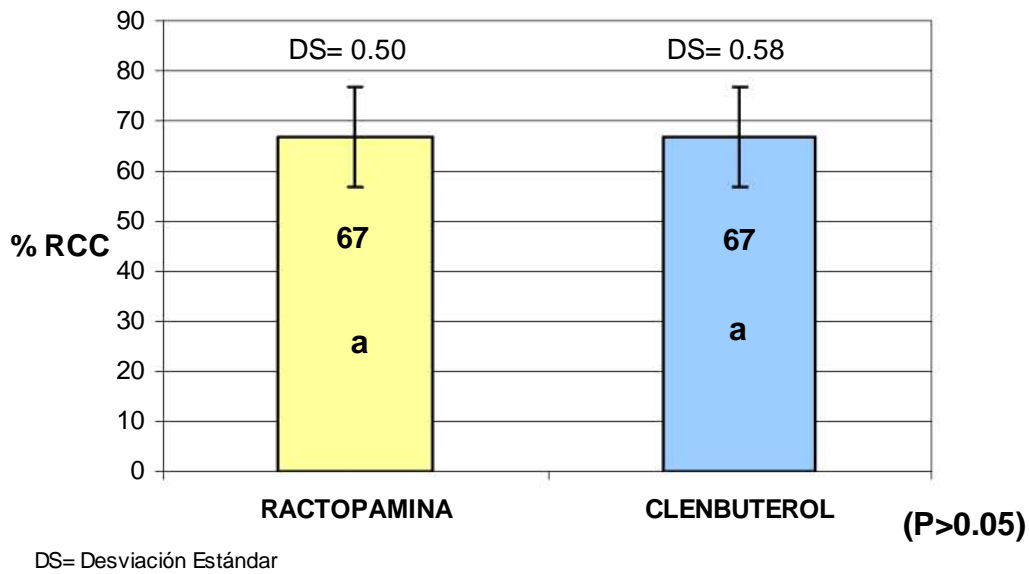
**FIGURA 1. PESO PROMEDIO DE LA CANAL CALIENTE (PCC) DE TORETES ESTABILADOS EN EL TRÓPICO CON EL USO DE BETA AGONISTAS**



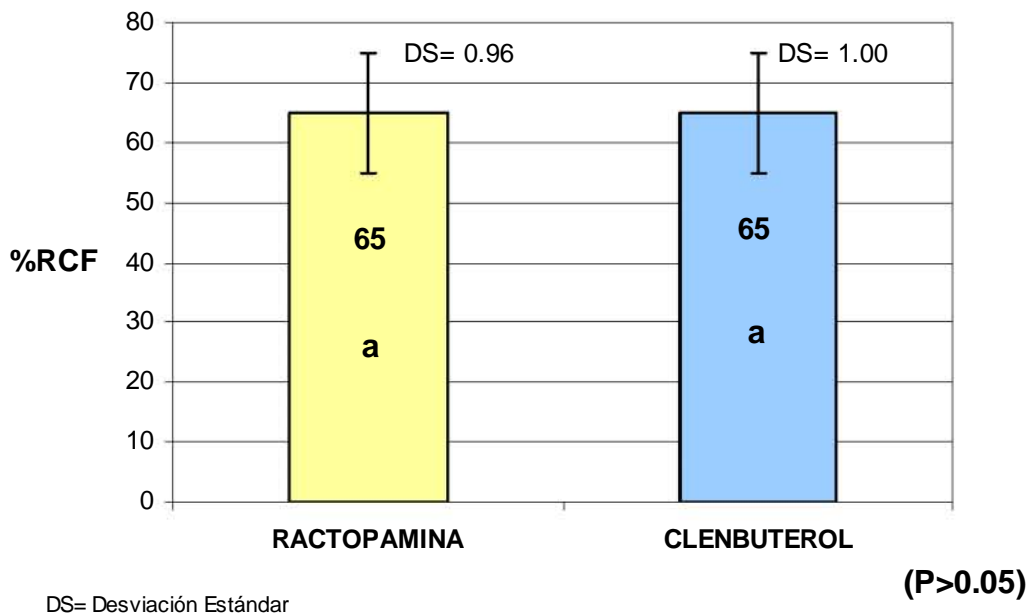
DS= Desviación Estándar

(P<0.05)

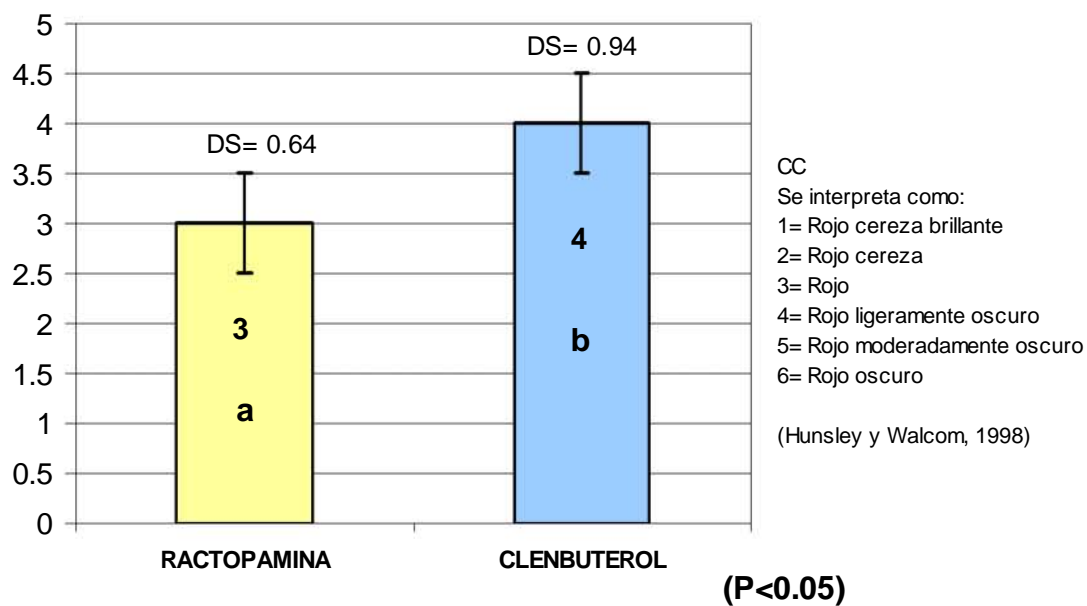
**FIGURA 2. PESO PROMEDIO DE LA CANAL FRÍA (PCF) DE TORETES ESTABILADOS EN EL TRÓPICO CON EL USO DE BETA AGONISTAS**



**FIGURA 3. RENDIMIENTO DE LA CANAL CALIENTE (RCC) DE TORETES ESTABULADOS EN EL TRÓPICO CON EL USO DE BETA AGONISTAS**

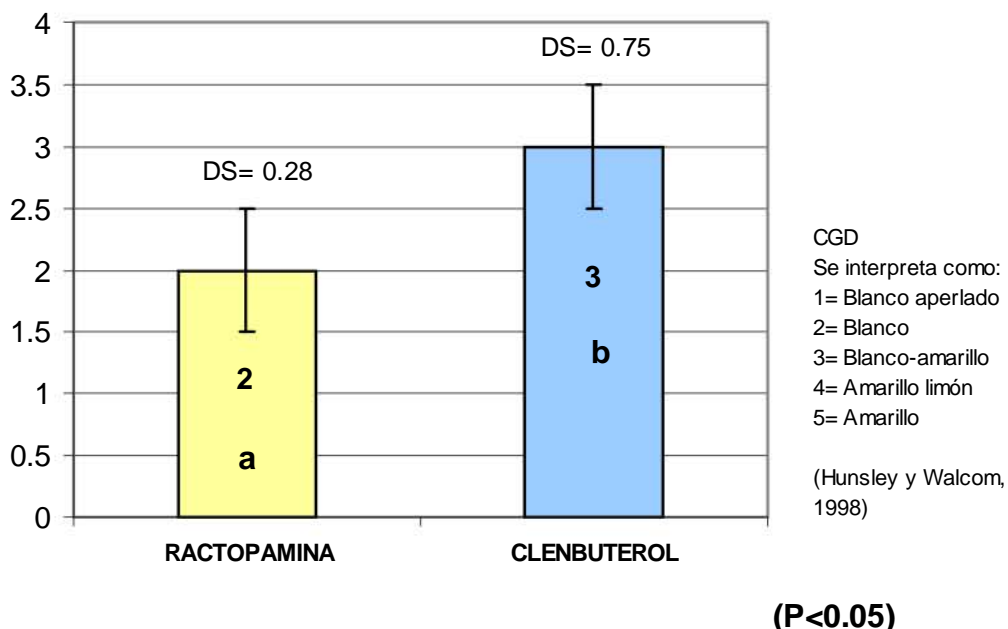


**FIGURA 4. RENDIMIENTO DE LA CANAL FRÍA (RCF) DE TORETES ESTABULADOS EN EL TRÓPICO CON EL USO DE BETA AGONISTAS**



DS= Desviación Estándar

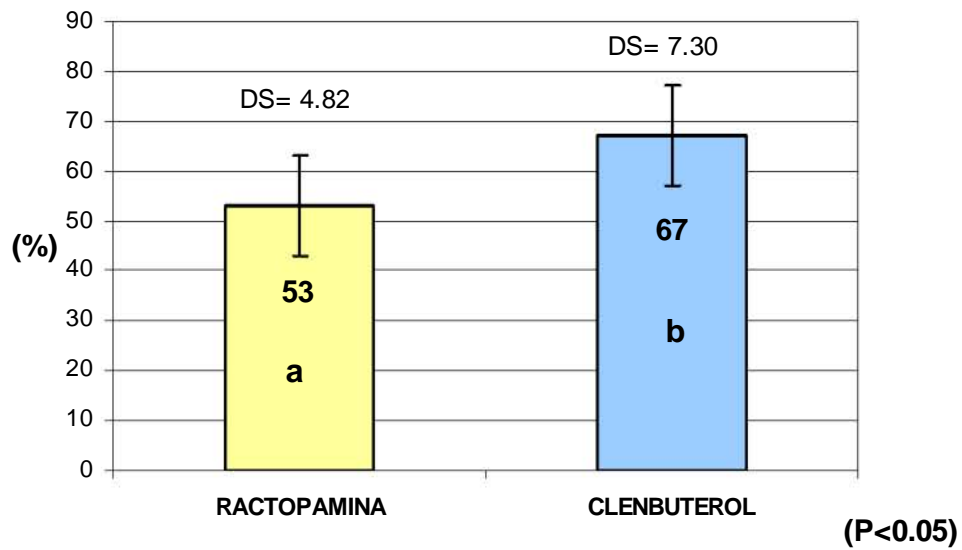
**FIGURA 5. COLOR DE LA CARNE (CC) DE TORETES ESTABULADOS EN EL TRÓPICO CON EL USO DE BETA AGONISTAS**



DS= Desviación Estándar

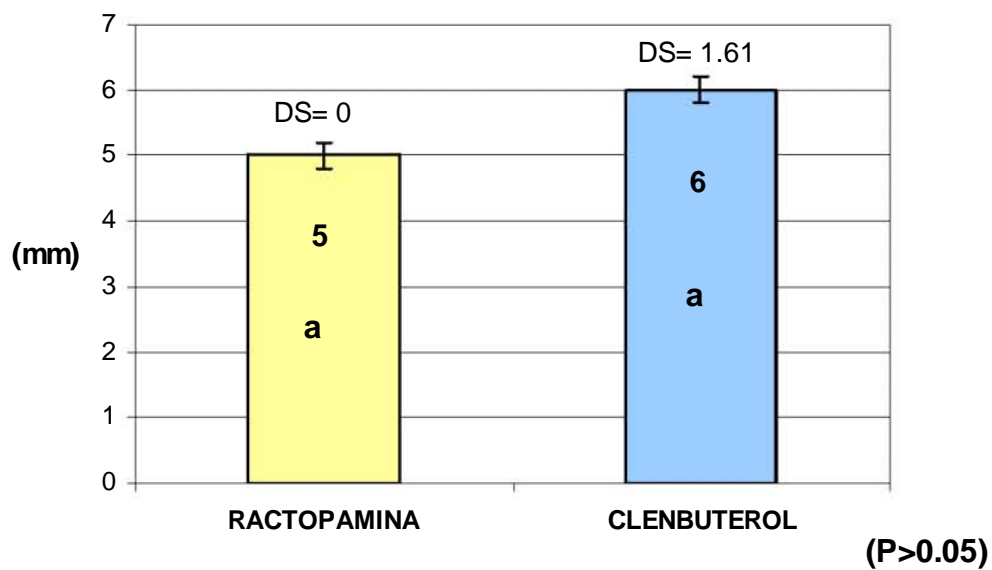
**FIGURA 6. COLOR DE LA GRASA DORSAL (CGD) DE TORETES ESTABULADOS EN EL TRÓPICO CON EL USO DE BETA AGONISTAS**





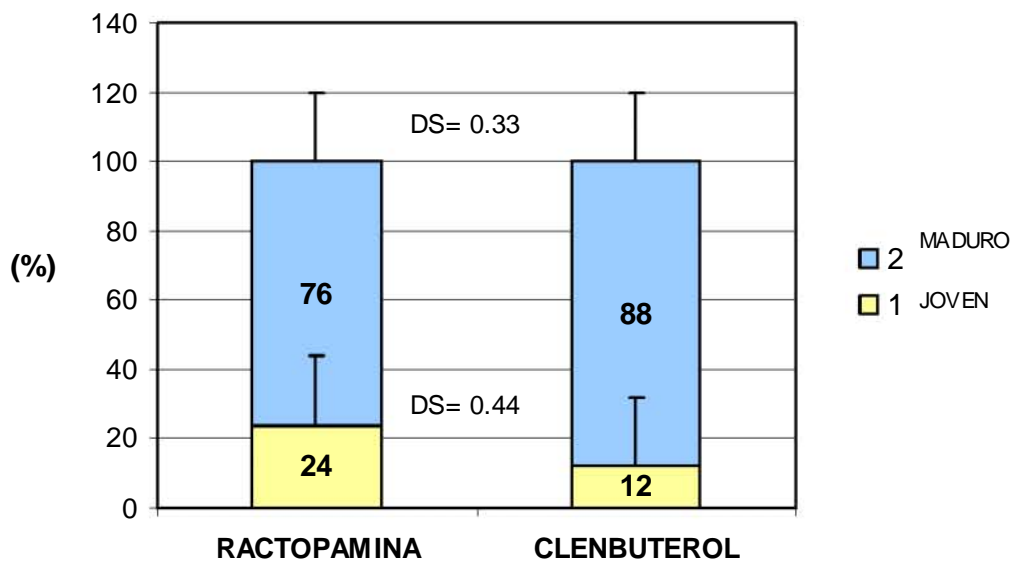
DS= Desviación Estándar

**FIGURA 7. DISTRIBUCION DE LA GRASA DORSAL DE TORETES ESTABULADOS EN EL TRÓPICO CON EL USO DE BETA AGONISTAS**



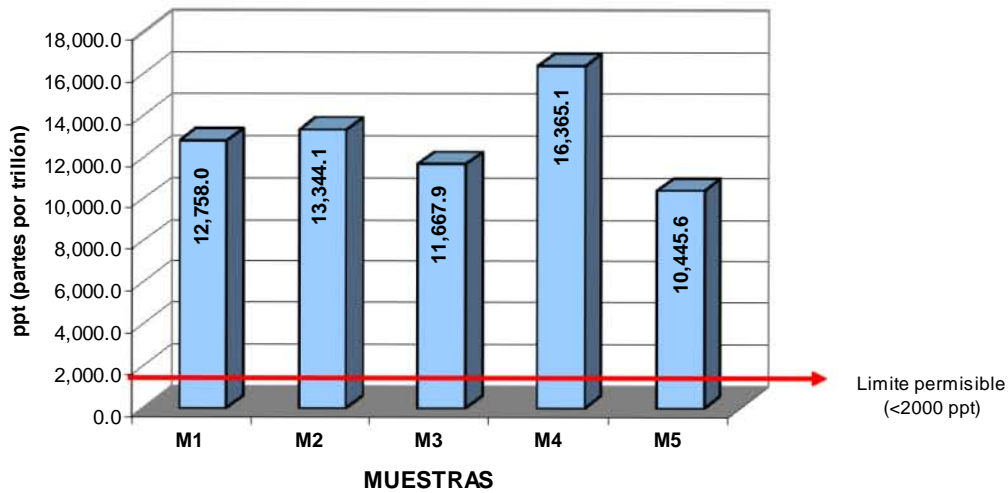
DS= Desviación Estándar

**FIGURA 8. GROSOR DE LA GRASA DORSAL (GGD) DE TORETES ESTABULADOS EN EL TRÓPICO CON EL USO DE BETA AGONISTAS**

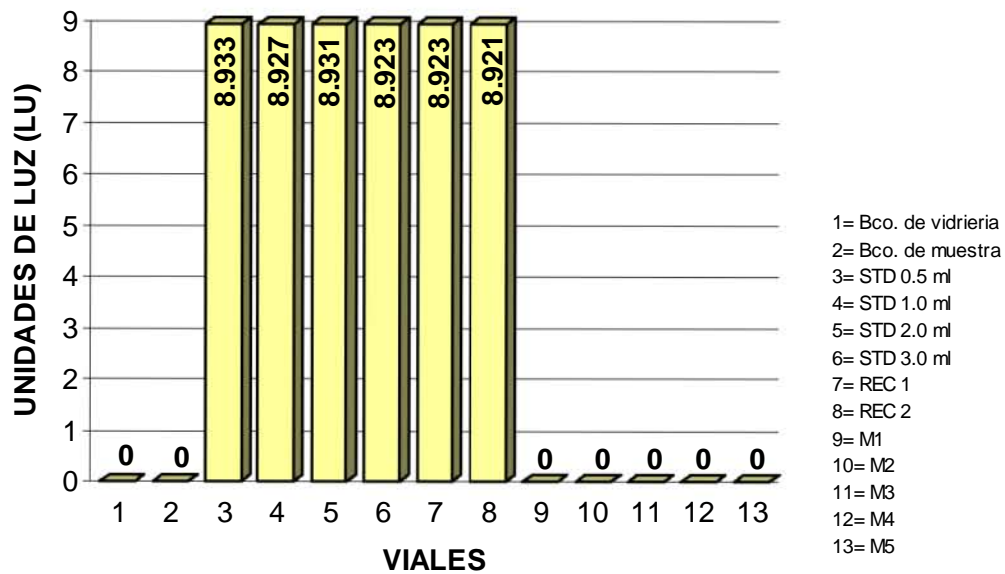


DS= Desviación Estándar

**FIGURA 9. PROMEDIO DE EDADES DE TORETES ESTABULADOS EN EL TRÓPICO CON EL USO DE BETA AGONISTAS**



**FIGURA 10. CONCENTRACIONES DE CLENBUTEROL EN MUESTRAS DE HÍGADO DE TORETES ESTABULADOS EN EL TRÓPICO CON EL USO DE BETA AGONISTAS**



**FIGURA 11. CONCENTRACIONES DE RACTOPAMINA EN MUESTRAS DE HÍGADO DE TORETES ESTABULADOS EN EL TRÓPICO CON EL USO DE BETA AGONISTAS**

## CUADROS

**CUADRO 1. Parámetros de clasificación de calidad de la carne**

CARACTERISTICA	PARAMETRO	INTERPRETACION
Grosor de la grasa dorsal	Calificación	Se expresa en mm
Distribución de la grasa dorsal	1 A 10	Equivale 10 – 100%
	CALIFICACION	INTERPRETACION
Color de la grasa dorsal	1	Blanco aperlado
	2	Blanco
	3	Blanco ligeramente amarillo
	4	Amarillo limón
	5	Amarillo
Color de la carne	1	Rojo cereza brillante
	2	Rojo cereza
	3	Rojo
	4	Rojo ligeramente oscuro
	5	Rojo moderadamente oscuro
	6	Rojo oscuro

Hunsley y Walcom (1988)(120)

**Cuadro 2. Concentraciones de clenbuterol en muestras de hígado de toretes estabulados en el trópico por ELISA. Veracruz, México, 2005.**

Serie No.	Concentración ppt	Absorbancia		B / BO (%)	Calculados ppt	Desviación (%)
		Media	CV			
1	0.0	0.718	0	100.0		
2	100.0	0.675	0	94.0	99.8	0.2
3	300.0	0.489	0	68.1	302.1	0.7
4	900.0	0.413	0	57.5	892.9	0.8
5	2700.0	0.244	0	34.0	2710.7	0.4
6	8100.0	0.155	0	21.6	8077	0.3

CV= Coeficiente de variación

B/Bo=Densidad Óptica/ % de absorción

ppt= partes por trillón

Serie No.	ID	Absorbancia			Calculados ppt	Factor Dilución	ppt
		Media	CV	%			
1	M1	0.089	0.0	12.4	31895.1	0.4	12758.0
2	M2	0.087	0.0	12.1	33360.2	0.4	13344.1
3	M3	0.093	0.0	13.0	29169.8	0.4	11667.9
4	M4	0.078	0.0	10.9	40912.8	0.4	16365.1
5	M5	0.098	0.0	13.6	26114.1	0.4	10445.6
6	C-T	0.567	0.0	79.0	179.3	0.4	71.7
7	C+T	0.107	0.0	14.9	21460.3	0.4	8584.1

ID= Identificación de la muestra

CV= Coeficiente de variación

ppt= partes por trillón

**Cuadro 3. Concentraciones de ractopamina en muestras de hígado de toretes estabulados en el trópico por HPLC con detector de fluorescencia. Veracruz, México, 2005.**

Concentración de la curva de fortificación (ppm)	Área del Estándar	Coefficiente de correlación	Area de la recuperación	Porcentaje de recuperación
1.30	10.08	0.9961	79.18	118.32
2.60	24.82		68.40	103.95
5.21	69.22			
7.81	101.21			

ppm= partes por millón

MUESTRA	X= CONCENTRACIÓN DE LA MUESTRA PROBABLE (ppm)	RESPUESTA	MEDIA
M 1	0.0000	0	0.000
M 2	0.0000	0	
M 3	0.0000	0	
M 4	0.0000	0	
M 5	0.0000	0	

ppm= partes por trillón

## ANEXO 1

### Glosario de Términos

**Beta agonista:** Es un compuesto químico del grupo de los beta adrenérgicos, que confiere a cualquier producto, dilución o mezcla el carácter farmacéutico específico de los mismos, con efectos de promoción de la misma masa muscular, reductor de la cantidad de grasa corporal y efectos sobre el aparato respiratorio (66).

**Residuo:** Es la presencia de un  $\beta$ -agonista o sus metabolitos en un animal, sus productos y subproductos,, determinado por los métodos analíticos oficiales (66).

**Canal de bovino:** Cuerpo del animal sacrificado desangrado y sin piel, abierto a lo largo de la línea media del pecho y abdomen a la cola; separado de la cabeza al nivel de la articulación Atlanta-occipital, de las extremidades anteriores al nivel de la articulación carpometacarpiana y de las posteriores a nivel de la articulación tarsometatarsiana, con o sin presencia de cola, amputada esta a nivel de la segunda vértebra caudal. Sin vísceras cavitarias (excepto los riñones), quedando el diafragma adherido, sin genitales ni ubre (112).

**Tiempo de retiro o plazo de seguridad:** Es el periodo que debe transcurrir entre el momento en el que un animal recibe por última vez un medicamento o alimentos medicados y aquel en que es presentado para su sacrificio y posterior consumo (113).

**Límite de residuos máximos:** Es el límite más alto permisible de un residuo que puede considerarse como aceptable en un tejido en particular, cuando este es analizado por la metodología internacionalmente aceptada para su cuantificación. También se conoce como límite de tolerancia (113).

**Residuo tóxico:** Es la suma de compuestos presentes en cualquier porción comestible de productos animales, cuyo origen sea medicamento o por contaminación y que por estudios previos se ha determinado que se puede constituir un riesgo a la salud pública si se consume por encima de niveles máximos de residuos (113).

## **NORMATIVIDAD**

Queda prohibido el uso de los siguientes ingredientes activos y/o aditivos alimenticios en la formulación de productos alimenticios destinados para consumo por los animales:

1. Cloranfenicol en su modalidad de preventivo o terapéutico.
2. Cristal violeta como fungicida en materias primas y producto terminado.
3. Cumarina en saborizantes artificiales.
4. Pigmectantes sintéticos del grupo de los sudanes.
5. Clenbuterol

Así como todos aquellos ingredientes y /o aditivos alimenticios que comprobadamente puedan ser nocivos para la salud pública o representen riesgo zoonosario, y que no cuenten con el soporte técnico correspondiente para su empleo en la nutrición de los animales (114).

Con excepción de aquellos productos beta agonistas que cuenten con el registro y autorización de la secretaría para su uso o consumo en animales, queda prohibida la producción, manufactura, fabricación, elaboración, preparación acondicionamiento, transportación, tráfico, comercialización, importación, suministro y/o utilización de los principios activos como ingredientes activos, aditivos, alimenticios y/o medicamentos en formulación de productos alimenticios destinados para consumo y uso en los animales, tales como: Bromobuterol, Carbuterol, Cimaterol, Fenoterol, Isoproterenol, Mabuterol, Mapenterol, Orciprenaline, Pirbuterol, Salbutamol, Terbutaline y Clenbuterol (66).

La SAGARPA ha evaluado satisfactoriamente dos moléculas de beta agonistas (clorhidrato de zilpaterol y ractopamina), para su empleo en alimentación animal a las que se han realizado las valoraciones para asegurar que las formulaciones comerciales cumplen con las especificaciones para las que fueron elaboradas, tiene la potencia descrita por el fabricante, son seguras para



los animales y no presentan residuos peligrosos en los tejidos comestibles de los animales para abasto. La fabricación y venta de clorhidrato de zilpaterol y ractopamina se encuentra sujeta a la autorización que la SAGARPA expide mediante el número de registro (115).

El empleo de clorhidrato de clenbuterol se encuentra permitido en formulaciones tópicas de baja concentración para el tratamiento de enfermedades respiratorias de los equinos por su efecto broncodilatador y que permite aumentar la ventilación pulmonar. La fabricación y venta de medicamentos conteniendo clorhidrato de clenbuterol se encuentra sujeta a la autorización que la SAGARPA expide mediante el número de registro (116).

El engordador debe solicitar en escrito libre a la Delegación de la Secretaría en la entidad federativa correspondiente, a su costa y previo el pago de derechos, la certificación de que su explotación pecuaria, se encuentra libre de residuos de beta adrenérgicos (66).

Los engordadores que cuenten con la certificación de libre de residuos de beta agonistas, deben presentar el original y entregar una copia de la certificación de su ganado al comprador y/o administrador del rastro (66).

La Secretaría promoverá el consumo de carne y productos de origen animal proveniente de explotaciones pecuarias que cuenten con la certificación de libre de beta agonistas (66).

La SAGARPA se encuentra realizando acciones de difusión a veterinarios y productores, incitándolos a no emplear sustancias prohibidas en la alimentación del ganado y a denunciar ante nuestros funcionarios de manera directa o anónima el uso ilegal de clenbuterol (115).

Cabe señalar que la NOM-EM-015-ZOO-2002 (66) denominada: "Especificaciones técnicas para el control del uso de beta agonistas en los animales", emitida por la SAGARPA como una medida de emergencia a fin de frenar el uso irracional del clenbuterol entró en vigor el 22 de febrero del 2002 con una vigencia de 6 meses y quedó sin vigencia a partir del 22 de agosto del 2002, por lo que no existe ninguna restricción para el uso del Clenbuterol.

El incumplimiento a las disposiciones contenidas en estas normas se sancionará conforme a lo establecido por la Ley Federal de Sanidad Animal y la Ley Federal sobre Metrología y Normalización (Diario Oficial de la Federación).

## ANEXO 2

### DEPARTAMENTO DE RESIDUOS TÓXICOS Y CONTAMINANTES

#### DETERMINACION DE RACTOPAMINA POR EL MÉTODO DE HPLC

##### FUNDAMENTO

El clorhidrato de ractopamina de acuerdo con la nomenclatura internacional es Benzemethanol, 4-hydroxy-alpha-3-(4-hidroxyphenyl)-1-methylprpyl-amino-methyl.

##### MATERIAL

- a) Filtros para jeringa de 13mm y 0.45µm PTFE
- b) Dosificadores de 0 a 50ml
- c) Espátula acanalada
- d) Equipo de filtración
- e) Gradilla para tubos de 50ml
- f) Insertos de 250µl
- g) Jeringas de 1.0ml
- h) Matraz Erlenmeyer de 500ml
- i) Matraces volumétricos clase A de 10 y 100ml
- j) Matraz Kitazato de 1000ml
- k) Membranas para filtración de 47mm de diámetro, 0.45µm
- l) Microespátula
- m) Micropipetas de 10 a 100 y de 100 a 1000µl
- n) Pipeta sexológica de 10ml
- o) Probeta de 250ml
- p) Puntas para micropipetas de 2 a 100 y de 100 a 1000µl
- q) Agitadores magnéticos
- r) Tubos para centrifuga de polipropileno con tapón de rosca de 50ml
- s) Vial para automuestreador de vidrio de 2ml con tapa y septa
- t) Botellas de polipropileno de 250ml

## EQUIPO

- a) Agitador mecánico
- b) Balanza analítica
- c) Balanza granataria
- d) Baño de ultrasonido con desgasificador
- e) Bomba de vacío
- f) Centrifuga para tubos de 50ml y botellas de 250ml
- g) Cromatógrafo de líquidos equipado con bomba ternaria o cuaternaria, detector de fluorescencia, automuestreador y columna C18 4.6mm x 150mm, 5 $\mu$ m.
- h) Homogenizador de tejidos

## REACTIVOS, SOLUCIONES y ESTANDARES

### Reactivos

- a) Acetonitrilo, grado HPLC
- b) Agua, grado HPLC
- c) Ácido acético grado reactivo o HPLC
- d) Ácido clorhídrico
- e) Ácido 1-octanosulfónico
- f) Estándar certificado de ractopamina
- g) Metanol, grado HPLC

### Soluciones

- a) **FASE MOVIL:** 400ml de acetonitrilo grado HPLC, 600ml de agua HPLC, 20ml de ácido acético y 1.08  $\pm$  0.05gr de ácido octanosulfónico. (Para 1 lt de solución)
- b) **SOLVENTE DE EXTRACCION:** 900ml de metanol HPLC, 100ml de agua HPLC y 2ml de ácido clorhídrico concentrado. Mezclar perfectamente.
- c) **DILUENTE DE LA MUESTRA:** 980ml de agua HPLC y 20ml de ácido acético glacial.

## ESTÁNDARES

- a) **SOLUCIÓN STOCK:** Pesar aproximadamente  $100 \pm 0,1$ mg de estándar de ractopamina en un matríz volumétrico de 100ml, diluir y aforar con metanol HPLC. El peso debe ser corregido por la pureza del estándar. Esta solución es estable por un periodo de 3 meses. Protegerla de la luz solar. Es recomendable guardarla a una temperatura de  $2 - 8$  °C.
- b) **SOLUCIONES DE LA CURVA DE TRABAJO:** Preparar las soluciones que se encuentren dentro del rango de trabajo establecido, aproximadamente de 14.0 a 60 ppm (partes por millón) a partir de la solución stock y llevando a volumen con diluyente de la muestra. Estas soluciones son estables por un periodo de 2 semanas. Protegerlas de la luz solar. Es recomendable guardarlas a una temperatura de  $2 - 8$  °C.

## PROCEDIMIENTO

### EXTRACCION

1. Pesar 7 muestras de  $40g \pm 0.01g$  de tejido blanco en frascos de polipropileno de 250ml, preparar 4 muestras para realizar la curva de estándares, mismas que serán fortificadas con 0.5, 1.0, 2.0 y 3.0ml de la solución stock. Adicionalmente preparar mínimo 2 recuperaciones con 2.0ml, así como un blanco de muestra. Además de las recuperaciones, se debe analizar un blanco de vidriería cuyo origen es el solvente de enjuague del material antes de iniciar la extracción y un blanco de reactivo que es una concentración de los residuos utilizados desde el inicio de la extracción.
2. Dejar reposar las muestras después de haber sido fortificados un tiempo de 10 a 15 minutos para fijar el analito de muestra.
3. Adicionar  $200 \pm 2$  ml de solvente de extracción dejar reposar la muestra un periodo de 10 minutos.
4. Homogenizar cada muestra por un tiempo de 40 segundos.
5. Colocar las muestras en un agitador oscilatorio por un mínimo de 2 horas a un máximo de 18 horas a una velocidad suficiente para completar una porción de 250 rpm (revoluciones por minuto). Es recomendable que las muestras se agiten por un periodo de 12 horas

(toda la noche) para optimizar el tiempo de extracción y obtener buenos porcentajes de recuperación. Las muestras deben mantenerse en posición vertical y sellar bien los frascos para no permitir goteos o fugas de la muestra.

6. Centrifugar las muestras 10 minutos a 2500 rpm. Las muestras son estables en esta solución por un periodo de 48 horas a temperatura ambiente protegiéndolas del contacto de la luz.
7. Diluir una alícuota tomando en cuenta el rango de la curva, si es que se fortificó con la misma concentración, en caso contrario tomar una dilución de 1.0ml en 10 llevando a volumen con diluyente de la muestra. Agitar perfectamente.
8. Filtrar una alícuota para encapsular la muestra en un vial con inserto La filtración es con un filtro de 0.45µm PTFE, se puede ayudar con una jeringa de 1.0ml.

## **CALCULOS**

Constituir una curva de estándares usando la regresión lineal y obtener las concentraciones de las muestras con la ecuación:  **$Y = MX + B$**

### **Donde:**

Y= Área de ractopamina

X= Concentración de la muestra (ractopamina)

M= Pendiente

B= Intercepto en y

## **CONDICIONES DEL EQUIPO**

- Fase móvil: Especificada en soluciones
- Columna: (opcional): Phenomenex Security o equivalente
- Velocidad de flujo: 1.0 ml/min
- Volumen de inyección: 50µl
- Temperatura de la columna: Ambiente (25 °C)
- Longitud de onda de excitación: 226nm

- Longitud de onda de emisión: 305nm
- Tiempo de corrida: 10 minutos

Lavar el sistema por 60 minutos con 1:1 (acetonitrilo ó metanol)/agua después de cada corrida. Guardar la columna en 70% ACN (acetonitrilo) ó MeOH (metanol)/30% de agua.

## ESPECIFICACIONES

Compuesto	Rango analítico (ppm)	% recuperación aceptable	Repetibilidad CV (%)
Ractopamina	> 14.0 (variable)	80 - 120	< 20

ppm= partes por millón

CV= coeficiente de variación

El coeficiente de correlación debe ser mayor o igual a 0.995

## CRITERIOS DE ACEPTACION

Repetir el análisis, si el coeficiente de correlación de la curva de estándares y los porcentajes de recuperación son menores a los especificados por el método.

Este método solo es aplicable para matrices: Hígado, músculo, riñon (porcino, bovino).

## PUNTOS CRITICOS DE CONTROL

VARIABLE	CONTROL ACEPTABLE
Peso de la muestra	40g ± 0.1g
No transferir residuos después de la centrifugación	
Preparación de las soluciones	Poner las cantidades especificadas

**Referencia (117)**

## **DEPARTAMENTO DE RESIDUOS TOXICOS Y CONTAMINANTES**

### **DETERMINACION DE CLENBUTEROL POR EL METODO DE INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO (ELISA)**

#### **FUNDAMENTO**

El clenbuterol es un miembro del grupo de medicamentos llamados beta agonistas que tienen poderosos efectos algunos deseables otros no, tiene habilidad de incrementar masa muscular, y los residuos en los tejidos puede llegar a causar síntomas de envenenamiento agudo en las personas; de ahí la importancia de contar con metodologías que detecten hasta concentraciones bajas como ppt (partes por trillón) de este tipo de compuestos.

La prueba se basa en la relación antígeno – anticuerpo. Los pozos de la placa son cubiertos con anticuerpos específicos al clenbuterol. El conjugado enzima clenbuterol, los estándares de clenbuterol compiten por los sitios de unión de los anticuerpos.

Cualquier enzima conjugado no unida es eliminada con lavados. La enzima substrato (urea-peroxidasa) y el cromógeno (tetrametilbenzidina), son adicionados a los pozos y se incuban.

El enlace de la enzima conjugado se convierte con el cromógeno de color transparente a azul, después se adiciona el reactivo stop (paro de la reacción) y cambia de azul a amarillo. La medición se hace fotométricamente a 450nm la absorción es inversamente proporcional a la concentración de clenbuterol en la muestra.

#### **REACTIVOS INCLUIDOS EN EL KIT**

- 1 microplaca de 12 pozos con 8 pozos cada una.
- 6 soluciones de estándar de clenbuterol con 300µl cada una.
- Soluciones estándar 0.0, 100, 300, 900, 2,700 y 8,100 ppt (partes por trillón).
- 1 conjugado (concentrado de peroxidasa conjugada con clenbuterol) tapa roja.
- 1 substrato (urea-peroxidasa) 7ml de solución. (tapa verde)

- 1 cromógeno (tetrametilbenzidina) 7ml de solución. (tapa azul).
- 1 reactivo stop (ácido sulfúrico 1M (molar)) 14ml. (tapa amarilla).
- 1 buffer (buffer dilución de conjugado) 12ml. (tapa blanca).
- 1 buffer de lavado (buffer tris pH 7.2) solo incluido en el kit de clenbuterol.

## PROCEDIMIENTO DE EXTRACCION

1. Pesar 5g de muestra en un tubo de 50ml
2. Añadir 25ml de ácido clorhídrico 50mM (minimoles) (1ª depuración)
3. Homogenizar la muestra con la ayuda de un homogenizador
4. Agitar la muestra con un agitador mecánico horizontal por 1.30 minutos o toda la noche.
5. Pesar 6g del homogenizado y poner en tubos para centrifugar
6. Centrifugar la muestra a 3600 rpm (revoluciones por minuto) 15 minutos a 10 – 15 °C.
7. El sobrenadante pasarlo a otro tubo.
8. Agregar 300µl de Hidróxido de sodio 1M
9. Agitar 15 minuto en el agitador
10. Agregar 4ml de Fosfato de potasio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) a pH de 3.0 a 0.5M (2ª depuración)
11. Centrifugar 15 minutos a 4000G a 10 – 15 °C.
12. Pasar el sobrenadante a otro tubo.
13. La columna se activa con 3ml de metanol y se pasa por goteo todo el metanol después a una velocidad de 1 gota por segundo.
14. Agregar 2ml de solución buffer KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50mM pH 3.0 (solución de enjuague).
15. Agregar la muestra (pasarla por la columna lavada).
16. Agregar 2ml de solución buffer a la columna.
17. Secar la columna con flujo de aire.
18. Eluir la muestra lentamente con 1ml de metanol (100%), a una velocidad de 15 gotas por minuto.
19. Evaporar la muestra a 50 a 60 °C bajo corriente débil de aire o nitrógeno.



20. Reconstituir el residuo seco en 400µl (0.4ml) de agua destilada y emplear 20µl por pozo para el análisis.

## **ENSAYO INMUNOENZIMATICO (ELISA)**

Cuando las muestras ya están extraídas se procede a preparar la placa donde serán aplicadas para realizar el ensayo.

## **CONSIDERACIONES PRELIMINARES**

- Dejar que todos los reactivos y muestras estén a temperatura ambiente antes de su uso.
- Regresar todos los reactivos a 2 – 8 °C inmediatamente después de su uso.
- No permitir que los micropozos sequen entre los pasos del procedimiento.
- La reproducibilidad en cualquier ELISA depende en gran parte de la consistencia con la que los micropozos son lavados. Seguir cuidadosamente la secuencia de lavado recomendado como se marca en el procedimiento de análisis de ELISA.
- Evitar la luz directa solar durante todas las incubaciones. Se recomienda tapar las microplacas.

## **PREPARACION DE LA MICROPLACA**

- a) Cortar la bolsa de aluminio que contiene la placa transversalmente.
- b) Retirar los pozos requeridos junto con el macro.
- c) Los pozos que no utilice mantengamos junto con el agente de secado, bien cerrado dentro de la bolsa de aluminio y a una temperatura de 2 – 8 °C.
- d) Insertar suficientes pozos en la placa integrada en el kit, para todos los estándares y muestras.
- e) Preparar el anticuerpo ya que viene presentada en forma concentrada. Debido a que la enzima conjugado tiene estabilidad reducida, solo deberá reconstituirse la cantidad necesaria. Antes de **pipetear la enzima**

conjugado deberá agitarse cuidadosamente. Para preparar una solución 01:11 en solución buffer.

- f) Agregar 100µl de solución de anticuerpos diluidos a cada pozo e incubar por 15 minutos a temperatura ambiente.
- g) Vaciar el líquido de los pozos invirtiendo la placa boca abajo y sacudiéndola vigorosamente contra un papel secante, llenar todos los pozos con 250µl de agua destilada y vaciarla nuevamente. Repetir dos veces más.
- h) Agregar 20µl del estándar ó de la muestra preparada por duplicado.
- i) Agregar 100µl de la enzima conjugado diluida, en el fondo de cada pozo e incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.
- j) Repetir el punto 3.
- k) Agregar a cada pozo 50µl del sustrato y 50µl de cromógeno. Mezclar e incubar en la oscuridad por 15 minutos a temperatura ambiente.
- l) Agregar 100µl de la solución paro a cada pozo. Mezclar y medir la absorbancia a 450nm contra un blanco de aire. Leer dentro de un lapso de 60 minutos.

## CALCULOS

Los valores promedio de absorbancia obtenidos para los estándares y las muestras a través de las lecturas dadas por el lector de ELISA a 450nm, se dividen entre el valor de absorbancia del primer estándar (estándar cero) y se multiplican x 100. Por lo tanto el estándar cero se vuelve al 100% y los valores de absorbancia se dan en porcentaje.

$$\frac{\text{Absorción del estándar (o muestras)}}{\text{Absorción del estándar cero}} \times 100 = \% \text{ Absorción}$$

Los valores calculados para los estándares entran en un sistema de coordenadas en un papel semilogarítmico, la concentración equivalente de clenbuterol en (ng/kg) la curva de calibración deberá ser virtualmente linear en el rango de 200 – 2,000ng/kg (ppt). Los equivalentes del clenbuterol en ng/kg

correspondientes a la extracción de cada muestra pueden leerse a partir de la curva de calibración.

1ng/kg equivalente de clenbuterol es igual a 1ng/kg de clenbuterol, 13ng/kg salbutamol, 10ng/kg terbutalina, 0.7ng/kg brombuterol y 1.2ng/kg mobuterol.

**NOTA:**

Con objeto de obtener la concentración de clenbuterol en ng/kg (ppt) contenido en una muestra, la lectura de concentración de la curva de calibración deberá multiplicarse posteriormente por el factor de dilución correspondiente. Cuando se trabaja de acuerdo a la regulación mencionada, los factores de dilución son:

<b>Matriz</b>	<b>Factor de dilución</b>
<b>Orina</b>	<b>1.0</b>
<b>Tejido</b>	<b>0.4</b>
<b>Retina</b>	<b>2.0</b>
<b>Alimento</b>	<b>25.0</b>
<b>Pelo</b>	<b>6.0</b>
<b>Suero</b>	<b>1.0</b>

**CONDICIONES DEL EQUIPO**

Encender el equipo 15 minutos antes de leer la placa

Leer a 1 longitud de onda de 459nm

**PUNTOS CRITICOS DE CONTROL**

**Respecto a el kit:**

- No usar el kit clenbuterol fase caduco
- No diluir o adulterar los reactivos, puede provocar disminución o nula sensibilidad.

- No intercambiar reactivos individuales entre kits de diferentes lotes.

#### **Almacenamiento:**

- Almacenar el kit a 2 – 8 °C. No congelar.
- Pozos no usados regresarlos a su caja original.
- El cromógeno es sensible a la luz. No exponerlo directamente a ella.

#### **Indicadores de deterioro del kit:**

- Cualquier coloración del cromógeno indica deterioro.
- Valor < 0.6 unidades de absorbancia del estándar cero indica inestabilidad de los reactivos.

#### **En cuanto a las extracciones:**

- Tejido= respetar tiempos de goteo de las columnas de purificación que marca este procedimiento, porque un mal goteo ocasionaría pérdida de muestra.
- Alimento= Respetar el pH indicado
- Pelo= Evaporar la muestra, antes de reconstituir.

### **ESPECIFICACIONES**

Para decidir si una muestra es positiva a el uso de clenbuterol se tienen las siguientes especificaciones como límites de residuos máximos por matriz.

<b>Matriz (+)</b>	<b>ng/kg (ppt)</b>
<b>Tejido</b>	<b>2,000</b>
<b>Alimento</b>	<b>10,000</b>
<b>Orina</b>	<b>2,000</b>
<b>Retina</b>	<b>3,000</b>
<b>Suero</b>	<b>2,000</b>
<b>Pelo</b>	<b>6,000</b>

ppt (partes por trillón)

- Rango analítico (estándares) 0 – 8,100 ppt
- Si salen positivas las muestras hay que analizarlas por duplicado antes de dar un resultado.

## **CRITERIOS DE ACEPTACION**

Los resultados deberán cumplir los parámetros requeridos por el kit correspondiente para emitir resultados y dictámenes es decir el coeficiente de variación no debe ser > 10%.

Los controles más y menos deben tener un rango de positividad y negatividad todas las veces que sean empleados.

La densidad óptica por estándar no debe ser mayor ni menor a 20% con respecto a la lectura del certificado del kit y la desviación estándar de cada punto de la curva no debe ser mayor a 1.0.

La absorción del estándar del punto 1 no tiene que ser mayor a 0.6 unidades de absorbancia porque esto indica inestabilidad de los reactivos (118, 119).