

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNICA

IMPLEMENTACIÓN Y VALIDACIÓN DE UNA TÉCNICA ANALÍTICA
CUANTITATIVA PARA RACTOPAMINA EN HÍGADO, RIÑÓN, MÚSCULO Y
GRASA DE CERDO, MEDIANTE EL USO DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE
ALTA RESOLUCIÓN

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

ANGEL RAÚL BUENO PÉREZ

Asesores:

Dr. Héctor Salvador Sumano López

Dra. Dinorah Vargas Estrada



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.

DEDICATORIA

A la memoria de mi primo Carlos Altair

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primeramente a mi madre María del Rosario Bueno Pérez por todo el sacrificio realizado durante más de 26 años para que yo llegara a ser quien ahora soy, por todos los consejos, motivaciones, vivencias, experiencias, regaños y sobre todo valores que fueron parte vital de mi formación como profesionista, como persona, pero sobre todo como ser humano. A mi padre Mario Alberto Acacio García por demostrarme que se puede llegar tan lejos como uno se lo proponga, por demostrarme que la disciplina es un gran valor que nos hace ser grandes seres humanos, y por todo el apoyo brindado desde que llego a nuestra vida. A mi abuelita María Luisa Pérez Quintero por estar conmigo durante toda mi niñez, por todos esos viajes, vivencias y experiencias, por todos los valores que me inculco, por todo el apoyo que me ofreció durante toda mi vida y porque nunca dejo de creer en mí. A mi tía Edith por cuidarme como a un hijo durante toda mi niñez, a mis tías y tíos Martha, Mayte, Zoraida, Gina, Fernando (cuate), Silvestre, Josafat, Daniel, Manuel y Aurelio por ser parte fundamental de mis logros como persona, por todas esas horas de risas, llantos, consejos, fiestas y más que nos hacen ser una gran familia. A mis primos Daniel, Alan y Misael por todos esos desmadres que hicimos, hacemos y seguiremos haciendo durante el tiempo que nos queda de vida. A mis demás primos Montse, Daniela, Carlos, Yose, Chiky, Karin, Iván, Karen, Sinaí, Alejandra y La Güera, por todos esos momentos que hemos pasado juntos a lo largo de nuestras vidas y que no cambiaría por nada. A mi tía Güera y mi tío Seco, por dejarme ser parte de su familia. A mi abuelito Alvarito quien fue un gran ejemplo para mí, enseñándome que la humildad y sencillez es lo que te define como persona. A Marieli Zacnite por todas esas horas de risas, juegos, paseos, llantos y más que hemos compartido juntos. A toda la familia Acacio García, a la señora Angelita, Roberto, Oscar, Irma y Andrés por aceptarme como un miembro más de su familia y brindarme la confianza para sentirme parte de ellos. A mis amigos Cumbia, Isrra, y Chabela (CCI) por todos esos momentos que pasamos y seguiremos pasando juntos, al Krusty, Rubicundo, Sofía, Montse, Julia, Amazona, Rodrigo, Maja, Chuky, Picil, Piti, y Ulises por esas increíbles “experiencias” que vivimos juntos. A toda la cerveza que durante el tiempo que duro mi carrera fue ingerida en grandes cantidades y que fue parte fundamental de mi formación como Medico Veterinario. A mis amigos del laboratorio Itzcoatl, Claudia, Heidi, Pablo y Lizbeth por ser un gran ejemplo a seguir y por todos los consejos que me han brindado desde que los conocí. Al Dr. Héctor Salvador Sumano López por confiar en mí y darme la gran oportunidad de trabajar a su lado, a la Dra. Dinorah Vargas por todo el conocimiento que me transmitió desde el primer día que llegue al laboratorio y darme la confianza para trabajar con ella, a la Sra. Feliza por su valiosa colaboración en este trabajo. Al departamento de Farmacología y Fisiología y su personal por todo su apoyo brindado a lo largo de mi formación, a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Así como a sus profesores por convertirme en el profesionista que ahora soy. A la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO por toda la sabiduría que me dio, y por permitirme portar con orgullo los colores AZUL Y ORO de nuestra gran institución.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.	1
INTRODUCCIÓN.	2
JUSTIFICACIÓN.	11
HIPÓTESIS.	12
OBJETIVO.	12
MATERIAL Y MÉTODOS.	13
RESULTADOS.	22
DISCUSIÓN.	40
CONCLUSIONES.	42
REFERENCIAS.	43
ÍNDICE DE CUADROS.	46
ÍNDICE DE FIGURAS.	48

RESUMEN

BUENO PÉREZ ÁNGEL RAÚL. Implementación y validación de una técnica analítica cuantitativa para ractopamina en hígado, riñón, músculo y grasa de cerdo mediante el uso de cromatografía líquida de alta resolución. (Bajo la dirección del Dr. Héctor Salvador Sumano López y la Dra. Dinorah Vargas Estrada)

Es inevitable contar con técnicas analíticas para detectar residuos de fármacos en los productos de origen animal, con el fin de garantizar su inocuidad en la salud pública. La ractopamina es un ergotrópico que se utiliza para incrementar la productividad de las especies destinadas al consumo humano aprobado en México, Estados Unidos de Norteamérica y otros países. En los últimos años, la producción del cerdo en nuestro país se ha visto incrementada, para satisfacer los requerimientos del consumo a nivel nacional y para la exportación a países, principalmente a Japón y Corea, cuyas reglamentaciones sanitarias son muy estrictas. En México, no se cuenta con una herramienta analítica que este apegada a la legislación y que sirva para determinar los residuos de ractopamina en los tejidos del cerdo así como su tiempo de retiro, por lo que para dar cumplimiento a los exigencias sanitarias, en este trabajo se implementó y validó una técnica analítica en HPLC (Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución), con detector de fluorescencia, metodología apropiada, de acuerdo a la normatividad nacional y mundial para el análisis de residuos en productos de origen animal y por ende para la detección de ractopamina en tejidos de cerdo.

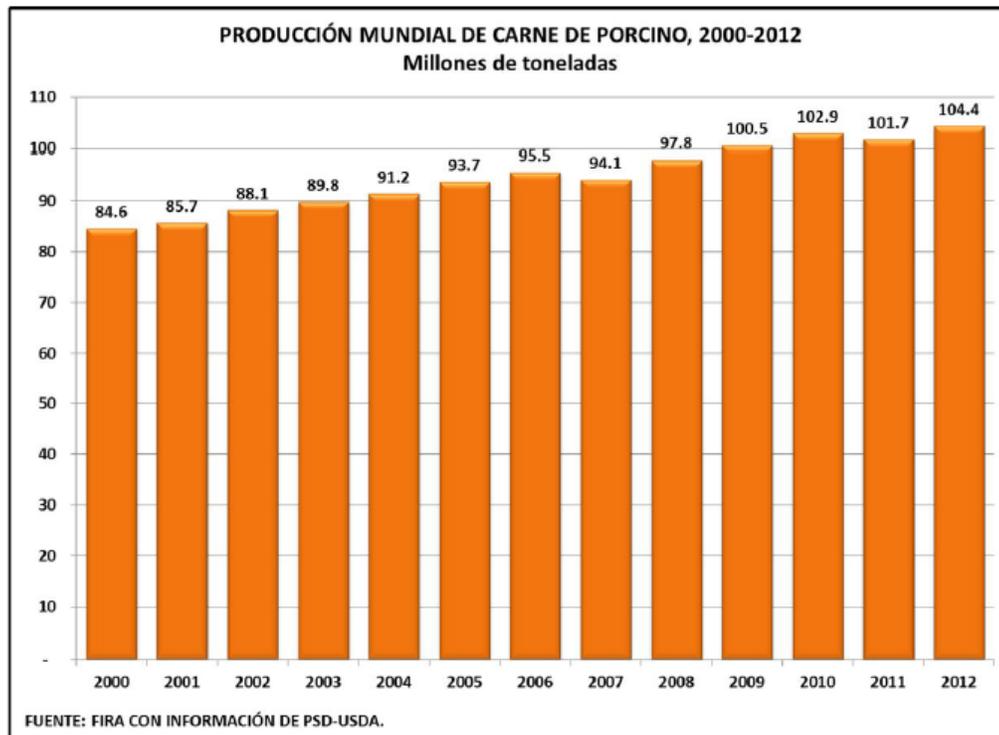
El método, resultó ser preciso, exacto, lineal, repetible, reproducible, selectivo, y el límite de detección y cuantificación fue adecuado con respecto al LMR (Limite Máximos de Residuos) y de los criterios de aceptación establecidos, así mismo, la estabilidad de las soluciones y las muestras cumplen con los criterios de repetibilidad y exactitud, de acuerdo a la NOM-177-SSA1- 1998.

INTRODUCCION

La carne roja de mayor consumo a nivel mundial es la de cerdo, y su demanda en las últimas décadas ha experimentado un fuerte incremento, con un número de animales que alcanzará los mil millones antes del año 2015, el doble que en la década de 1970. ^(a) Esto debido a los cambios en los patrones de consumo derivados del aumento de ingresos de los países en desarrollo con economías de rápido crecimiento.

Como se puede ver en la figura 1, en el periodo 2001-2011 la producción de carne en el mundo creció a una tasa media anual de 1.7%. Durante 2012, la producción mundial de carne totalizó 104.4 millones de toneladas.

Figura 1. Producción mundial de carne de cerdo periodo 2000-2012.



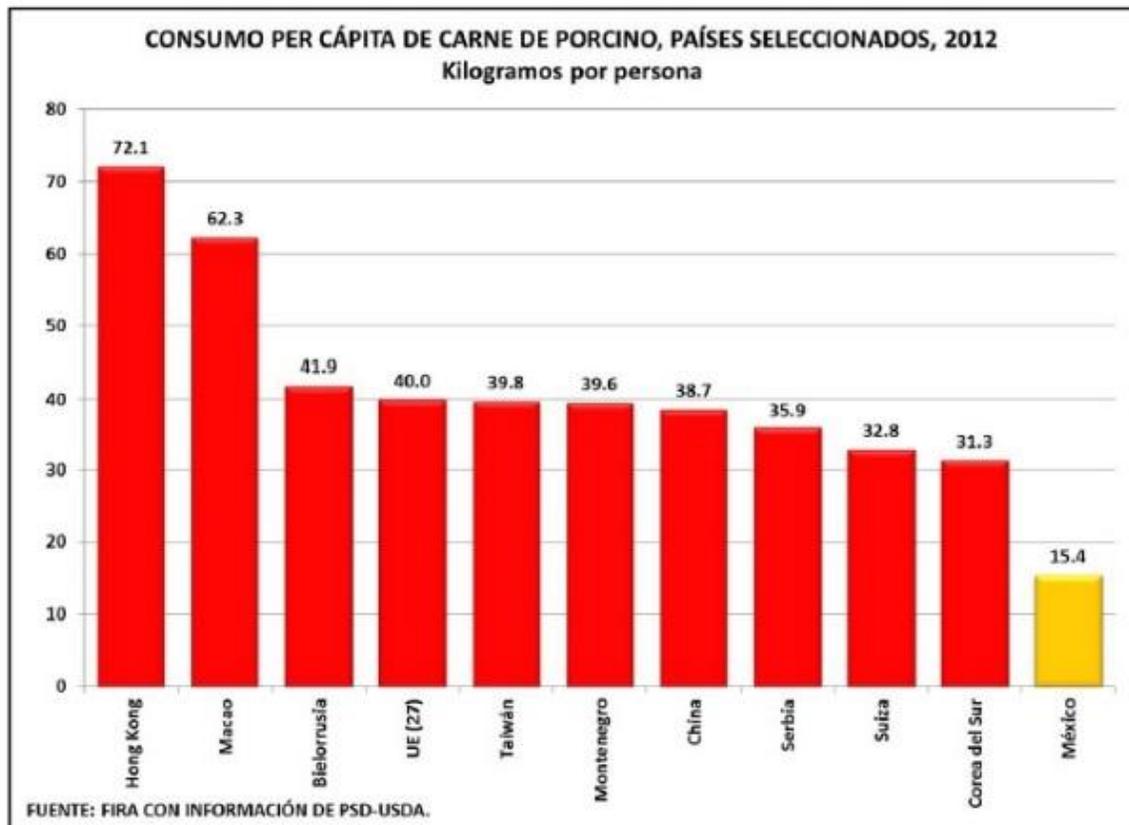
Con respecto a la producción mundial de carne de porcino, el 81.2% de la producción se concentra en China, la Unión Europea y Estados Unidos. México,

(a) <http://www.fao.org/ag/againfo/th>

ocupa la posición 10° como productor a nivel mundial, con una participación de 1.2% en el año 2012.

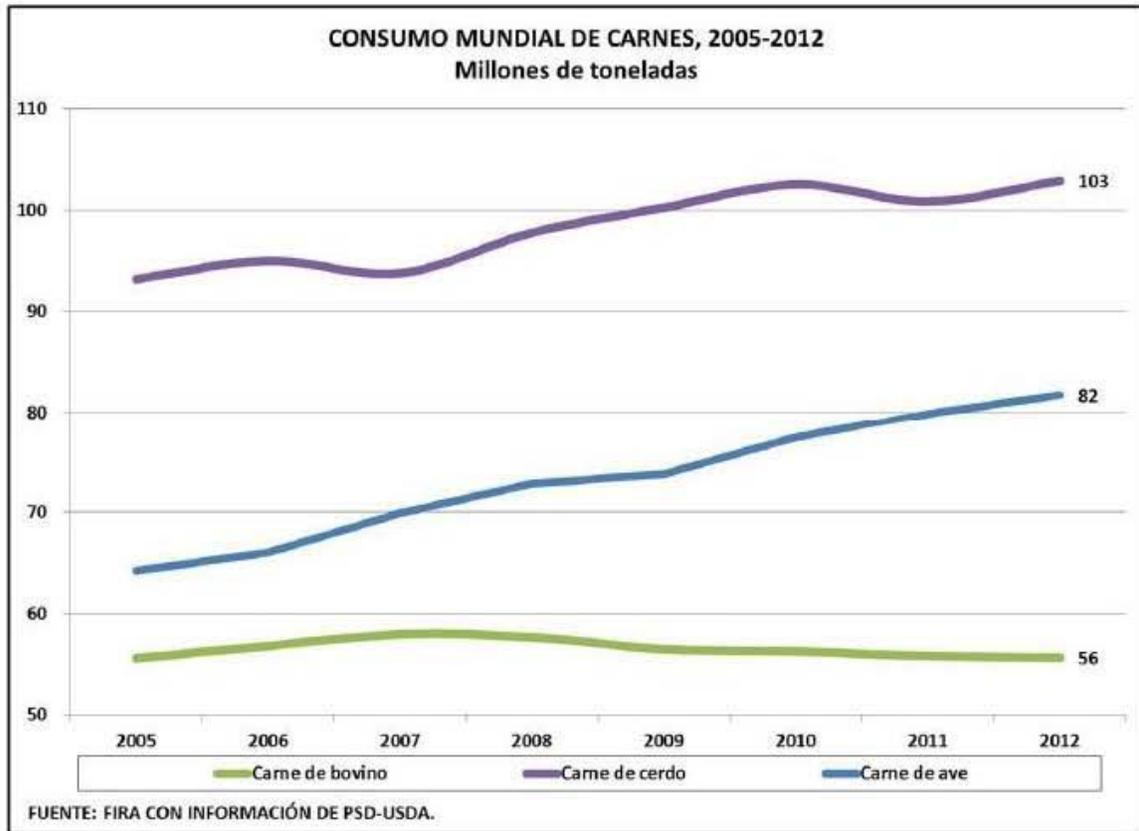
El consumo per cápita más alto en el mundo se ubica en los países asiáticos y europeos, en México el volumen de consumo per cápita anual se ubica en 15.4 kilogramos, de acuerdo con la información del United States Department of Agriculture (USDA) como se indica en la figura 2.

Figura 2. Consumo per cápita de carne de cerdo en algunos países, durante el año 2012.



En México, en el 2012 el consumo de carne de cerdo representó un 43% con respecto al conjunto de carnes derivadas de bovino y ave, véase figura 3.

Figura3. Consumo mundial de carnes, durante el periodo 2005-2012.



La producción de carne de porcino en México en el año 2011 se ubicó en 1.18 millones de toneladas, siendo Jalisco y Sonora los principales estados productores a nivel nacional, seguidos de Guanajuato, Puebla, Yucatán y Veracruz, véase figura 4 y 5.

Figura 4. Producción nacional de carne de cerdo, 2000-2012.

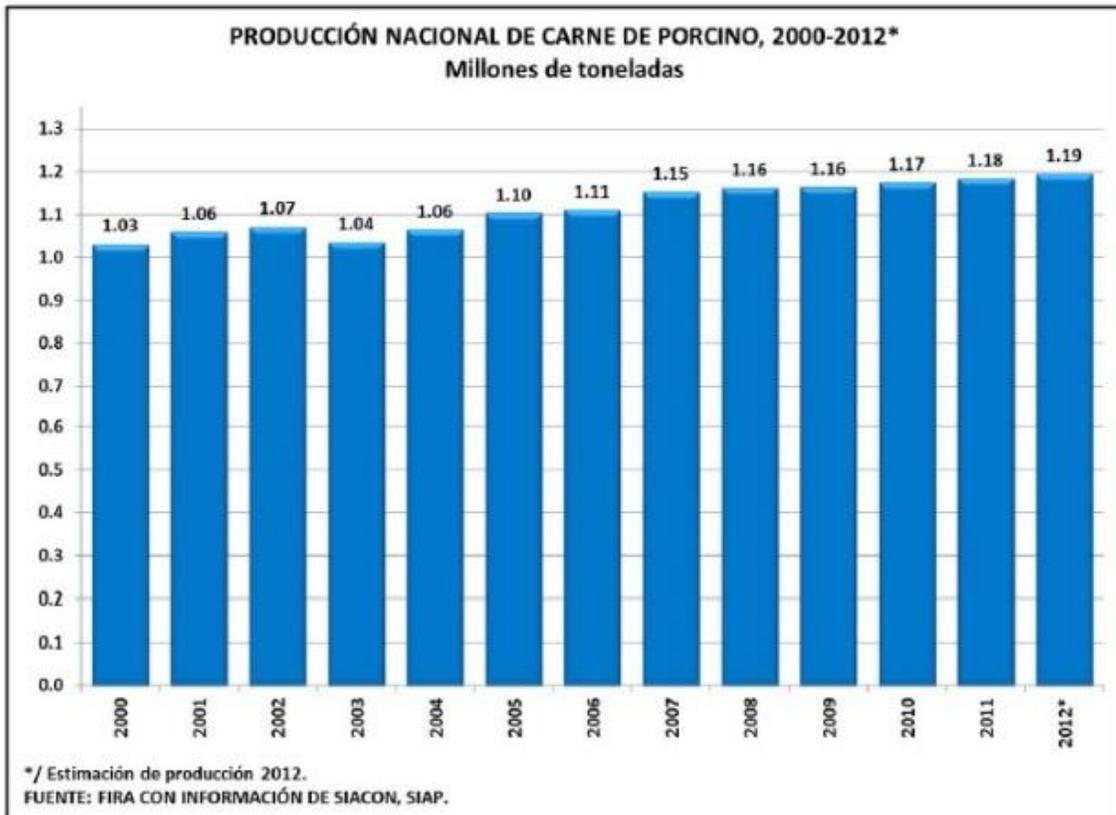
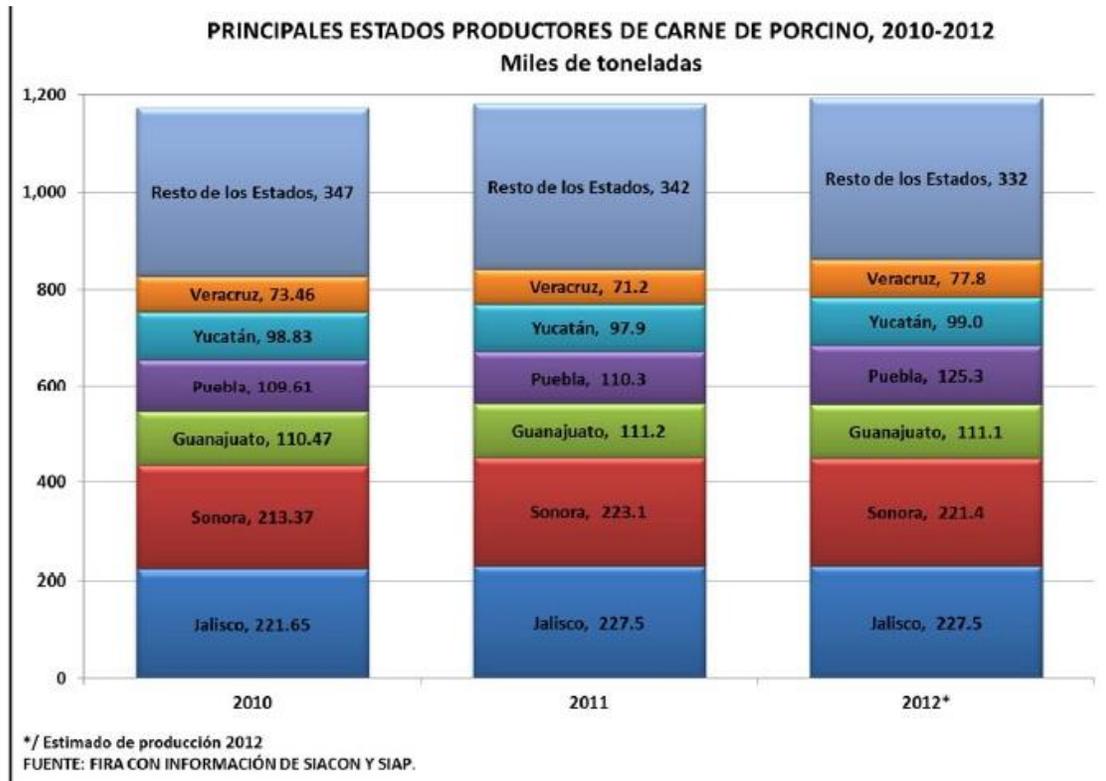


Figura 5. Principales estados productores de carne de cerdo en México en el periodo del 2010-2012.



En la última década, las exportaciones de la carne mexicana se incrementaron 10.5% en 2011, motivado principalmente por la demanda de Japón, principal destino de la carne de cerdo mexicana. Por este motivo, México debe cumplir con la normatividad y exigencias sanitarias de los organismos regulatorios de los países a los que exporta, lo que permite el intercambio comercial de alimentos de origen animal, ya que se garantiza la calidad sanitaria, y se amplía la posibilidad del comercio internacional ⁽¹⁾.

Por otro lado, los costos de producción en la industria porcina, como son el sueldo de los empleados, alquiler, materia prima, alimento, depreciaciones de equipo, una gran cantidad de insumos y factores adicionales como la existencia de “introdutores” y otros intermediarios, deben ser tomados en cuenta para evitar pérdidas en la producción. ⁽²⁾

Con el fin de incrementar la ganancia del hato, en muchos países se utilizan los ergotrópicos o promotores de crecimiento para mejorar la producción, en especial la velocidad de crecimiento y la conversión alimenticia, esto con el fin de disminuir el tiempo de producción y por consiguiente los costos de producción. En contraste existen países en los que se encuentran totalmente o parcialmente prohibidos los promotores de crecimiento en la alimentación animal. Tal es el caso de la Unión Europea en la que por diversos factores (tanto políticos, como sociales) se ha justificado la prohibición de los promotores del crecimiento. A pesar de las consecuencias que su prohibición conlleva, entre las que destacan el aumento de patologías entéricas, el deficiente índice de conversión de alimento y con ello un marcado incremento en el costo de producción.⁽³⁾

Hoy en día, se dispone de una amplia gama de aditivos alternativos que ayudan a mejorar la producción (conversión alimenticia, porcentaje de carne magra, etc.) con variados modos de acción y sobre todo de eficacia pero lo que sí está claro es que ninguno de ellos puede sustituir por sí solo a los ergotrópicos. Una de las principales desventajas del uso de promotores del crecimiento es la presencia de residuos en los tejidos, lo que representa un grave problema en salud pública, entre las afecciones más recurrentes que se pueden presentar es la presencia de alergias, surgimiento de resistencias de patógenos, interacciones hormonales, etc. A este respecto, la normatividad en los países exige conocer el tiempo de retiro de los fármacos para mantener los residuos por debajo del LMR (Limite Máximo de Residuos), razón por la cual, se deben implementar técnicas de detección de residuos en los productos de origen animal, con el fin de garantizar la inocuidad de los productos de origen animal.

Uso de agonistas β adrenérgicos (β AA) como ergotrópicos

Los agonistas β adrenérgicos (β AA) se han utilizado en la producción animal durante mucho tiempo, propiciando una mayor eficiencia del uso del alimento, la cual se manifiesta en mejores características de la canal, así como en la composición química de la carne. En México, Estados Unidos de Norteamérica y otros países, la ractopamina es un ergotrópico aprobado para su uso en cerdos. ⁽⁴⁾

La Ractopamina incrementa la ganancia diaria de peso, mejora la eficiencia y la conversión alimenticia, además de aumentar el porcentaje de rendimiento y porcentaje de carne magra de la canal. El Clorhidrato de Ractopamina es un β -agonista con capacidad para redistribuir los nutrientes promoviendo la deposición del músculo y disminuyendo la de grasa. Es estructuralmente similar a las catecolaminas epinefrina y norepinefrina, tiene una alta afinidad hacia los receptores β -adrenérgicos en tejido adiposo y muscular. ⁽⁵⁾

Farmacodinamia y farmacocinética

La Ractopamina es una molécula orgánica (véase figura 6) que se une a los receptores β -adrenérgicos a nivel de la membrana celular, que a su vez activa a la proteína Gs1. La subunidad α de la proteína Gs activa a la adenilatociclasa, enzima que produce el monofosfato de adenosina cíclico (AMPc). Esta molécula produce su efecto al unirse a la subunidad reguladora de la cinasa proteínica A, para liberar la subunidad catalítica que fosforila a un gran número de proteínas intracelulares. Las proteínas intracelulares tienen papeles funcionales vitales para una gama de funciones que van desde permitir la entrada del Ca^{++} a la célula, hasta mediar la síntesis de proteínas, clave para el funcionamiento celular. El Clorhidrato de Ractopamina incrementa la cantidad de carne magra. Actúa directamente sobre la utilización de los nutrientes de la acumulación de grasa hacia la síntesis de proteína, de manera que hay un incremento en la carne magra contenida en las canales de los animales que fueron alimentados con dietas a las que se les adicionó el producto. ⁽⁶⁾

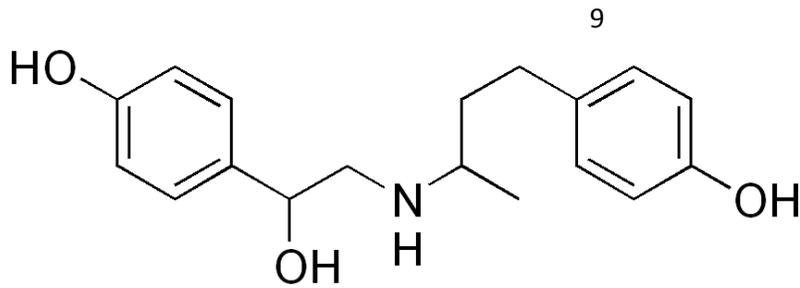


Figura 6 .Formula estructural de ractopamina.

Normativa y regulación sobre el uso de ractopamina en México y el mundo

A nivel mundial el uso de ractopamina se encuentra prohibido en la Unión Europea (UE) desde 1989, si bien, su uso está aprobado en 26 países como EEUU, Australia, Brasil, Canadá, Indonesia, México, Filipinas y Corea del Sur. La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) emitió un dictamen en el que señala que no hay datos suficientes para hacer una propuesta de LMR para la ractopamina y que por lo tanto, los riesgos para la salud humana no se pueden descartar.

La prohibición en la UE permanece aun cuando en el *Codex Alimentarius*, la Ractopamina tiene un índice de Ingesta Diaria Aceptable (ADI) de 0-1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal, un Límite Máximo de Residuos (LMR) De 10, 40, 90 Y 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de tejido en musculo, hígado, riñón y grasa respectivamente, véase cuadro 1. ⁽⁴⁾

Cuadro 1. Ingesta Diaria Aceptable (ADI) y Límite Máximo de Residuos (LMR) para ractopamina en tejidos de cerdo y ganado vacuno. Fuente: *Codex Alimentarius*.

RACTOPAMINA (coadyuvante de producción)		
Evaluación del JECFA:	40 (1992); 62 (2004); 66 (2006)	
Ingesta diaria admisible (IDA):	0-1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal (62 ^a reunión del JECFA, 2004).	
Definición del residuo:	Ractopamina.	
Especie	Tejido	LMR ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Vacuno / Vaca	Músculo	10
Vacuno / Vaca	Hígado	40
Vacuno / Vaca	Riñón	90
Vacuno / Vaca	Grasa	10
Cerdo	Músculo	10
Cerdo	Hígado	40
Cerdo	Riñón	90
Cerdo	Grasa / Piel	10

Como ya se mencionó, en México está permitido el uso de ractopamina como promotor de crecimiento, avalada por la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) por medio de la NOM-064-ZOO-2000⁽⁷⁾ la cual establece una clasificación de los productos farmacéuticos veterinarios por el nivel de riesgos de sus ingredientes activos para evitar que estos puedan ser nocivos a la salud animal, y su posible repercusión en salud pública. Dentro de este listado, la ractopamina se encuentra en la clase de: Promotores del crecimiento, subclase: beta agonistas, clasificación: grupo I, esto indica que es un ingrediente activo restringido para su venta mediante receta médica cuantificada y que es de uso exclusivo del médico veterinario con cedula profesional.⁽⁸⁾

Técnicas para la detección de ractopamina

En México, no se cuenta con una técnica analítica cuantitativa para la detección de ractopamina en tejidos de cerdo que este regulada y avalada por la SAGARPA, técnica que revele la cantidad de residuos de ractopamina libre en los tejidos de cerdo, con el fin de garantizar la inocuidad de dicho alimento. Las pruebas que podemos encontrar en el mercado internacional son test rápidos como el RAC (inmunoensayo), ELISA, Ractopamina ELISA 96 test, etc. Estas pruebas solamente indican la presencia de ractopamina en ciertos tejidos o fluidos de cerdo, pero no la cantidad exacta que se encuentra en cada tejido, esto nos lleva a obtener datos poco confiables sobre los residuos que se encuentra en cada tejido, y es que como lo menciona el Codex Alimentarius, el LMR para ractopamina es diferente en hígado, músculo, riñón y grasa. Por lo cual, se deben confirmar los resultados en equipos como cromatografía de líquidos de alta resolución o cromatografía de gases masas.⁽⁹⁾

JUSTIFICACIÓN

Recientemente se incluyó a la ractopamina en la clasificación de fármacos de uso veterinario que puede emplearse como promotor del crecimiento. En México no hay técnicas que permitan medir los residuos de ractopamina en carne de cerdo con el fin de ofrecer un alimento inocuo y que se encuentre apegado a la normativa mexicana. En este trabajo se implementó y validó una técnica para detectar residuos de ractopamina en hígado, riñón, músculo y grasa de cerdo mediante el uso de cromatografía líquida de alta resolución, la cual nos ofrece datos exactos sobre la cantidad de ractopamina que se encuentra libre en cada tejido analizado y nos permite conocer el tiempo de retiro, para reducir los residuos por debajo del LMR en los tejidos de cerdo.

HIPÓTESIS

Con los recursos de instrumentación y material con los que cuenta el departamento de Farmacología y Fisiología de la FMVZ-UNAM y con base en las técnicas descritas en la literatura para detectar ractopamina por debajo de los límites máximos de residuos (LMR), es posible desarrollar una técnica analítica-cuantitativa que se apegue a la normativa mexicana.

OBJETIVO

Desarrollar una técnica analítica-cuantitativa y validada para determinar ractopamina en tejidos de cerdo que logre detectar concentraciones de hasta 10, 40, 90 Y 10 µg/kg de tejido en musculo, hígado, riñón y grasa respectivamente, equivalente al LMR establecido por el *Codex Alimentarius*^{*} mediante el uso de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC- High Performance Liquid Chromatography)

*<http://www.codexalimentarius.net/vetdrugs/data/vetdrugs/details.html?lang=es&d-16497-o=2&d-16497-s=3&id=79&print=true>

MATERIAL Y MÉTODOS

Lugar donde se realizó el trabajo:

Laboratorio de Investigación del Departamento de Farmacología Veterinaria, en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

De un total de 24 cerdos, se obtuvieron 4 grupos (A, B, C Y D) de 6 animales respectivamente, al grupo "A" se le ofreció alimento adicionado con Ractopamina a una dosis de 40ppm durante 27 días, y se sacrificó, al grupo "B" se le ofreció alimento adicionado con Ractopamina a una dosis de 40ppm durante 28 días, y se sacrificó, al grupo "C" se le ofreció alimento adicionado con Ractopamina a una dosis de 40ppm durante 28 días, se suspendió el tratamiento el día 29 y se sacrificó, al grupo "D" se le ofreció alimento adicionado con Ractopamina a una dosis de 40ppm durante 28 días, se suspendió el tratamiento el día 29 y 30, y posteriormente se sacrificó.

De los 24 animales, se retiró el hígado y un riñón, así como una cantidad de musculo y grasa al azar, se mantuvieron en refrigeración (4°C) y se enviaron para su análisis.

Cabe mencionar, que el tratamiento, sacrificio, así como la toma y envío de muestras fueron realizados por laboratorios PiSA® con sede en la ciudad de Guadalajara, y el procesamiento de las muestras fue realizado en el laboratorio de investigación de farmacología de la FMVZ-UNAM.

Materiales

- 1) Micropipetas (100, 200, 1000 µL) labopette ®HirschmannLaborgerate
- 2) Membranas desechables de nylon 0.45µm de HNWP Millipore®
- 3) Filtro de jeringa Millex HN Nylon 0.45 µm, 13 mm Millipore®

- 4) Cartuchos de extracción de fase sólida: Alúmina acida (Alúmina A) 2g aproximadamente. Actividad grado I, Waters Sep-Pak Classic, No. 51800, Waters Sep-Pak Plus No. 20500.
- 5) Sistema para filtración y vacío (Matraz kitazato, portafiltros, base vidrio, tapón y abrazadera de 1000 mL PALL®)

Reactivos

- 1) Agua grado HPLC
- 2) Metanol grado HPLC (MeOH) JTBaker®
- 3) Acetonitrilo grado HPLC (ACN) JTBaker®
- 4) Acetato de etilo, grado HPLC JTBaker®
- 5) Ácido acético glacial grado reactivo JTBaker®
- 6) Buffer de borato (0.025 M pH 9.5) JTBaker®

Equipos

- 1) Sala fría 4 °C (York by Johnson Controls)
- 2) Balanza Analítica (modelo 1-800 Sartorius®)
- 3) Sistema Purificador de agua (*Simplicity* Millipore®)
- 4) Sistema Cromatográfico de líquidos de alta resolución modelo Jasco® XLC™
 - Bomba cuaternaria de gradiente (PU 2089 Plus)
 - Inyector (Jasco 3159 AS).
 - Controlador: LC NET II/ADC
 - Detector de fluorescencia (FP2020 Plus)
 - Guarda columna: CO-2067 Plus
 - Ordenador: Gateway GT3076m
 - Impresora: hp Laser Jet 1018

- 5) Molino de carne o procesador de alimentos Moulinex® modelo HVS
- 6) Procesador de alimentos ProctorSilex®
- 7) Homogenizador de tejidos Heidolph ®modelo SilentCrusher M
- 8) Agitador de tubos Multi-reaxHeidolph®
- 9) Centrifuga (Leyend RT®, Modelo Sorvall)
- 10) Evaporador de nitrógeno, Infra®
- 11) Baño seco Felisa ®modelo FE-404
- 12) Campana de extracción de humos ESCO® modelo EFA-48
- 13) Desecador de vacío Alltech ® modelo 210351
- 14) Agitador magnético multistation 10 IKA modelo RT10
- 15) Congelador -20° LRP Lab Research Products®
- 16) *Rotoevaporador IKA® modelo RV10 CS99 equipado con sistema de enfriamiento IKA ® KV600 digital y con bomba de vacío MPC 105 T ILMVAC*
- 17) Baño ultrasónico de agua (*Smith kline®, Modelo B12*)
- 18) Potenciómetro (*Conductronic*)
- 19) Columna HPLC: *C18 fase reversa como Supelcosil®LC-18-DB de 5 µm, 4.6 x 250 mm, Part No. 58355*

Estándares

Clorhidrato de Ractopamina C₁₈ H₂₃ NO₃HCl Sigma Aldrich ® lot SZBA074X
95.9%

Vigencia: 15-Marzo- 2010 - 15-Marzo- 2013

Clorhidrato de Ritodrina Sigma Aldrich ® 018K1317

PROCEDIMIENTO

Preparación de soluciones

Buffer de borato (0.025 M pH 9.5)

Se adicionó 9.54 ± 0.05 g de borato de sodio a un volumen de 900 mL de agua grado HPLC y se disolvió con agitación, posteriormente se agregó hidróxido de sodio 1 N hasta lograr que el pH llegara a 9.5 ± 0.1 y se aforó a 1 L.

Fase móvil HPLC

A 320 mL de acetonitrilo grado HPLC, se adicionó 680 mL de agua grado HPLC, 20 ml de ácido acético glacial. Se mezcló y filtró a través de un filtro de $0.45 \mu\text{m}$ y se degasificó.

Diluyente de la muestra (ácido acético, 2% v/v)

A 980 mL de agua HPLC, se adicionó 20 mL de ácido acético glacial grado reactivo y se mezcló.

Preparación del estándar de referencia

Solución stock (clorhidrato de ractopamina 1000 $\mu\text{g/ml}$)

Se adicionaron 5mg de estándar de referencia de clorhidrato de ractopamina a un matraz volumétrico de 5 mL y se diluyó al aforo con metanol, se utilizaron guantes para manipular el estándar de referencia. Los estándares se almacenaron entre 2-8°C.)

Estándar intermedio (clorhidrato de ractopamina 10 $\mu\text{g/ml}$)

Se transfirieron 0.05 mL de la solución estándar stock en un matraz volumétrico de 5 mL, se diluyeron con el diluyente de la muestra, se mezcló bien y se llevó al aforo. Los estándares se almacenaron entre 2-8°C.)

Fortificación del estándar (clorhidrato de ractopamina 0.20 µg/mL)

Se transfirieron con micropipeta 0.1 mL de la solución estándar intermedia en un matraz volumétrico de 5 mL y se aforó con el diluyente de la muestra y se mezcló. Para niveles de fortificación más altos, se puede utilizar la solución estándar intermedia 10 µg/ml.

Preparación de la curva patrón en fase móvil

Se realizó la preparación de la curva patrón de clorhidrato de Ractopamina como se muestra en el cuadro 2.

Las soluciones de la curva estándar de clorhidrato de ractopamina se prepararon por diluciones volumétricas del estándar de fortificación 0.20 µg/mL usando el diluyente de la muestra y siendo el volumen de aforo 5 mL.

Cuadro 2. Concentraciones de la curva patrón del estándar de clorhidrato de Ractopamina en fase móvil.

Matraz	Concentración de Clorhidrato de Ractopamina (ng/mL)
1	100
2	50
3	25
4	10
5	5
6	2.5
7	1.25

Preparación del estándar de resolución

Se realizaron soluciones que contenían Clorhidrato de Ritodrina y Clorhidrato de Ractopamina en el rango de 10 y 20 ng/ml en diluyente de la muestra.

Preparación y almacenamiento de tejidos

Para la preparación de las muestras fue necesario iniciar con la molienda del órgano, se utilizaron los procesadores de alimentos para producir muestras homogéneas. Fue necesario un mínimo de 500 g de muestra. Se almacenaron todos los tejidos a temperatura de congelación (-10 °C o menos).

Preparación de las muestras de recuperación y control

Se preparó una muestra de recuperación con órgano control (músculo). Se realizó una solución de 10 ng/g fortificado con 0.5 mL de estándar de ractopamina 0.20 µg/mL por cada 10 g de órgano.

Proceso de extracción de muestras de órganos para cuantificar Ractopamina

Se pesó aproximadamente 10 ± 0.2 g de una muestra molida representativa del órgano en un tubo de centrifuga.

Se adicionó 20 ± 1 mL de metanol a la muestra.

Se homogenizó el tejido usando el agitador de tubos durante 20 min; para aumentar el contacto del solvente con el tejido.

Se centrifugó la muestra anterior a 3000 rpm por 15 min. (4 °C)

Se recolectó el sobrenadante con pipetas pasteur y se almacenó en un tubo.

Se adicionó por segunda vez 20 mL de metanol al tejido, se agitó vigorosamente con una espátula durante 2 minutos, se centrifugó a 3000 rpm por 15 minutos y se adicionó el segundo sobrenadante obtenido al primero.

Se repitió el paso anterior adicionando el tercer sobrenadante al primero y segundo. NOTA: En este punto del análisis es adecuado para parar el análisis. Las muestras fueron almacenadas por al menos 7 días entre 2-8 °C hasta que el análisis se completó.

Para los tejidos que contenían ≤ 50 ppb o niveles desconocidos: se tomó una alícuota de 8.0 ± 0.1 mL del sobrenadante combinado en un matraz bola. (Previa agitación de los sobrenadantes recolectados). Se evaporó la muestra a un volumen de 0.5 mL con aire o nitrógeno a $49 \pm 2^\circ\text{C}$. Nota: No fue necesario secar la muestra completamente, la mayoría del material remanente fue un residuo oleoso (aceitoso). Menos de 0.5 ml fue suficiente para remover la mayoría del metanol.

Se adicionaron 2 mL del buffer de borato y se mezclaron por dos minutos intentando que la solución tocara toda la superficie del matraz.

Extracción líquido/líquido

Se adicionaron 7 ml de acetato de etilo al matraz que contenía la muestra y se agitó con vortex por 2 minutos. Se vació en el tubo de centrifuga y se adicionó 1 mL de acetato al matraz bola y se agitó por 2 minutos.

Se centrifugó el tubo por 5 min a 2000 rpm.

Se transfirió la capa superior (acetato de etilo) en un tubo limpio de 16 x 100 mm usando una pipeta desechable, sin remover la parte de la fracción inferior (buffer de borato).

Extracción fase sólida

Se humectó el cartucho de alúmina ácida usando aprox. 5 ml de acetato de etilo, se dejó que el solvente drenara a la superficie del cartucho. La velocidad del flujo no fue importante.

Se transfirió la tercera y segunda fracción de acetato de etilo al cartucho. Se drenaron las fracciones de acetato de etilo combinadas a la superficie del cartucho SPE a una velocidad de flujo de aprox. 2-4 mL/min. Se descartó el cartucho efluente.

Se lavó el cartucho con aprox. 5 mL de acetato de etilo a la misma velocidad de flujo de la muestra y se paró el flujo cuando el líquido alcanzó la superficie del empaque del cartucho. Se descartó el cartucho efluente.

Para fluir la ractopamina del cartucho, se adicionaron aproximadamente 15 mL de metanol al cartucho y se recolectaron el efluente en un tubo de 16 x 100 mm. Se extrajo el líquido completamente del cartucho usando presión o vacío. La velocidad del flujo de metanol no sobrepasó de 5 mL/ min.

Nota: este punto del análisis es adecuado para detener el mismo.

Se evaporó la muestra hasta sequedad usando un rotoevaporador. Se disolvió volumétricamente la muestra en 1 mL del diluyente de la muestra, se agitó el tubo vigorosamente por dos minutos. Y se sonicó por aproximadamente 30 segundos en un baño ultrasónico.

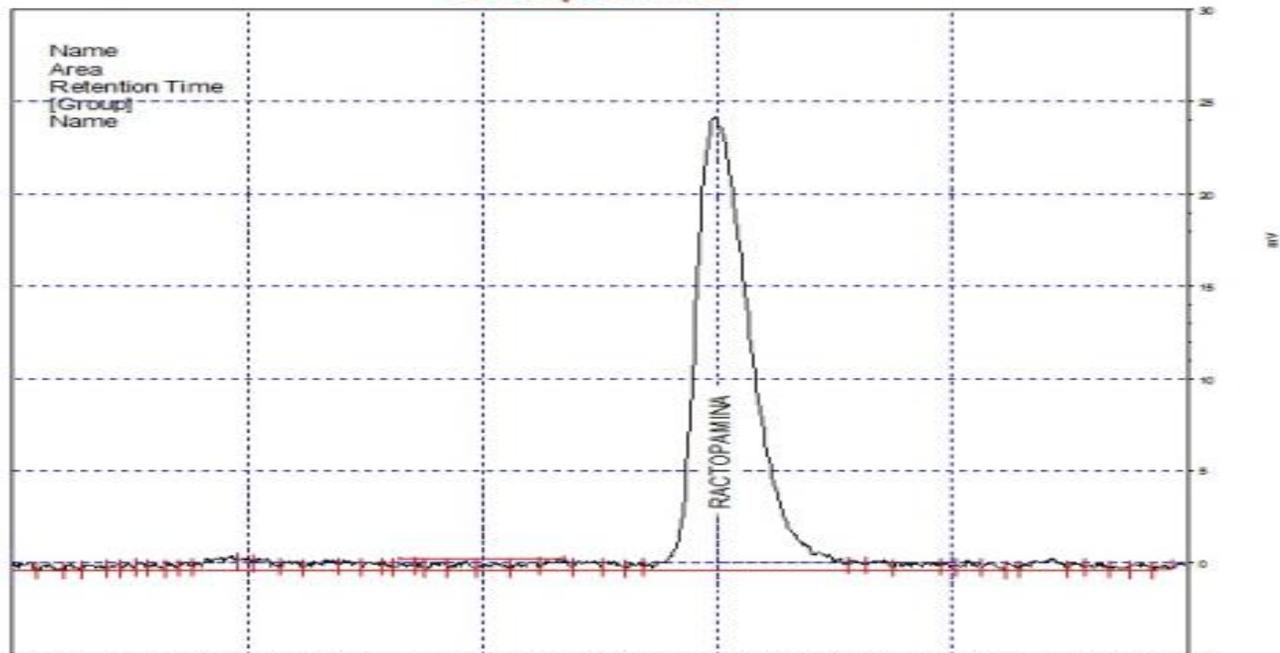
Se recuperó la muestra del matraz bola a través de una jeringa. Se filtró la muestra a través de un filtro de jeringa PTFE de 0.45 μm x 13 mm y se recolectó la muestra filtrada en un vial Nota: este punto del análisis es adecuado para parar el mismo.

Condiciones cromatograficas

Cuadro 3. Condiciones cromatográficas para el análisis de las muestras de cerdo tratado con ractopamina.

Fase móvil	320 mL de acetonitrilo HPLC, 680 mL de agua HPLC, 20 mL de ácido acético glacial.
Columna cromatográfica	4.6 mm i.d. x 25 cm Supelcosil LC-18-DB, o equivalente
Velocidad de flujo	1.0 ml/min
Volumen de inyección	50µl
Temperatura	Ambiente (20-25°C)
Longitud de onda	Excitación 226 nm Emisión 305 nm
Tiempo de corrida	10 minutos

Figura 7. Cromatograma típico para este método analítico.



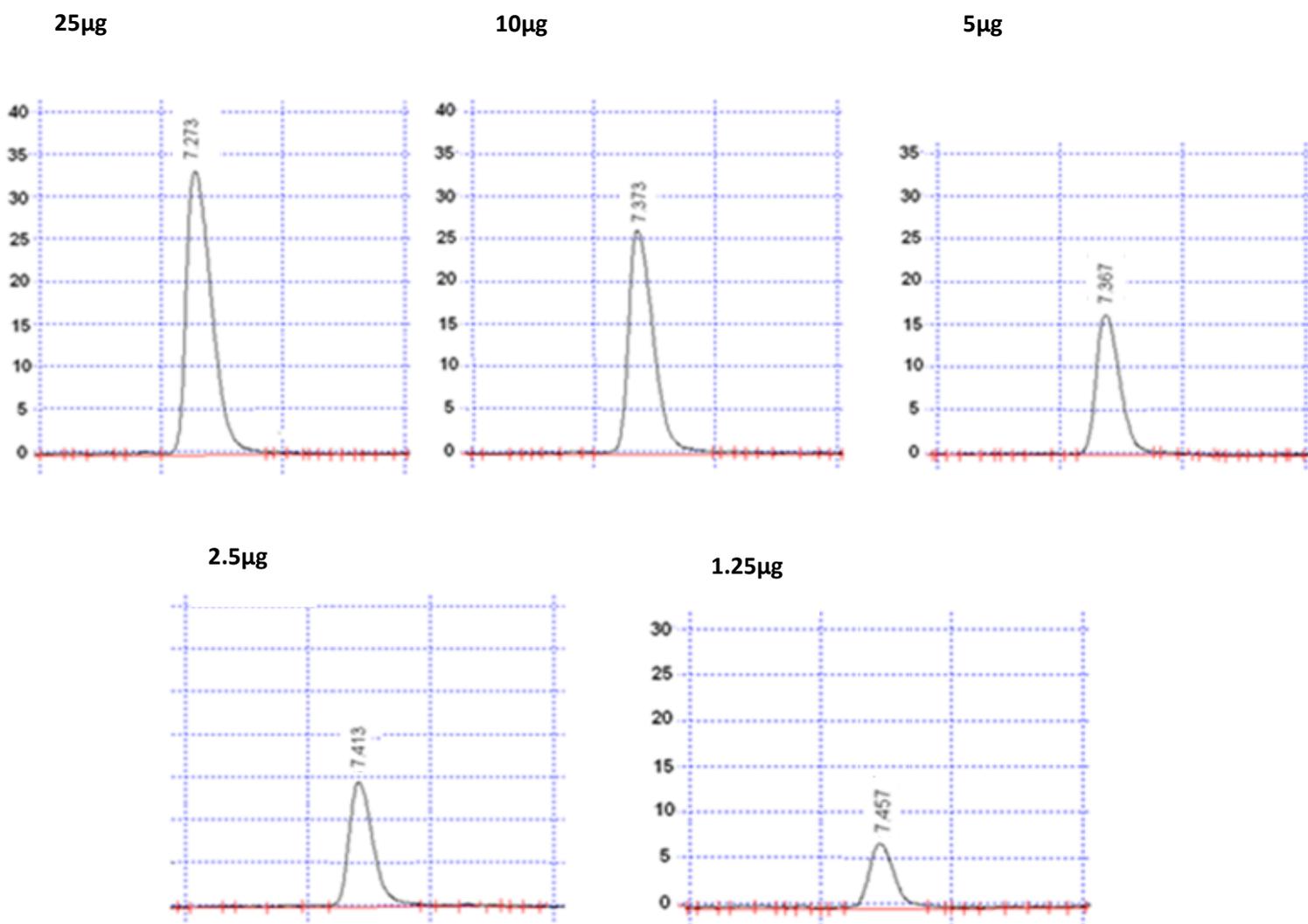
RESULTADOS

Curva patrón

Se preparó la curva patrón del clorhidrato de Ractopamina, mediante diluciones volumétricas del estándar de fortificación en una concentración de 25, 10, 5, 2.5, 1.25 $\mu\text{g/mL}$, se utilizó el diluyente de la muestra (ácido acético, 2 % v/v) y se aforó a 5 mL.

Figura 8. Ejemplos de cromatogramas de la curva estándar de Ractopamina.

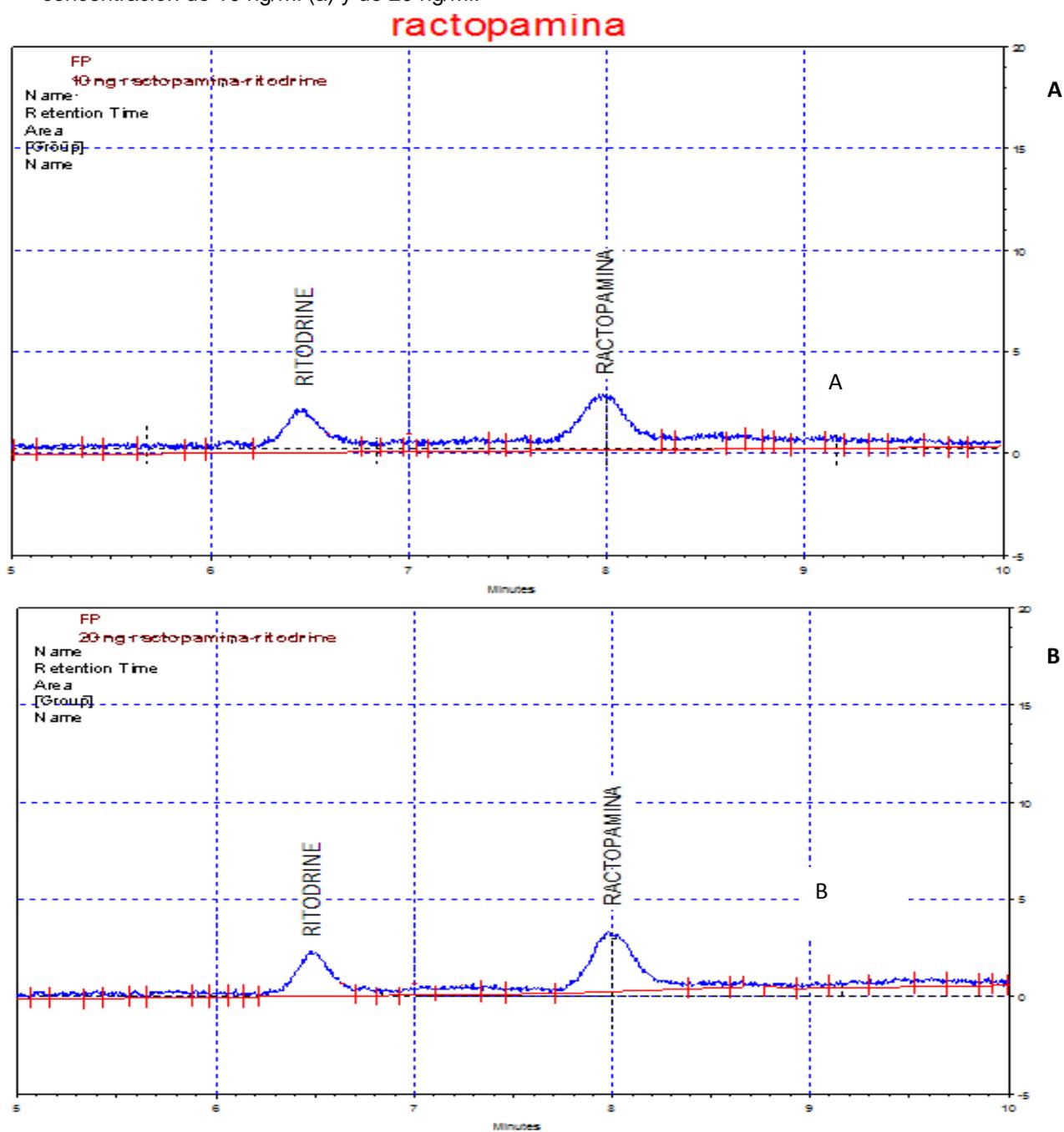
Ractopamina



Preparación del estándar de resolución

Con el fin de medir la selectividad del método analítico, se realizaron soluciones que contenían Clorhidrato de Ritodrina y Clorhidrato de Ractopamina en el rango de 10 y 20 ng/ml en diluyente de la muestra.

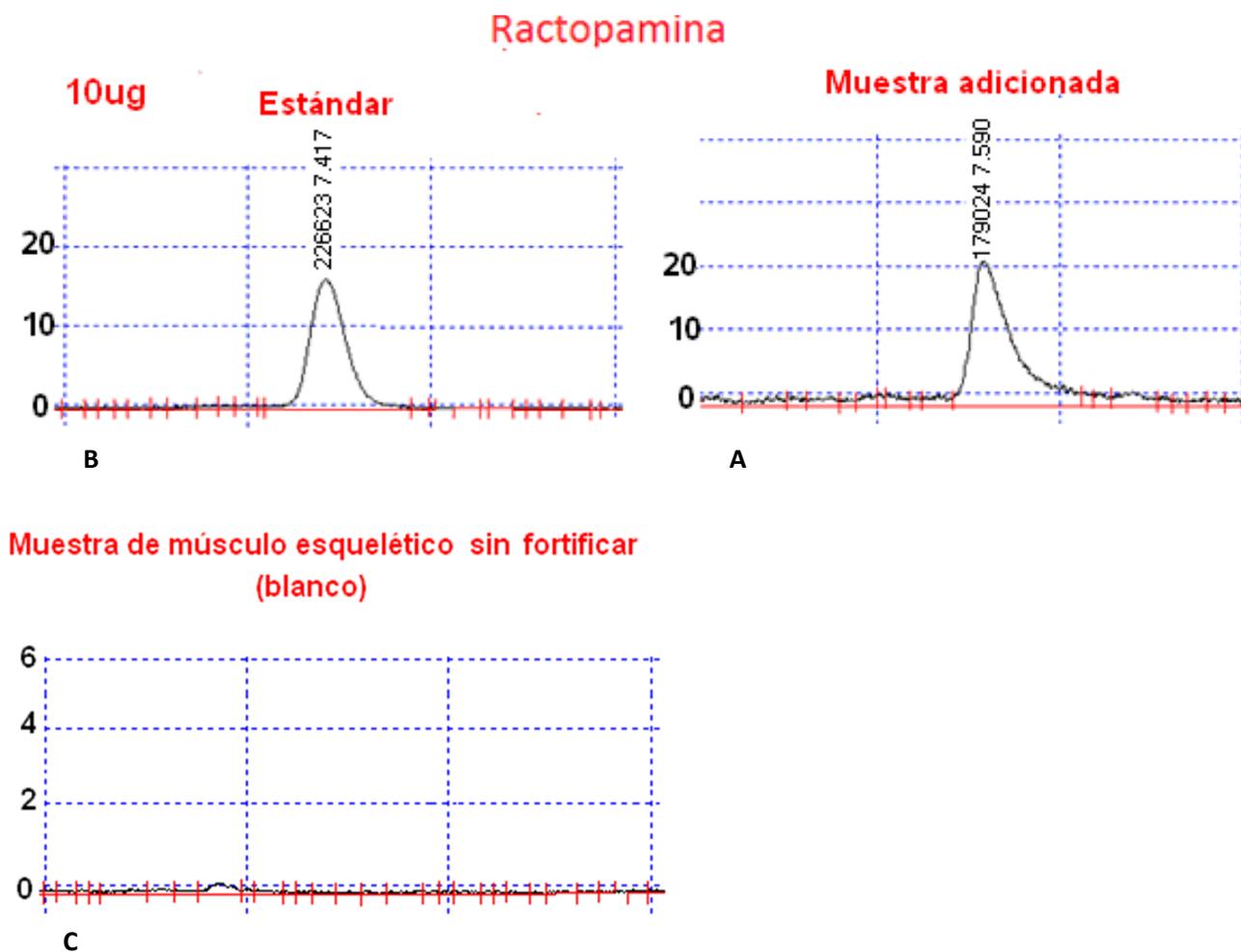
Figura 9. Selectividad del método analítico. Cromatograma de ractopamina y ritodrina en una concentración de 10 ng/ml (a) y de 20 ng/ml.



Muestras fortificadas

Se fortificó el tejido muscular de cerdo blanco con 0.1 mL de la solución estándar de 50 μg , 10 μg y 2.5 μg de ractopamina. En muestras de tejido de 10 g, esto equivale a 50 ng/g, 10 ng/g y 2.5 ng/g.

Figura 10. Ejemplo de cromatograma de Ractopamina obtenido de la muestra adicionada (b), su comparación con el estándar (a) y el tejido blanco sin fortificar (c).



Resultados obtenidos en las muestras

Se analizaron las muestras de tejido de cerdo (24 cerdos), encontrándose las siguientes concentraciones:(Véase cuadro 4).

Cuadro 4. Concentración de ractopamina en las muestras de cerdo tratadas con ractopamina.

Identificación de la muestra	Hígado µg/kg	Riñón µg/kg	Músculo µg/kg	Grasa µg/kg	Identificación de la muestra	Hígado µg/kg	Riñón µg/kg	Músculo µg/kg	Grasa µg/kg
A1	53.1	19.2	8.1	6.4	C1	0.01	0.012	0.01	0.006
A2	13.3	32.4	5.0	5.3	C2	0.035	0.014	0.009	0.003
A3	60.1	14.3	3.2	2.6	C3	0.002	0.005	0.006	0.001
A4	53.4	13.6	1.0	1.1	C4	0.001	0.02	0.0	0.01
A5	42.4	23.7	2.3	1.1	C5	0.041	0.016	0.001	0.0
A6	33.6	21.9	1.4	1.3	C6	0.02	0.0	0.004	0.002
B1	11.0	1.1	0.99	1.95	D1	0.006	0.0	0.0	0.0
B2	8.2	2.1	1.9	2.89	D2	0.001	0.001	0.0	0.001
B3	7.3	5.3	2.6	0.97	D3	0.002	0.002	0.001	0.0
B4	1.1	5.0	1.1	1.59	D4	0.0	0.0	0.0	0.001
B5	5.3	4.1	1.65	1.0	D5	0.004	0.001	0.001	0.0
B6	6.0	6.2	0.98	0.99	D6	0.0	0.0	0.0	0.001

Grupo A: 27 días de tratamiento con ractopamina

Grupo B: 28 días de tratamiento con ractopamina

Grupo C: 1 día post tratamiento con ractopamina

Grupo D: 2 días post tratamiento con ractopamina

Validación del sistema

Una vez que se implementó el método analítico, se procedió a validarlo:

Linealidad

Se evaluó la relación lineal entre concentración y respuesta cromatográfica, dentro del intervalo (2.5- 100 ng/mL) de clorhidrato de ractopamina, se utilizó diluyente como medio de disolución. Para los tres gráficos de calibración, se obtuvo el coeficiente de correlación, la pendiente y la ordenada al origen.

Cuadro 5. Validación del sistema: Linealidad.

Ractopamina ng/mL	Área Bajo la Curva (ABC)				
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Promedio	C.V %
100	8967024	8817123	8611094	8798414	2.0
50	4402508	4593512	4351500	4449173	2.9
25	2264412	2354222	2192401	2270345	3.6
10	241310	222112	240310	234577	4.6
5	132056	141096	145022	139391	4.8
2.5	71991	72199	73991	72727	1.5
Intercepto	314535.7	261650.2	278903.3		
Pendiente	93332.54	92312.5	89806.4		
Coeficiente de correlación	99532	99212	99478		

Exactitud de la curva de linealidad

Para determinar la exactitud de la curva de calibración, se calculó la desviación estándar absoluta y el coeficiente de variación.

Cuadro 6. Validación del sistema: Exactitud de la curva de linealidad.

Ractopamina ng/mL	Área Bajo la Curva (ABC)					
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Promedio	C.V %	D.E
100	8967024	8817123	8611094	8798414	2.0	178701
50	4402508	4593512	4351500	4449173	2.9	127576
25	2264412	2354222	2192401	2270345	3.6	81073
10	241310	222112	240310	234577	4.6	10807
5	132056	141096	145022	139391	4.8	6649
2.5	71991	72199	73991	72727	1.5	1100

Validación del método analítico

Linealidad

Para realizar el estudio de linealidad del método, se basó en lo descrito en el inciso 5.1, con la diferencia de lo mencionado anteriormente, que la curva de calibración se preparó con la muestra de estudio, es decir, el órgano y el plasma.

Cuadro 7. Validación del método analítico: Linealidad.

Ractopamina ng/mL	Área Bajo la Curva (ABC)				
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Promedio	C.V %
100	7001691	7293141	6833691	7042841	3.3
50	3361510	3566012	3412280	3446601	3.1

25	1911212	1801718	1821453	1844794	3.2
10	188421	191433	205461	195105	4.7
5	104236	115113	111286	110212	5.0
2.5	53292	51571	56543	53802	4.7
Coefficiente de correlación	99826	99853	99632		

Exactitud de la curva de linealidad

Para determinar la exactitud de la curva de calibración, se calculó la desviación estándar absoluta y el coeficiente de variación.

Cuadro 8. Validación del método analítico: Exactitud de la curva de linealidad.

Ractopamina ng/mL	Área Bajo la Curva (ABC)					
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Promedio	C.V %	D.E
100	7001691	7293141	6833691	7042841	3.3	232473
50	3361510	3566012	3412280	3446601	3.1	106483
25	1911212	1801718	1821453	1844794	3.2	58360
10	188421	191433	205461	195105	4.7	9094
5	104236	115113	111286	110212	5.0	5518
2.5	53292	51571	56543	53802	4.7	2525

Precisión y Exactitud

Repetibilidad

Se analizó en un mismo día por quintuplicado, tres concentraciones conocidas (alta, media y baja) de Clorhidrato de Ractopamina. Los valores de las respuestas se interpolaron en una curva de calibración y se calculó la concentración

recuperada. Para cada nivel se determinó el promedio, la desviación estándar, la desviación estándar absoluta y el coeficiente de desviación.

Reproducibilidad entre días

Se efectuó por quintuplicado durante tres días concentraciones conocidas (alta, media y baja) del compuesto. De cada una de las determinaciones se calculó la concentración recuperada. Para cada nivel se determinó el promedio, la desviación estándar, la desviación absoluta y el coeficiente de variación.

Reproducibilidad entre analistas

Se realizó en un mismo día por quintuplicado, por dos analistas diferentes, tres concentraciones conocidas (alta, media y baja) de ractopamina. Los valores de las respuestas se interpolaron en una curva de calibración y se calculó la concentración recuperada. Para cada nivel se determinó el promedio, la desviación estándar, la desviación absoluta y el coeficiente de variación.

Exactitud

A partir de los datos de repetibilidad y reproducibilidad, se determinó la desviación estándar absoluta (DEA) de las determinaciones en cada nivel de concentración conocida (alta, media y baja), se empleó la siguiente relación matemática:

$$\%DEA = \frac{(Conc. Nominal) - (Conc. Obtenida)}{Conc. Nominal} \times 100$$

Cuadro 9. Repetibilidad y exactitud del método analítico.

Réplica	Concentración de ractopamina (ng/mL)		
	50	10	2.5
1	39	8.89	2.51
2	42.1	8.93	1.999
3	45	7.96	2.19
4	44.6	8.89	1.998
5	46.2	7.9	1.998
Promedio	43.38	8.51	2.139
D.E	2.5	0.47	0.19

C.V (%)	5.9	5.6	9.3
Exactitud DEA %	13.24	14.86	14.44

Cuadro 10. Reproducibilidad entre días y exactitud del método analítico

Día	Concentración de ractopamina (ng/mL)		
	50	10	2.5
1	41.9	8.5	1.998
	42.2	8.51	1.979
	46	8.59	2.298
	41.5	8.65	2.211
	41.6	8.4	2.21
2	43.9	8.89	2.3
	40.8	8.79	2.35
	42.4	8.7	2.1
	43.5	7.99	1.84
	43.6	8.82	2.15
3	48.3	9.8	2.4
	49.8	9.9	2.3
	40.9	8.5	1.98
	40.5	7.1	1.99
	42.1	7.7	2.1
Promedio	43.27	8.59	2.15
D.E	2.76	0.67	0.16
C.V (%)	6.37	7.84	7.46
Exactitud % DEA	13.47	14.11	14.2

Cuadro 11. Reproducibilidad entre analistas.

Réplica		Concentración de ractopamina (ng/mL)		
		50	10	2.5
ANALISTA 1	1	39	8.89	2.1
	2	42.1	8.93	1.98
	3	45	7.96	2
	4	44.6	8.89	1.98
	5	46.2	7.9	1.99
ANALISTA 2	6	40.1	8.9	1.99
	7	42.9	9.2	2.38
	8	44.2	7.8	2.29
	9	45.3	7.99	2.3
	10	45	8.8	2.48
Promedio		43.44	8.53	2.15
D.E		2.38	0.54	0.19
C.V (%)		5.47	6.33	9.02
Exactitud % DEA		13.12	14.74	14.04

Selectividad

Se midió para conocer la capacidad que tiene el método analítico para cuantificar exacta y específicamente un compuesto a analizar, libre de interferencias de otros compuestos que pudieran estar presentes en la muestra.

Cuadro 12. Selectividad del método analítico.

Analito	Tiempo de retención (minutos)
Ractopamina 20 ng/mL	7.983

Ractopamina 10 ng/mL	7.970
Ritodrine 20 ng/mL	6.693
Ritodrine 10 ng/mL	6.680

Recobro absoluto

Se realizó por quintuplicado tres concentraciones conocidas de ractopamina (alta, media y baja) y se compararon con soluciones de ractopamina en fase móvil a concentraciones equivalentes. Se calculó el promedio del porcentaje de recobro para cada nivel de concentración y para cada analista. El % de recobro absoluto se obtuvo mediante la siguiente relación matemática:

$$\% \text{ Recobro absoluto} = \frac{\text{Respuesta muestra}}{\text{Respuesta solución}} \times 100$$

Cuadro 13. Recobro absoluto.

Ractopamina (ng/mL)	Analista 1		Recobro	Analista 2		Recobro
	Áreas			Áreas		
	Sistema	Método		Sistema	Método	
50	46.1	39.6	85.90	47.3	37.2	78.65
	49.1	39.3	80.04	49.5	38.7	78.18
	48.92	45.9	93.83	46.12	41.9	90.85
	47.3	43.2	91.33	45.8	45.2	98.69
	40.92	41.6	101.66	41.12	40.3	98.01
Promedio	46.47	41.92	90.21	45.97	40.66	88.45
10	8.1	7.6	93.83	7.3	6.9	94.52
	9.1	8	87.91	8.5	7.99	94.00
	8.9	6.8	76.40	7.12	7	98.31
	7.2	7.2	100.00	8.8	8.3	94.32

	9.9	8.6	86.87	7.99	7.6	95.12
Promedio	9.62	8.70	90.44	7.94	7.56	95.21
2.5	2.1	1.99	94.76	2.29	1.91	83.41
	1.99	1.98	99.50	2.19	1.99	90.87
	2.35	2.33	99.15	2.34	2.1	89.74
	2.14	2.4	112.15	1.99	1.93	96.98
	2.4	2.39	99.58	1.98	1.76	88.89
Promedio	2.20	2.22	100.91	2.16	1.94	89.81
	Promedio parcial		95.38	Promedio parcial		91.33

Límite de detección y cuantificación

Para el límite de detección se calculó la concentración cuya respuesta es tres veces mayor a la respuesta promedio del blanco por triplicado. Por su parte el límite de cuantificación, se analizó por quintuplicado una concentración del fármaco.

Efecto de dilución

Se prepararon seis muestras de recuperación control alto y de control alto diluido. Posteriormente se obtuvieron los valores correspondientes a la D.E y %C.V

Cuadro 14. Límite de detección y cuantificación: Efecto de dilución.

Réplica	Concentración recuperada control alto (ng/mL)	Concentración recuperada control alto diluido (ng/mL)
1	46.9	44.9
2	48	45.3
3	49.5	44.9
4	48.6	47.1

5	46.9	45.1
6	47.8	46.6
Promedio	47.95	45.65
Desviación Estándar	1.01	0.95
%Coeficiente de variación	2.10	2.09
% Desviación Absoluta		8.70

Estabilidad de la muestra

Por medio de este análisis se pudo determinar las condiciones y tiempo bajo las cuales la ractopamina permaneció estable antes de ser procesada y cuantificada. En todos los casos se evaluó la respuesta por duplicado a tres concentraciones conocidas (alta, media y baja), se preparó cada día de análisis una curva de calibración y se interpoló en ella la respuesta obtenida de los puntos control. De igual modo se calculó el promedio de la desviación absoluta, el coeficiente de variación y la desviación estándar para cada nivel de concentración.

Estabilidad de la muestra en la mesa de trabajo

Esta prueba sirvió para conocer la estabilidad que presenta la muestra, mientras permanece en la mesa de trabajo a temperatura ambiente durante el proceso de análisis simultáneo de otras muestras. Para ello se prepararon por duplicado los puntos control de ractopamina, se realizaron dos series; una que es inyectada inmediatamente (t=0 horas) y la otra que se inyectó después de 5 horas (las muestras se mantuvo a temperatura ambiente sobre la mesa de trabajo).

Cuadro 15. Estabilidad de la muestra procesada y mantenida a temperatura ambiente

Muestra	Concentración de ractopamina (ng/mL)		
	50	10	2.5
1	50	10	2.5

2	46	9.58	2.36
Promedio	48.00	9.79	2.43
D.E	2.83	0.30	0.10
C.V (%)	5.89	3.03	4.07
% DEA	4.00	2.10	2.80

Estabilidad de la muestra sin reconstituir

Se prepararon dos series de los puntos control (alto, medio y bajo) por duplicado; una serie se procesó e inyectó inmediatamente (t=0 horas), la otra serie fue procesada, pero sin reconstituir, se mantuvo por 24 horas a 4°C y pasado este tiempo se reconstituyó en fase móvil para ser inyectada en el cromatógrafo.

Cuadro 16. Estabilidad de la muestra sin reconstituir: Concentración inicial de muestras de ractopamina.

Muestra	Concentración de ractopamina (ng/mL)		
	50	10	2.5
1	50	10	2.5
2	48.9	9.98	2.42
Promedio	49.45	9.99	2.46
D.E	0.78	0.01	0.06
C.V (%)	1.57	0.14	2.30
% DEA	1.10	0.10	1.60

Cuadro 17. Estabilidad de las muestras procesadas sin reconstituir.

Muestra	Concentración de ractopamina (ng/mL)		
	50	10	2.5
1	50	10	2.5

2	47.6	9.82	2.4
Promedio	48.80	9.91	2.45
D.E	1.70	0.13	0.07
C.V (%)	3.48	1.28	2.89
% DEA	2.40	0.90	2.00

Estabilidad de la muestra en ciclos de congelación-descongelación

Se prepararon los puntos control (alto, medio y bajo) por duplicado, en dos series, una serie se procesó e inyectó inmediatamente ($t=0$) al cromatógrafo y la otra serie que sirvió de prueba se sometió a 2 ciclos de congelación-descongelación, la temperatura de congelación fue de $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, pasado el último ciclo, la serie se procesó y se efectuó el análisis de la misma.

Cuadro 18. Estabilidad de la muestra en ciclos de congelación-descongelación Concentración inicial de muestras de ractopamina.

Muestra	Concentración de ractopamina (ng/mL)		
	50	10	2.5
1	50	10	2.5
2	49.6	9.87	2.37
Promedio	49.80	9.94	2.44
D.E	0.28	0.09	0.09
C.V (%)	0.57	0.93	3.78
% DEA	0.40	0.65	2.60

Cuadro 19. Estabilidad de las muestra en ciclos de congelación-descongelación.

Muestra	Concentración de ractopamina (ng/mL)		
	96	45	3.5
1	50	10	2.5

2	47.1	9.07	2.29
Promedio	48.55	9.54	2.40
D.E	2.05	0.66	0.15
C.V (%)	4.22	6.90	6.20
% DEA	2.90	4.65	4.20

Estabilidad de la muestra a largo plazo

Se prepararon por duplicado los puntos control de ractopamina, se realizaron tres series, una fue inyectada inmediatamente (t=0 horas), las otras dos se almacenaron a -20 °C por 15 y 30 días, transcurrido el tiempo, se procesaron e inyectaron al cromatógrafo.

Cuadro 20. Estabilidad de la muestra a largo plazo. Concentración inicial de muestras de ractopamina.

Muestra	Concentración de ractopamina (ng/mL)		
	50	10	2.5
1	50	10	2.5
2	49.6	9.87	2.37
Promedio	49.80	9.94	2.44
D.E	0.28	0.09	0.09
C.V (%)	0.57	0.93	3.78
% DEA	0.40	0.65	2.60

Cuadro 21. Estabilidad a largo plazo (t= 15días).

Muestra	Concentración de ractopamina (ng/mL)		
	50	10	2.5
1	50	10	2.5
2	45.1	8.7	2.3

Promedio	47.55	9.35	2.40
D.E	3.46	0.92	0.14
C.V (%)	7.29	9.83	5.89
% DEA	4.90	6.50	4.00

Intervalo

Se analizaron tres concentraciones (alta, media y baja) en las cuales se comprobó que el método fue preciso, exacto y lineal.

Cuadro 22. Criterios de aceptación para las distintas pruebas de validación de acuerdo a la NOM-177-SSA1- 1998.

Pruebas de validación	Criterio de aceptación
Linealidad del método	El coeficiente de correlación (r) debe ser mayor o igual 0.98.
Exactitud de la curva de linealidad	Para cada punto de la curva el %CV y %DEA deberán ser menores o igual al 15% excepto para el valor más bajo, que puede ser hasta del 20%
Repetibilidad	El coeficiente de variación no debe ser mayor del 15 %
Reproducibilidad	El coeficiente de variación no debe ser mayor del 15%
Exactitud	El valor promedio de las desviaciones absolutas de las determinaciones en cada nivel de concentraciones de los datos de repetibilidad y reproducibilidad deben estar dentro de $\pm 15\%$ del valor nominal de concentración

Selectividad	No deben existir interferencias en el tiempo de retención del compuesto a cuantificar
Límite de detección	La concentración obtenida, cumple con los criterios de precisión y exactitud. El %CV no debe ser mayor al 20%
Límite de cuantificación	El valor promedio de la concentración evaluada debe estar dentro del $\pm 20\%$ del valor nominal (exactitud) y no debe tener una variación mayor al 20%
Estabilidad de la muestra	Los resultados obtenidos para los puntos control deben de cumplir con los criterios de repetibilidad y exactitud
Recobro absoluto	El porcentaje de recobro no necesariamente es del 100%, pero debe ser reproducible en los diferentes niveles de concentración

DISCUSION

Habitualmente los LMR permitidos para un analito son establecidos por el *Codex Alimentarius* y dichos valores deben ser respetados tanto para la salvaguarda de la salud pública, como para facilitar la importación y exportación de carne, en este caso de cerdo. En este caso el LMR establecido para ractopamina es de 10, 40, 90 Y 10 µg/kg de tejido en musculo, hígado, riñón y grasa respectivamente. ⁽⁴⁾

En Mexico la literatura médica y posterior a una revisión en diferentes bases de datos (AGRIS, MICROMEDEX, SCIENCEDIRECT, ELSEVIER, ETC), no se encontraron datos de estudios hechos en México, a pesar de que existen al menos 4 preparados de ractopamina aprobados para su comercialización.*

Esto evidentemente impone una enorme carga de trabajo para el Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal (CENAPA) institución vinculada a la SAGARPA, único lugar donde se tiene establecida la técnica de HPLC con gases masas para la detección de ractopamina. la importancia y validación de la técnica en HPLC aquí descrita puede servir como elemento de ayuda tanto para la industria farmacéutica como para las autoridades correspondientes de la SAGARPA dado que es un fármaco muy vigilado (tanto por la opinión pública como por las autoridades en función) sobre los posibles contaminantes con clenbuterol ^(10,11)

Esta técnica fue desarrollada para hígado, riñón, musculo y grasa de cerdo, pero es factible suponer que puede implementarse para el alimento ya que este se incorpora a 6-10 ppm en la dieta y dichos valores pueden detectarse fácilmente ⁽¹²⁾

Vale la pena destacar que el costo aproximado de determinación cuantitativa de ractopamina mediante HPLC y gases masas puede fluctuar entre \$4,000.00 y \$10,000.00 por muestra, mientras que con el método desarrollado en este ensayo los costos se reducen a tan solo \$1,000.00.

Existen en el mercado otras técnicas para detectar ractopamina por el método de ELISA, pero estas pruebas arrojan resultados menores a los del HPLC, lo que

*PISA AGROPECUARIA, SMC NUTRITION, APLIGEN, LAPISA

indica que la Cromatografía Líquida de Alta Resolución es más confiable al momento de determinar las concentraciones de ractopamina en algún tejido animal. ^(11,13.14.15)

Como todas las técnicas analíticas esta es susceptible de mejorarse y otra tendencia lógica será la de incorporar en un mismo análisis la detección de zilpalterol, ractopamina y clenbuterol.

CONCLUSIONES

De acuerdo a *The European Food Safety Authority Journal* (2009)* el MRL para Ractopamina en músculo y grasa es de 10 µg/kg, de 40 µg/kg para hígado y de 90 µg/kg para riñón, y tiene un ADI de 0-1 µg/kg bw., con los resultados obtenidos de las muestras de tejidos de cerdo, se pudo comprobar que al día 1 postratamiento las concentraciones de ractopamina en hígado, riñón, músculo y grasa no sobrepasa el MRL establecido por la EMEA.

Por otro lado, se puede concluir que en el presente trabajo, se implementó y validó una técnica analítica, que podrá ser usado como una herramienta para garantizar la inocuidad de los productos de origen animal que hayan tenido una alimentación adicionada con ractopamina como promotor del crecimiento.

El método, de acuerdo al estudio de validación resultó ser preciso, exacto, lineal, repetible, reproducible, selectivo y el límite de detección y cuantificación fue adecuado con respecto a los MRL y de acuerdo a los criterios de aceptación establecidos, la estabilidad de las soluciones y las muestras cumplen con los criterios de repetibilidad y exactitud, de acuerdo a la NOM-177-SSA1- 1998**.

**The EFSA Journal* (2009) 1041, 6-52 <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/1041.pdf>

**NOM-177-SSA1- 1998. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/177ssa18.html>

REFERENCIAS

1. Panorama agroalimentario, Carne de cerdo 2012. Dirección General Adjunta de Inteligencia Sectorial, Dirección de Investigación Económica y Sectorial, Subdirección de Investigación Económica
2. Paramio T. *et al* “Breve manual de aproximación a la empresa porcina para estudiantes de veterinaria”. Departament de Ciència Animal i dels Aliments Unitat de Ciència Animal Facultat de Veterinària. UAB.
3. Cepero R. “Retirada de los antibióticos promotores de crecimiento en la Unión Europea: causas y consecuencias”. Depto. de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza.
4. “PROGRAMA CONJUNTO FAO/OMS SOBRE NORMAS ALIMENTARIAS, COMITÉ DEL CODEX SOBRE RESIDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINARIOS EN LOS ALIMENTOS”. Vigésimo primer periodo de sesiones, *Minneapolis, Minnesota, Estados Unidos de América, del 26 al 30 de agosto de 2013*.
5. Williams N, Cline T, Schinckel A and Jones D. The impact of ractopamine, energy intake, and dietary fat on finisher pig growth performance and carcass merit. *Journal of Animal Science* 1994, 72:3152-3162
6. Sumano y Ocampo. “Farmacología Veterinaria”. 3^{ra} edición, MacGraw-Hill Interamericana 2006.
7. “NOM-064-ZOO-2000” NORMA Oficial Mexicana NOM-064-ZOO-2000, Lineamientos para la clasificación y prescripción de productos farmacéuticos veterinarios por el nivel de riesgo de sus ingredientes activos.

http://198.61.233.93:8080/web/a_paginas/a_pdf/064_zoo.pdf

8. “Acuerdo por el que se modifica el diverso por el que se establece la clasificación y prescripción de los productos farmacéuticos veterinarios por el nivel de riesgo de sus ingredientes activos”. DOF: 05/03/2012
http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5236380&fecha=05/03/2012

9. De Brabander H, *et al.* “Residue analysis: Future trends from a historical perspective”. Journal of Chromatography_A, 1216 (2009) 7964–7976

10. SUMANO H, OCAMPO L, and GUTIÉRREZ L., 2002. “Clenbuterol y otros b-agonistas, ¿una opción para la producción pecuaria o un riesgo para la salud pública?” Veterinaria México, 2002. 137-159

11. Gratacós M. “Desarrollo de métodos rápidos para el análisis de residuos en producción animal” Universitat de Girona, Departament de Química. Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries, Jluio 2007.

12. Main R, *et al* “Effects of ractopamine HCl dose and treatment period on pig performance in a commercial finishing facility”. Journal of Swine Health and Production, Vol 17, No. 3, June 2009. 134-139

13. Furusawa N. “Simplified and Small-Scale Technique For Quantifying Ractopamine in Beef under Organic Solvent-Free Conditions”. Open Journal of Analytical Chemistry Research. OJACR 2013, 1(3):46-51

14. Zhang Y, *et al* “Rapid Determination of Ractopamine Residues in Edible Animal Products by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: Development and Investigation of Matrix Effects”. Journal of Biomedicine and Biotechnology Volume 2009, Article ID 579175, 9 pages
doi:10.1155/2009/579175

15. Pleadin J, Vulić A, Perši N, Radeck W. “Determination of Ractopamine Residues in Pigs by Ultra Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry”. Croatian Veterinary Institute, Federal Office of Consumer Protection and Food Safety, Croatia Germany.

INDICE DE CUADROS**PAGINA**

1. Ingesta Diaria Aceptable (ADI) y Límite Máximo de Residuos (LMR) para ractopamina en tejidos de cerdo y ganado vacuno.	9
2. Concentraciones de la curva patrón del estándar de clorhidrato de Ractopamina en fase móvil.	17
3. Condiciones cromatográficas para el análisis de las muestras de cerdo tratado con ractopamina.	21
4. Concentración de ractopamina en las muestras de cerdo tratadas con ractopamina.	25
5. Validación del sistema: Linealidad.	26
6. Validación del sistema: Exactitud de la curva de linealidad.	27
7. Validación del método analítico: Linealidad.	27
8. Validación del método analítico: Exactitud de la curva de linealidad.....	28
9. Repetibilidad y exactitud del método analítico cuadro.	29
10. Reproducibilidad entre días y exactitud del método analítico.	30
11. Reproducibilidad entre analistas.	31
12. Selectividad del método analítico.	31

13. Recobro absoluto.	32
14. Límite de detección y cuantificación: Efecto de dilución.	33
15. Estabilidad de la muestra procesada y mantenida a temperatura ambiente.	34
16. Estabilidad de la muestra sin reconstituir: Concentración inicial de muestras de ractopamina.	35
17. Estabilidad de las muestras procesadas sin reconstituir.	35
18. Estabilidad de la muestra en ciclos de congelación-descongelación Concentración inicial de muestras de ractopamina.	36
19. Estabilidad de las muestra en ciclos de congelación-descongelación.	36
20. Estabilidad de la muestra a largo plazo: Concentración inicial de muestras de ractopamina.....	37
21. Estabilidad a largo plazo (t= 15días).	37
22. Criterios de aceptación para las distintas pruebas de validación de acuerdo a la NOM-177-SSA1- 1998.	38

INDICE DE FIGURAS

	PAGINA
1. Producción mundial de carne de cerdo periodo 2000-2012.....	2
2. Consumo per cápita de carne de cerdo en algunos países durante el año 2012.	3
3. Consumo mundial de carnes durante el periodo 2005-2012.....	4
4. Producción nacional de carne de cerdo 2000-2012.	5
5. Principales estados productores de carne de cerdo en México, 2010-2012.	6
6. Formula estructural de ractopamina.	9
7. Cromatograma típico para ractopamina.	21
8. Ejemplos de cromatogramas de la curva estándar de ractopamina.	22
9. Selectividad del método analítico. Cromatograma de ractopamina y ritodrine en una concentración de 10 ng/ml (a) y de 20 ng/ml (b).	23
10. Ejemplo de cromatograma de Ractopamina obtenido de la muestra adicionada (b), su comparación con el estándar (a) y el tejido blanco sin fortificar (c).	24