



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

UN NUEVO METODO POR CROMATOGRAFIA DE GASES PARA
LA DETERMINACION DE 7-ALFA-ZEARALANOL Y BREVE
REVISION SOBRE ALGUNOS COMPUESTOS DE ACCION SIMILAR

T E S I S

Que para obtener el Título de

Q U I M I C O

presenta

OSCAR ABRAHAM ABAROA LECHUGA

México, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1991



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 está 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.

I N D I C E

		<u>Pag.</u>
1.	INTRODUCCION	1
2.	GENERALIDADES	3
3.	AGENTES ANABOLICOS	9
3.1	Definición	10
3.2	Clasificación	10
3.3	Estructuras y Características Químicas:	11
	-Zeranol	
	-Dietilestilbestrol	
	-Trenbolona	
4.	EFFECTOS MUTAGENICOS Y CANCERIGENOS	20
4.1	Acción primaria genotóxica o cancerígena	21
4.2	Acción secundaria no genotóxica	22
5.	PRUEBAS DE EVALUACION	24
5.1	Ames	25
5.2	Mutación de células de linfoma de ratón	25
5.3	Citogenética en médula ósea de ratón	26
5.4	Cultivos primarios de hepatocitos de rata	27
5.5	Mutación del Bacteriófago T7	27
5.6	Combinación covalente con el DNA	28
6.	NORMAS DE SEGURIDAD	32
7.	METODOS DE ANALISIS PARA AGENTES ANABOLICOS	34
7.1	Cromatografía en capa fina (TLC)	35
7.2	Espectroscopía de ultravioleta/visible	36
7.3	Cromatografía líquida de alta presión	37
7.4	Radio-inmuno-análisis	39
7.5	Unión enzimática inmunoabsorbente	41
7.6	Cromatografía de gases	42
	-Generalidades	
	-Detectores	
	-Formación de Derivados	
8.	DESARROLLO DEL TRABAJO EXPERIMENTAL	55
8.1	Introducción	56
8.2	Extracción y Purificación	57
8.3	Detección por Cromatografía de Gases	58
8.4	Preparación del Estándar	60
8.5	Procedimiento general	61
8.6	Cromatogramas	64
8.7	Cálculos y Resultados	90
9.	CONCLUSIONES	93
10.	APENDICE A.- GLOSARIO	96
	BIBLIOGRAFIA	101

I N T R O D U C C I O N

Algunos compuestos químicos, llamados "agentes anabólicos" ayudan a la formación de músculo en el organismo y es, en el área de la medicina humana donde su uso es restringido debido al factor de alto riesgo que presentan.

No es así en la producción animal, donde el uso de éstos agentes anabólicos es común ya que aquí representan un beneficio económico muy importante.

Sin embargo, el empleo de estos agentes anabólicos, aún aplicados en animales se ha cuestionado mucho debido a posibles residuos en la carne animal para consumo humano.

El desarrollo de nuevos agentes anabólicos con beneficio a la humanidad y sus riesgos tóxicos, hace que surja la necesidad de que exista la permanente revisión del efecto de éstos. El adecuado conocimiento de su aplicación y su evaluación, serán factores determinantes en la investigación que se realice.

Para ello es necesario que las tecnologías analíticas se encuentren a la vanguardia mejorando los tiempos de análisis, sensibilidad, exactitud y confiabilidad, logrando con ello que sean el apoyo para evitar posibles errores de los consumidores y productores en cuanto a la utilización de compuestos para uso humano y también que se detecte con eficiencia y seguridad si se ha abusado de ellos.

GENERALIDADES

Se sabe que ciertos compuestos hormonales actúan como eficientes agentes anabólicos, estimulando glándulas específicas de secreción interna. Todo este mecanismo manipula los procesos metabólicos del ganado productor de carne (rumiantes), con el fin de incrementar la eficiencia alimenticia y consecuentemente su peso. Los agentes anabólicos activan la disposición de proteína en el músculo debido a un incremento en la circulación sanguínea periférica, en los niveles crecientes de hormonas de crecimiento, insulina y hormona tiroidea.

Para potencializar la acción de tales agentes anabólicos se suman a ello factores ambientales, alimenticios y fisiológicos. En un principio, hacia las décadas de los años 50-60's los agentes anabólicos se empezaron a suministrar en forma oral aunque para la década de -- los años 70's se popularizó el uso de éstos en forma de implantes constituidos basicamente por un vehículo comprimido a base de algún agente compactante (bentonita, silicón, etc.), pigmentante y el agente anabólico que con ayuda del dispositivo implantador, se coloca subcutáneamente detrás de la oreja del animal.

Probablemente el más conocido de estos agentes anabólicos sea el DIETILESTILBESTROL (DES), un estrógeno sintético que fué retirado del mercado a partir de los años 70's por comprobarse su potente carcinogenicidad. Hoy en día, se siguen presentando numerosas pruebas experimentales en las cuales el DES causa lesiones en el cuerpo celular, mutagenicidad y enlaces irreversibles con el DNA y las proteínas.¹

Sin embargo, existe un gran número de agentes anabólicos que han surgido posteriormente al DES, tal es el caso de RALGRO (Resorcilio Acido Lactónico Grows) nombre comercial con el que se conoce al Zeranol. Según sus fabricantes, International Minerals and Chemical Corporation, el producto debe implantarse aproximadamente cada 90 días al animal en dosis de 36 mg cada vez, con lo cual el animal recibe de 144 a 180 mg de Zeranol durante todo el período de engorda.

De esta manera al utilizarse la carne de bovino para alimentación humana, proveniente de animales tratados con este compuesto, existe la posibilidad de encontrar excedentes del agente anabólico que provoquen efectos nocivos en el ser humano como el caso de Telarque, enfermedad caracterizada por el desarrollo prematuro de los órganos sexuales en niños, reportado en Puerto Rico en 1986.²

Debido a lo anterior el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América realizó un intenso programa especial con duración de 9 meses durante los cuales se analizaron 693 muestras de carne roja destinada a alimentación humana, para detectar la presencia de trazas de Zeranol y de Dietilstilbestrol, resultando negativa la presencia de estos dos compuestos.

Otro de los agentes anabólicos conocidos es SINOVEX, el cual es el producto de la combinación de dos hormonas y que comercialmente tiene dos presentaciones: SINOVEX M que contiene 20 mg de benzoato de estradiol y 200 mg de progesterona sugerida para utilizarse en bovinos machos y SINOVEX H que contiene 20 mg de benzoato de estradiol y 200 mg de testosterona sugerida para utilizarse en bovi

nos hembras. Ambas presentaciones deben ser administradas antes de los 60 días previos al sacrificio de acuerdo a la Food and Drug Administration (FDA). Al igual -- que otros compuestos empleados como estimulantes del -- crecimiento, existe la preocupación de los posibles e--fectos secundarios causados por el empleo de este pro--ducto.

Lesmeister y Elling³ estudiaron los efectos anatómicos y reproductivos en hembras Holstein a las que les habían administrado estrógenos y progesterona, encontrando que el área pélvica en cm² fué mayor en las hembras que recibieron SYNOVEX H a los 15 meses de edad y 28 días antes del parto. Las medidas transversal, vertical y altura de la pelvis fué mayor en animales implantados comparativamente a los controles (animales sin implante).

Otro producto empleado como estimulante de crecimiento es REVALOR, nombre comercial registrado por el Grupo Roussel, el cuál asegura una ganancia total por animal de 136 kg. Este producto contiene 20 mg de estradiol y 140 mg de acetato de trenbolona.

COMPUDOSE es el nombre comercial del 17B-estradiol - el cual reporta una ganancia total por animal de 126.5 Kg en una sola dosis ó implante. Es además, el que presenta mayor similitud endógena con el organismo, de los compuestos aquí mencionados.

La alimentación moderna de ganado productor de carne va desarrollándose paralelamente con la industria actual. En nuestros días es común que en la producción de carne se utilicen de manera rutinaria un gran número de compuestos químicos, que aunque no son nutrimentos, for-

man parte de las raciones proporcionadas al ganado. De ahí que los resultados de los estudios realizados de diversas partes del mundo sobre una posible actividad de tipo cancerígeno en el ser humano que se ha alimentado con carne de animales implantados haya provocado que la Comunidad Económica Europea (CEE) decidiera a partir de enero de 1989 restringir la importación de carne tratada con agentes anabólicos proveniente de los Estados -- Unidos de América. Por lo que respecta a Latinoamérica, los países de mayor producción ganadera, tales como, - Argentina, Uruguay y Brasil, desde hace menos de cinco años exportan a Europa carne proveniente de animales no implantados.

Por lo anteriormente expuesto, se observa que es - necesario un gran avance tecnológico que sólo logran -- los países altamente desarrollados, los cuales llevan a cabo técnicas analíticas para la detección oportuna y - veraz de residuos anabólicos, tales como la del Radio-inmuno-análisis, que requiere del uso de radioisótopos y permisos para su manejo, técnicas como la de Unión Enzimática Inmuoadsorbente (ELISA), o bien, del uso de -- equipos acoplados que además de ser costosos emplean técnicas laboriosas. Qué será entonces de aquellos países donde la posibilidad de contar con equipos y técnicas -- analíticas como las ya citadas se dificulta grandemente?

Como consecuencia, en el presente trabajo se propone un método de análisis por Cromatografía de Gases para la determinación de un agente anabólico denominado comercialmente ZERANOL con un límite de detección de 1 ppb. El método aquí desarrollado resulta accesible a un laboratorio común de investigación que cuente con equipo de uso rutinario. Asimismo, se presenta una breve revisión de los agentes anabólicos de uso más frecuente en este - campo.

Finalmente, se tratará de definir el posible aspecto toxicológico de estos agentes anabólicos, realizando una revisión de la farmacología que circunda su funcionamiento y la relación tan importante que tienen en la cadena alimenticia, además de comentar los avances analíticos presentando los métodos modernos que se emplean para su cuantificación.

AGENTES ANABOLICOS

3.1 Definición

En la literatura no se encontró una definición específica para este tipo de compuestos, sin embargo, los estudios realizados a la fecha inducen a expresar la siguiente definición: Los AGENTES ANABOLICOS que sean considerados como tales, serán compuestos que por sus funciones metabólicas favorezcan la velocidad del crecimiento celular, activando centros reguladores endocrinos en la fase del anabolismo.⁴

3.2 Clasificación

Al realizar la búsqueda bibliográfica de una clasificación de los agentes anabólicos, no se encontró información alguna en la literatura que fué solicitada a los Bancos de información de referencia⁵, sin embargo se mencionará la división que utiliza Ingerowski⁶, colocando a los agentes anabólicos de la siguiente manera:

ENDOGENOS	-Estradiol -Progesterona -Testosterona
	-Estrógenos sintéticos:hexestrol,dietilestilbestrol,I-propionato,dinetrol.
EXOGENOS	-Andrógenos sintéticos:trenbolona -Micoestrógenos:zearanol,zearalenona,zearalanona,talarenol,zenona,zanona.
OTROS NO CLASIFICADOS*	Metandienona,metilandrostenediol,metil testosterona,mandrolona,normetandrolo-na,oximetazona.

*Proc.Workshof(1981) 45-56 (Eng). Anabol.Ag.beef Veal prod.

3.3 Estructuras y Características Químicas

ZERANOL

(LACTONAS DEL ACIDO RESORCILICO)

El Zeranol es un agente anabólico natural, no esteroide, semisintético, cuya composición química corresponde a -- una lactona del ácido resorcílico que se encuentra en el ambiente como un Phyto-estrógeno natural. Según el Index Merck se tienen las siguientes acepciones para este compuesto: Zeranol; 3,4,5,6,7,8,9,10,11,12-Decahidro-7,14,16 trihidroxi-3-metil-1H-2-benzoxaciclotetradecin-1-ona; -- ácido-6-(6,10-dihidroxiundecil)-B-resorcílico de *M*-lactona; Zearalanol; P-1496; Ralgro; Zerano. (fig.1)

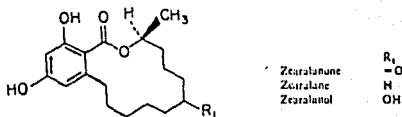


FIGURA 1

El Zeranol se prepara industrialmente a partir de la zearalenona que es a su vez producida en forma natural en cultivos sumergidos en medio glucosado, por un hongo propio del maíz, *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*, *Fusarium roseum*) según Hidy (1977).⁷ La zearalenona es modificada en un proceso químico por reducción de la función 7-cetona a una mezcla de alfa y beta hidroxilos, y por hidrogenación de la función olefina en el C₁₁ y C₁₂ se logra obtener una mezcla de Zeranol y Taleranol. De -

esta manera, el 7-alfa diasterómero, el zeranól, se separa por recristalización con el 98% de pureza para constituir el producto de uso comercial.

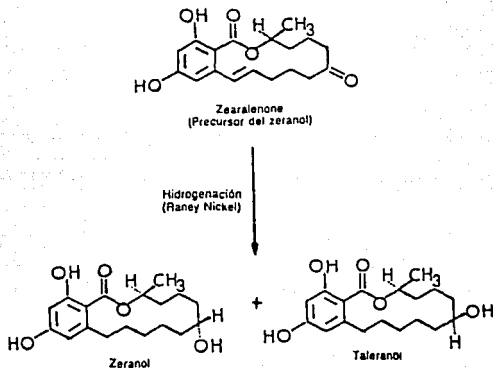


FIGURA 2

Los estudios de las propiedades anabólicas de los derivados de la zearalenona, se realizaron por la necesidad de reemplazar al DES como promotor de crecimiento. Consecuentemente fué obtenido el producto comercial Zeranól (s-zearalanól) el cuál como ya se ha mencionado es un derivado semi-sintético de la zearalenona que tiene la configuración s en la posición 10'.⁸

Existen más de 100 derivados de la zearalenona que pueden ser sintetizados y clasificados de acuerdo a varios

efectos farmacológicos.^{9,10} Muchos de estos compuestos análogos se han probado en ratas y ratones con ensayos uterotrópicos y se ha expresado su actividad relativa a la zearalenona y el DES (tabla 1).^{9,11}

De estos estudios pueden emerger dos facetas: la primera es que la actividad estrogénica de la zearalenona se puede incrementar considerablemente por alteraciones de su estructura y la segunda, es que la configuración isomérica de la zearalenona y sus derivados juega un papel muy importante ya que esto determina la actividad uterotrópica de la molécula.

Compuesto	Actividad Anti-implantación relativa a DES	Actividad Uterotrópica en ratas relativa a	
		DES	Zearalenone
DES (standard)	1	1	1000
Zearalenone (S)		0.0005	1
R-Zearalenone		0.0003	0.63
S-Zearalenone		0.0004 — 0.0010	2
Zearalanol (Ralgro)		0.0024 — 0.0032	4.8
Zearalanol		0.0013	2.7
Zearalane	0.0011	0.00016 — 0.0005	0.22 — 1.0
7'-formylzearalane	0.003	0.025	50
Isomer A	0.0015	0.009	18
Isomer B	0.006	0.047	94
7'-Carboxyzearalane	0.030	0.050	100
Isomer C	0.150	0.096	192
Isomer D	0.0375	0.009	18
2,4-Dideoxyzearalanone		<0.0001	<0.2
2-Deoxyzearalanone		0.00063	1.26
4-Deoxyzearalanone		<0.0001	<0.2
5-Hydroxyzearalanone		<0.0003	<0.6
5-Nitrozearalanone		0.0007	1.4
2,4-Diacetoxyzearalanol		0.0019	3.8
6'-Acetylzearalane		0.0010	2
2,4-Dimethoxyzearalanone		<0.0001	<0.2
4-Methoxyzearalanone		<0.0001	<0.2

TABLA 1

DIETILESTILBESTROL
(ESTILBENOS)

En la década de los años 40's se iniciaron una serie de estudios tendientes a obtener productos que sustituyeran a los estrógenos de origen natural. Se obtuvieron una gran cantidad de compuestos, encontrándose que los estilbenos sustituidos presentaban efecto estrogénico.¹² Más tarde en los años 50's se empezaron a realizar las primeras investigaciones sobre la actividad estrogénica de los derivados del estilbeno. Sin embargo, la utilidad práctica de éstos es muy limitada ya que presentan efectos secundarios serios tales como efectos feminizantes, ginecomastia, impotencia, etc.¹³

Esta serie de resultados motivó que se efectuara una investigación sistemática que permitiera preparar nuevos estilbenos, obtenidos a partir de la condensación de un aldehído con fenil acetoniitrilo, en donde ambos pueden estar sustituidos, entre ellos los alfa-ciano-estilbenos asimétricos. Pruebas farmacológicas preliminares demostraron que estos compuestos exhiben actividad estrogénica.¹⁴

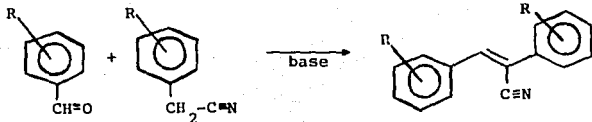


FIGURA 3

En la década de los años 70's se estudiaron compuestos del tipo de los estilbenos de tal forma que se sustituyó el nitrilo por el grupo nitro, encontrándose que estos compuestos también presentaban actividad estrogénica. Los alfa-nitro-estilbenos se prepararon por con-

densación de un aldehído aromático con un nitro-bencilo, pero al mismo tiempo se encontró que la molécula que contiene el agrupamiento nitro-vinilo presentaba actividad citotóxica.¹⁵

Doré estudió este tipo de moléculas, encontrando que los alfa-nitro-estilbenos y los beta-nitro-estilbenos presentan mayor actividad estrogénica si se encuentran sustituidos por grupos desactivantes, tanto en la doble ligadura como en los grupos arilo.¹⁶

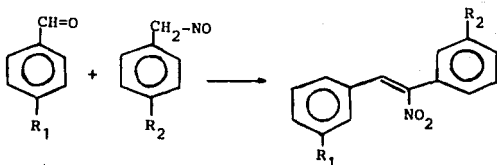


FIGURA 4

De este tipo de compuestos, el más importante es el Dietilestilbestrol (DES) que según el Index Merck tiene las siguientes acepciones: Dietilestilbestrol; 4,4'-(1,2-etenedinitil)-bisfenol; -Dietilestilbenediol; Stilbestrol; -Stilboestrol; 3,4-bis(p-hidroxifenil)-3-hexano; 4,4'-dihidroxi-, -dietiestilbeno; Domestrol; Estrobeno; Estrocyn; Fonatol; Hi-bestrol.

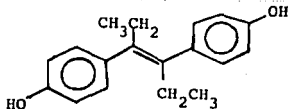


FIGURA 5

Dietilestilbestrol (DES)*

*Registro CAS (56-53-1)

El metabolismo oxidativo del dietilestilbestrol se ha estudiado en vivo en muchas especies y también en el hombre.

Un resumen de la ruta metabólica es descrito en la siguiente figura, donde sólo los isómeros trans son mostrados y los compuestos en corchetes denotan los intermediarios reactivos.

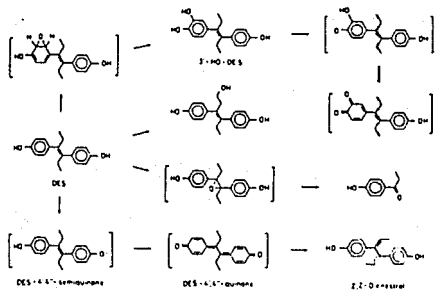


FIGURA 6
RUTA METABOLICA DEL DES

Se han sintetizado muchos derivados del Dietilestilbestrol, algunos de los cuales se mencionan a continuación (tabla 2). Sin embargo, en este trabajo sólo se hará referencia al DES.

PALMITATO
DIFOSFATO
DIPROPIONATO
DIMETIL ETER
DISULFATO
MONOBENZIL ETER
MONOMETIL ETER

TABLA 2

TRENBOLONA
(ESTEROIDE SINTETICO)

Esta es una hormona sexual esteroidal sintética con el esqueleto común del ciclopentanoperhidrofenantreno como estructura base que fué preparado por Velluz.¹⁷

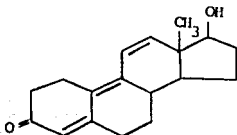


FIGURA 7

Trenbolona: 17 β -hidroxiestra-4,9,11-trien-3-ona*

*Registro CAS (10161-338)

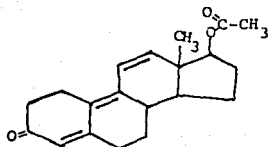


FIGURA 8

ACETATO: 17 -acetoxi-3-oxoestra-4,9,11-trien-3-ona

El empleo del acetato de trenbolona como promotor de --
 crecimiento en ganado de engorda en Estados Unidos de -

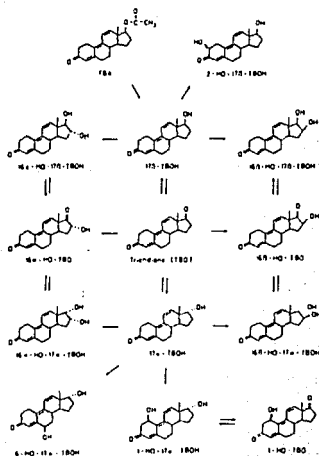


FIGURA 9

América y en algunos países de Europa es permitido. El estudio de la biotransformación de este compuesto - se muestra en la figura 9, en donde como se puede observar cerca del 80% del acetato de trenbolona se identifica como metabolito secundario en la ruta oxidativa.

EFFECTOS MUTAGENICOS Y CANCERIGENOS

En atención a que los agentes anabólicos han aparecido como factores de riesgo causantes de cáncer, se tratará este aspecto en esta sección con especial detalle, así como la clasificación en la presentación del zeranol y compuestos de acción similar, mostrando y analizando los datos, provenientes de múltiples pruebas realizadas por diversas fuentes mediante estudios experimentales.

Resulta pues conveniente, analizar en términos generales, cuáles son los aspectos que vinculan a la estimulación tumorigénica dentro de los mecanismos de acción de las drogas en el organismo. En este sentido se deben distinguir los conceptos de 'actividad genotóxica primaria ó cancerígena' y la 'actividad secundaria ó no genotóxica'.

4.1 Acción primaria genotóxica o cancerígena

Son genotóxicos los compuestos que reaccionan directamente con el DNA del núcleo celular, produciendo cambios en el genoma de los que derivan cambios ó mutaciones celulares, que originan progresivamente el proceso cancerígeno. En este sentido, los compuestos químicos de este tipo representan un grave riesgo, pues teóricamente una sola molécula de un compuesto genotóxico, podría reaccionar con una célula y desencadenar el proceso de cambio histológico, sin la existencia del más mínimo umbral toxicológico. Productos químicos de este tipo son algunos hidrocarburos antracénicos, algunos pesticidas organoclorados, el humo tabacal, etc.

4.2 Acción secundaria no genotóxica

Por el contrario, existen numerosas cantidades de moléculas como los anabólicos y las hormonas, que actúan sobre el DNA celular y que ejercen acción de crecimiento por fijación a los receptores hormonales de las células vinculándose principalmente con el metabolismo protéico.

Estas acciones llamadas epigénicas, favorecen la multiplicación celular y pueden estar dentro de los umbrales de dosificación que llegan a considerarse toxicológicos, constituyéndose en promotores co-cancerígenos por vía del incremento de crecimiento celular. Esto significa que al aumentar la velocidad de crecimiento del número de células, también se incrementa la vulnerabilidad a otros factores verdaderamente genotóxicos que se encuentran en el organismo y desencadenan el proceso tumoral.

Tal es el caso de los virus de acción tumorigénica, de elementos inmunodepresivos que frenan las defensas naturales contra las células anormales o de las sustancias tóxicas que específicamente tienen la propiedad de desarrollar las patologías celulares cancerígenas en el organismo.

De esta manera, el compuesto no genotóxico, puede actuar asociado y también como factor predisponente de grado de mayor o menor actividad promotora. Diversas hormonas y compuestos anabólicos a determinadas dosis, pueden cumplir esta función, entre los que se encuentran los estradiolos que actúan normalmente dentro de los mecanismos físico-endócrinos de los animales y el hombre.

Algunos agentes anabólicos por sí mismos, no tienen propiedades genotóxicas ni tampoco como promotores secundarios de crecimiento celular. Sin embargo, para este último caso, deben considerarse muy detalladamente las vinculaciones con las funciones estrógeno-similares, ya que estos efectos dependen de altas dosis y regularmente no aparecen dentro de los niveles usuales de la aplicación del producto.

Para evaluar la posible actividad mutagénica y cancerígena en la esfera de los agentes anabólicos, resulta de fundamental importancia determinar el umbral celulo-tóxico y la dosificación de dichos compuestos para medir la real trascendencia del posible efecto protumoral.

En la farmacología, tales evaluaciones se definen mediante una serie de técnicas que determinan cualitativa y cuantitativamente las posibilidades que tiene un compuesto para producir efectos mutagénicos y cancerígenos.

PRUEBAS DE EVALUACION

Las diversas pruebas de evaluación que se reportan en la literatura sobre las posibles mutaciones, reconocidas por los centros de control e investigación farmacológicas más importantes se describen aquí brevemente. Se resumirá el fundamento de las mismas para dar a continuación los datos que se han informado de algunos -- agentes anabólicos.

5.1 Prueba de Ames

Es una técnica desarrollada por B.N.Ames¹⁸ que se basa en la medición de la actividad generada por un compuesto químico para producir mutaciones de gérmenes especialmente del género Salmonella.

Utilizando este método para el taleranol, zearaleno y zeranol se demostró que los valores obtenidos para éstos frente a los controles, resultaron negativos indicando la inducción de la mutagenicidad tanto en las -- pruebas activadas como sin activar, en donde la dosis de los compuestos usados fué en general de 1 a 10,000 g - por placa usando las cepas de S.typhimurium TA 98 - TA 100 - TA 1535 - TA 1537 y TA 1538.^{19,20,21,22}

5.2 Prueba de Mutación de células de linfoma de ratón

El test de las células de linfoma de ratón está basado en demostrar la inducción por compuestos químicos a la formación de mutaciones detectables por la actividad de la enzima tiamida quinasa TK (Thyamide Kinasa) en las células L5178 y en las de linfoma de ratón.

La TK es la enzima celular que le permite a las células utilizar tiamida del medio de cultivo en donde -- participa por medio de una síntesis del DNA.

De los resultados obtenidos en este análisis detallado se comprobó siempre la actividad mutagénica negativa de los compuestos de la familia de las lactonas -- del ácido resorcílico. Sin embargo, en el trabajo de -- Cifone²³ aparece el taleranol con características de inducir la mutagenicidad cerca del punto crítico. Shelby y Stasiewicz²⁴ en 1984 reportaron que con esta prueba -- se obtuvieron resultados ambiguos en compuestos no cancerígenos lo que hace dudar sobre la efectividad de la misma.

5.3 Prueba citogenética en células de médula ósea de -- ratón

Esta prueba se basa en la evaluación de distorsiones cromosomales en células de médula ósea de ratón inducidas por dosis de los compuestos químicos que se van a investigar.

Cimino y Wett²⁵ aplicaron esta prueba para estudiar la inducción mutagénica derivada de la acción del zearanol, zearalenona y taleranol en ratones que fueron expuestos a una dosis diaria, durante 5 días, de hasta 5 miligramos por kilogramo de peso de ratón.

Las tomas de muestra de células de médula ósea se realizaron a diferentes tiempos entre 6 y 48 horas, comparándose las alteraciones cromosomales con base en los tejidos que se inocularon con trietilamina (TEM) como -- un inductor positivo por vía intraperitoneal; los testi

gos negativos se inocularon con carboximetilcelulosa -- (CMC). En ninguno de los casos de esta prueba se presentaron resultados positivos de inducción mutagénica -- con los compuestos antes mencionados.

5.4 Prueba de Cultivos primarios de hepatocitos de rata

El método consiste en determinar granulaciones nucleares producidas en cultivos primarios de células de hígado de rata inducidas por los compuestos a estudiar y medidas por técnicas autoradiográficas. El control del estudio se realizó observando las modificaciones en el DNA celular.

Para el zeranól y sus metabolitos, se utilizaron -- concentraciones entre 1.3×10^{-2} a 1.3×10^{-5} mg/ml. Con base en los controles negativos y los testigos positivos tratados con amino-fluoreno, se considerarían positivos los casos con granulaciones excedentes a 5 en cualquier concentración. En este estudio no se encontraron en ninguno de los casos, granulaciones superiores a 5 que permitiesen sospechar sobre posibles propiedades mutagénicas según Williams, G.²⁶

5.5 Prueba de Mutación del Bacteriófago T7

Estos estudios se basan en la cinética de la inhibición de la réplica del bacteriófago T7 de Escherichia coli B., tal inhibición refleja la actividad mutagénica de sustancias agregadas a cultivos. Se establece un orden de magnitud basado en una medida preestablecida -- llamada "dimedosis equivalente" (DED).

Según estudios realizados por Ronto²⁷ para el caso

del zearalenona, taleranol y zeranol, el valor DED estuvo siempre fuera de los niveles de magnitud mutagénica. En cambio, el 17 β -estradiol sólo en altas concentraciones llegó a dar valores DED en el rango asociado con la actividad positiva mutagénica.

5.6 Prueba de combinación covalente con el DNA

Según esta prueba el sistema de control de uniones covalentes de un producto que se logra enlazar al DNA es detectado por medio de un contador de centelleo atómico. De esta manera, se mide la diferencia entre el total de un producto suministrado y el combinado con el DNA de las células hepáticas de ratas que horas antes fueron inoculadas intraperitonealmente, con los productos a investigar.

El DNA hepatocelular se extrae de las células y se desproteiniza, luego se purifica por centrifugación, repitiendo estas dos operaciones varias veces. A continuación se le dan tratamientos con RNAasa, se separan por cromatografía en columna y ultracentrifugación para finalmente calcular el Índice de Unión Covalente (IUC), - lo cuál se realiza midiendo la radioactividad original del agente anabólico marcado e inoculado y la radioactividad resultante después de su unión al DNA del hígado.

Como sistema comparativo de control se establece - la relación con un agente cancerígeno de reconocido poder, como el N-hidroxiacetilaminofluoreno, cuyo índice de unión covalente es de 252.

En el siguiente cuadro, Barraud²⁸ muestra los índices de unión covalente en ratas de algunos agentes anabólicos.

Valores de I.U.C.

17B-estradiol	11.4
Trenbolona	5.6
Testosterona	4.5
Zeranol	1.6

En este ensayo se puede observar que dentro del -- grupo, el zeranol es el compuesto que presenta el menor índice de unión covalente al DNA de las células hepáticas en ratas.

De los estudios realizados por la FDA, para investigar las posibilidades de generar condiciones pre-cancerígenas en el animal, según presentación de Farber²⁹ y de las pruebas realizadas por Becci³⁰ y según sus resultados, no se observó en ninguna de las pruebas, la inducción de formación de tumores ni de neoplasias de cualquier tipo, situación similar a los mecanismos propios de los compuestos hormonales, como los estrógenos, en la familia de las lactonas del ácido resorcílico.

Becci³⁰ realizó ensayos en ratas FDRL wistar, las cuales fueron expuestas a zearalenona, administrándose éste en útero y por vía oral durante 104 semanas en dosis de 0.1 a 3 mg/kg/día. En este estudio no se observaron efectos tumorigénicos y como única observación particular a dicho experimento, puede mencionarse que los animales tratados con dosis altas (3 mg/kg/día) mostraron aumentos en el peso de sus órganos como consecuencia del efecto estrogénico a esas concentraciones, pero sin alteraciones histológicas que indiquen acciones pre-cancerígenas de algún tipo.

Los problemas relacionados con la determinación de

un nivel adecuado de exposición a esteroides sexuales sintéticos, son más complicados que los relacionados -- con la determinación del nivel de exposición a esteroides sexuales endógenos naturales, esto se debe en parte a que en los agentes de tipo exógeno, como el zeranol, no existe una síntesis endógena del compuesto que pueda ser cuantificada y considerada en relación directa con la exposición producida por el producto. Por consiguiente, las pruebas toxicológicas se hacen más complejas, largas y difíciles de interpretar como se observa en -- las pruebas realizadas en zeranol para comprobar el posible efecto cancerígeno o tumorigénico, donde éste no se define claramente. Sin embargo, para la trenbolona -- se reportan casos de mutaciones en el linfoma celular -- de ratón en un experimento realizado con células del -- tipo L 5178Y.³¹

Metzler³² realizó un estudio a estilbenos y particularmente dietilestilbestrol para determinar si la formación de estos metabolitos forman parte de los mecanismos cancerígenos. El estudio lo realiza en el metabolismo oxidativo, especialmente sobre el mediador metabólico de la activación de la peroxidasa luego de interacciones de intermediarios reactivos con las proteínas y los ácidos nucleicos.

Muchos son los estudios que se han realizado sobre los estrógenos sintéticos, entre los cuales destacan -- los de Liehr J.G. y Fang W.E.³³ con su investigación sobre la carcinogenicidad de derivados de estradiol, induciendo carcinoma renal en Hamster Syriam machos; los trabajos -- de Korach K. y McLachlan J.³⁴ en donde hacen una revisión histórica y muestran evidencias experimentales del importante papel que desempeña el estrógeno receptor en la toxicidad del dietilestilbestrol; y los estudios de Von Borstel R.C. y Mehta R.D.³⁵ en los cuales se hace --

una intensa investigación del DES en las áreas de toxicidad, pruebas de mutagenicidad, translocaciones genéticas, metabolismo y carcinogénesis.

Sin embargo, de los compuestos más importantes que encontramos, el zeranol y la trenbolona, los estudios experimentales no logran definir el debate que se suscita sobre la posible toxicidad de estos compuestos. Para ello Scheutwinkel M.V. y Hude W.³⁶ realizaron una investigación sobre la toxicidad de éstos compuestos en la que resulta positiva una prueba para detectar la posible potencialidad del zeranol como compuesto genotóxico.

Por todo lo anterior, la Food and Drug Administration de los Estados Unidos de América ha impuesto para este tipo de compuestos una serie de Normas de Seguridad que se basan fundamentalmente en un esquema de pruebas que garantizan su inocuidad con un alto grado de confianza. De esta manera, se busca satisfacer las incógnitas que tanto los técnicos como los consumidores se hacen en relación a la seguridad sobre la utilización de un producto, dado que las consecuencias derivadas de su uso pueden afectar la salud pública con efectos probablemente irreversibles de no fácil e inmediata detección.

NORMAS DE SEGURIDAD

Para detectar la posible potencialidad cancerígena o genotóxica de un agente anabólico, la Food and Drug Administration de los Estados Unidos de América ha aprobado la siguiente lista de controles para que sean realizados en todos aquellos productos que se quieran destinar para incrementar el metabolismo animal.

A) Estudios sobre mutagénesis

- Prueba de síntesis no programada de DNA en mamíferos
- Pruebas mutagénicas:

Ames

Controles en células de mamíferos

B) Estudios sobre animales

- Reproducción sobre dos ó más generaciones de ratas - con estudios teratogénicos.
- Estudios teratogénicos en una segunda especie.
- Estudios de alimentación de 90 días de duración, en ratas, con observaciones de actividad reproductiva y sexual.
- Estudios de 90 días de alimentación en perros.
- Estudios de 180 días en monos macacos u otros primates con observaciones de las respuestas hormonales en el aspecto sexual y reproductivo.
- Estudios de oncogenicidad en dos especies de roedores, sólo si cualquiera de los ensayos sobre toxicidad genética resultara positivo, o bien, existiese cualquier indicio pre-neoplásico. Si no existen indicaciones -- carcinogénicas ó si los tumores aparecen solamente en el tejido endócrino, debe calcularse la ingesta diaria aceptable (IDA), valiéndose de la muestra más sensible.

METODOS DE ANALISIS PARA AGENTES ANABOLICOS

A continuación se muestra un resumen de cada una de las técnicas de análisis para la determinación de niveles residuales en tejido animal de 7-alfa-zearalanol, conocido comercialmente como zeranol. Sin embargo, fue la cromatografía de fase gaseosa la primera técnica oficial según método aprobado por la Food and Drug Administration de los Estados Unidos de América en 1969.³⁷

La sensibilidad de esta técnica llega a 20 ppb, lo que significa un nivel de detección por debajo de los requisitos definidos como Nivel sin Efecto Hormonal (NEH). Sin perjuicio de ello, el método, si bien, es sensible no deja de ser trabajoso y complejo. Lo anterior ha impulsado a desarrollar otro enfoque en el terreno analítico utilizando técnicas nuevas, mejorándolas y realizando acoplamiento entre ellas.

7.1 Cromatografía en capa fina (TLC)

El método de cromatografía en capa fina para la detección de agentes anabólicos en tejido u orina contaminados, ha sido perfeccionado mediante un procedimiento - que describe Verbeke R.³⁸

Con este método se alcanzan niveles de detección -- tan bajos como 0.5 a 10 ppb, permitiendo la recuperación del 60 al 80% del agente anabólico, entre los que se encuentran el zeranol, trenbolona, 17B-estradiol, melengestrol, dinestrol, benzestrol y etinil estradiol.

El análisis se realiza por medio de una corrida bidimensional en donde la presencia de residuos de agentes anabólicos son revelados utilizando ácido sulfúrico por

inducción de fluorescencia. El límite de detección de algunos de estos agentes anabólicos es del orden de 1 a 10 ng.

El método de cromatografía en capa delgada se ha perfeccionado mediante el acoplamiento del zeranól a un colorante azoico y por corrida unidimensional con doble revelado y cambios en los sistemas de disolventes. La determinación colorimétrica del zeranól y el colorante azoico llega a detectar niveles de orden de 1 ppb según Worber B.³⁹ En este procedimiento, Worber utiliza el acoplamiento de la sal de diazonio (Fast Dark Blue R.) con estradiol en presencia de estriol y estrona. La prueba se realizó para residuos hormonales en carne destinada a alimentación humana.

Con los mismos objetivos que se presentan en este trabajo, Oehrle K.L. Y Hoffman B.⁴⁰ realizaron un método en el campo de la cromatografía en capa fina para la determinación de trenbolona y acetato de trenbolona con una reacción colorida mediante fluorescencia. La reacción descrita es altamente sensitiva y específica con la discriminación además de otros agentes anabólicos. La medición en el fluorómetro se realiza con una longitud de onda de 365 nm y tiene su emisión máxima a 498 nm.

7.2 Espectroscopía de ultravioleta/visible

La técnica analítica de espectroscopía de ultravioleta/visible (UV/V) logra el ensayo semicuantitativo de la mayoría de los agentes anabólicos aquí mencionados. Pero debido a que la detección de residuos anabólicos requiere de límites de detección del orden de partes por billón (una parte en 10^9) esta técnica no es útil -

para la cuantificación, sin embargo, es útil para -- la identificación.

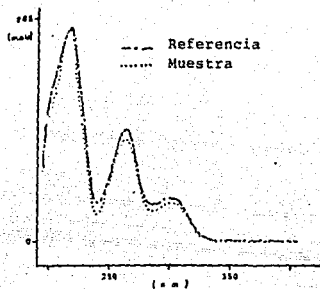
La trenbolona puede ser identificada por espectros copia de ultravioleta/visible a una longitud de onda máxima de 239 ó 335 nanómetros con un coeficiente de extinción molar de 5260 y 28,000 respectivamente.

La identificación de zeranol, taleranol y zearalenona extraídos con metanol de muestras urinarias de animales se logró fácilmente. Los espectros mencionados - se muestran a continuación (figura 10) comparados contra los estándares de referencia bajo idénticas condiciones cromatográficas según estudios realizados por Heyong.⁴¹

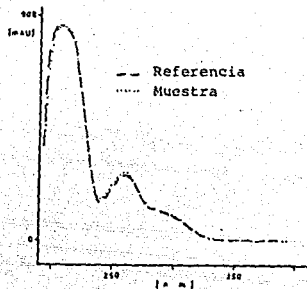
7.3 Cromatografía líquida de alta presión

Frischkorn C.G.B.⁴² desarrolló un método por cromatografía líquida de alta presión (HPLC)* para el zeranol y la zearalenona, más tarde, esta técnica sufrió modificaciones y hoy en día existen dos variantes al método desarrollado obteniendo una sensibilidad de 10 y 5 - ppb.

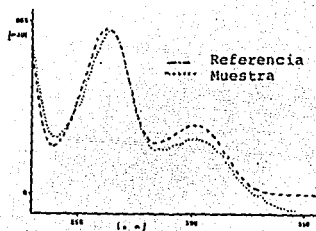
* High-Performance Liquid Chromatography



Espectro UV del zeranol



Espectro UV del taleranol



Espectro UV de la zearalenona

FIGURA 10

Maysinger D.C.⁴³ trabajó con derivados poli-iodados activando el anillo aromático del dietilestilbestrol y del estradiol obteniendo ésto por sustitución electrofílica del yodo. Aunque en este trabajo, los derivados iodados sólo fueron purificados por cromatografía líquida de alta presión y caracterizados posteriormente con acoplamiento de UV/espectroscopia de masas, Maysinger resume los resultados obtenidos de trabajos anteriores que conformaron la síntesis de los derivados iodados desde su separación, purificación e identificación de éstos gracias a la técnica analítica de HPLC.

De la misma manera Frischkorn C.G.B y Frischkorn H.⁴⁴ a raíz de los sucesos de la Olimpiada de Montreal en 1976 en donde, como es sabido se detectó por primera vez el uso de drogas anabólicas en atletas, utilizaron la técnica de antidopping trabajando con cromatografía líquida de alta presión para detectar drogas anabólicas en muestras de orina, tanto en atletas como en animales de alta producción de carne para consumo humano, por ejemplo bovinos. En este trabajo también reportan la determinación simultánea de metardienona, conocida comercialmente como Dinabol, y sus posibles metabolitos: metiltestosterona, isometiltestosterona y 17-metildihidrotestosterona en presencia de esteroides naturales de las vías urinarias.

7.4 Radio-inmuno-análisis

Dado el éxito que este método ha tenido, ya que logra un alto grado de sensibilidad y perfecciona la especificidad en la detección del zeranól y compuestos relacionados y considerando la naturaleza de este trabajo, resulta conveniente ampliar algunos conceptos generales característicos del radio-inmuno-análisis al aplicarse al zeranól.

El radio-inmuno-análisis depende de la habilidad del anticuerpo marcado isotópicamente para unirse al antígeno. Con el fin de cuantificar el antígeno radioactivo marcado se busca medir su unión con el anticuerpo frente a otros antígenos con los que opera competitivamente. El anticuerpo es formado por inoculación al animal con suero de albumina conjugado al zeranól. La albumina se une al zeranól en su posición 14-hidroxi. Cuando el antígeno no radioactivo está presente, menos antígeno radioactivo queda adherido al anticuerpo. Así se establece una relación cuantitativa entre la concentración del antígeno no marcado ligado al anticuerpo y la proporción de los antígenos marcados isotópicamente unidos al anticuerpo.

Las uniones anticuerpo-complejo marcadas son precipitadas por otro segundo anticuerpo, midiéndose esta -- precipitación con el contador de centelleo radioactivo luego de remover el sobrenadante. Los resultados del estudio son extrapolados, se comparan contra la concentración de los controles y se dibuja con puntos la tendencia lineal. Los puntos miden la concentración del producto del antígeno en la abcisa por el valor que en la ordenada presentan los controles en su nivel radioactivo residual comparable.

Cabe mencionar que actualmente se están desarrollando métodos analíticos aún mejores que el radio-inmuno-análisis para la detección de residuos de zeranól en tejido ya que una desventaja importante que presenta este método es su requerimiento en el uso de radioisótopos provocando con ésto que el método sea laborioso y costoso. Los nuevos métodos que reemplazarán al RIA incluyen métodos cromatográficos mejorados.

La técnica del radio-inmuno-análisis se describió por primera vez con una preparación de antígeno por acople del zearanol hemisuccinizado a la albúmina de suero de bovino según estudios realizados por Dixon S.N.⁴⁵ El anticuerpo policlonal en este caso, reacciona no únicamente con el zearanol en un 100%, sino también con la zearalenona y con el zearalanol en un 19% para cada uno. Sin embargo, con estas reacciones cruzadas se puede perjudicar el método cuando exista la posibilidad de que los alimentos consumidos por los animales en estudio estén contaminados por el hongo *Fusarium* sp., lo que invalidaría los resultados debido a la aparición de compuestos de su metabolismo vinculados a la zearalenona, tales como los micoestrógenos y esto resulta de vital importancia ya que la sensibilidad del método para estos compuestos resulta del orden de 0.1 ppb

La especificidad del radio-inmuno-análisis ha sido perfeccionada por la producción de antígenos por acople del 16-carboxipropil éter del zearanol con el suero de albúmina humana y con anticuerpos de tipo monoclonal.

7.5 Unión enzimática inmunoabsorbente

La empresa Neogen Corporation de los Estados Unidos de América ha desarrollado un procedimiento para la rápida detección de micotoxinas y micoestrógenos entre ellos la zearalenona.

El método se denomina Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) siendo ésta una alternativa sencilla y económica que utiliza técnicas químicas.

En Estados Unidos de América se encuentra en proceso la autorización de la prueba como procedimiento ofi-

cial por la American Official Analytical Chemist (AOAC). El método utiliza anticuerpos específicos marcados con -enzimas que son fijados a un soporte sólido en cuyo fondo están adsorbidos los anticuerpos.

El microestrógeno conjugado a un enzima, utilizado - en la prueba como antígeno conocido, denominado conjugado enzimático entra ahora en competencia por fijaciones a los soportes. El microestrógeno y el conjugado enzimático no fijados, son lavados por separado pipeteándose - un sustrato enzimático en los huecos del soporte sólido. Para hacer visible la reacción se añade un reactivo colorado, de esta manera se forma un espectro cromático que puede ser fácilmente detectado y evaluado mediante observación fotométrica en concentraciones del orden de 20 ppb.

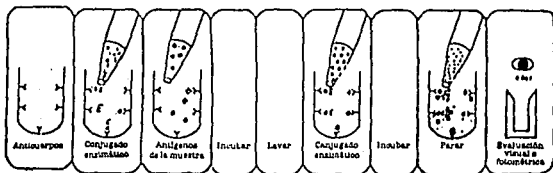


FIGURA 11
Esquema del principio de ELISA

7.6 Cromatografía de gases

El acoplamiento de técnicas para el análisis de residuos de compuestos anabólicos en tejido ha sido muy notable, tal es el caso de los investigadores Stan H.J. y Abraham B.⁴⁶ que reportan el acoplamiento de las técnicas de cromatografía de gases y espectroscopía de ma--

sas. El trabajo consistió en la determinación de 7 --
drogas estrogénicas usadas en preparaciones anabólicas
para producción animal con límites de detección de 1
a 5 ppb.

La cromatografía de gases para la determinación -
de residuos de compuestos anabólicos sintéticos, tales
como los estilbenos entre los que se encuentran el di-
tilestilbestrol, dinestrol y hexestrol fué tratada por
Laitem L.P.G. y Bello I.⁴⁷ con la formación de deriva-
dos con pentafluorobenzoil cloruro, obteniendo ésteres
perfluorados muy estables y adecuados para el análisis
por cromatografía usando un detector de captura de --
electrones. Con este procedimiento es posible la de--
tección de subpartes por billón utilizando sólo 5 g de
muestra.

Es así como se han presentado diferentes métodos -
para la detección, caracterización y/o cuantificación -
de algunos agentes anabólicos, sin embargo, la técnica
de cromatografía de gases presenta ventajas sobre las -
anteriores, tales como la facilidad de operación, costo
y disponibilidad, entre otras, mismas que motivaron la
utilización de esta técnica en el presente trabajo.

GENERALIDADES

El método de cromatografía de gases es una técnica útil y versátil. En sus inicios fué aplicada al análisis de gases y vapores muy volátiles. El trabajo de Martin y Synge⁴⁸ y luego de James y Martin⁴⁹ en cromatografía de gas-líquido abre una puerta para la utilización de una técnica analítica que ha revolucionado los análisis y las separaciones químicas.

Hoy en día, la cromatografía de gases es una herramienta química que puede ser usada para la separación directa y para el análisis de muestras gaseosas, líquidas y sólidos volátiles. Así mismo, la cromatografía de gases estudia estructuras de compuestos químicos, determina mecanismos y cinéticas de reacciones químicas, realiza mediciones de isoterma, de energías libres, de coeficientes de actividad y constantes de difusión.

Otra aplicación significativa de esta técnica es en el área de la preparación de sustancias puras como estándares para otras investigaciones. A escala industrial es utilizada para monitoreo de procesos.

La cromatografía de gases puede ser aplicada para la solución de problemas en muchos campos, de los cuales se enumeran sólo algunos:

a) Drogas y compuestos farmacéuticos

La técnica es usada en el control de calidad de los productos de referencia, también se aplica para el análisis

de nuevos productos y para el monitoreo de metabolitos en sistemas biológicos.

b) Estudios del Ambiente

Las muestras de aire pueden ser muy complejas y la cromatografía de gases es adaptada fácilmente para la separación y análisis de los compuestos que componen a estas muestras. De esta manera, se ha podido relacionar, directa o indirectamente, la contaminación del aire con muchos problemas de salud que presentan las grandes metrópolis, tales como asma, cáncer de pulmón, efimemas y bronquitis entre otros.⁵⁰

c) Química Clínica

La cromatografía de gases se adapta a muchos tipos de muestras como la sangre, orina y otros fluidos biológicos, compuestos como las proteínas, carbohidratos, aminoácidos, ácidos grasos, esteroides, triglicéridos, vitaminas y barbitúricos.

d) Pesticidas

La cromatografía de gases con la ayuda de detectores -- específicos tales como el de captura de electrones, conductividad electrolítica y detectores fosforosos hacen que la detección y la medición sea relativamente simple. A través de esta técnica se analizan casi en su totalidad los pesticidas agrícolas empleados actualmente.

e) Alimentos

La determinación de antioxidantes y conservadores alimenticios es una parte activa en el campo de la cromatografía de gases. Los análisis se realizan en frutas, jugos, vinos, cervezas, quesos, especias, oleoresinas, bebidas, productos en descomposición, contaminantes y adulterantes.

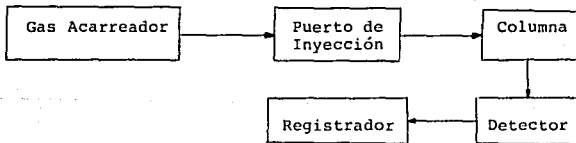
La cromatografía de gases se define como una técnica de separación de mezclas de sustancias volátiles a la temperatura empleada, que interaccionan con una fase líquida y son arrastradas ó eluidas por una fase gaseosa, de ahí que su separación dependerá del punto de ebullición del compuesto ó compuestos por analizar, de la fuerza y tiempo de interacción de éstos con la fase líquida y de la velocidad del gas de arrastre.

Partes Básicas de un Cromatógrafo

- Cilindro del gas acarreador
- Puerto de inyección
- Columna
- Detector
- Registrador

Además consta de un controlador de flujo de gas, un regulador de presión y termostato para el inyector, columna y detector.

Sistema Cromatográfico



La medición cuantitativa en el método de cromatografía de gases depende del área del pico registrado ó la altura del pico y la relación de éste con la cantidad ó concentración de soluto en la muestra. La medición del ---

área se puede llevar a cabo mediante las siguientes técnicas:

	Desv. Estd. Relat.
- Planimetría	4.06
- Cálculo del área ($b \cdot h/2$)	2.58
- Triangulación	4.06
- Cortar y Pesar	1.74
- Integrador de disco	1.29
- Integrador electrónico	0.44

La base del análisis cuantitativo en la cromatografía - de gases es la comparación de los tiempos de retención de los compuestos conocidos con el valor obtenido de -- los compuestos desconocidos, tratados bajo las mismas - condiciones de operación ya que cuando éstas últimas -- son constantes, el tiempo de retención es característico de cada compuesto.

El tiempo de retención puede verse modificado por cambios en:

- Temperatura de la columna.
- Naturaleza del gas acarreador y el flujo de éste.
- Entrada y salida de la presión del gas.
- Composición y naturaleza de la fase estacionaria.
- Longitud de la columna.
- Volúmen de inyección.

La identificación cromatográfica se realiza por distintos métodos y entre ellos se encuentran:

- Datos de retención
- Series Homólogas ó Kovats
- Método del canal doble
- Técnicas no cromatográficas como la formación de deri-

vados, espectro de infrarrojo, espectro de masas y resonancia magnética nuclear.

DETECTORES

Para que un detector pueda ser usado en cromatografía de gases, debe tener una alta sensibilidad a la mayoría de las sustancias, alta estabilidad térmica, un buen intervalo lineal ó proporcionalidad y dar una respuesta en un lapso corto. Existen muy variados tipos de detectores, pero los más utilizados son:

a) Detector de conductividad térmica

Compara la conductividad térmica de una mezcla llevada por la corriente de gas acarreador, con la conductividad térmica del gas acarreador. El hidrógeno y el helio conducen eficientemente el calor, por lo que son recomendados para obtener una efectiva conductividad térmica. La celda de conductividad térmica consiste en un filamento calentado al rojo dentro de un bloque de metal y con una corriente eléctrica constante que pasa a través del filamento, el cuál está conectado a un puente de Wheatstone. Los filamentos están fabricados por metales que resisten la corrosión y que tienen un alto coeficiente de resistencia a la temperatura. Los más usados son los filamentos de platino, tungsteno, níquel y aleaciones de tungsteno. A este detector se le denomina universal ya que presenta respuesta a todos los compuestos, ya sean orgánicos o inorgánicos. El límite de detección del detector es del orden de 100 ppm.

b) Detector de ionización de flama

Se fundamenta en que la conductividad eléctrica de un gas es directamente proporcional a la concentración de partí-

culas cargadas que contenga la corriente del gas. El gas que fluye de la columna, generalmente nitrógeno, a través del orificio del electrodo, pasa por una fuente de ionización que ioniza alguna de las moléculas presentes en la corriente del gas. La presencia de partículas cargadas en el electrodo causa que la corriente eléctrica se incremente, provocando desbalanceo en la resistencia por lo que al pasar la señal eléctrica al registrador forma el llamado pico cromatográfico. El detector de ionización de flama responde virtualmente a todos los compuestos orgánicos, pero es "ciego" a compuestos inorgánicos lo que lo hace un detector selectivo y de especial ayuda para análisis de contaminantes del aire y del agua, materiales geológicos, bebidas alcohólicas, etc. En la actualidad, el límite de detección del detector es del orden de nanogramos.

c) Detector de captura de electrones

Mide el descenso de la corriente eléctrica producida cuando el gas acarreador, generalmente argón-metano (1:20), pasa a través del detector compuesto por tritio o níquel 63, el gas ioniza y se forman electrones lentos. Estos electrones lentos emigran al ánodo por una corriente eléctrica que es amplificada por un electrómetro. Si la muestra contiene moléculas ávidas por electrones la corriente es reproducida. Esta pérdida de corriente es una medida de la afinidad electrónica del compuesto. El detector de captura de electrones es extremadamente sensible a ciertos compuestos tales como los haloalquilos, carbonilos conjugados, nitritos, nitratos y organometales. Su sensibilidad a los halógenos lo hace muy valioso para el análisis de pesticidas ya que su límite de detección es de hasta picogramos.

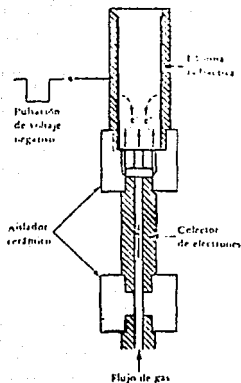


FIGURA 12

Detector de captura de electrones. (Cortesía de Varian Associates.)

d) Detector de helio

Está basado en el aumento del nivel energético por emisión de radiaciones beta a través de una hoja metálica de tritio. El helio estable ioniza el compuesto a analizar y la cantidad de electrones emitidos producirá un cambio de corriente que será registrado.

FORMACION DE DERIVADOS

Las razones para formar derivados en cromatografía de gases son: para incrementar la volatilidad de una sustancia con punto de ebullición muy alto, para reducir la adsorción de solutos sobre el soporte y la superficie de la columna y además para favorecer la separación. Los agentes formadores de derivados específicos auxilian para lograr una mejor separación de compuestos que químicamente son similares tales como los isómeros ópticos.

Cuando se considera necesaria la formación de derivados

en cromatografía de gases, es conveniente primero distinguir entre dos causas que afectan la volatilidad de una sustancia:

- a) La volatilidad de un compuesto no podrá ser incrementada cuando la cohesión intermolecular, resultado de interacciones de fuerzas de dispersión, sea alta.
- b) Cuando se tengan compuestos con tamaño molecular relativamente pequeño y que tienen grupos funcionales que -- provoquen interacciones polares no podrá incrementarse -- la volatilidad.

Las sustancias con alto peso molecular y muchos grupos -- funcionales sobre la molécula no son recomendables para identificarse por cromatografía de gases. Los grupos -- funcionales polares reducen la volatilidad de los compuestos, lo cuál resulta en tiempos de retención excesivamente largos. La volatilidad puede aumentar por disminución en la polaridad debido a bloqueos de los agentes formadores de derivados en los grupos polares y de esta manera -- pueden ser cromatografiados con tiempos de retención razonables.

Sin embargo, es frecuente que sea necesario analizar sustancias con volatilidad relativamente alta y por consecuencia hay pérdidas de los componentes que se están analizando.

El tratamiento con un agente formador de derivados puede convertir al compuesto derivado en uno menos volátil y -- que sea apropiado para el análisis por cromatografía de gases.

Algunas sustancias no pueden ser analizadas por cromatografía de gases debido a su inestabilidad térmica ya que

se descomponen y se producen demasiados picos lo cuál - resulta indeseable en cualquier cromatograma. Estas -- dificultades se pueden resolver si se usa un agente for- mador de derivados adecuado.

Usualmente compuestos de alta polaridad y baja volatili- dad se adsorben sobre el soporte cromatográfico ó sufren descomposición, por estas razones la evaluación cuantita- tiva es muy difícil y puede tornarse imposible. Un ejem- plo es el del colesterol cromatografiado sin derivar y - derivado utilizando para ello trimetilsililimidazol (TMSI) como agente formador del derivado. Como se puede observar (figura 13) el cromatograma del colesterol libre es muy - difícil de evaluar mientras que el cromatograma del coles- terol derivado presenta simetría en el pico y una aprecia- ble disminución en el tiempo de retención.

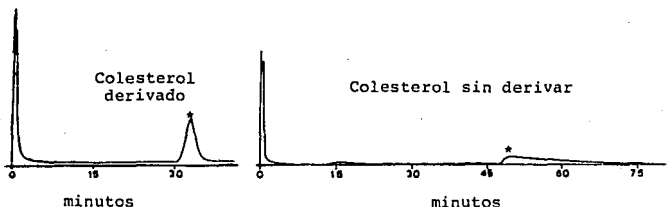


FIGURA 13

El efecto de coleo y la adsorción en el soporte son comun- mente causados por grupos funcionales hidroxilo, carboxi- lo y compuestos polifuncionales de alto peso molecular y además algunos grupos imino y amino que interactúan fuer-

temente con el soporte. Es posible evitar estos efectos por conversión a grupos de menor polaridad desde la preparación de la muestra, es decir, antes del análisis cromatográfico

La formación de derivados es de gran importancia y provee de un método adecuado para la separación de compuestos estrechamente relacionados, donde frecuentemente se hace posible su resolución, que de otra manera no podría realizarse. Entre los compuestos que pueden ser un claro ejemplo de esto, se encuentran los esteroides que difieren en la posición del grupo hidroxilo, ya que los isómeros con grupos hidroxilo en la posición alfa no pueden ser separados del isómero beta sobre una columna no polar, pero cuando el grupo hidroxilo se convierte al compuesto derivado, estos isómeros sí pueden separarse en columnas no polares.

La separación sobre columnas no polares de la estrona, el estradiol y el estriol, todos ellos estrógenos, derivados y sin derivar, pueden apreciarse en la siguiente figura. La separación incompleta y la mala definición de los com-

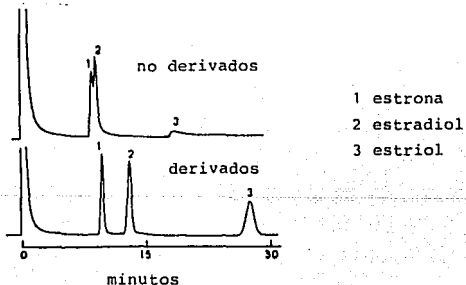


FIGURA 14

puestos sin derivar y el comparativo con los compuestos derivados donde se observan los picos bien definidos, se muestran con claridad.

En el estudio de muestras biológicas, debido al comportamiento de sustancias orgánicas, es necesaria la formación de derivados para que se realice la cromatografía de gases. Finalmente, entre los compuestos por derivar más comunes se encuentran los ésteres, éteres, silil derivados, acil derivados, hidrazonas y oximas y quelatos metálicos.

DESARROLLO DEL TRABAJO EXPERIMENTAL

8.1 Introducción

El uso de la cromatografía de gases y la columna capilar en la detección del 7-alfa-zearalanol, conocido comercialmente como zeranol, proporcionan un método adecuado y sensitivo para la determinación de trazas de dicho compuesto en tejido animal destinado para el consumo humano.

A continuación se reporta un ensayo simple con un límite de detección mínimo de 1 ppb, utilizando para ello equipo común a un laboratorio de investigación sin la necesidad de equipos costosos que impliquen la utilización de anticuerpos o radioisótopos.

La técnica requiere tan sólo de un día de trabajo, permitiendo así el análisis de un número considerable de muestras en un período relativamente corto.

Este ensayo consiste en extraer con éter dietílico la enzima hidrolizada del tejido, seguida por la separación cuantitativa por cromatografía de gases del 7-alfa-zearalanol derivado con el éter trimetilsililimidazol.

La confirmación de la derivación del zeranol-TMS en residuos de tejido se realiza usando cromatografía de gases con detector de captura de electrones.⁵¹ El patrón de fragmentación y el tiempo de retención obtenido para el 7-alfa-zearalanol-TMS estándar hace suponer que será el mismo para el compuesto en estudio.

El método resulta lineal bajo un rango de 1 ppb a 10 ppb. Finalmente, el método resulta conveniente por el

poco tiempo necesario para el análisis del compuesto y -
por el empleo de equipo de uso común a cualquier laborato
rio de investigación.

2.2 Extracción y Purificación

a) Aparatos

Estufa con intervalo de temperatura 0-100 °C

Viales para derivación de 2 ml de capacidad

Centrífuga:Explosion-Proof

Balanza granataria de 2000 g de capacidad

Balanza analítica de 0.1 mg de sensibilidad

Homogeneizador de tejido:Tekmar Tissumizer o equivalente.

Potenciómetro:Beckman Mod. 3200

Evaporador de nitrógeno con baño de agua: Organomation -
N-Evap. o equivalente.

Congelador

Tubos para centrífuga:Corex No. 1265 de 150 ml con tapa -
de rosca.

Baño ultrasónico para equipo de vidrio: NoChroMix

Pipetas Pasteur

Matraces de 250 y 1000 ml de capacidad con boca ancha --
24/40 vidrio Pyrex

Embudos de separación:Squibb con llave de teflón de 250 y
500 ml de capacidad, vidrio Pyrex

Extractor:Soxhlet de 1000 ml de capacidad, vidrio Pyrex

Baño de agua

b) Reactivos

Eter dietílico anhidro. Se analizó para detectar presencia
de peróxidos y contaminantes según procedimientos recomen-

dados por ACS.

Cloroformo Regis Chemical. Redestilado y refrigerado al resguardo de la luz.

NaOH solución 1 N y 6 N. Grado analítico

H₃PO₄ solución 3 N. Grado analítico

Solución 0.05 M PBS, 6.9 g NaHPO₄ + 8.5 g NaCl, disolver en 800 ml de agua, ajustar pH a 7.2 con solución de --- H₃PO₄ y diluir a 1 lt.

c) Procedimiento

La muestra de tejido exento de agentes anabólicos proveniente del Livestock Feeding and Nutrition Research - Institute localizado en Terrè Haute, Indiana, E.U.A. fué tomada por el laboratorio de Análisis de Residuos del mismo Instituto. La muestra de tejido pertenecía a reses machos de 45 semanas de edad siendo éstos sacrificados 5 días antes a la utilización de la muestra, la cuál fué homogeinizada en agua y mantenida en congelación para su conservación.

d) Cálculos

La concentración de 7-alfa-zearalanol en la muestra de tejido se calcula con la siguiente ecuación:

$$\text{ppb de zeranol en la muestra} = \frac{\text{ng de zeranol en la muestra}}{\text{g de muestra} \times 0.9}$$

Ecuación 1

8.3 Detección por Cromatografía de Gases

a) Aparatos

Cromatógrafo de Gases: Varian Modelo 810 con detector de captura de electrones o equivalente, equipado con inyector SPLIT/SPLITNESS y FDI.

Jeringa Hamilton Micro Syringe Modelo 701 de 10 ul de capacidad.

Integrador PC-IBM-XT de Spectra-Physics 4270 o equivalente utilizando el Software Labnet-XT version 2.0

b) Reactivos

Tetrahidrofurano grado derivación, Pierce Chemical Co., - No. Cat. 27860

Deriva-Sil Regis Chemical, No. Cat. 270150. Está compuesto por BSA (N,O-Bistrimethylsilylacetamida), BSTFA (N,O-Bistrimethylsilyltrifluoroacetamida), DMS (Dimethylsilyl), TMCS (Trimethylchlorosilano) y TMSI (Trimethylsilylimidazol).

Material de vidrio. Todo el material de vidrio fue silanizado con solución de dimetildiclorosilano en tolueno antes de su uso.

c) Gases para cromatógrafo

Gas acarreador. Helio ultra puro

Hidrógeno. Ultra puro

Nitrógeno. Ultra puro

d) Columna

Columna capilar 15 metros x 0.32 mm. ID FSOT recubierta con DB-5, espesor de capa 0.25 micrones. Inyecciones de 1-2 ul de una mezcla 50/50 de hexametildisilazano y trimetilclorosilano que ayudará a remover sitios activos en la columna. Se preparó un trimetilsilano derivado de 1000 ug del estándar primario como se describe en el procedimiento general. Se inyectaron alícuotas de 1ul varias veces y en cada ocasión se fueron variando las condiciones de operación hasta optimizarlas, de tal manera que la columna respondiera con la máxima eficiencia. Una vez que la columna mostró respuesta al nivel de 1000 ug, se procedió a inyectar cantidades más pequeñas para conocer el límite de detección.

e) Detector

Captura de electrones

f) Condiciones de operación

Flujos Promedio

Helio	3.7 ml/min
Aire	300 ml/min
Hidrógeno	30 ml/min

Condiciones del Horno

Temperatura inicial	100 °C para 1 min
Incremento de temperatura	5 °C por min
Temperatura final	300 °C para 5 min
Temperatura de inyección	325 °C
Temperatura del detector	325 °C
Detector	Captura de electrones

Tipo de Inyección

Relación	59:1
Tamaño de muestra	2.8 ul

8.4 Preparación del Estándar

Zearalanol estándar primario, lote No. P-1496-3 Commercial Solvents Co. La preparación del estándar consistió en elaborar una solución stock disolviendo 0.100 g del estándar primario P-1496-3 en metanol, diluyendo en un matraz aforado hasta 100 ml. De éste se tomó una alícuota de 5 ml, se llevó a un matraz aforado de 100 ml, se diluyó hasta la marca nuevamente con metanol y se agitó. Se prepararon soluciones de 1 y 5 ug/ml diluyendo alícuo

tas de 2 y 10 ml de la segunda dilución con 100 ml de metanol.

De éstas últimas se tomó una alícuota de 1 ml y se colocaron respectivamente en viales con el fin de evaporar el disolvente al vacío a 60 °C durante toda la noche y se guardaron para la preparación del derivado con trimetilsilano. Los estándares secos de 1 a 5 ug son estables hasta por un mes.

8.5 Procedimiento general

- Pesar con precisión 25 g de muestra de tejido finamente picado y llevarlo a un tubo de 150 ml de la centrífuga.
- Añadir a la muestra la cantidad apropiada de 7-alfa-zetralanol (estándar) o metanol, según sea el caso, hasta alcanzar igualdad de volumen en todos los casos.
- Adicionar 15 ml de la solución PBS.
- Homogeneizar la muestra con el homogeneizador de tejido.
- Tapar el tubo de la centrífuga y llevar éste al baño de agua justo antes de la ebullición, por un tiempo de 10 minutos.
- Quitar el tubo de la centrífuga del baño y enfriar a temperatura ambiente.
- Adicionar 5 ml de la solución PBS que contiene 25,000 u de beta-glucuronidasa y re-homogeneizar.
- Incubar la muestra en baño de agua a 37°C por 60 min.
- Sacar de la incubación y enfriar con agua.
- Ajustar pH entre 7 y 8 con solución NaOH 6 N y enfriar nuevamente.
- Adicionar CUIDADOSAMENTE 25 ml de éter dietílico.
- Centrifugar a 1200 rpm durante 5 minutos.
- Quitar la tapa y extraer la capa etérea con una pipeta

- Pasteur y llevar esta capa a un vaso de precipitados de 50 ml.
- Repetir los pasos 11, 12 y 13 con extracciones de éter - de 11 a 13 veces.
 - Evaporar en campana o bajo flujo de nitrógeno hasta sequedad, aproximadamente 12 horas.
 - Disolver el residuo en 20 ml de cloroformo y transferir a un embudo de separación de 125 ml.
 - Extraer el cloroformo dos veces con alícuotas de 10 ml - de NaOH 1 N llevándolo a otro embudo de separación.
 - Lavar el extracto cáustico con 10 ml de cloroformo.
 - Ajustar el extracto cáustico con solución de H_3PO_4 3 N a pH de 8.0
 - Retornar la solución neutralizada al embudo de separación y extraer ésta tres veces con porciones de éter -- dietílico.
 - Eliminar cualquier capa que se haya formado debajo de la de éter.
 - Transferir el extracto etéreo a vasos de precipitados de 50 ml y posteriormente dejar secar toda la noche o bajo flujo de nitrógeno.
 - Transferir el residuo a un vial para derivaciones con -- dietil éter y secar nuevamente bajo flujo de nitrógeno.
 - Adicionar 100 ul de Deriva-Sil (3:2:3:BSTFA:TMCS:TMSI) - y calentar a 60°C durante 20 minutos.
 - Enfriar y adicionar 100 ul de tetrahidrofurano seco.
 - Inyectar 2.8 ul dentro de la columna de 15 m x 0.32 mm - ID FSOT con DB-5 para un promedio de capa delgada de -- 0.25 um siguiendo las condiciones para el análisis por - cromatografía de gases ya descritas.
 - Calcular por sustracción las diferencias de áreas en el cromatograma, o bien, utilizar el Software Labnet-XT ver sión 2.0 instalado sobre una PC-IBM-XT de Spectra-Physics haciendo la sustracción del cromatograma del blanco y la muestra punto por punto.

-Usar las diferencias de áreas en el cromatograma para -
determinar la cantidad de 7-alfa-zearalanol presente -
según la siguiente ecuación:

$$\text{ng de zeranol en la muestra} = \frac{\text{ng de zeranol en el estándar} \times \text{Area del pico de zeranol en la muestra}}{\text{Area del pico de zeranol en el estándar}}$$

Ecuación 2

Los volúmenes de la muestra y el estándar pueden ser --
iguales o diferentes si se usa un factor de corrección.

-Calcular la concentración de 7-alfa-zearalanol en la --
muestra de tejido.

8.6 Cromatogramas

DESCRIPCION DE LOS CROMATOGRAMAS DEL PRIMER ENSAYO

Para obtener el cromatograma no. 1 se inyectaron 100 ng - de zeranol estándar, preparado según procedimiento que se encuentra en el punto 8.4. Se obtienen tiempos de retención, concentración y área bajo la curva.*

Para obtener el cromatograma no. 2 se inyectó la muestra # 1 de tejido que se utilizó como blanco o referencia.*

Para obtener el cromatograma no. 3 se inyectó la muestra # 3 de tejido adicionado con 50 ng de zeranol estándar.*

Para obtener el cromatograma no. 4 se realizó la sustracción sobre la línea base del cromatograma no. 3 respecto al cromatograma no. 2 bajo las mismas condiciones,** evaluando la recuperación obtenida mediante este método.***

Para obtener el cromatograma no. 5 se realizó la inyección de la muestra no. 4 de tejido adicionado con 50 ng de zeranol estándar.*

Para obtener el cromatograma no. 6 se realizó la sustracción sobre la línea base del cromatograma no. 5 respecto al cromatograma no. 2 bajo las mismas condiciones,** evaluando la recuperación obtenida mediante este método.***

Para obtener el cromatograma no. 7 se inyectó la muestra # 3 de tejido que se utilizó como blanco.*

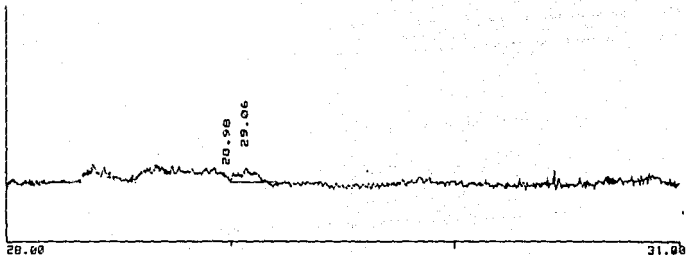
* Los valores aparecen en el mismo cromatograma.

** Apoyo del software de IBM en equipo Varian

*** La evaluación se encuentra en el punto 8.7

ZERANOL ESTANDAR 100 NG

INYECTADO EL 09/16/88 11:23:01
 DISK FILE : IVAR2925.RAW
 ANCHURA DE PICO = 6
 DE J.A.F
 ATENUACION = 2.0

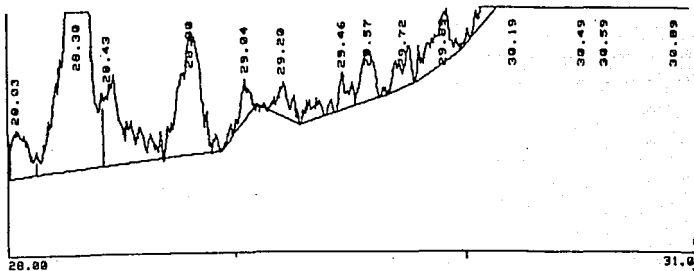


FILE	1	METHOD	0	RUN	15	INDEX	15	CH#	PS#	1
PICO #		AREA %		t		AREA				
1		1.305		28.98		26 61				
2		98.695		29.06		1967 61				
TOTALS		100.				1993				

CROMATOGRAMA NO. 1

MUESTRA # 1
BLANCO DE TEJIDO

INYECTADO EL 09/16/88 12:27:20
DISK FILE: 1VAR2927.RAW
ANCHURA DE PICO = 6
DE 72.4/
ATENUACION = 2.0

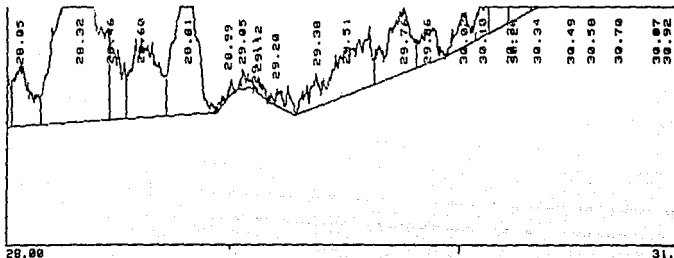


FILE	1	METHOD	0	RUN	18	INDEX	18	CH=	PS=1
PICO	#	AREA	%	t	AREA				
1		1.431		28.03	3410	02			
2		7.151		28.38	17047	02			
3		0.943		28.43	2249	02			
4		17.651		28.78	42074	02			
5		1.546		29.04	3685	02			
6		16.472		29.20	39265	02			
7		4.084		29.46	9736	02			
8		5.639		29.57	13442	02			
9		0.812		29.72	1935	61			
10		0.885		29.83	2110	02			
11		1.267		29.89	3021	02			
12		1.327		29.89	3163	02			
13		1.086		29.89	2588	02			
14		2.068		30.19	4729	02			
15		8.096		30.19	19300	02			

CROMATOGRAMA NO. 2

MUESTRA # 3
TEJIDO CON 50 NG DE ZERANOL ESTANDAR

INYECTADO EL 09/16/88 13:27:02
DISK FILE : IVAR2928.RAW
ANCHURA DE PICO = 6
DE 7.147
ATENUACION = 2.0

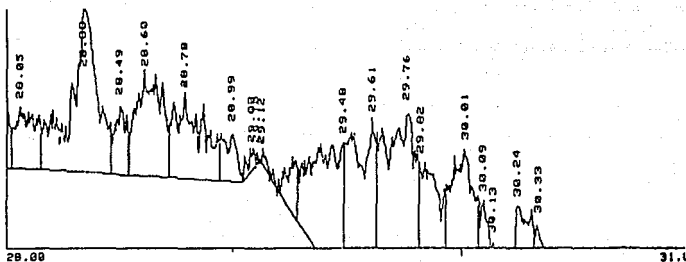


FILE 1	METHOD 0	RUN 23	INDEX 23	CH=	PS=1
PICO #	AREA %	t _r	AREA		
1	0.416	27.24	895	01	
2	6.036	27.41	12972	02	
3	0.204	27.54	443	02	
4	0.98	27.59	2106	02	
5	0.739	27.72	1588	02	
6	23.741	27.87	51027	02	
7	2.579	28.03	3544	02	
8	25.016	28.32	5768	02	
9	7.085	28.46	4435	02	
10	4.457	28.66	10091	02	
11	7.44	28.81	15990	02	
12	0.215	28.99	464	61	
13	0.309	29.05	653	02	
14	0.168	29.12	561	00	
15	0.59	29.28	1269	00	

CROMATOGRAMA NO. 3

SUSTRACCION SOBRE LA LINEA BASE
 DEL CROMATOGRAMA NO. 3 RESPECTO
 AL CROMATOGRAMA NO. 2

INYECTADO EL 09/16/80 10:27:07
 DISK FILE: TEST1.RAN
 DE /.../
 ATENUACION = 2.0
 ANCHURA DE PICO = 6

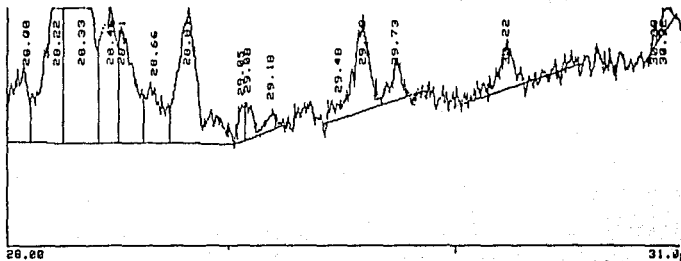


FILE	1	METHOD	0	FUN	15	INDEX	25	CH=	PS=1
PICO #		AREA	::		t		AREA		
1	0.0000	0.00							
2	0.0000	0.00							
3	0.0000	0.00							
4	0.0000	0.00							
5	0.0000	0.00							
6	0.0000	0.00							
7	0.0000	0.00							
8	0.0000	0.00							
9	0.0000	0.00							
10	0.0000	0.00							
11	0.0000	0.00							
12	0.0000	0.00							
13	0.0000	0.00							
14	0.0000	0.00							
15	0.0000	0.00							
16	0.0000	0.00							
17	0.0000	0.00							
18	0.0000	0.00							
19	0.0000	0.00							
20	0.0000	0.00							
21	0.0000	0.00							
22	0.0000	0.00							
23	0.0000	0.00							
24	0.0000	0.00							
25	0.0000	0.00							
26	0.0000	0.00							
27	0.0000	0.00							
28	0.0000	0.00							
29	0.0000	0.00							
30	0.0000	0.00							
31	0.0000	0.00							
32	0.0000	0.00							
33	0.0000	0.00							
34	0.0000	0.00							
35	0.0000	0.00							
36	0.0000	0.00							
37	0.0000	0.00							
38	0.0000	0.00							
39	0.0000	0.00							
40	0.0000	0.00							
41	0.0000	0.00							
42	0.0000	0.00							
43	0.0000	0.00							
44	0.0000	0.00							
45	0.0000	0.00							
46	0.0000	0.00							
47	0.0000	0.00							
48	0.0000	0.00							
49	0.0000	0.00							
50	0.0000	0.00							

CROMATOGRAMA NO. 4

MUESTRA # 4
 TEJIDO CON 50 NG DE ZERANOL ESTANDAR

INYECTADO EL 09/16/88 15:31:58
 DISK FILE : IVAR290.RAW
 ANCHURA DE PICO = 6
 DE / A/
 ATENUACION = 2.0

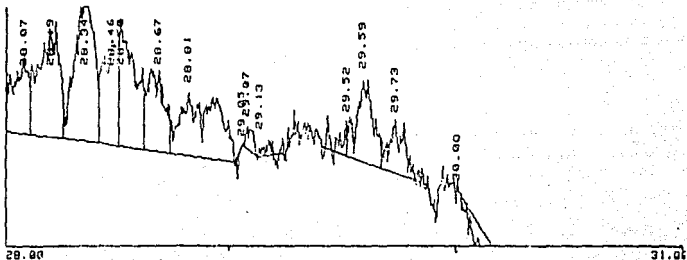


FILE 1	METHOD 0	RUN 30	INDEX 30	CH=	PS=1
PICO #	AREA %	t	AREA		
1	2.186	27.2	4213	0	0
2	4.216	27.42	8126	0	0
3	3.181	27.43	6132	0	0
4	2.559	27.59	4892	0	0
5	2.057	27.88	4892	0	0
6	3.071	28.08	5920	0	0
7	7.734	28.22	14906	0	0
8	21.439	28.33	41321	0	0
9	5.48	28.46	10562	0	0
10	4.765	28.51	9184	0	0
11	2.65	28.66	5108	0	0
12	7.608	28.81	14662	0	0
13	0.678	29.05	1308	61	
14	0.703	29.08	1355	00	

CROMATOGRAMA NO. 5

SUSTRACCION SOBRE LA LINEA BASE
 DEL CROMATOGRAMA NO. 5 RESPECTO
 AL CROMATOGRAMA NO. 2

INYECTADO EL 06/11/88 12:01:00
 DISK FILE : TR011.PAR
 ANCHURA DE PICO
 DE : 0.0100
 ATENUACION : 1.00

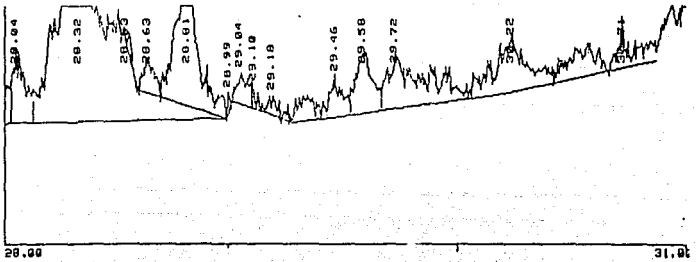


FILE 1	METHOD 0	RUN 37	INDEX 33	CH=	PS=1
PICO #	AREA %	t	AREA		
1	0.004	28.07	1458	0.00	
2	0.001	28.09	4368	0.00	
3	0.015	28.33	4908	0.00	
4	0.020	28.46	7758	0.00	
5	0.049	28.58	1644	0.00	
6	0.017	28.67	1168	0.00	
7	0.035	28.81	7886	0.00	
8	0.047	29.07	15886	0.00	
9	0.027	29.13	7886	0.00	
10	0.031	29.22	10084	0.00	
11	0.034	29.39	7188	0.00	
12	0.000	29.73	11570	0.00	
13	0.000	30.00	9054	0.00	
14	0.002	29.17	816	0.00	

CROMATOGRAMA NO. 6

MUESTRA # 3
BLANCO DE TEJIDO

INYECTADO EL 09/16/88 14:35:48
DISK FILE : 1VAR29.RAW
ANCHURA DE PICO = 6
DE / - /
ATENUACION = 2.0



FILE	1	METHOD	0	RUN	28	INDEX	28	CH=
PS=	1	AREA %	t			AREA		
PICO	#							
1		7.932	27.41			15655	02	
2		7.784	27.61			3483	02	
3		24.065	27.91			47499	02	
4		2.246	28.04			4452	02	
5		34.854	28.33			68794	08	
6		0.176	28.66			37	05	
7		0.982	28.72			1938	06	
8		7.811	28.81			15417	06	
9		0.077	28.99			152	61	
10		0.073	29.04			1724	61	
11		0.134	29.15			763	00	
12		0.614	29.18			1253	00	
13		2.481	29.46			4896	06	
14		2.156	29.58			4967	06	
15		6.379	29.72			12590	06	

CROMATOGRAMA NO. 7

DESCRIPCION DE LOS CROMATOGRAMAS DEL SEGUNDO ENSAYO

Para obtener el cromatograma no. 8 se inyectó agente de derivación (DERIVA-SIL:THF) en tetrahidrofurano, que se utiliza como referencia.*

Para obtener el cromatograma no. 9 se inyectaron 50 ng de zeranol estándar preparado según procedimiento del punto no. 8.4., Se obtienen tiempos de retención, concentración y área bajo la curva.*

Para obtener el cromatograma no. 10 se inyectó la muestra # 1 del lote identificado con el no. 24 que se empleó como blanco.*

Para obtener el cromatograma no. 11 se inyectaron 50 ng de zeranol en la muestra de tejido # 3 identificado con el número de lote 24

Para obtener el cromatograma no. 12 se inyectó la muestra de tejido # 1 del lote 23 que se utilizó como blanco.*

Para obtener el cromatograma no. 13 se inyectaron 125 ng de zeranol en la muestra de tejido = 3 del lote identificado con el número 23.*

Para obtener el cromatograma no. 14 se realizó la sustracción sobre la línea base del cromatograma no. 13 respecto al cromatograma no. 15 , bajo las mismas condiciones,** evaluando la recuperación obtenida mediante este método.***

Para obtener el cromatograma no. 15 se inyectó la muestra # 2 del lote 23 que se utilizó como blanco de tejido.*

Para obtener el cromatograma no. 16 se inyectó la muestra de tejido # 4 del lote 23 con 125 ng de zeranol estándar.*

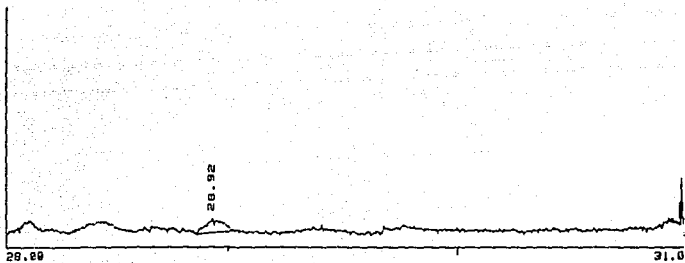
* Los valores aparecen en el mismo cromatograma

**Apoyo del software de IBM en equipo Varian

***La evaluación se encuentra en el punto 8.7

BLANCO DE DERIVA-SIL:THF

INYECTADO EL 04/12/82 09:41:14
 DISEÑO FILE 104825011.FRW
 ANCHURA DE PICO = 6
 DE /-0.1/
 ATENUACION = 2.0

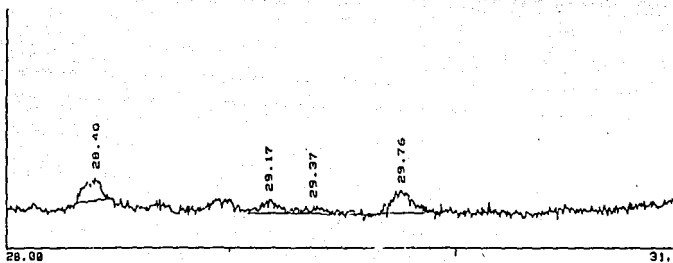


FILE	METHOD	RUN	INTEG	CH	PS#
PICO #	AREA %	t	AREA		
1	100	28.92	1156	61	
totals	100		1156		

CROMATOGRAMA NO. 8

ZERANOL ESTANDAR 50 NG

INYECTADO EL 09/17/88 10:29:15
 D:\51 FILE: 17062101.RAW
 ANCHURA DE PICO = 6
 DE 2.0
 ATENUACION = 2.0

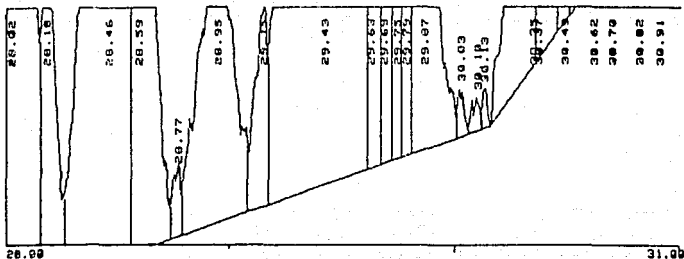


FILE	1	METHOD	0	RUN	5	INDEX	5	CH=	PS=1
PICO #		AREA %		t		AREA			
1		35.930		28.4		1972	01		
2		17.800		29.17		1071	08		
3		11.900		29.37		713	08		
4		37.264		29.76		2251	01		

CROMATOGRAMA NO. 9

MUESTRA # 1
 LOTE 24
 BLANCO DE TEJIDO

INYECTADO EL: 09/17/88 11:22:35
 DISK FILE: 1:ARC1903.FAW
 ANCHURA DE PICO = 6
 DE
 ATENUACIÓN = 2.0

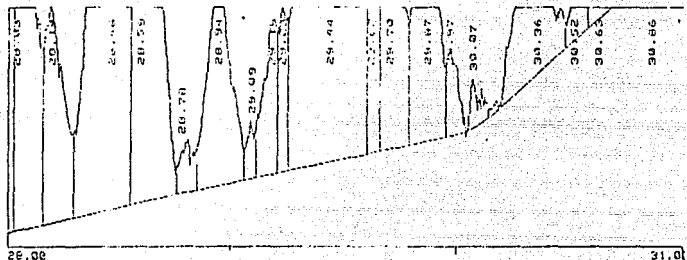


FILE	1	METHOD	0	RUN	6	INDEX	6	CH=	PS =1
PICO #		AREA %	t			AREA			
1		0.091	28.02			1580	0		
2		0.117	28.18			2017	0		
3		0.33	28.46			8730	0		
4		0.159	28.59			1742	0		
5		0.1159	28.77			1188	0		
6		0.001156	28.95			575	0		
7		0.9211	29.43			1642	0		
8		21.73	29.63			2819	0		
9		1.73	29.69			165	0		
10		11.72	29.72			7090	0		
11		4.557	29.87			78708	0		
12		0.18	30.03			1108	0		
13		3.148	30.13			14159	0		
14		0.798	30.37			1379	0		
15		34.25	30.47			1082	0		

CROMATOGRAMA NO. 10

MUESTRA # 3
 LOTE 24
 TEJIDO CON 50 NG DE ZERANOL ESTANDAR

INYECTADO EL 09/17/88 10:26:10
 DISK FILE : IVAR294.RAW
 ANCHURA DE PICO = 6
 DE
 ATENUACION = 2.0

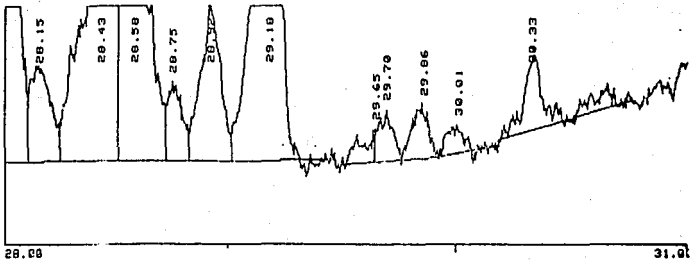


FILE 1	METHOD	0	RUN 12	INDEX 12	CH=	PS=1
PICO #	AREA %		t	AREA		
1	0.184		27.05	185	0	0
2	0.485		27.14	488	0	0
3	0.214		27.19	215	0	0
4	0.378		27.27	378	0	0
5	0.487		27.41	487	0	0
6	1.356		27.77	1356	0	0
7	0.049		28.00	49	0	0
8	10.741		28.08	1074	0	0
9	0.151		28.14	151	0	0
10	0.181		28.15	181	0	0
11	1.708		28.19	1708	0	0
12	0.279		28.20	279	0	0
13	0.211		28.21	211	0	0
14	0.228		28.22	228	0	0
15	0.257		28.23	257	0	0

CROMATOGRAMA NO. 11

MUESTRA # 1
 LOTE 23
 BLANCO DE TEJIDO

INYECTADO EL 06/17/80 14:10:45
 DISK FILE : I\WAB230.RAW
 ANCHURA DE PICO = 6
 DE
 ATENUACION = 2.0

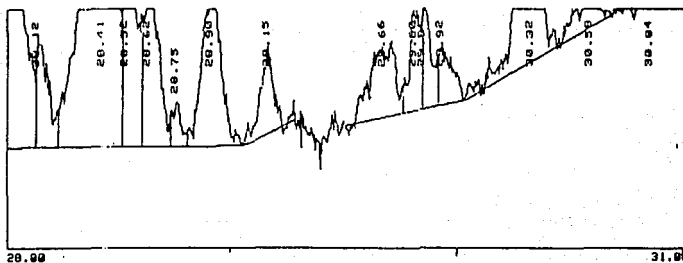


FILE	1	METHOD	0	RUN	14	INDEX	14	CH=	PS=1
PICO #		AREA %		t		AREA			
1		0.785		28.15		132179		01	
		0.587		28.43		150266		02	
		1.752		28.58		502735		03	
		15.483		28.75		449333		04	
		0.443		28.92		9988		05	
		11.544		29.18		106976		06	
		11.171		29.65		17473		07	
		2.036		29.78		15709		08	
		0.599		29.86		16243		09	
10		0.685		30.01		25115		10	
11		0.875		30.33		1460		11	
12		1.227				1558		12	

CROMATOGRAMA NO. 12

MUESTRA # 3
 LOTE 23
 TEJIDO CON 125 NG DE ZERANOL ESTANDAR

INYECTADO EL 09/17/82 15:06:21
 DISK FILE : 1\VAR\35.RAW
 ANCHURA DE PICO = 6
 DE 1.5 A 2
 ATENUACION = 2.0



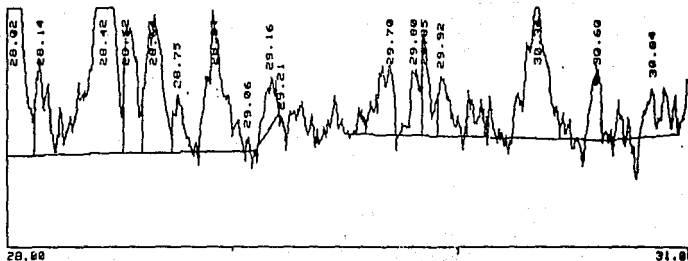
FILE	1	METHOD	0	RUN	15	INDEX	15	CH=	PS=1
PICO #		AREA %		t		AREA			
1		1.548		20.04		4708	001		
2		1.1547		20.12		3791	001		
3		7.16154		20.41		25273	001		
4		10.16156		20.50		7102	001		
5		10.18777		20.63		87802	001		
6		2.108704		20.75		5701	001		
7		4.158464		20.90		69518	001		
8		4.1584		20.15		14758	001		
9		4.1584		20.66		15089	001		
10		6.651		20.80		1979	001		
11		1.4432		20.82		1854	001		
12		1.943		20.92		5906	001		

CROMATOGRAMA NO. 13

ESTA TESIS NO DEBE
 SALIR DE LA BIBLIOTECA

SUSTRACCION SOBRE LA LINEA BASE
 DEL CROMATOGRAMA NO. 13 RESPECTO
 AL CROMATOGRAMA NO. 15

INYECCADO EL 09/17/83 15:06:20
 DISK FILE TESTS.FRW
 ANCHURA DE PICO = 6
 DE /2.A/
 ATENUACION = 2.0

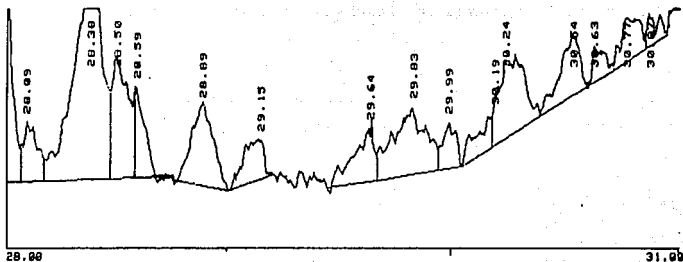


FILE	1	METHOD	0	RUN	24	INDEX	24	CH=	PS=1
PICO #		AREA	t	AREA					
1	28.02	15000	1.1	15000	15000	15000	15000	15000	15000
2	28.14	15000	1.1	15000	15000	15000	15000	15000	15000
3	28.42	15000	1.1	15000	15000	15000	15000	15000	15000
4	28.52	15000	1.1	15000	15000	15000	15000	15000	15000
5	28.75	15000	1.1	15000	15000	15000	15000	15000	15000
6	29.06	15000	1.1	15000	15000	15000	15000	15000	15000
7	29.16	15000	1.1	15000	15000	15000	15000	15000	15000
8	29.21	15000	1.1	15000	15000	15000	15000	15000	15000
9	29.70	15000	1.1	15000	15000	15000	15000	15000	15000
10	29.80	15000	1.1	15000	15000	15000	15000	15000	15000
11	29.85	15000	1.1	15000	15000	15000	15000	15000	15000
12	29.92	15000	1.1	15000	15000	15000	15000	15000	15000
13	30.00	15000	1.1	15000	15000	15000	15000	15000	15000
14	30.60	15000	1.1	15000	15000	15000	15000	15000	15000
15	30.84	15000	1.1	15000	15000	15000	15000	15000	15000

CROMATOGRAMA NO. 14

MUESTRA # 2
 LOTE 23
 BLANCO DE TLJJDO

INYECTADO EL 09/10/88 09:26:04
 DISK FILE " WARDY29.RAW"
 ANCHURA DE PICO = 6
 DE 7.27
 ATENUACIÓN = 2.0

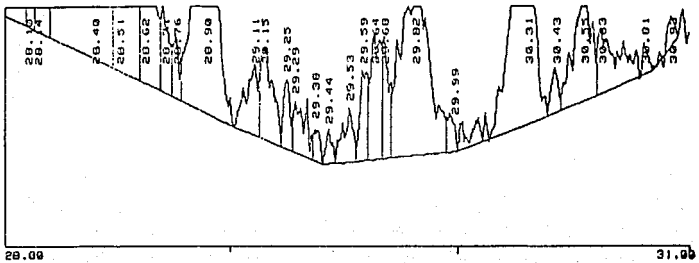


FILE	1	METHOD	0	RUN	21	INDEX	21	CH=	PS=
PICO #		AREA %		t		AREA			
1		1.318		28.09		22248			
2		7.127		28.30		12160			
3		1.318		28.50		33349			
4		1.166		28.59		7099			
5		1.528		28.89		4311			
6		19.759		29.15		33712			
7		16.416		29.64		16946			
8		3.497		29.83		4260			
9		4.998		29.99		9380			
10		1.307		30.19		1486			
11		6.72		30.24		5642			
12				30.64		11466			

CROMATOGRAMA NO. 15

MUESTRA # 4
 LOTE 23
 TEJIDO CON 125 NG DE ZERANOL ESTANDAR

INYECCADO EL: 09/10/86 10:01:15
 DIR: FILE: 1068340.FRW
 ANCHURA DE PICO = 6
 DE: 10.00
 ATENUACION = 2.0



FILE	1	METHOD	0	RUN	25	INDEX	25	CH	PS-1
PICO	#	AREA	%	t	AREA				
1		0.24			1044				
2		0.657			26411				
3		0.3389			1218				
4		0.2219			844				
5		1.21			4444				
6		0.46			1664				
7		0.454			167				
8		0.449			1633				
9		0.703			2641				
10		0.15			54				
11		15			544				
12		13.171			4655				

CROMATOGRAMA NO. 16

DESCRIPCION DE LOS CROMATOGRAMAS DEL TERCER ENSAYO

Para obtener el cromatograma no. 17 se inyectaron 25 ng de zeranol estándar, preparado según procedimiento que se encuentra en el punto 8.4. Se obtiene el área bajo la curva.*

Para obtener el cromatograma no. 18 se inyectó la muestra de tejido # 1 del lote no. 25 que se utilizó como blanco.*

Para obtener el cromatograma no. 19 se inyectaron 25 ng de zeranol estándar en la muestra de tejido # 3 del lote no. 25.*

Para obtener el cromatograma no. 20 se realizó la sustracción sobre la línea base del cromatograma no. 19 respecto al cromatograma no. 18 bajo las mismas condiciones,** evaluando la recuperación obtenida mediante este método.***

Para obtener el cromatograma no. 21 se inyectaron 25 ng de zeranol estándar en la muestra de tejido # 4 del lote no. 25.*

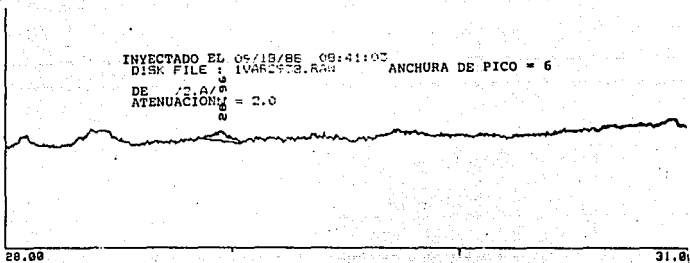
Para obtener el cromatograma no. 22 se realizó la sustracción sobre la línea base del cromatograma no. 19 respecto al cromatograma no. 21 bajo las mismas condiciones,** evaluando la recuperación obtenida mediante este método.***

* Los valores aparecen en el mismo cromatograma.

** Apoyo del software de IBM en equipo Varian.

*** La evaluación se encuentra en el punto 8.7

ZERANOL ESTANDAR 25 NG

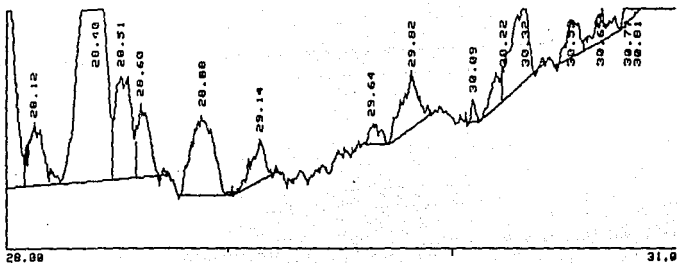


FILE	1	METHOD	0	RUN	18	INDEX	10	CH=	PS=1
PICO #		AREA %		t		AREA			
1		100.		28.96		762.61			

CROMATOGRAMA NO. 17

MUESTRA # 1
 LOTE 25
 BLANCO DE TEJIDO

INYECTADO EL 09/18/68 11:24:52
 DATA FILE : 10AR2941.RAW
 ANCHURA DE PICO = 6
 DE / C N /
 ATENUACION = 2.0

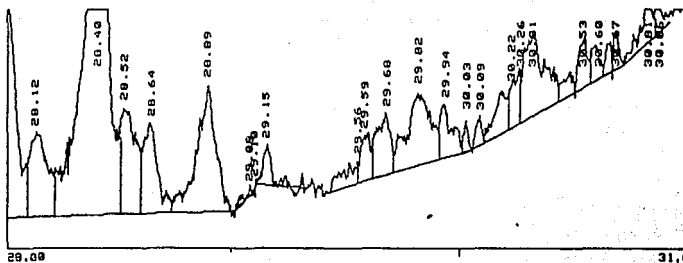


FILE 1	METHOD 0	RUN 33	INDEX 33	CH=	PS=1
PICO #	AREA %	t	AREA		
1	0.776	27.10	1224	01	
2	1.699	27.45	10727	01	
3	1.098	27.99	51117	01	
4	0.097	28.10	4886	02	
5	0.511	28.44	41659	02	
6	0.669	28.51	8471	02	
7	0.919	28.55	4606	02	
8	1.817	28.88	9264	02	
9	0.689	29.14	2868	02	
10	0.689	29.64	1066	02	
11	0.051	29.82	4814	02	

CROMATOGRAMA NO. 18

MUESTRA # 3
 LOTE 25
 TEJIDO CON 25 NG DE ZERANOL ESTANDAR

INYECCADO EL 09/10/88 10:52:23
 DISK FILE : 1041211.RAW
 ANCHURA DE PICO = 6
 DE
 ATENUACION = 2.0

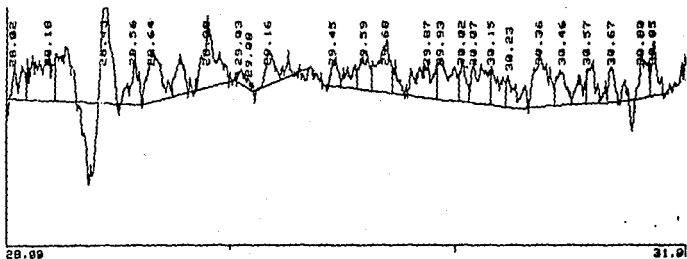


FILE	1	METHOD	0	RUN	36	INDEX	36
PICO #		CH=		PS=	1		
		AREA :	t		AREA		
1		1.219			239	01	
2		0.686			1347	01	
3		4.900			92	01	
4		1.741			108	01	
5		4.949			400	01	
6		4.677			800	01	
7		24.056			4721	01	
8		4.205			825	01	
9		4.438			1276	01	
10		6.507			114	01	
11		0.160			1454	61	
12		0.843					

CROMATOGRAMA NO. 19

SUSTRACCION SOBRE LA LINEA BASE
DEL CROMATOGRAMA NO. 19 RESPECTO
AL CROMATOGRAMA NO. 18

INYECCADO EL 09/18/83 13:51:23
DISK FILE: TENT77.RAA
ANCHURA DE PICO = 6
DE 7.8 H.
ATENUACION = 2.0

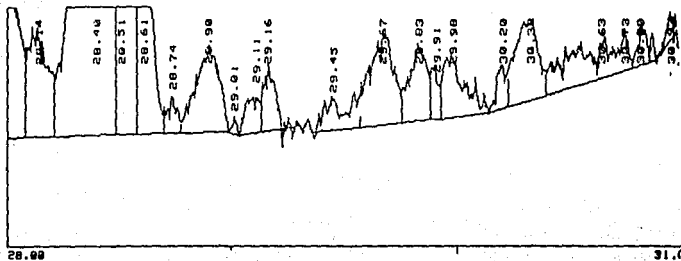


FILE	1	METHOD	0	RUN	39	INDEX	39	CH=	PS=	1
PICO	#	AREA %		c	AREA					
1		0.		27.17	650	01				
2		14.42	284	27.17	650	01				
3		14.42	284	27.17	650	01				
4		14.42	284	27.17	650	01				
5		0.001		27.17	650	01				
6		14.285		27.17	650	01				
7		0.		27.17	650	01				
8		0.001		27.17	650	01				
9		14.285		27.17	650	01				
10		0.		27.17	650	01				
11		14.285		27.17	650	01				
12		0.		27.17	650	01				
13		14.285		27.17	650	01				

CROMATOGRAMA NO. 20

MUESTRA # 4
 LOTE 25
 TEJIDO CON 25 NG DE ZERANOL ESTANDAR

INYECTADO EL 09/15/65 1:30:46
 DISK FILE: 104200.554
 ANCHURA DE PICO = 6
 DE
 ATENUACION = 2.0

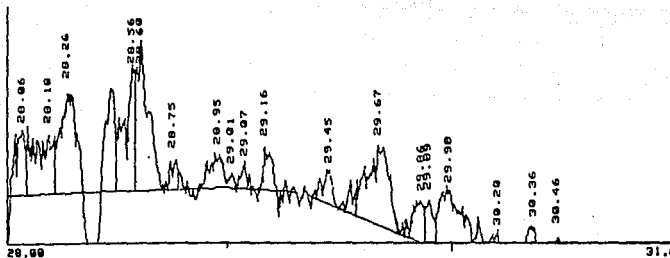


FILE	METHOD	RUN	INDEX	CH	PS=1
PICO #	AREA	t	AREA		
1	2.117	28.44	21.77		
2	0.4	28.51	7.18		
3	0.688	28.61	5.97		
4	0.712	28.74	7.68		
5	0.805	28.98	7.74		
6	18.463	29.01	7.96		
7	4.576	29.11	11.14		
8	6.648	29.16	15.51		
9	6.688	29.43	14.75		
10	0.719	29.67	7.74		
11	4.128	29.83	17.40		
12	0.125	29.91	9.28		
13	1.125	29.98	11.01		
14	1.618	30.20	15.15		
15		30.34	15.00		
16		30.63	15.00		
17		30.80	15.00		
18		30.90	15.00		
19		30.96	15.00		

CROMATOGRAMA NO. 21

SUSTRACCION SOBRE LA LINEA BASE
 DEL CROMATOGRAMA NO. 19 RESPECTO
 AL CROMATOGRAMA NO. 21

INYECTADO EL 09-18/88 14:46:4c
 DISC FILE 1K518.PAW
 ANCHURA DE PICO = 6
 DE 72.87
 ATENUACION = 2.0



FILE	1	METHOD	0	RUN	43	INDEX	43	CH
PICO	#	AREA %	t	AREA				
1	1	1.997	28.06	3259	0	0	0	
	2	1.003	28.18	1990	0	0	0	
	3	2.16	28.24	3349	0	0	0	
	4	4.671	28.58	3210	0	0	0	
	5	13.023	28.75	3207	0	0	0	
	6	11.697	29.01	1845	0	0	0	
	7	1.337	29.05	1784	0	0	0	
	8	6.781	29.07	3041	0	0	0	
	9	8.122	29.16	881	0	0	0	
	10	1.121	29.45	1216	0	0	0	
	11	1.877	29.67	2041	0	0	0	
	12	0.326	29.86	354	0	0	0	
	13		29.98	61	0	0	0	
	14		30.29		0	0	0	
	15		30.36		0	0	0	
	16		30.46		0	0	0	

CROMATOGRAMA NO. 22

8.7 Cálculos y Resultados
RESULTADOS DEL PRIMER ENSAYO

ng de zeranol en el estándar	=	100
Cromatograma No. 1		
Area del pico de zeranol en el estándar	=	1967
Cromatograma No. 1		
Area del pico de zeranol en la muestra # 3	=	760
Cromatograma No. 4		
Area del pico de zeranol en la muestra # 4	=	905
Cromatograma No. 6		

Sustituyendo en la ecuación 2

$$\begin{array}{l} \text{Cromatograma No. 4} \\ \text{ng de zeranol} \\ \text{en la muestra \# 3} \end{array} = \frac{100 \times 760}{1967} = 38.637$$

Sustituyendo en la ecuación 1

$$\begin{array}{l} \text{ppb de zeranol} \\ \text{en la muestra \# 3} \end{array} = \frac{38.637}{50 \times 0.9} = 0.85$$

Sustituyendo en la ecuación 2

$$\begin{array}{l} \text{Cromatograma No. 6} \\ \text{ng de zeranol} \\ \text{en la muestra \# 4} \end{array} = \frac{100 \times 905}{1967} = 46.009$$

Sustituyendo en la ecuación 1

$$\begin{array}{l} \text{ppb de zeranol} \\ \text{en la muestra \# 4} \end{array} = \frac{46.009}{50 \times 0.9} = 1.02242$$

RESULTADOS DEL SEGUNDO ENSAYO

ng de zeranól en el estándar = 50
Cromatograma No. 9

Area del pico de zeranól en el estándar = 1071
Cromatograma No. 9

Area del pico de zeranól en la muestra = 2706
Cromatograma No. 14

Sustituyendo en la ecuación 2

ng de zeranól en la muestra = $\frac{50 \times 2706}{1071}$ = 126.33

Sustituyendo en la ecuación 1

ppb de zeranól en la muestra = $\frac{126.33}{125 \times 0.9}$ = 1.1229

RESULTADOS DEL TERCER ENSAYO

ng de zeranól en el estándar = 25
Cromatograma No. 17

Area del pico de zeranól en el estándar = 762
Cromatograma No. 17

Area del pico de zeranól en la muestra = 653
Cromatograma No. 20

Area del pico de zeranól en la muestra = 354
Cromatograma No. 22

Sustituyendo en la ecuación 2

ng de zeranól = $\frac{25 \times 653}{762}$ = 21.42
en la muestra
3 lote 25

Sustituyendo en la ecuación 1

ppb de zeranól = $\frac{21.42}{25 \times 0.9}$ = 0.952
en la muestra
3 lote 25

Sustituyendo en la ecuación 2

ng de zeranól = $\frac{25 \times 354}{762}$ = 11.61
en la muestra
4 lote 25

Sustituyendo en la ecuación 1

ppb de zeranól = $\frac{11.61}{25 \times 0.9}$ = 0.516
en la muestra
4 lote 25

C O N C L U S I O N E S

El método presentado resulta adecuado para la determinación de 7-alfa-zearalanol en tejido orgánico, mediante el empleo de la técnica de Cromatografía de Gases con detector de captura de electrones. Indiscutiblemente -- puede ser incluido en los múltiples ensayos y controles que en este campo se han presentado, ya que el ensayo se realiza en corto tiempo además de ser sensible, exacto y confiable.

Por ser un método corto y sensible, la técnica se - facilita, pero no por eso dejará de recomendarse que la manipulación, el equipo y los reactivos se utilicen tal y como son descritas en la técnica logrando con ello reproducibilidad en el trabajo y por lo tanto buena calidad.

En relación a los otros métodos de análisis aquí -- descritos, se observa la gran diversidad de pruebas que existen para la identificación, caracterización y cuantificación de los agentes anabólicos. Es, sin embargo, la Cromatografía de Gases, el procedimiento más accesible, económico y confiable que existe al respecto en nuestro país.

Durante el trabajo experimental llevado a cabo, se estableció una recuperación mayor al 90% del estándar en la muestra, con ello se puede observar que la recuperación obtenida fué mayor a la esperada.

Hoy en día, se continúa la investigación de los agentes anabólicos, a través de pruebas experimentales que se llevan a cabo en diferentes Centros especializados. Estas investigaciones en algunos casos llevarán muchos años y - estarán motivadas por la gran importancia comercial que - estos compuestos tienen.

Hasta este momento todas las pruebas que se han presentado no demuestran ampliamente la inocuidad de este tipo de productos y representan un eventual riesgo para el consumidor humano a través de la cadena alimenticia, ya que el efecto causado por estos compuestos en el metabolismo de los animales empleados para pruebas, induce a pensar en un efecto mutagénico debido al exceso en la aplicación de estos compuestos, lo que significaría una alteración en la mencionada cadena alimenticia.

APENDICE A.- GLOSARIO

Alelo Una de las formas contrastantes de un gene.

Andrógeno Sustancia con actividad hormonal sexual masculina en los animales vertebrados.

Anticuerpo Globulina formada como una respuesta específica a sustancias de masa molecular elevada extraña al organismo.

Antígeno Sustancia que inyectada al hombre o a un animal estimula la producción de anticuerpos que reaccionan específicamente con la sustancia inyectada.

Cáncer Tumor maligno en general y especialmente formado por células epiteliales.

Carcinógeno Sustancia capaz de producir metástasis en el organismo.

Carcinoma Cáncer o tumor maligno constituido por células epiteliales polimorfas con tendencia a la infiltración de los tejidos próximos y a las metástasis.

Celulotóxico Que causa toxicidad a las células en general.

Citotóxico Que causa toxicidad a células de tejido.

Endógeno, metabolismo Los aminoácidos resultantes de las proteínas ingeridos son utilizados para la preparación y construcción de la proteína tisular degradada.

Endocrino Del griego endo, interno y de krinein, separar.

Enzima Proteínas que catalizan todas las funciones bioquímicas.

Epigénesis Formación gradual de un organismo nuevo a --- partir de materias simples no organizadas.

Esteroides Grupo de compuestos que desde el punto de vista químico poseen un sistema de anillo hidrogenado ciclo-pentano fenantreno.

Estrógeno Hormona del ovario y la placenta que estimula las formaciones y características sexuales secundarias en las hembras y cuya producción aumenta en el embarazo.

Exógeno, metabolismo Supone degradación oxidativa de aminoácidos de la dieta que no son necesarios para la síntesis de proteínas.

Farmacología Estudia los fármacos, su estructura química, su acción biológica y su aplicación terapéutica en el --- hombre.

Genoma Serie completa de factores hereditarios o genes, como los contenidos en una serie haploide de cromosomas.

Ginecomastía Hipertrofia de la mama masculina producida - por el excesivo desarrollo de sus componentes glandulares.

Histología Estudio de la composición y estructura microscópica de los tejidos.

Hormona Término para referirse a sustancias orgánicas - elaboradas en forma específica por las glándulas de secreción interna y que ejerce una influencia neta sobre las - funciones de células o sistemas sin que aporten caudales importantes de materia y energía.

Implante Se refiere a la inserción o injerto en los tejidos de un huésped o receptor.

Impotencia Falta de potencia o virilidad, incapacidad del varón para realizar un coito normal.

Inocuidad Que no daña, inocente, inofensivo.

Inocular Introducir el virus de un enfermo u otro material antigénico en el tejido subcutáneo, en un vaso sanguíneo o por aplicación sobre una superficie absorbente con fines curativos, profilácticos o experimentales.

Linfa Fluido tisular que está compuesto de agua, moléculas de proteínas, sales y otras sustancias.

Metabolismo Suma de cambios químicos que consuman la -- función nutritiva.

Mutación genética Proceso por medio del cuál se forman -- nuevos alelos de un gene.

Mutagénico Dícese de las sustancias o agentes inductores de mutaciones.

Neoplasia Masa anormal de tejido que prolifera sin relación de los tejidos normales y que es capaz de crecimiento independiente.

Oncogenicidad Producción de tumores

Teratogénesis química Sustancias que producen anomalías en el desarrollo fetal.

Toxicología Estudia los efectos dañinos de los compuestos químicos que afectan a los seres vivos.

Translocación genética Desplazamiento de un segmento de cromosoma hacia otra parte de un cromosoma homólogo o -- también al interior de un cromosoma no homólogo.

Tumor Crecimiento excesivo patológico en tejidos, de -- carácter no inflamatorio.

Uterotrópico Que tiene afinidad por el útero o ejerce -- su influencia sobre el mismo.

<u>BSA</u>	N,O-Bistrimethylsilylacetamida
<u>BSTFA</u>	N,O-Bistrimethylsilyltrifluoacetamida
<u>DMS</u>	Dimethylsilyl (derivativo)
<u>TMCS</u>	Trimethylchlorosilano
<u>TMSI</u>	Trimethylsilylimidazol

BIBLIOGRAFIA

1. Korach, K.S., McLaughlan, J.A., "The role of the - estrogen receptor in DES toxicity" Arch. Toxicol. (Suppl.) 8, 33-42. (1985).
2. "USDA find no Zeranol, DES in Puerto Rico meat - poultry supplies". Feedstuffs. 58, (22), 3 (1986).
3. Lesmeister, J.L., Ellington, E.F. "Anatomical and reproductive effects of prepuberal estrogen progestogen administration in beef Heifers". Abstracts -- 70th annual meeting 1978, 266-267 Am. Soc. of Animal Science.
4. Hoffmann, V.B., "Anabole Substanzen-Definition und chemische Strukturen". Aus dem Institut für Physiologie der Süddeutschen Versuchs. München 1975, 7-9.
5. Bancos de información del Centro de Investigación Científica y Humanística:
 - File 155: MEDLINE 66-89/feb.
 - File 50: CAB ABSTRACTS 1984 -88/dec.
 - File 50: CAB ABSTRACTS 1972 -1983
 - File 5: BIOSIS REVIEW 69 -89/feb.
 - File 312: CA SEARCH 1987 -1989
 - File 304: MERCK INDEX ON LINE
 - File 229: DRUG INFORMATION Full text
 - File 52: TSCA CHEMICAL SUBSTANCES INVENTORY (may 86)
6. Ingerowski, G.H., Scheotwinkel-Reich, M.S., "Mutagenicity studies on veterinarian Anabolic Drugs -- with the Salmonella/microsome test". Mutat. Res. 91 (2), 93- 98. (1981).
7. Hidy, P.H., Balwin, R.S., Greasha, R.L., Keith, C.L., "Zearalenone and some derivatives: Production and -- Biological activities". Adv. Appl. Microbio. 22, 59-82. (1977).
8. Ronald, C.S., "Micotoxins and N-nitroso Compounds Environmental. Vol. 2. "Zearalenona and its derivatives. Ed. CRC Press.
9. Hurd, R.N. Structure Activity Relationships in -- zearalenone, in Mycotoxins in Human and Animal health. Rodricks, J.V., Hesseltine, C.W., Mehlman, M.A., Eds., - Pathoox, Park Forest South, III., (1977), 379.
10. Shipenhandler, M.T., "Chemistry of Zearalenone and some of its derivatives", Heterocycles, 3, 471.(1975).

11. Bollinger, G., Tamm, C., Vier Neue Metabolite von - Giberella zeae: 5-firmyl-zearalenon, 7'-Dehidro-zearalenon, 8'-hidroxy-und-8'-epi-hidroxy-zearalenon. Helv. Chim. Acta., 55, 3030. (1972).
12. Novelli, A., Ciencia 2, (1) 12-19. (1941).
13. Hernández, A.F., "Síntesis de derivados del estilbeno y compuestos relacionados". TESIS UNAM, 1985.
14. Buu-Hoi, N.P., Chim. 4 (5), 327-329. (1969).
15. Niederl, J.B., Ziering, A.J., Jour. Am. Chem. Soc. 64, 885. (1942).
16. Doré, et.al. Eur. J. Med. chim. Ther. 10 (1) --- 47-54 (1975)
17. Velluz, M, R. Acad. Sci. 257-569 (1963).
18. Ames, B.N., Duston, G.Y., Lee, F.D., "Carcinogenes - and mutagens a simple test system combining liver ho mogenate for activation and bacteria for detection". Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70 2.281-2.285. (1973).
19. Wehner, F.C., Marasas, W.F.O., Thiel, P.E., "Lack of mutagenicity to salmonella Typhimurium of some Fusarium Micotoxines" Applied. and Envir. Microbiol. ap. vol 35-N, 4, 659-682. (1978).
20. Kuczac, M.H., Benson, P.M., Heatl, M., Hayes, W., "Eva luation of the mutagenic potential of micotoxins -- using salmonella Typhimurium and Saccharomyces cerevisiae". Mut. Res. (1978).
21. Uano, Y., Kubota, K., Ito, T., Nakamura, Y., "Mutage nicity of cancirogenic mycotoxins in salmonella Ty-- phimurium". Cancer Res. 38, 536-542. (1978).
22. Bartholomew, R.M., Ryan, D.C., "Lack of mutagenici ty of some phitoestrogens in the salmonella/mamalian microsome assay" Mutat. Res. 78, 317-321. (1980).
23. Cifone, M. 1983. Unpublished data report by Liton Biotechnics Inc. Kensington, Maryland USA.
24. Shelby, M.D., Stasiewicz, S., "Chemical Showing no - evidence of carcinogenicity in Long-Term, two species rodent studies: The need for Short-Term test data". Envir. Mutag. 6, 871-878. (1984).

25. Cimino, M.C. (1983), Ivett, J.K. (1985), "Mutagenicity evaluation of zeranol and zearalenone and taleranol in the mouse bone marrow cytogenetic assay". Report from Litton Biotechnics Inc. Kensington, Maryland USA.
26. Williams, G. (1983-1985), "The hepatocyte primaty culture (DNA) repair assay on compound zeranol". Report from Naylor Daria Inst. For Disease Prevention. American Health Foundation. Dana Road I, Valhalla, - N.Y. (USA).
27. Ronto, G., Tarjan, I., Gaspar, S. (1985), "A rapid - and quantitative mutagenicity screening test". Submitted to Mutation Research.
28. Barraud, B., Lugnier, A., Dirheimer, S., "In vivo co valent binding to rat liver DNA of trenbolone as com pared to 17 β -estradiol, testosterone and zeranol". - Symposium on anabolic in animal production. Public - Health Aspects, Analytic methods and Regulation. Held at office International des Epizooties, Paris, France. February 15-17 pp 325-338. (1983).
29. Farber, J.L., Crawford, L.U., USA regulations. Anabolic in animal production symposium held at OIE Paris, France. February, 15-17 (1983) pp. 509-514.
30. Becci, P., Voss, K., Hess, G., Gallo, A., "Long term -- carcinogenicity and Toxicity study of zearalenone in rats FDRL wistar". J. Appl. Toxicol. 2, 5, 247 (1982).
31. Richold, M., "The genotoxicity of trenbolone. A synthetic steroid". Arch. Toxicol. 61 (4), 249-258. -- (1988).
32. Metzler, M., "Metabolic Activation of Xenobiotic -- Stilbene Estrogens". Fed. Proc., 46(5): 1855-7 (1987).
33. Liehr, J.G., Fang, W.F., Sirbasku, D.A., "Carcinogenicity of catechol estrogens in syrian hamster" -- J. Steroid Biochem. 24(1). 353-356. (1986).
34. Korach, K.S., McLachlan, J.A., "The role of the -- estrogen receptor in Diethylstilbestrol Toxicity", -- Arch. Toxicol. (Suppl) 8, 33-42, (1985).
35. Von Borstel, R.C., Metha, R.D., "Nonmutagenic Carci nogens", Prog. Clin. Biol. Res., 109, 47-57, (1982).

36. Scheutwinkel, M.V., Hude, W., Basler, A., "Studies on the genotoxicity of the anabolic drugs trenbolone and zeranol" Arch. Toxicol. 59 (1), 4-6, (1986).
37. Federal Register (USA) vol. 34-N. 219 Nov. 14 - 1969. (135b.12 Zearalanol)
38. Verbeke, R., "Sensitive multi-residue method for detection of anabolics urine and tissue of slaughtered animal". J. Chromat. 177, 69-84. (1979).
39. Worber, B., Woller, R., Chulamorked, T., "Detection of estrogenic-like compounds by thinlayer chromatograph" J. Chromatography 156, 105-210, (1978).
40. Oehrie, K.L., Hoffman, B., "Determination of trenbolone and trenbolone acetate by thin-layer chromatography in combination with fluorescence colour reaction" J. Chrom. 114, 244-246. (1975).
41. Heyong, J.K., Allen, C.R., Stipanovic, R.D., "Rapid separation and identification of urinary metabolites of zeranol by HPLC-UV spectrophotometry" J. Agric. Food Chem. 34. 312-315. (1986).
42. Frischkorn, C.G.B., Obst, I.M., "Der simultane ppm-nachweis des anabolwirkenden zeranol and seins metabolites zearalanon in fleis mittles hochauflosen der flussigkeitschromatographie (HPLC)" Z. Lebensm. Unters. Forsh. 167, 7-10. (1978).
43. Maysinger, D.C., Wolf, W., "Preparation and High Performance Liquid Chromatography of Iodinated Diethylstilbestrols and some related steroids". J. Chromatography 130, 129-138. (1977).
44. Frischkorn, C.G.B., Frischkorn, H.E., "Investigation of anabolic drugs in athletics and cattle feed". J. Chromatography, 151, 331-338. (1978).
45. Dixon, S.N. Radioimmunoassay of the anabolic agent zeranol I. Preparation and properties of a specific antibody to zeranol. J. Vet. Pharmacol Ther. 3, -- 177-181. (1980).
46. Stan, H.J., Abraham, B., "Determination of residues of anabolic drugs in meat by gas chromatography-mass spectroscopy" J. Chromatography. 195. 231-241 (1980)

47. Laitem, L.P.G., Bello, I., "Stable derivatives for - the gas chromatography determination of synthetic -- stilbene residues in meat, and organs of treated cattle at the subper billion (10^7) levels" J. Chrom. 156, 267-273 (1978).
48. Martin, A.J., Syngé, R.L.M., Biochem. J., 35, 1358. (1941).
49. James, A.T., Martin, A.J., Biochem. J., 50, 679-690 (1952).
50. Grob, R.L., (Ed), Chromatographic Analysis of the Environmental. Dekker, N.Y. (1975).
51. Cook, R.H., Stoffer, R.R., "Analysis of Zeranol and Lysocellin by Capillary Gas Chromatography-ion trap-detector". J. Chrom. 7. 15-16. (1985).