



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
AGRÍCOLAS

CAMPUS TABASCO

PROGRAMA PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

**DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE CLEMBUTEROL EN CARNES
DE BOVINO COMERCIALIZADAS EN DOS MUNICIPIOS DEL
ESTADO DE TABASCO**

MANUEL FABIAN OSEGUERA SOBERANO

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

H. CÁRDENAS, TABASCO, MÉXICO

2017



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas
Campeche-Córdoba-Montecillo-Puebla-San Luis Potosí-Tabasco-Veracruz

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe Manuel Fabian Oseguera Soberano, alumno de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta Institución, bajo la dirección del Profesor Jesús Alberto Ramos Juárez, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis: Determinación de residuos de clenbuterol en carnes de bovino comercializadas en dos municipios del estado de Tabasco y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

H. Cárdenas, Tabasco, a 21 de julio de 2017.

Firma

Vo. Bo. Profesor Consejero
Dr. Jesús Alberto Ramos Juárez

La presente Tesis titulada: “**Determinación de residuos de clembuterol en carnes de bovino comercializadas en dos municipios del estado de Tabasco**” realizada por el alumno **Manuel Fabian Oseguera Soberano**, bajo la dirección del **Consejo Particular** indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

EN PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



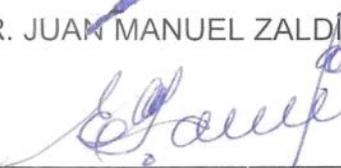
DR. JESÚS ALBERTO RAMOS JUÁREZ

ASESOR



DR. JUAN MANUEL ZALDÍVAR CRUZ

ASESOR



DR. ENRIQUE SAURI DUCH

ASESORA



DRA. ALEIDA SELENE HERNÁNDEZ CAZARES

H. CÁRDENAS, TABASCO, MÉXICO A 21 JULIO DE 2017

DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE CLEMBUTEROL EN CARNES DE BOVINO COMERCIALIZADAS EN DOS MUNICIPIOS DEL ESTADO DE TABASCO

Manuel Fabian Oseguera Soberano, MC.

Colégio de Postgraduados, 2017

RESUMEN

El clenbuterol es un compuesto utilizado ilegalmente en la producción animal como promotor de crecimiento, pertenece a la familia de los agonistas β -adrenérgicos. Es usado para el tratamiento de algunas enfermedades respiratorias en caballos, su utilización en dosis superiores a las terapéuticas, ocasiona cambios en la composición de la canal de los animales, lo que resulta en un aumento en la masa muscular y una disminución en el contenido de grasa, debido a esta característica se le denomina agente repartidor de energía. La administración prolongada del clenbuterol en animales, resulta en la acumulación de residuos en tejidos. La presencia de residuos de clenbuterol en tejidos destinados a consumo humano representan un riesgo para la salud de los consumidores, debido a sus efectos tóxicos en el sistema nervioso y cardiovascular. La ingesta de tejidos contaminados con clenbuterol ha ocasionado casos graves de intoxicación, por lo que se ha limitado su uso únicamente a fines terapéuticos. Sin embargo, se ha documentado la existencia de residuos de clenbuterol en carne e hígado de bovino en diferentes ciudades de México. El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de residuos de clenbuterol de la carne de bovino que se comercializa en dos municipios del estado de Tabasco, México. Las muestras se obtuvieron de dos tipos de establecimientos: carnicerías y supermercados, un total de 36 muestras de carne fueron recolectadas. El análisis de las muestras se realizó por medio de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC-UV). El 54% de las muestras analizadas, resultó positivas al análisis de clenbuterol en niveles superiores a los establecidos por el Codex Alimentarius.

Palabras Clave: residuos, β -agonistas, bovino, carne, calidad.

CLEMBUTEROL RESIDUES IN BOVINE MEAT MARKETED IN TWO MUNICIPALITIES OF THE STATE OF TABASCO, MÉXICO

Manuel Fabian Oseguera Soberano, MC.

Colegio de Postgraduados, 2017.

ABSTRAC

Clenbuterol is a drug used illegally in animal production as growth promoter. It's a adrenoreceptor β_2 -agonists use in veterinary medicine as bronchodilator and tocolytic in horses, If administered at concentrations highest than the therapeutic dose, it can result in carcass meat with lower fat tissue and increased muscle growth, by this property is denominated as energy repartitioning agent. As result of prolonged treatment with clenbuterol in animals, its results in tissue accumulation. Meat products obtained from treated animals may pose a potential risk for consumer health, due to its toxic effects on nervous and cardiovascular system. Consumption of meat products contaminated with clenbuterol residues have caused several outbreaks of food poisoning, therefore clenbuterol is only allowed for therapeutic use. However, the existence of clenbuterol residues in bovine liver and meat has been documented in different cities of Mexico. The aim of the study was to evaluate clenbuterol residues in meat beef commercialized in two municipalities of the state of Tabasco, Mexico. Samples were obtained from two types of establishments: butchers and supermarkets, 36 meat samples were collected. Samples were analyzed using High Performance Liquid Chromatography (HPLC-UV). The 54% of the samples tested were positive for clenbuterol at higher concentrations than those established by the Codex Alimentarius.

Key words: residues, β -agonist, bovine, meat, quality.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico para realizar mis estudios de maestría.

Al Colegio de Postgraduados Campus Tabasco por permitirme ser parte de su comunidad y brindarme todas las facilidades necesarias para realizar esta investigación.

A los integrantes de mi consejo particular, en especial a los doctores Juan Manuel Zaldívar Cruz y Jesús Alberto Ramos Juárez por haberme aceptado como tesista y por haber contribuido en mi formación académica.

Al Dr. Enrique Sauri Duch y amigos del Instituto Tecnológico de Mérida, por su amistad, tiempo y apoyo brindado durante mi estancia en Mérida.

A mis Amigos y compañeros del Colegio de Postgraduados que me brindaron su amistad, apoyo y que estuvieron conmigo durante este proceso.

A Sonia, a quien amo, admiro y respeto, quien ha sido una excelente compañera y me ha dado su apoyo incondicional, gracias por creer en mí y estar siempre conmigo.

A mis padres por sus palabras de aliento, gracias por apoyarme y confiar en mí.

A TODOS, MUCHAS GRACIAS.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. General	3
2.2. Específicos.....	3
CAPITULO 1- USO DEL CLEMBUTEROL EN LA PRODUCCIÓN ANIMAL.....	4
1.1. INTRODUCCIÓN	5
1.2. GENERALIDADES.....	6
1.3. USO CLÍNICO Y DOSIS	6
1.4. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS AGONISTAS β -ADRENERGICOS	7
1.5. EFECTOS FISIOLÓGICOS Y MODIFICACIÓN DE LA CANAL EN ANIMALES TRATADOS	7
1.6. ADSORCIÓN Y ELIMINACIÓN DEL CLEMBUTEROL:	10
1.7. ACUMULACIÓN EN TEJIDOS.....	11
1.8. NORMATIVA EN MÉXICO Y EL MUNDO	15
1.9. EFECTOS SECUNDARIOS EN HUMANOS.....	16
1.10. CASOS DE INTOXICACIÓN	17
1.11. CONCLUSIONES	19
1.12. LITERATURA CITADA	20
CAPITULO 2. - DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE CLEMBUTEROL EN CARNES DE BOVINO COMERCIALIZADAS EN UN ESTADO DEL SURESTE DE MÉXICO. ...	28
2.1. INTRODUCCIÓN	30
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS	32

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
2.4. CONCLUSIONES	40
2.5. LITERATURA CITADA.....	41

LISTA DE TABLAS

Cuadro 1.1. Distribución de los subtipos de receptores	5
Cuadro 1.2. Selectividad del clembuterol	9
Cuadro 1.3. Permanencia estimada de residuos de clembuterol en tejidos después de suspenderse en rumiantes.	12
Cuadro 1.4. Límite máximo de residuos de clembuterol en diferentes tejidos	16
Cuadro 1.5. Residuos de clembuterol asociados a casos de intoxicación en el mundo.	17
Cuadro 1.6. Residuos de clembuterol encontrados en diferentes tejidos en varias ciudades de México.....	18
Cuadro 2.1. Concentraciones de clembuterol en muestras analizadas en el municipio de Huimanguillo, Tabasco.....	34
Cuadro 2.2. Concentraciones de clembuterol en muestras analizadas en el municipio de Cárdenas, Tabasco.....	35
Cuadro 2.3. Muestras contaminadas por municipio.	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Concentración de clembuterol en varios tejidos de cabra.....	13
Figura 2.1. Porcentaje de muestras contaminadas con clembuterol por municipio.....	36

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Uno de los principales problemas en muchos países, es el suministro de alimentos inocuos y de calidad, suficientes para satisfacer las necesidades de una población en constante crecimiento. Para satisfacer esta demanda, es necesario incrementar la producción de alimentos por animal y por unidad de superficie en las áreas de producción comercial.

Mejorar el crecimiento de los animales que producen carne destinados al consumo humano con el fin de reducir los tiempos de engorda y obtener mayores beneficios económicos es uno de los retos de la ganadería bovina. Se han seleccionado razas que poseen mejor potencial de crecimiento con dietas adecuadas, también se han utilizado aditivos para mejorar el uso de forrajes de baja calidad nutricional, prevenir enfermedades o bien, mejorar la eficiencia en la producción de los animales. Las sustancias que se utilizan con este fin se denominan promotores de crecimiento y se agrupan en una amplia gama de sustancias naturales y sintéticas que son administradas durante el desarrollo de los animales en la fase de producción, a fin de acelerar dichos procesos y mejorar los rendimientos, bien sea disminuyendo el tiempo de crecimiento o aumentando la síntesis de proteína.

Actualmente, se ha puesto mayor interés en la composición de la canal con un menor contenido de grasa y más músculo, ya que un mayor número de consumidores está dispuesto a pagar por este tipo de productos, debido a que la grasa generalmente se asocia a la aparición de ciertas enfermedades.

Los agonistas β -adrenérgicos son sustancias promotoras de crecimiento, mejoran la tasa de crecimiento y la eficiencia de la alimentación, al mismo tiempo, la composición de la canal se altera, reduciendo la acumulación de grasa neta y aumentando el contenido de proteína, razón por la cual también son llamados “agentes repartidores”. Estas sustancias, pueden ser útiles para satisfacer la demanda de los consumidores interesados en un producto más magro.

El uso de los β -adrenérgicos es común en algunos países productores de carne para mejorar la producción y las características de la canal. Algunos agonistas β -adrenérgicos como el Zilmax® (Clorhidrato de Zilpaterol), están permitidos en algunos países como Estados Unidos y México, sin embargo, su uso está prohibido en la Unión Europea. Por otro lado, el uso del agonista β -adrenérgico clenbuterol está prohibido en la mayoría de los países, incluido México, debido a los efectos tóxicos asociados a su ingesta.

El clenbuterol puede ser utilizado para fines clínicos y veterinarios para el tratamiento de algunas enfermedades respiratorias. Sin embargo, la administración prolongada conduce a la acumulación de residuos en la canal. La ingesta de carne contaminada representa un riesgo potencial para la salud en los humanos, debido a que ocasiona efectos secundarios en el sistema nervioso y cardiovascular. Por lo tanto, el monitoreo de residuos es necesario para detectar medicamentos anabólicos y veterinarios.

2. OBJETIVOS

2.1. General

Determinar y cuantificar la presencia de residuos de clenbuterol en carne de bovinos comercializada en dos municipios de Tabasco.

2.2. Específicos

1. Montar y estandarizar una técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) para la determinación del clenbuterol en muestras de carne.
2. Analizar muestras de carne de bovino por medio de HPLC para la determinación y cuantificación de clenbuterol.

CAPITULO 1- USO DEL CLEMBUTEROL EN LA PRODUCCIÓN ANIMAL

Oseguera-Soberano M. F.,¹ Ramos-Juárez J. A.,¹ Zaldívar-Cruz, J. M.,¹ Sauri-Duch E.²
Hernández-Cazares A.S³

¹ Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco. Periférico Carlos A. Molina s/n, C.P 86500. H. Cárdenas, Tabasco, México.

² Instituto Tecnológico de Mérida. Av. Tecnológico s/n km 4.5, C.P 97118. Mérida, Yucatán, México

³ Colegio de Postgraduados, Campus Córdoba. Carretera Federal Córdoba-Veracruz Km 348, C.P 94946. Amatlán de los Reyes, Veracruz, México.

*Autor de correspondencia: zaldivar@colpos.mx

Resumen

El clenbuterol es un compuesto que pertenece a la familia de los β -agonistas, es utilizado para el tratamiento del asma y otras enfermedades respiratorias en humanos. Su uso veterinario esta aprobado para el tratamiento en las obstrucciones de las vías respiratorias en caballos. Su capacidad para aumentar el tejido magro, disminuir la grasa y aumentar la eficiencia de crecimiento de los animales ha ocasionado que se administre de forma ilegal en dosis superiores a la terapéutica, en animales de granja destinados a consumo humano. Tiene mayor biodisponibilidad y una vida media más larga en comparación con otros compuestos de su familia, se elimina principalmente por vía renal, no obstante, se acumula en diversos tejidos. Los residuos de este farmaco presentes en tejidos animales, pueden representar un riesgo para la salud de los consumidores ya que tiene efectos secundarios en el sistema nervioso y cardiovascular de las personas, lo que ha conducido a casos de intoxicación en humanos después del consumo de tejidos contaminados.

1.1. INTRODUCCIÓN

En la producción animal se utilizan ilegalmente diferentes compuestos con la finalidad de lograr un mayor crecimiento del animal en el menor tiempo posible, con el ahorro económico que esto puede representar. Diversas sustancias como estrógenos, andrógenos, β -agonistas son utilizados con estos fines, su administración, da lugar a un mayor aumento de peso, en menor tiempo.

Los agonistas adrenérgicos son compuestos capaces de unirse a un receptor e imitar la actividad de un mediador natural biológico (Gomperts *et al.*, 2009). Johnson *et al.* (2014) mencionan que los agonistas β -adrenérgicos (β -AA) son moléculas orgánicas que actúan uniéndose a los receptores β -Adrenérgicos (β -AR), los cuales están presentes en la superficie de casi todo tipo de células en los mamíferos (Cuadro 1.1). Esos receptores son estimulados fisiológicamente por la epinefrina (Adrenalina) y la norepinefrina los cuales pertenecen a un grupo de hormonas y neurotransmisores conocidos como catecolaminas (Hebert *et al.* 2015), una respuesta fisiológica es producida cuando un β -AA se une a uno de estos receptores.

Cuadro 1.1. Distribución de los subtipos de receptores

Especie	Tejido	Abundancia de subtipo de β-AR
Ratas	Corazon	>90% β_1
	Músculo esquelético	>85% β_2
	Tejido adiposo	>90% β_3
Cerdos	Corazon	>65% β_1
	Pulmón	>67% β_1
	Tejido adiposo	>73% β_1 , 20% β_2 , 7% β_3
Ganado	Músculo esquelético	>99% β_2
	Tejido adiposo	>90% β_2
Humanos	Pulmón	>27% β_1
	Hígado	>20% β_1
	Tejido adiposo	>35% β_1 , 65% β_2

1.2. GENERALIDADES

El clenbuterol [benzil alcohol, 4-amino- α - (t-butilamino) metil-3, 5 dicloro]; es un compuesto que pertenece a la familia de los β_2 -agonistas adrenérgicos (Choo et al. 1992). El clenbuterol ($C_{12}H_{19}Cl_3N_2O$) es un polvo cristalino, de peso molecular 313.65106 [g/mol] y punto de fusión 173 °C, es insoluble en disolventes no polares y fácilmente soluble en solventes polares como metanol o agua (Smith 1998). Es conocido principalmente debido a sus efectos anabólicos en el ganado bovino.

1.3. USO CLÍNICO Y DOSIS

El clenbuterol y otros β_2 -agonistas tienen la capacidad de relajar el músculo liso bronquial y el útero, por esta razón es usado en medicina veterinaria. En caballos se usa para el tratamiento de algunas enfermedades respiratorias como en el caso de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), también ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de bronquitis y neumonía (Kearns and McKeever 2009). También se usa como agente tocolítico para retrasar el inicio del parto en animales de granja (Robison 2000). La dosis farmacéutica administrada para el tratamiento de enfermedades respiratorias es de 0.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ sin embargo se permite una dosificación gradual hasta una dosis máxima de 3.2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Kearns and McKeever 2009). En humanos ha sido usado para el alivio de broncoespasmos, asma y otras enfermedades respiratorias. La dosis terapéutica típica del clenbuterol en humanos es 5-20 μg por vía oral dos veces al día y una dosis máxima de hasta 40 μg , para tratar el asma se emplea una dosis oral de 20 a 40 μg , dos veces al día (Hoffman et al. 2001).

Debido a sus efectos anabólicos y lipolíticos confirmados en animales, y supuesta capacidad para aumentar la fuerza/tamaño del músculo esquelético, a la vez que reduce la grasa corporal en los seres humanos, ha sido abusada por los atletas, a menudo a dosis muy superior a los utilizados terapéuticamente (Daubert et al. 2007). La dosificación utilizada no está basada en ensayos clínicos y si, en experiencias personales, en estos casos, las dosis utilizadas varían de 20 a 200 μg de 1 a 3 veces al día (Hoffman et al. 2001).

Para conseguir un efecto repartidor en animales se requiere dosis de 10 a 20 veces la dosis terapéutica respiratoria y por periodos de tiempo mas largos, por lo que es usado ilegalmente en muchos países como promotor de crecimiento en la producción animal (Ricks et al. 1984)(Ortiz et al. 2000). Se ha reportado que el clenbuterol puede alterar el rendimiento en caballos de carreras cuando es administrado en dosis terapeutica, incluyendo efectos anabólicos. Los caballos que han recibido una administración crónica de clenbuterol han demostrado disminuciones significativas en el porcentaje de grasa y masa grasa, y un aumento en la masa libre de grasa (Bishop et al. 2015).

1.4. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS AGONISTAS β -ADRENÉRGICOS

Los agonistas β -adrenérgicos (β -AA) mejoran el crecimiento del músculo con una pequeña reducción en la formación de la grasa, a nivel celular, los efectos son medidos por la modificación de señales metabólicas específicas en las células del músculo y la grasa, resultando en un incremento de nutrientes dirigidos hacia el crecimiento del músculo. La generación de estas señales se lleva a cabo por la unión de β -agonistas con receptores específicos (receptores β -adrenérgicos). Cuando los β -agonistas se unen a esos receptores en la superficie de las células grasas, señales bioquímicas son producidas dentro de la célula, para disminuir la síntesis de grasa e incrementar su degradación, resultando en una menor deposición de grasa y un incremento sustancial en la tasa de deposición y síntesis de proteína muscular (Moody, Hancock, and Anderson 2010).

1.5. EFECTOS FISIOLÓGICOS Y MODIFICACIÓN DE LA CANAL EN ANIMALES TRATADOS

Actualmente se sabe que el clenbuterol tiene un efecto anabólico y efectos repartidores en la canal de diversos animales de granja, y se ha probado su efectividad en vacas, borregos, cerdos y pollos. El fármaco produce diversos efectos, como un incremento significativo en el peso corporal y contenido de proteína, así como cambios en la eficiencia alimenticia, gasto de energía y cambio en la composición de la canal, los cuales son debidos principalmente al incremento de proteína corporal (los efectos más obvios del tratamiento con clenbuterol son en el músculo esquelético) y a una disminución en

el contenido de grasa (Sillence et al. 1993); (Cardoso and Stock 1996). El efecto repartidor del clenbuterol se limita únicamente a la composición corporal, la producción de leche y la composición nutricional (proteína, grasa, lactosa) de la misma, no se ven afectadas por la administración prolongada de clenbuterol (Stoffel and Meyer 1993).

El ganado tratado con clenbuterol aumenta la deposición de músculo a expensas de la deposición de grasa, mejorando el rendimiento de la canal debido a que una mayor cantidad de nutrientes son dirigidos hacia la formación de músculo. Los niveles de grasa pélvica se reducen hasta en un 42% (20-42%) y la proteína aumenta entre un 11-16% (Ricks et al. 1984). A pesar de eso, no se observa un aumento en la ganancia diaria de peso o en el consumo diario de alimento, lo cuales no se ven afectados por el tratamiento con clenbuterol (Baker et al. 1984) (Cardoso and Stock 1996). Sin embargo, Rothwell y Stock (1987), señalan que el clenbuterol aumenta la ganancia de peso corporal pero la magnitud de ese incremento es usualmente más pequeña que los cambios en el contenido de proteína muscular debido a una disminución simultánea en la masa del tejido adiposo. Algunos órganos tienden a cambiar su tamaño por el tratamiento con clenbuterol, el contenido de proteína en el corazón se incrementa en respuesta al tratamiento con β_2 -agonistas, no obstante, este aumento es asociado a un incremento en la tasa cardíaca. Aunque se ha reportado una reducción en los pesos del hígado y de otros órganos de los animales que han sido tratados con clenbuterol, este efecto se observa solo en animales con restricción alimenticia (Sillence et al. 2000).

(Mersmann 1995), menciona que el grado en que se observa cada uno de estos efectos varía considerablemente entre especies, pero se observa una mejor respuesta en ovinos y bovinos que en cerdos y una menor respuesta en aves (pavos y pollos), lo que puede explicarse por diferencias entre las especies o diferencias en la distribución y respuesta de los subtipos de receptores β -adrenérgicos entre tejidos (Cuadro 1.2), ya que los efectos anabólicos del clenbuterol en el músculo esquelético son mediados por la activación de los β_2 -adrenoreceptores (Choo et al. 1992), no obstante, se ha observado que la respuesta de rendimiento al tratamiento, se mejora con la madurez de los animales y que los animales más pesados responden mejor que los animales de peso más ligero, razón por la cual es utilizado en la etapa final de la engorda de ganado (Baker et al.

1984). Además, las hembras tienen una mejor respuesta con mayor ganancia de proteína mediante la reducción de la grasa abdominal, factor que puede ser atribuido al hecho de que las hembras tienen mayor tendencia a acumular grasa que los machos (Rehfeldt *et al.*, 1997).

Cuadro 1.2. Selectividad del clenbuterol

	Especie	Subtipo de Receptor
Clenbuterol	Ratas, ratones	β_2
	Cerdos	Parcialmente β_2
	Ganado	β_2

Para inducir a los efectos anabólicos del clenbuterol y otros β -agonistas, se requiere su administración continua, el ganado vacuno se vuelve rápidamente insensible a los efectos de este tipo de fármacos y no se produce un aumento adicional de la masa muscular en los rumiantes más allá de 2 o 3 semanas de tratamiento con β -agonistas, esto se ha correlacionado con una reducción en la densidad de los β -AR (regulación negativa) en el músculo esquelético, la cual puede ser tan grande como el 50% (Pringle *et al.* 1993); (Sillence *et al.* 1993) por lo que el efecto del clenbuterol dependerá de la especie estudiada, el sexo y la duración del tratamiento.

El clenbuterol puede ayudar a conservar las proteínas del cuerpo a expensas de otros tejidos, incluso cuando la proteína dietética y la energía son limitadas (Rothwell and Stock 1987). En animales con restricción alimenticia, sus efectos son particularmente notables. Las acciones anabolizantes del clenbuterol pueden ser sostenidas e incluso más marcadas en animales alimentados de forma restrictiva, incrementando el crecimiento muscular, el aumento de peso y la eficiencia alimenticia (Choo, Little, and Rothwell 1990) (Cardoso and Stock 1996); (Cardoso and Taveira 2002) (Sillence *et al.* 1993) aunque el ganado con déficit de proteína pierde más peso vivo que los animales alimentados de forma adecuada, esa pérdida de peso vivo no se ve reflejada en la canal de los animales, pues el peso de la canal aumenta junto con el contenido de proteína (Rothwell and Stock 1987). Según Sillence *et al.*, (2000) esta pérdida de peso se puede explicar en parte, a una reducción de la grasa de la canal, pero principalmente debido a una reducción en la masa de las vísceras y/o piel, no obstante cuando el ganado recibe

una dieta adecuada, el aumento de la masa muscular suele ser igual o superior a la pérdida de vísceras y grasas, de modo que el peso vivo se mantiene o aumenta.

El clenbuterol puede ser administrado por vía oral o bien incorporada en el agua o el alimento de los rumiantes, gracias a su solubilidad en el agua es muy fácil incorporarla por medio de los sistemas de bombeo que suministran los abrevaderos, pudiéndose controlar en los sistemas más tecnificados la dosis de acuerdo al tamaño del animal, edad, alimentación y consumo de forraje (Ramos et al. 2009).

1.6. ABSORCIÓN Y ELIMINACIÓN DEL CLEMBUTEROL:

La absorción de la mayoría de los β -AA es rápida en animales de laboratorio, humanos y ganado. Los niveles plasmáticos máximos ocurren dentro de 1 a 3 h después de la administración oral en seres humanos (Morgan, 1990), y se observa un patrón similar en animales de granja.

Caballos: Después de una dosis oral terapéutica baja (0.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$) la vida media plasmática del clenbuterol es de 10.4 h (Knych et al. 2014) y los niveles plasmáticos más altos se alcanzan dos horas después de su administración. En concentraciones más altas, la vida media del clenbuterol aumenta (Kallings et al. 1991). Las concentraciones plasmáticas del clenbuterol caen por debajo de niveles detectables (2 pg / ml) 2 a 7 días después de la administración de la dosis final. Las concentraciones de clenbuterol alcanzan un estado de equilibrio en el plasma 48 después de su administración (Soma et al. 2004).

Bovinos: La absorción del clenbuterol en bovinos es rápida, los niveles plasmáticos alcanzan un máximo aproximadamente 2 a 7 h después del tratamiento inicial, la vida media en el plasma es de 55 a 57 h, la eliminación se produce principalmente a través de la excreción renal, la excreción fecal representa una cantidad relativamente pequeña. 48 h después de la dosificación, aproximadamente, 50% se excreta en la orina y menos del 2% en las heces, el resto permanece en la canal y en el tracto intestinal (Smith and Paulson 1997), y una parte se secreta en la leche de vacas lecheras (Stoffel and Meyer 1993).

Humanos: El clenbuterol es 70 a 80% biodisponible por vía oral (80% en humanos y 76% bovino), tiene una vida media de eliminación de 25 a 39 h. Se elimina por vía urinaria y aproximadamente 87 % se excreta 86 h después de su administración. Su distribución y absorción es rápida, se acumula principalmente en el hígado y en menor medida en el músculo (Marban-Arcos and Lopez-Jimenez 2011); (Salleras et al. 1992).

1.7. ACUMULACIÓN EN TEJIDOS

Debido a que puede almacenarse en diversos tejidos su uso ilegal ha sido confirmado por medio de residuos encontrados a través del análisis de muestras de pelo (Salquèbre et al. 2007), retina, carne, hígado, riñón, etc., (Smith 1998). En la década de los 90 se realizaron diversos estudios para cuantificar los residuos presentes en los tejidos comestibles de las especies ganaderas, simulando la exposición de animales en condiciones ilícitas al administrar dosis repetidas del fármaco. Según (Smith and Paulson 1997), las concentraciones de residuos y tasas de eliminación de clenbuterol varía considerablemente entre diferentes tejidos, así como en plasma y orina después de la administración de clenbuterol y durante el periodo de retiro (Cuadro 1.3).

En los tejidos internos, los residuos más altos de clenbuterol están presentes en el hígado, riñón y pulmones, mientras que en el músculo esquelético y el tejido adiposo los residuos son casi equivalentes y representan una pequeña parte de las presentes en el hígado. La acumulación de clenbuterol en estos tejidos depende de la dosificación y del tiempo de administración, alcanzando niveles máximos después de varios días de tratamiento (Elliott et al. 1995) (Pleadin et al. 2014).

Cuadro 1.3. Permanencia estimada de residuos de clenbuterol en tejidos después de suspenderse en rumiantes.

Tejido	Especie	LDQ ¹	Días	Referencia
Plasma	Rumiantes	>0.2	14-21	(Li et al. 2016) (Zhao et al. 2015)
Orina	Rumiantes	>0.2	7-15 días	(Zhao et al. 2015) (Meyer and Rinke 1991)
Músculo, grasa	Rumiantes	>0.1	14	(Zhao et al. 2015) (Li et al. 2016)
Hígado	Rumiantes	> 0.2	28-56	(Li et al. 2016) Elliot <i>et al.</i> , 1995,
Retina	Rumiantes	>2	28-42	(Li et al. 2016)(Elliott et al. 1995)
Pelo	Rumiantes	>20	70 días	(Li et al. 2014)
		>4	33 sem	(Haasnoot et al. 1998)

¹LDQ: Límite de cuantificación

Por otro lado, los residuos se agotan más rápidamente del plasma y la orina que de otros tejidos. Mientras que, en tejidos pigmentados como ojo y pelo, las concentraciones de clenbuterol tienen una tasa de metabolismo relativamente lenta, por lo que la acumulación de clenbuterol en estos tejidos es persistente en comparación con la de la orina, el plasma y otros tejidos. (Zhao et al. 2015), administraron 16 mg kg⁻¹ de clenbuterol a cabras durante 21 días consecutivos y encontraron las mayores concentraciones de clenbuterol en ojos, seguido de bilis y hígado (Figura 1).

El clenbuterol interacciona con la melanina. Por lo tanto, la melanina es el componente dentro del ojo y pelo responsable de la alta acumulación residual (Pleadin et al. 2011). Por lo que residuos de clenbuterol permanecen en la retina y el pelo durante mucho tiempo. Sin embargo, en términos de todos los tejidos comestibles, el hígado, el riñón y el pulmón mantienen los mayores residuos de clenbuterol lo cual puede explicarse porque estos son los tejidos más activos para el metabolismo de los fármacos (Li et al. 2016).

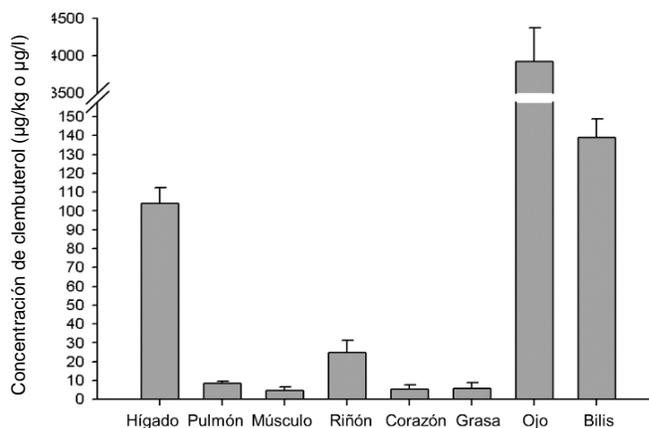


Figura 1.1. Concentración de clenbuterol en varios tejidos de cabra.

Orina y suero: En tratamiento, las concentraciones de clenbuterol en la orina y plasma continúan aumentando, aunque las concentraciones en la orina son mucho más altas que en el plasma. Sin embargo, después de la interrupción del tratamiento, las concentraciones de clenbuterol medidas en la orina se mantienen significativamente mayores en comparación con las muestras de sangre debido a que el clenbuterol se elimina principalmente a través de la orina (Li et al. 2016).

Pelo y retina: El hígado, riñón y músculo son tejidos bien irrigados de sangre en oposición al pelo y retina, por lo tanto, el clenbuterol se acumula en estos últimos tejidos, en particular si están pigmentados (Smith 1998). El pelo y la retina son los tejidos en donde se hayan las concentraciones más altas después del periodo de retiro; en el primero, permanece disponible y es fácil de recolectar (animales vivos) y en la retina es la matriz que da un resultado más confiable después del sacrificio de los animales (Cristino, Ramos, and Da Silveira 2003).

La melanina es la responsable de la acumulación de clenbuterol en tejidos como pelo, piel y retina debido a la unión química entre la melanina y el anillo aromático del β -agonista (Vuli et al. 2011) (Howells, Godfrey, and Sauer 1994), por lo que el color de pelo tiene importancia en la acumulación del fármaco y se encuentra en concentraciones más altas en aquellos con coloración negra, que en pelos de coloración más clara, no obstante, los pelos no pigmentados se pueden usar para su control, pues igual se acumula, incluso cuando se administran dosis bajas y su concentración continúa

umentado durante los primeros días de retiro (Gleixner, Sauerwein, and Meyer 1996)(Li et al. 2014). A su vez , en el ojo se acumula en la retina y la coroides del ojo, en lugar de los tejidos no pigmentados del mismo (Sauer et al. 1995).

Grasa: De acuerdo a Smith (1998), los β -agonistas generalmente no son lipófilos, sin embargo, debido a la presencia del cloro en el clenbuterol se ha afirmado que es más lipofílico que sus análogos y se ha deducido que se distribuye fácilmente en el tejido adiposo lo cual es incorrecto. Estudios realizados en ratas, ratones y conejos mostraron que el clenbuterol no se acumulaba en el tejido adiposo (Smith and Paulson 1997).

Leche: La acumulación de residuos de clenbuterol en leche, puede ser alto y tener efectos farmacológicos en los consumidores cuando se suministra continuamente (Stoffel and Meyer 1993).

Debido a las altas concentraciones de residuo que permanecen en los tejidos oculares o en el pelo después de largos períodos de abstinencia, estos tejidos han sido recomendados para detectar el uso ilegal del clenbuterol. Sin embargo, cuando el clenbuterol se usa para fines terapéuticos, estos tejidos pueden tener poca utilidad (Pleadin et al. 2011)(Pleadin et al. 2014). La tasa de eliminación del clenbuterol depende del tiempo de administración y de retiro, y del tejido que sea analizado, por tal motivo resulta muy difícil distinguir cuando se ha dado un uso veterinario o un uso incorrecto al clenbuterol (Elliott et al. 1995).

Efecto del cocinado: Según Rose *et al.* (1995), el clenbuterol es estable bajo condiciones normales de cocinado. El hervido, asado, freído y cocción en microondas no producen cambios en la concentración de clenbuterol y el fármaco permanece en el tejido comestible cocinado. Es estable cuando se hierve en agua a 100 °C y se fríe a 160 °C, sin embargo, en condiciones extremas como cuando se cocina en abundante aceite a 260 °C su concentración disminuye hasta en un 44 %, no obstante a esta temperatura el tejido resulta carbonizado y no apto para consumo humano (Rose et al. 1995).

Efecto sobre la calidad de la carne: El marmoleo de la carne no se ve afectado por el tratamiento con clenbuterol debido que la grasa intramuscular es menos sensible a los

efectos reductores del clenbuterol que los depósitos de grasa subcutáneos o internos, esto es importante porque una cierta cantidad de grasa intramuscular, se requiere para la palatabilidad aceptable y sirve como el principal criterio para la evaluación de la calidad de la carne (Ricks et al. 1984). En cerdos, el clenbuterol puede reducir la capacidad de retención del agua e incrementar la terneza de la carne, ceniza y contenido de grasa de la carne (Dilaga 2012).

1.8. LEGISLACION DEL USO DEL CLENBUTEROL

Los residuos de clenbuterol presentes en los tejidos de animales tratados ilegalmente han causado envenenamientos agudos en los consumidores de hígado contaminado. Por lo tanto, los agonistas β -adrenérgicos han sido objeto de intenso escrutinio como toxinas potenciales en el suministro de alimentos, y la legislación ha prohibido su uso como agentes de mejora de la delgadez en el futuro previsible.

El uso de β -AA en la producción animal está prohibido en la Unión Europea y en la mayoría de los países asiáticos como China y Tailandia. En Estados Unidos y en México, se permite el uso de algunos compuestos de esta familia como el clorhidrato de zilpaterol y clorhidrato de ractopamina los cuales están aprobados para su uso en la alimentación animal. Como resultado de su toxicidad, las autoridades han prohibido el uso del clenbuterol para incrementar la ganancia de peso en animales destinados al consumo humano (Serratosa et al. 2006), por lo cual, está autorizado únicamente para uso terapéutico en la Unión Europea, Estados Unidos y Canadá. En México, el uso del clenbuterol con este fin está prohibido en la norma NOM-061-ZOO-1999 que también prohíbe su importación, comercialización, transporte y suministro y la NOM-194-SSA1-2004 establece que los productos de ganado bovino deberán estar libres de clenbuterol. El Programa de Monitoreo de Residuos Tóxicos en Animales, en el apartado de LMR establece que los compuestos clenbuterol y metabolitos en hígado, riñón, grasa, músculo, orina, suero y leche no debe ser detectado. El Codex alimentario establece los niveles máximos permisibles de clenbuterol para ganado en diferentes tejidos y se recomienda únicamente cuando se asocia con un uso terapéutico aprobado. La Comisión del Codex Alimentarius (2015) recomienda como límite máximo de residuo de clenbuterol 0.2 ng g^{-1} en músculo de bovino y caballo (Cuadro 1.4)

Cuadro 1.4. Límite máximo de residuos de clenbuterol en diferentes tejidos

Especie	Tejido	LMR ¹ (µg/kg)	Año
Caballo, vacuno	Grasa, músculo	0.2	2015
Caballo, vacuno	Riñón, hígado	0.6	2015
Vacuno	Leche	0.05	2015

¹LMR: límite máximo de residuos

En México la vigilancia de los ratros Tipo Inspección Federal y municipales están a cargo de la SAGARPA y de la secretaria de salud respectivamente

1.9. EFECTOS SECUNDARIOS EN HUMANOS

Los residuos de clenbuterol presentes en tejidos de animales tratados ilegalmente principalmente hígado, han causado intoxicaciones agudas en los consumidores. Los casos de pacientes intoxicados con clenbuterol se deben principalmente a la ingesta de carne contaminada o al consumo intencional por deportistas que desean aumentar la masa corporal. En la década de los 90, se supo de uso ilegal cuando fue ligado a casos de intoxicación alimentaria en Europa (Kuiper et al. 1998). En casos de intoxicación, el periodo de incubación varía entre 15 minutos a 6 h y la duración de los síntomas entre 90 minutos y 6 días (Salleras et al. 1992). Su distribución y absorción es rápida, los síntomas se presentan tempranamente, 30 minutos después de su consumo (Marban-Arcos and Lopez-Jimenez 2011).

Su toxicidad en humanos es similar a la de otros agonistas β_2 -adrenérgicos y ocasiona efectos en el sistema nervioso y cardiovascular. Los principales síntomas por intoxicación son; taquicardia, temblores musculares, dolor de cabeza, palpitaciones, ansiedad, vomito, agitación, mareos, sudoración (Chodorowski and Sein 1996), además de ocasionar hipopotasemia, hipofosfatemia e hiperglucemia. La toxicidad más grave puede presentarse con convulsiones, psicosis, infarto de miocardio, arritmias ventriculares, acidosis láctica, o rabdomiólisis. Y en casos extremos de sobredosis puede ocasionar toxicidad cardíaca que puede terminar en infarto de miocardio de tipo 2 (Barry and Graham 2013).

1.10. CASOS DE INTOXICACIÓN

Los riesgos en la salud han sido documentando por varios casos de intoxicación humana reportados en la década de los 90's en países europeos y se asociaron principalmente al consumo de hígado. Aunque se encuentra prohibido, en los últimos años se ha informado de una tendencia al uso ilegal de clenbuterol en rumiantes, hasta ahora, existen varios estudios que han documentado el uso ilegal del clenbuterol en México así como en otras partes del mundo (Cuadro 1.5 y cuadro 1.6), a través de los residuos encontrados en tejidos, orina y plasma en bovinos.

En el continente asiático, principalmente en China y Tailandia, los agricultores utilizan β -agonistas para la engorda de ganado, cerdos y aves de corral. Yodrasing *et al.* (2015), analizó muestras de alimentos para determinar la contaminación por salbuterol, clenbuterol y ractopamina. En el caso del clenbuterol, en 74 % de las muestras se confirmó la contaminación con esta sustancia.

Cuadro 1.5. Residuos de clenbuterol asociados a casos de intoxicación en el mundo.

Fuente	Origen	Año	Concentración $\mu\text{g kg}^{-1}$	Referencia
Hígado de bovino	Portugal	2005	1400	(Barbosa et al. 2005)
Orina y pelo de bovino	Portugal	2007	0.3-11.6 32.9-57.0	(Ramos et al. 2009)
Músculo e Hígado	Portugal	2003	3200-32 000	(Cristino et al. 2003)
Alimento	Tailandia	2014	0.30-3.73	(Yodrasing et al. 2015)
Hígado de pollo y cerdo	Malasia	2015	0.03-0.09 0.05-0.15	(Sakai et al. 2016)

A pesar de estar prohibido en México, los residuos de clenbuterol han sido cuantificados en diversas ciudades del país. No obstante, en la última década el número de casos de intoxicación por clenbuterol ha disminuido considerablemente. En 2007 se registraron 555 casos de intoxicación y destaca por ser el año con mayor número de casos registrados, sin embargo, en 2013 la tasa de intoxicación de clenbuterol por habitante en México fue menor al 1%, año en el que se registraron 94 casos de intoxicación. Los casos reportados por intoxicación están asociados en su mayoría al consumo de carne

e hígado contaminado, pese al número de rastros clausurados en los últimos años y a una evidente disminución en los casos oficiales reportados, el uso de esta sustancia por parte de algunos productores de ganado, se ha comprobado en varios estados del país. En los últimos 10 años, se han analizado tejidos de animales en diferentes ciudades del país con el fin de comprobar la contaminación por clenbuterol, los resultados obtenidos han sido variados, pero han dado positivo a la presencia de clenbuterol. Sin embargo, las reacciones adversas en humanos son raramente observadas, ya que la cantidad ingerida de residuo puede no ser suficiente para producir signos clínicos de intoxicación.

Cuadro 1.6. Residuos de clenbuterol encontrados en diferentes tejidos en varias ciudades de México.

Fuente	Origen	Año	Concentración (ng kg ⁻¹)	Referencia
Hígado	Mérida, Yucatán	2005	ND	(Ortiz Borges, Alcocer Vidal, and Castellanos Ruelas 2005)
Retina	Guadalajara	2006	200-8100	(Hernandez Contreras et al. 2006)
Carne Alimento	Norte de México Sur de México	2006	100-2300 2525-53787	(Peña Betancurt et al. 2008)
Carne	Sonora	2008	100-3060	(Estrada-Montoya et al. 2008)
Hígado	Sahuayo, Michoacán	2010	1500-637,000	(Flores et al. 2010)
Suero	Xalapa, Veracruz	2011	1.89-7376.7	(López Hernández et al. 2011)
Hígado, orina y suero	Guerrero	2005- 2010	No especificado	(Chávez Almazán et al. 2012)
Hígado y músculo	Texcoco, México	2011	2100-8100	(Olaya Fernandez 2012)
Carne	Texcoco, México	2009	651-4578	(Hernandez Sanchez et al. 2013)
Hígado	Ciudad de México	2013	530-150,020	(Morales-Trejo et al. 2013)
Suero	Toluca, Edo. México	2013	2000-8000	(Valladares-carranza et al. 2014)

Los residuos encontrados superan por mucho los establecidos en los Límites Máximos de Residuos establecidos por el Codex Alimentarius.

1.11. CONCLUSIONES

Desde un enfoque productivo, el uso del clenbuterol en la producción animal como promotor de crecimiento supone una ventaja para los productores de ganado. Su uso se asocia con mejora de los rendimientos de la canal y mejorar de las misma, lo que constituye en una característica deseada. Sin embargo, la presencia de residuos de clenbuterol en tejidos comestibles de origen animal representa un riesgo potencial para la salud de los consumidores debido a sus efectos tóxicos y estabilidad por periodos prolongados de tiempo. Por ello el uso del clenbuterol se ha sido limitado únicamente con fines terapéuticos, no obstante, continúa usándose en dosis elevadas de forma ilegal en la engorda de ganado bovino en algunos países incluido México. De tal manera que debe mantenerse especial atención en la vigilancia de residuos de fármacos en los animales, que garanticen la producción de alimentos inocuos.

1.12. LITERATURA CITADA

- Baker, P. K., Dalrymple, R. H., Ingle, D. L. & Ricks, C. A. (1984). Use of a β 2-adrenergic agonist to alter muscle and fat deposition in lambs. *Journal of Animal Science*, 59(5): 1256–1261.
- Barbosa, J., Cruz, C., Martins, J., Silva, J. M., Neves, C., Alves, C. & Da Silveira, M. I. (2005). Food poisoning by clenbuterol in Portugal. *Food Additives and Contaminants*, 22(6): 563–566.
- Barry, A. R. & Graham, M. M. (2013). Case report and review of clenbuterol cardiac toxicity. *Journal of Cardiology Cases*, 8(4): 131–133.
- Bishop, J., Heffron, B., Taddei, L., Benoit, M., Hurt, L., Costello, S. & Negrusz, A. (2015). confirmation and quantification of clenbuterol in horse urine using Liquid Chromatography tandem mass spectrometry triple quadrupole. *Journal of Analytical Toxicology*, 39(1): 130–132.
- Cardoso, L. A. & Stock, M. J. (1996). Effect of clenbuterol on growth and body composition during food restriction in rats. *Journal of Animal Science*, 74(9): 2245–2252.
- Cardoso, L. A. & Taveira, O. (2002). Effect of clenbuterol on endocrine status and nitrogen and energy balance in food-restricted rats. *Journal of Animal Science*, 76(4): 1012–1018.
- Chávez Almazán, L. A., Díaz Ortiz, A. J., Pérez Cruz, B. & Alberto Alarcón, M. R. (2012). Tendencia de 2005 a 2010 de los niveles de Clembuterol en muestras de bovinos en Guerrero , México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 3(4): 449–458.
- Chodorowski, Z. & Sein, A. J. (1996). Acute poisoning with clenbuterol - a case report. *Przegląd Lekarski*, 54(10): 763–764.
- Choo, J. J., Horan, M. A., Little, R. A. & Rothwell, N. J. (1992). Anabolic effects of clenbuterol on skeletal muscle are mediated by β 2-adrenoceptor activation. *The*

American Journal of Physiology, 263(1): E50–E56.

Choo, J. J., Little, R. A. & Rothwell, N. J. (1990). Effects of the β 2-adrenoceptor agonist, clenbuterol, on muscle atrophy due to food deprivation in the rat. *Metabolism*, 39(6): 647–650.

Codex Alimentarius Commission. (2015). Maximum Residue Limits for Veterinary Drugs in Foods Updated as at the 38 th Session of the Codex Alimentarius Commission (July 2015). CAC/MRL, 2-2015.

Cristino, A., Ramos, F. & Da Silveira, M. I. N. (2003). Control of the illegal use of clenbuterol in bovine production. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 32(2): 311–316.

Daubert, G. P., Mabasa, V. H., Leung, V. W. Y. & Aaron, C. (2007). Acute clenbuterol overdose resulting in supraventricular tachycardia and atrial fibrillation. *Journal of Medical Toxicology*, 3(2): 56–60.

Dilaga, W. S. (2012). Effect of clenbuterol on meat quality of growing male pig. *Journal of Agricultural & Social Science*, 8(1): 29–33.

Elliott, C. T., Mccaughey, W. J., Crooks, S. R. H., Mcevoy, J. D. G., Kennedy, D. G., Mccaughey, W. J. & Mcevoy, J. D. G. (1995). Residues of clenbuterol in cattle receiving therapeutic doses : Implications for differentiating between legal and illegal use. *Veterinary Quarterly*, 17(3): 100–102.

Estrada-Montoya, M. C., González-Córdova, A. F., Torrescano, G., Camou, J. P. & Vallejo-Córdova, B. (2008). Screening and confirmatory determination of clenbuterol screening and confirmatory determination of clenbuterol residues. *Ciencia Y Tecnología Alimentaria*, 6(2): 130–136.

Flores, R., Pacheco, C., Campos, C. A., Caraveo, J. M. & Carrión Gutiérrez, M. (2010). Clenbuterol en hígado de bovinos de un matadero municipal de Michoacán, México. *Ciencia y Tecnología de los Alimentos*, 20(1): 1–4.

Gleixner, A., Sauerwein, H., & Meyer, H. H. D. (1996). Accumulation of the β 2-adrenoceptor agonist clenbuterol in calf hair of different pigmentation. *Archiv Für*

Lebensmittelhygiene, 47(6): 131–135.

- Gomperts, B. D., Kramer, Ij. M. & Tatham, P. E. R. (2009). Chapter 3 - Receptors. In B. D. Gomperts, Ij. M. Kramer, & P. E. R. Tatham (Eds.), *Signal Transduction (Second Edition)*. San Diego: Academic Press, pp. 37–79.
- Haasnoot, W., Stouten, P., Schilt, R. & Hooijerink, D. (1998). A fast immunoassay for the screening of beta- agonists in hair. *Analyst*, 123(12): 2707–2710.
- Hebert, K., de Guevara, E., Macedo Dias, A. & Vilches, E. (2015). Adrenergic Agents. In P. Lanzer (Ed.), *PanVascular Medicine*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 931–951.
- Hernández Contreras, L., Pacheco Gallardo, C., Gonzales Aguilar, D. G. & Ramírez Alvarez, A. (2006). Aplicacion de la tecnica Elisa para la determinación de clenbuterol en retina de bovino. In *Avances en la Investigacion Cientifica en el CUCBA*. pp. 742–747.
- Hernández Sánchez, D., Francisco Martinez, A., Osorio Reyes, J. P., Cobos Peralta, M. A. & Crosby Galvan, M. M. (2013). Niveles de clenbuterol detectados en carne de bovino distribuidos en Texcoco, Estado de México. *Agroproductividad*, 6(1): 17–22.
- Hoffman, D. R. J., Hoffman, R. S., Freyberg, C. L., Poppenga, R. H. & Nelson, L. S. (2001). Clenbuterol ingestion causing prolonged tachycardia, hypokalemia, and hypophosphatemia with confirmation by quantitative levels. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 39(4): 339–344.
- Howells, L., Godfrey, M. & Sauer, M. J. (1994). Melanin as an adsorbent for drug residues. *Analyst*, 119(12): 2691–2693.
- Johnson, B. J., Smith, S. B. & Chung, K. Y. (2014). Historical overview of the effect of Beta-adrenergic agonists on beef cattle production. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 27(5): 757–766.
- Kallings, P., Ingvast-Larsson, C., Persson, S., E, A. L., Forster, H. J. & Rominger, K. L. (1991). Clenbuterol plasma concentrations after repeated oral administration and its effects on cardio-respiratory and blood lactate responses to exercise in healthy Standardbred horses. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 14(3): 243–249.

- Kearns, C. F. & McKeever, K. H. (2009). Clenbuterol and the horse revisited. *Veterinary Journal*, 182(3): 384–391.
- Knych, H. K., Mitchell, M. M., Steinmetz, S. J. & Mckemie, D. S. (2014). Detection, pharmacokinetics and cardiac effects following administration of clenbuterol to exercised horses. *Equine Veterinary Journal*, 46(3): 380–385.
- Kuiper, H. A., Noordam, M. Y., Schilt, R. & Roos, A. H. (1998). Illegal use of β -adrenergic agonists : European Community. *Journal of Animal Science*, 76(1): 195–207.
- Li, L., Tang, C., Zhang, J., Zhao, Q. & Zhang, K. (2016). The potential of various living tissues for monitoring clenbuterol abuse in food-producing chinese simmental beef cattle, *Journal of Analytical Toxicology*, 40(1): 72–77.
- Li, L., Zhang, J., Tang, C. & Zhao, Q. (2014). Accumulation of clenbuterol residues in the hair of chinese simmental beef cattle during and after treatment. *Journal of Analytical Toxicology*, 38(1): 52–56.
- López Hernández, C. M., González Ortiz, S. A., López Muñoz, D., Ortega Planell, C. B., Guadarrama Vázquez, M. A., Croda Todd, M. T. & Escobar Henríquez, J. B. H. (2011). Determinación de clenbuterol en el ganado bovino de la ciudad de Xalapa , Veracruz , México. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*, 11(2): 28–31.
- Marban-Arcos, E. S. & López-Jiménez, F. A. (2011). Intoxicación alimentaria por clenbuterol. *Revista de Sanidad Militar*, 65(3): 121–124.
- Mersmann, H. J. (1995). Species variation in mechanisms for modulation of growth by beta-adrenergic receptors. *The Journal of Nutrition*, 125: 1777S–1782S.
- Meyer, H. H. & Rinke, L. M. (1991). The pharmacokinetics and residues of clenbuterol in veal calves. *Journal of Animal Science*, 69(11): 4538–4544.
- Moody, D. E., Hancock, D. L. & Anderson, D. B. (2010). Phenethanolamine repartitioning agents. In *Farm Animal Metabolism and Nutrition*. CAB International. Vol. 3, pp. 1016–1044).
- Morales-Trejo, F., Leon, S. V. Y., Escobar-Medina, A. & Gutierrez-Tolentino, R. (2013).

- Application of high-performance liquid chromatography-UV detection to quantification of clenbuterol in bovine liver samples. *Journal of Food and Drug Analysis*, 21(4): 414–420.
- Morgan D.J., (1990). Clinical pharmacokinetics of beta-agonists. *Clinical Pharmacokinetics*. 18(4): 270–294.
- Olaya Fernández, E. (2012). Residuos de clenbuterol en tejidos comestibles de bovino. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Chapingo
- Ortiz, M., Valdivia, F. J., Martínez, R. & Martínez de A, A. (2000). Effect of clenbuterol on growth performance in broilers. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 52(3): 256–260.
- Ortiz Borges, J. C., Alcocer Vidal, V. M. & Castellanos Ruelas, A. F. (2005). Determinación de clenbuterol por el método de gases / masas y su cuantificación en bovinos sacrificados en dos rastros. *Técnica Pecuaria en México*, 43(1): 57–67.
- Peña Betancurt, S. D., Córdova-izquierdo, A., Uribe, A. & Michel, A. M. (2008). Clenbuterol residues in bovine feed and meat. *Research Journal of Biological Science*, 3(12): 1444–1445.
- Pleadin, J., Vulić, A., Mitak, M., Perši, N. & Milić, D. (2011). Determination of clenbuterol residues in retinal tissue of food-producing pigs. *Journal of Analytical Toxicology*, 35: 28–31.
- Pleadin, J., Vulic, A., Terzic, S., Vahc, N., Ksenija, S. & Perak, E. (2014). Comparison of accumulation of clenbuterol and salbutamol residues in animal internal tissues non-pigmented eyes and hair. *Journal of Analytical Toxicology*, 38(1): 681–685.
- Pringle, T. D., Calkins, C. R., Koohmaraie, M. & Jones, S. J. (1993). Effects over time of feeding a beta-adrenergic agonist to wether lambs on animal performance, muscle growth, endogenous muscle proteinase activities, and meat tenderness. *Journal of Animal Science*, 71(3): 636–644.
- Ramos, F., Baeta, M. L., Reis, J. & Silveira, M. I. N. (2009). Evaluation of the illegal use of clenbuterol in Portuguese cattle farms from drinking water, urine, hair and feed

- samples. *Food Additives & Contaminants*. 26: 814–820.
- Rehfeldt, C., Schadereit, R., Weikard, R. & Reichel, K. (1997). Effect of clenbuterol on growth, carcass and skeletal muscle characteristics in broiler chickens. *British Poultry Science*, 38(4): 366–373.
- Ricks, C. A., Dalrymple, R. H., Baker, P. K. & Ingle, D. L. (1984). Use of a B-agonist to alter fat and muscle deposition in steers. *Journal of Animal Science*, 59(5): 1247–1255.
- Robison, N. E. (2000). Clenbuterol and the horse. *AAEP Proceedings*, 46(3): 229–223.
- Rose, M. D., Shearer, G. & Farrington William, H. H. (1995). The effect of cooking on veterinary drug residues in food. *Food Additives & Contaminants*, 12(1): 67–76
- Rothwell, N. J. & Stock, M. J. (1987). Effect of a selective β 2-adrenergic agonist (clenbuterol) on energy balance and body composition in normal and protein deficient rats. *Bioscience Reports*, 7(12): 933–940.
- Sakai, N., Sakai, M., Mohamad Haron, D. E., Yoneda, M. & Ali Mohd, M. (2016). Beta-agonist residues in cattle, chicken and swine livers at the wet market and the environmental impacts of wastewater from livestock farms in Selangor State, Malaysia. *Chemosphere*, 165: 183–190.
- Salleras, L., Dominguez, A., Mata, E., Lluís Taberner, J., Moro, I. & Salva, P. (1992). Epidemiologic study of an outbreak of clenbuterol poisoning in Catalonia, Spain. *Public Health Reports*, 110(3): 338.
- Salquère, G., Bresson, M., Villain, M., Cirimele, V. & Kintz, P. (2007). Clenbuterol determination in calf hair by UPLC-MS-MS: case report of a fraudulent use for cattle growth. *Journal of Analytical Toxicology*, 31(2): 114–8.
- Sauer, M. J., Pickett, R. J. H., Limer, S. & Dixon, S. N. (1995). Distribution and elimination of clenbuterol in tissues and fluids of calves following prolonged oral administration at a growth-promoting dose. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 18(2): 81–86.

- Serratos, J., Blass, a, Rigau, B., Mongrell, B., Rigau, T., Tortadès, M. & Balagué, J. (2006). Residues from veterinary medicinal products, growth promoters and performance enhancers in food-producing animals: a European Union perspective. *Revue Scientifique et Technique*, 25(2): 637–653.
- Sillence, M. N., Hunter, R. A., Pegg, G. G., Brown, L., Matthews, M. L., Magner, T. & Lindsay, D. B. (1993). Growth, nitrogen metabolism, and cardiac responses to clenbuterol and ketoclenbuterol in rats and underfed cattle. *Journal of Animal Science*, 71(11): 2942–2951.
- Sillence, M. N., Matthews, M. L., Brandan, T. W. & Pegg, G. G. (2000). Effects of clenbuterol on growth in underfed cattle. *Australian Journal of Agricultural Research*, 49: 317–327.
- Smith, D. J. (1998). The Pharmacokinetics, Metabolism, and Tissue Residues of β -Adrenergic Agonists in Livestock. *Journal of Animal Science*, 76(1): 173–194.
- Smith, D. J., & Paulson, G. D. (1997). Distribution, Elimination, and Residues of [14 C] Clenbuterol HCl in Holstein Calves. *Journal of Animal Science*, 75(1): 454–461.
- Soma, L. R., Uboh, C. E., Guan, F., Moate, P., Luo, Y., Teleis, D. & Tsang, D. S. (2004). Pharmacokinetics and disposition of clenbuterol in the horse. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 27(2): 71–77.
- Stoffel, B., & Meyer, H. H. (1993). Effects of the beta-adrenergic agonist clenbuterol in cows: lipid metabolism, milk production, pharmacokinetics, and residues. *Journal of Animal Science*, 71(7): 1875–1881.
- Valladares-carranza, B., Bañuelos-valenzuela, R., Pena-Betancourt, S. D., Velazquez-Ordonez, V., Velazquez-Armenta, Y. & Nava-Ocampo, A. (2014). Illegal use of clenbuterol in cattle production in México. *Health*, 6: 673–676.
- Vuli, A., Pleadin, J., Perši, N., Stojkovi, R. & Ivankovi, S. (2011). Accumulation of β -agonists clenbuterol and salbutamol in black and white mouse hair, 35: 566–570.
- Yodrasing, P., Boontanon, N., Boontanon, S. K. & Polprasert, C. (2015). Analysis of Beta-agonists in animal feeds by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and

health risk assessment, In *International Conference on Agricultural, Ecological and Medical Sciences*, pp. 58–61.

Zhao, Z., Yao, T., Qin, Y., Yang, X., Li, J., Li, J. & Gu, X. (2015). Clenbuterol distribution and residues in goat tissues after the repeated administration of a growth-promoting dose. *Journal of Analytical Toxicology*, 39(6): 1–7.

CAPITULO 2. - DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE CLEMBUTEROL EN CARNES DE BOVINO COMERCIALIZADAS EN UN ESTADO DEL SURESTE DE MÉXICO.

Oseguera-Soberano M. F.,¹ Ramos-Juárez J. A.,¹ Zaldívar-Cruz, J. M.,¹ Sauri-Duch E.²
Hernández-Cazares A.S ³

¹ Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco. Periférico Carlos A. Molina s/n, C.P. 86500. H. Cárdenas, Tabasco, México.

² Instituto Tecnológico de Mérida. Av. Tecnológico s/n km 4.5, C.P. 97118. Mérida, Yucatán, México

³ Colegio de Postgraduados, Campus Córdoba. Carretera Federal Córdoba-Veracruz Km 348, C.P. 94946. Amatlan de los Reyes, Veracruz, México.

*Autor de correspondencia: zaldivar@colpos.mx

RESUMEN

El clenbuterol es un β 2-AA usado ilegalmente como promotor de crecimiento en el ganado vacuno debido a que altera la composición de la canal, favoreciendo el aumento de las masas musculares y la disminución de los depósitos de grasa. La Administración de altas dosis ocasiona que se almacene en tejidos y órganos del animal, el consumo de estos puede representar un riesgo para la salud debido a que ocasiona aparición de una serie de síntomas. El objetivo de este estudio fue determinar y cuantificar residuos de clenbuterol en carnes de bovino comercializados en dos municipios del estado de Tabasco, México. Las muestras se obtuvieron en dos tipos de establecimientos; carnicerías y supermercados. Un total de 37 muestras de carne fueron analizadas por medio de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC-UV). El 59.4% de las muestras analizadas presentaron residuos de clenbuterol con valores de 2-14 ng g⁻¹. Las muestras que resultaron positivas estuvieron por encima del LMR establecido por el Codex Alimentarius.

Palabras claves: *residuos, β -agonistas, bovino, carne, calidad.*

ABSTRACT

Clenbuterol is a β 2-AA used illegally as a growth promoter in cattle. It alters the composition of the canal, improve the increase of muscle mass and the decrease of fat deposits. The administration of high doses of clenbuterol causes that it is stored in tissues and organs of the animal and the consumption of these can represent a health risk because it causes a series of symptoms. The aim of this study was to determine and quantify clenbuterol residues in beef meat sold in two municipalities in the state of Tabasco, Mexico. The samples were obtained in two types of establishments: Butchers and Supermarkets. In total, 37 meat samples were analyzed using High Performance Liquid Chromatography (HPLC-UV). A high percentage of the analyzed samples (56.8%) presented clenbuterol residues with values of 2-14 ng g⁻¹, which are above the MRL established by the Codex Alimentarius

Key words: *residues, β -agonist, bovine, meat, quality.*

2.1. INTRODUCCIÓN

El clenbuterol (4-amino α [(*tert*-butilamino) metil]-3,5 alcohol diclorobenzil) es un compuesto que pertenece a la familia de los β_2 -agonistas Adrenérgicos (β -AA) (Choo *et al.*, 1992). Es usado en la medicina veterinaria para el tratamiento de algunas enfermedades respiratorias en caballos en dosis de 0.8 $\mu\text{g kg}$ (Kearns y McKeever, 2009) y como agente tocolítico para prevenir la contracción uterina en el ganado (Robison 2000).

Los β_2 -agonistas son sustancias que poseen propiedades anabólicas y son usadas comúnmente como suplemento en la alimentación de bovinos para mejorar la eficiencia de crecimiento. Cuando se administra clenbuterol en dosis superiores a la terapéutica (10 a 20 veces) y por periodos de tiempo prolongados ocasiona efectos anabólicos, por lo que es usado ilegalmente en muchos países como promotor de crecimiento en la producción animal (Ramos *et al.*, 2009). Actualmente se sabe que el clenbuterol tiene efectos repartidores en la canal de diversos animales de granja (Ortiz *et al.*, 2000), aunque los mayores efectos repartidores se observan en bovinos y ovinos (Williams *et al.*, 1987). Los efectos son debidos principalmente al incremento de proteína corporal y una disminución en el contenido de grasa epididimal. Los productores utilizan los β_2 -agonistas porque resulta en canal con bajo contenido de tejido adiposo e incrementa el contenido de proteína, lo cual resulta atractivo para los consumidores (Johnson *et al.*, 2014).

La principal problemática asociada al uso de clenbuterol se debe a los efectos tóxicos causados por la ingesta involuntaria, debido a que se almacena en diversos tejidos de los animales tratados, por lo que su uso ilegal puede confirmarse a través del análisis de muestras de hígado, músculo, riñón (Meza-Marquez *et al.*, 2012), pelo (Li *et al.*, 2014; Salquèbre *et al.*, 2007) retina, y plasma u orina (Pleadin *et al.*, 2009) en el caso de animales vivos. Se excreta principalmente a través de la orina, sin embargo, cuando no se le da un periodo de descanso a los animales, se acumula en los tejidos en concentraciones elevadas. El tiempo de permanencia varía entre tejidos, en el caso de hígado y carne se ha logrado cuantificar hasta varias semanas de haber suspendido el

tratamiento con clenbuterol (Zhao *et al.*, 2015). Además, el clenbuterol es estable a altas temperaturas por lo que los métodos tradicionales de cocinado no ocasionan ningún efecto en su concentración (Rose *et al.*, 1995).

Las primeras intoxicaciones en humanos aparecieron en la década de los 90's en la Unión Europea y fueron ligadas al consumo de productos cárnicos contaminados con residuos de clenbuterol (Kuiper *et al.*, 1998). Los síntomas en humanos asociados al consumo de carne contaminada con clenbuterol incluyen taquicardia, temblores musculares, dolor de cabeza, palpitaciones, ansiedad, vómito, agitación, mareos, sudoración (Barbosa *et al.*, 2005) y en casos más graves puede presentarse con convulsiones, psicosis, infarto de miocardio, arritmias ventriculares, acidosis láctica, o rhabdomiólisis (Barry y Graham, 2013), por lo tanto, el consumo de tejidos provenientes de animales tratados ilegalmente representa un riesgo para la salud humana.

Como resultado de sus efectos tóxicos, el clenbuterol está autorizado únicamente para uso terapéutico y se ha prohibido su uso para incrementar la ganancia de peso en animales destinados al consumo humano, no obstante en algunos países el uso de β -agonistas con propósitos repartidores está permitido (Serratosa *et al.*, 2006).

En México, el uso del clenbuterol en la producción animal se encuentra prohibido desde 1999 por la NOM-061-1999 y en los últimos años se han establecido programas para la vigilancia y monitoreo de residuos tóxicos en animales destinados al consumo humano. La comisión de Codex Alimentarius recomienda un Límite Máximo de Residuos (LMR) para ganado de 0.2 ng g^{-1} en músculo y grasa, pero únicamente cuando se asocia con un uso terapéutico (Codex Alimentarius Commission, 2015). A pesar de eso en la última década el uso del clenbuterol a cobrado importancia debido a la aparición de casos de intoxicación asociadas al consumo de tejidos contaminados, principalmente hígado. Por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar la presencia de residuos de clenbuterol en carnes de bovinos destinadas al consumo en dos municipios del Estado de Tabasco, México.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y reactivos

Se utilizó un estándar de clorhidrato de clenbuterol con un 95% de pureza (Sigma Aldrich). Los solventes utilizados fueron Acetonitrilo (CH₃CN) e Isopropanol (Sigma Aldrich) de grado HPLC. Ácido Fosfórico, Fosfato de Sodio Monobásico (NaH₂PO₄), Sulfato de sodio (Na₂SO₄), Sulfato de Magnesio (Mg₂SO₄), y Cloruro de Sodio (NaCl), todos los reactivos fueron de grado analítico (Sigma Aldrich).

Toma de muestras

Las muestras de carne de bovino fueron obtenidas de carnicerías locales y supermercados ubicados en los municipios de Cárdenas y Huimanguillo del estado de Tabasco. Se seleccionaron todas las carnicerías ubicadas en la cabecera municipal de ambos municipios registradas por la Secretaria de Desarrollo Municipal (2016), además, de tres supermercados situados en el municipio de Cárdenas, un total de 37 establecimientos fueron muestreados. Se colectaron 250 g de músculo de ganado bovino en cada establecimiento, las muestras fueron conservadas en congelación a -20 °C hasta su análisis. Las muestras se recogieron en la mañana la primera semana de julio del 2016.

Condiciones cromatográficas

Las muestras se analizaron en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) marca Agilent 1220 infinity LC acoplado a un detector de UV-VIS calibrado a 214 nm. La separación cromatografica se llevó a cabo en una columna C18 con partículas de 25 µm de diámetro, 150 mm de longitud y 4.7 mm de diámetro. Se inyectaron 20 µL de cada muestra, filtrados a través de una membrana de nylon con poro de 0.45 µm y 47 mm de diámetro (Millipore Co.). La fase móvil consistió en una solución de NaH₂PO₄ (0.05 M) /Acetonitrilo en proporción de 85:15, con flujo isocrático de 1 mL/min a 25 °C durante un tiempo de 30 min.

Procedimiento analítico

Después de su homogeneización se pesaron 5 g de muestra en un tubo centrifuga de 50 ml, se agregaron 4 ml de acetonitrilo y 2 ml de isopropanol y se agitó en vortex durante 2 minutos. Se agregó 1.2 g de NaCl y se mezcló en vortex durante 2 minutos. Se agregó 4 g de sulfato de Sodio y 2 g de Sulfato de Magnesio y mezclaron en vortex durante 2 minutos. La mezcla se centrifugó durante 20 minutos a 2400 rpm. El extracto se dejó secar en cápsulas de porcelana y se resuspendió en 1 ml de fase móvil, posteriormente, se filtró usando una jeringa de 3 ml y filtros de nylon de 0.45 μm y se colocó en un vial, se tomaron 20 μl y se inyectaron en el equipo HPLC.

Para la identificación y cuantificación del clenbuterol se utilizó un estándar de clenbuterol con un 95% de pureza (Sigma Aldrich). Se realizó una curva de calibración de 4 puntos con concentraciones de 6, 10, 50, y 100 ng mL^{-1} las cuales se prepararon diluyendo la solución stock en fase móvil hasta alcanzar las concentraciones mencionadas. Los resultados se expresaron en ng de clenbuterol por g^{-1} de muestra. La identificación del compuesto se realizó comparando el tiempo de retención del estándar del clenbuterol con el de las muestras inyectadas.

Análisis estadístico

Se determinaron las concentraciones de las muestras de carne recolectadas, calculándose el número de muestras positivas y negativas, así como el porcentaje de muestras contaminadas por municipio, y tipo de establecimientos, y la concentraciones máximas y mínimas en cada caso.

Las concentraciones de clenbuterol por municipio y por centro de distribución fueron comparadas usando la prueba t de Student ($p \leq 0.05$) para probar diferencias entre las medias de los dos grupos, la comparación se realizó con el procedimiento TTEST del programa estadístico SAS versión 9.4 (2017).

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las muestras recolectadas, el 54 % resultó positivas al análisis de clenbuterol en niveles superiores al LMR del Codex Alimentarius de la FAO el cual es de 0.2 ng g^{-1} para grasa y músculo de bovino. El 5.4 % de las muestras estuvo por debajo del LMR y en las

muestras restantes no se detectó el compuesto. La concentración máxima y mínima encontrada fue de 1.23 y 14.8 ng g⁻¹.

Cuadro 2.1. Concentraciones de clenbuterol en muestras analizadas en el municipio de Huimanguillo, Tabasco.

Muestra	Concentración ng g ⁻¹
H1	8.91 ± 0.17
H2	ND
H3	2.07 ± 0.08
H4	ND
H5	ND
H6	ND
H7	2.27 ± 0.16
H8	3.44 ± 0.24
H9	14.92 ± 0.74
H10	3.39 ± 0.24
H11	2.83 ± 0.66

ND= No detectado, H=Huimanguillo.

Cuadro 2.2. Concentraciones de clenbuterol en muestras analizadas en el municipio de Cárdenas, Tabasco.

Muestra	Concentración ng g ⁻¹
C1	2.48 ± 0.05
C2	ND
C3	ND
C4	ND
C5	ND
C6	3.64 ± 0.57
C7	3.69 ± 0.14
C8	9.48 ± 1.37
C9	ND
C10	1.23 ± 0.18
C11	5.56 ± 0.24
C12	ND
C13	2.63 ± 0.58
C14	2.29 ± 0.06
C15	2.42 ± 0.32
C16	2.55 ± 0.08
C17	2.55 ± 0.30
C18	ND
C19	1.85 ± 0.10
C20	2.29 ± 0.49
C21	3.57 ± 0.20
C22	ND
C23	ND
C24	ND
C25	ND
C26	3.07 ± 0.25

ND= No detectado, C=Cárdenas.

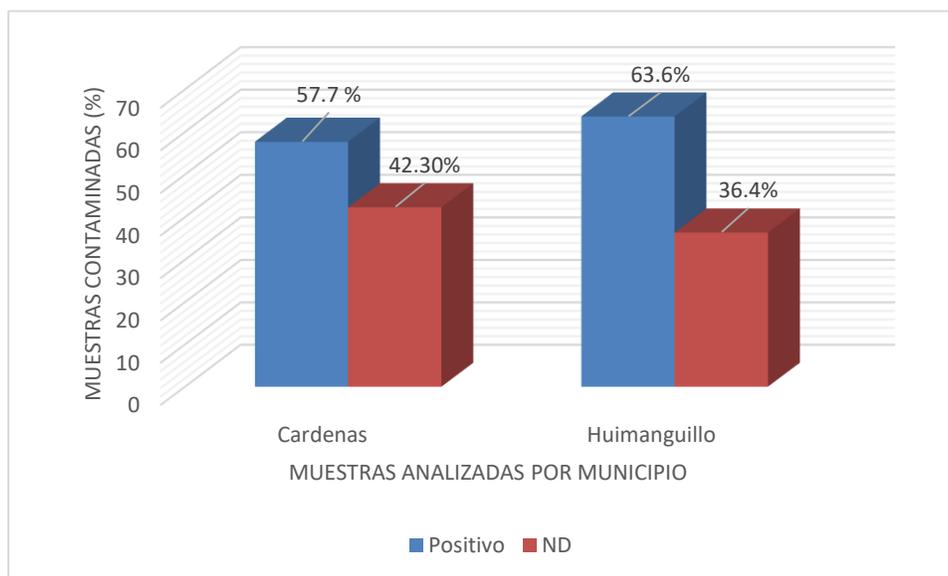
En el municipio de Huimanguillo, de 63.6 % de las muestras analizadas dieron positivas al análisis de clenbuterol, la concentración más baja fue de 2.27 ng g⁻¹ y la más alta de 14.8 ng g⁻¹, mientras que, para el municipio de Cárdenas, el rango estuvo de 1.23-8.85 ng g⁻¹ con de 57.7 % de muestras positivas.

Cuadro 2.3. Muestras contaminadas por municipio.

Origen	Positivo (%)	No Detectado(%)	Total
Cárdenas	15 (57.7)	11 (42.3)	26
Huimanguillo	7 (63.6)	4 (36.4)	11

Los dos municipios mostraron concentraciones por encima de LMR (>0.2 ng g⁻¹), en el municipio de Huimanguillo, todas las muestras que resultaron positivas estuvieron por encima del LMR, mientras que, para el municipio de Cárdenas, dos muestras estuvieron por debajo del LMR, siendo el primer municipio donde se encontraron las concentraciones más altas.

Figura 2.1. Porcentaje de muestras contaminadas con clenbuterol por municipio.



La prueba de medias muestra que no existe diferencia entre los residuos de clenbuterol encontrados en los dos municipios ($p > 0.05$). Es decir que los residuos de clenbuterol

encontrados en las muestras en el municipio de Cárdenas y Huimanguillo son iguales estadísticamente.

No se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de clenbuterol provenientes de Cárdenas y Huimanguillo, sin embargo, cuando se compararon los datos de las concentraciones por tipo de establecimiento se encontró diferencias entre las carnicerías y los supermercados. Ninguna de las muestras provenientes de supermercados resulto positiva al análisis de clenbuterol, mientras que en las carnicerías el 64.7% de las muestras dio positivo al análisis. Estos resultados son similares a los reportados por Olaya-Fernandez (2012) quien encontró diferencias entre muestreos realizados en tianguis, carnicerías y supermercados, siendo las concentraciones más altas las encontradas en tianguis y carnicerías locales

Los resultados encontrados confirman la presencia de clenbuterol, el 54 % de los establecimientos comerciales dedicados a la venta de carne registraron concentraciones superiores a los límites máximos permisibles por las normas nacionales e internacionales. Esto contrasta con los datos epidemiológicos de intoxicación por clenbuterol que muestran un progresivo decremento en el número de casos nuevos de 2006 en adelante (DGE, 2012).

Las concentraciones encontradas en este estudio son similares a datos reportadas por otros autores en México quienes también analizaron muestras de carne con un alto porcentaje de muestras contaminadas, no obstante, las concentraciones más altas han sido reportadas en muestras de hígado. En este estudio, la concentración más alta encontrada fue de 14.8 ng g⁻¹, otros autores han reportado concentraciones superiores, Flores *et al.* (2010) reporto concentraciones de hasta 637 ng g⁻¹ y Morales-Trejo *et al.*, (2013) concentraciones de 150 ng g⁻¹ ambos casos representan las concentraciones más altas reportadas en el país en la última década en muestras hígado, para el caso de carne Estrada-Montoya *et al.*, (2008) en Michoacán y Hernandez-Sanchez *et al.*, (2013) en Texcoco, México reportaron concentraciones de 3 y 4.5 ng g⁻¹ respectivamente, las cuales son inferiores a las encontradas en nuestro estudio. En los últimos años la Secretaria de Salud Pública ha clausurado rastros asociados al uso de clenbuterol, sin

embargo, en estos casos las concentraciones encontradas no han sido publicadas por lo que no se puede comparar.

La ausencia de casos de intoxicación reportados puede ser atribuida debido a que las concentraciones encontradas en músculo son menores a las necesarias para generar síntomas de intoxicación. En este estudio las concentraciones encontradas son menores a las reportadas por otros autores en brotes de intoxicación humana asociados al consumo de carne y/o hígado contaminado, Barbosa *et al.* (2005) reporto concentraciones de 300-1400 ng g⁻¹ en la cual 2 personas resultaron intoxicadas por el consumo de carne. Sin embargo, como Chávez-Almazán *et al.*, (2012) cita existe poca correlación entre el porcentaje de muestras contaminadas y el número de casos por intoxicación. El consumo de tejidos como el hígado proveniente de animales tratados representa mayor riesgo de envenenamiento que la carne debido a que en este tejido se acumula en mayores cantidades.

En Tabasco ya se había reportado el uso de clenbuterol: entre 2013-2014 se reportó la presencia de muestras contaminadas (4%) provenientes de rastros, matanzas rurales y tiendas de autoservicio, sin embargo, no se mencionó los niveles encontrados.

A nivel nacional, el uso de clenbuterol en el ganado bovino ha sido utilizado con fines diferentes a los terapéuticos a pesar de estar prohibido en la legislación nacional y, aún continúa utilizándose por algunos productores de ganado debido a sus efectos sobre las características de la canal, lo cual ha sido registrado en la literatura científica.

Como menciona Signorini, (2007) y Vilaboa-Arroniz *et al.* (2009), un alto porcentaje de la carne que se comercializa en México, así como en el sureste del país, proviene del sistema de comercialización denominado tradicional, el cual no está integrado al Tipo Inspección Federal (TIF), por lo que existe menos vigilancia y no se garantiza el cumplimiento de la normatividad vigente en la cadena productiva. Las carnicerías locales en su mayoría pertenecen a este sistema, mientras que, en el caso de los supermercados, la carne que se comercializa en este tipo de establecimientos cuenta con la certificación TIF, lo cual puede explicar la ausencia de residuos de clenbuterol en

las muestras de carnes adquiridas en supermercados a diferencia de la obtenida en carnicerías.

En la actualidad se ha puesto mayor énfasis en la composición de la carne, principalmente en el contenido de grasa por lo que la demanda de carne más magra por parte de los consumidores ha aumentado, esto podría ser un factor que influye en el uso del clenbuterol debido a que su uso disminuye el contenido de grasa de la canal.

2.4. CONCLUSIONES

No se encontró residuos de clenbuterol en las carnes de bovino provenientes de los supermercados.

La carne de bovino que se comercializa en las carnicerías de los municipios de Cárdenas y Huimanguillo del Estado de Tabasco presentan residuos de clenbuterol.

No se encontraron diferencias estadísticas en las concentraciones de residuos de clenbuterol en los dos municipios estudiados.

En las muestras de carne de bovino analizadas se detectaron niveles de clenbuterol superiores a los Límites Máximos de Residuos establecidos por el Codex Alimentarius de la FAO, lo que puede implicar un riesgo para la salud de los consumidores.

El número de muestras positivas al análisis de clenbuterol, así como las concentraciones presentes en las carnes analizadas sugieren que el clenbuterol posiblemente se utilizó ilegalmente como promotor de crecimiento los municipios de Cárdenas y Huimanguillo del Estado de Tabasco.

2.5. LITERATURA CITADA

- Barbosa, J., Cruz, C., Martins, J., Silva, J. M., Neves, C., Alves, C. & Da Silveira, M. I. (2005). Food poisoning by clenbuterol in Portugal. *Food Additives and Contaminants*, 22(6): 563–566.
- Barry, A. R. & Graham, M. M. (2013). Case report and review of clenbuterol cardiac toxicity. *Journal of Cardiology Cases*, 8(4): 131–133.
- Chávez Almazán, L. A., Díaz Ortiz, A. J., Pérez Cruz, B. & Alberto Alarcón, M. R. (2012). Tendencia de 2005 a 2010 de los niveles de clenbuterol en muestras de bovinos en Guerrero, México. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, 3(4): 449–458.
- Choo, J. J., Horan, M. A., Little, R. A. & Rothwell, N. J. (1992). Anabolic effects of clenbuterol on skeletal muscle are mediated by β 2-adrenoceptor activation. *The American Journal of Physiology*, 263(1): E50–E56.
- Codex Alimentarius Commission. (2015). Maximum Residue Limits for Veterinary Drugs in Foods Updated as at the 35th Session of the Codex Alimentarius Commission (July 2015). *CAC/MRL 2-2015*.
- Dirección General Epidemiológica (2012). Intoxicación alimentaria asociada al consumo de carne contaminada por clenbuterol. Distrito Federal, México, 2012.
- Estrada-Montoya, M. C., González-Córdova, A. F., Torrescano, G., Camou, J. P., & Vallejo-Córdova, B. (2008). Screening and confirmatory determination of clenbuterol residues. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 6(2): 130–136.
- Flores, R., Pacheco, C., Campos, C. A., Caraveo, J. M., & Carrión Gutiérrez, M. (2010). Clenbuterol en hígado de bovinos de un matadero municipal de Michoacán, México. *Ciencia Y Tecnología de los Alimentos*, 20(1): 1–4.
- Hernandez-Sanchez, D., Francisco Martinez, A., Osorio Reyes, J. P., Cobos Peralta, M. A., & Crosby Galvan, M. M. (2013). Niveles de clenbuterol detectados en carne de bovino distribuidos en Texcoco, Estado de México. *Agroproductividad*, 6(1): 17–22.

- Johnson, B. J., Smith, S. B. & Chung, K. Y. (2014). Historical overview of the effect of Beta-adrenergic agonists on beef cattle production. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 27(5): 757–766.
- Kearns, C. F. & McKeever, K. H. (2009). Clenbuterol and the horse revisited. *Veterinary Journal*, 182(3): 384–391.
- Kuiper, H. A., Noordam, M. Y., Schilt, R., & Roos, A. H. (1998). Illegal Use of b-Adrenergic Agonists : European Community. *Journal of Animal Science*, 76: 195–207.
- Li, L., Zhang, J., Tang, C., & Zhao, Q. (2014). Accumulation of clenbuterol residues in the hair of chinese simmental beef cattle during and after treatment. *Journal of Analytical Toxicology*, 38(1): 52–56.
- Meza-Marquez, O. G., Gallardo-Velazquez, T., Osorio-Revilla, G., & Dorantes-Ávarez, L. (2012). Detection of clenbuterol in beef meat, liver and kidney by mid-infrared spectroscopy (FT-Mid IR) and multivariate analysis. *International Journal of Food Science and Technology*, 47(11): 2342–2351.
- Morales-Trejo, F., Leon, S. V. Y., Escobar-Medina, A. & Gutierrez-Tolentino, R. (2013). Application of high-performance liquid chromatography-UV detection to quantification of clenbuterol in bovine liver samples. *Journal of Food and Drug Analysis*, 21(4): 414–420.
- SAGARPA (1999). Norma Oficial Mexicana NOM-061-ZOO-1999. Especificaciones zoosanitarias de los productos alimenticios para consumo animal. Diario Oficial de la Federación.
- Olaya-Fernandez, E. (2012). Residuos de clenbuterol en tejidos comestibles de bovino. Tesis de maestria. Universidad Autónoma de Chapingo.
- Ortiz, M., Valdivia, F. J., Martínez, R. & Martínez de A, A. (2000). Effect of clenbuterol on growth performance in broilers. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária E Zootecnia*, 52(3): 256–260.

- Pleadin, J., Gojmerac, T., Bratoš, I., Lipej, Z., Novosel, D. & Vulić, A. (2009). Clenbuterol residues in plasma and urine samples of food-producing pigs during and after subchronic exposure to a growth-promoting dose. *Food Technology and Biotechnology*, 47(1): 67–74.
- Ramos, F., Baeta, M. L., Reis, J. & Silveira, M. I. N. (2009). Evaluation of the illegal use of clenbuterol in Portuguese cattle farms from drinking water, urine, hair and feed samples. *Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 26: 814–820.
- Robison, N. E. (2000). Clenbuterol and the horse. *AAEP Proceedings*, 46(3): 229–223.
- Rose, M. D., Shearer, G., & Farrington William, H. H. (1995). The effect of cooking on veterinary drug residues in food : *Food Additives & Contaminants*, 12(1): 67–76.
- Salquèbre, G., Bresson, M., Villain, M., Cirimele, V. & Kintz, P. (2007). Clenbuterol determination in calf hair by UPLC-MS-MS: case report of a fraudulent use for cattle growth. *Journal of Analytical Toxicology*, 31(2): 114–8.
- Serratosa, J., Blass, a, Rigau, B., Mongrell, B., Rigau, T., Tortadès, M., Balagué, J. (2006). Residues from veterinary medicinal products, growth promoters and performance enhancers in food-producing animals: a European Union perspective. *Revue Scientifique et Technique*, 25(2): 637–653.
- Signorini, M. (2007). Evaluación de los riesgos de los rastros y mataderos municipales. *Nacaneh*, 1(2): 118–141.
- Vilaboa-Arroniz, J., Díaz-Rivera, P., Platas-Rosado, D. E., & Juárez Lagunas, F. (2009). Estructura de comercialización de bovinos destinados para el abasto de carne en la región del Papaloapan, Veracruz, México. *Revista Mexicana de Agronegocios*, 13(31): 831–854.
- Williams, P. E., Pagliani, L., Innes, G. M., Pennie, K., Harris, C. I. & Garthwaite, P. (1987). Effects of a beta-agonist (clenbuterol) on growth, carcass composition, protein and energy metabolism of veal calves. *The British Journal of Nutrition*, 57(3): 417–28.

Zhao, Z., Yao, T., Qin, Y., Yang, X., Li, J., Li, J. & Gu, X. (2015). Clenbuterol Distribution and Residues in Goat Tissues After the Repeated Administration of a Growth-Promoting Dose. *Journal of Analytical Toxicology*, 39(6): 1–7.