



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA, INVESTIGACIÓN

Y SERVICIO EN ZOOTECNIA

POSGRADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL

**RESIDUOS DE CLEMBUTEROL EN TEJIDOS COMESTIBLES DE
BOVINO**

TESIS

Que como requisito parcial
para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA

Presenta:

ERNESTO OLAYA FERNÁNDEZ

Bajo la supervisión de:

GILBERTO ARANDO OSORIO, Ph.D.

MAXIMINO HUERTA BRAVO, Ph.D.



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
ORIGEN DE EXÁMENES PROFESIONALES

Junio de 2012

Chapingo, Estado de México.

RESIDUOS DE CLEMBUTEROL EN TEJIDOS COMESTIBLES DE BOVINO

Tesis realizada por **ERNESTO OLAYA FERNÁNDEZ** bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA

DIRECTOR:



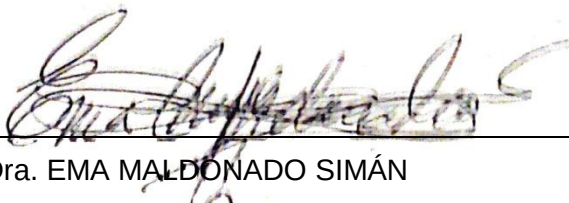
Ph.D. GILBERTO ARANDA OSORIO

CODIRECTOR:



Ph.D. MAXIMINO HUERTA BRAVO

ASESOR:



Dra. EMA MALDONADO SIMÁN

ASESOR:



Dr. JOSÉ ARTEMIO CADENA MENESES

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	v
LISTA DE FIGURAS	vii
DEDICATORIA	ix
AGRADECIMIENTOS	x
DATOS BIOGRÁFICOS	xi
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	2
2.1 Clembuterol	2
2.1.1. Farmacocinética del clembuterol	3
Absorción	3
Distribución	4
Excreción	7
2.2. Efecto y funciones del clembuterol	7
2.2.1. Efecto metabólico	7
2.2.2. Funciones terapéuticas	9
2.3. El clembuterol en la producción animal	10
2.4. Intoxicaciones por clembuterol	12
2.4.1. Síntomas de la intoxicación por clembuterol	15
2.5. Normatividad del clembuterol	17
2.5.1. En el mundo	17
2.5.2. Normatividad del clembuterol en México	18
2.6. Métodos para la detección de los β -agonistas	20
2.7. Residuos de clembuterol en tejidos de México	24
2.8. La industria de la carne de bovino en México	26
2.8.1. Estacionalidad de la producción	27

2.8.2. Distribución y comercialización de la carne	28
Tiendas de autoservicio	30
Carnicerías y puestos en centros urbanos.....	31
Tianguis	31
2.8.3. El consumo de carne en México	32
2.9. Literatura citada	34
3. RESIDUOS DE CLEMBUTEROL EN TEJIDOS COMESTIBLES DE BOVINO PROVENIENTE DE DIFERENTES CENTROS DE DISTRIBUCIÓN EN TEXCOCO, MÉXICO	44
3.1. Resumen.....	44
3.2 Abstract.....	45
3.3 Introducción	46
3.4. Materiales y Métodos	49
3.4.1. Muestreo	49
Manejo de las muestras	50
3.4.2. Análisis de laboratorio.....	50
Reactivos	50
Soluciones estándar	50
Kit NEOGEN	51
Kit RIDASCREEN clenbuterol fast.....	51
Extracción de clenbuterol y acondicionamiento de la columna	51
Extracción de clenbuterol en tejidos	51
Acondicionamiento de la columna C18.....	52
Análisis ELISA	52
Análisis con el kit NEOGEN.....	52
Análisis con el kit Ridascreen clenbuterol fast	52
3.4.3. Análisis estadístico	53

3.5. Resultados y Discusión.....	55
3.5.1. Por muestreo	55
3.5.2. Por centros de distribución.....	57
3.5.3. Por tipo de tejido	60
3.5.4. Probabilidad de riesgo	64
3.5.5. Comparación de los kits.....	65
3.6. Conclusiones	68
3.7. Recomendaciones	69
3.8. Literatura citada	70

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Proporción del tipo de β -receptores en algunos órganos y posible efecto a la administración del clenbuterol.	3
Cuadro 2. Concentración de clenbuterol administrado y su proporción de residuos en órganos.	4
Cuadro 3. Residuos del clenbuterol en tejidos de bovinos tratados con clenbuterol a diferente tiempo de retiro.....	5
Cuadro 4. Excreción del clenbuterol en diferentes especies.	7
Cuadro 5. Indicadores productivos de toretes finalizados con clenbuterol.	11
Cuadro 6. Comparación de los efectos de la administración de tres β -agonistas.	12
Cuadro 7. Intoxicaciones ocurridas en el mundo por consumo de tejidos con residuos de clenbuterol.....	13
Cuadro 8. Síntomas y su frecuencia de aparición por la intoxicación causada por consumo de tejidos con residuos de clenbuterol.	16
Cuadro 9. Especificaciones para la cantidad y tipo de muestras de animales vivos y sacrificados para su posterior análisis de residuos de clenbuterol.	23
Cuadro 10. Límite de residuos de clenbuterol en tejidos analizados con el método ELISA.....	24
Cuadro 11. Resultados de investigaciones de residuos de clenbuterol en diferentes tejidos distribuidos en México.	25
Cuadro 12. Frecuencia de las concentraciones de clenbuterol ($\mu\text{g kg}^{-1}$) encontradas por épocas de los muestreos.	57

Cuadro 13. Frecuencia de las concentraciones de clenbuterol ($\mu\text{g kg}^{-1}$) encontradas en los centros de distribución.....	60
Cuadro 14. Frecuencia de las concentraciones de clenbuterol ($\mu\text{g kg}^{-1}$) encontradas en los tejidos.	62
Cuadro 15. Probabilidad de riesgo de encontrar tejidos con residuos mayores a $2 \mu\text{g de clenbuterol kg}^{-1}$ provenientes de carnicerías y tianguis.	64
Cuadro 16. Estadísticos descriptivos de las muestras analizadas con diferente kit.	66
Cuadro 17. Coeficiente de variación de cada tejido en relación al kit evaluado.	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química del clenbuterol, adrenalina y noradrenalina.	2
Figura 2. Biotransformación del clenbuterol en mamíferos.....	6
Figura 3. Brotes y casos de intoxicación por consumo de tejidos con residuos de clenbuterol en España durante el periodo de 1989-2000.	13
Figura 4. Entidades con mayor número de casos de intoxicación por clenbuterol, durante el periodo de 2002 a 2006.....	15
Figura 5. Producción nacional de carne en canal de ganado bovino.....	26
Figura 6. Porcentaje productivo y producción de carne de las entidades con mayor producción de carne en canal bovina.	27
Figura 7. Distribución de la producción de carne en canal de ganado bovino 1998-2008.....	28
Figura 8. Esquema de la cadena de producción y comercialización de la carne bovina en México.	29
Figura 9. Consumo <i>per cápita</i> de carne de bovino en México durante el periodo de 2003-2011.....	33
Figura 10. Diagrama de muestreo realizado en los puntos de venta de los tres centros de distribución durante las dos estaciones de producción de carne en Texcoco, México.	49
Figura 11. a) Concentración promedio de los tejidos colectados por temporada de producción de carne b) Concentración promedio de clenbuterol ($\mu\text{g kg}^{-1}$) de los tejidos colectados en diferente época de muestreo en la ciudad de Texcoco, México.	56

Figura 12. Concentración promedio de clenbuterol ($\mu\text{g kg}^{-1}$) de los tejidos colectados en los tres centros de distribución ubicados en la ciudad de Texcoco, México.	58
Figura 13. Comportamiento de las concentraciones de clenbuterol de los tejidos por cada centro de distribución durante las tres épocas de muestreo.	59
Figura 14. Concentración promedio de residuos de clenbuterol ($\mu\text{g kg}^{-1}$) en hígado y músculo colectados en la ciudad de Texcoco, México.	61
Figura 15. Comportamiento de las concentraciones de clenbuterol en hígado y músculo colectados de cada centro de distribución durante las épocas de muestreo.	63
Figura 16. Concentración promedio de clenbuterol de los tejidos positivos a clenbuterol ($2 \mu\text{g de clenbuterol kg}^{-1}$ de tejido) acorde a SAGARPA.	64
Figura 17. Distribución y promedio de la concentración de los tejidos que presentaron concentraciones superiores a $2 \mu\text{g de clenbuterol kg}^{-1}$ analizados con el kit NEOGEN y posteriormente con RIDASCREEN.	65

DEDICATORIA

Como cada logro en mi vida, lo dedico a Ernesto Olaya Alonso y a Rosa María Fernández Paredes (mis padres), quienes contribuyeron de manera importante, con su apoyo moral y su entrega hacia mi persona, además de sus miles de hazañas que han realizado para concluir conmigo esta nueva meta.

A Sofía Olaya Fernández, Cesar G. Reyes Olaya, H. Dahí Reyes Olaya mis ejemplos de perseverancia y cariño.

A Cindy A. Gómez Armenta por contribuir con su granito de arena a este proyecto, por sus consejos y momentos que aminoraron la presión.

A mis amigos que sin importar la distancia me han acompañado en pensamiento, obra o misión: Javier Sánchez Arellano, Areli Domínguez Antonio, Humberto Gómez Grande, Jorge Díaz Martínez, Salvador Rodríguez, Tiburcio Martínez Martínez, Rodolfo Pacheco, Liliana Valdiviezo, Pamela flores, Paul Cortés, Miriam Resendiz, José Ángel Náfate Nuriasmú, Fredy Isrrael Constantino Perez.

A mis nuevos pero nada despreciables amigos: Luis Antonio Saavedra, Pedro Meda, José Luis Zepeda, Gilberto Maldonado, Renato Ortiz, Delfino Herrera, Leodan Tadeo, Oscar Rojas, Saúl Chirinos, Cisneros Jetzabel, Cuevas Reyna, González Juan, Saúl Hernández, Torres Elena, Liz Martínez, Isabel Carrillo, Ulises Quispe, Santiago Gómez Grande.

“Son muchas las personas que han contribuido a mi desarrollo personal y profesional, algunas me han acompañado y otras se encuentran en mis recuerdos, sin embargo, plasmar cada nombre en una hoja es tarea difícil, así que por si algún motivo no encuentras tu nombre es porque lo llevo guardado en mi pensamiento”. Atte. **E.O.F.**

AGRADECIMIENTOS

A mi Padre Celestial por esta maravillosa vida y por su guía para conquistar grandes victorias personales y profesionales.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico que me brindó para realizar mis estudios de posgrado.

A la universidad Autónoma Chapingo por su forma de existir loable y comprometida.

A todos los profesores del Posgrado en Producción Animal que contribuyeron de manera positiva a mi formación, en especial al Dr. Gilberto Aranda, al Dr. Maximino Huerta, al Dr. José A. Cadena, a la Dra. Ema Maldonado por contribuir en tiempo y dedicación para el finiquito de ésta meta.

Al Grupo Integral de Servicios Fitosanitarios ENA, S.A. de C.V. (GISENA) por su importante participación en el desarrollo de este trabajo.

Al grupo de residuos tóxicos del laboratorio GISENA por su atención y su invaluable amistad.

A mi familia y amigos que me acompañaron a lo largo del proceso.

"El agradecimiento es la memoria del corazón"

DATOS BIOGRÁFICOS



Datos personales

Nombre	Ernesto Olaya Fernández
Fecha de nacimiento	24 de Abril de 1986
Lugar de nacimiento	Martínez de la Torre, Veracruz
CURP	OAFE860424HVZLRR03
Profesión	Ingeniero Agrónomo Especialista en Zootecnia
Cédula Profesional	6397770

Desarrollo Académico

Bachillerato	Preparatoria Agrícola Universidad Autónoma Chapingo 2001-2004
Licenciatura	Departamento de Zootecnia, Universidad Autónoma Chapingo 2004-2008
Maestría	Posgrado en Producción Animal, Departamento de Zootecnia, Universidad Autónoma Chapingo 2010-2011

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Uno de los principales problemas para muchos países, es el suministro de alimentos inocuos y de calidad, suficientes para satisfacer las necesidades de una población en constante crecimiento. Ante esta situación la ganadería ha trabajado con la combinación de diferentes tecnologías que permitan lograr productos sin riesgos al consumidor y de mejor calidad en menor tiempo, siendo la adición de sustancias que permiten mejorar la asimilación de los nutrientes una de las herramientas más comunes en la producción pecuaria, tales como: prebióticos, probióticos, hormonas, antimicrobianos, modificadores metabólicos, entre otros (Casas *et al.*, 2005). El clenbuterol es uno de los modificadores metabólicos más conocido en el área de producción de carne, tema de estudio del presente trabajo debido al alto grado residual que deja esta sustancia en los tejidos comestibles y sus posibles repercusiones en la salud pública (Domínguez-Vara *et al.*, 2009).

En el Capítulo 2 se muestra una revisión bibliográfica, en la que se resume la información científica referente al clenbuterol y las características que lo distinguen, los efectos de esta sustancia y su distribución en los tejidos. Posteriormente se hace referencia a la normatividad aplicable al clenbuterol y las intoxicaciones presentadas por el consumo de tejidos con residuos de clenbuterol en el mundo y México, y finaliza con una revisión sobre la producción de carne de bovino en México, la estacionalidad de producción, además de la comercialización y distribución de la carne de bovino y su consumo nacional.

En el Capítulo 3 se presentan los resultados de un estudio en el que se determinó la concentración de clenbuterol en hígado y músculo de bovino evaluados por dos kits de ensayo inmunoenzimático ELISA de diferente laboratorio, tales tejidos fueron colectados de tres centros de distribución en dos épocas de producción de carne de bovino de la ciudad de Texcoco, Estado de México.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Clembuterol

El clembuterol o hidrocloreto de clembuterol es un β -agonista del grupo de los adrenérgicos, cuyo nombre químico es 4-amino-3,5 dicloro- α -terbutilaminometil-bencil alcohol, presenta una estructura química parecida a las catecolaminas como la adrenalina y noradrenalina (Figura 1). El clembuterol tiene un punto de fusión variable de 170-176 °C, soluble en metanol y etanol, moderadamente soluble en cloroformo e insoluble en benceno, siendo estas características dependientes de la casa comercial de donde provenga; su apariencia consta de ser un polvo microcristalino incoloro o ligeramente amarillo (Heitzman, 1996).

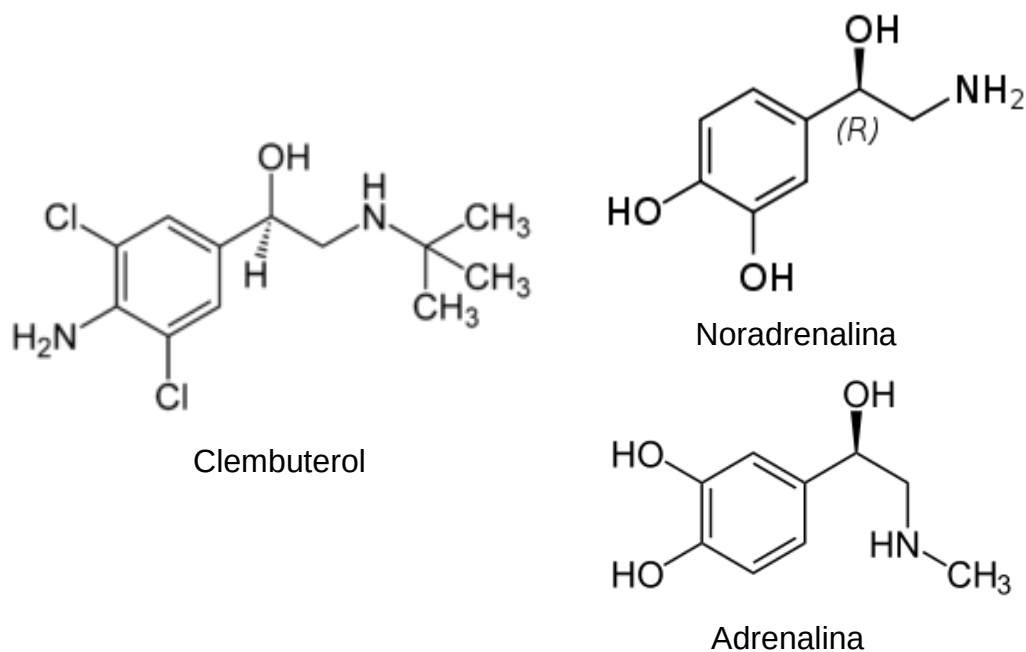


Figura 1. Estructura química del clembuterol, adrenalina y noradrenalina.

El clembuterol al principio se utilizó como una herramienta en la veterinaria debido a su acción broncodilatadora, descongestionante y tocolítica (González *et al.*, 1996; Mersmann, 2002). Posteriormente, se descubrió que a dosis diez veces superiores a las terapéuticas, presentaban una acción anabolizante,

favoreciendo la síntesis de proteína y disminuyendo la de grasa, lo que dio lugar a la denominación de este grupo como: agentes repartidores de energía. Este efecto se comprobó en diferentes especies animales: bovinos (Ricks *et al.*, 1984); ovinos (Baker *et al.*, 1984; Beerman *et al.*, 1987) y porcinos (Jones *et al.*, 1985).

2.1.1. Farmacocinética del clenbuterol

Absorción

Los sitios de absorción y el efecto del clenbuterol están en relación a la ubicación de los β -adrenoreceptores (Cuadro 1). El clenbuterol trabaja de manera similar a la de los transmisores adrenérgicos adrenalina-noradrenalina con propiedades selectivas a los receptores β_2 estimulantes y con un mínimo efecto a los β_1 y α , actuando sobre los terminales posganglionares del sistema nervioso simpático (Soria y Arias, 1997; Mersmann, 2002).

Algunos estudios localizan residuos de clenbuterol en corazón, pulmones, vaso, hígado, riñones, cerebro tejido adiposo, estómago e intestinos de bovinos tratados con esta sustancia (Smith y Paulson, 1997; Smith, 1998). El tiempo de absorción del clenbuterol depende de la vía de administración, por vía oral, la absorción alcanza los niveles máximos plasmáticos entre la 2^{da} y 3^{er} hora, sin embargo por vía subcutánea o intramuscular, es aún más rápida, alcanzándose las máximas concentraciones dentro de los 15-30 minutos después de la aplicación (Morgan, 1990; Moore *et al.*, 1994).

Cuadro 1. Proporción del tipo de β -receptores en algunos órganos y posible efecto a la administración del clenbuterol.

Órgano	Tipo de receptores	Efecto
Corazón	$\beta_1 > \beta_2$	Aumento de la fuerza de contracción, de la frecuencia cardíaca
Vasos sanguíneos	$\beta_2 > \beta_1$	Relajación
Tracto gastrointestinal	$\beta_2 > \beta_1$	Relajación
Músculo liso	$\beta_2 > \beta_1$	Relajación

Esfínter	$\beta_2 > \beta_1$	Relajación
Músculos bronquiales	$\beta_2 > \beta_1$	Relajación
Útero	$\beta_2 > \beta_1$	Relajación
Riñón	$\beta_1 > \beta_2$	Liberación de renina
Lipocitos	$\beta_2 > \beta_1$	Lipólisis
Músculo esquelético	$\beta_2 > \beta_1$	Glucogenólisis
Páncreas	$\beta_2 > \beta_1$	Liberación de insulina
Hígado	$\beta_2 > \beta_1$	Glucogenólisis

En los animales de laboratorio y humanos que fueron tratados con clenbuterol, mostraron un pico máximo de concentración de clenbuterol 2-4 h después de la administración, con una vida media plasmática que varió entre 16 y 105 h (Heitzman, 1996; FAO/OMS, 1998), sin embargo algunas investigaciones coinciden que la absorción en rumiantes es más lenta ya que el pico máximo de concentración se presentó 2 a 12 horas después de la administración (Heitzman, 1996).

Distribución

El clenbuterol se distribuye en casi todos tejidos debido a la ubicación de los β -adrenoreceptores. En la mayoría de las investigaciones sobre residuos de clenbuterol en tejidos de ganado bovino, coinciden que los niveles máximos de residuos se encuentran en ojo, hígado, riñones, y pulmones mientras que en el músculo y la grasa presentan los niveles más bajos (Cuadro 2) (Smith y Paulson, 1997; Smith, 1998).

Cuadro 2. Concentración de clenbuterol administrado y su proporción de residuos en órganos.

Órgano	Clenbuterol $\mu\text{g kg}^{-1}$	Proporción de los residuos de clenbuterol (%)
Pulmones	6.8	81
Hígado	2.2	44
Riñones	3.7	63
Corazón	0.9	64

Por su acción tocolítica en especies como las ratas, perras y babuinas gestantes puede atravesar la placenta y depositarse en el feto (Heitzman, 1996; Smith y Paulson, 1997; Smith, 1998). Algunos estudios muestran que la cantidad de residuos en tejidos es proporcional a la dosis así como al número de veces de la administración (Cuadro 3).

Cuadro 3. Residuos del clenbuterol en tejidos de bovinos tratados con clenbuterol a diferente tiempo de retiro.

Dosis y duración del tratamiento	Tiempo de retiro h	Hígado μg de clenbuterol kg^{-1}	Riñón	Ojo	Referencia
3 mg kg^{-1} de PV una dosis	48	5.04-0.23	5.90-3.71	256.00 ^x	Smith y Paulson, 1997
16 $\text{mg kg}^{-1}\text{d}^{-1}$ 30 d	0	85.90	16.71	60.00 ^z	Elliot <i>et al.</i> , 1995; Mersmann, 2002
	16	3.00	0.00	181.00	
	39	0.70	0.00	116.00	
5 mg kg^{-1} PV d^{-1} 21 d	0	39.00	32.70	118.00 ^y	Meyer y Rink, 1991
	3.5	1.60	1.20	57.50	
	14.0	0.60	<0.10	15.10	

^zResiduos de clenbuterol presentes sólo en la retina del ojo; ^y Residuos de clenbuterol presentes en el homogeneizado del ojo completo. ^x Residuos del compuesto sin biotransformar.

En diversos β -agonistas adrenérgicos se desconoce la relación cuantitativa entre el compuesto inicial y el de sus metabolitos. Tampoco ha quedado claro si los conjugados de clenbuterol son totalmente excretados, ya que posiblemente los que permanezcan sean susceptibles a la circulación enterohepática y estos sean convertidos a clenbuterol nuevamente en el tracto intestinal de los humanos (Figura 2) (Smith, 1998).

La biotransformación del clenbuterol difiere entre especies, por lo que se han identificado diferentes metabolitos, sin embargo, el principal componente identificado en estas especies ha sido el clenbuterol no metabolizado, seguido de los óxidos y conjugados con otras estructuras (Heitzman, 1996; Soma *et al.*, 2004). En el ganado bovino y caballar, algunos autores han identificado al clenbuterol no metabolizado como el principal residuo encontrado en orina e

hígado, también se han identificado pequeñas cantidades de ácido 4-amino-3,5-diclorobenzoico y ácido 4-amino-3,5-diclorohipúrico (Baillie *et al.*, 1980; Hawkins *et al.*, 1993), en músculo no se encontraron otros residuos a excepción del clenbuterol no metabolizado (Schmid, 1990).

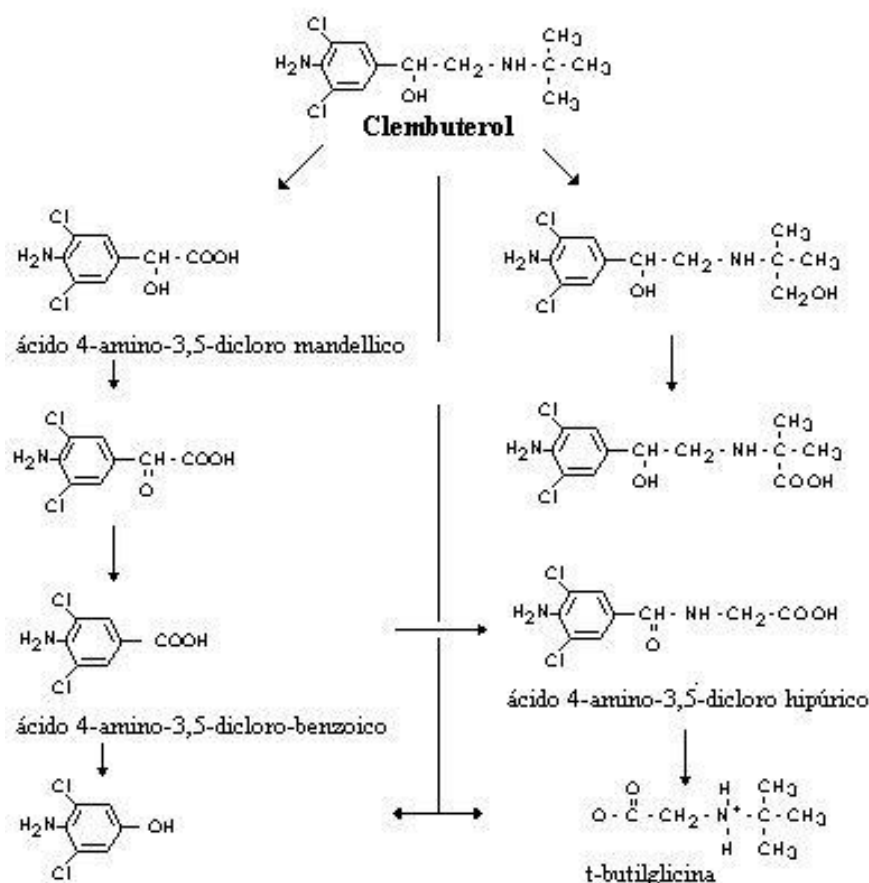


Figura 2. Biotransformación del clenbuterol en mamíferos.

Actualmente, se desconoce si los metabolitos del clenbuterol poseen un riesgo toxicológico para los humanos, sin embargo Zalko *et al.* (1997) sugieren que el clenbuterol n-hidroxiarilamina y n-nitroso, encontrados en la orina de ratas, son inestables y podrían transformarse de nuevo en clenbuterol bajo ciertas condiciones. No obstante, Smith (1998) menciona que los conjugados de ácidos glucorónicos pueden ser susceptibles a la hidrólisis (ya sea enzimática o ácida) y que la reabsorción del componente inicial podría ocurrir subsecuente a la hidrólisis en el intestino, en consecuencia si los conjugados de clenbuterol

presentes en tejidos comestibles están sujetos a la circulación enterohepática, entonces los análisis que miden el clenbuterol, pero no toman en consideración los metabolitos podrían tener una estimación equivocada del potencial toxicológico del compuesto en el tejido contaminado.

Excreción

El clenbuterol se excreta rápidamente y en gran proporción por la orina en forma de clenbuterol no metabolizado, y el resto se elimina en su mayor parte con las heces (Cuadro 4) (Prezelj *et al.*, 2003). En bovinos que se les administró clenbuterol (C14) por vía oral, inyección intramuscular e intravenosa resultó que 50 a 85% de la dosis se excretó en la orina, 5 a 30% se eliminó en las heces y una pequeña porción 0.9 a 3% por leche en vacas lactantes, 4 a 15 días después de la administración (Heitzman, 1996).

Cuadro 4. Excreción del clenbuterol en diferentes especies.

Especie	Tiempo de retiro (h)	Dosis en orina (%)	Dosis en heces (%)	Referencia
Ratones	0 a 72	62.5	20.8	Zalko <i>et al.</i> , 1998
Conejos	0 a 72 0 a 96	88.5 92	8.9 0.2 a 5	Yeung <i>et al.</i> , 1990
Perros	0 a 96	85 a 87	3.5 a 9	Yeung <i>et al.</i> , 1990
Caballo	0 a 336	75 a 91	6 a 15	Soma <i>et al.</i> , 2004

2.2. Efecto y funciones del clenbuterol

2.2.1. Efecto metabólico

Los efectos metabólicos están relacionados con la concentración tisular de Adenosín MonoFosfato cíclico (AMPc), a nivel muscular y hepático, la conversión de Adenosín TriFosfato (ATP) en AMPc se produce de manera acelerada al igual que la activación de distintas enzimas, fundamentalmente de tipo fosforilasa, que catalizan la transformación de glucógeno en glucosa, aunque también están implicadas otras, como proteincinasas, lipasas y

fosfofructocinasas, de esta manera, se produce una aceleración de la movilización de los ácidos grasos, formándose ácido láctico en sangre, hígado y musculatura esquelética, también presenta una tendencia especial hacia el incremento de la lipólisis o descenso de la lipogénesis (Del Barrio *et al.*, 1995).

En los tejidos adiposo y muscular, es el responsable de que los nutrientes sean dirigidos fuera de los depósitos grasos hacia la formación de proteínas (Martínez *et al.*, 1991), que contribuyen a la formación de musculatura al utilizarse las cadenas carbonatadas de los ácidos grasos libres, en la formación de aminoácidos (Sanz, 1995).

En el tejido adiposo aumenta el metabolismo de los lípidos en el adipocito, por tanto impiden y reducen, la síntesis y la esterificación de ácidos grasos dentro del triacilglicerol resultando en una reducción en el anabolismo de los lípidos en el adipocito, conduciendo a una hipertrofia reducida del adipocito, además, la activación de los receptores β -adrenérgicos, causa un aumento en el AMPc, que activa a la proteincinasa A, la cual a su vez fosforila a la hormona sensible a lipasa dando inicio a la lipólisis (Smith, 1998; Mersmann, 2002).

En el tejido muscular incrementa el adenosin monofosfato cíclico (AMPc); de manera que una proteína atraviesa la membrana celular siete veces, formando tres asas intracelulares y tres extracelulares a los que se unen la adrenalina y la noradrenalina (Ganong, 2001), aumentan la perfusión sanguínea hacia el músculo dando como resultado una mayor disponibilidad de energía y aminoácidos, en consecuencia aumenta la síntesis y retención de proteína que favorece la hipertrofia muscular, principalmente de los músculos del cuarto posterior del animal (Li *et al.*, 2000; Ekpe *et al.*, 2000; Castellanos-Ruelas *et al.*, 2006).

En el músculo, además de la hipertrofia, ocurren cambios en el tipo de fibra muscular y en la proporción de ARN de transcripción para proteínas musculares como la miosina y actina (Miller *et al.*, 1988). En ovinos y bovinos se ha

observado que aumenta el peso de los músculos en 40%, y que la magnitud de la respuesta varía dependiendo de la influencia de factores como la especie, la raza, la edad, el sexo y la concentración del clenbuterol en la dieta (Mersmann, 2002).

2.2.2. Funciones terapéuticas

Uno de los principales funciones del clenbuterol es servir como agente broncodilatador tanto en medicina humana como veterinaria (Martínez-Navarro, 1990), debido a que relaja la musculatura lisa de los bronquios y disminuye la resistencia de la vía aérea (Pascual *et al.*, 1994), lo que ha sido aprovechado para el tratamiento del asma en humanos y otras enfermedades respiratorias de tipo obstructivo (Masnatta y Rubio, 1992; Drennan y Yong, 1994).

También trabaja como agente tocolítico, por su capacidad para relajar la musculatura lisa del útero. Esta capacidad se aprovecha fundamentalmente en el área reproductiva en yeguas y vacas (Brocway *et al.*, 1987).

Otra función es ser estimulante cardíaco, por sus efectos cronotrópico e inotrópico positivos, lo que resulta de gran utilidad en tratamientos de urgencia de bradicardias producidas por bloqueo cardíaco o cuando es necesario aumentar la contractilidad miocárdica (Hughes *et al.*, 1983). En el tratamiento de varios procesos degenerativos, en estudios practicados sobre ratas a las que se les induce cierto tipo de tumores y se administra clenbuterol, demuestran que los efectos anabólicos del clenbuterol preservan la masa muscular y el contenido proteico, traducándose en una reducción del crecimiento del tumor (Hollenga *et al.*, 1990; Bates y Pell, 1991).

Para el tratamiento de enfermedades que van asociadas a un catabolismo muy elevado, como es el caso de grandes quemaduras, diabetes o denervación muscular (Chance *et al.*, 1991), retrasa la atrofia producida en ciertas lesiones musculares, como distrofias o atrofas debidas a la no movilización de los miembros. El efecto ejercido por el clenbuterol sobre la síntesis proteica, en los

casos de atrofia muscular, puede ser debido a posibles cambios en la capacidad del ARN en todo el músculo o sobre un nivel específico del ARNm, (Babij y Booth, 1988), o al fenómeno combinado de la reducción de la constante de degradación.

También puede servir como coadyuvante en el empleo de los agentes antiobesidad, ya que además de incrementar el índice metabólico, también estimula la síntesis proteica, lo que puede ayudar a prevenir la pérdida de masa magra corporal, asociada a la reducción de peso (Emery *et al.*, 1984). Los compuestos que tienen propiedades de lipomovilización, poseen un efecto antiobesidad usado comúnmente en roedores genéticamente obesos (Lafontan *et al.*, 1988).

2.3. El clenbuterol en la producción animal

El uso del clenbuterol como promotor de crecimiento en la producción animal se popularizó debido a que concentraciones superiores a las terapéuticas aumentan la síntesis de proteína y reducen la cantidad grasa de la canal de bovinos, ovinos, cerdos, así como en ratones y pollos.

De acuerdo con Ricks *et al.* (1984) la administración de clenbuterol en 10 y 500 mg de clenbuterol por torete d^{-1} mostró un aumento de la proteína muscular y en el contenido de agua de la canal, además que redujo la cantidad de grasa de la canal, también observaron que no había diferencias ($p < 0.05$) entre las ganancias diarias de peso, consumo diario y la eficiencia alimenticia cuando no se administraba clenbuterol y cuando se suplementaba con 10 mg torete d^{-1} , mientras que la dosificación de 500 mg torete d^{-1} redujo todos los parámetros (Cuadro 5). En ovinos alimentados con niveles de 0 a 100 μg de clenbuterol kg^{-1} de alimento se encontró la misma tendencia a aumentar la síntesis de proteína y disminuir grasa sin afectar el consumo diario (Baker *et al.*, 1984). En cerdos que fueron alimentados con 1 μg de clenbuterol kg^{-1} de alimento no se

encontraron diferencias en la ganancia diaria de peso durante tres y siete días, solamente se observó una reducción en la grasa de la canal (Smith, 1998).

Cuadro 5. Indicadores productivos de toretes finalizados con clenbuterol.

Observación	Clenbuterol mg torete ⁻¹ d ⁻¹		
	0	10	500
Ganancia diaria de peso (kg) ^z	1.21 ± 0.33	1.08 ± 0.27	0.68 ± 0.38**
Consumo de alimento (kg d ⁻¹) ^z	13.05 ± 2.17	12.09 ± 2.08	9.39 ± 2.04**
Eficiencia alimenticia ^z	0.09 ± 0.02	0.09 ± 0.01	0.07 ± 0.02*

^z Los valores presentados son los promedios ± desviación estándar.

*Medias en la misma fila son diferentes (p<0.05)

** Medias en la misma fila son diferentes (p<0.01)

En la avicultura, especialmente el pollo, a pesar de que el clenbuterol mostró la tendencia a reducir la grasa abdominal no funcionó como una opción rentable, debido a que los parámetros productivos como el consumo de alimento y la conversión alimenticia no fueron mejorados, además que la calidad genética de las líneas son suficientes para reducir el tiempo productivo de la especie (Dalrymple *et al.*, 1983; Ocampo *et al.*, 1998).

Algunas investigaciones muestran que el clenbuterol tiene un impacto superior a los análogos ractopamina y zilpaterol en la canal y en el rendimiento de la canal (Cuadro 6) (Strydom *et al.*, 2009). Sin embargo, su estado legal, la toxicidad residual y el impacto sobre la calidad del producto son características que ponen en desventaja el uso del mismo. Los resultados de Geesink *et al.* (1993) sobre la administración de clenbuterol a terneras mostraron la inhibición de las proteólisis *post-mortem* provocando que el tiempo de almacenado se prolongue para obtener una carne más suave. El almacenamiento prolongado requerido para el ablandamiento podría aumentar los costos de almacenamiento, además de que la ganancia de peso durante la etapa de la engorda puede ser opacada por la cantidad de agua que contiene la canal, al escurrimiento de la carne y pérdidas por la cocción. Teniendo en cuenta estos resultados, los beneficios económicos del uso del clenbuterol en la producción de carne debería ser cuestionada.

Cuadro 6. Comparación de los efectos de la administración de tres β -agonistas.

Variables	Control	Zilpaterol 6 ppm	Ractopamina 30 ppm	Clembuterol 2 ppm
Peso inicial. kg	504.7	503.2	503.3	506.3
Peso final. kg	568.6	575.5	582.7	572.1
Ganancia diaria de peso. kg	2.1	2.4	2.6	2.2
Conversión alimenticia. kg kg ⁻¹	6.6	5.4	5.2	5.0
Consumo de alimento. kg MS d ⁻¹	13.3	12.5	13.2	12.1
Peso canal. kg	339.1	353.5	346.1	355.0
Rendimiento de canal. %	59.6	61.4	59.4	62.1
Grasa riñón, pelvis y corazón. %	1.38	1.33	1.29	0.83
<i>M. longissimus</i> %				
Proteína	22.7	22.9	22.8	22.7
Grasa	1.70	1.01	1.18	0.98

Strydom *et al.*, 2009

2.4. Intoxicaciones por clembuterol

Con el uso del clembuterol como promotor de crecimiento en la producción animal, han aparecido casos de intoxicación en el mundo, siendo España el primer país con casos registrados de intoxicaciones por el consumo de hígado con residuos de clembuterol, no obstante durante el período comprendido entre los años 1990 y 2000, se declararon 47 brotes y 3 episodios aislados, con un total de 809 casos (Figura 3) (Martínez-Navarro, 1990; Hernández *et al.*, 2001).

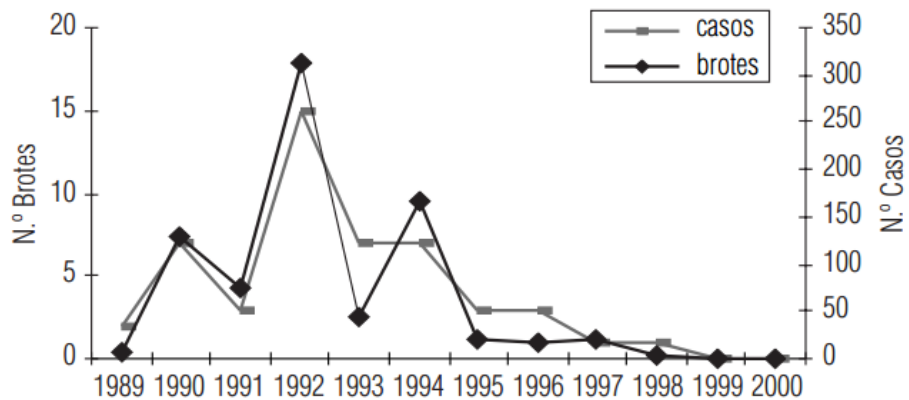


Figura 3. Brotes y casos de intoxicación por consumo de tejidos con residuos de clenbuterol en España durante el periodo de 1989-2000.

Las intoxicaciones ocurridas en el mundo por consumo de algún tejido de origen animal con residuos de clenbuterol se han presentado con gran variabilidad de concentración de residuos (Cuadro 7).

Cuadro 7. Intoxicaciones ocurridas en el mundo por consumo de tejidos con residuos de clenbuterol.

Año	País	Casos	Origen	Concentración (μkg^{-1})	Referencia
1990	España	125	Hígado de res	160 a 290	Martínez-Navarro, 1990
1990	Francia	113	Hígado de ternera	375 a 500	Pulce <i>et al.</i> , 1990
1992	España	22	Hígado de ternera	19 a 5395	Salleras <i>et al.</i> , 1995
1995	Italia	16	Carne de res	500	Ramos <i>et al.</i> , 2003
1996	España	15	Hígado de ternera	500	Bilbao-Garay <i>et al.</i> , 1997
1996	Italia	62	Carne de res	800 a 7400	Sporano <i>et al.</i> , 1998
1997	Italia	15	Carne de ternera	1140 a 1480	Brambilla <i>et al.</i> , 2000
1998	Portugal	10	Carne de borrego	9.7 a 343	Ramos <i>et al.</i> , 2003

1998	China	1750	Carne de cerdo	NR	Thomas, 2010
2000	Portugal	2	Hígado de res	1420	Ramos <i>et al.</i> 2003
2000	China	35	Carne de cerdo Hígado de cerdo	2 a 460 190 a 3060	Shiu y Chong, 2001
2002	México	132	Hígado de bovino	NR	García-López, 2002

NR. No registrada

China es uno de los países donde los casos de intoxicaciones por consumo principalmente de carne de cerdo, han sido recurrentes durante el periodo de 1998 a 2010 (Thomas, 2010).

México no ha sido la excepción, entre los años 2002 a 2008, se reportaron 2,130 casos de intoxicación por consumo de tejidos con clenbuterol. Las entidades que más casos de intoxicación han presentado son Jalisco, Distrito Federal, Guanajuato, Zacatecas y Michoacán, representado 85.4% del total (Jiménez *et al.*, 2011). De acuerdo con el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE, 2007) en México durante los años 2002 y 2006 se registraron un total de 1 300 casos de intoxicación por residuos de clenbuterol de los cuales fueron en Jalisco, D.F., Guanajuato, en Nayarit y en Hidalgo teniendo como alimento implicado en el 70% de ellos al hígado de bovino (Figura 4).

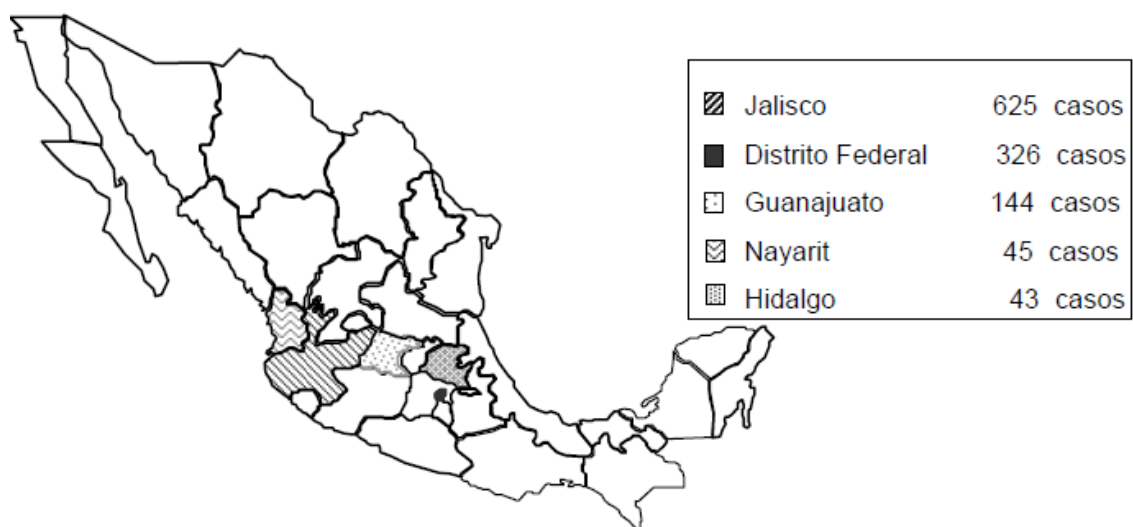


Figura 4. Entidades con mayor número de casos de intoxicación por clenbuterol, durante el periodo de 2002 a 2006.

En el año de 2011 la aparición de dopajes por clenbuterol en deportistas de alto rendimiento durante la Copa Oro de América, en la Copa Mundial de Fútbol sub-17 y en los XVI Juegos Panamericanos fue atribuida al consumo de alimentos de origen cárnico mexicano contaminado con residuos de clenbuterol, esto reveló las fallas operativas en el combate contra el uso del clenbuterol como promotor de crecimiento (CNN, 2011; El Universal, 2011). Ante esta situación se intensificaron operativos por parte de la COFEPRIS para la detección de clenbuterol en rastros de todo el país resultando en el cierre temporal de algunos de estos centros de matanza en los estados de Puebla, Guanajuato, México, Hidalgo, Guerrero, Jalisco, Morelos, Nayarit, Querétaro, Quintana Roo y Yucatán (AMEG, 2012).

2.4.1. Síntomas de la intoxicación por clenbuterol

El comité mixto de la FAO/OMS (1998) sin afán de proponer el uso del clenbuterol como promotor de crecimiento, basado en resultados de estudios *in vivo* de ratones de laboratorio, propuso el índice de la Ingesta Diaria Admisible (IDA) en $0.004 \mu\text{g}$ de clenbuterol kg^{-1} de peso vivo día^{-1} , teniendo en

consideración que está calculado con el fármaco clenbuterol, sin incluir a sus metabolitos.

El diagnóstico de una posible intoxicación por residuos de clenbuterol está basado en los signos y síntomas de activación simpática junto con la sospecha clínica de la ingesta de vísceras de bovino (hígado, principalmente), (Cuadro 8) (Marban-Arcos y López-Jiménez, 2011). El manejo integral de este padecimiento requiere de una total coordinación entre los responsables de la salud humana, que permitirá limitar los daños producidos por la ingesta inadvertida de esta sustancia.

Cuadro 8. Síntomas y su frecuencia de aparición por la intoxicación causada por consumo de tejidos con residuos de clenbuterol.

Síntomas	Frecuencia de aparición (%)
Taquicardia (120 latidos por min)	82
Temblores musculares	75
Nausea	74
Epigastralgias	68
Diarrea	50
Fiebre	36
Dolores de cabeza y mareos	36
Mialgias y astenia	22
Hipertensión (>150/80 mm Hg)	18
Vómito	18
Boca seca y cambios de voz	10

El periodo de la aparición de los síntomas puede variar dependiendo la cantidad de residuos que haya contenido el tejido, algunos autores registran que varía de 10 minutos hasta seis horas, mientras que la duración de los síntomas puede prolongarse entre 90 minutos hasta seis días (Salleras *et al.*, 1995; Brambilla *et al.*, 2000; Ramos *et al.*, 2004). De acuerdo con Salleras *et al.* (1995) la edad y el sexo no fueron determinantes para la aparición y duración de los síntomas.

La guía propuesta por Ramos *et al.* (2004) para casos de intoxicación por clenbuterol, recomienda realizar para el diagnóstico: una colección de orina y

sangre de los pacientes, para después realizar un hemograma y análisis de glucemia e hipocalemia, además de un electrocardiograma al paciente. También sugieren que es indispensable coleccionar el alimento sospechoso y preservar a -20 °C (para su posterior confirmación en un laboratorio especializado). El tratamiento recomendado por estos autores es la administración de β -bloqueadores y una intravenosa de cloruro de potasio (para corregir la hipocalemia) debido a que puede causar arritmias graves, sobre todo en pacientes que toman antiarrítmicos como la digoxina o de otro tipo de cardiotónicos. Sin embargo, debido a que la intoxicación puede persistir, puede ser necesario ampliar el tratamiento. Debido a la toxicidad de los residuos de clenbuterol en los alimentos, también sugieren que los pacientes sean vigilados de cerca, especialmente si sufren de una cardiopatía isquémica, hipertensión arterial, si necesitan diuréticos, o si están siendo tratados con medicamentos del mismo grupo terapéutico.

2.5. Normatividad del clenbuterol

2.5.1. En el mundo

Desde el año 1981 la comunidad económica europea empieza a regular el uso de ciertas sustancias químicas que, con efecto hormonal o promotor del crecimiento, puedan emplearse en la cría del ganado (Reig, 2008). Es hasta el 16 de septiembre de 1989 que se incluye a los β -agonistas en general y al clenbuterol en particular a la directiva 86/469/EEC, el cual prohíbe el uso de estas sustancias con fines de promotores de crecimiento, obligando a cada país del bloque a hacer una ampliación del Código Penal, tipificando el uso del clenbuterol en los animales cuyas carnes o productos se destinen al consumo humano, como delito contra la salud pública (Kuiper *et al.*, 1998).

En los Estados Unidos después de las intoxicaciones ocurridas en Europa y algunos casos similares en Texas, la FDA lanza en 1991 las primeras cartas de aviso sobre la posibilidad del uso ilegal del clenbuterol en alimento para

animales domésticos, no es hasta 1995 cuando el método para la determinación de residuos de clenbuterol en retina es validado, que se prohíbe el uso del clenbuterol en la alimentación animal y sólo se autoriza para su uso terapéutico en caballos. No obstante, el zilpaterol y la ractopamina se autorizan como promotores de crecimiento en ganado bovino. (Mitchell and Dunnavan, 1998).

2.5.2. Normatividad del clenbuterol en México

La Secretaría de Salud (SSA) lleva a cabo actividades referentes a la inocuidad de los productos cárnicos a través de la Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), y por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), a través del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), de acuerdo con sus ámbitos de competencia, en el cumplimiento respectivo de las leyes, reglamentos y normas oficiales mexicanas en dicha materia.

La SSA, vía la Ley General de Salud, establece las especificaciones sanitarias que aplican a los rastros municipales y sitios de matanza, así como en los establecimientos de expendio de los productos cárnicos. La NOM-194-SSA1-2004 indica que los productos de ganado bovino deberán estar libres de clenbuterol, y el cumplimiento de esta disposición corresponde a la COFEPRIS (que ejerce las atribuciones de regulación, control y fomento sanitarios) y a los gobiernos de las entidades federativas. De esta forma, se evalúan las condiciones sanitarias de los establecimientos y se toman muestras de alimentos para su análisis, con el objeto de proporcionar evidencia en el cumplimiento de las especificaciones sanitarias conforme a la ley, o en su defecto, dar los elementos para proceder a las medidas de seguridad, como la incautación del producto contaminado o sospechoso hasta la suspensión de actividades del establecimiento.

La SAGARPA realiza actividades de regulación y certificación referentes a las buenas prácticas pecuarias en unidades de producción primaria y de verificación en establecimientos Tipo Inspección Federal (TIF). En el año 2000 se emitió la norma oficial mexicana NOM-061-ZOO-1999, denominada: Especificaciones zoosanitarias de los productos alimenticios para consumo animal, en la cual queda explícitamente prohibido el uso de Clembuterol, así como de todos aquellos ingredientes y/o aditivos alimenticios que comprobadamente puedan ser nocivos para la salud pública o representen riesgo zoonosológico, y que no cuenten con el soporte técnico correspondiente para su empleo en la nutrición de los animales.

El 1º de marzo de 2002 se publicó en el Diario Oficial de la Federación la Norma Oficial de Emergencia NOM-EM-ZOO-2002: Especificaciones técnicas para el control del uso de beta-agonistas en los animales. El 25 de marzo de 2002, se publicó el acuerdo por el que se activó el Dispositivo Nacional de Emergencia de Sanidad Animal, que establece medidas para la detección del Clembuterol a nivel nacional e impedir su uso, además de que queda prohibida la producción, manufactura, fabricación, elaboración, preparación, acondicionamiento, transportación, tráfico, comercialización, importación, suministro y/o utilización de los siguientes principios activos como ingredientes activos, aditivos, alimenticios y/o medicamentos en formulación de productos alimenticios destinados para consumo y uso en animales, tales como: Bromobuterol, Carbuterol, Cimaterol y Clembuterol, entre otros, otorgándole un carácter enunciativo más no limitativo por lo que incluye cualquier beta-agonista conocido o de nueva creación.

En mayo de 2011 se enuncia el proyecto de modificación a la norma oficial mexicana NOM-004-ZOO-1994 que emite los límites máximos permisibles y procedimientos de muestreo para grasa, hígado, músculo y riñón en aves, bovinos, caprinos, cérvidos, equinos, ovinos y porcinos, donde se modifican en

el caso de los β -agonistas los límites máximos permisibles del clenbuterol, zilpaterol y ractopamina.

Queda establecido que en caso de no cumplir con estas normas se sancionará conforme a lo establecido por la Ley Federal de Sanidad Animal y la Ley Federal sobre Metrología y Normalización. Adicionalmente, ante la presunción de un hecho ilícito, la SAGARPA procederá a formular la denuncia correspondiente ante el Ministerio Público Federal.

De acuerdo a la Ley Federal de Sanidad Animal (2007) título Décimo Primero, capítulo IV de los delitos, artículos 172 y 173 sanciona: aquel que introduzca al territorio nacional o dentro de éste, transporte o comercie con animales vivos, sus productos o subproductos, que hayan sido alimentados con una sustancia cuyo uso esté prohibido para tal fin en las disposiciones de sanidad animal o de buenas prácticas pecuarias emitidas por la Secretaría se le impondrá una pena de cuatro a ocho años de prisión y multa de quinientos hasta tres mil veces el salario mínimo vigente en la zona económica en que se llevó a cabo el hecho y en caso de reincidencia se duplicará la pena y la multa.

Se han establecido programas como: el Programa Nacional de Residuos Tóxicos y Contaminantes en Carne y Productos de Origen Animal, así como el programa de Proveedor Confiable (Libre de Clenbuterol), también se ha fomentado el No Uso del Clenbuterol, con el Manual de Buenas Prácticas de Producción en la Engorda de Ganado Bovino en Confinamiento.

2.6. Métodos para la detección de los β -agonistas

Debido a la naturaleza, estructura y tamaño de la molécula de clenbuterol, existe una gran variedad de procedimientos analíticos que se han publicado en la literatura desde 1990, para la determinación de residuos de clenbuterol y otros β -agonistas en diferente tipo de tejidos. Los métodos para monitoreo incluyen a los ensayos inmunoabsorbentes ligados a una enzima (ELISA), a la cromatografía de líquidos (HPLC) y la cromatografía de gases (GC), mientras

que para la confirmación de tejidos positivos se necesitan métodos más sensitivos como la cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS), los cuales presentan límites inferiores de detección a 0.01 mg kg⁻¹ (Girault y Fourtillan, 1990; Heitzman, 1996).

Los ensayos inmunoenzimáticos permiten la detección de todos los compuestos capaces de unirse a un receptor, incluyendo las moléculas recién sintetizadas. El primer ensayo inmunoenzimático para análisis de clenbuterol fue descrito por Yamamoto e Iwata (1982) usado para determinar clenbuterol en plasma de humanos tratados por vía oral. La principal ventaja de estos métodos es la rapidez: el manejo de la muestra es fácil y sencillo cuando son pocas muestras, además de ser más barato que el uso de otro tipo de técnicas instrumentales como las cromatografías. El tiempo necesario para llevar a cabo un ensayo de placa de ELISA es menos de 6 horas para la mayoría de los kits, excluyendo la extracción y el límite de detección es generalmente cercano a 100 ng de clenbuterol mL⁻¹ (Yamamoto e Iwata, 1982; Kim and Kim, 1997). Los anticuerpos del ensayo inmunoenzimático son selectivos, sin embargo, existe una reactividad cruzada entre los análogos estructurales del clenbuterol. En un estudio realizado por Hahnau y Jülicher (1996) los anticuerpos del salbutamol mostraron 100% de reactividad cruzada con clenbuterol entre los kits de prueba. Actualmente los inmunoensayos se han convertido cada vez más específicos con la excepción de unos pocos sistemas que implican una reactividad cruzada con alguna mezcla de anticuerpos.

Algunos autores mencionan que el inmunoensayo puede ser utilizado para detectar la presencia de clenbuterol, pero los resultados positivos deben ser confirmados por métodos instrumentales, como la cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas, este tipo de métodos son muy costosos y tardados para trabajos de rutina, además de la preparación de la muestra consume tiempo y es más laborioso debido a que implica una hidrólisis, extracción, purificación y derivatización (Lin-Ying *et al.*, 2005).

La cromatografía de líquidos proporciona ventajas significativas sobre la cromatografía de gases para el análisis de clenbuterol, en este método no hay necesidad de derivatización, y el sistema cromatográfico es compatible con muestras biológicas, el desarrollo de interfaces de la cromatografía de líquidos como la termopulverización y electrospray ha permitido el análisis de clenbuterol en varias matrices como: orina, suero, plasma, hígado, pelo y retina, con límites de detección de 0.01 a 0.5 ng L⁻¹ (Lin-Ying, 2005). En lugar de detección por espectrómetro de masas, se han acoplado otros métodos instrumentales como: detectores electroquímicos y ultravioleta que proporcionan la sensibilidad necesaria para la confirmación de clenbuterol, sin embargo, la selectividad es menor que en el caso del detector selectivo de masas (Gratacós, 2007).

En México de acuerdo a las normas NOM-EM-015-ZOO-2002 y NOM-004-ZOO-1994 para la constatación de la presencia o ausencia de residuos de beta-agonistas en animales, las muestras deben ser procesadas en un laboratorio acreditado por la SAGARPA y bajo la utilización de cualquiera de los métodos analíticos oficiales siguientes:

- I. Ensayo Inmuno-enzimático (ELISA)
- II. Cromatografía de gases (CG)
- III. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

De acuerdo con la NOM-EM-015-ZOO-2002 las muestras en animales vivos y sacrificados se deben tomar por duplicado con características especiales (Cuadro 9).

Cuadro 9. Especificaciones para la cantidad y tipo de muestras de animales vivos y sacrificados para su posterior análisis de residuos de clenbuterol.

Tipo de muestra	Muestra	Cantidad
<i>Animales vivos</i>	Pelo, lana o pluma	2 g aproximadamente.
<i>Animales sacrificados</i>		
Bovinos, ovinos, caprinos y porcinos	Hígado	200 g aproximadamente.
	Globo ocular	Completo
	Músculo	200 g aproximadamente.
Aves	Ave completa	

De acuerdo con Centro Nacional de Servicios de Constatación de Salud Animal CENAPA (2002) y la NOM-004-ZOO-1994 el procedimiento para identificar un animal o tejido con residuos de clenbuterol es coleccionar la muestra sospechosa y dividirlo en dos submuestras para proceder a enviar solamente una muestra de tejido a un laboratorio certificado por la SAGARPA, donde se analizará con el método ELISA, el laboratorio está obligado a revelar un dictamen ya sea positivo o negativo de acuerdo a límites máximos de residuos permitidos (LMR) y la concentración determinada de dicho tejido, si la concentración rebasa los límites permitidos (Cuadro 10) son consideradas como muestras positivas y procede a analizar en el laboratorio del CENAPA con métodos confirmatorios (cromatografía de gases- espectrómetro de masa) para realizar el dictamen final y aplicar las sanciones según sea el caso.

Cuadro 10. Límite de residuos de clenbuterol en tejidos analizados con el método ELISA.

Muestra positiva	Límite máximo permitido $\mu\text{g kg}^{-1}$
Tejidos (Músculo e hígado)	2
Alimento	10
Orina	2
Retina	3
Suero	2
Pelo	6

Sin embargo la FAO/OMS (1998) a través de estudios analizados y el índice de ingesta diaria admisible (IDA) concluyó en recomendar como límites máximos de residuos (LMR) para tejidos del ganado bovino y equino las siguientes concentraciones: $0.2 \mu\text{g}$ de clenbuterol kg^{-1} en músculo y grasa, $0.6 \mu\text{g}$ de clenbuterol kg^{-1} en hígado y riñones, y $0.05 \mu\text{g}$ de clenbuterol litro^{-1} en leche de bovino. Estas concentraciones han servido como base para la regulación del clenbuterol como promotor de crecimiento en la Unión Europea y Estados Unidos de América.

2.7. Residuos de clenbuterol en tejidos de México

La presencia del clenbuterol como promotor de crecimiento se ha visto revelada por los casos de intoxicación ocurridos en la última década en México. En los laboratorios oficiales de la SAGARPA durante el periodo de 1999 a 2002, se analizaron 5,571 muestras de tejidos de las cuales el 23% resultó positivo a la presencia de clenbuterol en muestras procedentes de 25 entidades federativas, la mayor cantidad de muestras analizadas correspondió a pelo-pluma, suero sanguíneo e hígado, en las que los porcentajes de muestras positivas fueron 38, 30 y 31%, respectivamente, mientras que 45% de las muestras de orina fue positiva a residuos de clenbuterol (SAGARPA, 2007).

Se han realizado operativos federales y estatales por la SAGARPA y la Secretaría de Salud, así como investigaciones por parte de las instituciones de educación para monitorear los residuos de clenbuterol en tejidos comestibles, que demuestran el uso actual e irracional del clenbuterol como promotor de

crecimiento en la alimentación de ganado bovino en México. Existen resultados variables en cuanto a la existencia y concentración de clenbuterol en retina, músculo e hígado distribuidos en México, encontrando algunos tejidos con concentraciones superiores a las establecidas por la FAO/OMS (1998) y CENAPA (2002) (Cuadro 11).

Cuadro 11. Resultados de investigaciones de residuos de clenbuterol en diferentes tejidos distribuidos en México.

Lugar	Tejido	Resultados ^z	Referencia
Rastro Municipal Torreón, Coah.	Hígado	23.9%: 1.24 a 3.85 µg kg ⁻¹	Cisneros y Vázquez, 2003
Rastro TIF Durango	Hígado	100%: <0.07 µg kg ⁻¹	Cisneros y Vázquez, 2004
Mérida, Yucatán	Hígado	No detectado ^x	Ortiz <i>et al.</i> , 2005
Guerrero	Hígado	22.9%: Positivos ^y	SAGARPA-SSA de Guerrero, 2008.
Guadalajara	Retina de bovino	53.5%: 3.00 a 8.10 µg kg ⁻¹	Hernández <i>et al.</i> , 2006
Sonora	Músculo	12%: 3.06 a 6.12 µg kg ⁻¹ 26%: 0.50 a 1.83 µg kg ⁻¹	Estrada-Montoya <i>et al.</i> , 2008
Norte y Sur de México	Músculo	16%: 0.1 a 2.3 µg kg ⁻¹	Peña <i>et al.</i> , 2008

^zLos resultados presentados equivalen al porcentaje de tejidos encontrados con la concentración determinada.

^yEl dictamen solamente fue positivo o negativo con el criterio base de 2 µg de clenbuterol kg⁻¹.

^xEl método de análisis de laboratorio no detectó residuos de clenbuterol en las muestras.

En los resultados del programa nacional de monitoreo y control de residuos tóxicos y contaminantes en alimentos de origen animal, procedentes de plantas y establecimientos TIF durante el periodo 2008 a 2010, no se encontraron residuos de clenbuterol en tejidos provenientes de este sistema de matanza, sin embargo otros estudios realizados en rastros municipales han encontrado tejidos con concentraciones de clenbuterol superiores a las permitidas (Cisneros y Vázquez, 2003; Moreno *et al.*, 2010; Moreno, 2011).

2.8. La industria de la carne de bovino en México

La producción de carne de bovino es una de las actividades fundamentales del sector pecuario nacional ya que, la ganadería se desarrolla en aproximadamente 110 millones de hectáreas, lo que representa alrededor del 60% de la superficie del territorio nacional (Ruíz, 2004).

Los sistemas de producción van desde los más altamente tecnificados e integrados hasta los tradicionales. Existen tres regiones ganaderas: la región norte, árida y semiárida, cuya producción ha estado históricamente integrada a la producción del sur de Estados Unidos. Las regiones tropical y templada del centro, están orientadas fundamentalmente al abasto del mercado interno (FIRA, 2010). De acuerdo con cifras del INEGI (2011) la carne de bovino contribuye con 28.4% del valor de la producción pecuaria.

Entre los años 2001 a 2010 la producción nacional de carne en canal de bovino en México ha crecido para ubicarse en 1.7 millones de toneladas (Figura 5) (SIAP, 2011).

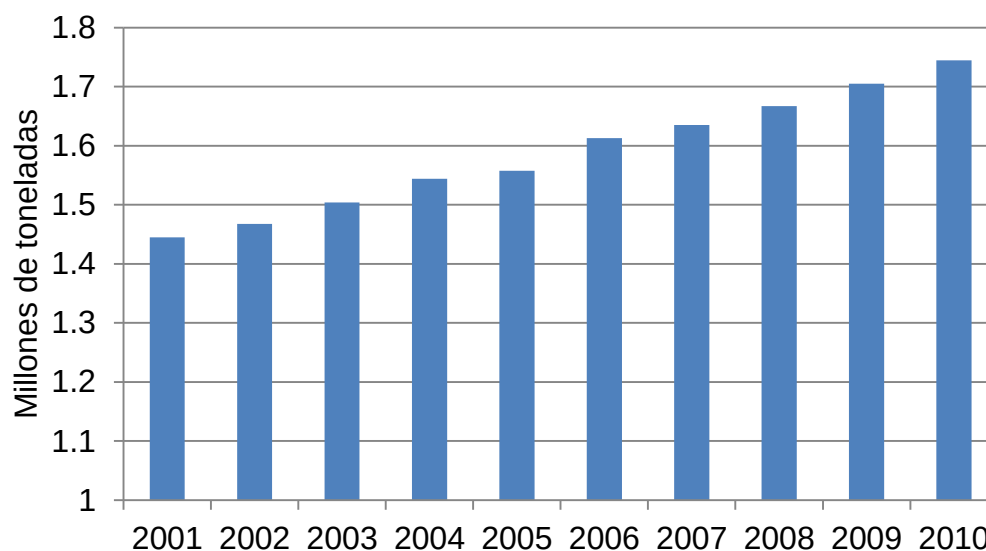


Figura 5. Producción nacional de carne en canal de ganado bovino.

En México se produce carne en todas las entidades del país, siendo el Estado de Veracruz el mayor productor con 261 mil toneladas de carne de bovino en

canal durante 2010, en orden de importancia, le siguen Jalisco, Chiapas, Chihuahua, Sinaloa y Sonora, respectivamente (Figura 6). Por lo que en cinco entidades federativas se concentra más del 40% de la producción de carne bovina nacional (SIAP, 2011).

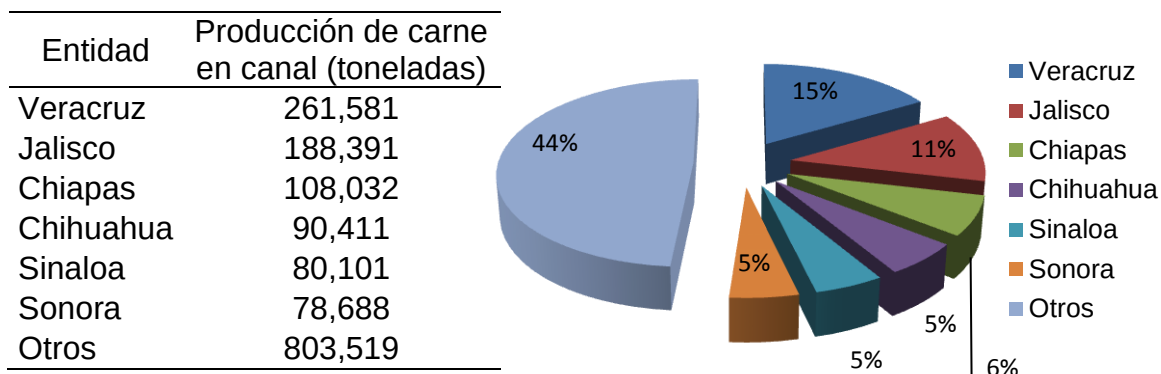


Figura 6. Porcentaje productivo y producción de carne de las entidades con mayor producción de carne en canal bovina.

2.8.1. Estacionalidad de la producción

En México la producción de carne bovina presenta variación a lo largo del año, atribuible a los aspectos como: el factor climatológico basado en la disponibilidad de forraje que impacta en forma directa a los sistemas de producción extensivos, donde está ubicada principalmente la ganadería bovina, y los cambios en la demanda a lo largo del año. Estos aspectos han generado la imposición de patrones de producción, los cuales permiten ajustar los niveles de oferta en los que incurre el mercado (Ramírez, 2009; Tellez, 2011).

Así también, se ha observado que el consumo de carne es influenciado por el aumento o disminución del poder adquisitivo del consumidor, así se tiene que, en los primeros meses del año disminuye la demanda de cárnicos como consecuencia de los fuertes gastos que la población realiza a finales del año anterior; la disminución se acentúa en el periodo de cuaresma que dura aproximadamente mes y medio; en el siguiente cuatrimestre la demanda es igual al promedio anual; y en el último periodo se presenta un fuerte aumento

en el consumo de carne como consecuencia de las fiestas religiosas o de fin de año (Figura 7) (ASERCA, 2000).

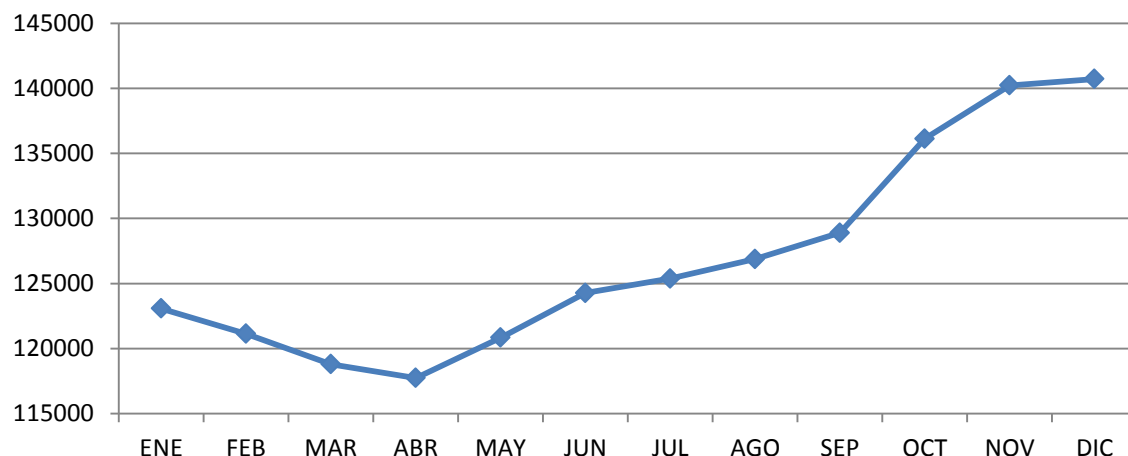


Figura 7. Distribución de la producción de carne en canal de ganado bovino 1998-2008.

2.8.2. Distribución y comercialización de la carne

Aproximadamente el 60% de la carne producida en el país se comercializa en forma de canal caliente, lo que afecta la calidad e inocuidad para el consumidor, el resto se realiza a través de otros canales donde se mantiene la cadena de frío. La distribución de la carne de origen nacional, ya sea en medias canales o cortes primarios, se efectúa principalmente por intermediarios (mayoristas o tablajeros) que adquieren su mercancía en rastros municipales o clandestinos y en menor proporción, a través de las cadenas de tiendas de autoservicio que son abastecidas por plantas TIF(Figura 8) (Aranda *et al.*, 2008; SIAP, 2010).

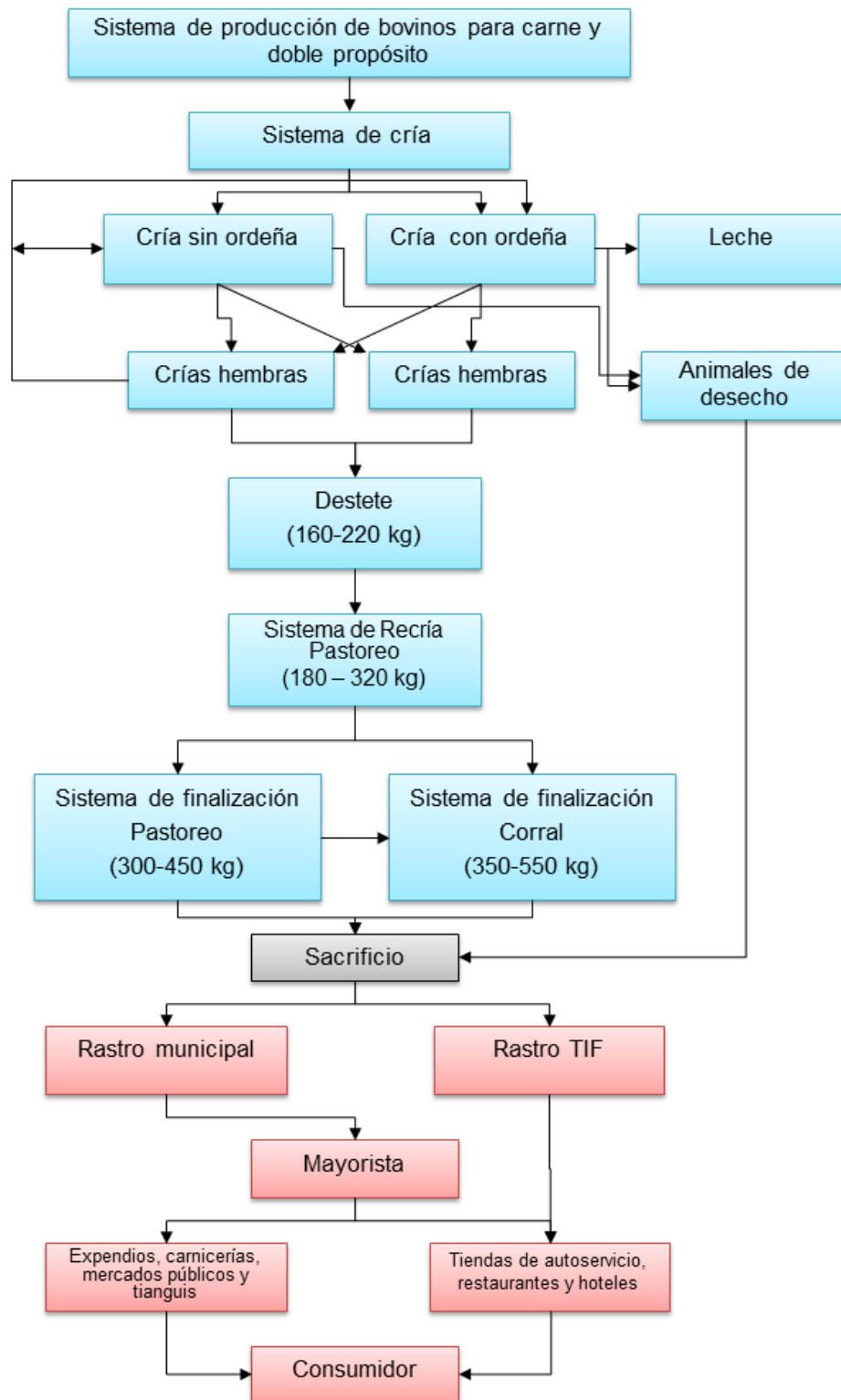


Figura 8. Esquema de la cadena de producción y comercialización de la carne bovina en México.

De acuerdo con el SIAP (2010) existen dos tipos de comercialización: uno denominado integrado, donde están relacionados todos los procesos de la cadena de producción y comercialización, en el cual participan los agentes: ganadero, engordador, e intermediario que transporta el ganado a las plantas TIF; de ahí el transportista lleva la carne en canal o en cortes primarios a los grandes centros urbanos y finalmente, al detallista que ofrece el producto al consumidor final. Este proceso se caracteriza por tener un estricto control sanitario, supervisado desde la recepción del animal hasta el sacrificio. Las principales tiendas de autoservicio que participan en este proceso son: Comercial Mexicana, Soriana, Casa Ley entre algunas otras; igualmente cadenas de restaurantes y hoteles y las comercializadoras de cortes finos.

El segundo esquema de comercialización que se denomina tradicional o no integrado, es aquel esquema donde cada etapa se lleva sin asociación, en la que el productor del ganado o el intermediario transporta los animales al rastro municipal, pagando una cuota por la maquila del sacrificio, de ahí pasa al acopiador o introductor para que lo transporte a los lugares de consumo expuesta para su venta en la percha, siendo transportadas a carnicerías o mercados públicos.

Ante esta situación se han desarrollado diferentes formas para la venta de carne, tanto fresca como procesada, presentadas a continuación:

Tiendas de autoservicio

Actualmente en México, se está dando una fuerte concentración de la producción y el comercio de alimentos en un reducido número de empresas, lo que genera nuevos escenarios y retos para este sector. Esto se refleja en que los supermercados, los cuales comercializan 46% de la venta de alimentos del país (González, 2001). En México se cuenta con grandes cadenas de autoservicio: Wal-Mart, Soriana, Chedraui y Comercial Mexicana; clubes como Costco y Sam's Club, que se empezaron a instalar en 1991 en las grandes

ciudades, estos centros están enfocados hacia las clases de ingresos altos, quienes demandan productos de importación y que además pueden adquirirlos en grandes volúmenes y con sistemas de descuento. Cabe mencionar que en este tipo de establecimientos el consumo de carne se realiza principalmente por cortes.

El establecimiento de grandes supermercados regionales ha facilitado el rápido crecimiento en las importaciones de carne, debido a la facilidad del manejo, a la infraestructura de transporte y almacenamiento, así como a su bajo precio (López, 1996). Por otro lado, la AMEG (2006), afirmó que la carne congelada mexicana domina 80% de los anaqueles de los supermercados y el resto es ocupado por carne proveniente de Estados Unidos, debido al brote de la enfermedad de las vacas locas en dicho país y al hecho de que un mayor volumen de carne cuenta con el sello TIF exigido por las tiendas de autoservicio.

Carnicerías y puestos en centros urbanos

Este centro de comercialización de la carne ha aumentado como consecuencia del crecimiento de las ciudades y de las áreas urbanas, en cuyas carnicerías se ofrece carne fresca y en algunas de ellas se procesan algunos tipos de carne. Su importancia radica en que se encuentran en prácticamente en todas las colonias y áreas urbanas de las ciudades, los que se encuentran en este centro de distribución se abastecen principalmente de productores de ganado locales. (González, 2001).

Tianguis

El término tianguis viene del náhuatl *tianquiztli* que significa mercado, el cual ha existido en mesoamérica desde la época prehispánica, y que ha evolucionado en forma y contexto social a lo largo de los siglos, este establecimiento difiere del comercio ambulante, siendo de gran tradición y se realiza en un día

específico, con la oferta de gran variedad de productos (Marquez, 2001; RAE, 2011).

La procedencia de la carne y los subproductos que están a la venta en este centro de distribución es incierta y debido a su naturaleza es un comercio difícil de regular (AMEG, 2011).

De acuerdo con Aguilar (2005), los resultados recabados en los censos económicos de 1988, mostraban que en México existían 5 mil 756 supermercados o tiendas de autoservicio, mientras que comercios de alimentos al por menor como son: mercados, tianguis y otras concentraciones había cerca de 11 mil 832. Para el censo económico del año 2004 el número de supermercados y tiendas de autoservicio aumentó a 23 mil 183 lo que restó espacio y presencia a los mercados tradicionales.

2.8.3. El consumo de carne en México

El consumo *per cápita* de la carne de bovino disminuyó durante el periodo 2003-2011 a una tasa mínima de 3.1% anual (Figura 9), por lo que en el 2011 el consumo *per cápita* fue de 16.5 kg de carne por persona, sin embargo al parecer la tasa de crecimiento de la población supera a la del consumo aparente, debido que el consumo aparente presenta una tendencia creciente, presentando un crecimiento anual del 1%(FIRA, 2011).

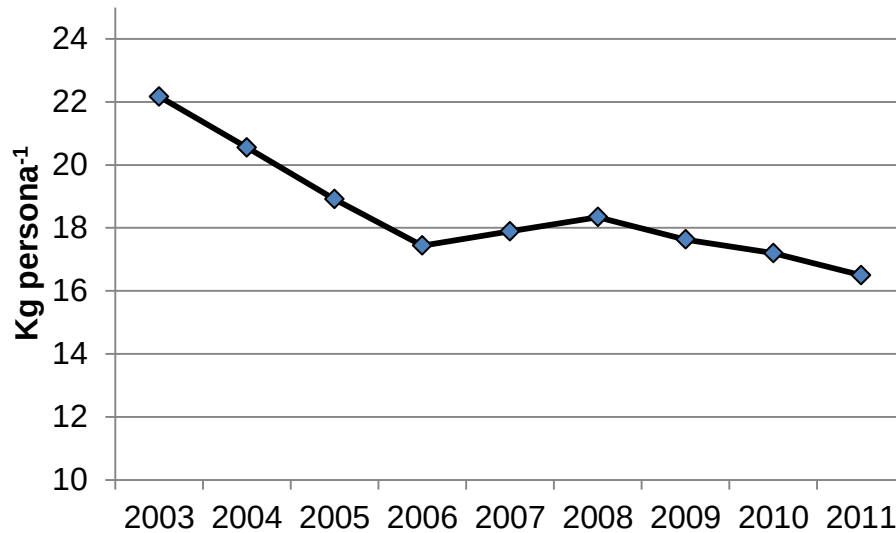


Figura 9. Consumo *per cápita* de carne de bovino en México durante el periodo de 2003-2011.

De acuerdo con los datos de la Encuesta Nacional de Ingresos y Gastos en los Hogares (ENIGH) que publica el INEGI sobre total del gasto destinado para la compra de las carnes, la carne de bovino ha ocupado el primer lugar seguida de la carne de aves, durante el periodo correspondiente del 2000 al 2006 (FIRA; 2011).

En México el consumo de carne de bovino se realiza bajo dos grandes sistemas: a) el consumo de carnes frescas, b) el de los productos industrializados entre los que se encuentran las carnes frías y embutidos. El consumo de carnes frescas puede abastecerse de tres destinos: el rural, el de pequeños centros de población y el de las grandes ciudades. Estos destinos son caracterizados por el uso de la carne y el aprovechamiento parcial o integral por parte del consumidor, ya sea de manera directa o por medio de comercialización o puntos de venta, así como por el origen del propio abasto (ASERCA, 2000).

En el mercado nacional existe una diferencia en el consumo de carne acorde al tipo de corte, siendo preferidos los de tipo americano en los estados del norte y los de tipo español en el centro y sur del país, que a nivel de detalle

representan 78% del volumen comercializado (ASERCA, 1995). Sin embargo Tellez (2011) reportó que los consumidores de carne del Valle de México demandan principalmente cortes populares: bistec, molida y retazo (62.7%), mientras que la demanda de cortes especiales como *rib-eye*, *T-bone* y *sirlon* fue de 0.7% de la población, además que el consumo de carne de bovino en relación al tipo de establecimiento donde adquiere la carne, muestra que 24.9% adquiere la carne en tiendas de autoservicio, 34.5% la adquisición de la carne es en mercados públicos, 25.5% en las carnicerías de barrio y 5.1% en tianguis o mercados sobre ruedas.

2.9. Literatura citada

- Aguilar, J. A. 2005. Hábitos del consumo ¿Adiós al mercado tradicional?. Revista del consumidor PROFECO. 19-21
- AMEG. 2006. Logra carne mexicana más presencia. <http://fox.presidencia.gob.mx/buenasnoticias/?contenido=28380&pagina=1>. Consultado el 11 de marzo de 2010.
- AMEG. 2011. Venden carne sin control en tianguis. <http://www.ameg.org.mx/noticias/venden-carne-sin-control-en-tianguis>. Consultado el 11 de marzo de 2010.
- AMEG. 2012. Suspende COFEPRIS rastros de Puebla y San Martín Texmelucan por clenbuterol. <http://www.ameg.org.mx/noticias/suspende-cofepris-rastros-de-puebla-y-san-martin-texmelucan-por-clenbuterol/>. Consultado el 30 de marzo de 2012.
- Aranda O., G., O. García J., A. Monzón J., G. Hernández A., y N. Ortega G. 2008. ¿Qué implica comer carne de res en México?. Revista Extensión al Campo 2:10-11.
- Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria (ASERCA). 1995. El ganado vacuno en México. Claridades Agropecuarias 23: 19-25.
- Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria (ASERCA). 2000. Cárnicos. Claridades Agropecuarias 87: 39 -40.
- Babij, P., y F. W. Booth. 1988. Clenbuterol prevents or inhibits loss of specific mRNAs in atrophying rat skeletal muscle. American Journal of Physiology 254: 657-660
- Baillie, H. W., B. D. Cameron, G. H. Draffan, and J. Schmid. 1980. Investigations of the placental transfer of ¹⁴C-N-AB 365 CL in the cow. No. 111674 de la base de datos de la OMS.

http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_876_spa.pdf. Consultado el 24 de abril de 2011.

- Baker, P.K., R. H. Dalrymple, D. L. Ingle, C. A. Ricks. 1984. Use of a β -adrenergic agonist to alter muscle and fat deposition in lambs. *Journal of Animal Science* 59: 1256-1261.
- Bates, P. C., and J. M. Pell. 1991. Action and interaction of growth hormone and the β -agonist clenbuterol, on growth, body composition and protein turnover in dwarf mice. *British Journal of Nutrition* 65: 115-129.
- Beerman, D.H., W. R. Butler, D. E. Hogue, V. K. Fishell, R. H. Dalrymple, C. A. Ricks, C. G. Scanes. 1987. Cimaterol-induced muscle hypertrophy and altered endocrine status in lambs. *Journal of Animal Science* 65: 1514-1524.
- Bilbao-Garay, J., J. F. Hoyo J., M. López J., M. Vinuesa S., J. Perianes M., P. Muñoz M., y J. Ruiz G. 1997. Clenbuterol poisoning, clinical and analytical data on an outbreak in Móstoles, Madrid. *Revista Clínica Española* 197(2):92-95.
- Brambilla, G., T. Cenci, F. Franconi, R. Galarini, A. Macri, F. Rondoni, M. Strozzi, A. Loizzo. 2000. Clinical and pharmacological profile in a clenbuterol epidemic poisoning of contaminated beef meat in Italy. *Toxicology Letters* 114:47-53.
- Brockway, J. M., J. C. Macrae, and P. Williams. 1987. Side effects of clenbuterol as a repartitioning agent. *The Veterinary Record* 18:381-383.
- Casas, E., P. M. Corva, R. Felmer, L. C. Regitano, A. M. Sifuentes, y A. Duarte. 2005. La biotecnología aplicada a la producción animal en las Américas. http://www.iica.int/foragro/cd_prior/Docs/BiotAn.pdf Consultado el 2 de diciembre de 2011.
- Castellanos-Ruelas, A. F., J. G. Rosado-Rubio, L. A. Chel-Guerrero, y D. A. Betancur-Ancon. 2006. Empleo del zilpaterol en novillos con alimentación intensiva en Yucatán, México. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal* 14 (2): 56-59.
- Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal (CENAPA). 2002. Ensayo Inmunoenzimático para el análisis cuantitativo de Clenbuterol y otros β -agonistas. Nota Técnica 12 p.
- Cisneros A., J. V., y M. S. Vázquez M. 2004. Identificación de clenbuterol en hígados de bovinos sacrificados en un establecimiento (Rastro) TIF de Torreón, Coahuila. *In: Memoria de la XV Semana Internacional de Agronomía FAZ-UJED, Gómez Palacios Durango* 8 a 10 de septiembre. 466-470 pp.
- Cisneros A., J. V., y M. S. Vázquez M. 2003. Detección de clenbuterol en hígados de bovinos sacrificados en rastros del municipio de Durango. *In:*

- Memoria de la XV Semana Internacional de Agronomía FAZ-UJED, Gómez Palacios Durango 8 a 10 de septiembre. 479-484 pp.
- Chance, W. T., D. Von-Allmen, D. Benson, F. S. Zhang, and S. E. Fischer. 1991. Clenbuterol decreases catabolism and increases hypermetabolism in burned rats. *The Journal of Trauma* 31 (3): 365-370.
- CNN. 2011. 109 mundialistas de la Sub-17 en México dieron positivo al clenbuterol. <http://mexico.cnn.com/deportes/2011/10/17/109-mundialistas-de-la-sub-17-en-mexico-dieron-positivo-al-clenbuterol>. Consultado el 20 de enero de 2012.
- Dalrymple, R. H., C. A. Ricks, P. K. Baker, J. M. Pensack, P. E. Ginger, and D. L. Ingle. 1983. Use of the β -agonist clenbuterol to alter carcass composition in poultry. *Poultry Science* 42:668.
- Del Barrio, A. S., M. A. García-Calonge, A. Fernández-Quintela, E. Simón, M. P. Portillo, L. Astiasaran, and J. A. Martínez. 1995. Effects of the beta-adrenergic agonist salbutamol and its withdrawal on protein metabolism of lambs. *Annals of Nutrition and Metabolism* 39: 317-324.
- Domínguez-Vara, I. A., J. Mondragón-Ancelmo, M. González R., F. Salazar-García, J. L. Bórquez-Gastelum, y A. Aragón-Martínez. 2009. Los β -agonistas adrenérgicos como modificadores metabólicos y su efecto en la producción, calidad e inocuidad de la carne de bovinos y ovinos: una revisión. *Ciencia Ergo Sum* 16 (3) 278-284.
- Drennan, W. G., and M. S. Yong. 1994. Clenbuterol not approved for use in cattle in Canada. *Canadian Veterinary Journal* 35: 474-478.
- Ekpe, E. D., J. A. Moibi, and R. J. Christopherson. 2000. Beta-adrenergic receptors in skeletal muscles of ruminants: effects of temperature and feed intake. *Canadian Journal of Animal Science* 80: 79-86.
- Elliot, C. T., W. J. McCaughey, S. R. Crooks, J. D. McEvoy, y D. G. Kennedy. 1995. Residues of clenbuterol in cattle receiving therapeutic doses: implications for differentiating between legal and illegal use. *The Veterinary Quarterly* 17: 100-102.
- Emery, P. W., N. J. Rothwell, M. J. Stock, and P. D. Winter. 1984. Chronic effects of β_2 -adrenergic agonists on body composition and protein synthesis in the rat. *Bioscience Reports* 4: 83-91.
- El Universal. 2011. Tricolores obtienen el perdón por caso de dopaje. <http://www.eluniversal.com.mx/notas/800465.html> Consultado el 20 de enero de 2012.
- Estrada-Montoya, M. C., A. F. González-Córdova, G. Torrescano, y J. P. Camou. 2008. Monitoreo y confirmación de la presencia de residuos de clenbuterol en carne de bovino comercializada en el noroeste de México. *Ciencia y Tecnología Alimentaria* 6 (2): 130-136.

- FAO/OMS. 1998. Evaluación de residuos de ciertos fármacos de uso veterinario en los alimentos. http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_851_spa.pdf. Consultado el 16 de febrero de 2010.
- FIRA. 2003. Perspectivas de la red bovinos de carne. Fideicomisos Instituidos en Relación a la Agricultura. <http://www.itescam.edu.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r20973.PDF>. Consultado el 15 de marzo de 2010.
- FIRA. 2010. Carne de bovino. Panorama agroalimentario. <http://www.corraldeengorda.com.mx/download/panorama-bovino-carne-2010.pdf>. Consultado el 19 de febrero de 2010.
- FIRA. 2011. Carne de bovino. Panorama agroalimentario. <http://www.corraldeengorda.com.mx/download/panorama-bovino-carne-2011.pdf> Consultado el 21 de abril de 2011.
- Ganong, W. F. 2001. Fisiología Médica. 18ª edición. Editorial El Manual Moderno. México, D. F. 696 p.
- García-López, A. 2002. Alerta epidemiológica por la intoxicación en humanos con clenbuterol y su empleo en la alimentación del ganado. *Revista de Sanidad Militar México* 56: 131-134.
- Geesink, G. H., F. J. Smulders, H. L. Van Laack, J. H. Van der Kolk, T. Wensing, and H. J. Breukink. 1993. Effects on meat quality of the use of clenbuterol in veal calves. *Journal of Animal Science* 71:1161-1170.
- Girault, J., and J. B. Fourtillan, 1990. Determination of clenbuterol in bovine plasma and tissues by gas chromatography-negative ion chemical ionization mass spectrometry. *Biomed Environment Mass Spectrometry* 19: 80-88.
- González G., P., T. Fernández F., O. Cadahía M., C. Fente S., C. Franco A., and A. Cepeda S. 1996. Rapid and simple determination of clenbuterol residues in retina by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography Biomedical Applications* 677: 167-171.
- González S., R. F. 2001. Estimación de elasticidades de la demanda para la carne de res, pollo, cerdo y huevo en México, una aplicación del Sistema de Demanda Casi Ideal. Tesis doctoral. División de Ciencias Económico Administrativas (DICEA). Universidad Autónoma Chapingo (UACH), México 98p.
- Gratacós C., M. 2007. Desarrollo de métodos rápidos para el análisis de residuos en producción animal. Tesis doctoral. Universidad de Girona, España. 129p.
- Hahnau, S., and B. Jülicher. 1996. Evaluation of commercially available ELISA test kits for the detection of clenbuterol and other beta 2-agonists. *Food Additives and Contamination* 13(3): 259-274.

- Hawkins, D. R., L. F. Elsom, M. H. Dighton, A. Kaur, and D. M. Cameron. 1993. The pharmacokinetics, metabolism and residues of ¹⁴C-clenbuterol (¹⁴C-N-AB 365 CL) following intramuscular administration to calves. No. HRC/BOI 140/921418 de la base de datos de la OMS. http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_876_spa.pdf. Consultado el 24 de abril de 2011.
- Heitzman, R. J. 1996. Clenbuterol. <http://www.fao.org/docrep/w4601e/w4601e06.htm>. Consultado el 22 de enero de 2010.
- Hernández C., L., C. Pacheco G., D. G. González A., y A. Ramírez A. 2006. Aplicación de la técnica de ELISA para la determinación de clenbuterol en retina de bovino. *In XVII Semana de la Investigación Científica Jalisco México del 22 al 26 de mayo Universidad de Guadalajara* 742-747 pp.
- Hernández P., G., R. García V., I. Mangas G., F. Martínez N., J. Martín, O. González. 2001. Intoxicaciones por clenbuterol en España. *Boletín Epidemiológico de España* 9:1-8.
- Hollenga, C. H, M. Haas, J. T. Deinum, and J. Zaagsma. 1990. Discrepances in lipolytic activities induced by 13-adrenoceptor agonist in human and rat adipocytes. *Hormone and Metabolic Research* 22: 17-21.
- Hughes, S. M., S. P. Seale, and D. M. Temple. 1983. Effect of fenoterol on immunological release of leukotrienes and histamine from human lung *in vitro*: selective antagonism by beta-adrenoceptor antagonist. *European Journal of Pharmacology* 95: 239-245.
- INEGI. 2011. PIBN del primer al cuarto trimestre de 2011. <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/comunicados/pibcorr.asp>. Consultado el 29 de febrero de 2012.
- Jiménez S., L. A., J. G. Ramos, H. Sumano L., H. Fragoso S. 2011. Vigilancia sanitaria en el uso ilícito del clenbuterol y su coordinación intersectorial en dos entidades de México. *Veterinaria México* 42: 11-27.
- Jones, R.W., R. A. Easter, F. K. McKeith, R. H. Dalrymple, H. M. Maddock, P. J. Behtel. 1985. Effect of the β -adrenergic agonist cimaterol (CL 263,780) on the growth and carcass characteristics of the finishing swine. *Journal of Animal Science* 61: 905-913.
- Kim, Y. H., and Y. S. Kim. 1997. Effects of active immunization against clenbuterol on the growth-promoting effect of clenbuterol in rats. *Journal of Animal Science* 75:446-453.
- Kuiper, H. A., M. Y. Noordam, M. M. van Dooren-Flipsen, R. Schilt, and A. H. Roos. 1998. Illegal use of beta-adrenergic agonists: European Community. *Journal of Animal Science* 76:195-207.
- Lafontan, M., M. Berlan, y M. Prud'hon. 1988. Les agonistes beta-adrénergiques. Mécanismes d'action: lipomobilisation et anabolisme. *Reproduction, Nutrition and Development* 28(1): 61-84.

- Ley Federal de Sanidad Animal. Consultado el 24 de febrero de 2010.
<http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/LFSA.pdf>
- Li, Y. Z., B. T. Cristopherson, and J. A. Moibi. 2000. Effects of a beta-adrenergic agonist (I-644,969) on performance and carcass traits of growing lambs in a cold environment. *Canadian Journal of Animal Science* 80 : (3) 459-465.
- Lin-Ying, C., C. Shin-Shou, and H. Deng-Fwu. 2005. High performance liquid chromatography to determine animal drug clenbuterol in pork, beef and hog liver. *Journal of Food and Drug Analysis* 13(2): 163-167.
- López L., B. J. 1996. Evaluación de canales de res en México bajo normas canadiense y estadounidense. Tesis profesional. Departamento de Ingeniería Agroindustrial. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo. México 105 p.
- Marban-Arcos, E. S., y F. A. López-Jiménez. 2011. Intoxicación alimentaria por clenbuterol. *Revista Sanidad Militar México* 65 (3): 121-124.
- Márquez G., V. E. 2001, *Síntesis de la serie: Comercio Informal*.
http://www.mktglobal.iteso.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=226&Itemid=117. Consultado 3 de enero de 2012.
- Martínez, J. A., M. P. Portillo, and J. Larralde. 1991. Anabolic actions of a mixed β -adrenergic agonist on nitrogen retention and protein turnover. *Hormone and Metabolic Research* 23: 590-593.
- Martinez-Navarro F. J., 1990. Food poisoning related to consumption of illicit β -agonist in liver. *The Lancet* 24: 336- 352.
- Masnatta, L. D., and M. Rubio. 1992. Hemodynamic effects on hepatic blood flow of a selective β -adrenoceptor agonist, clenbuterol in rat. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 17 (4): 247-250.
- Mersmann, H. J. 2002. Beta-adrenergic receptor modulation of adipocyte metabolism and growth. *Journal of Animal Science* 80: 24-29.
- Meyer H., H., and L. M. Rink. 1991. The pharmacokinetics and residues of clenbuterol in veal calves. *Journal of Animal Science* 69: 538-544.
- Miller, M. F., D. K. Garcia, M. E. Coleman, P. A. Ekeren, D. K. Lunt, K. A. Wagner, M. Procknor, T. H. Welsh, and S. B. Smith. 1988. Adipose tissue, longissimus muscle and anterior pituitary growth and function in clenbuterol/fed heifers. *Journal of Animal Science* 66:12-20.
- Mitchell, G. A., and D. Dunnavan. 1998. Illegal use of adrenergic agonists in the United States. *Journal of Animal Science* 76: 208-211.
- Moore, N. G., U. G. Pego, and M. N. Sillence. 1994. Anabolic effects of the β_2 -adrenoreceptor agonist salmeterol are dependent on route of administration. *American Journal of Physiology* 267: 475-484.

- Moreno, R. S., A. De-Vega G., R. Ramírez H., R. Ávila B. 2010. Detección de clenbuterol por la técnica de ensayo inmunoenzimático en muestras de retina, suero y orina de bovinos sacrificados en rastros del estado de Puebla. *In* Primer Foro Nacional de Rastros 2 y 3 de agosto, Centro de Convenciones W.O. Jenkins de la ciudad de Puebla, México 8 p.
- Moreno, R. S. 2011. Detección de los niveles de clenbuterol en rastros municipales del estado de Puebla a partir de muestras de retina mediante la técnica de ELISA. *In* 2do Foro Nacional de Rastros 9 y 10 de junio Puebla, México 9 p.
- Morgan, D. J. 1990. Clinical pharmacokinetics of β -agonists. *Clinical Pharmacokinetics* 18 (4):270-294.
- NOM-004-ZOO-1994. Grasa, hígado, músculo y riñón en aves, bovinos, caprinos, cérvidos, equinos, ovinos y porcinos. Residuos tóxicos. Límites máximos permisibles y procedimientos de muestreo
- NOM-061-ZOO-1999. Especificaciones zoosanitarias de los productos alimenticios para consumo animal. <http://www.senasica.gob.mx/?doc=519>. Consultado el 24 de febrero de 2010.
- NOM-EM-015-ZOO-2002: Especificaciones técnicas para el control del uso de β -agonistas en los animales. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
- Ocampo, L., U. Cortez, H. Sumano, and E. Ávila. 1998. Use of low doses of clenbuterol to reduce incidence of ascites syndrome in broilers. *Poultry Science* 77:1297–1299.
- Ortiz B., J. C., V. M. Alcocer V., y A. F. Castellanos R. 2005. Determinación por el método de gases/masas y su cuantificación en bovino sacrificados en dos rastros. *Técnica Pecuaria en México* 43: 57-67.
- Pascual, M., J. A. Martínez, and J. Larralde. 1994. A single dose of a non selective β -adrenergic agonist increases bone protein synthesis. *Revista Española de Fisiología* 50(3): 191-192.
- Peña, S. D., A. Uribe, A. Cordova-Izquierdo, and A. M. Michel. 2008. Clenbuterol residues in bovine feed and meat. *Journal of Biological Sciences* 3: 444- 445.
- Prezelj, A., A. Obreza, and S. Pecar. 2003. Abuse of clenbuterol and its detection. *Current Medicinal Chemistry* 10: 281-290.
- Pulce, C., D. Lamaison, G. Keck, C. Bostvironnois, J. Nicolas, J. Descotes. 1990. Collective human food poisonings by clenbuterol residues in veal liver. *Veterinary and Human Toxicology* 33 (5):480-485.

- RAE. 2011. Definición Tianguis.
http://buscon.rae.es/draeI/SrvltConsulta?TIPO_BUS=3&LEMA=tianguis.
 Consultado el 3 de enero de 2012,
- Ramírez T., J. J. 2009. Aplicación de un sistema de demanda casi ideal (AIDS) en cortes de carne (bovino, porcino y pollo) y huevo en México 1995-2008. Tesis Doctoral. Colegio de Postgraduados. México. 92p.
- Ramos, F., A. Cristino, P. Carrola, T. Eloy, and J. M. Silva. 2003. Clenbuterol food poisoning diagnosis by gas chromatography–mass spectrometric serum analysis. *Analytica Chimica Acta* 483:207–213.
- Ramos, F., I. Silveira, J. M. Silva, J. Barbosa, C. Cruz, J. Martins, C. Neves, y C. Alves. 2004. Proposed guidelines for clenbuterol food poisoning. *The American Journal of Medicine* 117(5):362-375.
- Reig M., T. 2008. Veterinary drug residues in meat: concerns and rapid methods for detection. *Meat science* 78: 60-67.
- Ricks, C. A., R. H. Dalrymple, P. K. Baker, D. L. Ingle. 1984. Use of β -agonist to alter fat and muscle deposition in steers. *Journal of Animal Science* 59: 1247-1255.
- Ruíz F. A. 2004. Impacto del TLCAN en la cadena de valor de los bovinos para carne. Universidad Autónoma Chapingo. 39 p.
- SAGARPA. 2007. Programa nacional de residuos tóxicos. Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal. México. 30 p.
- SAGARPA-Salud Pública de Guerrero.2008. Vigilancia sanitaria del clenbuterol en productos cárnicos bovinos. www.guerrero.gob.mx/pics/art/articles/.../file.clenbuterol07.pdf
 Consultado el 20 de abril de 2010
- Salleras, L., A. Domingues, E. Mata, J. L. Taberner, I. Moro, and P. Salva. 1995. Epidemiologic study of an outbreak of clenbuterol poisoning in Catalonia, Spain. *Public Health Reports* 110(3): 338–342.
- Sanz P., B. 1995. Problemas de salud pública ocasionados por el empleo en la alimentación animal del clenbuterol y otros agentes promotores del crecimiento. *Eurocarne* 38: 57- 66.
- Schmid, J. 1990. Plasma levels and residue analysis in cows and calves. No. U90-0092 de la base de datos de la OMS. http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_876_spa.pdf. Consultado el 24 de abril de 2011.
- Shiu T., C. and W. H. Chong. 2001. A cluster of clenbuterol poisoning associated with pork and pig offal in Hong Kong. *Public Health Epidemiology Bulletin* 10:14–17.

- SIAP. 2010. Distribución y comercialización de la carne de bovino. <http://w4.siap.gob.mx/sispro/portales/pecuarios/carnebovino/comercializacion.pdf>. Consultado el 5 de marzo de 2010.
- SIAP. 2011. Producción anual. http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=3&Itemid=29. Consultado el 29 de agosto de 2011.
- SINAVE. 2007. Intoxicación por clenbuterol. Sistema nacional de vigilancia epidemiológica. <http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2007/sem18/pdf/edit1807.pdf> Consultado el 20 de abril de 2010.
- Smith, D. J. 1998. The pharmacokinetics, metabolism and tissue residues of beta- adrenergic agonists in livestock. *Journal of Animal Science* 76: 70-79.
- Smith, D. J., and G. D. Paulson. 1997. Distribution, elimination and residues of [¹⁴C] clenbuterol HCL in Holstein calves. *Journal of Animal Science* 75: 454-461.
- Solís, M. 2002. Más que razones sanitarias en la problemática del clenbuterol. <http://www.cuatitlan2.unam.mx/comunidad/2002/num12/uc1.12.htm>. Consultado el 25 de septiembre de 2009.
- Soma, L. R., C. E. Uboh, F. Guan, P. Moate, Y. Luo, D. Teleis, R. Li, E. K. Birks, J. A. Rudy, D. S. Tsang. 2004. Pharmacokinetics and disposition of clenbuterol in the horse. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 27 (2): 71–77.
- Soria J., L. B., y J. A. Arias M. 1997. Señalización celular por segundos mensajeros. *In: Curso Internacional Precongreso: Actualización en Fisiología. XI Congreso Nacional de Temas Fisiológicos.* Ed. Sociedad Nacional de Temas Fisiológicos. México Distrito Federal del 6 al 8 de octubre. 305 p.
- Sporano, V., L. Grasso, M. Esposito, G. Oliviero, y G. Brambilla. 1998. Clenbuterol residues in non-liver containing meat as a cause of collective food poisoning. *Veterinary and Human Toxicology* 40: 141-143.
- Strydom, P. E., L. Frylinck, J. L. Montgomery, M. F. Smith. 2009. The comparison of three β -agonists for growth performance, carcass characteristics and meat quality of feedlot cattle. *Meat Science* 81: 557–564.
- Sumano L., H., L. Ocampo C., y L. Gutiérrez O. 2002. Clenbuterol y otros β -agonistas, ¿una opción para la producción pecuaria o un riesgo para la salud?. *Revista Veterinaria México* 33: 137-159.
- Tellez D., R. 2011. Caracterización del consumidor de carne bovina en la zona metropolitana del Valle de México. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. México. 98p.

- Thomas, M., R. Poms, B. Pöpping, M. Saarela, D. Spichtinger. 2010. Some key emerging food safety issues. *Quality Assurance and Safety of Crops and Foods* 2:141–148.
- Yamamoto, I., and K. Iwata. 1982. Enzyme immunoassay for clenbuterol, a β 2-adrenergic stimulant. *Journal Immunoassay* 3:155-171.
- Yeung, P. K., S. J. Mosher, M. A. Quilliam, T. J. Montague. 1990. Species comparison of pharmacokinetics and metabolism of clenbuterol in humans, dogs, rabbits, and rats. *Drug Metabolism and Disposition* 18 (6):1055-1059.
- Zalko, D., L. Debrauwer, G. Bories, And J. Tulliez. 1998. Metabolism of clenbuterol in rats. *Drug Metabolism and Disposition* 26 (9): 891-899.
- Zalko, D., L. Debrauwer, G. Bories, and J. Tuilliez. 1997. Evidence for a new and major metabolic pathway of clenbuterol involving in vivo formation of Nhydroxarylamine. *Chemical Research Toxicology* 10:197-204.

3. RESIDUOS DE CLEMBUTEROL EN TEJIDOS COMESTIBLES DE BOVINO PROVENIENTE DE DIFERENTES CENTROS DE DISTRIBUCIÓN EN TEXCOCO, MÉXICO

3.1. Resumen

El objetivo del presente estudio fue determinar la presencia y la probabilidad de riesgo de consumo de músculo e hígado de bovino con concentraciones superiores a $2 \mu\text{g}$ de clenbuterol kg^{-1} comercializados en carnicerías, tianguis y tiendas de autoservicio de la ciudad de Texcoco, Estado de México, distribuidos en dos temporadas de producción de carne, analizados con dos kits ELISA de diferente laboratorio. Se realizaron tres muestreos, en noviembre y diciembre de 2010 y en abril de 2011, colectando 36 muestras de tejidos en cada uno, los tejidos fueron analizados por la técnica ELISA del kit NEOGEN, posteriormente sólo aquellas muestras que presentaron más de $2 \mu\text{g}$ de clenbuterol kg^{-1} se analizaron con el kit RIDASCREEN. Las concentraciones de clenbuterol fueron evaluadas por el procedimiento GLM de SAS (2004) por muestreo, centro de distribución y tipo de tejido. Las medias se compararon mediante la prueba Tukey ($\alpha=0.05$). Para determinar la probabilidad de riesgo se usó el procedimiento CATMOD. Para la evaluación de los kits se realizó una prueba “t” de student. Se encontró diferencias ($p<0.05$) entre las concentraciones de clenbuterol de las muestras por muestreo, centro de distribución y tipo de tejidos. La concentración de clenbuterol en los tejidos colectados de noviembre y diciembre tuvieron $1.40 \mu\text{g}$ de clenbuterol kg^{-1} , en abril fue de $0.75 \mu\text{g}$ de clenbuterol kg^{-1} . Los tejidos de tianguis y carnicerías presentaron 1.81 y $1.71 \mu\text{g}$ de clenbuterol kg^{-1} respectivamente, las tiendas de autoservicio $0.05 \mu\text{g}$ de clenbuterol kg^{-1} . El hígado presentó $1.79 \mu\text{g}$ de clenbuterol kg^{-1} , el músculo $0.58 \mu\text{g}$ de clenbuterol kg^{-1} . La probabilidad de riesgo fue superior en hígado de carnicerías y tianguis durante noviembre y diciembre de 2010, reduciendo 50% para abril 2011. El kit NEOGEN fue el que presentó mayor precisión. Existe la presencia de residuos de clenbuterol en hígado y músculo en las carnicerías y tianguis de la ciudad de Texcoco.

Palabras claves: clenbuterol, hígado, músculo, centros de distribución, temporada de producción.

Tesis de Maestría en Ciencias en Innovación Ganadera, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Ernesto Olaya Fernández.

Director de Tesis: Gilberto Aranda Osorio, Ph. D.

CLEMBUTEROL RESIDUES IN BOVINE EDIBLE TISSUES FROM DIFFERENT DISTRIBUTION CENTERS IN TEXCOCO CITY, MÉXICO

3.2 Abstract

The objective of this study was to determine the presence and the risk likelihood of consumption of bovine muscle and liver with concentrations above 2 μg of clenbuterol kg^{-1} collected from butcher shops, flea markets and supermarkets in Texcoco city, Mexico State, during two seasons of meat production, and analyzed with two ELISA test kits from different laboratories. Samplings were done in November and December 2010 and April 2011, collecting a total of 36 samples tissues each time; every tissue was analyzed by an ELISA NEOGEN test kit. Samples that showed more than 2 μg of clenbuterol kg^{-1} were also analyzed with the kit RIDASCREEN. The concentrations of clenbuterol were evaluated by the GLM procedure of SAS (2004) for sampling, distribution center and tissue type effects. Means were compared using the Tukey test ($\alpha = 0.05$). To determine the risk likelihood, the CATMOD procedure was used. The evaluation of the kits was carried out with student's t-test. There were differences ($p < 0.05$) due to sampling, distribution center and tissue type. The concentration of clenbuterol in tissues collected in November and December was 1.40 μg of clenbuterol kg^{-1} , while for those collected in April was 0.75. Tissues from flea markets and butcher shops had 1.81 and 1.71 μg of clenbuterol kg^{-1} respectively, whereas tissues from supermarkets had 0.05 μg of clenbuterol kg^{-1} . Liver showed 1.79 μg of clenbuterol kg^{-1} , while muscle had 0.58 μg of clenbuterol kg^{-1} . The risk likelihood was higher in liver from the flea markets and butcher shops during November and December 2010, reducing to 50% in April 2011. The NEOGEN kit had less variation. There is presence of clenbuterol residues in liver and muscle beef from butcher shop and flea markets of the city of Texcoco.

Key words: clenbuterol, liver, muscle, distribution centers, seasons of meat production.

3.3 Introducción

El clenbuterol es una sustancia β -agonista del grupo de los β -adrenérgicos, que tiene efectos principalmente de promoción sobre la masa muscular y reducción de la cantidad de grasa corporal en los animales tratados con esta sustancia, dejando residuos en tejidos comestibles como hígado, riñón, músculo, ojo (humor vítreo) y timo (Solís, 2002; Sumano *et al.*, 2002). Estos tejidos al ser ingeridos, provocan una intoxicación en el sistema nervioso autónomo causando vómitos, palpitaciones y taquicardia en el humano (SINAVE, 2007). Debido a su alto grado residual y a las intoxicaciones causadas, el uso del clenbuterol como promotor en la producción animal se encuentra prohibido a nivel mundial, y en México está censurado por la NOM-061-ZOO-1999 y por la Ley Federal de Sanidad Animal (Mitchell y Dunnavan, 1998); a pesar de su prohibición, el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (2007) registró un total de 1300 casos de intoxicación por consumo de hígado con residuos de clenbuterol durante el periodo de 2002 al 2006 en México.

En el país hay dos tipos de comercialización para la carne bovina, el primero está basada en una cadena integrada, el cual está relacionado con el sacrificio Tipo Inspección Federal (TIF), que se caracteriza por tener un estricto control sanitario y su mercado son principalmente las tiendas de autoservicio y la exportación. El segundo se denomina tradicional o no integrado, donde los animales son llevados a un rastro municipal, el cual se caracteriza porque no existe un control sanitario adecuado y su mercado son las carnicerías, mercados municipales y tianguis (FIRA, 2003).

La producción nacional de carne bovina presenta una variación productiva a lo largo del año, atribuida a factores climatológicos y cambios en la demanda, siendo la religión la de mayor influencia a esta última, resultando en dos temporadas de oferta: la de alta producción ubicada en los meses de octubre,

noviembre y diciembre, y la de baja producción en marzo y abril (Ramírez, 2009; SIAP, 2010).

Esta disparidad del control sanitario y de la oferta ha creado una controversia en el tema de residuos como el clenbuterol, por lo que es necesario establecer acciones para determinar la presencia y la concentración de ésta sustancia, en los productos comestibles con el fin de prevenir riesgos para la salud pública.

Se han realizado operativos federales y estatales por la SAGARPA y la Secretaría de Salud, así como investigaciones por parte de las instituciones de educación para monitorear los residuos de clenbuterol en tejidos comestibles, que demuestran el uso actual e irracional del clenbuterol como promotor en la alimentación de ganado bovino en México. En investigaciones como las de Hernández *et al.*, (2006) reportaron que el 53.5% de sus muestras de retina de bovino resultaron en un rango de entre 3.00 a 8.10 μg de clenbuterol kg^{-1} ; y Estrada-Montoya *et al.* (2008), encontraron que el 12% de muestras de músculo de bovino contenían clenbuterol en un rango de 3.06 a 6.12 μg de clenbuterol kg^{-1} , cifras superiores a las establecidos por la FAO/OMS (1998) y SAGARPA (2002).

La cromatografía de gases y de líquidos, así como, los inmunoanálisis son métodos analíticos usados para la determinación de clenbuterol en alimentos, tejidos y fluidos de los animales, aprobados por la NOM-EM-015-ZOO-2002 y la NOM-004-ZOO-1994. Los inmunoanálisis se han convertido en una herramienta de monitoreo para detectar la presencia de clenbuterol en diferentes matrices, debido a que presenta las ventajas de ser el más rápido y el de menor costo (Ren *et al.*, 2009). Actualmente hay una gran variedad de laboratorios que ofrecen kits ELISA para analizar clenbuterol, siendo capaces de competir con el único kit aprobado por la SAGARPA.

Por lo que el objetivo del presente estudio fue determinar la presencia y la probabilidad de riesgo de consumo de carne o hígado de bovino con

concentraciones superiores a $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ de clenbuterol comercializados en carnicerías, tianguis y tiendas de autoservicio, en dos temporadas de producción de carne de la ciudad de Texcoco, Estado de México, analizados con diferentes kits basados en el método ensayo inmuno-enzimático (ELISA).

3.4. Materiales y Métodos

3.4.1. Muestreo

La recolección de los tejidos (hígado y músculo) se llevó a cabo en la ciudad de Texcoco, Estado de México en tres centros de comercialización: carnicerías, tianguis y tiendas de autoservicio. Para cada centro de distribución se identificaron seis puntos de venta, en los cuales, se colectó una muestra de músculo y otra de hígado (Figura 10).

Se realizaron tres muestreos, el primero en noviembre, el segundo en diciembre de 2010 y el tercero en abril de 2011, se efectuó una visita a cada punto de venta, llegando a obtener 36 muestras de tejidos en cada uno de ellos, resultando en un total de 108 muestras, 54 de hígado y 54 de músculo.

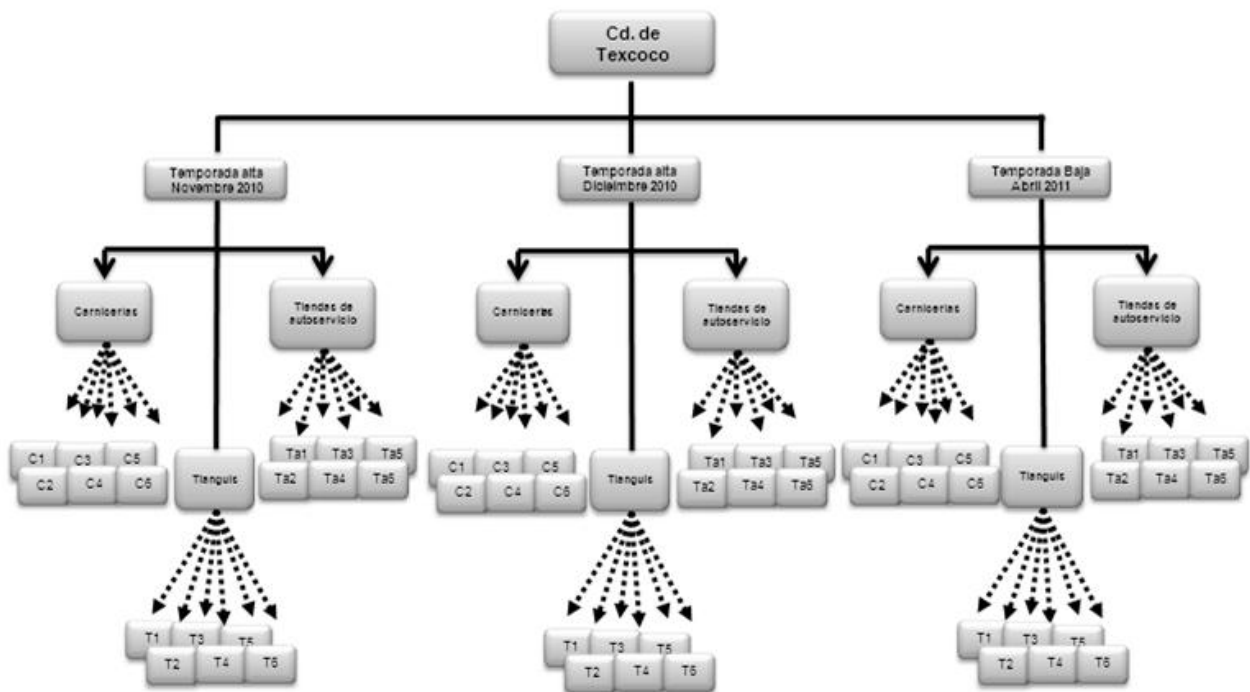


Figura 10. Diagrama de muestreo realizado en los puntos de venta de los tres centros de distribución durante las dos estaciones de producción de carne en Texcoco, México.

Manejo de las muestras

Una vez obtenido el tejido, se envolvió en papel aluminio para después depositarse en una bolsa de polietileno (plástico) transparente, cada bolsa se identificó con los siguientes datos: número de muestreo, centro de distribución, tipo de tejido (músculo o hígado), clave del punto de venta y fecha de colecta. La muestra se colocó en otra bolsa de plástico transparente de la que se extrajo el aire residual, sellándola con cinta adhesiva.

Todas las bolsas se colocaron en una hielera de unicel acompañadas de gel refrigerante, para conservarse en buenas condiciones durante el transporte. Las muestras después de colectarse y ser empacadas, se enviaron al laboratorio para su congelamiento y su futuro análisis.

3.4.2. Análisis de laboratorio

A cada una de las muestras se les determinó la concentración de clenbuterol mediante el método Ensayo Inmuno-Enzimático (ELISA).

Las 108 muestras colectadas fueron analizadas con el kit NEOGEN del laboratorio del mismo nombre, posteriormente, solamente aquellos tejidos que presentaron concentraciones superiores a $2 \mu\text{g}$ de clenbuterol kg^{-1} (24 tejidos) se analizaron con el kit RIDASCREEN clenbuterol-fast del Laboratorio R-Biopharm.

Reactivos

Ácido clorhídrico (HCl), agua destilada, agua grado HPLC, fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4), hidróxido de sodio (NaOH) y metanol grado HPLC.

Soluciones estándar

Disoluciones de ácido clorhídrico 5 M, 50 mM y 0.01 M, solución de hidróxido de sodio 1 M, y disoluciones de fosfato de potasio monobásico 0.5 M y 50 mM pH 3.

Kit NEOGEN

Este kit contiene una microplaca con 12 tiras de 8 pozos cada una (96 pozos) y seis soluciones estándar de clenbuterol de 300 μL cada uno (0, 0.2, 0.5, 1, 2 y 6 μg de clenbuterol mL^{-1} de solución), conteniendo las siguientes soluciones: EIA Buffer, Sample Buffer, Wash Buffer (10x), sustrato k-blue, drug-enzyme conjugada (180x) y una solución stop (NH_2SO_4).

Kit RIDASCREEN clenbuterol fast

Este kit contiene una microplaca con 12 tiras de 8 pozos cada una (96 pozos) y seis soluciones estándar de clenbuterol (0, 100, 300, 900, 2700 y 8100 ng de clenbuterol mL^{-1} de solución), conteniendo las siguientes soluciones: enzima conjugada, una solución stop (ácido sulfúrico 1 M), una solución buffer y un sustrato cromógeno (urea peroxidasa/ tetrametilbenzidina).

Extracción de clenbuterol y acondicionamiento de la columna

La metodología usada para estos pasos fue la misma para los dos kits (NEOGEN, 2010; R-Biopharm, 2011).

Extracción de clenbuterol en tejidos

Los tejidos (músculo e hígado) fueron molidos (5 g) y homogeneizados con 25 mL de HCl 50 mM, para después transferir 6 g del homogeneizado a tubos de centrifuga de 15 mL; los tubos fueron centrifugados a 3400 rpm durante 15 min a una temperatura de 10 $^{\circ}\text{C}$. El sobrenadante se transfirió a otro tubo de centrífuga con 300 μL de NaOH 1 M y se añadieron 4 mL KH_2PO_4 0.5 M pH 3 para ser agitados horizontalmente durante 24 h. Por último, cada muestra se hizo pasar a través de papel filtro para obtener una muestra homogénea.

Acondicionamiento de la columna C18

La columna fue lavada con 3 mL de metanol para después ser equilibrada con 2 mL KH_2PO_4 50 M pH 3 y posteriormente se añadió la muestra antes filtrada. Después se procedió a lavar la columna con 2 mL KH_2PO_4 50 M pH 3 y eluir la muestra con 1 mL de metanol, para después evaporar a una temperatura 56 °C bajo corriente de aire. Finalmente, se reconstituyó el residuo con 1 mL de buffer para muestras, proveniente del kit.

Análisis ELISA

Análisis con el kit NEOGEN

El análisis de las muestras (108: 54 de músculo y 54 de hígado), fue el siguiente: se agregó 20 µL de los estándares y muestras a cada pozo de la microplaca del kit por duplicado con 180 µL de conjugado Drug-enzima respectivamente, y se incubó a temperatura ambiente durante 45 minutos. Se realizaron tres lavados con 270 µL del buffer de lavado, después, se agregó 100 µL del sustrato K-Blue a cada pozo, y se procedió a incubar a temperatura ambiente durante 30 min. Para finalizar se agregaron 100 µL de la solución stop a cada pozo y se leyó la microplaca en un lector de ELISA a 450 nm.

Análisis con el kit Ridascreen clenbuterol fast

El análisis de las muestras (24: 6 de músculo y 18 de hígado), fue el siguiente: se depositaron 100 µL de la mezcla (buffer + anticuerpo) en cada pozo y se dejó reposar por 15 minutos, para después realizar tres lavados con 250 µL de agua HPLC por cada pozo. Se procedió a aplicar 20 µL de los seis estándares y 20 µL de cada muestra a su respectivo pozo con 100 µL de la mezcla (buffer + conjugado) a cada pozo y se dejó reposar por 30 minutos. Posteriormente se realizaron tres lavados más con 250 µL de agua HPLC y se depositó 100 µL de cromógeno a cada pozo, se tapó y se aisló de la luz por 15 minutos. Para

finalizar se agregaron 100 µL de solución stop a cada pozo y se procedió a realizar la lectura en un espectrofotómetro (lector de ELISA) a 450 nm.

3.4.3. Análisis estadístico

Las concentraciones de clenbuterol de cada muestra por centro de distribución y muestreo fueron analizados por el procedimiento GLM de SAS (2004), se realizó una comparación de medias con la prueba de Tukey con $\alpha=0.05$.

El modelo utilizado para analizar la concentración de clenbuterol de cada muestra fue el siguiente:

$$Y_{ijkl} = \mu + M_i + C_j + T_k + E_{ijkl}$$

Donde:

Y_{ijkl} son los valores que toma cada una de las variables de respuesta evaluadas; μ es la media general; M_i es el efecto fijo del i -ésimo muestreo ($i = 1, \dots, 3$); C_j es el efecto fijo del j -ésimo centro de distribución ($j = 1, \dots, 3$); T_k es el efecto fijo del k -ésimo tejido ($k = 1, 2$); E_{ijkl} es el error aleatorio.

Como base para determinar la probabilidad de riesgo por muestreo, centro de distribución y tipo de tejido, sólo se evaluaron las muestras que tuvieron más de 2 µg de clenbuterol por kilogramo de tejido en base húmeda (µg kg⁻¹), debido a que la SAGARPA (2002) y CENAPA (2002) considera a estos niveles como peligrosos y positivos a la administración de clenbuterol como promotor de crecimiento en alguna etapa de la engorda de los animales.

Para determinar la probabilidad de riesgo de adquirir una muestra con más de 2 µg kg⁻¹ se usó el procedimiento para análisis de datos categóricos CATMOD del Programa SAS (2004) versión 9.0.

El modelo utilizado para determinar la probabilidad de que existan tejidos con residuos superiores a 2 µg de clenbuterol kg⁻¹ fue el siguiente:

$$\text{Logit } P(Y=1) = \beta_1 \cdot \text{Muestreo}_i + \beta_2 \cdot \text{Centro de distribución}_j + \beta_3 \cdot \text{Tipo de tejido}_k$$

Donde $P(Y=1)$ es la probabilidad de que haya tejidos con residuos superiores a $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ de clenbuterol, β_1 es el intercepto del i -ésimo muestreo ($i=1,2,3$), β_2 es el intercepto del j -ésimo centro de distribución ($j=1,2,3$) y β_3 es el intercepto del k -ésimo tipo de tejido ($j=1,2$).

Para la comparación de los dos kits se usaron solo aquellas muestras con concentraciones superiores a $2 \mu\text{g}$ de clenbuterol kg^{-1} determinadas con el kit NEOGEN, comparándolas con las determinaciones obtenidas por el kit ridascreen. Se realizó una prueba “t” de Student de medias apareadas provenientes de cada kit, utilizando el programa SAS (2004) con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$, con el fin de aceptar o no la hipótesis nula de que las medias de cada kit son iguales:

$$H_0: \mu_N = \mu_R$$

$$H_1: \mu_N \neq \mu_R$$

Donde:

H_0 es la hipótesis nula; H_1 es la hipótesis alternativa; μ_N es la media del kit NEOGEN; μ_R es media del kit RIDASCREEN.

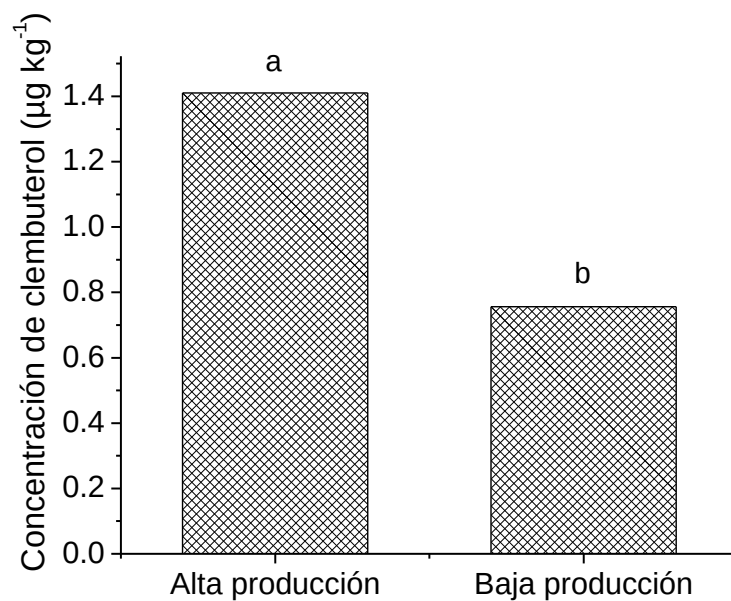
3.5. Resultados y Discusión

3.5.1. Por muestreo

Se encontraron diferencias ($p < 0.05$) en las concentraciones de residuos de clenbuterol de los tejidos que fueron colectados en diciembre de 2010 con respecto a los otros dos muestreos (Figura 11b), coincidiendo la temporada de alta oferta y demanda de carne (SAGARPA, 2002) con la época donde la concentración de clenbuterol en los tejidos fue más alta, siendo superior 1.8 veces a la encontrada en abril de 2011 (Figura 11a). Probablemente esta elevada concentración de los residuos de clenbuterol en los tejidos encontrados de noviembre a diciembre, se deba a la época decembrina, donde se puede sospechar que algunos productores buscan aprovechar los precios de esa temporada, pensando que al aumentar la dosis de clenbuterol en la alimentación, incrementará de manera lineal los parámetros productivos, siendo que esta práctica puede afectar la salud y bienestar del animal (Peters, 1989; Sauer *et al.*, 1999; Sumano *et al.*, 2002).

Un caso parecido sucedió en Hong Kong donde Shiu (2001) atribuyó las intoxicaciones presentadas en octubre de 2000 por carne de cerdo a la gran demanda de este producto provocada por las fiestas de Chung Yeung celebradas en ese mismo mes.

a)



b)

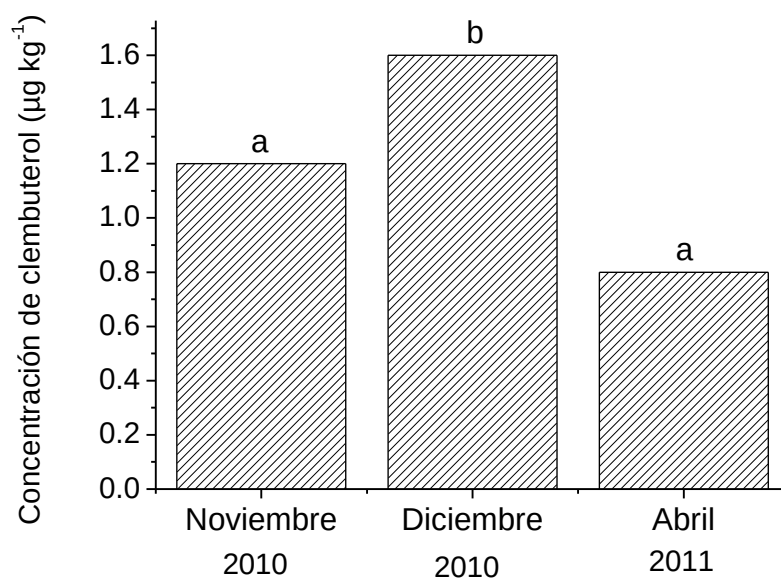


Figura 11. a) Concentración promedio de los tejidos colectados por temporada de producción de carne b) Concentración promedio de clenbuterol ($\mu\text{g kg}^{-1}$) de los tejidos colectados en diferente época de muestreo en la ciudad de Texcoco, México.

García (2002) reportó en el Estado de México 3 brotes de intoxicación con un total de 17 casos, donde el sexo y la edad más afectada fue el femenino, de 25 a 44 años; desafortunadamente el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) sólo presenta los resúmenes anuales de los brotes de intoxicación, sin presentar las fechas ni las concentraciones encontradas en los tejidos comestibles.

En el muestreo realizado en noviembre de 2010, 7 (19.4%) de las muestras presentaron residuos superiores a 2 μg de clenbuterol kg^{-1} , en diciembre de 2010 12 (33.3%) de los tejidos presentaron concentraciones de clenbuterol superiores, mientras que, los tejidos colectados en abril de 2011 6 (16.8%) tuvieron concentraciones superiores a 2 μg de clenbuterol kg^{-1} (Cuadro 12).

Cuadro 12. Frecuencia de las concentraciones de clenbuterol ($\mu\text{g kg}^{-1}$) encontradas por épocas de los muestreos.

Concentración de clenbuterol ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Noviembre 2010 (n = 36)		Diciembre 2010 (n = 36)		Abril 2011 (n = 36)	
	n	%	n	%	n	%
<1	28	77.8	23	63.9	30	83.3
1 a 2	1	2.8	1	2.8	ND	ND
2 a 4	ND	ND	4	11.1	4	11.1
>4	7	19.4	8	22.2	2	5.7

ND No detectado. No se encontraron tejidos con concentraciones de clenbuterol en esos valores

En la intoxicación de 35 personas causada por residuos de clenbuterol en la carne de cerdo, distribuida en Hong Kong, los tejidos presentaron concentraciones que variaron de 2 a 460 μg de clenbuterol kg^{-1} (Shiu y Chong, 2001).

3.5.2. Por centros de distribución

No se encontraron diferencias ($p < 0.05$) entre las concentraciones de clenbuterol de los tejidos provenientes de carnicerías y tianguis, pero sí cuando se compararon con las de tiendas de autoservicio (Figura 12), las concentraciones encontradas en carnicerías y tianguis fueron 18 veces superiores a las encontradas en las tiendas de autoservicio.

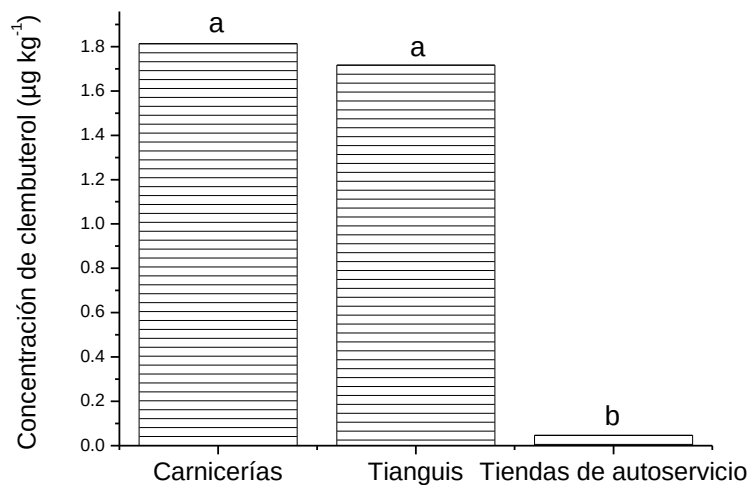
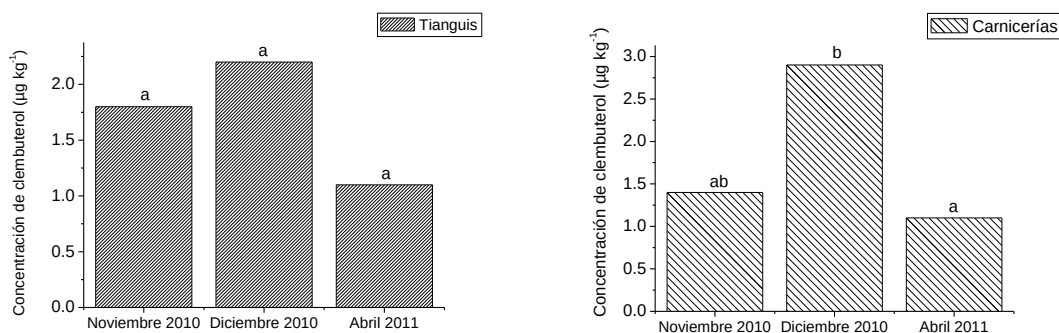


Figura 12. Concentración promedio de clenbuterol ($\mu\text{g kg}^{-1}$) de los tejidos colectados en los tres centros de distribución ubicados en la ciudad de Texcoco, México.

Cuando se comparó la concentración de los residuos de clenbuterol en los tejidos colectados por cada centro de distribución se observó que existe un aumento de la cantidad de residuos de clenbuterol en los tejidos que fueron colectados en el mes de diciembre de 2010, sin embargo, solamente en las concentraciones de clenbuterol de los tejidos provenientes de las carnicerías se encontraron diferencias ($p < 0.05$) (Figura 13).



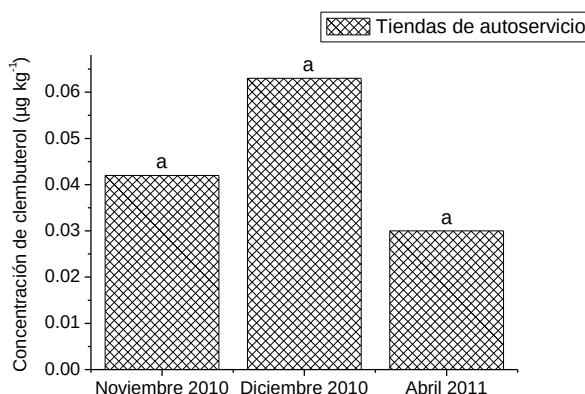


Figura 13. Comportamiento de las concentraciones de clenbuterol de los tejidos por cada centro de distribución durante las tres épocas de muestreo.

La decisión de la distribución de los productos y subproductos de la ganadería de carne bovina se encuentra definida por el sistema de matanza, por lo que en México las carnicerías y tianguis se encuentran abastecidos fundamentalmente de los mataderos municipales, y las tiendas de autoservicio lo hacen de los rastros TIF (FIRA, 2003). Algunas investigaciones de la inocuidad en los sistemas de matanza coinciden que existe un riesgo mayor de encontrar carne o subproductos contaminados por factores químicos, microbiológicos y físicos provenientes de mataderos clandestinos y rastros municipales (COFEPRIS, 2006; Signorini, 2008; Favila 2011).

Moreno *et al.* (2010), encontraron residuos de clenbuterol en 75% de las muestras analizadas de retina, proveniente de cinco rastros municipales del estado de Puebla, con una concentración promedio de 16.6 µg de clenbuterol kg⁻¹, mientras que, para el siguiente año seis de siete rastros muestreados de Puebla, presentaron concentraciones superiores a 40 µg de clenbuterol kg⁻¹ en tejidos como retina y orina de animales (Moreno, 2011).

La cantidad de tejidos que presentaron concentraciones superiores a 2 µg de clenbuterol kg⁻¹ fue similar en los tianguis y carnicerías, representando alrededor de un 30% del total de las muestras, con concentraciones superiores a 4 µg de clenbuterol kg⁻¹ (Cuadro 13). En las tiendas de autoservicio el 100%

de las muestras tuvieron concentraciones menores a 1 μg de clenbuterol kg^{-1} de tejido, presentando el tejido más alto de este centro, una concentración de 0.2 μg de clenbuterol kg^{-1} . De manera similar Cisneros y Vázquez (2005) encontraron residuos inferiores a 0.1 μg de clenbuterol por kg de tejido de hígado de rastros TIF de Durango.

Cuadro 13. Frecuencia de las concentraciones de clenbuterol (μg kg^{-1}) encontradas en los centros de distribución.

Concentración de clenbuterol (μg kg^{-1})	Tianguis (n = 36)		Carnicerías (n = 36)		Tiendas de autoservicio (n = 36)	
	n	%	n	%	n	%
<1	23	63.9	22	61.1	36	100
1 a 2	ND	ND	2	5.6	ND	ND
2 a 4	4	11.1	4	11.1	ND	ND
>4	9	25.0	8	22.2	ND	ND

ND NO DETECTADO. No se encontraron tejidos con concentraciones de clenbuterol en esos valores

Algunas investigaciones como la de Peña *et al.* (2008) determinaron la presencia de clenbuterol en carne, proveniente de carnicerías de nueve ciudades de México (localizadas en el norte y sur del país), en las cuales encontraron concentraciones similares a este estudio y variaron de 0.1 a 2.3 μg de clenbuterol kg^{-1} , siendo solo el 16.6% que presentaron concentraciones superiores a 2 μg de clenbuterol kg^{-1} , mientras que Estrada-Montoya *et al.* (2008) reportaron que 12% de las muestras de carne de bovino proveniente del mercado municipal presentaron concentraciones de 3.06 a 6.12 μg de clenbuterol kg^{-1} .

3.5.3. Por tipo de tejido

Los residuos de clenbuterol en los tejidos analizados fueron diferentes ($p < 0.05$), siendo tres veces superior las concentraciones de clenbuterol en hígado que en músculo (Figura 14), ésta tendencia coincide con intoxicaciones presentadas en diferentes países como: España con 113 casos de intoxicación por consumo de hígado de bovino (Salleras *et al.*, 1995), Portugal (Barbosa *et al.*, 2005) en donde, el número de intoxicados era mayor por consumo de

hígado de bovino que de músculo y México con 2,130 intoxicaciones en el periodo de 2002-2008, donde 70% de los casos fueron asociados al consumo de hígado de bovino (SINAVE, 2007; Jiménez *et al.*, 2011).

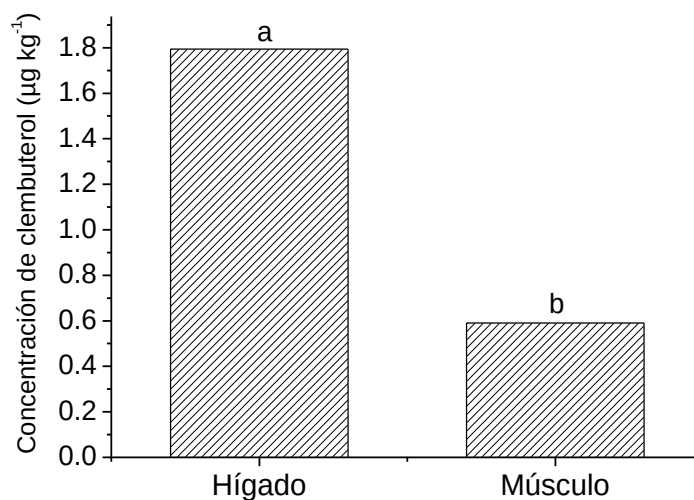


Figura 14. Concentración promedio de residuos de clenbuterol ($\mu\text{g kg}^{-1}$) en hígado y músculo colectados en la ciudad de Texcoco, México.

La concentración de residuos de clenbuterol en tejidos es 2.2 veces superior en hígado que lo encontrado en músculo. Sin embargo, las concentraciones reportadas en este estudio se encuentran por debajo de las encontradas en algunas intoxicaciones en el mundo, como en Italia, Brambilla *et al.* (2000), reportaron que la concentración de clenbuterol en carne de bovino causante de las intoxicaciones osciló entre 1140 y 1480 $\mu\text{g de clenbuterol kg}^{-1}$; al igual que en Portugal donde la carne de bovino tuvo alrededor de 300 $\mu\text{g de clenbuterol kg}^{-1}$ (Barbosa *et al.*, 2005).

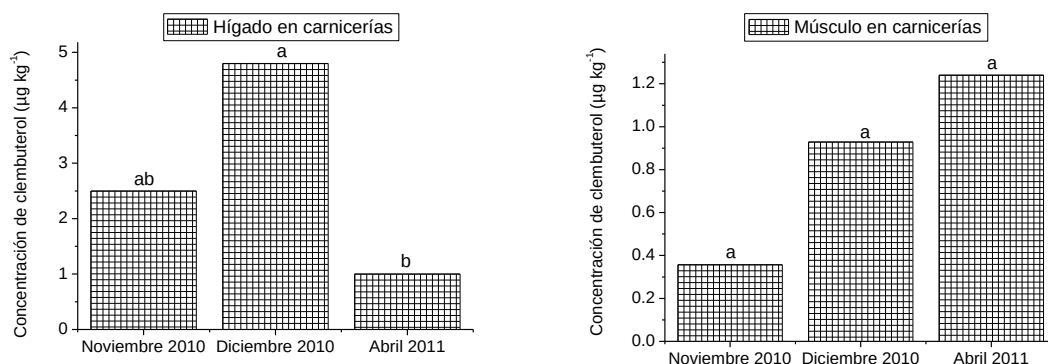
De las muestras de hígado analizados, 16 (29.6%) contenían residuos de clenbuterol superiores a 2 $\mu\text{g de clenbuterol kg}^{-1}$, mientras que en músculo sólo 7 (13%) de las muestras presentaron concentraciones mayores a 2 $\mu\text{g de clenbuterol kg}^{-1}$ (Cuadro 14).

Cuadro 14. Frecuencia de las concentraciones de clenbuterol ($\mu\text{g kg}^{-1}$) encontradas en los tejidos.

Concentración de clenbuterol ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Hígado (n = 54)		Músculo (n = 54)	
	n	%	n	%
<1	36	66.7	45	83.3
1 a 2	ND	ND	2	3.7
2 a 4	2	3.7	5	9.3
>4	14	25.9	2	3.7

ND NO DETECTADO. No se encontraron tejidos con concentraciones de clenbuterol en esos valores

Cuando se evaluó la concentración de clenbuterol del hígado y músculo colectados de cada centro de distribución durante las épocas de muestreo, el hígado presentó una tendencia de incremento en la concentración de clenbuterol cuando fueron colectados en diciembre, encontrando diferencias ($p < 0.05$) sólo en carnicerías, mientras que las concentraciones de residuos clenbuterol en músculo no se encontraron diferencias ($p < 0.05$) por centro de distribución ni por muestreo (Figura 15).



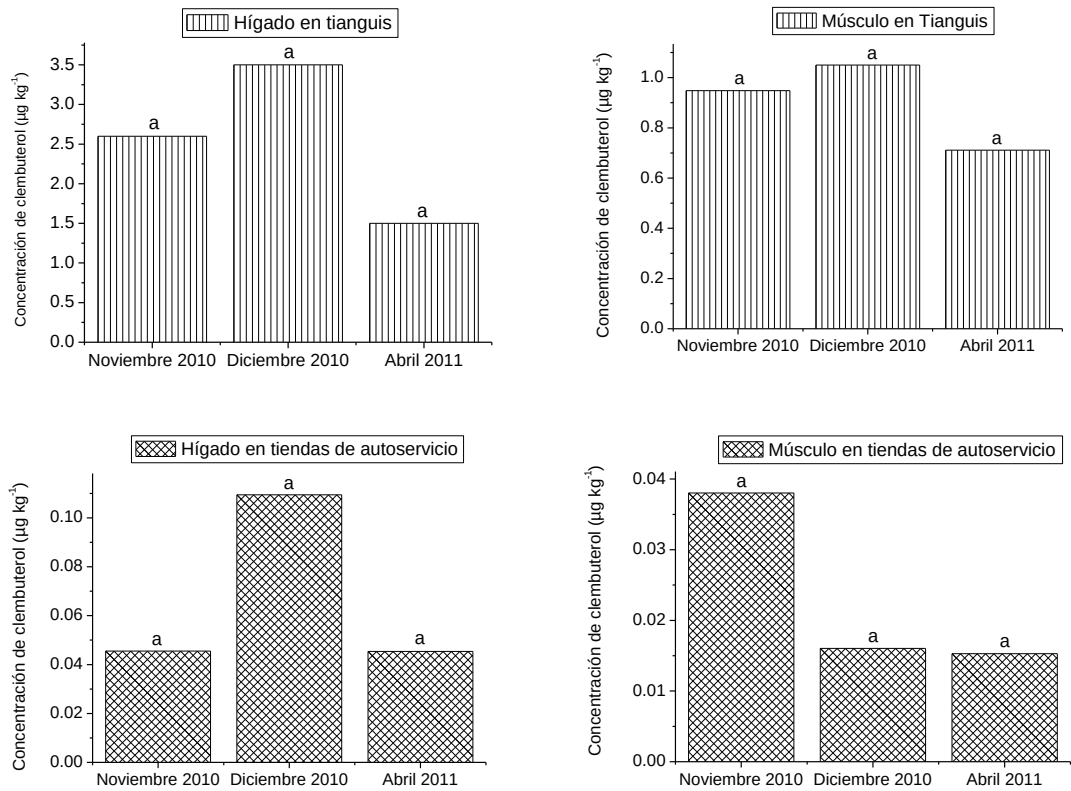


Figura 15. Comportamiento de las concentraciones de clenbuterol en hígado y músculo colectados de cada centro de distribución durante las épocas de muestreo.

La concentración de las muestras que presentaron residuos superiores a $2 \mu\text{g de clenbuterol kg}^{-1}$ variaron de 2.06 hasta $6.45 \mu\text{g}$ en los dos tipos de tejidos provenientes, tanto de carnicerías como de tianguis y distribuidas durante las dos temporadas de producción (Figura 16). Las concentraciones más altas se encontraron en la temporada de alta producción, es decir de noviembre a diciembre 2010.

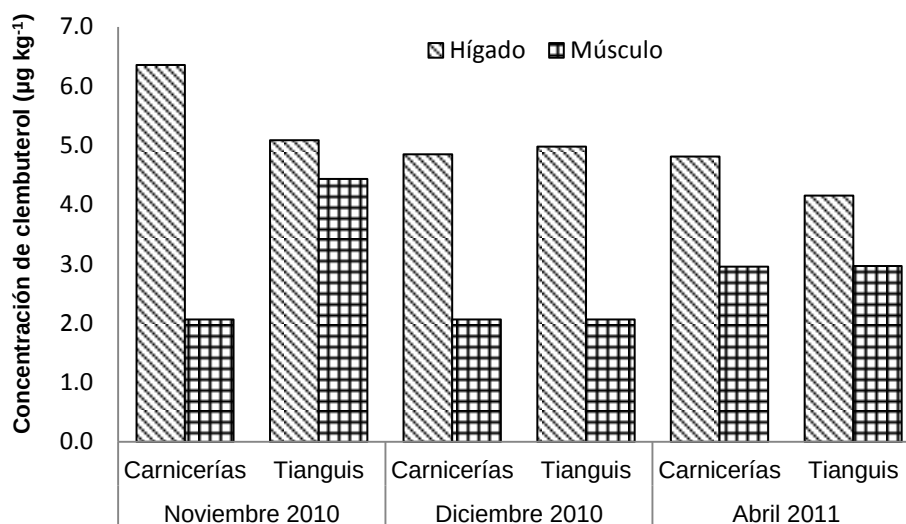


Figura 16. Concentración promedio de clenbuterol de los tejidos positivos a clenbuterol ($2 \mu\text{g}$ de clenbuterol kg^{-1} de tejido) acorde a SAGARPA.

3.5.4. Probabilidad de riesgo

La probabilidad de encontrar tejidos con concentraciones superiores a $2 \mu\text{g}$ de clenbuterol kg^{-1} fue superior en el periodo de noviembre y diciembre (Cuadro 12), disminuyendo aproximadamente 50% para abril 2011 en todos los centros de distribución. El hígado fue el tejido que tuvo mayor probabilidad de riesgo en carnicerías y tianguis. A pesar de que en algunos de los casos las probabilidades de riesgo son bajas, la SAGARPA (2002) y la SSA las consideran a todas, como un peligro para la salud pública.

Cuadro 15. Probabilidad de riesgo de encontrar tejidos con residuos mayores a $2 \mu\text{g}$ de clenbuterol kg^{-1} provenientes de carnicerías y tianguis.

Centro de distribución	Tejido	Noviembre 2010	Diciembre 2010	Abril 2011
		Probabilidad de riesgo (%)		
Carnicerías	Hígado	52.0	56.9	36.0
	Músculo	20.1	23.4	11.6
Tianguis	Hígado	55.5	60.3	39.3
	Músculo	22.4	26.1	13.1

Los centros de distribución involucrados con tejidos que presentaron residuos de clenbuterol superiores a los permitidos por CENAPA (2002), NOM-004-ZOO-1994 y FAO/OMS (1998) y que presentaron altas probabilidades de riesgo, son precedidos por los rastros o mataderos municipales, esto coincide a lo señalado por Signorini (2008) y COFEPRIS (2006) donde mencionan que existe un alto riesgo a la salud humana por problemas en la operatividad de este tipo de establecimientos.

3.5.5. Comparación de los kits

En esta parte del estudio se compararon las concentraciones de los tejidos con más de $2 \mu\text{g}$ de clenbuterol kg^{-1} , determinadas en primera instancia con la prueba ELISA del laboratorio NEOGEN, con las concentraciones obtenidas por el kit RIDASCREEN CLENBUTEROL-FAST. Las concentraciones de los tejidos analizados con diferente kit se distribuyeron como se muestra en la Figura 17.

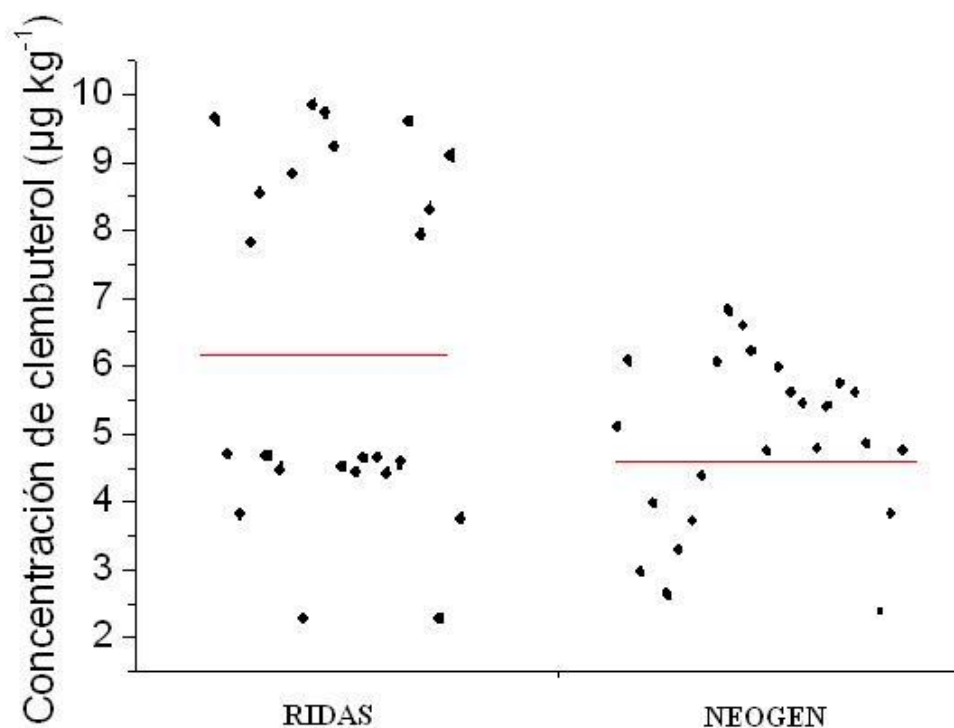


Figura 17. Distribución y promedio de la concentración de los tejidos que presentaron concentraciones superiores a $2 \mu\text{g}$ de clenbuterol kg^{-1} analizados con el kit NEOGEN y posteriormente con RIDASCREEN.

La prueba estadística *t* de Student arrojó como resultado que existen diferencias ($p>0.05$) entre los métodos de análisis para clenbuterol en matrices para tejidos de hígado y músculo. Las concentraciones de residuos determinadas por el kit RIDASCREEN son superiores a las analizadas con el kit NEOGEN, además el kit RIDASCREEN presentó una desviación estándar y un coeficiente de variación 2.1 y 1.5 veces superior comparado con el kit NEOGEN (Cuadro 13).

Cuadro 16. Estadísticos descriptivos de las muestras analizadas con diferente kit.

KIT	n	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar	Coeficiente de variación
		µg de clenbuterol kg ⁻¹				
RIDASCREEN	24	2.06	9.78	6.18	2.65	42.89
NEOGEN	24	2.05	6.45	4.54	1.25	27.58

Los resultados muestran que hubo mayor uniformidad y precisión en las concentraciones determinadas con el kit NEOGEN en comparación con el kit RIDASCREEN, a pesar de esta diferencia no se encontraron muestras con concentraciones inferiores a $2 \mu\text{g de clenbuterol kg}^{-1}$ por lo que existe una repetitividad adecuada en ambos kits. Jeyaletchumi (2004) descartó al kit RIDASCREEN en una evaluación de tres kits, debido a que el coeficiente de variación fue superior a los que presentaron los demás.

Sin embargo cuando se analizó los residuos de clenbuterol por cada tipo de tejido en función a cada kit (Cuadro 14), se encontró que había un coeficiente de variación de 30% en promedio entre los dos kits por lo que coincidimos con algunos trabajos similares (Hahnau y Jülicher, 1996; Shelper y Smith, 2000) donde se menciona que la calidad de los kits de inmunoensayos específicos a clenbuterol es variable e impredecible, que pueden variar de un laboratorio a otro, así como entre lotes; por tanto recomiendan realizar técnicas confirmatorias como lo son: la cromatografía de gases o de líquidos acoplados a un espectrómetro.

Cuadro 17. Coeficiente de variación de cada tejido en relación al kit evaluado.

Tejido	NEOGEN	RIDASCREEN	Promedio	Desviación estándar	Coeficiente de variación
	$\mu\text{g de clenbuterol kg}^{-1}$				
1	4.8	9.5	7.2	3.3	46
2	5.7	4.5	5.1	0.8	16
3	2.6	3.6	3.1	0.7	23
4	3.6	7.7	5.7	2.9	51
5	2.3	8.5	5.4	4.4	82
6	3,0	4.5	3.7	1.1	29
7	3.4	4.3	3.9	0.7	17
8	4,0	8.8	6.4	3.3	52
9	5.7	2.1	3.9	2.6	66
10	6.5	9.8	8.1	2.4	29
11	6.3	9.6	8,0	2.4	30
12	5.9	9.1	7.5	2.3	31
13	4.4	4.3	4.4	0.1	1
14	5.7	4.2	4.9	1.0	20
15	5.3	4.5	4.9	0.6	13
16	5.1	4.5	4.8	0.5	10
17	4.5	4.2	4.4	0.2	4
18	5.1	4.3	4.7	0.5	11
19	5.4	9.5	7.5	2.9	39
20	5.3	7.9	6.6	1.8	28
21	4.5	8.2	6.4	2.6	41
22	2.1	2.1	2.1	0,0	0
23	3.5	9,0	6.2	3.9	62
24	4.4	3.6	4,0	0.6	15
Promedio	4.5	6.2	5.4	1.7	30

3.6. Conclusiones

Existe la presencia de residuos de clenbuterol en hígado y músculo en concentraciones superiores a $2 \mu\text{g}$ de clenbuterol kg^{-1} en las carnicerías y tianguis de la ciudad de Texcoco, sin excepción de la temporada de producción de carne.

La probabilidad de riesgo de adquirir un alimento cárnico (músculo o hígado) de bovino con concentraciones mayores a $2 \mu\text{g}$ de clenbuterol kg^{-1} es 50% superior en tianguis y carnicerías durante la época de alta producción de carne.

La concentración de residuos de clenbuterol encontrados en hígado es tres veces superior de lo encontrado en músculo, sin embargo este tipo de tejido se caracteriza por una baja absorción del clenbuterol, por tanto se puede sospechar que existen niveles superiores en hígado y otros tejidos.

El diferencial que hay en las concentraciones de los tejidos distribuidos en las dos temporadas, hace suponer que existe una sobredosificación en la engorda anterior a las épocas decembrinas.

El kit NEOGEN presentó mayor precisión al determinar la concentración de clenbuterol en tejidos comestibles de ganado bovino.

3.7. Recomendaciones

De acuerdo con los resultados de esta investigación, se recomienda la adquisición de hígado o músculo en la ciudad de Texcoco en las tiendas de autoservicio, hasta que los centros de distribución tradicional sean capaces de asegurar que ofrecen productos cárnicos inocuos.

Se recomienda el uso del kit ELISA NEOGEN para determinar residuos de clenbuterol bajo situaciones parecidas a este estudio, sin embargo, es conveniente usar una prueba confirmatoria como la cromatografía de gases o de líquidos acoplado a un espectrómetro.

Realizar una mayor difusión de programas federales como “Proveedor confiable (libre de clenbuterol)” así como del estatus legal del clenbuterol como promotor de crecimiento a los productores, para desalentar el uso de éste.

Ofrecer información a los consumidores sobre el problema de salud que puede causar el consumo involuntario de productos con residuos de clenbuterol, con el fin de concientizar al consumidor y exija carne libre clenbuterol.

Realizar más investigaciones que muestren evidencias del uso actual e irracional del clenbuterol como promotor de crecimiento en el ganado bovino, así como, desarrollar investigaciones para encontrar alternativas al uso de clenbuterol.

3.8. Literatura citada

- Barbosa, J., C. Cruz, J. Martins, J. M. Silva, C. Neves, C. Alves, F. Ramos, y M. I. Noronha. 2005. Food poisoning by clenbuterol in Portugal. *Food Additives and Contaminants* 22(6): 563–566.
- Brambilla, G., T. Cenci, F. Franconi, R. Galarini, A. Macri, F. Rondoni, M. Strozzi, A. Loizzo. 2000. Clinical and pharmacological profile in a clenbuterol epidemic poisoning of contaminated beef meat in Italy. *Toxicology Letters* 114: 47–53.
- Cisneros A., J. V. 2005. Análisis de la situación higiénico sanitaria del sacrificio de bovinos en rastros municipales del estado de Durango que pueden afectar la salud pública. In: Memoria de la XV Semana Internacional de Agronomía FAZ-UJED, Gómez Palacios Durango 16 a 18 de septiembre. 450-454 pp.
- Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal (CENAPA). 2002. Ensayo Inmunoenzimático para el análisis cuantitativo de Clenbuterol y otros β - agonistas. Nota Técnica 12 p.
- COFEPRIS. 2006. Evaluación de riesgos de los rastros y mataderos municipales. www.cofepris.gob.mx/Documents/TemasInteres/.../EVAL1.PDF Consultado el 1 de diciembre de 2011.
- Estrada-Montoya, M. C., A. F. González-Córdova, G. Torrescano, y J. P. Camou. 2008. Monitoreo y confirmación de la presencia de residuos de clenbuterol en carne de bovino comercializada en el noroeste de México. *Ciencia y Tecnología Alimentaria* 6 (2): 130-136.
- FAO/OMS. 1998. Evaluación de residuos de ciertos fármacos de uso veterinario en los alimentos. 47º Informe del Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios. Ginebra. 6-13 pp.
- Favila H., L. 2011. Principales contaminantes de la carne del rastro a su consumo. <http://www.comitepecuario.com/Ponencias/Principales%20Contaminantes%20Del%20Rastro%20A%20Su%20Consumo.pdf>. Consultado el 16 de febrero de 2012.
- FIRA. 2003. Perspectivas de la red bovinos de carne. Fideicomisos Instituidos en Relación a la Agricultura. 15 p.
- FIRA. 2010. Panorama agroalimentario de la carne de bovino. Fideicomisos Instituidos en Relación a la Agricultura. 18 p.
- García L., A. 2002. Alerta epidemiológica por la intoxicación en humanos con clenbuterol y su empleo en la alimentación del ganado. *Revista Sanidad Militar México* 56(3) 131-134.

- Hahnau, S., and Jülicher, B., 1996, Evaluation of commercially available ELISA test kits for the detection of clenbuterol and other β_2 -agonists. Food Additives and Contaminants 13: 259- 274.
- Jeyaletchumi, P., Kharidah, M., Salam A., KK G., and Abdul H. 2004. Validation of ELISA test kits for detection of beta-agonist residues in meat. Journal of Tropical Medicine and Public Health 35 (2):481-487.
- Jiménez S., L. A., J. Garza R., H. Sumano L., H. Fragoso S. 2011. Vigilancia sanitaria en el uso ilícito del clenbuterol y su coordinación intersectorial en dos entidades de México. Revista Veterinaria México 42: 11-25.
- Mitchell, G. A., and D. Dunnavan. 1998. Illegal use of adrenergic agonists in United States. Journal of Animal Science 76: 208-211.
- Moreno, R. S., A. De-vega G., R. Ramírez H., R. Ávila B. 2010. Detección de clenbuterol por la técnica de ensayo inmunoenzimático en muestras de retina, suero y orina de bovinos sacrificados en rastros del estado de Puebla. In Primer Foro Nacional de Rastros 2 y 3 de agosto, Centro de Convenciones W.O. Jenkins de la ciudad de Puebla, México 8 p.
- Moreno M., R. S. 2011. Detección de los niveles de clenbuterol en rastros municipales del estado de Puebla a partir de muestras de retina mediante la técnica de ELISA. In 2do Foro Nacional de Rastros 9 y 10 de junio Puebla, México 9 p.
- NEOGEN, 2010. ELISA Screening for β -Agonist residues in Animal Tissue. http://www.fsis.usda.gov/PDF/CLG_CLN_3_01.pdf. Consultado 3 de marzo de 2010.
- NOM-004-ZOO-1994: Residuos tóxicos límites máximos permisibles y procedimientos de muestreo en grasa, hígado, músculo y riñón en aves, bovinos, caprinos, cérvidos, equinos, ovinos y porcinos. <http://www.senasica.gob.mx/?doc=522>. Consultado el 24 de febrero de 2012.
- NOM-EM-015-ZOO-2002: Especificaciones técnicas para el control del uso de β -agonistas en los animales. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
- NOM-061-ZOO-1999. 2000. Especificaciones zoosanitarias de los productos alimenticios para consumo animal. <http://www.senasica.gob.mx/?doc=519> Consultado el 24 de febrero de 2010.
- Peña, S. D., A. Uribe, A. Cordova-Izquierdo, and A. M. Michel. 2008. Clenbuterol residues in bovine feed and meat. Journal of biological Sciences 3: 1444-1445.
- Peters, A. R. 1989. B-agonists as repartitioning agents: a review. Veterinary Record 124:417-420.

- Ramírez T., J. J. 2009. Aplicación de un sistema de demanda casi ideal (AIDS) en cortes de carne (bovino, porcino y pollo) y huevo en México 1995-2008. Tesis doctoral. Colegio de Postgraduados 82 pp.
- Ren, X., Zhang, F., Chen, F., and Yang, T. 2009. Development of a sensitive monoclonal antibody-based ELISA for the detection of clenbuterol in animal tissues. *Food and Agricultural Immunology* 20(4) 333-344.
- R-Biopharm. 2010. Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of clenbuterol and other β -agonists. R-biopharm AG Darmstadt, Germany. 20 p.
- Salleras, L., A. Dominguez, E. Mata, J. L. Taberner, I. Moro, P. Salva. 1995. Epidemiologic study of an outbreak of clenbuterol poisoning in Catalonia, Spain. *Health Reports* 110: 339–342.
- SAS. 2004. SAS/STAT 9.1 User's Guide. SAS Institute Inc. Cary, NC, USA. 5180 p.
- Sauer, M. J., Dave, M., Lake, B. G., Manchee, G. R., Howells, L. C., Coldham, N. G. 1999. β_2 -agonist abuse in food producing animals: use of *in vitro* liver preparations to assess biotransformation and potential target residues for surveillance. *Xenobiotica* 29(5):483-97.
- Shelver, W. L., and Smith D. J. 2000. Evaluation of commercial immunoassays for cross-reactivity to clenbuterol stereoisomers and bovine metabolites. *Food Additives and Contaminants* 17 (10): 837- 845.
- SIAP. 2010. Estacionalidad de la carne de bovino 1998-2008. <http://www.siap.gob.mx/> Consultado el 23 de febrero de 2010.
- Signorini, M. 2008. Rastros municipales y su impacto en la salud pública. *Nacameh* (2): 1-24.
- Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica SINAVE. 2007. Intoxicación por clenbuterol del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. <http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2007/sem18/pdf/edit1807.pdf>. Consultado el 20 de abril de 2010.
- Sumano L., H., L. Ocampo C., y L. Gutiérrez O. 2002. Clenbuterol y otros β -agonistas, ¿una opción para la producción pecuaria o un riesgo para la salud?. *Revista Veterinaria México* 33: 137-159.
- Solís, M. 2002. Más que razones sanitarias en la problemática del clenbuterol. <http://www.cuatitlan2.unam.mx/comunidad/2002/num12/uc1.12.htm>. Consultado el 25 de septiembre de 2009.
- Shiu, T. C., and Chong Y. H. 2001. A cluster of clenbuterol poisoning associated with pork and pig offal in Hong Kong. *Public Health Epidemiology Bulletin* 10:14–17.