

Niveles de clenbuterol detectados en carne de bovino distribuida en Texcoco, Estado de México

Hernández-Sánchez D.^{1,3}; Francisco-Martínez A.²; Osorio-Reyes J.P.²; Cobos-Peralta M.A.^{1,3}; Crosby-Galván M.M.^{1,3}; Hernández-Mendo O.^{1,3}

¹Programa en Ganadería, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados km. 36.5 Carretera México- Texcoco Texcoco, Estado de México. CP. 56230.

²Departamento de Zootecnia, Universidad Autónoma Chapingo. km 38.5 Carretera México- Texcoco.

³Línea Prioritaria de Investigación en Inocuidad, Calidad de Alimentos y Bioseguridad (LPI-7), Colegio de Postgraduados.

*Autor responsable: sanchezd@colpos.mx

RESUMEN

El clenbuterol es un β -agonista sintético altamente residual no autorizado por la Secretaría de Salud en México para uso en engorda de ganado; su prohibición se establece en la norma oficial mexicana NOM-061-ZOO-1999 y la norma emergente NOM-EM-015-ZOO-2002. A pesar de esta normativa, los engordadores de ganado bovino lo usan en dosis que ponen en riesgo la salud del consumidor. En este sentido se determinó la presencia de residuos de clenbuterol en carne de bovino distribuida en establecimientos de productos cárnicos en la ciudad de Texcoco, Estado de México, a través de muestreos aleatorios para diagnosticar residuos de clenbuterol para el periodo octubre-diciembre de 2009. Se realizó con un tamaño de muestra de 20 % de los establecimientos y una recolecta de 200 g de carne del área del lomo en cada sitio. Los establecimientos muestreados incluyeron tiendas de autoservicio (Bodega Aurrera, Comercial Mexicana, Soriana, Sams y Walmart). Para determinar los residuos de clenbuterol se utilizó la prueba Ridascreen AG y se analizaron mediante comparación múltiple de medias (Tukey).

Los registros indicaron valores de 124 a 4,578 ppt., en cerca de 50 % de los sitios comerciales muestreados, los cuales sobrepasan los límites máximos permisibles de acuerdo al *Codex Alimentarius*.

Palabras clave: Clenbuterol, carne de bovino, carnicerías, salud, intoxicación.



INTRODUCCIÓN

La inocuidad alimentaria es un tema de interés común, debido a que en la actualidad los consumidores demandan alimentos seguros que no causen daño a la salud, propiciados por el uso de sustancias prohibidas, como es el caso del clenbuterol (β -agonista sintético) (Figura 1) que, en forma accidental o inducida, pueden contaminar la carne de bovino. Lo anterior obliga a generar tecnologías de rápida detección de sustancias que puedan provocar problemas de salud pública por su consumo (Domínguez *et al.*, 2010).

El clenbuterol es un β -agonista sintético altamente residual no autorizado por la Secretaría de Salud para uso en la engorda de ganado, prohibido bajo la norma oficial mexicana NOM-061-ZOO-1999 y la emergente NOM-EM-015-ZOO-2002 (SAGARPA, 2007). La problemática generada en México al usarlo como promotor de crecimiento es ilegal y es causa de intoxicación en la carne y sobre todo en el consumo de vísceras, especialmente de hígado (SINAVE, 2007). Lo anterior está relacionado con sus efectos a largo plazo y su posible relación con problemas cardíacos, por lo que ha sido prohibido para uso humano y restringido a un determinado grupo de animales en diversos países; sin embargo, en otros se permite para tratar el asma y problemas respiratorios, y como sustancia dopante por varios organismos deportivos a nivel mundial (Sumano *et al.*, 2002).

El clenbuterol pertenece al grupo de los agonistas β -2 adrenérgicos y se caracteriza por el fuerte efecto anticata-



Figura 1. Clenbuterol empleado en alimentación animal

bólico que origina disminución en la tasa de reducción proteica en la célula muscular, provocando mayor desarrollo de la misma (McNeel y Mersmann, 1995). También es utilizado por médicos veterinarios con fines terapéuticos, tales como manejo de patologías en equinos. Aun cuando en humanos la vida alcanza 36 horas, se establece de uso limitado (Mersmann, 1998). Los residuos de clenbuterol pueden afectar pulmones y corazón debido a que la ingesta de carne contaminada puede exceder las dosis médicas habituales para humanos, las cuales oscilan entre 40 y 60 $\mu\text{g d}^{-1}$, con riesgos mayores al exceder 150 $\mu\text{g d}^{-1}$ (Gopal, 2004). Con base en lo anterior, se realizó un estudio para determinar la presencia de residuos de clenbuterol en carne de bovino distribuida en la ciudad de Texcoco, Estado de México,

y formular un diagnóstico que evidencie el riesgo por su consumo.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se desarrolló en el Municipio de Texcoco, Estado de México, realizando muestreos aleatorios en establecimientos de productos cárnicos de bovino para diagnosticar residuos de clenbuterol. Los análisis químicos de las muestras de carne recolectadas se realizaron en el Laboratorio de Nutrición Animal y Microbiología del Postgrado en Ganadería del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Los muestreos de carne y los análisis químicos respectivos iniciaron en el mes de octubre y finalizaron en la primera semana de diciembre de 2009.

Muestreo en carnicerías

Se realizó un censo de establecimientos que distribuyen productos cárnicos de bovino en la ciudad de Texcoco y se determinó un tamaño de muestra de 20 % de sitios comerciales; en cada uno se recolectaron 200 g de carne del área del lomo (Figura 2). Los establecimientos que fueron muestreados incluyeron también tiendas de autoservicio de la localidad, tales como Bodega Aurrera, Comercial Mexicana, Soriana, Sams y Walmart. Las muestras fueron recolectadas a las 7:30 am, en cuatro periodos de muestreo, con intervalos de 15 días cada uno; se colocaron en refrigeración (4 °C) para su transporte y realizar las pruebas químicas.

Determinación de residuos de clembuterol:

Para la determinación de residuos de clembuterol en las muestras se utilizó la prueba RIDASCREEN® Clembuterol Fast-R-Biopharm, AG, Darmstadt, Germany Ridascreen® (Figura 3), la cual se basa en la reacción antígeno-anticuerpo. Antes de iniciar con el análisis de las muestras se les eliminó el contenido de grasa con el uso de hojas de bisturí, con la finalidad de que el tejido adiposo no interfiriera en la determinación de la prueba. Una vez eliminada la grasa, se homogeneizaron 100 g de carne en una licuadora hasta obtener una pasta de aspecto más masoso, se depositaron 5 g de la muestra en un tubo de centrífuga de 50 mL, y se adicionaron 25 mL de HCl, 50 mM. Se homogeneizó por agitación durante 20 minutos y se centrifugó a 6,000 g por 15 minutos a una temperatura de 10-15 °C.

Del paso anterior se transfirieron 18 mL del sobrenadante (3 g de muestra) en un vial de centrífuga, al cual se



Figura 3. Kit de Ridascreen® para la determinación de clembuterol en carne de bovino.

adicionaron 2 mL de de NaOH, 0.5 M y se mezcló durante 10 minutos. Se adicionaron 10 mL de KH_2PO_4 , buffer pH 3.0, 500 mM; se mezcló brevemente y se almacenó a 4 °C por un tiempo mínimo de 1.5 horas, y permaneció toda la noche en refrigeración. Posteriormente, se centrifugó a 4000 g por 15 minutos a temperatura de 10 a 15 °C; del sobrenadante se tomaron 10 mL (1 g de muestra) y se dejó calentar a temperatura ambiente (20-25 °C / 68 - 77 °F (20 a 25 °C)). Finalmente, la muestra se purificó con el uso de columnas RIDA®, suplidas con el Kit Ridascreen Clembuterol Fast.

Procesamiento de carne y tejidos con alto contenido de grasa
Este proceso se aplicó cuando las muestras presentaban



Figura 2. Muestreo de carnicerías y toma de muestra del área del lomo en la Ciudad de Texcoco.

alto contenido de grasa y no fue posible eliminarla manualmente; para ello se homogeneizaron de 100 a 200 g de muestra en una licuadora, hasta obtener una pasta masosa; 5 g de ésta se homogeneizaron por agitación 30 minutos con 25 mL de Tris-buffer, 50 mM, pH 8.5, durante 30 minutos; posteriormente, se añadieron 15 mL de n-heptano y se agitó durante cinco minutos para propiciar la eliminación de grasa de la muestra; concluido este proceso, se centrifugó a más de 4,000 g por 5 minutos a temperatura de 10 a 15 °C. Concluido el proceso se procedió a eliminar la capa superior de heptano, así como la capa fina de grasa intermedia entre el heptano y la muestra, mediante absorción con pipeta Pasteur. Este paso se repitió hasta en tres ocasiones (lavado con 15 mL de n-heptano) para eliminar completamente la grasa. A la muestra remanente, libre de grasa y de n-heptano, se le agregaron 0.5 mL de HCl concentrado 6 M, y se agitó por una hora (alternativamente se podría agitar durante toda la noche).

Se pesaron 6 g del homogeneizado de carne (correspondiente a 1 g de muestra). Se colocaron en un vial de centrifuga a más de 4000 g, por 15 minutos en temperatura de 10-15 °C. Se transfirió el sobrenadante a otro vial de centrifuga y se añadieron 300 μ l de NaOH 1 M; se mezcló durante 15 minutos y se agregaron 4 ml 500 mM de KH_2PO_4 500 mM, mezclando brevemente, y almacenó a 4 °C por 1.5 horas. Al día siguiente, se centrifugó a más de 4000 g por 15 minutos a 10 y 15 °C. El sobrenadante (casi transparente) se dejó calentar a temperatura ambiente (20 a 25 °C) y después se purificó con el uso de columnas suplidadas con el Kit Ridascreen.

Procedimiento del ensayo (reacción antígeno-anticuerpo)

Para iniciar la prueba se insertaron pozos en una microplaca integrada en el kit para los estándares y muestras. Inicialmente, en cada pozo se agregaron 100 μ L de solución de anticuerpos y se incubaron por 15 minutos a temperatura ambiente (Figura 4 A). Transcurrido este tiempo se eliminó la solución de los pozos invirtiendo la microplaca, sacudiéndola vigorosamente contra un papel secante y lavando con agua destilada a través de una piceta (este paso se realizó tres veces). Una vez realizado el tercer lavado, se colocaron en seis pozos con 20 μ L de los estándares (0, 100, 300, 900, 2700, 8100 ppt) y 20 μ L de la muestra por analizar en los pozos restantes; se adicionaron 100 μ L de la enzima-conjugada y se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente.

Se procedió a eliminar la solución de los pozos (sacudiéndola y lavando) y se agregó a cada pozo 100 μ L de cromógeno. Se mezcló e incubó en la oscuridad por 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se agregaron 100 μ L de la solución *stop*, que origina un cambio de color azul a amarillo (Figura 4 B). La concentración de clembuterol se midió por absorbancia a 450 nm, la cual es inversamente proporcional a la concentración de clembuterol en la muestra, con un lector de ELISA, y se analizó mediante el programa RIDASOFT WIN® (Ridascreen, 2002). Los valores iguales o mayores a 2000 ppt, fueron considerados positivos, mientras que los menores correspondieron a muestras negativas (Cuadro 1) (FAO, 1996).

Los datos obtenidos se analizaron como un diseño completamente al azar mediante el procedimiento GLM (SAS, 2001) y comparación múltiple de medias por medio de la prueba de Tukey (Steel y Torrie, 1988).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los residuos de clembuterol detectados en las muestras de carne mostraron amplia variación ($p < 0.05$) (Figura 5) entre los sitios muestreados, determinando niveles residuales que van desde los 124 hasta los 4,578 ppt. De acuerdo con la FAO (1996), una muestra se considera positiva a residuos de clembuterol y potencialmente tóxica cuando tiene un valor igual o mayor a 2,000 ppt, con un rango analítico de la prueba de 0 a 8,100 ppt (Ridascreen®, 2002); asimismo, el *Codex Alimentarius* (2011) establece 2,000 ppt como límite máximo de residuos (LMR) para clembuterol.

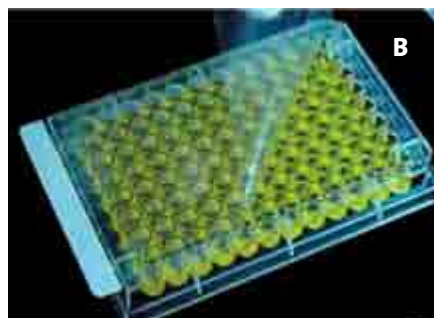
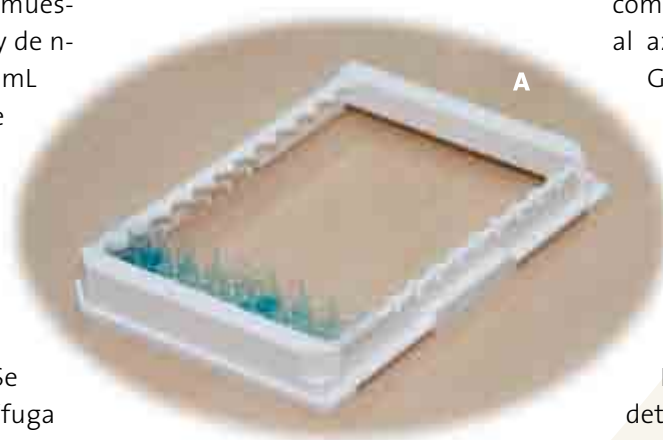


Figura 4. A: Microplaca integrada en el kit para determinar clembuterol. B: Cambio de coloración para muestras positivas a clembuterol.

Cuadro 1. Concentraciones de clembuterol que determinan una reacción positiva (FAO, 1996).

Muestra orgánica	Positiva ng kg ⁻¹ (ppt)
Tejidos	2,000
Alimento	10,000
Orina	2,000
Retina	3,000
Suero	2,000
Pelo	6,000

Lo anterior registró que alrededor de 50 % de los establecimientos que distribuyen carne de bovino en la ciudad de Texcoco representan riesgos de salud a los consumidores por expender carne con residuos de clembuterol superiores a los límites máximos permisibles (*Codex Alimentarius*, 2011), lo que implica que los animales de los que se obtuvo la carne para este estudio recibieron sobredosis de 5 y 10 veces superior a las permitidas para propósitos terapéuticos, propiciando una acumulación de residuos (Heinrich *et al.*, 1991).

Estrada-Montoya *et al.* (2008) realizaron un estudio en el noroeste de México para determinar la presencia de residuos de clembuterol en carne de bovino registrando, en 50 muestras obtenidas en el comercio y analizadas por inmunoensayo específico ligado a enzima (ELISA), un 12 % con residuos de clembuterol entre 3.06 y 6.12 mg.kg⁻¹; 26 %

con residuos de entre 0.5 a 1.83 mg.kg⁻¹; 48 % con 0.1 a 0.5 mg.kg⁻¹, y únicamente 14 % registró niveles inferiores al límite de detección con 0.1 mg.kg⁻¹ del ensayo ELISA. Las seis muestras que presentaron niveles más altos de residuos de clembuterol estuvieron sujetas a confirmación por medio de cromatografía de gases acoplada a un detector selectivo de masas-masas (GC-MS-MS), confirmando la presencia de clembuterol, el cual fue utilizado ilegalmente como promotor de crecimiento de bovinos.

Otro estudio realizado por Peña *et al.* (2008), donde se analizó la presencia de residuos de clembuterol en carne de bovino distribuida en el norte y sur de México, reveló que al menos 16.6 % de las muestras analizadas resultaron positivas al mismo en un intervalo de 0.1 a 2.3 µg.kg⁻¹. Estas evidencias, aunadas a los resultados de este estudio, indican que a pesar de que el uso de clembuterol está prohibido (NOM-EM-015, 2002), su uso sigue siendo indiscriminado, poniendo en riesgo la salud del consumidor. Por lo anterior, es necesario implementar sistemas de bioseguridad basados en la aplicación de buenas prácticas de producción y generar conciencia en los actores que participan en la cadena productiva, buscando que la inocuidad se mantenga a lo largo de todos los eslabones bajo el esquema “de la granja a la mesa”.

CONCLUSIONES

La carne de bovino distribuida en al menos

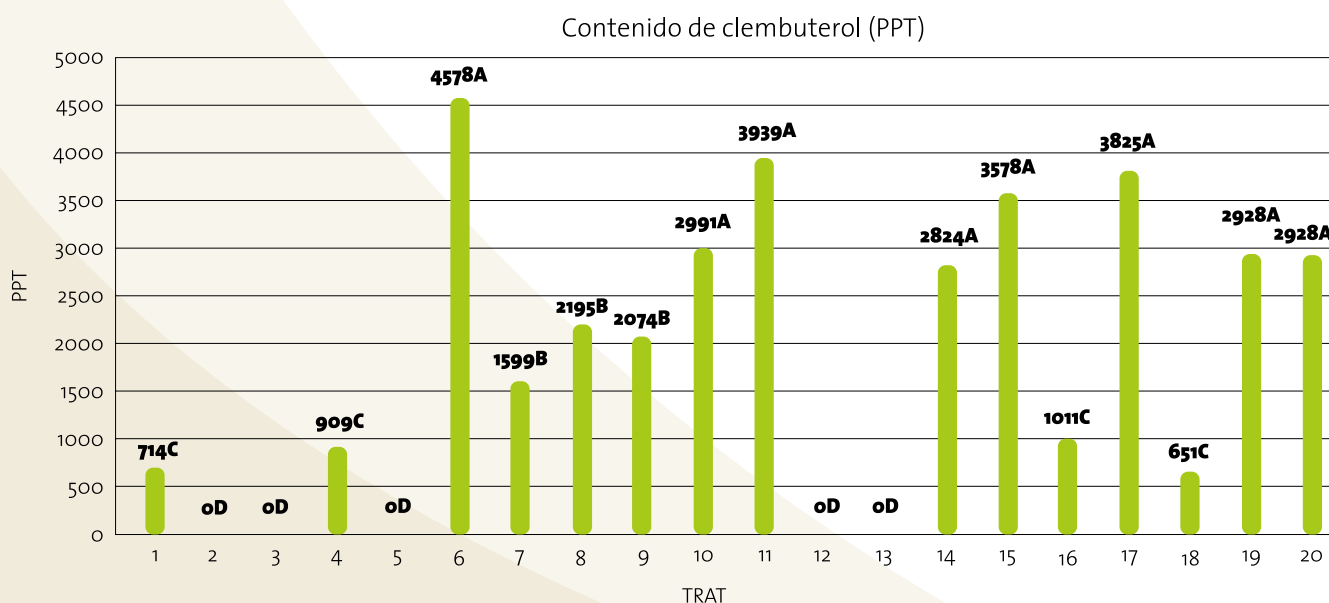


Figura 5. Contenido de clembuterol en muestras de carne recolectadas de sitios comerciales de la ciudad de Texcoco, Estado de México.

50 % de los establecimientos comerciales en la Ciudad de Texcoco registraron residuos de clenbuterol con niveles iguales o superiores a los límites máximos permisibles por la regulación nacional e internacional, implicando un riesgo para la población a pesar de que existe prohibición para el uso de este fármaco.

LITERATURA CITADA

- Codex Alimentarius*. 2011. Límites máximos de residuos para clenbuterol. 34a Reunión de la Comisión del Codex Alimentarius FAO/OMS. Roma, Italia 274 p.
- Domínguez V.D.I., Mondragón A.J., González R.M., Salazar G.F., Bórquez G.J.L., Aragón M.A. 2010. Los β -agonistas adrenérgicos como modificadores metabólicos y su efecto en la producción, calidad e inocuidad de la carne de bovinos y ovinos. *CIENCIA ergo sum*. 16 (3): 278-284
- Estrada-Montoya M.C., González-Córdova A.F., Torrescano G., Camou J.P., Vallejo-Córdova B. 2008. Screening and confirmatory determination of clenbuterol residues in bovine meat marketed in the northwest of México. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. 6(2): 130-136.
- FAO. 1996. Compendio de especificaciones para aditivos alimentarios. JECFA. Límites máximos para residuos (LMR) para clenbuterol. Roma, Italia. 65 p.
- Gopal K., Soppa R., Ryszard T. 2004. Effects of chronic administration of clenbuterol on function and metabolism of adult rat cardiac muscle. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288: H1468-H1476.
- Heinrich H., Meyer D., Rinke L.M. 1991. The pharmacokinetics and residues of clenbuterol in veal calves. *J. Anim. Sci.* 69:4538-4544.
- McNeel R.L., Mersmann H.J. 1995. β -adrenergic Receptor Subtype Transcripts in porcine Adipose Tissue. *J. Anim. Sci.* 73:1962-1971.
- Mersmann H.J., 1998. Overview of the effects of β -adrenergic receptor agonists on animal growth including mechanisms of action. *J. Anim. Sci.*, 76:160-172
- NOM-EM-015-ZOO. 2002. Norma Oficial Mexicana de Emergencia. Especificaciones Técnicas para el control de uso de β -agonistas en alimento para animales.
- Peña B.S.D., Uribe A., Córdova-Izquierdo A., Michel A.M. 2008. Clenbuterol Residues in Bovine Feed and Meat. *Research Journal of Biological Sciences*. 3(12): 1444-1445.
- RIDASCREEN. 2002. Clenbuterol Fast. Competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of clenbuterol and other β -agonists in urine, serum/plasma, liver, kidney, meat and tissue. R-Biopharm AG. Germany
- SAS. 2001. User's Guide: Statistics, version 8 th de. Sas Inst. Inc., Cary, N.C. CD-ROM.
- SAGARPA. 2007. Plan Nacional de Desarrollo Pecuario 2006-2012 Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Normas Mexicanas (NMX) y Oficiales Mexicanas (NOM) relacionadas con la ganadería. <http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Paginas/Legislacion.aspx> 30 Septiembre, 2011.
- SINAVE. 2007. Secretaría de Salud. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE). Información Epidemiológica. Boletín de Epidemiología. <http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2007/sem18/index.htm> 30 Septiembre, 2011.
- Steel R.G., Torrie J.H. 1988. Bioestadística. Principios y procedimientos. Segunda edición. McGraw Hill, México. 622 p.
- Sumano H.L., Ocampo L.C., Gutiérrez L.O. 2002. Clenbuterol and other β -agonists, are they an option for meat production or a threat for public health? *Vet. Méx.* 33 (2): 137-159.

