



UNIVERSIDAD DE CHILE

**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS**



**“VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA
LA DETECCIÓN DE ESTILBENOS Y ZERANOL, EN
TEJIDO MUSCULAR DE ESPECIES DE INTERÉS
COMERCIAL”**

ANDRÉS EDUARDO SANDOVAL GORGOLLÓN

Memoria para optar al Título Profesional
de Médico Veterinario Departamento de
Ciencias Clínicas

PROFESOR GUÍA: BETTY SAN MARTÍN NUÑEZ

**SANTIAGO, CHILE
2007**

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS	1
INDICE DE TABLAS Y FIGURAS	3
RESUMEN	5
ABSTRACT	7
INTRODUCCIÓN	9
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	11
Origen.....	11
Farmacocinética.....	14
Vías de administración	16
Efectos adversos en la salud humana.....	17
Efectos adversos del Dietilestilbestrol	17
Efectos adversos del Zeranól.....	20
Legislaciones para el uso de estilbenos y zeranól en animales de producción.....	22
Programas para el control de residuos.....	24
Métodos de análisis.....	26
Validación de metodologías analíticas	27
OBJETIVO GENERAL.....	31
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
MATERIAL Y MÉTODO.....	32
MATERIALES.....	32
METODOLOGÍA ANALÍTICA	34
PROCEDIMIENTO DE VALIDACIÓN INTERNA.....	35
Especificidad:	35
Tiempo de retención del analito:	35
Recuperación:	36
Reemplaza:	36
Precisión (Reproducibilidad intralaboratorio):	37
Repetitividad:.....	37
Curvas de Calibración:	38
Límite de Decisión $CC\alpha$: (Límite de detección)	39
Capacidad de detección $CC\beta$: (Limite de cuantificación)	39
Robustez	40
RESULTADOS	42
VALIDACIÓN DEL MÉTODO	42
Especificidad:	42
Tiempo de retención de los analitos:.....	43
Recuperación:	43
Precisión (Reproducibilidad intralaboratorio):.....	45
Repetitividad:.....	47
Curvas de Calibración:	48
Limite de Decisión $CC\alpha$ (Limite de detección):.....	50
Capacidad de detección $CC\beta$ (Limite de cuantificación):	50
Robustez:	51
DISCUSIÓN	52

CONCLUSIONES.....	57
BIBLIOGRAFÍA	58
ANEXOS	64

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1: Presentación y vías de administración de agentes anabólicos.	16
Tabla 2: Intervalos de recuperación según fracción de masa.	36
Tabla 3: Porcentajes de recuperación de hexestrol en matriz de salmón.	44
Tabla 4: Porcentajes de recuperación de dietilestilbestrol en matriz de salmón.	44
Tabla 5: Porcentajes de recuperación de dienestrol en matriz de salmón.	45
Tabla 6: Porcentajes de recuperación de zeranol en matriz de salmón.	45
Tabla 7: Concentración cuantificada y CV por nivel de enriquecimiento de hexestrol en matriz de salmón.	46
Tabla 8: Concentración cuantificada y CV por nivel de enriquecimiento de dietilestilbestrol en matriz de salmón.	46
Tabla 9: Concentración cuantificada y CV por nivel de enriquecimiento de dienestrol en matriz de salmón.	46
Tabla 10: Concentración cuantificada y CV por nivel de enriquecimiento de zeranol en matriz de salmón.	46
Tabla 11: Concentración cuantificada y CV por nivel de enriquecimiento de hexestrol en matriz de salmón, para cálculo de repetitividad.	47
Tabla 12: Concentración cuantificada y CV por nivel de enriquecimiento de Dietilestilbestrol en matriz de salmón, para cálculo de repetitividad.	47
Tabla 13: Concentración cuantificada y CV por nivel de enriquecimiento de dienestrol en matriz de salmón, para cálculo de repetitividad.	47
Tabla 14: Concentración cuantificada y CV por nivel de enriquecimiento de zeranol en matriz de salmón, para cálculo de repetitividad.	48
Tabla 15: Factores y matriz de interacciones para cálculo de robustez del método.	51
Figura 1: Estructura química de los estilbenos: dienestrol, dietilestilbestrol y hexestrol.	12
Figura 2: Estructura química y origen del zeranol y sus derivados.	13
Figura 3: Estructuras químicas, nombres y abreviaciones de la familia del zeranol.	14
Figura 4: ejemplos de CV de reproducibilidad de los métodos cuantitativos en un intervalo de fracciones de masa de analito.	37
Figura 5: Comparación cromatográfica de matriz de salmón blanco (cromatograma superior) con matriz de salmón fortificada (cromatograma inferior).	42

Figura 6: Cromatograma de droga pura de hexestrol, dietilestilbestrol, dienestrol y zeranol.....	43
Figura 7: Curva calibración de hexestrol.....	48
Figura 8: Curva de Calibración de dietilestilbestrol.....	49
Figura 9: Curva de calibración de dienestrol.....	49
Figura 10: Curva de calibración de zeranol.....	50

RESUMEN

Los estilbenos y el zeranol, son medicamentos con efecto anabólico, que actualmente se encuentran prohibidos en la Comunidad Europea, debido a sus reconocidos efectos carcinogénicos y teratogénicos. Sin embargo, en Chile y en los Estados Unidos de Norte América, el uso de zeranol en ganado destinado a consumo humano está permitido; en estos países se han establecido límites máximos residuales.

Con el objetivo de asegurar la inocuidad de los alimentos destinados a consumo humano, se han debido implementar metodologías analíticas sensibles y específicas como la cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas (GC-MS/MS).

El objetivo de esta tesis, fue validar de acuerdo a las normativas de la Comunidad Europea, un método multiresidual por GC-MS/MS con detector trampa de iones, para la detección de estilbenos y zeranol, en tejido muscular de salmón, bovino, cerdo y pollo.

La sensibilidad del método determinó un límite de decisión o $CC\alpha$ de 1,3 ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$) para Hexestrol; 1,61 ppb para Dietilestilbestrol (DES); 1,15 ppb para Dienestrol y 0,98 ppb para Zeranol. Se obtuvo un límite de cuantificación o $CC\beta$ de 3,37 ppb para Hexestrol; 2,75 ppb para Dietilestilbestrol; 1,97 ppb para Dienestrol y 2,96 ppb para Zeranol. El coeficiente de determinación para todos los analitos fue mayor a 0,90 ($r^2 > 0,90$)

El rango de recuperación del método fue de 89,4% - 112,17%. La precisión expresada como coeficiente de variación fluctuó entre 2% - 14%.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el método cumple con los parámetros exigidos por la normativa de la Comunidad Europea, siendo eficiente en la detección y cuantificación de residuos de estilbenos y zeranól en las matrices estudiadas. Se puede concluir que el método validado puede ser utilizado en la determinación y cuantificación de residuos de estilbenos y zeranól de acuerdo a las normativas nacionales e internacionales, permitiendo que el producto de exportación cumpla con los requisitos de inocuidad alimentaria exigidos por los países importadores.

ABSTRACT

Stilbenes and zeranol are anabolic drugs, currently, forbidden in the European Community due to their recognized carcinogenic and teratogenic effects. Nevertheless, in Chile and the United States of North America, the use of zeranol in cattle fattening production system is allowed; in these countries maximal residual limits have been established.

To assure delivery of safe animal products to human consumption, sensitive and specific analytical methods developed like gas chromatography coupled with mass spectrometry detection (GC-MS/MS) have been.

The objective of this thesis was to validate, a multiresidual method by GC-MS/MS with ion trap detector, for the detection of stilbenes and zeranol in salmon, bovine, pork and chicken muscle, under the European Community guidelines.

The sensitivity of the method determined a decision limit or $CC\alpha$ of 1.3 ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$) for Hexestrol; 1.61 ppb for Diethylstilbestrol (DES); 1.15 ppb for Dienestrol and 0.98 ppb for Zeranol. A quantification limit or $CC\beta$ of 3.37 ppb was obtained for Hexestrol; 2.75 ppb for Diethylstilbestrol; 1.97 ppb for Dienestrol and 2.96 ppb for Zeranol. The coefficient of determination for all the analytes was higher than 0.90 ($r^2 > 0.90$).

The range for recovery (expressed as percentages) of the method was 89.4% - 112.17%. The precision, expressed as coefficient of variation (CV) ranged between 2% - 14%.

According to these results, the method fulfills the parameters established by the European Community directives, being efficient for the detection and quantification of stilbenes and zeranol residues in the studied matrices and can be used for the analysis of animal products that will be exported to other countries.

INTRODUCCIÓN

Como consecuencia del aumento de población humana, ha debido incrementarse la producción de alimentos proteicos de origen animal, convirtiéndola en un reto para todas aquellas personas que se desempeñan dentro del campo de la producción animal.

Para alcanzar este fin se han empleado agentes anabólicos por ser sustancias con efecto hormonal que influyen en las funciones metabólicas del animal, mejorando el balance de nitrógeno en el organismo y por consiguiente, incrementando la producción de proteínas en el mismo. Los anabólicos más usados en la ganadería son las hormonas gonadales masculinas y las que tienen actividad progestacional.

Sin embargo, todo esto tiene que estar de acuerdo a la necesidad de producir alimentos de calidad, que sean inocuos para la salud humana, existiendo gran preocupación a nivel mundial por la inocuidad de los alimentos de origen, no solo por parte de organismos relacionados al tema si no que también por los propios consumidores, cada día más exigentes.

Dentro de este contexto, un aspecto importante a considerar son los Residuos de Medicamentos Veterinarios en los alimentos de origen animal, entre los que se encuentran los estilbenos y zeranol. Se sabe que los efectos adversos que pueden causar estos fármacos son independientes de la dosis ingerida, bastando pequeñas concentraciones para que se presenten.

Con el fin de asegurar que los alimentos de origen animal estén libres de medicamentos, diversos países, incluido Chile, tienen implementados planes que monitorean la presencia de residuos farmacológicos. Estos planes de monitoreo resultan de gran importancia para las exportaciones de productos pecuarios de nuestro país a mercados tan exigentes como la Unión Europea, Asia pacífico y Estados Unidos de América.

A su vez las normativas nacionales e internacionales solicitan a los laboratorios analíticos, una validación de las metodologías analíticas utilizadas en la detección de residuos con el fin de que los resultados de los análisis sean trazables, confiables y homologables en todos los países.

Según lo expuesto anteriormente, el objetivo del presente trabajo es validar un método analítico para la detección de estilbenos y zeranol por cromatografía de gases con espectrometría de masas, según las directrices de la Unión Europea.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En la producción de animales de abasto se utiliza una gran variedad de productos farmacológicos ya sea con fines terapéuticos, zotécnicos o como promotores de crecimiento, dentro de ellos se encuentran las hormonas. La mayoría de estos productos son susceptibles de dejar residuos en los alimentos procedentes de los animales que han sido tratados. Estos residuos pueden provenir del principio activo en su forma original o de metabolitos durante su aplicación. (Jalón *et al.*, 1997)

La administración de las hormonas con fines terapéuticos es necesaria, pero cuando se utilizan de forma indiscriminada y abusiva, fundamentalmente como anabólicos, sin atender a los principios de las buenas prácticas veterinarias, la presencia de residuos en los alimentos puede causar un grave riesgo para la salud de los consumidores (Jalón *et al.*, 1997).

Origen

El DES es un estrógeno sintético que regula la respuesta fisiológica y ha sido utilizado extensamente como promotor del crecimiento en el ganado bovino y en el tratamiento de deficiencia de estrógenos. Las estructura química del dienestrol y hexestrol son muy semejantes al dietilestilbestrol (Figura 1) (Sulan *et al.*, 2005)

El dietilestilbestrol fue administrado con fines terapéuticos a mujeres embarazadas entre los años 1950 a 1960, abandonado su uso debido a sus efectos teratogénicos y cancerígenos. Actualmente, el di fosfato de dietilestilbestrol se utiliza oralmente en la terapia de estrógeno para cáncer de próstata. (Dobrydneva *et al.*, 2003)

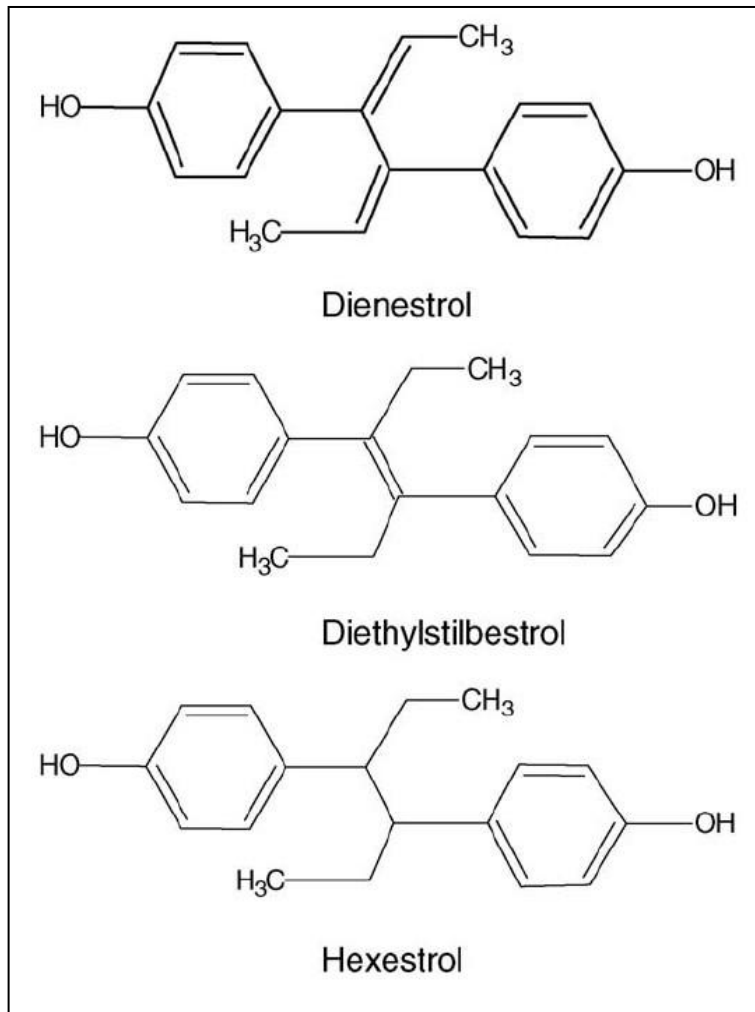


Figura 1: Estructura química de los estilbenos: dienestrol, dietilestilbestrol y hexestrol.

El zeranol es un derivado del micoestrógeno zearalonona, producido por diversas especies de fusarium (Figura 2). Estos hongos colonizan con frecuencia diversos tipos de granos como maíz, cebada, trigo, avena y sorgo. El diastereoisómero correspondiente a β -zearalonona es sintético y preparado por reducción de 6 acetonas de zearalonona. Existe la hipótesis de que el Zeranol es formado "in vivo" desde α -Zeralenol, zeralenona, y desde β -zeralenona presumiblemente por la microflora del rumen. La

reducción de zearalanona parece ocurrir también en el hígado de animales o humanos (Erasmuson *et al.*, 1994; Daxenberger *et al.*, 2001; Laganá *et al.* 2001)

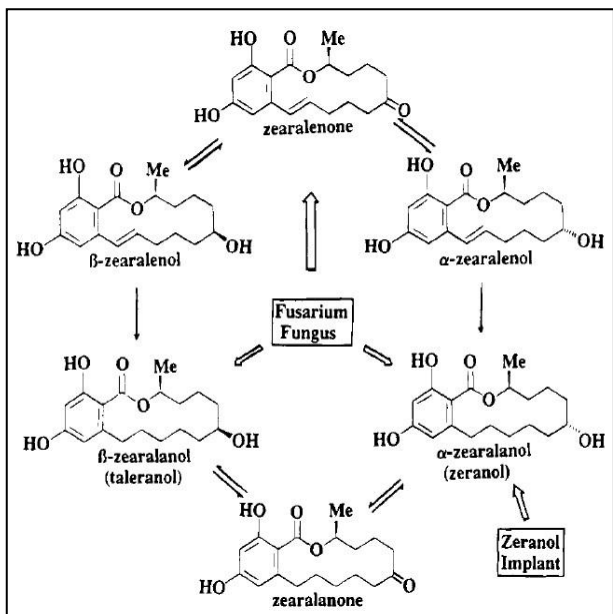


Figura 2: Estructura química y origen del zeranól y sus derivados.

Según sus estructuras químicas (Figura 2), este grupo de compuestos se llaman “resorcylic acid lactones”. Sólo el zeranól se utiliza como un promotor de crecimiento bajo el nombre comercial de Ralgro®. Como a menudo se confunden las estructuras químicas y nombres, estos son resumidos en la figura 3 (Metzler y Pfeiffer, 2001)

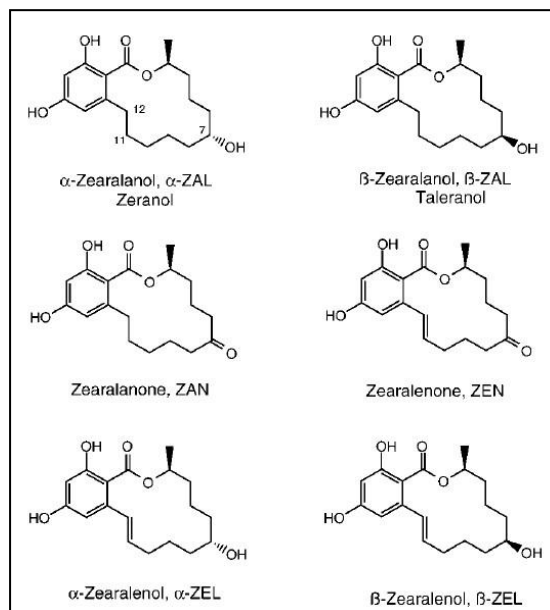


Figura 3: Estructuras químicas, nombres y abreviaciones de la familia del zearanol.

Farmacocinética.

Uno de los mecanismos de acción de los anabólicos consiste en el aumento de la secreción de la hormona de crecimiento por estimulación de la glándula pituitaria, lo que determina una mayor retención de nitrógeno y una menor tasa de urea en la sangre. El efecto es diferente si el compuesto es andrógeno (desarrollo de fibras estriadas del músculo) o si es gestágeno o estrógeno (síntesis de proteína tisular, sin acción sobre las células musculares). Un caso diferente es el de la trembolona, que actúa disminuyendo el catabolismo proteico con el consiguiente aumento de la retención proteica tisular (Jalón *et al.*, 1997).

El metabolismo del zearanol, ha sido estudiado en varias especies, siendo el metabolito principal la zeralanona, la cual es producida por oxidación. El zearanol y sus metabolitos son excretados en la bilis y en algunas especies por la orina, después de una conjugación a nivel hepático (Rico, 1983).

El metabolismo del zeranol marcado radioactivamente con tritio en C11 y C12 (figura 3), ha sido estudiado en la rata femenina de Wistar, conejo de New Zealand, perros Beagle, mono de Rhesus y hombre. Conjugados de zeralenona (ZEN) y zeralanona (ZAN) fueron encontrados como metabolitos urinarios en todas las especies; además, taleranol (B-ZAL) fue detectado en la orina de conejo. Uno de los metabolitos en la orina humana fue identificado como zeralanol hidroxilado o zeralanona de anillo abierto. La suposición de que el metabolismo oxidativo del zeranol es mucho más complejo que lo descrito en los informes publicados es corroborado por estudios recientes en biotransformación "in vitro" de zeranol con varios microsomas (Pfeiffer y Metzler, datos no publicados): cinco metabolitos nuevos y cantidades pequeñas de B-ZAL y de ZAN fueron detectados por HPLC en incubaciones de zeranol con microsomas de hígado de rata. Los nuevos metabolitos fueron identificados tentativamente por GC/MS como derivados monohidroxilados de zeranol. Tres de ellos fueron formados también por microsomas del hígado bovino, además de B-ZAL. (Metzler y Pfeiffer, 2001)

El DES es levemente transformado en el organismo y su actividad después de la administración oral es muy alta. Es excretado en la bilis y heces en una forma libre y en orina en forma conjugada. Dos metabolitos de esta sustancia son ω -OH-dienestrol y dienestrol (Rico, 1983).

El hígado convierte los agentes anabólicos en metabolitos biológicamente menos activos y conjugados que los hacen más solubles al agua. Algunas de las fracciones conjugadas pueden ser hidrolizadas a la forma libre por bacterias del tracto gastrointestinal; la forma libre es excretada o reabsorbida vía circulación entero-hepática y finalmente son excretados en las heces, orina y leche. (Heitzman, 1983)

Vías de administración

Los agentes anabólicos exógenos como el acetato de trembolona, zeranol y DES pueden ser administrados por vía oral y metabolizados en el hígado, como anabólicos endógenos. (Rico, 1983).

Las preparaciones de agentes anabólicos pueden ser clasificadas como se expone en la siguiente tabla (Tabla 1):

Tabla 1: Presentación y vías de administración de agentes anabólicos.

Formulación	Vía de administración
Aditivo en comida	Oral
Suspensión oleosa, microcristalina	Inyección intramuscular o subcutánea
Pellet comprimido, caucho silicona impregnado	Implante subcutáneo

Los aditivos en las comidas tienen la ventaja de regular su ingesta manteniendo constante la concentración del agente en circulación. Sin embargo, esta vía de administración es limitada ya que son metabolizados en intestino o rumen, o durante la absorción inicial del sistema porta en el hígado. (Heitzman, 1983)

Las suspensiones inyectables de agentes anabólicos, son frecuentemente usadas con propósitos terapéuticos y como promotores del crecimiento a causa de que ellos son rápidamente absorbidos del sitio de inyección. (Heitzman, 1983)

Los “pellets”, comprimidos e inyecciones intramusculares exhiben similar cinética de absorción exponencial, aunque su tasa de disolución es mucho más lenta. Implantes vía subcutánea de zeranol, acetato de trembolona, DES, dienestrol y hexestrol, lograron concentraciones efectivas por 2 a 4 meses después de su administración. El uso de estos productos pueden dejar altas concentraciones de residuos en el sitio de administración, bilis, músculo, heces y orina. Se sugiere como tejidos blancos el hígado y riñón por ser los órganos donde la depleción de estos fármacos es más lenta en los programas de control de residuos. (Heitzman, 1983)

Efectos adversos en la salud humana

Las hormonas esteroidales están implicadas en varios tipos de cánceres, incluyendo el cáncer de mamas y cervicales en mujeres, próstata y neoplasia testicular en hombres, y otras enfermedades tales como síndrome poliquístico del ovario y malformaciones de los órganos genitales externos e internos. Los efectos carcinógenos y teratogénicos de los estrógenos se han demostrado en estudios en animales y han sido implicados a las mujeres que prenatalmente fueron expuestas al DES. (Andersson y Skakkebæk, 1999)

Efectos adversos del Dietilestilbestrol

Dentro de los efectos adversos asociados al DES se encuentran procesos de mutagénesis, carcinogénicos y teratogénicos. Estos efectos y otros han sido mencionados en los estudios citados a continuación.

Se ha demostrado que el DES tiene una gran afinidad por los receptores estrogénicos en úteros bovino y humanos, esta afinidad puede ser la causa de la expresión de distintos efectos hormonales, que pueden ocurrir después de la ingestión por el hombre. Por oxidación, algunas drogas pueden llevar a la formación de metabolitos reactivos de vida corta y de naturaleza electrofílica que pueden reaccionar con grupos nucleofílicos en algún constituyente celular como las aminas y grupos presentes en macromoléculas como ADN, ARN y proteínas. Esto lleva a la formación de complejos covalentes que han sido involucrados en procesos de mutagénesis, carcinogénesis y toxicidad de riñón e hígado. (Rico, 1983)

Se estima que entre los años 1941-1971, alrededor de 5 y 10 millones de embarazadas fueron expuestas al DES; la indicación original fue usada para prevenir abortos en embarazos de riesgo elevado. Las consecuencias adversas de esta exposición habían sido divulgadas en el año 1949, sin embargo, no fue hasta el desarrollo de un cáncer vaginal, conocido como claro-célula adenocarcinoma (CCA) en 1971, que se relacionó la teratogenicidad de este esteroide. (Martino *et al.*, 2002)

El CCA de la vagina y del cérvix explica aproximadamente el 2% de cánceres ginecológicos, y se estima que 1 en 1.000 mujeres expuestas al DES desarrollarán CCA además de otras anomalías genitales. Secuelas del uso del DES incluyen anomalías estructurales de las zonas reproductivas de las hijas de madres expuestas y posiblemente un aumento en la incidencia del cáncer de pecho en esas madres. (Martino *et al.*, 2002)

El mecanismo de la acción en el desarrollo del adenocarcinoma cervical y vaginal es teratogénico más que carcinógeno. El DES se ha demostrado capaz de modificar la expresión de los genes HOXA9 y

HOXA10, que están implicados en la diferenciación estructural de la zona reproductiva. La adenosis vaginal se ha descrito en asociación con CCA y ocurre en casi el 45% de pacientes expuestos al DES. La adenosis es visible como quistes o como granulaciones de la mucosa vaginal. (Martino *et al.*, 2002)

De las mujeres expuestas al DES un 25% tienen cambios estructurales a su cérvix y vagina, incluyendo un tabique vaginal transversal, los cantos transversales, hipoplasia cervical, y pseudopolipos. La alteración uterina más común es un útero en forma de T. Otras anomalías comunes que pueden afectar el potencial reproductivo son constricciones cerca de la entrada al útero, tamaño y volumen más pequeño e histerosalpingograma anormal. Estos cambios ocurren sobre el 69% de las mujeres expuestas al DES. (Martino *et al.*, 2002)

En los hijos de mujeres expuestas al DES, se han observado quistes epididimales, criptorquidia e hipoplasia testicular. Existen evidencias de anomalías de la esperma, infertilidad, e incremento del riesgo del cáncer testicular. (Martino *et al.*, 2002)

Se ha descrito además, un posible aumento del riesgo de cáncer de mamas en las mujeres que tomaron el DES durante el embarazo. (Martino *et al.*, 2002)

La exposición neonatal y prenatal prematura de hembras al DES interfiere con el crecimiento del folículo, que conduce a un número de desórdenes reproductivos incluyendo la formación de folículos poliovulatorios con células hipertróficas de la theca interna causando elevación de los niveles de andrógeno. Sin embargo, el DES añadido a un

medio de cultivo inhibe con eficacia la producción de andrógeno y de estrógenos. (Myllymäki *et al.*, 2005)

Efectos adversos del Zeranol.

El zeranol estimula el crecimiento en ganado de carne; de particular interés es el incremento del área pélvica, ya que una baja área pélvica está involucrada en distocias en vacas de primer parto. El tratamiento con zeranol aparentemente no ha tenido efecto adverso en el comienzo de la pubertad en novillas de carne. Mientras es posible que haya una disminución en la concepción. (Staigmiller *et al.*, 1983)

Aún cuando se ha observado que la toxicidad del zeranol es mucho menor que las aflatoxinas, sustancias químicas que también son sintetizadas por diversas especies de hongos, la preocupación radica en su notable efecto estrogénico y características anabólicas descubiertas en ratas, ratones, aves de corral y cerdos; la zeralanona y sus derivados pueden conducir a un hiperestrogenismo y problemas de fertilidad severos, sobretodo en cerdos. Además, pruebas biológicas han considerado el zeranol como agente cancerígeno (Rosenberg *et al.*, 1998)

Zeralanona y sus derivados tiene una baja toxicidad aguda y sus propiedades son consideradas controversiales; se conocen por ejercer una notable actividad estrogénica y propiedades anabólicas debido a su habilidad de emparejarse con el receptor de estrógeno, teniendo como resultado severos efectos en el sistema reproductor pudiendo llevar a hiperestrogenismo. Algunos de ellos son utilizados como promotores de crecimiento para el ganado, principalmente α -zeranol. (Dobrydneva *et al.*,

2003) se ha descrito además un efecto anti-implantación en hembras expuestas a zeralanol (Revuelta *et al.*, 1997)

Tres bioensayos “in-vitro” (Le Guavel y Pakdel, 2001), fueron utilizados para comparar la actividad estrogénica de sustancias químicas utilizadas como promotores de crecimiento en el ganado vacuno (17 β -estradiol, α -zeralanol, testosterona, trenbolona, acetato de trenbolona, acetato de melengestrol) o encontrado como contaminantes en alimentos tales como las micotoxinas zeralanona y algunos de sus metabolitos. La evaluación de la potencia estrogénica de estas sustancias químicas, claramente demostraron la fuerte estrogénicidad de la micotoxina zeralanona y sus metabólicos y especialmente zeralanol que era tan poderoso como estradiol y dietilestilbestrol en la línea endometrial humana de la célula de Ishikawa. (Le Guavel y Pakdel, 2001)

En ratas la exposición de zeralanona producen la disminución de la fecundidad, reabsorción o deformidades de fetos, y aborto en altas concentraciones. (Turcotte *et al.*, 2005)

Dada la gran capacidad estrogénica del zeralanol, y de sus metabolitos es importante analizar los efectos adversos de los estrógenos. Hoy en día, se sugiere que el estradiol representa un agente carcinógeno y mutágeno débil, capaz de inducir lesiones genéticas con baja frecuencia. (Daxenberger *et al.*, 2001; Turcotte *et al.*, 2005)

Los estrógenos, incluyendo las hormonas naturales estrona y estradiol, inducen tumores en animales de laboratorio y han sido reconocidos como cancerígenos en humanos, aumentando el riesgo de cáncer de mamas y útero. Se pensaba que los estrógenos actuaban

solamente como promotores de la carcinogénesis mamaria. Recientemente, cambios cromosómicos producidos por el estradiol (aneuploides) y aberraciones cromosómicas estructurales se han detectado en cultivos celulares y en riñón del hámster Syrian. Con estos datos se puede concluir que el estradiol desempeña un papel dual como agente mutágeno carcinógeno y como hormona estimuladora del crecimiento en la inducción de tumores. (Liehr, 2001)

Legislaciones para el uso de estilbenos y zeranol en animales de producción.

En países de la Unión Europea, cualquier uso de hormonas para mejorar el crecimiento en animales está prohibido, mientras que en otros países, como por ejemplo Estados Unidos de Norteamérica (EEUU) y Canadá se permite el uso de Zeranol. (Pfaffl *et al.*, 2003).

La Comunidad Europea a través de la Directiva 96/22 (Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 1996a), prohíbe el uso de estos fármacos y mediante la Directiva 96/23 establece Planes de Vigilancia de estos residuos (Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 1996b) en los estados miembros. Del mismo modo, mediante la Decisión 657/2002 establece los criterios de funcionamiento de los métodos de análisis y de interpretación de resultados (Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 2002) y con estos criterios, los laboratorios autorizados encargados de cumplir los planes de vigilancia elaboran métodos de análisis para identificar y cuantificar estos residuos en las distintas matrices como son músculo, hígado, riñón, leche, miel y huevos.

EEUU a través de la Administración de Drogas y Alimentos (FDA), establece límites para distintos residuos farmacéuticos en animales; en el caso de las hormonas, establece límites residuales en distintos tejidos de origen animal; para el estradiol y sus ésteres relacionados es de 0,120 µg/Kg (ppb); las tolerancias para residuos de zeranól en tejidos comestibles de ganado no se requieren (FDA, 2004). A su vez el Codex Alimentarius (CODEX) establece para el zeranól un Límite Máximo Residual (MRL) para hígado de 10 µg/kg y en músculo de 2 µg/kg (Codex Alimentarius, 1995).

La directiva 96/23/CE de la Comunidad Europea señala las medidas de control respecto los residuos en los animales vivos y sus productos. En el artículo 3 de esta Directiva, se establecen los residuos que se deben buscar en los programas de vigilancia realizados en la cadena de producción; en el anexo I se señala los que pertenecen al grupo A y al grupo B:

Grupo A: determina a las sustancias con efecto anabolizantes y sustancias no autorizadas:

1. Estilbenos, derivados de estilbenos, sus sales y ésteres; Dietilestilbestrol (DES), Dienestrol (DE), Hexestrol (HEX).
2. Agentes antitiroideos.
3. Esteroides.
4. "Resorcylic Acid Lactones" (incluido el Zeranól)
5. β-agonistas
6. Sustancias incluidas en el anexo IV del reglamento (CEE) nº 2377/90 del consejo, de 26 de junio de 1990

Grupo B se encuentran medicamentos veterinarios y contaminantes:

1. Sustancias antibacterianas, incluidas las sulfonamidas, quinolonas.
2. Otros medicamentos veterinarios.
3. Otras sustancias y contaminantes medioambientales.

A la vez en la directiva 96/23/CE en su anexo II se determina el grupo de residuos o sustancias que habrán de detectarse según el tipo de animales, piensos y agua de beber y por tipo de productos animales de origen primario (Anexo 1). En esta se señala la detección de residuos de estilbenos y zeranól en bovinos, caprinos, ovinos, porcinos y equinos, aves de corral, carne de conejo y carne de caza de cría o silvestre. Para animales de acuicultura la detección de estilbenos está indicada no así el zeranól (Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 1996b)

Para los estilbenos y zeranól, sustancias prohibidas en la Unión Europea, se utiliza el concepto de límite mínimo de funcionamiento exigido (MRPL) que es el contenido mínimo de un analito en una muestra que debe ser detectada y confirmada. El MRPL, permite armonizar el funcionamiento analítico de los métodos aplicables a las sustancias para las que no se ha establecido un MRL. (Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 2002)

Programas para el control de residuos

Con el objetivo de asegurar la entrega de productos alimenticios libres de residuos de medicamentos de uso veterinario a la población humana y disminuir la contaminación ambiental, distintos organismos como el CODEX, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación y

Organización Mundial de la Salud (FAO/OMS) y la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), han normado sobre el uso racional de estas drogas en animales destinados a consumo humano, normas entre las que se incluyen los Programas de Control de Residuos de Medicamentos Veterinarios (San Martín, 2001). De los organismos nombrados anteriormente, es la comisión del CODEX quien tiene la responsabilidad de redactar normas, directivas y recomendaciones en lo que respecta a calidad y protección alimentaria, con el fin de proteger la salud de los consumidores y garantizar que el comercio internacional se base en prácticas conjuntas (Codex Alimentarius, 1995)

Según el CODEX (1996), los países necesitan programas reglamentarios de control para asegurar a la población un suministro inocuo y sano de alimentos. Las especificaciones de un programa de control de residuos están determinadas por la importancia de los diversos riesgos para la salud que podrían afectar a los consumidores de productos de origen animal.

Como una forma de asegurar la armonización en las exigencias que hacen los países para comercializar sus productos, y que estas exigencias no se transformen en barreras paraarancelarias que compliquen el comercio internacional, en el año 1996 comenzó a funcionar el Comité Internacional de Armonización en Veterinaria (VICH), cuyo objetivo principal es armonizar sobre el uso de medicamentos en animales productores de alimento de tal manera de asegurar la inocuidad de los mismos (San Martín, 2001)

La inocuidad de los alimentos para el consumo humano requiere una completa evaluación de los riesgos relativos, así como de la cantidad de residuos de medicamentos que permanecen en los tejidos de animales

tratados y un conjunto sistemático de procedimientos que aseguren un control efectivo de tales residuos en los alimentos.

El establecer dichos programas de control no sólo trae beneficios para la salud de la población, si no que también facilita a los países en el comercio internacional, ello porque un buen programa de control de residuos puede servir de base para certificar la inocuidad de los alimentos exportados por el país, así como asegurar la inocuidad de los productos importados. (Feliu, 2004)

Métodos de análisis

Con el fin de garantizar el cumplimiento de los requisitos relativos a la inocuidad de los alimentos, los laboratorios analíticos deben contar con métodos optimizados que funcionen como un sistema en que entran muestras y salen resultados. Lo ideal sería disponer de métodos que fueran eficaces y prácticos para detectar, cuantificar e identificar todos los residuos de medicamentos veterinarios que pudieran estar presentes en los alimentos (Codex Alimentarius, 1996).

Estos métodos deben ser capaces de determinar la conformidad con los Límites Máximos Residuales de Medicamentos Veterinarios (LMRMV), que se definen como la concentración máxima de residuo que puede aceptarse en un alimento como resultado del uso de un medicamento en animales destinados al consumo humano, y se expresa en mg/kg de peso fresco (Arboix y Martín-Jimenez, 2002). Este límite se basa en el tipo y la cantidad de residuos considerados como carentes de todo riesgo toxicológico para la salud humana, así como también en aspectos tecnológicos de la producción de alimentos Este límite puede reducirse para

ajustarse a las buenas prácticas de uso de medicamentos veterinarios y en la medida en que se disponga de métodos prácticos de análisis (Codex Alimentarius, 1996).

La aplicación de métodos cromatográficos tanto líquidos como por gases, han sido desarrollados y utilizados desde 1970. Los procedimientos de preparación de las muestras en estos métodos involucran extracción con solventes y procesos de partición con mezcla de solventes. La FDA considera dentro de sus métodos oficiales el análisis confirmatorio de residuos de Zeranól mediante cromatografía de gases con espectrometría de masas.

En términos de aplicación de uno u otro método, cabe resaltar que varios son los factores que pueden incidir en el rendimiento y resultado arrojado por las distintas pruebas analíticas.

Validación de metodologías analíticas

El concepto de validación es un término muy amplio. De manera simple, la validación consiste en la demostración formal que un sistema realiza lo que se supone que debe hacer, de forma continuada y ajustada al objetivo del análisis. Existen distintos tipos de validación, validación de muestra, de datos y de métodos, definiéndose este último como la demostración formal que un método posee un determinado nivel de exactitud en parámetros analíticos básicos (AOAC, 2002).

La validación de métodos analíticos se convierte en una actividad fundamental en los sistemas de calidad de los laboratorios. Este proceso de validación, guarda estrecha relación con la representatividad de los

resultados, dependiendo del objetivo de los análisis y del tipo de muestra (San Martín y Cañon, 2000)

La validación de los métodos es un proceso que demuestra que los procedimientos analíticos son convenientes para su uso previsto, ya que todos los procedimientos analíticos son de igual importancia de la perspectiva de la validación (FDA, 2000).

La Comunidad Europea define validación como la confirmación mediante examen y puesta a disposición de pruebas efectivas de que se cumplen los requisitos particulares de un uso específico previsto. (Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 2002)

En este trabajo la validación del método se basó en la decisión 657 del año 2002 (Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 2002), la cual contempla una serie de parámetros que deben ser estudiados y cumplidos para dar un método como validado, estos son:

Especificidad: corresponde a la capacidad de diferenciar entre el analito y sustancias afines (isómeros, metabolitos, productos de degradación, etc.) con la matriz, verificando posibles interferencias (señales, picos, indicios de iones) en la región de interés en la que cabe esperar la elusión del analito. Es especialmente importante estudiar cualquier interferencia que pudiera resultar de los componentes de la matriz.

Recuperación: corresponde al porcentaje real de un analito recuperado durante el procedimiento analítico.

Curvas de calibración: es la gráfica generada por la respuesta del equipo de medición, ante el aumento de la concentración del analito a intervalos uniformes; esperando una respuesta lineal. A su vez es la base para la cuantificación de un analito en particular. Estas curvas son creadas mediante la adición de analito (fortificación), esta adición puede ser realizada antes del procesamiento, antes de la fase sólida o antes de la derivatización. Al utilizar curvas de calibración para la cuantificación, es preciso utilizar 5 niveles (incluyendo al 0), describir la fórmula matemática de la curva y la bondad del ajuste de los datos a la curva, y el r^2 los datos de la curva.

Repetibilidad: grado de concordancia entre resultados de ensayos independientes obtenidos en condiciones estipuladas (predeterminadas).

Reproducibilidad intralaboratorio: precisión obtenida en un mismo laboratorio y en condiciones estipuladas (predeterminadas), relativas, por ejemplo, al método, los materiales de ensayo, los operadores y el entorno, separados por largos intervalos de tiempo justificados.

Límite de decisión ($CC\alpha$): es el límite en el cual y a partir del cual se puede concluir con una probabilidad de error α ($\alpha=1\%$) que una muestra es no conforme, es decir, que la muestra contiene el analito en estudio.

Límite de detección ($CC\beta$): corresponde al contenido mínimo del analito que puede ser detectado, identificado o cuantificado en una muestra, con una probabilidad de error β ($\beta = 5\%$)

Robustez: es la capacidad del método de soportar cambios a las condiciones experimentales, que pueden expresarse en forma de lista de

los materiales de la muestra, los analitos, las condiciones de almacenamiento, las condiciones ambientales o de preparación de la muestra en las que puede aplicarse el método tal cual o con determinadas modificaciones menores. Debe indicarse cualquier variación de las condiciones experimentales susceptibles de fluctuación en la práctica (por ejemplo, el operador, la procedencia y la edad de los reactivos, disolventes, patrones y extractos de la muestra, velocidad de calentamiento, temperatura, pH, estabilidad de los reactivos, composición de la muestra, y muchos otros factores que pueden darse en el laboratorio) que pueden afectar los resultados analíticos.

OBJETIVO GENERAL

Validar un método analítico confirmatorio para estilbenos y zeranol en diferentes matrices de tejido muscular provenientes de diferentes especies de interés comercial.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Definir las mejores condiciones de extracción en la matriz en estudio.
2. Validar el método analítico siguiendo las reglamentaciones de la Comunidad Europea.

MATERIAL Y MÉTODO

MATERIALES

A.- Estándares Utilizados

Los estándares utilizados son:

- Hexestrol (meso-3,4-bis[4-Hydroxyphenyl]hexane) $C_{18}H_{22}O_2$ SIGMA® pureza min. 98%
- Diethylstilbestrol (DES) $C_{18}H_{20}O_2$ SIGMA® pureza min. 99%
- Dienestrol (3,4-bis[p-hydroxyphenyl]-2,4-hexadiene) $C_{18}H_{18}O_2$ SIGMA® pureza min. 99%
- β -Zearalanol (2,4-Dihydroxy-6-[6 β ,10-dihydroxyundecyl]benzoic acid μ -lactone) $C_{18}H_{26}O_5$ SIGMA® pureza min. 98%

A partir de una solución de 1000 μ g/ml de cada estándar, se realizará la dilución para obtener una nueva solución de concentración de 10 μ g/ml.

B.- Equipos Cromatográficos:

- Cromatógrafo de gases con detector masa-masa VARIAN®, modelo Gas Chromatograph CP-3800, con un detector VARIAN® GC / MS / MS, modelo Saturn 2200. Autosampler modelo CP-8400 VARIAN®

C.- Otros Equipos

- Incubadora (Barnstead®/Lab-Line, modelo Max^QMini 4000)
- Sonicador (Branson®, modelo 3510)
- Campana de extracción Quimis®
- Balanza de precisión (Precisa®, modelo 125^a)
- Balanza de precisión (Sartorius®, modelo bl 610)
- Centrífuga (Hettich Zentrifugen®, modelo Universal 320)

- Vortex (Heidolph®, modelo Multi Reax)
- pHmetro (Hanna Instruments®, modelo HI9321PH)

D.- Condiciones Cromatográficas

- Columna ID-BPX5 30m*0.25mm*0.25µm.
- Inyección de 1 µl split-splitless. Temperatura del inyector 250 °C
- Rampa de temperatura 150 °C * 0 minutos (min). Subir a 20 °C/min. Hasta 200 °C * 0 min. Subir a 2 °C/min. Hasta 235 °C * 5 min. Subir a 30 °C/min. Hasta 310 °C * 5 min.
- Presión de helio 8 PSI y 12 PSI a los 20 min., método Prueba SIS varían el gas transportador corresponde a helio con un grado de pureza de 99,999%.

E.- Reactivos y Soluciones

- Ácido acético glacial al 100% pro análisis.
- Metanol, grado HPLC.
- Etil acetato, grado HPLC.
- Cloroformo, grado HPLC.
- Agua desionizada 18.2 MΩ cm., grado HPLC.
- Tampón acetato pH 4,8 2M: 16,4 g. acetato de sodio en 80 ml, ajustar pH 4,8 con ácido acético, en un matraz de aforo de 100 ml llevar a volumen con agua HPLC.
- NaOH 1M: 20 g. de NaOH llevar a 500 ml con agua HPLC
- Ácido acético 20%
- Metanol 45%

F.- Material Fungible

Corresponde a todo aquel material de uso habitual en el Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

G.- Matrices de Trabajo

10 g. de tejido muscular de salmón, sin piel, previamente homogenizado mediante trituración mecánica, con Moulinex®.

10 g. de tejido muscular de Bovino, Cerdo y Pollo, previamente homogenizado mediante trituración mecánica, con Moulinex®.

En el caso de trabajar con curvas de calibración o muestras fortificadas, seguido de este paso se añadirán los analitos a ser determinados.

METODOLOGÍA ANALÍTICA

Se utilizó como referencia la metodología descrita previamente por Ministerio de Sanidad y Consumo (1989), Impens y *col* (2002) y Dikson y *col* (2003).

Extracción en fase líquida: a 10 g. de muestra se le agrega 20 ml de metanol, agitar y centrifugar a 3500 rpm (1890 x g). Se reduce el volumen a 5 ml bajo flujo de nitrógeno a 50 °C. Agregar 250 µl tampón acetato 2M pH 4,8 y 10 ml de cloroformo; se agita y centrifuga por 5 minutos a 3500 rpm (1890 x g); descartar fase superior y agregar 10 ml de NaOH 1M, centrifugar a 3500 rpm (1890 x g) y ajustar a pH a 5,0 con ácido acético al 20%.

Extracción en fase sólida: se pasa la muestra en el catridge SEP-PAK C18, previamente acondicionada con 4 ml de metanol y 5 ml de agua HPLC;

eluir con 5 ml de metanol en tubos con sulfato de sodio anhidro Na_2SO_4 ; llevar a sequedad bajo flujo de nitrógeno a 50°C .

Derivatización: Derivatización con 50 μl N,O-Bis(trimetylsilyl)trifluoroacetamide (N,O BSTFA) a 80°C por 45 minutos, en seco. Enfriar y reconstituir con 50 μl de etil acetato.

PROCEDIMIENTO DE VALIDACIÓN INTERNA

Para la validación de la metodología analítica se tomó como referencia las normas establecidas por la decisión nº 657 del año 2002 en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados (Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 2002)

Especificidad:

Se analizaron 20 muestras blancos para ver si existe interferencia en la región de interés en la cual se espera la elución del analito. Para analizar otras matrices, se analizaron 5 blancos de cada una. La validación se utilizó para todas las matrices donde no se observaron interferencias.

Tiempo de retención del analito:

Se analizaron drogas puras para evaluar los tiempos de retención cromatográficos.

Recuperación:

Reemplaza la veracidad cuando no hay material de referencia certificado. Como no se disponía del material de referencia certificado, se calculó la recuperación con matriz blanco enriquecida.

Se aceptaron los valores de recuperación obtenidos cuando estos se encontraron entre los siguientes intervalos señalados en la directiva 2002/657/CE (Tabla 2)

Tabla 2: Intervalos de recuperación según fracción de masa.

Fracción de masa	Intervalo
$\leq 1 \text{ ug/kg}$	-50 a +20 (50-120%)
$> 1 \text{ } \mu\text{g/kg}$ a $10 \text{ } \mu\text{g/kg}$	-30 a +10 (70-110%)
$\geq 10 \text{ } \mu\text{g/kg}$	-20 a +10 (80-110%)

Se eligieron 18 muestras blancos y se enriquecieron con el analito siguiendo los siguientes pasos:

- a) Se determinó la concentración de trabajo de 5 ppb.
- b) Se enriquecieron las muestras de la siguiente forma:
 - 6 muestras 0,5 veces la concentración de trabajo
 - 6 muestras 1,0 ves la concentración de trabajo
 - 6 muestras 1,5 veces la concentración de trabajo

El cálculo de la recuperación fue evaluado según la siguiente ecuación para los 4 analitos en estudio:

$$100 \times \frac{\text{Contenido Medido}}{\text{Nivel de Enriquecimiento}}$$

Precisión: (Reproducibilidad intralaboratorio)

Se tomaron 6 distintas curvas enriquecidas a los mismos niveles que en el caso de la Recuperación y Repetitividad, realizadas por distintas personas y en diferentes días. Se calculó la concentración detectada en cada muestra, la concentración media, desviación estándar y CV (%), para cada concentración y cada analito, para poder ser comparados con la repetitividad. Cuando se trabaja con fracciones de masa superiores a 100 ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$) el CV no debe superar al valor obtenido mediante la ecuación de Horwitz: $CV = 2^{(1-0,5 \log C)}$, Donde C es la fracción de masa expresada como potencia de 10 (por ejemplo: $1 \text{ mg}/\text{g} = 10^{-3}$)

Con fracciones de masa inferiores a $100 \mu\text{g}/\text{kg}$, como en este caso, la aplicación de la ecuación de Horwitz conduce a valores inaceptablemente elevados, por lo tanto, los CV de las concentraciones inferiores a 100 ppb serán los más bajos posibles. (Figura 4)

Fracción de masa	CV de reproducibilidad (%)
1 $\mu\text{g}/\text{kg}$	(*)
10 $\mu\text{g}/\text{kg}$	(*)
100 $\mu\text{g}/\text{kg}$	23
1 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (1 mg/kg)	16

Figura 4: ejemplos de CV de reproducibilidad de los métodos cuantitativos en un intervalo de fracciones de masa de analito.

Repetitividad:

Se eligieron 18 muestras blancas y se enriquecieron con el analito siguiendo los siguientes pasos:

- a) Se determinó la concentración de trabajo.
- b) Se enriquecieron las muestras de la siguiente forma:

- 6 muestras 0,5 veces la concentración de trabajo
- 6 muestras 1,0 ves la concentración de trabajo
- 6 muestras 1,5 veces la concentración de trabajo

Para el cálculo de la concentración cuantificada por el equipo se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{Repetitividad} = \frac{\text{Area Cromatográfica} - \text{Intersecto}}{\text{Pendiente}}$$

- a) Se calculó la concentración detectada en cada muestra.
- b) Se calculó la concentración media, desviación estándar (DS) y CV (%), para cada concentración.

Curvas de Calibración:

Se incorporaron 6 curvas de calibración que cumplieron con las siguientes características:

- estar compuestas de 5 niveles en la construcción de la curva incluido el 0.
- El intervalo de fortificación fue de 0 para los blancos, 0,5; 1; 1,5 y 2 veces la concentración de trabajo de 5 ppb (SAG, 2005).
- Se describió la formula matemática de la curva y la bondad de ajuste de los datos de esta.
- Los márgenes de aceptabilidad de los parámetros de la curva se aceptaron cuando la linealidad $r^2 > 0,9$.

Concentración de trabajo: se tomó como referencia, los límites detección indicados por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), en su programa de control de residuos 2005; en este programa se establece un límite de detección de 5 ppb, para estilbenos y zeranol (SAG, 2005).

Límite de Decisión CC α : (Límite de detección)

Se realizó con 6 curvas de calibración, las cuales tenían 4 puntos de fortificación o enriquecimiento (ISO 11843)

El cálculo del límite de decisión fue evaluado según los siguientes pasos:

1º Cada curva se analizó por separado calculando la ecuación de regresión (Se acepta la curva cuando $r^2 > 0,9$) y se calcula la pendiente y su promedio de las pendientes.

2º Para cada curva se calculó el intercepto en el eje Y, expresado en área cromatográfica. Luego se calcularon los promedios y desviaciones estándar de los interceptos.

3º Se calculó el CC α (en área) aplicando la siguiente fórmula:

CC α área = Promedio de los interceptos + 2,33 veces DS estándar de los interceptos.

5º El resultado de CC α obtenido en área es transformado a concentración por medio de la siguiente fórmula:

$$CC\alpha \text{ Concentración} = \frac{CC\alpha - \text{Promedio de los interceptos}}{\text{Promedio de las pendientes}}$$

El valor obtenido para el CC α es el límite en el cual y a partir del cual se pudo concluir con una probabilidad de error α (1%) que una muestra no es conforme.

Capacidad de detección CC β : (Limite de cuantificación)

Se trabajó con 20 muestras blancas, enriquecidas con una concentración equivalente a $CC\alpha$ y se realizó, además, una curva de calibración (que se acepta la curva cuando $r^2 > 0,9$).

Calculo:

1º Se calcularon los promedios y la DS de las áreas obtenidas en las muestras.

2º Posteriormente se calculó el $CC\beta$ (en área) aplicando la siguiente fórmula:

$CC\beta \text{ área} = \text{Limite de detección } CC\alpha + 1,64 \text{ veces la DS de las áreas obtenidas}$

3º El resultado obtenido para la capacidad de detección $CC\beta$ en área será transformado a concentración por medio de la siguiente formula:

$$CC\beta \text{ concentración} = \frac{CC\beta - \text{Intercepto Curva de calibracion}}{\text{Pendiente Curva de calibracion}}$$

Resultado:

El valor obtenido para el $CC\beta$ es el contenido mínimo de la sustancia que puede ser detectado, identificado o cuantificado con una posibilidad de error β .

Robustez

1. - Para la metodología analítica se seleccionaron 3 factores que podrían influir en el resultado final del proceso analítico, determinando el punto o los puntos críticos de él.

2. - Mediante el método de diseño factorial fraccional incompleto se detectaron las interacciones entre los factores seleccionados.

3. - Se realizó el experimento de acuerdo a la configuración señalada de diseño factorial fraccional incompleto.

4. - Una vez identificados los factores que afectan el resultado, estos se dejaron establecidos en el instructivo de la metodología analítica.

RESULTADOS

VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Especificidad:

El análisis cromatográfico con espectrometría de masas para la determinación de estilbenos y zeranol, arrojó que no existen interferencias en la región de interés para la matriz de músculo de salmón. El estudio fue demostrado a través del análisis de 20 muestras blanco, a su vez tampoco hubo interferencia para las matrices de tejido muscular de bovino, pollo y cerdo.

El análisis de la región de interés en la matriz fue determinado por medio de la comparación de los tiempos de retención de los analitos en estudio.

En los cromatogramas de las muestras blanco de salmón, se observó que no existen “peaks” de interferencia en el tiempo de retención de la droga. La especificidad del método se puede corroborar al fortificar matriz de salmón con una concentración de 2,5 ppb. (Figura 5)

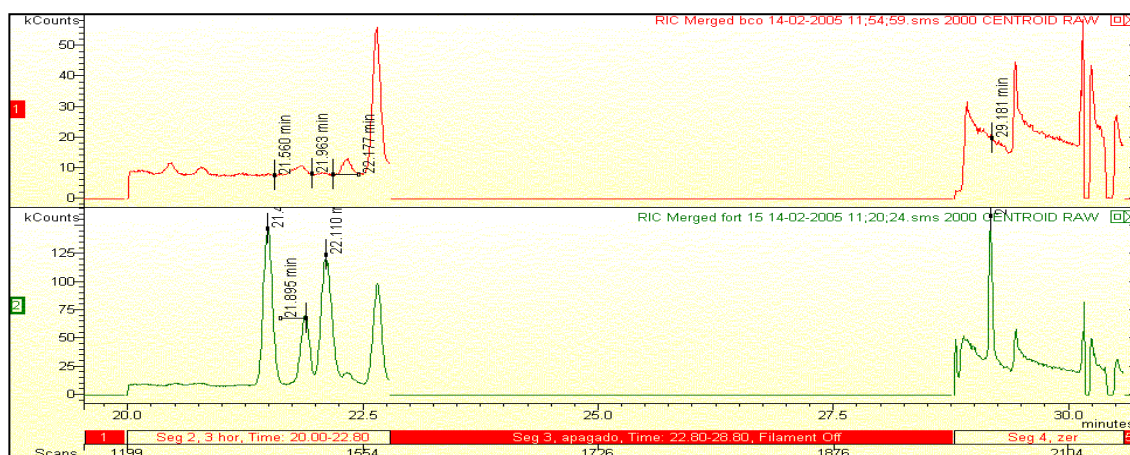


Figura 5: Comparación cromatográfica de matriz de salmón blanco (cromatograma superior) con matriz de salmón fortificada (cromatograma inferior)

Tiempo de retención de los analitos:

El análisis cromatográfico de los analitos como droga pura a una concentración de 5 ppb, arrojó un tiempo de retención de $21,022 \pm 0,329$ minutos para hexestrol, de $21,428 \pm 0,371$ minutos para dietilestilbestrol, de $21,665 \pm 0,414$ minutos para el dienestrol y de $29,470 \pm 0,314$ minutos para zeranol (Figura 6).

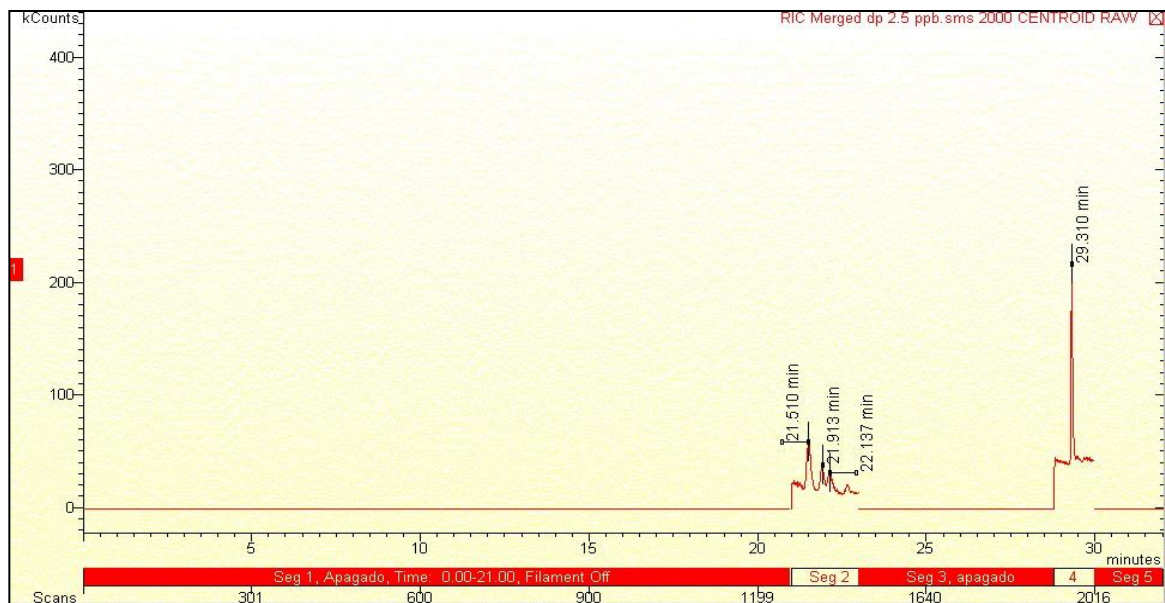


Figura 6: Cromatograma de droga pura de hexestrol, dietilestilbestrol, dienestrol y zeranol.

Recuperación:

Para todos los analitos los porcentajes de recuperación promedio se encontraron dentro de los rangos establecidos en la directiva 2002/657/CE a excepción del nivel de enriquecimiento inferior donde se detectan recuperaciones mayores a 110%.

En las tablas 3 a 6 se exponen los porcentajes de recuperación para cada analito.

Tabla 3: Porcentajes de recuperación de hexestrol en matriz de salmón.

RECUPERACIÓN HEXESTROL

Concentración de enriquecimiento	Porcentajes de recuperación (%)						Promedio %
	1	2	3	4	5	6	
2,5 ppb	116	101	105	112	104	101	106,50
5 ppb	84	99	95	88	96	99	95,40
7,5 ppb	105	100	102	104	101	100	101,40
Concentración de enriquecimiento	Rangos						
2,5 ppb	101% - 116%						
5 ppb	84% - 99%						
7,5 ppb	100%-105%						

Tabla 4: Porcentajes de recuperación de dietilestilbestrol en matriz de salmón.

RECUPERACIÓN DIETILESTILBESTROL:

Concentración de enriquecimiento	Porcentajes de recuperación (%)						Promedio %
	1	2	3	4	5	6	
2,5 ppb	122	107	98	110	115	110	110,33
5 ppb	78	93	102	90	85	90	92,00
7,5 ppb	107	102	99	103	105	103	102,40
Concentración de enriquecimiento	Rangos						
2,5 ppb	98% - 122%						
5 ppb	78% - 102%						
7,5 ppb	99% -107%						

Tabla 5: Porcentajes de recuperación de dienestrol en matriz de salmón.

RECUPERACIÓN DIENESTROL

Concentración de enriquecimiento	Porcentajes de recuperación (%)						Promedio %
	1	2	3	4	5	6	
2,5 ppb	120	113	112	115	107	106	112,17
5 ppb	80	87	88	85	93	94	89,40
7,5 ppb	107	104	104	105	102	102	103,40
Concentración de enriquecimiento	Rangos						
2,5 ppb	106% - 120%						
5 ppb	80% - 94%						
7,5 ppb	102%-107%						

Tabla 6: Porcentajes de recuperación de zeranol en matriz de salmón.

RECUPERACIÓN ZERANOL

Concentración de enriquecimiento	Porcentajes de recuperación (%)						Promedio %
	1	2	3	4	5	6	
2,5 ppb	115	101	106	110	102	110	107,33
5 ppb	85	99	94	90	98	90	94,20
7,5 ppb	105	100	102	103	101	103	101,80
Concentración de enriquecimiento	Rangos						
2,5 ppb	101% - 115%						
5 ppb	85% - 99%						
7,5 ppb	100%-105%						

Precisión (Reproducibilidad intralaboratorio):

Los CV de los distintos analitos para las diferentes concentraciones se encuentran en las tablas 7 a 10, que fluctúan entre un 2% y 14%.

Tabla 7: Concentración cuantificada y CV por nivel de enriquecimiento de hexestrol en matriz de salmón.

PRECISIÓN HEXESTROL (Reproducibilidad intralaboratorio)

Concentración de enriquecimiento	Concentración Cuantificada (ppb)						Promedio	Des. Estand.	CoVar	CoVar%
	16-4-05	18-3-05	25-abr	21-ene	25-abr	27-may				
2,5 ppb	2,3	2,3	2,5	2,2	2,8	2,2	2,40	0,23	0,10	9,52
5 ppb	5,5	5,4	5,0	5,5	4,4	5,6	5,21	0,46	0,09	8,76
7,5 ppb	7,3	7,3	7,5	7,2	7,8	7,2	7,40	0,23	0,03	3,08

Tabla 8: Concentración cuantificada y CV por nivel de enriquecimiento de dietilestilbestrol en matriz de salmón.

PRECISIÓN DIETILESTILBESTROL (Reproducibilidad intralaboratorio)

Concentración de enriquecimiento	Concentración Cuantificada (ppb)						Promedio	Des. Estand.	CoVar	CoVar%
	16-4-05	18-3-05	25-abr	21-ene	25-abr	27-may				
2,5 ppb	2,0	2,3	2,8	2,4	2,8	2,9	2,51	0,36	0,14	14,35
5 ppb	6,1	5,4	4,5	5,2	4,5	4,2	4,99	0,72	0,14	14,41
7,5 ppb	7,0	7,3	7,8	7,4	7,8	7,9	7,51	0,36	0,05	4,79

Tabla 9: Concentración cuantificada y CV por nivel de enriquecimiento de dienestrol en matriz de salmón.

PRECISIÓN DIENESTROL (Reproducibilidad intralaboratorio)

Concentración de enriquecimiento	Concentración Cuantificada (ppb)						Promedio	Des. Estand.	CoVar	CoVar%
	16-4-05	18-3-05	25-abr	21-ene	25-abr	27-may				
2,5 ppb	2,4	2,3	2,7	2,0	2,9	2,4	2,45	0,29	0,12	11,75
5 ppb	5,1	5,4	4,7	5,9	4,2	5,2	5,10	0,58	0,11	11,30
7,5 ppb	7,4	7,3	7,7	7,0	7,9	7,4	7,45	0,29	0,04	3,87

Tabla 10: Concentración cuantificada y CV por nivel de enriquecimiento de zeranol en matriz de salmón.

PRECISIÓN ZERANOL (Reproducibilidad intralaboratorio)

Concentración de enriquecimiento	Concentración Cuantificada (ppb)						Promedio	Des. Estand.	CoVar	CoVar%
	16-4-05	18-3-05	25-abr	21-ene	25-abr	27-may				
2,5 ppb	2,5	2,5	2,8	2,4	2,7	2,4	2,54	0,17	0,07	6,53
5 ppb	5,1	5,0	4,5	5,2	4,5	5,2	4,92	0,33	0,07	6,74
7,5 ppb	7,5	7,5	7,8	7,4	7,7	7,4	7,54	0,17	0,02	2,20

Repetitividad:

La repetitividad cumple su condición de aceptada cuando el CV de cada concentración medida, está en rango de valores correspondientes a la mitad o igual al CV de la precisión, corroborándose en las tablas 11 a 14.

Tabla 11: Concentración cuantificada y CV por nivel de enriquecimiento de hexestrol en matriz de salmón, para cálculo de repetitividad.

REPETITIVIDAD HEXESTROL

Concentración de enriquecimiento	Concentracion Cuantificada (ppb)						Promedio	Des. Estand.	CoVar	CoVar%
	1	2	3	4	5	6				
2,5 ppb	2,9	2,5	2,6	2,8	2,6	2,8	2,70	0,15	0,06	5,74
5 ppb	4,2	4,9	4,7	4,4	4,8	5	4,67	0,31	0,07	6,59
7,5 ppb	7,9	7,5	7,6	7,8	7,6	7,5	7,65	0,16	0,02	2,15

Tabla 12: Concentración cuantificada y CV por nivel de enriquecimiento de Dietilestilbestrol en matriz de salmón, para cálculo de repetitividad.

REPETITIVIDAD DIETILESTILBESTROL

Concentración de enriquecimiento	Concentracion Cuantificada (ppb)						Promedio	Des. Estand.	CoVar	CoVar%
	1	2	3	4	5	6				
2,5 ppb	3,1	2,7	2,4	2,8	2,9	2,8	2,78	0,23	0,08	8,32
5 ppb	3,9	4,7	5,1	4,5	4,2	4,5	4,48	0,41	0,09	9,19
7,5 ppb	8,1	7,7	7,4	7,8	7,9	7,8	7,78	0,23	0,03	2,98

Tabla 13: Concentración cuantificada y CV por nivel de enriquecimiento de dienestrol en matriz de salmón, para cálculo de repetitividad.

REPETITIVIDAD DIENESTROL

Concentración de enriquecimiento	Concentracion Cuantificada (ppb)						Promedio	Des. Estand.	CoVar	CoVar%
	1	2	3	4	5	6				
2,5 ppb	3	2,8	2,8	2,9	2,7	2,5	2,79	0,16	0,06	5,89
5 ppb	4	4,3	4,4	4,2	4,7	4,7	4,38	0,28	0,06	6,36
7,5 ppb	8	7,8	7,8	7,9	7,7	7,6	7,79	0,15	0,02	1,94

Tabla 14: Concentración cuantificada y CV por nivel de enriquecimiento de zeranól en matriz de salmón, para cálculo de repetitividad.

REPETITIVIDAD ZERANOL

Concentración de enriquecimiento	Concentración Cuantificada (ppb)						Promedio	Des. Estand.	CoVar	CoVar%
	1	2	3	4	5	6				
2,5 ppb	2,9	2,5	2,6	2,7	2,6	2,8	2,68	0,15	0,05	5,49
5 ppb	4,2	4,9	4,7	4,5	4,9	4,5	4,62	0,27	0,06	5,88
7,5 ppb	7,9	7,5	7,6	7,7	7,6	7,8	7,68	0,15	0,02	1,92

Curvas de Calibración:

Para determinar la linealidad de las matrices fortificadas, las muestras blancas fueron fortificadas con 4 concentraciones de los analitos. En las figuras 7 a 10 se puede observar para cada analito el análisis de regresión lineal en las muestras fortificadas de salmón, incluyendo la totalidad de las curvas. Se obtuvo un coeficiente de determinación r^2 de 0,9453 para el Hexestrol; 0,9535 para el Dietilestilbestrol; 0,9343 para el Dienestrol y 0,9545 para el Zeranól.

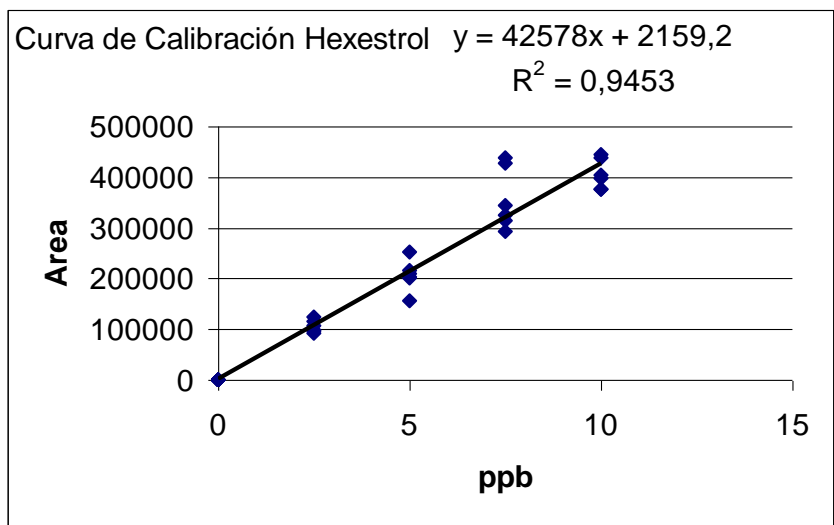


Figura 7: Curva calibración de hexestrol.

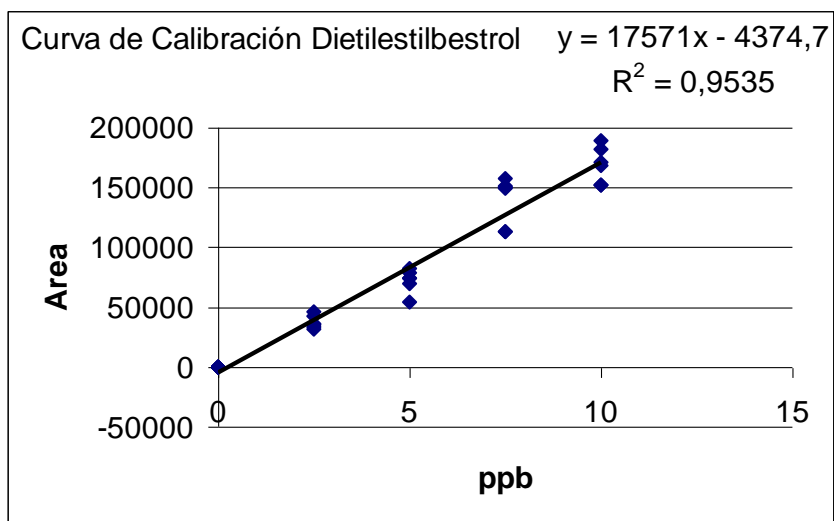


Figura 8: Curva de Calibración de dietilestilbestrol.

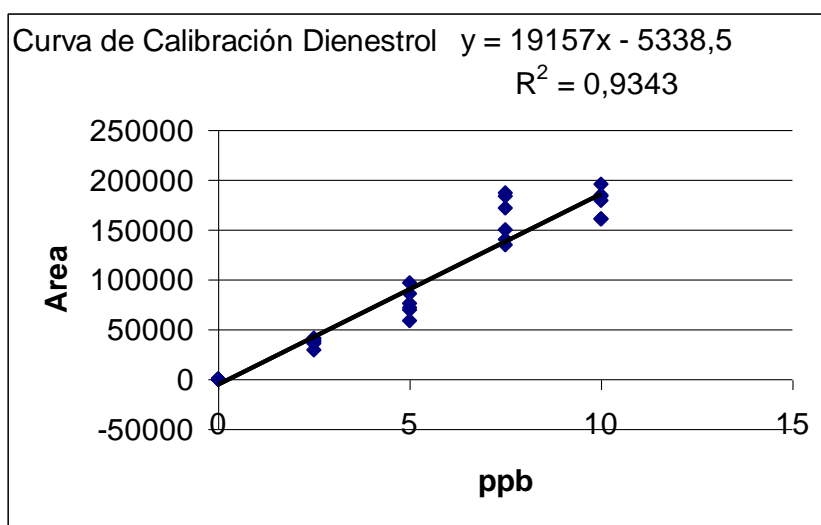


Figura 9: Curva de calibración de dienestrol.

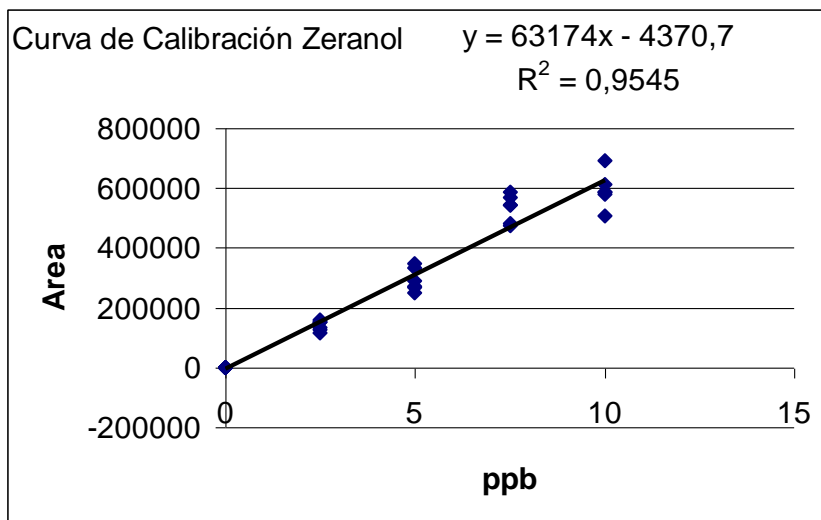


Figura 10: Curva de calibración de zeranól.

Limite de Decisión $CC\alpha$ (Limite de detección):

El valor obtenido para el $CC\alpha$ es el límite en el cual y a partir del cual se puede concluir con una probabilidad de error α (1%) que una muestra no es conforme. Se obtuvo un límite de detección de 1,3 ppb para el Hexestrol; 1,61 ppb para el Dietilestilbestrol; 1.15 ppb para el Dienestrol y 0,98 ppb para el Zeranól.

Capacidad de detección $CC\beta$ (Limite de cuantificación):

El valor obtenido para el $CC\beta$ es el contenido mínimo de la sustancia que puede ser detectado, identificado o cuantificado con una posibilidad de error β (5%). Se obtuvo un límite de cuantificación o $CC\beta$ de 3,37 ppb para el Hexestrol; 2,75 ppb para el Dietilestilbestrol; 1,97 ppb para el Dienestrol y 2,96 ppb para el Zeranól.

Robustez:

El análisis de robustez del método, a través del análisis multifactorial fraccionado, nos indicó cual de los factores seleccionados era el que más nos afectaba en el proceso analítico, determinando si el método utilizado es robusto o es afectado por algún cambio en el proceso analítico, determinando el punto o los puntos críticos de él.

Los resultados arrojados por este análisis determinaron que el método es robusto para los tres factores seleccionados (Tabla 15) y los 4 analitos en estudio, por que la desviación estándar calculada por la robustez es menor a la desviación estándar de la precisión. Se considera como medida precautoria el centrifugado a 4000 rpm (2469 x g), por ser el factor que más afectaría la robustez del método en los 4 analitos.

Tabla 15: Factores y matriz de interacciones para cálculo de robustez del método.

1.- Factores:

A - Centrifugar 10 minutos a 4000 rpm
a - Centrifugar 10 minutos a 3000 rpm

B.- Centrifugar 5 minutos a 3000 rpm
b.- Centrifugar 3 minutos a 3000 rpm

C- Secar a 40 °C con flujo de nitrógeno
c- Secar a 50 °C con flujo de nitrógeno

* Nivel del limite más bajo de la curva de calibración = 0.0025 mg/kg

2.- Interacciones según diseño factorial incompleto:

Experim.	Centrifugado RPM	Centrifugado minutos	Temperatura de secado	Conc. Cuant. mg/kg
1	a - Centrifugar 10 minutos a 3000 rpm	b.- Centrifugar 3 minutos a 3000 rpm	c- Secar a 50 °C con flujo de nitrógeno	0,00258
2	A - Centrifugar 10 minutos a 4000 rpm	b.- Centrifugar 3 minutos a 3000 rpm	c- Secar a 50 °C con flujo de nitrógeno	0,0002
3	a - Centrifugar 10 minutos a 3000 rpm	B.- Centrifugar 5 minutos a 3000 rpm	c- Secar a 50 °C con flujo de nitrógeno	0,00192
4	A - Centrifugar 10 minutos a 4000 rpm	B.- Centrifugar 5 minutos a 3000 rpm	c- Secar a 50 °C con flujo de nitrógeno	0,00122
5	a - Centrifugar 10 minutos a 3000 rpm	b.- Centrifugar 3 minutos a 3000 rpm	C- Secar a 40 °C con flujo de nitrógeno	0,0014
6	A - Centrifugar 10 minutos a 4000 rpm	b.- Centrifugar 3 minutos a 3000 rpm	C- Secar a 40 °C con flujo de nitrógeno	0,00075
7	a - Centrifugar 10 minutos a 3000 rpm	B.- Centrifugar 5 minutos a 3000 rpm	C- Secar a 40 °C con flujo de nitrógeno	0,00052
8	A - Centrifugar 10 minutos a 4000 rpm	B.- Centrifugar 5 minutos a 3000 rpm	C- Secar a 40 °C con flujo de nitrógeno	0,00027

DISCUSIÓN

La utilización de productos hormonales en animales de producción, no ha sido sólo para tratar enfermedades de índole reproductivas, sino que también como promotores del crecimiento; esta última, es una práctica que se realiza desde hace décadas para mantener un desarrollo adecuado en crianzas intensivas, donde los animales son sometidos a condiciones estresantes y la alimentación es una variable económica que puede ser maximizada mediante el empleo de dichas sustancias, aumentando la conversión alimenticia.

El uso de productos hormonales y sus derivados está prohibido en países de la comunidad europea y su utilización sólo por médicos veterinarios debe ser en casos justificados para el tratamiento de enfermedades del ganado. Esta prohibición se basa en evidencias científicas de los efectos nocivos de ciertos productos hormonales en la población humana, por ejemplo, el incremento de incidencia de cáncer mamario, cérvico-uterino y próstata; efectos teratogénicos y enfermedades reproductivas como el hiperestrogenismo, ovario poliquístico e infertilidad.

Pese a la evidencia citada en Estados Unidos está prohibido el uso de estilbenos y se licencia el uso de zeranol, fijando un MRL de 2 ppb para tejido muscular. En el caso de Chile la situación es idéntica a la Comunidad Europea en tejido muscular de salmón, señalando la ausencia de estilbenos y 17β -estradiol. En el caso de tejido muscular de bovino, porcino y aves, se fijó un MRL de 5 ppb para estilbenos y zeranol citado en el programa de control de residuos del SAG del año 2006.

El riesgo para la salud de las personas al usar estos fármacos en animales de producción, está dado por la posibilidad de que residuos de éstos estén presentes en los alimentos. Este riesgo es mayor si consideramos que la actividad biológica de dichos residuos puede preservarse, a pesar de someterse dichos alimentos a condiciones de temperaturas extremas como por ejemplo la cocción de la carne.

Como una forma de proteger la salud de la población, los países poseen programas de control de residuos de medicamentos veterinarios en productos de origen animal.

Este trabajo utilizó como referencia la metodología descrita previamente por Ministerio de Sanidad y Consumo 1989, Impens y *col* en 2002, Dikson y *col* 2003, siendo ajustada de acuerdo a las condiciones analíticas del Laboratorio de Farmacología Veterinaria de la Universidad de Chile y validado según las normas de la Comunidad Europea, decisión 657 del año 2002 (Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 2002).

El análisis estadístico de los resultados de la regresión lineal de los analitos en estudio como droga pura y en músculo fortificado tuvo un coeficiente de determinación de 0,9453 para hexestrol, 0,9535 para DES, 0,9343 para dienestrol y de 0,9545 para zeranol, con un tamaño de muestra de 30 niveles de fortificación, estos coeficientes son mayores a 0,9; ajustándose a lo requerido a nivel nacional e internacional. Esta linealidad nos permite no sólo identificar el analito si no que además cuantificarlo y diferenciar entre pequeñas concentraciones.

El método arrojó un tiempo de retención de $21,022 \pm 0,329$ minutos para hexestrol, de $21,428 \pm 0,371$ minutos para dietilestilbestrol, de $21,665 \pm$

0,414 minutos para el dienestrol y de $29,470 \pm 0,314$ minutos y para zeranol., que es relativamente cercano a lo descrito por Marchand *et al* (2000), quienes utilizaron un método basado en cromatografía gaseosa con espectrometría de masa con sistema cuadripolar y con la que obtuvieron un tiempo de retención para hexestrol, de 19,12 minutos para dietilestilbestrol, de 19,32 minutos para el dienestrol y de 19,23 minutos y para zeranol de 18,91 minutos, este último muy alejado del tiempo obtenido por nuestro método. Esta diferencia en los tiempos de retención puede ser atribuida a diferencias de equipo, presiones y flujo de los gases transportadores o "carrier", programas de temperaturas utilizados o a la utilización de columnas analíticas distintas, principalmente en cuanto a su diámetro interno como a su largo.

La recuperación del método fluctúa entre 84%-116% para hexestrol, entre 78%-122% para DES, entre 80%-120% para dienestrol y entre 85%-115% para el zeranol. Estos resultados difieren de los valores propuesto por la Comunidad Europea que para niveles entre 1ppb y 10 ppb se esperan valores entre 70%-110% (Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 2002), señalando que los valores discrepantes se encuentran en el nivel menor de fortificación correspondiendo a 2,5 ppb. Estos resultados son relativamente distintos a los obtenidos por Sawaya *et al.* (1998) que describe valores de recuperación para el DES entre 64%-115% usando Radio Inmunoensayo, con un coeficiente de variación (CV) de 15.4%, similar al CV promedio obtenido por el método para todos los analitos que fue de 12.5%. La recuperación en el caso del zeranol es similar a la obtenida por Horie y Nakazawa (2000) con un valor promedio de $85,1\% \pm 4,6\%$ mediante cromatografía líquida con espectrometría de masas (LC/MS/MS). Resultados similares de recuperación fueron obtenidos por Hartmann y Steinhart (1997) usando cromatografía de gases con

espectrometría de masas (GC/MS) en andrógenos, progestágenos y estrógenos.

La repetitividad del método se considera aceptada ya que el CV es igual al CV obtenido en la precisión, tal como lo plantea la decisión 657 del año 2002 en el Diario Oficial de las Comunidades Europeas.

Los límites de decisión ($CC\alpha$) en el presente trabajo fueron de 1,30 ppb para Hexestrol, 1,61 ppb para DES, 1,15 ppb para dienestrol y 0,98 para zeranol. Estos valores son superiores a los obtenidos por Van Poucke (2005) mediante LC/MS/MS donde los valores de $CC\alpha$ para Hexestrol, DES, Dienestrol y zeranol son 0,76 ppb, 0,40 ppb, 0,79 ppb y 1,00 ppb respectivamente.

A la vez, la capacidad de detección ($CC\beta$), lo que determina nuestros MRPL, en el presente trabajo fue de 3,37 ppb para Hexestrol, 2,75 ppb para DES, 1,97 ppb para dienestrol y 2,96 para zeranol. Estos resultados están conforme a los MRPL de Bélgica expuestos por Impens *et al.* (2002) para el hexestrol de 5 ppb, para el dienestrol de 2 ppb y zeranol de 5 ppb, la excepción es en el caso del DES que es de 2 ppb, 0,75 ppb bajo lo obtenido en este trabajo. Los LMR fijados por el CODEX para zeranol en músculo es de 2 ppb (Codex Alimentarius, 1995), un valor inferior al obtenido por este método.

Además se considera que el método es robusto ante cambios en el proceso analítico, considerando sólo medidas precautorias en el proceso analítico.

Según lo señalado por las normas de la comunidad europea, decisión 657 del año 2002 (Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 2002) el método seleccionado y validado en este trabajo, puede ser utilizado para la detección de estilbenos y zeranol, ya que cumple con las exigencias nacionales e internacionales.

CONCLUSIONES

- 1.- La metodología analítica utilizada es específica en la detección de estilbenos y zeranol en músculo de salmón.

- 2.- El método reúne las condiciones de sensibilidad ya que el límite de detección de 1,3 ppb para el Hexestrol; 1,61 ppb para el Dietilestilbestrol; 1,15 para el Dienestrol y 0,98 para el Zeranol resultaron ser menores a los exigidos por organismos internacionales como el CODEX y FDA.

- 3.- Los parámetros de linealidad, repetitividad reproducibilidad y precisión están dentro de los rangos exigidos por la Unión Europea, por lo que la metodología analítica se considera validada.

- 4.- La metodología analítica estudiada fue válida, además, para la detección de la droga en músculo bovino, porcino y pollo, ya que no hay interferencia de la matriz en la región de interés.

BIBLIOGRAFÍA

- **ANDERSSON, A.; SKAKKEBÆK, N.** 1999. Exposure to exogenous estrogens in food: possible impact on human development and health. *European Journal of Endocrinology*. 140: 477-485
- **AOAC.** 2002. Stability of sulfonamides, nitofuranes and chloramphenicol residues in preserved raw milk samples measured by liquid chromatography. [En línea].
<http://www.aoac.org/pubs/JOURNAL/2002/Nov_Dec/Stability_of_Sulfonamides.htm>. [Consulta: 13-01-04]
- **ARBOIX, M.; MARTÍN-JIMENEZ, T.** 2002. Aspectos terapéuticos y de salud pública de los residuos farmacológicos. **In:** Botana, L.M.; Landoni, F.; Martín-Jimenez. *Farmacología y Terapéutica Veterinaria*. Mac Graw-Hill Interamericana. Madrid, España. pp. 681-689.
- **CODEX ALIMENTARIUS.** 1995. Residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos. 2ª ed. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación organización mundial de la salud. 3. p. 17
- **CODEX ALIMENTARIUS. PROGRAMA CONJUNTO FAO/OMS SOBRE NORMAS ALIMENTARIAS, COMISION DEL CODEX ALIMENTARIUS.** 1996. Residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos. 2ª ed. FAO. Roma, Italia. V.3.
- **DAXENBERGER, A.L; IBARREÑA, D.; MEYER H.** 2001. Posible health impact of animal oestrogens in food. *Human Reproduction Update*. 7(3):340-355.
- **DIARIO OFICIAL DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS.** 1996a. Directiva 96/22/CE de 29 de abril de 1996 por la que se prohíbe utilizar determinadas sustancias de efecto hormonal y tiereostático y sustancias β -agonistas en la cría de ganado y por la que se derogan las directivas

81/602/CEE, 88/146/CEE y 88/299/CEE. Diario Oficial de las Comunidades Europeas. Luxemburgo, 23 de mayo. 125: 3-9.

- **DIARIO OFICIAL DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS.** 1996b. Directiva 96/23/CE de 29 de abril de 1996 relativa las medidas de control aplicables respecto de determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos y por la que se derogan las directivas 85/358/CEE y 86/469/CEE y las decisiones 85/187/CEE y 91/664/CEE. Diario Oficial de las Comunidades Europeas. Luxemburgo, 23 de mayo. 125: 10-32.

- **DIARIO OFICIAL DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS.** 2002. Decisión de la comisión de 12 de agosto de 2002 por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. Diario Oficial de las Comunidades Europeas. Bruselas 17 agosto. 221:8-36.

- **DICKSON, L.; MACNEIL, J.; REID, J.; FESSER A.** 2003. Validation of screening method for residues of diethylstilbestrol, dienestrol, hexestrol, and zeranol in bovine urine using immunoafinity chromatography and gas chromatography/mass spectrometry. Journal of AOAC International. 86(4): 631-639.

- **DOBRYDNEVA, Y.; WILLIAMS, R. L.; KATZENELLENBOGEN, J. A.; RATZ, P. H.; BLACKMORE, P. F.** 2003. Diethylstilbestrol and tetrahydrochrysenes are calcium channel blockers in human platelets: relationship to the stilbene pharmacophore. Thrombosis Research. 110:23-31.

- **ERASMUSON, A.; SCAHILL, B.; WEST, D.** 1994. Natural Zeranol (α -Zearalanol) in the Urine of Pasture-Fed Animals. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 42:2721-2725.

- **FDA.** 2000. Analytical Procedures and Methods Validation. [en línea]. <<http://www.fda.gov/cber/gdlns/methval.pdf>> [Consulta: 02-09-2005]

- **FDA.** 2004. Tolerances for residues of new animal drugs in food. [en línea].
<<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcr/CFRSearch.cfm?CFRPart=556>> [Consulta: 05-05-2005]

- **FELIU, C.** 2004. Validación de un método cromatográfico para la detección de cloranfenicol en tejido muscular de animales de producción de carne. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 24 p.

- **HARTMANN, S.; STEINHART, H.** 1997. Simultaneous determination of anabolic and catabolic steroid hormones in meat by gas chromatography – mass spectrometry. *Journal of Chromatography B.* 704:105-117.

- **HEITZMAN, R. J.** 1983. The absorption, distribution and excretion of anabolic agents. *Journal of Animal Science.* 57(1): 233-238.

- **HORIE, M.; NAKAZAWA, H.** 2000. Determination of trembolone and zeranol in bovine muscle and liver by liquid chromatography mass spectrometry. *Journal of Chromatography A.* 882:53-62.

- **IBARREÑA, D.; DAXENBERGER, A.; MEYER, H.** 2001. Possible health impact of phytoestrogens and xenoestrogens in food. *APMIS (Acta Patológica, Microbiologica, et Inmunologica Scandinavica).* 109:161–84.

- **IMPENS, S.; DE WASCH, K.; CORNELIS, M.; DE BRABANDER, H.F.** 2002. Analysis on residues of estrogens, gestagens and androgens in kidney fat and meat with gas chromatography – tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A.* 970:235-247.

- **JALÓN, M.; URIETA, I.; MACHO, M. L.; AZPIRI, A.** 1997. Residuos de medicamentos de uso veterinario. In: Vigilancia de la contaminación química de los alimentos en la comunidad autónoma del País Vasco 1990-1995. Servicio central de publicaciones del gobierno vasco: Duque de Wellington 2. 01010. Vitoria Gastéis, España. pp 103-123.

- **LAGANÁ, A.; FAGO, G.; MARINO, A.; SANTARELLI, D.** 2001. Development of an analytical system for the simultaneous determination of anabolic macrocyclic lactones in aquatic environmental samples. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 15: 304-310.

- **LE GUAVEL, R.; PAKDEL, F.** 2001. Assessment of oestrogenic potency of chemicals used as growth promoter by in –vitro methods. *Human Reproduction*. 16(5):1030-1036.

- **LIEHR, J.** 2001. Genotoxicity of the steroidal oestrogens oestrone and oestradiol: possible mechanism of uterine and mammary cancer development. *Human Reproduction Update*. 7(3):273-281.

- **MARCHAND, P.; LE BIZEC, B.; GADE, C.; MONTEAU, F.; ANDRÉ, F.** 2000. Ultra trace of a wide range of anabolic steroids in meat by gas chromatography coupled to mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 687:219-233.

- **MARTINO, M.; NEVADUNSKY, N.; MAGLIARO, T.; GOLDBERG, M.** 2002. The DES (diethylstilbestrol) years: bridging the past into the future. *Primary Care Update Ob/Gyns*. 9(1): 7-12.

- **METZLER, M.; PFEIFFER, E.** 2001. Genotoxic potential of xenobiotic growth promoters and their metabolites. *APMIS (Acta Patológica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica)*. 109:89–95.

- **Ministerio de sanidad y consumo, dirección general de salud alimentaria y protección a los consumidores “instituto de salud Carlos III” centro nacional de alimentación.** 1989. Métodos de análisis de residuos en alimentos. Método para la determinación de DES y zeranol en músculo por HPLC con detector electroquímico y método de determinación de estilbenos en músculo por GC-MS. *Majada honda*, España.

- **MYLLYMÄKI, S.; HAAVISTOA, T.; VAINITA, M.; TOPPARIB, J.; PARANKO, J.** 2005. In vitro effects of diethylstilbestrol, genistein, 4-tert-butylphenol, and 4-tert-octylphenol on steroidogenic activity of isolated immature rat ovarian follicles. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 204:69-80.

- **PFAFFL, M.W.; RECKB, B.; DREHER, R.; MEYER, H.H.D.** 2003. Production of clenbuterol, diethylstilbestrol and trenbolone mass standards in lyophilised bovine urine. *Analitica Chimica Acta*. 483: 401-412.

- **REVUELTA, M. P.; CANTABRANA, B.; HIDALGO, A.** 1997. Transcriptional mechanisms involved in the relaxant effect of zeranol on isolated rat uterus. *General Pharmacology*. 28(4):561-565.

- **RICO, A. G.** 1983. metabolism of endogenous and exogenous anabolic agent in cattle. *Journal of Animal Science*. 57(1):226-232.

- **ROSENBERG, E.; KRŠKA, R.; WISSIACK, R.; KMETOV, V.; JOSEPHS, R.; RAZZAZI, E.; GRASSERBAUER, M.** 1998. High-performance liquid chromatography–atmospheric-pressure chemical ionization mass spectrometry as a new tool for the determination of the mycotoxin zearalenone in food and feed. *Journal of Chromatography A*. 819:277-288.

- **SAG.** 2005. programa de control de residuos 2005. [en línea]. <http://www.sag.gob.cl/saveasdialog.asp?cod_cont=3291&bogus=Programa_Control_Residuos_2005.pdf> [Consulta: 10-07-2005]

- **SAG.** 2006. programa de control de residuos 2006. [en línea]. <http://www.sag.gob.cl/pls/portal/docs/page/pg_sag_biblioteca/bibl_exportaciones/biblio_exp_pec/biblio_exp_pec_manuales/programa_control_residuos.pdf> [Consulta: 28-07-2006]

- **SAN MARTIN, B.** 2001. Residuos químicos en los alimentos de origen animal: un análisis global de la situación mundial y nacional. *Tecnovet* 7(3):12-15.

- **SAN MARTÍN, B.; CAÑON, H.** 2000. Métodos de análisis para el control de residuos químicos en productos de origen animal. *Tecnovet.* 6(2):12-14.

- **STAIGMILLER, R. B.; BELLOWS, R. A.; SHORT, R. E.** 1983. Growth and reproductive traits in beef heifers implanted with zeranol. *Journal of Animal Science.* 57(3): 527-534.

- **SULAN, L.; XIAOPING, W.; ZENGHONG, X.** 2005. Determination of some estrogens by flow injection analysis with acidic potassium permanganate–formaldehyde chemiluminescence detection. *Analitica Chimica Acta.* 537: 189-195.

- **SAWAYA, W.; LONE, K.; HUSAIN, A.; DASHTI, B.; AL-ZENKI, S.** 1998. Screening for estrogenic steroids in sheep and chicken by the application of enzyme-linked immunosorbent assay and a comparison with analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chemistry.* 63(4):563-569.

- **TURCOTTE, J. C.; HUNT, P.; BLAUSTEIN, J.** 2005. Estrogenic effects of zearalenone on the expression of progesterin receptors and sexual behavior in female rats. *Hormones and Behavior.* 47: 178–184.

- **VAN POUCKE, C.; VAN DE VELDE, M.; VAN PETEGHEM, C.** 2005. Combination of liquid chromatography/tandem mass spectrometry and gas chromatography/mass spectrometry for detection of 21 anabolic steroid residues in bovine urine. *Journal of Mass Spectrometry.* 40:731-738.

ANEXOS

Anexo 1.

Nº L 125/24

ES

Diario Oficial de las Comunidades Europeas

23. 5. 96

ANEXO II

GRUPO DE RESIDUOS O SUSTANCIAS QUE HABRÁN DE DETECTARSE SEGÚN EL TIPO DE ANIMALES, SUS PIENSOS Y AGUA DE BEBER Y POR TIPOS DE PRODUCTOS ANIMALES DE ORIGEN PRIMARIO

Tipo de animales Productos animales Grupos de sustancias	Animales de las especies bovina, ovina, caprina, porcina y equina	Aves de corral	Animales de acuicultura	Leche	Huevos	Carne de conejo y carne de caza de cría Caza silvestre (*)	Miel
A 1	X	X	X			X	
2	X	X				X	
3	X	X	X			X	
4	X	X				X	
5	X	X				X	
6	X	X	X	X	X	X	
B 1	X	X	X	X	X	X	X
2a	X	X	X	X		X	
b	X	X			X	X	
c	X	X				X	X
d	X						
e	X	X		X		X	
f							
3a	X	X	X	X	X	X	X
b	X			X			X
c	X	X	X	X		X	X
d	X	X	X	X			
e			X				
f							

(*) A la caza silvestre sólo le afectan los elementos químicos.