

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS



**EFFECTO DEL TIEMPO DE SUPLEMENTACIÓN DE CLORHIDRATO DE
ZILPATEROL SOBRE RESIDUOS EN MÚSCULO, HÍGADO Y RIÑÓN DE
CORDEROS DE PELO FINALIZADOS EN CORRAL**

TESIS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS**

PRESENTA:

DOLORES ANGELICA MARQUEZ SALAZAR

DIRECTOR DE TESIS:

DR. MARTÍN FRANCISCO MONTAÑO GÓMEZ

MEXICALI, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO

ENERO DE 2019.

Efecto del tiempo de suplementación de clorhidrato de zilpaterol sobre residuos en músculo, hígado y riñón de corderos de pelo finalizados en corral. Tesis presentada por Dolores Angélica Márquez Salazar COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS, que ha sido aprobada por el siguiente comité:

Dr. Martin Francisco Montaña Gómez
Director

M.C. Miguel Ángel Vega Cázares
Asesor

Dr. Juan Octavio Chirino Romero
Asesor

M.C. Ramón Manuel Valenzuela Padilla
Asesor

Dra. Olga Maritza Manríquez Núñez
Asesor

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dr. Martin Francisco Montaña Gómez, mi director de tesis; a los miembros de mi comité M.C. Miguel Ángel Vega Cázares, Dr. Juan Octavio Chirino Romero, M.C. Ramón Manuel Valenzuela Padilla, y Dra. Olga Maritza Manríquez Núñez por el apoyo brindado durante mis estudios de maestría así como para la realización del proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada, lo cual hizo posible este logro.

Al Instituto de Investigaciones de Ciencias Veterinaria de la Universidad Autónoma de Baja California, por prestar las instalaciones y brindar facilidades durante la realización del proyecto.

A mi alma máter, UABC, por inspirarme y ayudarme a buscar la superación profesional.

A mis compañeros, por compartirme sus conocimientos y experiencia.

A mi familia y amigos, por su comprensión y apoyo a lo largo de este periodo.

Y nuevamente, gracias a CONACyT por apoyar a mi director de tesis en su estancia sabática.

DEDICATORIA

Para ti, madre. Porque con tu ejemplo me has enseñado tanto, me has retado a ser mejor persona, a buscar cosas nuevas, a aprender a aprender.

A mis hermanos, porque son parte de ese motor que me impulsa en el camino de la vida.

A mi padre y mis abuelos, con todo mi amor hasta el cielo.

Y a toda mi familia. Gracias por su amor incondicional.

RESUMEN

Efecto del tiempo de suplementación de clorhidrato de zilpaterol sobre residuos en músculo, hígado y riñón de corderos de pelo finalizados en corral

En Estados Unidos, la oficina federal de administración de alimentos y drogas (FDA por sus siglas en inglés) aprobó el uso de dos beta adrenérgicos ampliamente utilizados en alimentos que son el Clorhidrato de Ractopamina (CR) y Clorhidrato de Zilpaterol (CZ) en el año 2000 y 2006 respectivamente. La suplementación de CZ se limita a bovinos, y su uso no ha sido adoptado tan ampliamente como el de CR en otras especies. Se utilizaron 40 corderos machos enteros, los cuales se asignaron bajo un diseño de bloques completamente al azar a 1 de los siguientes 4 tratamientos de tiempos de suplementación de CZ: 0, 10, 20 y 30 d antes de finalizar el periodo de engorda. Todos los corderos se alimentaron con una dieta basal y se sacrificaron 48 h después de que se dejó de ofrecer el CZ. En cuanto a músculo, se observó un aumento en las concentraciones determinadas en el tejido con un comportamiento lineal significativo ($P \leq 0.05$) con respecto a los días de suplementación, así como una diferencia significativa entre el tratamiento testigo (T0) al ser compara con el resto de los tratamientos. En riñón se observó un aumento con tendencia lineal ($P \leq 0.10$) de las concentraciones encontradas en el tejido. Los niveles observados de clorhidrato de Zilpaterol fueron menores a los establecidos por SENASICA para bovinos. Se sugiere realizar más estudios para establecer límites máximos permisibles en ovinos.

Palabras clave: Agonistas adrenérgicos β_2 , zilpaterol, niveles, residuos.

ABSTRACT

Effect of time of supplementation of hydrochloride of zilpaterol on residues in muscle, liver and kidney of sheep's hair on feedlot diets

In the United States, the federal office of Administration's food and Drug (Administration FDA) approved the use of two beta adrenergic widely used in foods that are the Ractopamine hydrochloride (CR) and Zilpaterol hydrochloride (CZ) in 2000 and 2006 respectively. The supplementation of CZ is limited to cattle, and its use has not been adopted as widely as the CR. Forty lambs were used entire males, which were assigned under a block design randomized to 1 of the following 4 treatments of supplementation of CZ times: 0, 10, 20 and 30 d before the end of the period of fattening. All the lambs were fed a basal diet and 48 h were sacrificed once he stopped to offer the CZ. In terms of muscle, it was observed an increase in the concentrations determined in the tissue with a significant linear behavior ($P \leq 0.05$) with respect to the days of supplementation, as well as a significant difference witness (T_0) between the treatment being compared to the rest of the treatments. An increasing linear trend ($P \leq 0.10$) of the concentrations found in the tissue was observed in kidney. The observed levels of Zilpaterol hydrochloride were lower than those established by SENASICA for cattle. It is suggested to conduct more studies to establish maximum permissible limits in sheep.

Key words: β_2 agonists, zilpaterol, levels, residues.

CONTENIDO

	Pag
AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA	ii
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE CUADROS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN DE LITERATURA	7
Utilización de promotores del crecimiento	7
Receptores adrenérgicos	8
β adrenérgicos	11
Clorhidrato de Zilpaterol	13
Mecanismo de acción	16
Farmacocinética en rumiantes	18
Dosis	21
Métodos analíticos	22
Problemática de los residuos β adrenérgicos	22
MATERIALES Y MÉTODOS	26
Localización del área de estudio	26
Trato a las animales experimentales	26
Animales y manejo pre-experimental	27
Diseño experimental y tratamientos	29
Sacrificio de unidades experimentales	29
Recolección de muestras	30
Preparación de muestras	31

	Pag
Hipótesis	31
Análisis de muestras	31
Análisis estadístico	34
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
CONCLUSIONES	38
LITERATURA CITADA	39
ANEXOS	43

LISTA DE CUADROS

	Pag
Cuadro 1 Tejidos con Receptores β_2 y su respuesta al estímulo	12
Cuadro 2 Límites máximos de residuos (LMR) de zilpaterol establecidos por la FAO/OMS.....	24
Cuadro 3 Ingredientes y composición química de las dietas	28
Cuadro 4 Curva de calibración de zilpaterol	33
Cuadro 5 Efecto de los tratamientos sobre la variable de respuesta	36

LISTA DE FIGURAS

	Pag
Figura 1 Receptores acoplados a proteína G	10
Figura 2 Enantiómeros de Zilpaterol	15

INTRODUCCIÓN

Los agonistas beta adrenérgicos agregan valor económico al ganado de producción al mejorar la eficiencia alimentaria, crecimiento de músculo esquelético y la ganancia de peso de la canal. En Estados Unidos, la oficina federal de administración de alimentos y drogas (FDA por sus siglas en inglés) aprobó el uso de dos beta adrenérgicos ampliamente utilizados en alimentos que son el Clorhidrato de Ractopamina (CR) y Clorhidrato de Zilpaterol (CZ) en el año 2000 y 2006 respectivamente. Mientras que el Clorhidrato de Ractopamina es utilizado más frecuentemente en bovinos, porcinos y ovinos, la suplementación de CZ se limita a bovinos, y su uso no ha sido adoptado tan ampliamente como el de CR. La aprobación de los beta-agonistas en alimentos para ganado sigue siendo debatible en todo el mundo debido a la preocupación acerca de sus efectos potenciales de los residuos de dichas sustancias en productos cárnicos para consumo humano.

Diversos investigadores han evaluado si la prohibición por algunos países con productos cárnicos con contenido trazas de ractopamina viola acuerdos internacionales de comercio (Centner et al., 2014), los cuales entran en conflicto con las recomendaciones hechas por la Comisión del Código Alimentario, el cual establece los estándares internacionales en materia de alimentos. Esta comisión fue establecida por la FAO y la OMS en 1963 con la finalidad de desarrollar y homogenizar estándares internacionales sobre alimentos, lineamientos y códigos de prácticas encaminados a proteger la salud del consumidor y asegurar prácticas de comercialización adecuadas. Esta

comisión también promueve la coordinación de actividades encaminadas a estandarizar los criterios sobre alimentos a nivel internacional, tanto en el ámbito gubernamental como de organizaciones particulares (<http://www.codexalimentarius.org>).

El Código Alimentario ha aprobado los límites máximos de residuos (LMR o MLR por sus siglas en inglés) para ractopamina en productos cárnicos, bajo las obligaciones de la Organización Mundial de Comercio, pero se puede argumentar que los países no pueden prohibir los productos que cumplan con los lineamientos establecidos por el Codex para los límites de residuos.

Los productores necesitan reconocer que los consumidores pueden formular sus propias opiniones acerca de los beta-agonistas en los productos cárnicos. Aunque los residuos presentes en carne se encuentren dentro de los límites, el consumidor puede optar por no consumir dicho producto con cantidades traza de beta-agonistas. Además, aunque existan límites máximos de residuos para ractopamina en productos cárnicos, si un país llega a una conclusión científica diferente acerca de estas sustancias, se pueden rechazar las recomendaciones del Codex y desarrollar y usar requerimientos propios. Las leyes internacionales son complejas y los defensores de los productores no siempre reconocen las excepciones de los estándares internacionales. Dichos estándares pueden permitir a un país no aceptar productos con residuos, dado que los límites máximos de residuos establecidos por el Codex son importantes, pero no son infalibles (Jones, 2018).

Acorde con McCurry-Schmidt (2013), los beta agonistas son promotores del crecimiento que se utilizan en la producción de bovinos y porcinos. Cuando los animales consumen el alimento, éstos envían la energía extra hacia los adipocitos, pero cuando son suplementados con beta agonistas, la energía extra ingerida se envía a la síntesis de músculo en lugar de grasa. Muchos de los productores alimentan a sus animales con beta agonistas en las últimas semanas previas al sacrificio, debido a que los animales son medios eficientes en la conversión de energía a músculo conforme va aumentando su edad. Estas sustancias ayudan al ganado a aumentar la cantidad de tejido macro sin necesidad de aumentar la cantidad de alimento ingerido. Los beta agonistas se encuentran aprobados para su uso en pavos, pero su uso no es común.

Los beta agonistas utilizados en la producción animal son ractopamina y clorhidrato de zilpaterol. El Centro de Medicina Veterinaria de la FDA ha aprobado a ractopamina para su uso en porcinos y en ganado bovino, y es comercializado en dos presentaciones: "Paylean" es la línea comercial para cerdos, mientras que "Optaflexx" lo es para bovinos. Por otra parte, el clorhidrato de zilpaterol solo se encuentra aprobado para su uso en bovinos, siendo comercializado con el nombre de "Zilmax", por los laboratorios Merck. El uso de los agonistas beta adrenérgicos en animales de producción se considera seguro debido a que son eliminados rápidamente de los tejidos animales. Tanto CZ como CR son desdoblados rápidamente y excretados antes del sacrificio.

En los análisis de la FDA para los residuos de beta agonistas en productos de origen porcino y bovino rara vez se encuentran resultados positivos, pero incluso en dichos casos, los niveles encontrados son por debajo de los límites máximos de residuos establecidos por la misma FDA y la Comisión Internacional del Código Alimentario para el consumo humano seguro. Al mismo tiempo no se han reportado enfermedades transmitidas por alimentos o efectos secundarios en humanos que sean atribuibles al uso de beta agonistas aprobados en la producción de productos cárnicos.

A la fecha no hay datos publicados que comprueben que los agonistas adrenérgicos tienen un efecto sobre el bienestar animal. Porcinos y bovinos suplementados con dichos aditivos no han presentado mayor incidencia de lesiones o problemas de salud bajo un manejo adecuado.

Una preocupación es el posible efecto que estos productos pudieran tener sobre la integridad de las articulaciones de los animales a los que se les administra beta agonistas. Esta observación fue emitida por “Tyson Foods” en Estados Unidos (Roybal, 2013), por lo cual dejaron de aceptar ganado suplementado con CZ. Es importante mencionar que no se ha observado evidencia alguna de que éstos aditivos causen problemas en las articulaciones. Al mismo tiempo, otros investigadores (Radunz, 2010), no han observado efectos negativos sobre la conformación animal, remarcando que en el caso de ganado con pobre estructura ósea, la adición de músculo puede hacer más evidentes los problemas en las articulaciones.

Debido a que los beta agonistas fueron aprobados apenas en el año 2003, se sigue estudiando el posible efecto sobre la presentación de problemas potenciales en las articulaciones. He et al. (2003), en pruebas realizadas en la Universidad de Alberta en conjunto con otros organismos gubernamentales de Canadá demostraron que no hay conexión entre el uso de ractopamina y la rigidez en las articulaciones de porcinos. La rigidez fue evaluada mediante el estudio del cartílago en el área de carga de peso de las articulaciones. Éstos resultados demostraron que la suplementación con ractopamina puede incrementar la tasa de crecimiento en cerdos sin efecto perjudicial en el cartílago de las articulaciones.

Por otra parte, se han observado algunas evidencias de que los beta adrenérgicos pueden afectar el comportamiento porcino. En 2003, Marchant-Forde et al. reportaron que los cerdos que consumieron ractopamina fueron más renuentes a dejar sus corrales, lo cual se traduce en mayor tiempo para el manejo y transporte de dichos animales. Al mismo tiempo presentaron mayor ritmo cardiaco y mayor concentración de catecolaminas circulantes, sustancias químicas que son asociadas a la respuesta de estrés agudo.

Por su parte Baszczak et al. (2006), demostraron que ractopamina no afecta el comportamiento de ganado de carne al realizar las diversas rutinas de cuidado y manejo. Los investigadores monitorearon el comportamiento del ganado mediante el registro de la velocidad con la que los animales se movieron entre los compartimientos y si éstos forcejearon durante su manejo.

Como parte de la dieta de los seres humanos, la principal fuente de proteína es de origen animal por lo cual el consumo de carne, leche y huevos representan un importante aporte de nutrientes incluyendo vitaminas y minerales. El consumo de carne *per cápita* es mayor en países desarrollados en comparación a los países en desarrollo dónde el consumo anual es promedio es menor a 10 Kg, siendo 33 kg el consumo sugerido para una dieta balanceada. La producción de cárnicos a nivel mundial se enfoca principalmente en los bovinos, pero a pesar de estar en último lugar de producción y consumo, la carne de ovino representa aproximadamente un millón de toneladas al año alrededor del globo terráqueo. (FAO, 2018). Debido a los efectos de estos aditivos en humanos, se han establecido recomendaciones por parte de la FAO para la determinación de los límites máximos permisibles de dichos aditivos, para el aseguramiento de la seguridad alimentaria.

El uso de esta sustancia es permitido en México, y los límites máximos de residuos se encuentran establecidos exclusivamente para bovinos contemplando 10 ng/g en tejido muscular, 12 ng/g en riñón y 15 ng/g en hígado; mientras que para los demás rumiantes y otros ganados debe ser una cantidad "No detectada" (ND) donde ND representa un límite de tolerancia cero (SENASICA, 2017). En la Unión Europea el uso de beta agonistas adrenérgicos en el ganado está prohibido a partir de 1996 (Van Hoof et al., 2005).

El objetivo general del presente trabajo fue evaluar el efecto de tiempo de suplementación de clorhidrato de zilpaterol sobre residuos en músculo, hígado y riñón de corderos de pelo finalizados en corral.

REVISIÓN DE LITERATURA

Utilización de promotores de crecimiento

Con la finalidad de obtener mayor rendimiento del ganado, los productores han optado por varias alternativas para aumentar los beneficios derivados de sus productos. Desde el mejoramiento genético del hato, optimización de sistemas de pastoreo, utilización de granos en las raciones o la suplementación de sustancias en la alimentación, han sido algunas de las acciones que realizan los productores para aumentar ganancias. La administración de aditivos dentro de las dietas permite aumentar la efectividad de los nutrientes y permitiéndoles realizar su efecto en el tracto digestivo (McDonald, 2002).

Los promotores de crecimiento son sustancias o mezcla de sustancias no esenciales para la función biológica del animal que se agregan a las raciones para aumentar los parámetros productivos. Estas sustancias afectan las funciones metabólicas del animal de forma que la energía consumida sea utilizada eficientemente, promoviendo el anabolismo de células musculares.

Existen diferentes sustancias que funcionan como promotores del crecimiento, las cuales pueden ser clasificadas según sus características químicas o mecanismos de acción. Entre ellos se encuentran las hormonas esteroideas, anabólicos sintéticos, antibióticos, hormona de crecimiento y los agonistas beta adrenérgicos (Fajardo-Zapata et al., 2011).

El uso de promotores de crecimiento en la producción de productos de origen animal para consumo humano ha sido tema de debate entre la comunidad científica y un tema de preocupación pública durante años. Desde que la Unión Europea (EU, por sus siglas en inglés) prohibió el uso de esteroides anabólicos en el año 1986, se han introducido otras sustancias como alternativas a los anabólicos (Kuiper, 1998).

Receptores adrenérgicos

Se le conoce como receptores adrenérgicos a los receptores que son activados por adrenalina (también conocida como epinefrina) y noradrenalina (norepinefrina). Éstos son receptores transmembranales acoplados a proteína G y las sustancias que se unen a éstos principalmente son las catecolaminas como la adrenalina y noradrenalina; sustancias por las cuales reciben el nombre de adrenérgicos.

Los receptores acoplados a proteína G son la familia más grande receptores de membrana y estos responden a una gran variedad de señales químicas externas como hormonas, mediadores locales y neurotransmisores. (Alberts, 2010).

La cadena peptídica que conforma al receptor se pliega 7 veces atravesando la membrana, dejando la porción del extremo amino en el exterior de la célula y el extremo carboxilo en la región intracelular. La proteína G acoplada se encuentra en la porción intracelular y contiene subunidades (Figura

1) las cuales se separan para comenzar la cascada de segundos mensajeros intracelulares, culminando en la respuesta fisiológica del tejido estimulado

Existen dos tipos de receptores adrenérgicos, alfa (α) y beta (β); los cuales cuentan a su vez con subtipos como lo son α_1 , α_2 , β_1 , β_2 y β_3 . Tanto los receptores alfa como beta se encuentran ampliamente distribuidos en diferentes tejidos del organismo, teniendo un efecto específico sobre el metabolismo de dicho tejido (Katzung, 2010).

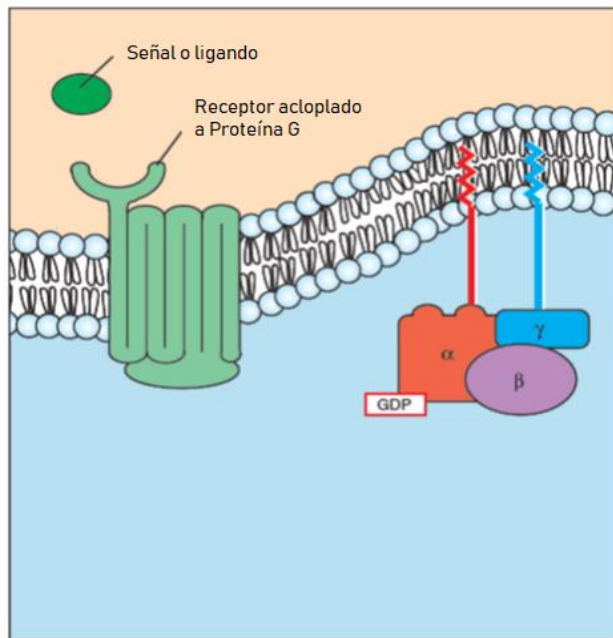


Figura 1. Receptores acoplados a proteína G. Modificada de Cunningham (2009).

β-adrenérgicos

Los β-adrenérgicos, son sustancias agonistas que tienen una afinidad mayor hacia los adrenoreceptores de tipo β. Son análogos de las catecolaminas y presentan diferentes sustituyentes químicos en su estructura lo cual le confiere características únicas a cada sustancia, entre ellas la afinidad por los receptores adrenérgicos, solubilidad, entre otras.

Dado que presentan puntos quirales en su estructura, los compuestos comerciales presentan ambos estereoisómeros; por tanto, tendrán actividad variable dependiendo de su proporción quiral. Para algunos compuestos como clenbuterol, ractopamina, fenoterol, isoproterenol, zilpaterol y terbutalina la parte activa es el isómero levógiro, aunque existen compuestos cuyo isómero funcional es dextrógiro (Morgan, 1990).

Cuadro 1. Tejidos con Receptores β_2 y su respuesta al estímulo.

Órgano	Respuesta al estímulo
Adipositos	Aumento de la lipólisis (termogénesis)
Arterias y venas	Dilatación de los vasos sanguíneos
Bazo	Relajación de la capsula del bazo
Corazón	Aumento de la contracción, aumento del ritmo cardiaco y aumento en la velocidad de conducción
Hígado	Aumento de la glucogenólisis
Estómago e intestino	Disminución de la motilidad y tono
Músculo Esquelético	Aumento de la contractibilidad, glucólisis y del consumo de potasio (K^+)
Ojo (Músculo ciliar)	Relajación (enfoco de imágenes lejanas)
Páncreas (células β)	Aumento de las secreciones pancreáticas
Pulmones y bronquios	Relajación de bronquios y músculo liso
Útero	Relajación
Vejiga	Relajación de la esfínter
Vesícula y conducto biliar	Relajación

(Modificado de Hsu, 2008).

Clorhidrato de zilpaterol

Siguiendo la nomenclatura de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, por sus siglas en inglés) el nombre del CZ es Clorhidrato de ($\pm$)-trans-4,5,6,7-tetrahidro-7-hidroxi-6-(isopropilamino),imidazo[4,5,1-jk]-[1]benzazepin-2(1H)-1, con dos carbonos quirales dando lugar a 4 diferentes enantiómeros ópticos. La mezcla comercializada por Merck, Zilmax® contiene una mezcla racémica de los enantiómeros (6R,7R) y (6S,7S) (Boison, 2014), como se muestra en la Figura 2, donde los centro quirales están identificados con un asterístico (*).

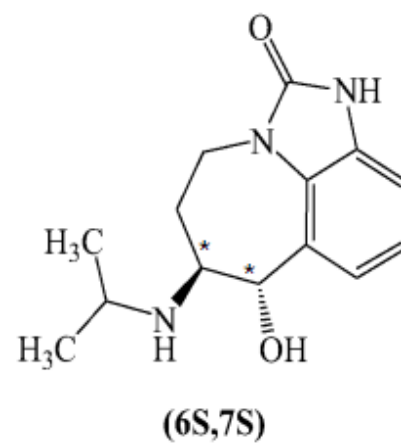
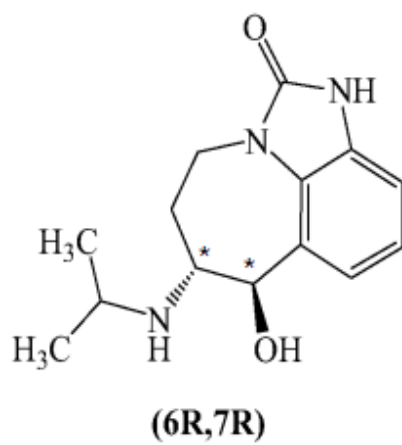
Su presentación es en polvo blanco, es muy soluble en agua y en otras soluciones acuosas con valores de pH de 1-10, en donde se disuelve aproximadamente el 50% del total del producto. El ligeramente soluble en metanol (solo el 3%) y se considera insoluble en otros solventes orgánicos (donde su solubilidad es menor al 0.1%) como etanol, acetona, etilacetato, éter isopropílico, hexano, tolueno, cloroformo, diclorometano y n-octanol (Boison, 2014).

A diferencia del clenbuterol, el zilpaterol es uno de los β -agonistas cuya suplementación es permitida en México, junto con clorhidrato de Ractopamina. Su afinidad es mayor hacia los receptores β_3 los cuales se encuentran mayormente en músculo esquelético (Hsu, 2008).

Su potencia es 2000 veces menor a la del clenbuterol, y su uso es exclusivamente veterinario por lo cual se considera que su uso es seguro en

cárnicos, ya que se para que tenga efectos cardiovasculares o broncodilatadores sobre el humano sería requerida una dosis de 40 mg de CZ, la cual equivale a los efectos de 20µg de clenbuterol (Sumano et al., 2002).

Figura 2. Enantiómeros de Zilpaterol.



(Boison, 2014).

Mecanismo de acción

Como su nombre lo dice, el mecanismo de estas sustancias sobre las células es mediante su unión con los receptores adrenérgicos, formando el complejo agonista-receptor. Los receptores adrenérgicos son receptores acoplados a proteína G, la cual es activada al momento de unirse ligando.

Existen variantes de la proteína G, cada cual es específica para un grupo de receptores y por lo tanto cada grupo tiene una cascada de señalización diferente, ya sea por activación o inactivación de enzimas o por canales iónicos en la membrana celular.

Todas estas proteínas G tienen una estructura similar y operan de forma similar entre ellas. Se componen de tres subunidades (alfa, beta y gamma) de las cuales dos están ligados a la membrana celular mediante cadenas cortas de lípidos. Cuando se encuentran sin estimular, la subunidad alfa se encuentra ligada a difosfato de guanina (GDP) y la proteína G se encuentra en reposo. Cuando una molécula extracelular o ligando se une al receptor, este cambia su conformación y la proteína G se activa porque la subunidad alfa disminuye su afinidad por GDP, el cual es reemplazado por trifosfato de guanina (GTP) y se desprende del complejo beta-gamma el cual también es activado. Independientemente de si ambos complejos son separados, ambos son partes activadas de la proteína G y ambos pueden interactuar directamente con las proteínas blanco en la membrana celular, en cuyo caso puede retransmitir la señal a hacia otros blancos en la célula. Mientras más tiempo se encuentren las

subunidades α y el complejo beta-gamma unidos a las moléculas blanco, más fuerte y duradera será la transmisión de la señal celular (Alberts, 2010).

Los Beta adrenérgicos están ligados a nucleótido de guanina, el cual activa la adenilato ciclasa que produce Monofosfato de adenilato cíclico (AMPc). El AMPc es un mensajero secundario intracelular cuya acción deriva en diferentes respuestas fisiológicas (Ruffolo et al., 1994). Los efectos de los beta-adrenérgicos dependen del órgano donde dicha sustancia ejerza su efecto, teniendo dos probables rutas que ayudan al aprovechamiento de la energía consumida.

Al unirse el AMPc con las subunidades reguladoras de la Proteína Cinasa A (PKA) activa su función fosforiladora la cual a su vez activa a la Fosforilasa cinasa y ésta última lo realiza sobre glucógeno fosforilasa, enzima cuyo efecto es el rompimiento de las cadenas de glucógeno en la célula y así liberar glucosa-6P en la célula, como fuente inmediata de energía.

Farmacocinética en rumiantes

Zilpaterol es fácilmente absorbido después de ser administrado vía oral, aunque el nivel de absorción depende del método específico para la administración oral. Estudios realizados en ratas, porcinos y bovinos mostraron el metabolismo de zilpaterol como comparables tanto forma cualitativa como cuantitativa en las tres especies, después de la administración oral del beta agonista. Dos metabolitos importantes, deisopropil-zilpaterol e hidroxil-zilpaterol, junto con zilpaterol en su forma original fueron observados. El compuesto original y sus metabolitos se eliminaron fácilmente, principalmente en la orina (80% en bovinos, 85% en porcinos y 50% en ratas) con la porción restante eliminada por medio de las heces. La forma excretada en orina de zilpaterol fue el compuesto sin cambios en todos los casos. Las concentraciones de los residuos de zilpaterol en orina y tejidos fueron aproximadamente 4 a 10 veces mayores que los metabolitos, especialmente en comparación con deisopropil-zilpaterol (FAO, 2016).

La eliminación de residuos radiomarcados en estudios realizados en bovinos después de ser tratados con la dosis recomendada de 0.15 mg/kg de peso/día demostraron que el estado estacionario de zilpaterol se alcanza a los 12 días de tratamiento. Se detectaron niveles en hígado y riñón a las 96 h después de aplicada la dosis. No se encontraron residuos en tejido graso después de las 21 horas así como tampoco se detectaron en músculo después de 48 horas. Los residuos extraíbles en hígado disminuyeron del 52% al 24%

entre las 12 h y 96 h, de igual forma en riñón donde disminuyó de 89% a 38% en el periodo de 12 y 48 horas.

El clorhidrato de zilpaterol sin cambios representa una parte significativa de los residuos extraíbles en hígado, riñón y músculo. La tasa de clorhidrato de zilpaterol disminuye con el tiempo en todos los tejidos mencionados. Deisopropil zilpaterol se indentificó dentro del extracto y representa una fracción menor a la de CZ. Otros metabolitos también son detectados en pequeñas cantidades en ganado incluyendo N-acetyl deisopropil zilpaterol, el cual se encuentra solamente en orina y un metabolito no identificado (3.3% en hígado y 5.7% de los residuos en riñón).

Acorde con Zilmax (2018), se observó que los niveles plasmáticos de Clorhidrato de Zilpaterol en el plasma y tejidos de ganado que consumió 6 ppm de Clorhidrato de Zilpaterol en el alimento, alcanzaron un nivel máximo entre los días 10 y 30 del tratamiento. A pesar de que el período de tratamiento exceda los 30 días recomendados, no hay acumulación del Clorhidrato de Zilpaterol en músculo, hígado, riñón o grasa. Después de 24 horas de suspender el tratamiento, se observó una rápida caída en los niveles de Clorhidrato de Zilpaterol en todos los tejidos. Por ejemplo, en el músculo más del 80% de los residuos de Clorhidrato de Zilpaterol se eliminan en un período de 24 h. En relación con la cinética del Clorhidrato de Zilpaterol puede concluirse que se absorbe rápidamente y los niveles más elevados de residuos se localizan en el hígado y los riñones, pero a las 48 h más del 80% del compuesto ha sido eliminado de estos tejidos. Por otra parte, los niveles de Clorhidrato de

Zilpaterol encontrados en el músculo son muy bajos y en la grasa son casi inexistentes. Después del retiro del Clorhidrato de Zilpaterol del alimento, los residuos se eliminan rápidamente.

Utilizando Zilpaterol radio-marcado, se determinó que el zilpaterol se metaboliza en deisopropil-zilpaterol, el cual se encuentra en menor proporción en los tejidos respecto a la cantidad de Zilpaterol intacto hasta 24 horas después de su última dosis, con valores de 8-16% y 67-76% en hígado; 5-13% y 62-87% en riñón; 10-13% y 73-94% en músculo (*longissimus dorsi*) para deisopropil-zilpaterol y zilpaterol respectivamente (Tulliez, 2000).

En un estudio revisado durante la 78ª Reunión del comité de la FAO, realizado mediante buenas prácticas de laboratorio, fue conducido con 4 novillos Salers y 4 vaquillas Charolais x Salers, de 295 kg de peso promedio, divididos en 4 grupos de dos animales, un novillo y una vaquilla por grupo. El primer grupo fue suplementado con zilpaterol no marcado y fue el grupo control. A los animales en los otros 3 grupos se suplementaron con una dosis única de 0.2 mg/kg de peso de Clorhidrato de Zilpaterol marcado con Carbono 14 (^{14}C) y sacrificados a las 12 h, 48 h y 8 días respectivamente. Se recolectó plasma de cada animal durante las primeras 10 horas y posteriormente a las 14 h, 21 h y 24 h durante los días subsecuentes hasta el día de sacrificio. También se colectaron muestras diarias de orina y heces en los animales del grupo de 8 días. Al sacrificio, se colectaron muestras de hígado, riñones y músculo (*longissimus dorsi*), grasa perianal y visceral y las cuatro porciones del estómago fueron extirpadas y congeladas hasta el análisis. Se observó un

incremento rápido en la radioactividad en el plasma, el cual alcanzó un valor máximo a las 12 horas y 10 h en macho y hembra respectivamente después de la administración del fármaco. Los valores máximos encontrados en plasma fueron 16.8 ng/ml y 22.4 ng/ml equivalentes de Zilpaterol. La reducción en radioactividad en plasma ocurrió con una base bifásica. El tiempo de vida media de la primera fase se observó a las 11.9 h y 13.2 h en macho y hembra respectivamente. La segunda fase correspondió a una disminución muy lenta en la radioactividad, pero no pudo ser descrita adecuadamente debido a que la señal no fue significativamente diferente a la señal de fondo. Una porción mayor al 90% de la dosis (97% en novillos y 93% en vaquillas) se excretó durante los 8 días posteriores al tratamiento (Tulliez, 1992).

Dosis

Clorhidrato de zilpaterol es comercializado como Zilmax[®] (Merck). El proveedor recomienda su uso durante los últimos 30 días de la etapa de finalización del ganado; así como también una dosis 0.15 mg de producto por kilogramo de peso vivo por día a cada animal, o 125 g de Zilmax por tonelada de alimento terminado con 90% de Materia seca, por lo cual raciones que contengan alimento húmedo tales como ensilajes, debe ser ajustadas.

En el ganado destinado para el consumo humano, se recomienda un tiempo de retiro de 3 días (Zilmax, 2018). Acorde con la FAO (2016), su uso recomendado es de 60 a 90 mg por animal al día, en periodos de 20 a 40 días, retirando entre 2 y 4 días antes del sacrificio.

Métodos analíticos.

En la actualidad se cuenta con diversos procedimientos para la cuantificación de sustancias químicas. El método de referencia a nivel mundial para detección y cuantificación de analitos es la cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC por sus siglas en inglés) pero éste procedimiento requiere un tratamiento extenso a la muestra y en la mayoría de los casos, el uso de altos volúmenes de solventes para lograr extraer la sustancia química de interés.

Una opción para detección de sustancias químicas específicas es la utilización de métodos inmunológicos, los cuales por su sencillez y especificidad por los analitos, son convenientes y la adquisición de reactivos y equipamiento es más económica en comparación a los métodos instrumentales como los antes mencionados (Shelver, 2006).

Problemática de los residuos de B-adrenérgicos en productos cárnicos.

Debido a que los receptores adrenérgicos se encuentran en diferentes tejidos y presentan diversos efectos fisiológicos, los residuos de dichas sustancias pueden efectuar su reacción fisiológica si esta sustancia se encuentra en cantidades suficientes cuando el tejido es consumido, como es el caso de los productos cárnicos, por lo cual es importante mantener los residuos de beta adrenérgicos por debajo de los niveles en los cuales se produce la reacción fisiológica. Un ejemplo es el clenbuterol, que tiene mayor

potencia pero su eliminación es lenta en comparación con ractopamina y zilpaterol, éstos dos últimos se consideran seguros para su uso en animales para consumo humano debido a su rápida eliminación (Sumano et al., 2002).

Se han reportado casos de intoxicaciones por los residuos de beta adrenérgicos en productos cárnicos (Elliot, 1996) por lo tanto, estos aditivos tienen una regulación estricta para su uso en productos para consumo humano y muchos países han instituido una política de Cero Tolerancia para los residuos de beta agonistas en productos de origen animal (Shelver, 2010).

Durante la 78ª Reunión de El Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (**JECFA**) se evaluó al Clorhidrato de zilpaterol, considerándose que los temblores observados en seres humanos y coherentes con los efectos agonistas de los receptores adrenérgicos β_2 del compuesto, son el efecto adverso más importante y sensible a partir del cual se debe calcular una ingesta diaria admisible (IDA). Se estableció una IDA toxicológica entre 0 y 0.04 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal, pero los datos fueron insuficientes para recomendar límites máximos de residuos (LMR), y durante la reunión número 81 de dicho comité se recomendaron los siguientes LMR para Zilpaterol (de base libre) (FAO, 2016a)

Cuadro 2. Límites máximos de residuos (LMR) de zilpaterol establecidos por la FAO/OMS.

Especie	Riñón (ng/g)	Hígado (ng/g)	Músculo (ng/g)
Ganado bovino	3.3	3.5	0.5

(FAO, 2016a).

En 1997, Casey y colaboradores realizaron un estudio para evaluar los efectos del zilpaterol en novillos (Sussex x Brahman) con dos tratamientos (0.0 mg/kg como testigo y 0.15 mg/kg) y con 1 y 7 días de retiro y sus residuos fueron determinados tanto en músculo (*longissimus dorsi thoracis*) como en hígado. Los resultados encontrados para 24 horas $0.21 \text{ ng/g} \pm 0.03 \text{ ng/g}$; y para 7 días $0.20 \pm 0.00 \text{ ng/g}$.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del área de estudio

El experimento se llevó a cabo en el área experimental de pequeños rumiantes del Instituto de Investigaciones de Ciencias Veterinarias (IICV), de la Universidad Autónoma de Baja California, localizada al sur de la ciudad de Mexicali, Baja California, México. El clima en esta región es árido seco con temperaturas extremas, tanto en la época de invierno como en verano (0°C hasta 50°C), y la precipitaciones media anual es 80 mm. (INEGI, 2018)

Trato a las unidades experimentales

Los procedimientos y manejo de los animales se realizaron en base a las indicaciones señaladas en las siguientes Normas Mexicanas para el cuidado y manejo de los animales: NOM-051-ZOO-1995 (la atención humanitaria hacia los animales durante la movilización), NOM-024-ZOO-1995 (disposiciones de sanidad animal y características durante el transporte de animales), NOM-033-ZOO-1995 (el sacrificio humanitario de animales domésticos y silvestres) y NOM-EM-015-ZOO-2002 (disposiciones técnicas para el control del uso de los beta agonistas en animales).

Animales y manejo pre-experimental

Se utilizaron 40 corderos machos de la cruce Dorper x Kathadin, los cuales tenían un peso vivo de 34.6 ± 2.4 kg y una edad de 4 meses al inicio del experimento. El estudio tuvo una duración de 52 días, de los cuales 20 días fueron para adaptación y 32 días de periodo experimental. Durante el periodo de adaptación, todos los corderos fueron desparasitados (Ivermectina; Sanfer Laboratorio, Ciudad de México; 0.5 ml/animal), vitaminados (Vigantol ADE Fuerte; Bayer, Ciudad de México, México; 1 ml /animal), alojados en corraletas individuales y adaptados a la dieta base (Cuadro 1). Las corraletas individuales medían 1.2 m de ancho x 2.0 m de largo, y cada una estaban equipadas con bebedero, comedero y sombra.

Cuadro 3. Ingredientes y composición química de las dietas.

	Tratamientos ¹			
	T0	T10	T20	T30
Ingredientes, %				
Maíz hojuela	46.00	46.00	46.00	46.00
Heno de alfalfa	26.50	26.50	26.50	26.50
DDGs ²	20.00	20.00	20.00	20.00
Melaza	6.00	6.00	6.00	6.00
CZ, mg/animal/d ³	0.00	10.00	10.00	10.00
Minerales	1.50	1.50	1.50	1.50
Análisis de composición nutrimental, % en base a Materia Seca				
Materia Seca	88.96	88.96	88.96	88.96
EM (Mcal/kg)	2.98	2.98	2.98	2.98
Extracto etéreo	4.89	4.89	4.89	4.89
Proteína cruda	15.78	15.78	15.78	15.78
Fibra detergente neutra	12.48	12.48	12.48	12.48
Fibra detergente ácida	4.84	4.84	4.84	4.84
Ca	0.85	0.85	0.85	0.85
P	0.68	0.68	0.68	0.68

¹Los tratamientos consistieron en: 1) T0 = Testigo, Sin Clorhidrato de Zilpaterol (Z0); 2) T10 = Suplementación de Clorhidrato de Zilpaterol los últimos 10 d de finalización; 3) T20 = Suplementación de Clorhidrato de Zilpaterol los últimos 20 d de finalización; 4) T30 = Suplementación de Clorhidrato de Zilpaterol los últimos 30 d de finalización.

²DDGs = Granos de destilería secos de maíz con solubles.

³CZ = Clorhidrato de Zilpaterol (CZ; Zilmax, Intervet/Schering-Plough, México).

Diseño experimental y tratamientos

Los corderos fueron pesados individualmente el primer día del periodo experimental para asignarlos bajo un diseño de bloques completamente al azar a los tratamientos. El peso vivo fue usado como factor de bloqueo, por lo cual inicialmente se hicieron grupos (bloques) de cuatro corderos de similar peso (10 bloques), y los corderos de cada grupo fueron asignados aleatoriamente a uno de cuatro tratamientos (n=10). Los tratamientos consistieron en suplementar a los corderos con 10 mg/d de clorhidrato de zilpaterol (Zilmax, Intervet/Schering-Plough, México) durante los últimos 0 (T0, testigo), 10 (T10), 20 (T20) y 30 (T30) días del periodo de finalización de engorda. Durante los 30 días del periodo experimental, independientemente del tratamiento, los corderos fueron alimentados con misma dieta (dieta base). Diariamente se alimentaron los animales por la mañana (700 h) y por la tarde (1500 h) en una proporción 40:60 del total de la porción de la dieta por día. El agua se ofreció *ad libitum* y el estado de salud se verificó visualmente todos los días. Muestras de alimento fueron colectadas para ser secadas en la estufa y determinar su composición química en el laboratorio de nutrición animal del IICV-UABC.

Sacrificio de unidades experimentales

Los animales fueron pesados (peso al sacrificio) y sacrificados por el método de degüelle sin previa insensibilización 48 h después de que finalizó el periodo experimental. El sacrificio se realizó en el Taller de Carnes del Instituto de Ciencias Agrícolas-UABC, localizado en el Ejido Nuevo León.

Recolección de muestras

Las muestras fueron recolectadas al momento del sacrificio que se realizó en el rastro dentro de las instalaciones del Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California, a las 48 horas de retiro del tratamiento y congeladas a -30°C hasta su preparación y análisis. Se tomaron muestras de hígado y riñón al momento del sacrificio; de igual forma se colectaron las cabezas de las unidades experimentales para la obtención de músculo. Las muestras de músculo se colectaron del músculo masetero, posteriormente al diseccionar las cabezas de los animales, evitando obtener zonas altas en grasa o tejido conectivo.

Preparación de muestras

Para la determinación de residuos se utilizaron 5 muestras de cada tejido por tratamiento. Las muestras fueron homogenizadas mediante molido. Se retiraron restos de tejido graso o conectivo previos a la molienda. Se mantuvieron en congelación hasta el momento de su extracción. Esta se realizó conforme al protocolo descrito por el proveedor para los diferentes tejidos (Bioo Scientific Corp., 2011), utilizando el homogenizador PowerGen 700™ (Fisher Scientific), al inicio de la extracción en conjunto con el primer buffer utilizado, con la finalidad de optimizar el proceso.

Hipótesis

Se pueden encontrar residuos de zilpaterol en músculo, hígado y riñón en corderos de finalización que han sido suplementados con clorhidrato de zilpaterol.

Análisis de muestras

Los residuos de Clorhidrato de Zilpaterol se cuantificaron mediante análisis de ELISA utilizando el kit “MaxSignal® Zilpaterol ELISA Test” el cual es un inmunoensayo enzimático competitivo. Para la determinación de las concentraciones se usó un Lector para placas ELISA, Eon™ (BioTek Instruments, Inc.), con lectura de las placas a 450 nm, según lo indicado por el proveedor. Las determinaciones se realizaron en microplacas de 96 pozos; las muestras se aplicaron por duplicado así como los estándares de la curva de calibración, para lo cual fueron necesarias dos placas, cuya distribución se puede apreciar en el anexo 1.

Se registraron la absorbancia de los pozos de la placa a 450 nm. La curva de calibración tuvo un coeficiente de correlación (R^2) de 0.9941, y fue realizada utilizando las concentraciones 0.00, 0.015, 0.20 y 0.50 ng/g. Dado que la curva de calibración es inversamente proporcional a la concentración y tiene un comportamiento logarítmico, el proveedor recomienda ajustar los valores de absorbancia absoluta a absorbancia relativa utilizando el valor del estándar cero (0.0 ng/g) como el 100 de absorbancia. Así mismo, para ajustar la curva a comportamiento lineal se hizo una transformación de los datos aplicando

logaritmo natural ($\ln$) al valor de absorbancia relativa para obtener la ecuación de la curva.

Utilizando el Software Gen5™ (BioTek Instruments, Inc.) se realizó un promedio de las absorbancias de cada una de las muestras, y los datos fueron utilizados para el análisis estadístico.

El límite de detección (LOD) se estableció como 3 veces la desviación estándar de la señal del blanco y el límite de cuantificación (LOQ) con 10 veces el valor de la desviación estándar de la señal o absorbancia del estándar cero (o blanco) (Skoog, 2001).

Cuadro 4. Curva de calibración de zilpaterol

Concentración (ng/g)	Absorbancia Relativa (%)
0.000	100.000
0.015	93.389
0.200	48.864
0.500	34.300
$R^2^{(1)}$	0.994
LOD ⁽²⁾	0.090
LOQ ⁽³⁾	0.125

⁽¹⁾ R^2 = Coeficiente de correlación, ⁽²⁾Límite de Detección, ⁽³⁾Límite de Cuantificación.

Análisis estadístico

Todos los datos se sometieron a un análisis de varianza bajo un diseño completamente al azar. Las medias fueron analizadas a través de polinomios ortogonales declarando significancia a $P \leq 0.05$ y tendencias cuando $P > 0.05$ y ≤ 0.10 . Los datos se analizaron con el Procedimiento GLM del programa estadístico SAS (2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El efecto de los tratamientos sobre la variable de respuesta se muestra en el Cuadro 5. En cuanto a músculo, se observó un aumento en las concentraciones determinadas en el tejido con un comportamiento lineal significativo ($P \leq 0.05$) con respecto a los días de suplementación, así como una diferencia significativa entre el tratamiento testigo (T0) al ser comparado con el resto de los tratamientos.

En riñón se observó un aumento con tendencia lineal ($P \leq 0.10$) de las concentraciones encontradas en el tejido, así como una diferencia significativa entre el tratamiento testigo (T0) en contraste con el resto de los tratamientos, mientras que en hígado se observó un aumento con tendencia lineal ($P \leq 0.10$) de las concentraciones encontradas en el tejido, pero no se encontró diferencia significativa o tendencia del tratamiento testigo (T0) con respecto a los demás tratamientos empleados en este experimento. Es importante remarcar que los niveles observados de clorhidrato de Zilpaterol fueron menores a los establecidos por SENASICA para bovinos.

En 2006, Shelver et al. evaluaron los niveles de zilpaterol en músculo, hígado y riñón de 10 corderos a diferentes tiempos de retiro y encontraron que a los dos días, los niveles de en hígado fueron de 1.5 ng/g, en músculo 0.86 ng/g y en riñón 1.10 ng/g, los cuales fueron mayores a los encontrados en nuestro estudio. La dosis utilizada fue de 0.15 mg/kg/día, un equivalente de 5.4 mg al día por animal lo cual corresponde aproximadamente a la mitad de la dosis utilizada en el experimento actual.

Cuadro 5. Efecto de los tratamientos sobre la variable de respuesta.

Residuos de CZ (ng/g)					Error	Valor P*	
Tejido	T0	T10	T20	T30	Estándar	T0 vs. Otros	Lineal
Músculo	0.0000	0.1908	0.2598	0.6414	0.0707	0.0065	0.0004
Riñón	0.0000	0.4962	0.6666	0.7152	0.1173	0.0438	0.0549
Hígado	0.0000	0.1862	0.2740	0.4484	0.0750	0.1270	0.0594

*No se observó efecto sobre comportamiento Cuadrático y/o Cúbico.

El tejido en el que se encontraron mayor cantidad de residuos de CZ fue riñón, lo cual se debe a que es una sustancia altamente soluble en agua por lo tanto su excreción es mayormente a través del sistema urinario, siendo los riñones los órganos encargados de eliminar al CZ, aunque los resultados difieren con lo encontrado por Shelver et al. (2006).

A la fecha, se han realizado estudios para determinar los residuos de CZ en otras especies, pero no en tejidos de ovejas además de los antes mencionados.

A pesar de que el CZ se encuentra autorizado para su uso en diferentes animales de producción, los límites máximos de residuos no se han establecido para borregos, por lo tanto los resultados encontrados en el presente estudios al ser positivos sobrepasan el límite de tolerancia cero establecido por SENASICA (2017). Es importante mencionar que dicho límite se estableció así más que nada por la falta de estudios acerca de los residuos en tejido animal para consumo humano y por la preocupación de los efectos que pudieran tener en la población que los consuma. Por lo anterior, se deben realizar más estudios para confirmar si dichas cantidades son peligrosas para los humanos y en su caso establecer límites máximos permisibles que garanticen la salud del consumidor.

CONCLUSIONES

Los niveles observados de clorhidrato de zilpaterol son menores a los establecidos por SENASICA para bovinos. En virtud de que esa institución no ha establecido límites formales para su uso en ovinos, se sugiere realizar más estudios para establecer límites máximos permisibles.

LITERATURA CITADA

- Alberts, B., D. Bray, K. Hopkin, A. D. Johnson, J. Lewis, M. Raff, and P. Walter. 2010. Essential cell biology. Garland Science:544-545.
- Baszczak, J. A., T. Grandin, S. L. Gruber, T. E. Engle, W. J. Platter, S. B. Laudert, A. L. Schroeder, and J. D. Tatum. 2006. Effects of ractopamine supplementation on behavior of British, Continental, and Brahman crossbred steers during routine handling. J. Anim. Sci. 84:3410-3414.
- Boison, J., F. Ramos, P. Sanders, and S. Scheid. 2014. Zilpaterol hydrochloride. RESIDUE EVALUATION OF CERTAIN VETERINARY DRUGS. 10:133.
- Casey, N. H., E. C. Webb, and J. L. Maritz. 1997. Effects of zilpaterol and its withdrawal on carcass and meat quality of young steers. In Annual international congress of meat science and technology. 43:264-265.
- Centner, T. J., J. C. Alvey, and A. M. Stelzleni. 2014. Beta agonists in livestock feed: Status, health concerns, and international trade. J. Anim. Sci. 92:4234-4240.
- Cunningham, J. G. 2009. Fisiología Veterinaria. Cuarta Edición. Editorial ELSEVIER. España.
- Elliott, C. T., H. G. Short, H. G. Kennedy, and W. J. McCaughey. 1996. Monitoring for clenbuterol abuse in N. Ireland 1989-1994. Vet. Q. 18:41-44.
- Fajardo-Zapata, Á. L., F. J. Méndez-Casallas, and L. H. Molina. 2011. Residuos de fármacos anabolizantes en carnes destinadas al consumo humano. Universitas Scientiarum. 16:77-91.
- F.A.O. World Health Organization, and WHO Expert Committee on Food Additives. 2016. Evaluation of certain veterinary drug residues in food: eighty-first report of the Joint FA. World Health Organization.

- F.A.O.a. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2016. Debate sobre el clorhidrato de zilpaterol en el Codex.
- He, P., F. X. Aherne, J. R. Thompson, A. L. Schaefer, and J. K. Merrill. 1993. Effect of ractopamine on carcass characteristics and joint-cartilage soundness in finishing pigs. *Can J. Anim. Sci.* 73:169-176.
- Hsu, W. H. 2008. Handbook of veterinary pharmacology. John Wiley & Sons Ed. 30-31.
- INEGI. Cuéntame... Información por territorio: Clima. Consultado, Noviembre, 2018.
<http://cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/bc/territorio/clima.aspx?tema=me&e=02>
- Jones, L. 2018. American Society of Animal Science- Communications.
- McCurry-Schmidt, M. 2013. American Society of Animal Science- Communications.
- McDonald, P. 2002. Animal nutrition. Pearson education.
- Marchant-Forde, J. N., D. C. Lay, E. A. Pajor, B. T. Richert, and A. P. Schinckel; The effects of ractopamine on the behavior and physiology of finishing pigs, *J. Anim. Sci.* 81:416-422.
- Katzung, B. G., S. B. Masters, and A. J. Trevor. 2010. Farmacología Básica y Clínica. (LANGE Basic Science). McGraw-Hill Education. 24-25.
- Kuiper, H. A., M. Y. Noordam, M.M.H. van Dooren-Flipsen, R. Schilt, and A. H. Roos. 1998. Illegal use of β -adrenergic agonists: European Community, *J. Anim. Sci.* 76:195–207.
- Morgan, D. J. 1990. Clinical pharmacokinetics of β -agonists. *Clinical pharmacokinetics* 18:270-294.

- NOM-015-ZOO-2002. Especificaciones técnicas para el uso de beta-agonistas en los animales. SAGARPA. México, DF.
- NOM-024-ZOO-1995. Especificaciones y características zoosanitarias para el transporte de animales, sus productos y subproductos, productos químicos, farmacéuticos, biológicos y alimenticios para uso en animales o consumo por éstos. Diario Oficial de la Federación, 16.
- NOM-033-ZOO-1995. Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres. Diario Oficial de la Federación, México DF, México.
- NOM- 051-ZOO-1995. Norma oficial para trato humanitario en la movilización de animales. Diario Oficial de la Federación, 23.
- Radunz, A. 2010. Live Cattle Evaluation for Carcass Traits and Grid Marketing Basics. UW Co-operative.
- Roybal, J. 2013. Beef Magazine. Recuperado en octubre 2018 de <https://www.beefmagazine.com/animal-welfare/tyson-says-it-won-t-buy-zilmax-fed-cattle-after-sept-6>.
- Ruffolo, R. R., J. M. Stadel, and J. P. Hieble. 1994. α -adrenoceptors: Recent developments. Medicinal research reviews. 14:229-270.
- SENASICA. 2017. Límites Máximos de Residuos Tóxicos y contaminantes. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/244765/Tabla_de_L_mites_M_ximos_2017.pdf
- Shelver, W. L., and D. J. Smith. 2006. Tissue residues and urinary excretion of zilpaterol in sheep treated for 10 days with dietary zilpaterol. Journal of agricultural and food chemistry. 54:4155-4161.
- Shelver, W. L., J. F. Thorson, C. J. Hammer, and D. J. Smith. 2010. Depletion of urinary zilpaterol residues in horses as measured by ELISA and UPLC-MS/MS. Journal of agricultural and food chemistry. 58:4077-4083.

- Skoog, D. A., F. J. Holler, and T. A. Nieman. 2001. Principios de análisis instrumental (No. 543.4/. 5). McGraw-Hill Interamericana de España.
- Sumano, H., L. Ocampo, y L. Gutiérrez. 2002. Clenbuterol y otros β -agonistas, ¿una opción para la producción pecuaria o un riesgo para la salud pública?. Veterinaria México. 33.
- Tulliez, J. 1992. Metabolism and residue study of 14C-RU 42173 in the cattle (steer and heifer) after single oral administration. Unpublished report of study No. 90/01/XL from INRA-Laboratoire des Xenobiotiques, 180 chemin de tournefeuille, 31931 Toulouse, France. Document No. V-0238-0104, submitted to FAO by MSD Animal Health.
- Tulliez, J. 1999. 14C-RU 42173 (zilpaterol hydrochloride) pivotal residue depletion study in steers and heifers. Unpublished report of study No. XL/97/RU42173/01 from INRA-Laboratoire des Xenobiotiques, 180 chemin de tournefeuille, 31931 Toulouse, France. Document No. V-0238-0158, submitted to FAO by MSD Animal Health.
- Tulliez, J. 2000. Pilot steady state study of 14C-RU 42173 steer and heifer. Unpublished report of study No. 94/03/XL from INRA-Laboratoire des Xenobiotiques, 180 chemin de tournefeuille, 31931 Toulouse, France. Document No. V-0238-0109, submitted to FAO by MSD Animal Health.
- Van Hoof, N., D. Courtheyn, J. P. Antignac, M. Van de Wiele, S. Poelmans, H. Noppe, and H. De Brabande. 2005. Multi-residue liquid chromatography/tandem mass spectrometric analysis of beta-agonists in urine using molecular imprinted polymers. Rapid communications in mass spectrometry. 19:2801-2808.
- Zilmax, 2018. Productividad Animal Boletín Veterinario, Intevet, México.

ANEXOS

Procedimiento de extracción en Riñón e Hígado

1. Remover las porciones grasas del tejido y homogenizar.
 2. Tomar 1g de tejido muestra y agregar 2ml de Buffer de Extracción. Mezclar con ayuda del homogenizador.
 3. Agitar en Rotorack durante 10 minutos
 4. Agregar 3ml de acetonitrilo y 2.5ml de Buffer de balance. Agregar 100µl de buffer de extracción en hígado.
 5. Agitar en Rotorack durante 10 minutos
 6. Centrifugar a 4000 x g, a temperatura ambiente, por 5 minutos.
 7. Tomar 900 µl del sobrenadante y transferir a un tubo nuevo.
 8. Evaporar con nitrógeno gaseoso, en baño maría a 60° C hasta sequedad.
 9. Agregar 1ml de Hexano y disolver.
 10. Agregar 0.6ml de 1X Buffer de Fosfatos.
 11. Agitar en Rotorack durante 5 minutos.
 12. Centrifugar a 4000 x g, durante 5 minutos y descartar la capa superior de Hexano.
 13. Utilizar 50 µl para el análisis ELISA
- NOTA: el factor de dilución aplicado a las muestras hasta este punto es dos (2).

Procedimiento de extracción en Músculo.

1. Remover las porciones grasas del tejido y homogenizar.
2. Tomar 1g de tejido muestra y agregar 2ml de Buffer de Extracción. Mezclar con ayuda del homogenizador.
3. Agitar en Rotorack durante 10 minutos
4. Agregar 3ml de acetonitrilo y 2.5ml de Buffer de balance.
5. Agitar en Rotorack durante 10 minutos
6. Centrifugar a $4000 \times g$, a temperatura ambiente, por 5 minutos.
7. Tomar 900 μ l del sobrenadante y transferir a un tubo nuevo.
8. Evaporar con nitrógeno gaseoso, en baño maría a 60° C hasta sequedad.
9. Agregar 1ml de Hexano y disolver.
10. Agregar 0.6ml de 1X Buffer de Fosfatos.
11. Agitar en Rotorack durante 5 minutos.
12. Centrifugar a $4000 \times g$, durante 5 minutos y descartar la capa superior de Hexano.

Relación de muestras

B	Blanco (0.0 ng/g)	STD5	0.50 ng/g
STD1	0.015 ng/g	MF¹	Músculo Fortificado.
STD2	0.05 ng/g	RF¹	Riñón Fortificado.
STD3	0.10 ng/g	HF¹	Hígado Fortificado.
STD4	0.20 ng/g	1-66²	Muestras

¹Los tejidos fueron fortificados a 0.04 ng/g. ²Las muestras 1-20 son músculo, 21-40 son riñón, 41-60 son hígado y 61-66 son repeticiones de muestras.

Posición de muestras en microplaca

Placa 1.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	B	1	1	9	9	17	17	25	25	33	*
B	STD1	STD1	2	2	10	10	18	18	26	26	33	*
C	STD2	STD2	3	3	11	11	19	19	27	27	34	*
D	STD3	STD3	4	4	12	12	20	20	28	28	34	*
E	STD4	STD4	5	5	13	13	21	21	29	29	35	*
F	STD5	STD5	6	6	14	14	22	22	30	30	35	*
G	MF	MF	7	7	15	15	23	23	31	31	36	*
H	HF	HF	8	8	16	16	24	24	32	32	36	*

*Posiciones no utilizadas

Placa 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	B	37	37	45	45	53	53	61	65	*	*
B	STD1	STD1	38	38	46	46	54	54	61	65	*	*
C	STD2	STD2	39	39	47	47	55	55	62	66	*	*
D	STD3	STD3	40	40	48	48	56	56	62	66	*	*
E	STD4	STD4	41	41	49	49	57	57	63	*	*	*
F	STD5	STD5	42	42	50	50	58	58	63	*	*	*
G	RF	RF	43	43	51	51	59	59	64	*	*	*
H	HF	HF	44	44	52	52	60	60	64	*	*	*

*Posiciones no utilizadas