

DETERMINACION DE LA PRESENCIA DE DIETILESTILBESTROL EN CARNE DE GANADO VACUNO PARA CONSUMO HUMANO

Licda. Sandra Lisseth Secam
Química Farmacéutica.
Facultad de CC.QQ. y FF. USAC

Licda. Julia Alicia Amado Zeissig
Química Farmacéutica, División de Análisis,
Pruebas y Ensayos. ICAITI

1. SUMARIO

El presente estudio fue realizado con el propósito de investigar residuos de la sustancia estrogénica dietilestilbestrol, en la carne de ganado bovino que es consumida por la población de la ciudad de Guatemala.

Para llevarlo a cabo se analizaron 57 muestras, entre los meses de enero a junio de 1986, procedentes de mataderos que proveen de carne a la ciudad; para este fin el tejido utilizado fue hígado y el método analítico usado fue el recomendado por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, el cual previamente fue ensayado y acondicionado para este propósito, el límite de detección obtenido fue de 2.0 microgramos de dietilestilbestrol por Kg de tejido.

En conclusión, ninguna de las muestras analizadas dio resultados positivos para residuos de dietilestilbestrol, por lo que puede afirmarse que la carne procedente de estos mataderos durante el período de estudio se encontró libre de esta sustancia, lo cual presupone que el uso de dietilestilbestrol es limitado y no presenta mayor problema.

2. INTRODUCCION

El uso de dietilestilbestrol (DES), una sustancia estrógena sintética, exponente de los compuestos anabólicos, tomó gran auge en los últimos tiempos para propósitos de engorde de animales⁽¹⁻⁴⁾; sin embargo, estudios realizados han revelado que produce daños en ciertas partes del organismo animal⁽⁵⁻⁹⁾, unido a ello su efecto residual⁽¹⁰⁻¹⁷⁾, por lo que esto ha sido motivo de preocupación de parte de las personas encargadas de la salud, quienes han tratado de desarrollar métodos de análisis seguros y sencillos con el objeto de investigar la presencia de esta sustancia en los tejidos de los animales que han de ser consumidos por el

hombre⁽¹¹⁻¹⁴⁾⁽¹⁸⁻³¹⁾.

El presente trabajo se efectuó con el propósito de investigar residuos de dietilestilbestrol en la carne de ganado bovino consumida por la población de la ciudad de Guatemala, utilizando para ello el método de análisis recomendado por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos.

Este método se basa en la formación de un derivado del dietilestilbestrol, tipo éster, al hacerlo reaccionar con heptafluorobutirilimidazol (HFBI). Este derivado hace más sensible la detección del dietilestilbestrol para su cuantificación en el detector de captura de electrones por cromatografía de gases. El límite de detección fue de 2 microgramos de dietilestilbestrol por Kg de tejido.

3. MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron muestras de hígado de res procedentes de distintos mataderos que abastecen a la ciudad de Guatemala.

3.1 Cristalería*

Evaporador Kuderna-Danish de 250 ml
Tubo concentrador de 4 ml
Columna de destilación tipo Snyder

3.2 Equipo

Cromatógrafo de gases, equipado con detector de captura de electrones ⁶³Ni.

3.3 Reactivos

Enzima β-glucuronidasa de hígado bovino 1,000,000 U/1.82g**
Heptafluorobutirilimidazol (HFBI)***
Dietilestilbestrol (DES)****
Dietilestilbestrol monoglucurónido****

* Kontes Glass Co.
** Sigma Chemical Co.
*** Pierce Chemical Co.
**** Aldrich

Solventes (para análisis de residuos)*****
1.5% de SP-2250/1.95% de SP-2401 en supelcoport,
100-120 mallas*****

***** Mallinckrodt
***** Supelco Inc.

3.4 Procedimiento Analítico

Se utilizó el método de análisis de:

Hsu PC, Dolan TS, Ashworth RB. Gas Chromatographic Assay and Mass Spectrometric Confirmation of Diethylstilbestrol in Bovine Tissue at 200 ppt or better. Corrected September 22, 1983. Department of Agriculture Food Safety and Inspections Service Chemistry División Laboratory Branch. Washington, D.C. 20250 U.S.A.

4. RESULTADO Y DISCUSION

Se analizaron 57 muestras de hígado de res procedentes de distintos mataderos que abastecen el consumo de la ciudad de Guatemala. Ninguna de ellas presentó residuos de dietilestilbestrol (Cuadro No. 1).

Previo al análisis de las muestras se realizó una serie de ensayos con el objeto de asegurar la efectividad del análisis. Se evaluaron aspectos muy importantes tales como: resolución y reproducibilidad en el cromatograma, pruebas de recuperación y de interferencias en muestras marcadas. Durante la evaluación de estos aspectos se presentaron ciertas dificultades por lo que se hizo necesario implementar una serie de procesos (Cuadros No. 2 y 3) que resolvieron dichas dificultades.

Estos ensayos incluyeron pruebas de acción y de potencia enzimática; revisión de reactivos utilizados para formar el derivado, reactivos analíticos en general y estándares; y pruebas de ajuste de pH.

Las muestras se trabajaron por grupos (en total 16) los cuales incluyeron un blanco de reactivos, una muestra de tejido marcada con dietilestilbestrol monoglucurónido y las muestras de hígado de res recolectadas.

El conjunto de pruebas y soluciones nos llevaron a obtener recuperaciones aceptables, que variaron entre 60 y 80%.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En conclusión, ninguna de las muestras de hígado analizadas dio resultados positivos.

De acuerdo a los resultados obtenidos se considera

que la población de la ciudad de Guatemala consumió carne de res, durante el período de estudio, libre de dietilestilbestrol, esto indica que la ley que prohíbe el uso de dietilestilbestrol se cumplió en dicho período.

Se sugiere el realizar estudios con muestras de otras áreas del país, para complementar el presente trabajo, a fin de tener un panorama global de la situación. Es conveniente, además, realizar este tipo de análisis periódicamente o bien cuando el médico veterinario sospeche, a través de un examen histológico, que el animal haya sido tratado con sustancias estrogénicas. Cuando se tengan indicios de que el animal ha sido implantado y se sospecha la utilización de dietilestilbestrol, el análisis debe realizarse directamente en el tejido muscular. Si se sospecha la utilización de la sustancia por vía oral, y los órganos sexuales accesorios del animal presentan necrosamiento, el análisis debe realizarse en cualquiera de los tejidos, hígado o riñón. Si este análisis resultara positivo, debe investigarse también en músculo para su confirmación.

6. AGRADECIMIENTOS

Al INSTITUTO CENTROAMERICANO DE INVESTIGACION Y TECNOLOGIA INDUSTRIAL (ICAITI), en cuyas instalaciones se llevó a cabo la presente investigación.

El personal de la División de Análisis Pruebas y Ensayos, por su valiosa colaboración, especialmente al Lic. Fernando Mazariegos, jefe de la división; a la Licda. Julia Alicia Amado de Zeissig, asesora de la investigación; a Olga Dalila Díaz, Julio César Escobar y Rubén Alberto Fiorini.

A todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron a la realización de la presente tesis.

7. REFERENCIAS

1. Litter M. Farmacología. 6 ed. Argentina: El Ateneo, 1980. XIII + 1953 p. (p. 1242-1256).
2. Preston R L. Reduction of plasma urea-N by diethylstilbestrol in ruminants. Proc Soc Exp Biol Med 1968; 129:250-56.
3. Trenkle A. The anabolic effect of estrogens on nitrogen metabolism of growing and finishing cattle and sheep. p. 79-99 (In Lu F C, Rendel J, eds. Anabolic Agents in animal production. USA: Georg Thieme Publishers

- Stuttgart. Suppl vol V, 1976).
4. Clegg M T, Cole H H. The action of stilbestrol on the growth response in ruminants. *J Animal Sci* 1954; 13:108-130.
 5. Noller KL, Fish Cr. Diethylstilbestrol Usage: Its interesting past, important present and questionable future. *Med Clinics North Am* 1974; 58:793-810.
 6. McLachlan JA. Prenatal exposure to diethylstilbestrol in mice; Toxicological studies. *J Toxicol Environ Health* 1977; 2:527-37.
 7. Vorhers H, et al. Teratogenesis and carcinogenesis in rat offspring ethylstilbestrol. *Biochem Pharmacol* 1979; 28:1865-77.
 8. Nomura T, Masuda M. Carcinogenic and teratogenic activities of diethylstilbestrol in mice. *Life Sci* 1980; 26:1955-62.
 9. Ird EA, Smirnov IO, Byull E. Embryogenesis and early postnatal development of rats under transplacental administration of sex hormones. *Biol Med* 1980; 90:607-9.
 10. Preston RL. Biological responses to estrogen additives in meat producing cattle and lambs. *J Anim Sci* 1975; 41:1414-1430.
 11. Umberger EJ, et al. Chemical determination of diethylstilbestrol residues in the tissues of treated chickens *J Assoc Off Anal Chem* 1963; 46:471-479.
 12. Donoho AL, et al. Gas chromatographic determination of diethylstilbestrol and its glucuronide in cattle tissues *J Assoc Off Anal Chem* 1973; 56:785-92.
 13. Day EW, Jr, Vantta LE, Sieck RF. The confirmation of diethylstilbestrol residues in beef liver by gas chromatography-mass spectrometry. *J Assoc Off Anal Chem* 1975; 58:520-24.
 14. Hoffman B, Laschütza W. Radioimmunoassay for determining diethylstilbestrol in blood plasma and edible parts of cattle. *Archiv für Lebensmittelhygiene* 1980; 31:105-111.
 15. Karg H, Vogt K. Control of hormone treatment in animals and residues in meat regulatory aspects and approaches in methodology. *J Assoc Off Anal Chem* 1978; 61:1201-1208.
 16. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura. Orientaciones para el establecimiento o el fortalecimiento de programas nacionales de vigilancia de la contaminación de los alimentos. Ginebra: OMS, 1979 105 p. (p. 39).
 17. Libby JU. Meat hygiene. 4 ed. Philadelphia: Lea & Feberger 1975. XII + 658 p (p. 476-77).
 18. Donoho AL, et al. A sensitive gas chromatographic determination of diethylstilbestrol in animal feeds. *J Assoc Off Anal Chem* 1971; 54:75-79.
 19. Gearien JE, Grabowski BF. Methods of drug analysis. USA: Lea & Feberger, 1969. IX + 281 p (p. 76-77).
 20. Smith WG, McNeil EE. Simple method for routine detection of residues of diethylstilbestrol (DES) in meat contaminated at levels as low as one part per billion. *Anal Chem* 1972; 44: 1084-87.
 21. Ponder C. Fluorometric determination and thin layer chromatographic identification of diethylstilbestrol in beef liver. *J Assoc Off Anal Chem*. 1974; 57:919-923.
 22. Ponder C. Fluorometric determination of diethylstilbestrol at low levels in animal feeds. *J Assoc Off Anal Chem*. 1974; 50:987-991.
 23. Jarc H, Ruttner O, Krocza W. The determination of estrogenic substances during routine examination of animals for the residues. *Fleischwirtschaft* 1976; 56:1326-8.
 24. Ryan JJ, Pilon JC. Chemical confirmation of diethylstilbestrol residues in beef livers. *J Assoc Off Anal Chem* 1976; 59:817-820.
 25. Kohrman KA, MacGee J. Simple and rapid gas-liquid chromatographic determination of diethylstilbestrol in biological specimens. *J Assoc Off Anal Chem* 1977; 60:5-8.
 26. Hoffman B. Use of radioimmunoassay for monitoring hormonal residues in edible animal products. *J Assoc Off Anal Chem* 1978; 61:1263-73.
 27. Rumsey TS, Kozad AS. Analysis by gas-liquid and thin layer chromatography of residual (¹⁴C) diethylstilbestrol ear implants.
 28. Sphon JA. Use of mass spectrometry for confirmation of animal drug residues. *J Assoc Off Anal Chem* 1978; 61: 1247-52.
 29. Vereinfachtes. Simplified extraction and purification procedure for radioimmunological assay of diethylstilbestrol in meat, liver and kidney. *Archiv für Lebensmittelhygiene* 1980; 31: 1138-41.
 30. Moretti G, Cavina G, Pompei U. Identification of DES residues in edible animal tissues by means of mass spectrometry. *Annali dell'Inst Sup di Sanita* 1982; 16:831-35.
 31. Tirpenou AE, Kilikidis SD, Kamarianos AP. Modified method for electron capture gas-liquid chromatographic determination of diethylstilbestrol in urine of fattened bulls. *J Assoc Off Anal Chem* 1983; 66:1230-33.

CUADRO No. 1
RESULTADOS DE RECUPERACIONES

MUESTRAS	GRUPO DE TRABAJO	RESULTADO	% RECUPERACION	OBSERVACIONES
IV - 1	A	-		
IV - 2	A	-		
IV - 3	A	-		
TESTIGO MARCADO	A	+	60	contaminado con 0.2 µg-DES/kg-muestra
I - 1	B	-		
II - 1	B	-		
IV - 4	B	-		
IV - 5	B	-		
IV - 6	B	-		
IV - 7	B	-		
IV - 8	B	-		
TESTIGO MARCADO	B	+	60	contaminado con 0.2 µg-DES/Kg-muestra
IV - 9	C	-		
IV - 10	C	-		
IV - 11	C	-		
IV - 12	C	-		
IV - 13	C	-		
IV - 14	C	-		
TESTIGO MARCADO	C	+	60	contaminado con 0.2 µg-DES/Kg-muestra
I - 2	D	-		
TESTIGO MARCADO	D	+	50	contaminado con 0.2 µg-DES/Kg-muestra
I - 3	E	-		
III - 1	E	-		
TESTIGO MARCADO	E	+	50	contaminado con 0.2 µg-DES/Kg-muestra
III - 2	F	-		
II - 2	F	-		
TESTIGO MARCADO	F	+	60	contaminado con 0.2 µg-DES/Kg-muestra
III - 5	G	-		
III - 3	G	-		
II - 3	G	-		
TESTIGO MARCADO	G	+	50	contaminado con 2 µg-DES/Kg-muestra
II - 4	H	-		
III - 4	H	-		
I - 4	H	-		
TESTIGO MARCADO	H	+	50	contaminado con 2 µg-DES/Kg-muestra
II - 5	I	-		
IV - 15	I	-		
IV - 16	I	-		
IV - 17	I	-		
TESTIGO MARCADO	I	+	82	contaminado con 2 µg-DES/Kg-muestra

MUESTRAS	GRUPO DE TRABAJO	RESULTADO	% RECUPERACION	OBSERVACIONES
V - 1	J	-		
V - 2	J	-		
IV - 17	J	-		
TESTIGO MARCADO	J	+	82	contaminado con 2 $\mu\text{g-DES/Kg-muestra}$
V - 3	K	-		
V - 4	K	-		
V - 5	K	-		
V - 6	K	-		
V - 7	K	-		
TESTIGO MARCADO	K	+	76	contaminado con 2 $\mu\text{g-DES/Kg-muestra}$
V - 8	L	+		
VI - 1	L	-		
VI - 2	L	-		
TESTIGO MARCADO	L	+	77	contaminado con 2 $\mu\text{g-DES/Kg-muestra}$
V - 9	M	-		
VI - 3	M	-		
VI - 4	M	-		
TESTIGO MARCADO	M	+	91	contaminado con 2 $\mu\text{g-DES/Kg-muestra}$
V - 10	N	-		
VI - 5	N	-		
VI - 6	N	-		
TESTIGO MARCADO	N	+	48	contaminado con 2 $\mu\text{g-DES/Kg-muestra}$
V - 11	O	-		
V - 12	O	-		
V - 13	O	-		
TESTIGO MARCADO	O	+	76	contaminado con 2 $\mu\text{g-DES/Kg-muestra}$
VI - 7	P	-		
VI - 8	P	-		
VI - 9	P	-		
VI - 10	P	-		
VI - 11	P	-		
VI - 12	P	-		
TESTIGO MARCADO	P	+	88	contaminado con 2 $\mu\text{g-DES/Kg-muestra}$

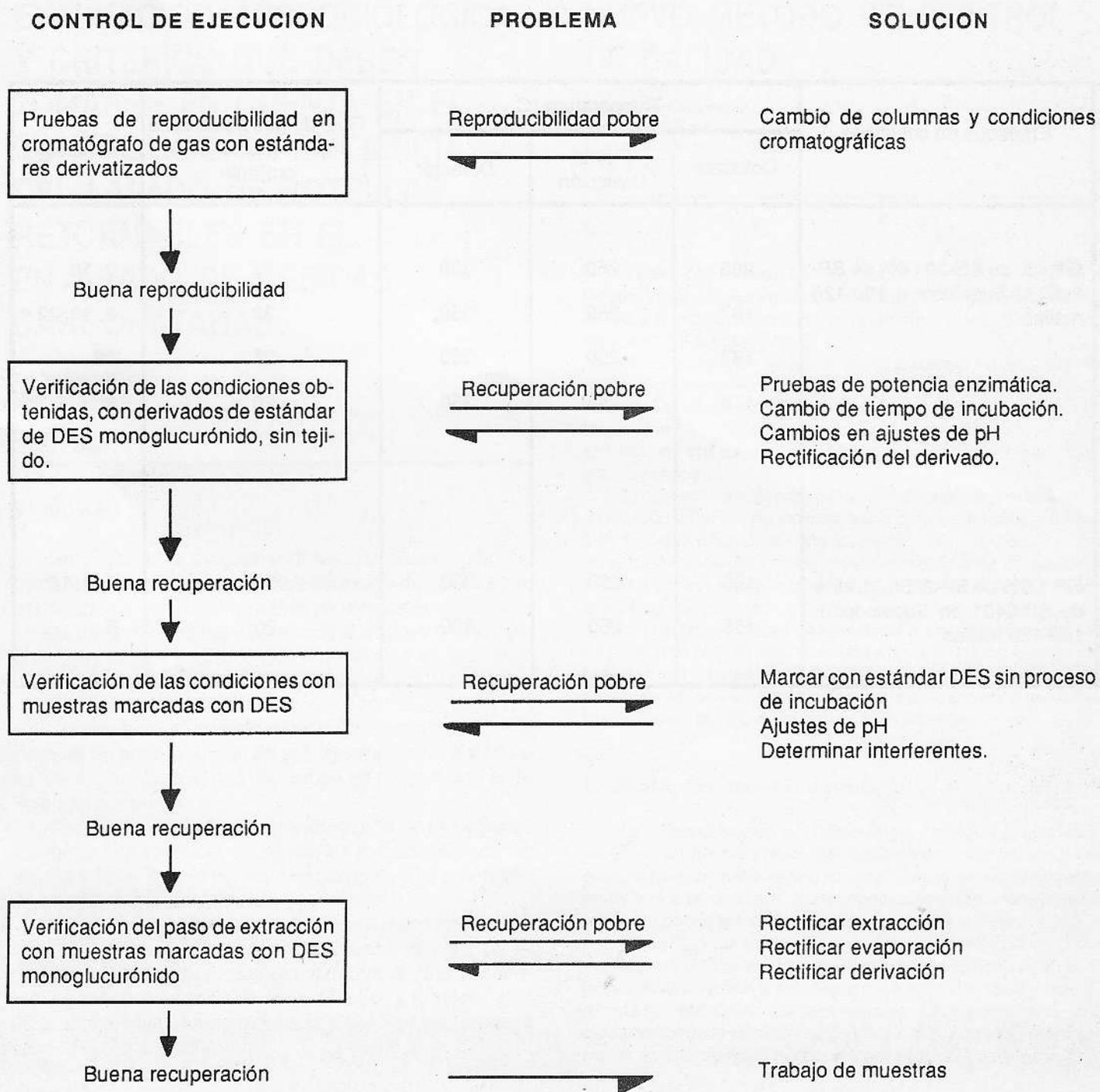
NOTA:

Las muestras son identificadas de la forma siguiente:

Ejemplo: IV - 1 A

- IV = Origen de la muestra
1 = Número de la muestra
A = Grupo de trabajo

CUADRO No. 2

FLUJOGRAMA DE SELECCION DE SOLUCIONES
SEGUN LOS PROBLEMAS ENCONTRADOS

CUADRO No. 3

DIFERENTES CONDICIONES DE OPERACION ENSAYADAS

Empaque de columnas	Temperatura °C			Flujo de gas de arrastre Argón-Metano (95/5) cm ³ /min	Atenuación
	Columna	Puerta Inyección	Detector		
GP 4% de SE-30 / 6% de SP-2401 en Supelcoport, 100-120 mallas	203	250	350	12	8, 16
	187	250	350	30	8, 16, 32
	187	250	350	21	16
	175	250	350	20	8
GP 1.5% de SP-2250 / 1.95% de SP-2401 en Supelcoport, 100-120 mallas	165	250	350	20	4, 8, 16
	155	250	350	20	8