

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**LA DETERMINACION DE ESTRADIOL EN CARNE
PROVENIENTE DEL SACRIFICIO DE LOS TOROS
DE LIDIA**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

PRESENTA

ANGEL RAMIREZ GARCIA

ASESOR: M.V.Z. MIGUEL CARVAJAL SORIA

GUADALAJARA, JALISCO, 1986

A MI PADRE:

Domingo Ramírez Perez

A MI MADRE:

Carlota Garcia Ortiz

A MIS HERMANOS:

Basilio

Maria

Florencio

Petra

Isidro

Rosa

Rodolfo

Domingo

Modesto

A MI ESPOSA:

Socorro Monroy León

A MI HIJO:

José Domingo

A MI ASESOR:

M.V.Z. Miguel Carbajal Soria.

Por su colaboración en el
presente trabajo.

A MI JURADO:

M.V.Z. Ruben Anguiano Estrella

M.V.Z. Juan Manuel Carrillo Garcia

M.V.Z. Javier Ricardo Lomelí Altamirano

M.V.Z. Rafael Alfonso Valencia Castro

M.V.Z. Jorge Hernandez Gobora

Y a todas aquellas personas que con su ayuda me fue posible
ver la cumbre de mi carrera.

I N D I C E:

INTRODUCCION	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	6
HIPOTESIS	7
OBJETIVOS	8
MATERIAL	9
METODO	13
RESULTADOS	24
RESUMEN	28
DISCUSION	29
CONCLUSIONES	30
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	31

LA DETERMINACION DE ESTRADIOL
EN CARNE PROVENIENTE DEL
SACRIFICIO DE LOS
TOROS DE LIDIA

I N T R O D U C C I O N

El toro, como todas las formas vivas actuales, es la -- resultante de una larga evolución filogenética a través de -- las épocas geológicas más dilatadas, durante las cuales han -- ejercido su máxima acción modeladora sobre la materia viva -- todas las fuerzas naturales que la geología y la biología -- en grado potencial en el acto sublime de la Creación. (5).

La palcontología, leyendo en restos fósiles encontrados en los estratos de la corteza terrestre, hace creer que los -- seres vivos de cada formación geológica son tanto más análo -- gos a los actuales cuanto más modernos son aquéllos.

De este modo, y según los más modernos estudios paleon -- tológicos relacionados con el origen de los bóvinos, tiene -- el género Bos, entre sus ascendientes desaparecidos, numero -- sas formas ancestrales, como el Bos longifrons o brachyce -- ros, el B. primigenius, el B. frontosus, etc., que se remo -- tan hasta el mencionado Anoplotherium, considerado como ori -- gen común o entronque de todos los artiodáctilos, tanto mo -- nogásticos como poligásticos, puesto que su organización -- presentaba marcada semejanza lo mismo con los unos que con -- los otros. (9).

Hay, sin embargo, quien no admite otros ascendientes -- de todas las razas actuales de toros que el uro o toro sal -- vaje del periodo neolítico y que ha subsistido en algunos -- países hasta el siglo XVII. Las demás especies del género -- Bos serían razas o subespecies del Bos taurus primigenius. -- (5) (9).

En área geográfica del uro se extendía desde el oeste -

de Europa (España, Inglaterra, etc.) hasta la china, y dada tan amplia área pudo muy bien ser domesticado en varios lugares independientemente, si bien lo sería probablemente en Asia, como casi todos los demás animales que el hombre utiliza en su servicio. (5).

Del uro derivan todas las razas de toros existentes, y no del bisonte de Europa, cuyos restos encontramos tan abundantemente en las habitaciones del hombre troglodita. Teniendo, pues, un origen común nada deben extrañarnos las analogías existentes entre los toros que en estado semisalvaje se encuentran en distintas regiones.

Los Faraones criaban toros en el país del Nilo para dedicarlos a la pelea, y tales animales eran precisamente el tipo braquicéfalo, como los suizos de que hablamos. (5).

Los árabes debieron difundir esta raza taurina por el norte de Africa y por España, de donde pasara a Suiza. Posee esta raza acentuado instinto combativo, y ella sería, según estas investigaciones, la precursora de las nuestras de lidia.

La raza escocesa es muy peluda y de largos cuernos, y ha servido de modelo para que los pintores ingleses dibujen estampas taurinas con toros que los españoles no reconocemos como nuestros.

Los celtas dieron nombre al toro salvaje que encontraron en Europa, al que llamaron auroch, palabra formada de las dos aur y och, que significa salvaje y toro, no confundiendo desde luego con el bisonte de Europa, como después lo han hecho muchos naturalistas; pues ya vemos tal diferenciación en las pinturas rupestres, en las que claramente se perciben las dos siluetas inconfundibles de ambos rumiantes,

puesto que, como decimos, han sido confundidas ambas especies, haremos una ligera descripción de cada una de ellas.

Los bisontes son animales bien caracterizados por tener 14 pares de costillas, mientras que los bueyes sólo tienen 13. Tienen abundante pelo, que forma en el tercio anterior una gran melena que cae sobre cuernos y ojos, mucho más abundante en el bisonte americano que en el europeo; su cabeza es ancha y más convexa y pesada que en el toro, con fuerte musculatura sobre la cerviz, que forma una ligera joroba en el bisonte europeo y una muy desarrollada en el americano. Los cuernos del bisonte son más pequeños y arqueados y finos que en el toro, ha desaparecido casi totalmente la especie europea, durante la gran guerra, de los bosques de Lituania y del Cáucaso, en donde, por lo visto, existían los últimos ejemplares.

El auroch era un animal tan grande como el bisonte y -- mucho más que el toro actual, pues alcanzaba una talla de -- 1.85 metros de altura a la cruz; su cola era más larga y peluda que la del bisonte; carecía de joroba, y sus cuernos -- eran mucho más desarrollados y más potentes que los del bisonte.

El uro no tenía el cuerpo cubierto de tan abundante pelo como el bisonte, ni formaba melena, ni era erizado en la primera mitad de su línea dorsal, ni se presentaba colgante sobre la papada. Cuéntase que fué muerto el último hallado en el bosque de Jaktorowka (Polonia) en el año 1630 (5).

REVISION LITERARIA.

Los estrógenos son biológicamente inactivos en dosis -- pequeñas, pero como muchas otras sustancias, pueden ocasionar efectos indeseables en grandes dosis. Entre los efectos tóxicos de los estrógenos están el incremento en la retención de agua, hemorragias uterinas, mastodinia, agravación de fibroides uterinas, mastitis quística crónica, migraña y el riesgo de tromflebitis. Con dosis grandes administradas por períodos prolongados se puede provocar cáncer en cepas de ratones susceptibles. En la mujer la administración de -- anticonceptivos, por largo tiempo o como terapia de reemplazo en menopausia u ovariectomía no incrementa el cáncer mamario. Herbert, Unfelder y Poskanzor. (7).

Los toros por su temperamento y forma de ser sacrificados en la plaza, son expuestos a factores estresantes que -- originan un aumento de secreción de las hormonas adrenales, en la fase inicial de la alarma las secreciones de las glándulas suprarrenales se activa y la secreción queda bajo control del sistema nervioso central. El hipotálamo se estimula por el estress, e induce a la liberación de corticotropina -- que conduce a la secreción de ACTH en la hipófisis, ésta a -- la vez provoca la biosíntesis de esteroides suprarrenales -- entre ellos los estrógenos con la ayuda del 3'5' AMP cíclico (4 - 10).

La F.D.A., en los Estados Unidos de Norteamérica tolera como residuo en los tejidos animales comestibles hasta -- una parte por billón de estrógenos (1 ppb) (6). Existen de 15,000 a 65,000 sitios receptores de las células blanco -- capaces de reaccionar con sustancias hormonalmente activas. --

Cada receptor conjuga hasta cinco moléculas. En la actualidad es posible detectar residuos estrogénicos en los tejidos comestibles de los animales muy inferiores al umbral capaz de producir una respuesta biológica (6), existe evidencia de que cada receptor necesita una o dos moléculas, por tanto se necesitan entre 5,000 y 100 millones de moléculas por célula para producir una respuesta fisiológica.

En los hígados de bovinos conteniendo ilegalmente 2 --- ppb. de estrógenos se encuentran 8.4×10^{12} moléculas. Al -- comer hígado del animal se absorbe en intestino el 3% o sea, 2.5×10^{11} moléculas, cada célula recibiría aproximadamente 4 moléculas de estrógenos muy inferior a las 5,000 a 100 millones necesarios para que sea una respuesta fisiológica.

La dosis mínima para provocar una respuesta fisiológica por los estrógenos es de 100 microgramos ó 2.2×10^{17} moléculas. La evidencia indica que con las dosis altas de residuos de estrógenos calculados anteriormente no existe peligro en el humano. (6).

Sin embargo Delane (6), menciona que "sólo es necesario una molécula de estrógeno en el sitio y momento para causar un cambio en el genoma celular y producir cáncer". De -- acuerdo a esto, las cantidades ínfimas de estrógenos encontrados en los tejidos animales comestibles bastaría para provocar cáncer.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente no hay duda en que el metabolismo que se -- realiza a nivel del cerebro es afectado por la alimentación -- ya que se sabe que por lo menos 3 clases de neurotransmisores (serotoninas, acetilcolinas y catecolaminas) son influenciadas por la dieta.

En la actualidad, es posible a través del (R.I.A.) y de otros métodos bioquímicos, (cromatografía en capa delgada) - investigar y cuantificar ciertos mediadores bioquímicos cuya cantidad puede ser incrementada en la carne por las situaciones de "stress" verificadas en los mataderos antes del -- sacrificio. Unas tras otras pueden desencadenar en el consumidor perturbaciones indeseadas (muy dependientes de la sensibilidad individual) y pueden indicar la necesidad de nuevos sistemas de preparación así como de la matanza de los -- animales.

H I P O T E S I S :

Las cantidades de estradiol pueden ser aumentadas por -
el "stress" producido en el sacrificio de los animales

O B J E T I V O S

1.- Determinar las cantidades de estradiol en carne de los toros de lidia, de las diferentes ganaderias, sacrificados en la plaza de toros de la Ciudad de Guadalajara, Jal.,

2.- Comparar las cantidades de estradiol en carne de los toros de lidia, con las del ganado de abasto (1).

M A T E R I A L

REACTIVOS.- Las cantidades de reactivos que se indican son suficientes para llevar a cabo un análisis completo por duplicado.

- 1.- Cloruro de metileno. Dos litros. Se filtra con gel de sílice antes de usar.
- 2.- Cloroformo. Cuatro litros. Debe de redestilarse con CO_3K_2 anhidro.
- 3.- Alcohol metílico absoluto. Cinco litros y medio. Redestílese con CO_3K_2 anhidro.
- 4.- Acetato de etilo. Un litro. Redestílese con CO_3K_2 anhidro.
- 5.- Tolueno. Ocho litros y medio. Redestílese con CO_3K_2 anhidro.
- 6.- Acetona. Doscientos ml. Redestílese con CO_3K_2 anhidro.
- 7.- Hexano. Quinientos ml. Redestílese con CO_3K_2 anhidro.
- 8.- Formamida. Trescientos ml. Redestílese con CO_3K_2 anhidro.
- 9.- Alcohol etílico absoluto. Doscientos ml.

- 10.- Alcohol etílico de 80° (v/v) Cien ml.
- 11.- Patrón de estradiol. Se disuelven 25 mg. de estradiol - en 25 ml. de alcohol etílico absoluto. Esta solución -- contiene 1 mg/ml.
- 12.- Azul de tetrazol. Se disuelven 24 mg. de colorante azul de tetrazol en 200 ml. de agua destilada.
- 13.- Hidróxido de sodio 0.1 N Doscientos ml.
- 14.- Hidróxido de sodio 1 N. Doscientos ml.
- 15.- Hidróxido de sodio 2 N. Doscientos ml.
- 15.- Acido acético 6 N. Quince ml.
- 17.- Formol al 37%. Cinco ml.
- 18.- Acido clorhídrico concentrado. Diez ml.
- 19.- Nitrógeno químicamente puro. Un cilindro.

EQUIPO:

- 1.- Cámaras cromatográficas. Redondas (30 de diámetro por 60 de altura) con accesorios para disolvente en cromatografía descendente; recipientes de vidrio (de 25 cm. de -- diámetro por 7.5 de altura) para la fase estacionaria - y recipientes rectangulares bajos. Se requieren dos jue-

gos.

- 2.- Lámpara de luz ultravioleta. (Longitud de onda larga).
Una.
- 3.- Baño de agua a 37°C. Uno.
- 4.- Placas de silica gel F. Treinta hojas de 46.3 por 56.5 -
cm. (30 hojas).
- 5.- Estufa secadora a 80°C. Una.

CRISTALERIA:

- 1.- Frasco de vidrio color ámbar de 3.75 litros. Uno.
- 2.- Agitador mecánico. Uno.
- 3.- Embudos de decantación.

4,000 ml. - dos
3,000 ml. - dos
2,000 ml. - dos
1,000 ml. - dos
500 ml. - dos
200 ml. - cuatro

4.- Balones.

- 1,000 ml. - dos
200 ml. - dos

100 ml. - dos
25 ml. - cuatro.

5.- Frasco Erlenmeyer con tapón de vidrio.

500 ml. - dos
250 ml. - dos
100 ml. - dos

6.- Probetas con tapón de vidrio.

100 ml. - dos
50 ml. - cuatro.

7.- Probetas comunes.

1,000 ml. - dos.

8.- Micropipetas calibradas.

100 microlitros - dos
50 microlitros - cuatro
25 microlitros - ocho
5 microlitros - seis
4 microlitros - dos
2 microlitros - dos
1 microlitro - dos.

M E T O D O.

Para el presente trabajo, se tomaron un número de 30 --- muestras de carne, de la parte de la pierna de los toros sacrificados en la plaza.

El peso de los toros fluctua entre los 400-500 Kg.

Muestras que se tomaron de varias corridas, para analizar de varias ganaderías.

Una vez sacrificado el animal, eviscerado, se tomaron -- las muestras, en seguida se trasladaron en refrigeración al laboratorio de análisis biomédicos y toxicológicos ubicado - en la calle Colón # 767 interior 207, Sector Hidalgo, Guadalajara, Jalisco.

Algunas etapas fueron trabajadas en el área de investigación en el Laboratorio de bioquímica de la Facultad de Medicina de la U. de G. que fueron sometidas al siguiente estudio:

- Determinación de estradiol, por el método de cromatografía en capa delgada.

El estradiol y otros esteroides cárnicos se someten a - hidrólisis ácida y después se extraen con cloruro de metileno. El estradiol se separa de los otros esteroides mediante tres fraccionamientos cromatográficos. El primer sistema --- cromatográfico separa el estradiol y otros esteroides " C_{21} " del material extraño existente en el extracto de cloruro de metileno. El segundo sistema cromatográfico separa el estradiol del cortisol y sus derivados. El tercer sistema cromatográfico aísla el estradiol y permite su determinación semicuantitativa, comparando la fluorescencia del estradiol en - el tercer cromatograma con la fluorescencia de patrones de - estradiol.

PROCEDIMIENTO:

Se recoge un gramo de macerado de carne de las muestras tomadas en un frasco de 3.75 litros de boca ancha y de color marrón, al cual se agregaron precisamente 15 ml. de ácido acético 6 N y 5 ml. de formol. Se ajusta el pH de la carne a 1.0-1.5 con el HCL concentrado.

Con el objeto de que se lleve a cabo la hidrólisis de los esteroides conjugados, se deja la muestra en reposo 24 horas a temperatura ambiente.

Se mide el volumen de la carne en una probeta graduada y se separan dos porciones de 1000 ml. cada una para el análisis. (Todas las determinaciones se hacen por duplicado. Cada porción se pasa a un embudo de decantación de 2000 ml.

Se agregan a cada embudo de decantación de 150 ml. de cloruro de metileno y se mezcla por toración durante un minuto. Se deja en reposo 10 minutos para que se separen las fases, se pasa después la capa inferior de cloruro de metileno a un embudo de decantación de 1000 ml. y se desecha el residuo cárnico.

Siguiendo la misma técnica se extrae la carne con 3 porciones de 150 ml. de cloruro de metileno.

Se reúnen los extractos de cloruro de metileno en el embudo de decantación de 1000 ml. y se desecha el residuo cárnico.

Los extractos mezclados de cloruro de metileno se lavan con 60 ml. de NaOH 0.1 N fría, y se aspira la solución de NaOH sobrenadante a un embudo de decantación de 500 ml.

De manera similar, se lavan los extractos mezclados de cloruro de metileno con 3 porciones de 60 ml. de agua desti-

lada. Los líquidos de lavado acuoso se aspiran al embudo de decantación a 500 ml.

Se procede ahora a extraer la mezcla de NaOH con los líquidos de lavado acuosos, empleando 60 ml. de cloruro de metileno. El extracto de cloruro de metileno obtenido se agrega a la mezcla de extractos de cloruro de metileno obtenidos previamente y se desecha el residuo acuoso.

Se filtran el extracto de cloruro de metileno con un papel de filtro previamente lavado con disolvente, en un balón de 1000 ml. Se coloca el balón en baño de agua 37°C y se evapora el contenido mediante corriente de nitrógeno, hasta un volumen de 5 ml. aproximadamente.

Se transfiere el residuo de la evaporación, junto con dos lavados con 5 ml. de cloruro de metileno y dos lavados con 5 ml. de alcohol etílico absoluto, a un balón de 25 ml.

Se evapora a sequedad el contenido de este balón en un baño de agua a 37°C , mediante una corriente de nitrógeno.

PRIMER FRACCIONAMIENTO CROMATOGRÁFICO

a) Preparación de la cámara cromatográfica.

Se recubre el interior de la cámara con una doble capa de placas silica gel F.

En un embudo de decantación de 3,000 ml. se colocan -- 1800 ml. de cloroformo, 200 ml. de hexano, 100 ml. de formamida y 100 ml. de agua destilada. Se mezcla enérgicamente -- varios minutos y se deja en reposo otros 10 minutos para que se separen las fases.

Se pasan unos 200 ml. de la capa inferior de hexano y cloroformo a un Erlenmeyer con tapón de vidrio, y se guardan para su uso posterior.

El resto de la capa inferior de hexano y cloroformo se vierte por el papel de filtro que recubre la cámara cromatográfica. Se tapa ésta herméticamente y se deja en reposo total por lo menos dos días.

b) Cromatografía. Placas silica Gel F.

Mediante micropipetas se aplican 25 microlitros de las soluciones patrones de cortisona y estradiol en las líneas - de partida de cada canal lateral de la hoja cromatográfica.

Se colocan 100 microlitros de una mezcla 1:1:1 de cloroformo, acetato de etilo y alcohol metílico en el balón de 25 ml. que contiene el residuo de esteroides, procediendo a su disolución por rotación suave. Con una micropipeta se --- aplica cuantitativamente la solución así obtenida, el cromatograma, haciendo una angosta banda a lo largo de la línea - de partida.

Se pasan porciones de 50 microlitros de la mezcla de -- cloroformo, acetato de etilo y alcohol metílico al balón, -- para disolver esteroides residuales, y se aplican después a la línea de partida del cromatograma. Generalmente hasta 2 - ó 3 porciones para la transferencia cuantitativa de los es-- teroides.

Se colocan en cromatograma en la cámara cromatográfica, llenando inmediatamente el recipiente de disolvente con la mezcla de hexano y cloroformo saturada con formamida y agua, que había sido reservada tal como se indicara en a, "Preparación del recipiente cromatográfico". Se deja llevar a cabo la migración cromatográfica durante 3 horas.

Se retira el cromatograma de la cámara cromatográfica, y se suspende de una varilla de vidrio mediante broches. Se necesitan unos 10 minutos para que se evaporen los disolventes.

Se corta cuidadosamente el canal central del cromatograma, reservándolo para la elución de los esteroides. Las porciones remanentes se depositan sobre una lámina de vidrio.

Se colocan 15 ml. de la solución de azul de tetrazol en una probeta de 50 ml. con tapón de vidrio y se diluye 30 ml. con NaOH 2N; se vierte cuidadosamente en seguida esta solución alcalina sobre el cromatograma, para que los canales laterales queden uniformemente saturados con el colorante. Así aparecen inmediatamente las manchas azules correspondientes a la cortisona (compuesto E) y al estradiol (compuesto f); se procede entonces a medir las distancias a que ha migrado cada componente desde las líneas de partida. Se deja secar después el cromatograma a temperatura ambiente.

Del canal central del primer cromatograma se corta un fragmento del cromatograma que comprenda desde unos 5 cm. por debajo del centro de la mancha "F", hasta 7.5 por debajo del centro de la mancha "E". Se pliega y se coloca en un franco de 100 ml. con tapón de vidrio. Se agregan 30 ml. de alcohol etílico de 80° y se agita suavemente con un agitador mecánico durante una hora, decantando después el alcohol etílico en un embudo de decantación de 200 ml.

Se pasan 60 ml. de cloruro de metileno al frasco con tapón de vidrio que contiene todavía el fragmento del cromatograma, se agita 5 minutos y se decanta el cloruro de metileno al embudo de decantación de 200 ml. Se repite una vez más este proceso de extracción con 60 ml. de cloruro de metileno los cuales también se pasan al embudo de decantación. Se agita el embudo de decantación de 200 ml. durante un minuto, y se deja en reposo 10 minutos para que se separen las fases. Se filtran después la capa inferior de cloruro de metileno con papel de filtro (previamente lavado con disolvente), pasándola a un balón de 200 ml. Se extrae la fase alcohólica que queda en el embudo de decantación, con 10 ml. de cloruro de metileno. Este extracto de cloruro de metileno se filtra al balón. Se coloca el balón en un baño de agua a 37°C y se evapora el contenido mediante corriente de nitrógeno, hasta reducir el volumen a unos 5 ml. Este residuo se transfiere, junto con dos lavados de 5 ml. cada uno de cloruro de metileno y dos porciones de alcohol etílico absoluto, a otro balón de 25 ml.

Se evapora el contenido a sequedad a 37°C, mediante corriente de nitrógeno. Si quedan huellas de formamida, habrá que calentar al vacío por un breve período, a 50 o 55°C. Este calentamiento deberá ser lo más corto posible.

SEGUNDO FRACCIONAMIENTO CROMATOGRÁFICO:

a). Preparación de la cámara cromatográfica.

Se recubre la cámara cromatográfica con una doble capa de placas silica gel F.

En un embudo de decantación de 4000 ml. se colocan 2000

ml. de tolueno, 1400 ml. de alcohol metílico y 600 ml. de agua destilada. Se mezcla enérgicamente varios minutos y se deja en reposo 10 minutos para que se separen las fases.

Se transfieren unos 500 ml. de la capa inferior del alcohol metílico a un Erlenmeyer con tapón de vidrio y se reservan para su utilización posterior.

El resto de la capa de alcohol metílico se coloca en un recipiente redondo para museo, el cual se deposita en el fondo de la cámara cromatográfica. Se transfieren unos 200 ml. de la capa sobrenadante de tolueno a un erlenmeyer con tapón de vidrio y se reservan para su utilización posterior.

El resto de la capa de tolueno se vierte cuidadosamente sobre el papel de filtro que recubre la cámara cromatográfica, la cual se cierra después herméticamente, dejándola así por lo menos dos días.

b) Cromatografía.-

Se pasan unos 25 ml. de la capa estacionaria del alcohol metílico a una cápsula baja y cuadrada y se sumerge la hoja de papel en la fase alcohólica cuidando de que se impregne uniformemente y se suspende después con broches de una varilla de vidrio. La fase se evapora parcialmente en unos 10 minutos.

Mediante micropipetas se aplican 25 microlitros de los patrones de cortisona y estradiol en la línea de partida de cada canal lateral de la hoja cromatográfica.

Se colocan 100 microlitros de la mezcla de cloroformo, acetato de etilo y alcohol metílico (1:1:1), en el balón de 25 ml. que contiene el residuo de esteroides, y se hace rotar cuidadosamente el balón para que el residuo se disuel-

va en el disolvente. Mediante una micropipeta se aplica cuantitativamente esta solución de esteroides en la línea de --- partida del segundo cromatograma, empleando la misma técnica indicada para el primer cromatograma.

Se coloca el cromatograma en la cámara cromatográfica y se deja equilibrar durante 30 minutos.

Se llena después el recipiente del solvente con tolueno (fase móvil) y se deja llevar a cabo la migración cromatográfica durante 6 horas.

Se saca el cromatograma, se corta el canal central y se colorean los canales laterales con tetrazol, tal como se describió para el primer cromatograma. Se corta un fragmento de papel de filtro del canal central que vaya desde 2.5 cm. por debajo del centro de la mancha "F" hasta 2.5 cm. por debajo del centro de la mancha "E", y se coloca en un frasco de 100 ml. con tapón de vidrio.

Se pasan 30 ml. de alcohol etílico absoluto al frasco con tapón de vidrio y se agita suavemente con un agitador mecánico durante una hora. Después se decanta el alcohol etílico a un balón de 100 ml. Se repite esta elución de los esteroides con otra porción de 30 ml. de alcohol etílico absoluto, que se reúne después con la primera en el balón de 100 ml.

Se procede a evaporar el contenido del balón hasta 5 -- ml. en baño de agua a 37°C y en corriente del nitrógeno; se transfiere el residuo, con lavados repetidos de alcohol etílico, a otro balón de 25 ml. y finalmente se evapora el contenido de éste a sequedad.

TERCER FRACCIONAMIENTO CROMATOGRÁFICO

a) Preparación de la cámara cromatográfica.

Se recubre el recipiente cromatográfico con una doble -- capa de placas de silico gel F, tal como se ha descrito anteriormente.

En un embudo de decantación de 4000 ml. se colocan 1000 ml. de agua destilada, 1000 ml. de alcohol metílico absoluto, 1800 ml. de tolueno y 200 ml. de acetato de etilo. Se mezcla y se dejan separar las fases tal como se indicó para el segundo fraccionamiento.

Se transfieren unos 500 ml. de la capa inferior de alcohol metílico a un Erlenmeyer con tapón de vidrio y se reservan para su utilización posterior. El resto de la fase de alcohol metílico se pasa a un frasco redondo para museo, que se deposita en el fondo de la cámara cromatográfica.

Se pasan unos 200 ml. de la fase sobrenadante de tolueno y acetato de etilo a un erlenmeyer con tapón de vidrio y se conservan para su utilización posterior. Se vierte el remanente de la fase sobrenadante de tolueno y acetato de etilo sobre el papel de filtro que recubre el interior de la -- cámara cromatográfica, se cierra ésta herméticamente y se la deja en reposo por lo menos dos días.

b) Cromatografía.-

Se corta una hoja de placa silica gel F. de acuerdo con las dimensiones señaladas en la figura.

Utilizando micropipetas, se aplican 25 microlitros de las dos soluciones patrón al cromatograma, tal como indica la figura. Los dos patrones son útiles como localizadores para la coloración con tetrazol. En los puntos marcados 1,2, 4 y 5 F, se aplican, respectivamente, 1,2,4 y 5 microgramos de compuesto F, que servirán como patrones para comparar la fluorescencia.

Se colocan 80 microlitros de la mezcla de cloroformo, acetato de etilo y alcohol metílico (1:1:1) en el balón que contiene el residuo de esteroides, y se hace rotar cuidadosamente el balón hasta que se completa la disolución. Con micropipetas, se aplican 5.25 y 50 microlitros del extracto de esteroides en los puntos del cromatograma marcados "1/16 A", "5/16 A", respectivamente. Es necesario actuar con rapidez para evitar las pérdidas de extracto de esteroides, por evaporación. Estos puntos corresponden a 1/16, 5/16, y 10/16, aproximadamente, del volumen total de 80 microlitros.

Se coloca el cromatograma en la cámara cromatográfica y se deja equilibrar durante 60 minutos.

Se llena el recipiente de solvente con la fase móvil de tolueno y acetato de etilo, y se deja llevar a cabo la migración cromatográfica durante 5 horas.

Se saca el cromatograma a temperatura ambiente.

Se colocan 50 ml. de solución de tetrazol en una probeta de 100 ml. con tapón de vidrio y se diluye hasta 100 ml. con NaOH 1 N.

Se vierte en seguida la solución de alcalina de tetra--

zol en un recipiente cuadrado y bajo.

Se une la parte superior del papel cromatográfico mediante broches a una varilla de vidrio, y se sumerge cuidadosamente en la solución de tetrazol impregnándolo uniformemente.

Se suspende el cromatograma en la estufa a 80°C, durante unos 6 minutos, hasta que el papel justo acabe de secarse.

Se observa inmediatamente el cromatograma con luz ultravioleta para la valoración de los puntos fluorescentes amarillos. Mediante comparación con los puntos del patrón "F", se calcula semicuantitativamente el estradiol en las alícuotas 1/16, 5/16 y 10/16, y se deduce así el contenido total de estradiol por gramo de carne.

Para hacer la determinación cuantitativa del estradiol se hizo un raspado de la mancha formada en el cromatograma, disolviéndose en cloruro de metileno, se centrifugó, se decantó y se hizo un barrido en un espectrofotómetro UV-240 de la marca SHIMADZU.

- Testigo.- 2 ml. cloruro de metileno.
- Patrón.- 10 pg. de estradiol diluido en 2 ml. de cloruro de metileno.
- Problema.- Aforado a 2 ml.

Cálculo:

D.O. Muestra

————— x concentración del patrón = pg./g.

D.O. Patrón.

R E S U L T A D O S :

Las muestras fueron tomadas de los toros de lidia, sacrificados en la plaza de toros Nuevo Progreso.

Muestras que fueron tomadas de varias corridas y de distintas ganaderías.

Todas estas presentaron valores de estradiol superiores a los normales descritos por los investigadores Correia-A.A. Díaz, Graca F. Da. 1979 (4).

VALORES DE ESTRADIOL ENCONTRADOS EN CARNE DE LOS TOROS-
DE LIDIA EN PICOGRAMOS POR GRAMO DE CARNE.

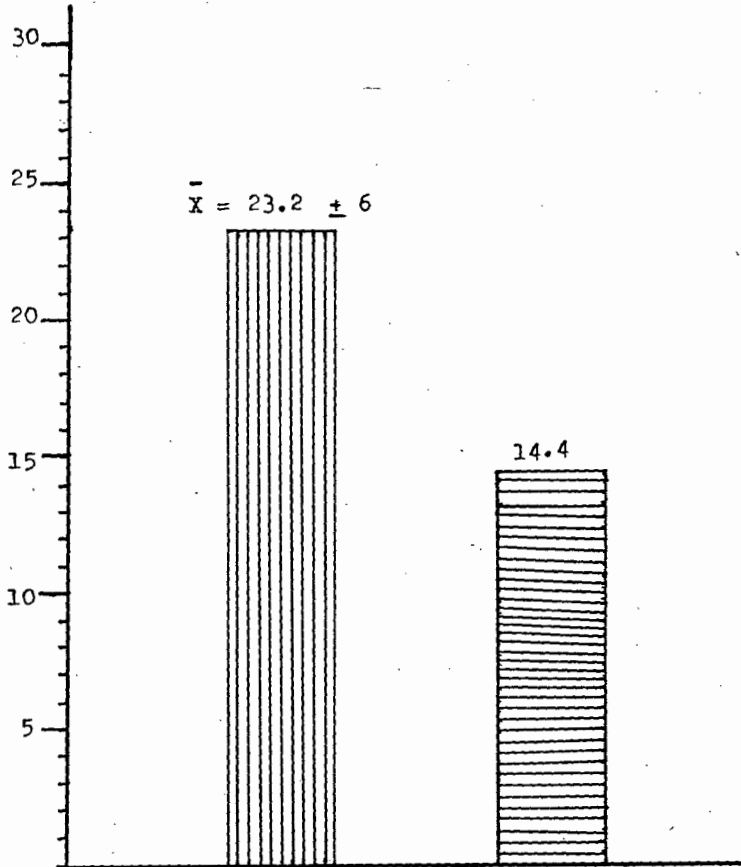
(1Pg.= .000000001 gr.)

MUESTRA.	Pg./gr. DE CARNE
1	24
2	23
3	19
4	19
5	18
6	19
7	18
8	30
9	29
10	19
11	21
12	24
13	24
14	18
15	18

MUESTRAS.	Pg./gr. DE CARNE.
16	18
17	30
18	22
19	24
20	28
21	26
22	19
23	22
24	18
25	24
26	30
27	28
28	30
29	26
30	28

TOTAL 30 MUESTRAS.

GRAFICA QUE MUESTRA LOS NIVELES DE ESTRADIOL EN Pg./gr. DE CARNE COMPARADOS CON LOS NORMALES.



VALORES ENCONTRADOS DE LOS TOROS SACRIFICADOS EN LA PLAZA NUEVO PROGRESO.



VALORES DESCRITOS COMO NORMALES POR LOS INVESTIGADORES Correia A.A., Graca F. Da. (4).

R E S U M E N.

En el presente trabajo realizado en carne de los toros de lidia (pierna). Se obtuvieron resultados superiores de estradiol en pg./gr. de carne, comparados con los normales - que establecen los investigadores Correia A.A., Díaz Graca - F. Da.

Se muestrearon un total de 30 toros y en las pruebas -- realizadas se obtuvieron resultados hasta de 30 Pg./gr. de - carne.

D I S C U S I O N .

Los investigadores Correia, A. A. Díaz Graca F. Da. en sus trabajos realizados en el año de 1979 el "stress" ante-mortem en animales para matanza y el probable estado anormal de la carne por la acción de ciertos mediadores bioquímicos (4). Determinaron las cantidades de estradiol encontrando 14.4 Pg./gr. de carne, los cuales fueron considerados como normales.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo fueron inferiores a los considerados como normales.

C O N C L U C I O N E S.

La técnica de cromatografía en capa delgada, nos permite determinar las cantidades de estradiol retenidas en los tejidos de los animales.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo fueron similares a los encontrados en el ganado de abasto, en el trabajo realizado en la Tesis Profesional, determinación de estradiol en masas musculares de bovinos como resultado del tipo de sacrificio en el rastro Municipal de Zapopan, Jal., (1).

Esto nos indica que con los distintos métodos de sacrificio, los animales son sometidos a condiciones similares de stress.

Esta técnica descrita en el presente trabajo no nos marca margen de error, ya que algunas muestras se mandaron analizar mediante otra técnica (R.I.A.) Radio inmuno análisis y los resultados obtenidos fueron similares.

El margen de error se puede atribuir a que la muestra tomada, tuviere mayor o menor cantidad de grasa en sus fibras musculares, ya que el estradiol se fija principalmente a las grasas. (7).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

- 1.- ALVAREZ ZEPEDA ISRAEL 1985 Tesis Profesional.- Determinación de estradiol en masas musculares de bovinos como resultado del tipo de sacrificio en el rastro Municipal de Zapopan, Jal.
- 2.- ANDRADE D.S.J. 1982. Patología especial de los animales domésticos. 2da. edición; Endocrinología. Interamericana. México. p. 399.
- 3.- BAREHAM J.R. 1973. The concept of stress. Vet. Rec. ---- 93. p. 682-683.
- 4.- CORREIA A.A. Díaz, Grace F. Da. 1979. Ante-mortem stress in slaughter animals and the probable abnormal meat composition resulting from various biochemical mediators. In proceedings. Budapest, Hungary. 1 p. 53-58.
- 5.- COSSIO. Los toros tomo I. Espasa-Talpe, S.A. Madrid ---- 1980.
- 6.- COUNCIL on agricultural science and technology veterinary and human toxicology. 1977. 19 p. 133
- 7.- LEHNINGER A.L. 1978. Biocímica: Aspectos bioquímicos de la acción hormonal. Omega, S.A. España, p. 817
- 8.- NIINIVAARA P.F. Antila P. 1973. Valor nutritivo de la carne. Acribia. España.

- 9.- OROZCO MEJIA LUIS GUILLERMO. Tesis Profesional Determinación de la edad de los bovinos para la lidia, como -- fundamento para el reglamento taurino de la ciudad de -- Guadalajara, Jal.

- 10.- THORNTON H. 1971. Relación entre el stress fisiológico y la calidad de la carne. Re. Vet. México 3 p. 29-31.