

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



VSSA

**DETERMINACION DE ESTRADIOL EN MASAS MUSCULARES DE BOVINOS COMO RESULTADO DEL TIPO DE SACRIFICIO EN EL RASTRO MUNICIPAL DE ZAPOPAN, JAL.**

**TESIS PROFESIONAL**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:**

**MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA**

**PRESENTA:**

**ISRAEL ALVAREZ ZEPEDA**

**GUADALAJARA, JALISCO, 1985**

A LA MEMORIA DE MI PADRE:

Lauro Alvarez del Toro

A MI MADRE:

Elena Zepeda Barboza

A MIS HERMANOS:

Lauro

Lupita

Jorge

Aurelio

Sergio

Ma. Elena

Ma. de Lourdes

Cesar Octavio

G R A C I A S

A MI ASESOR:

M.V.Z. Miguel Carbajal Soria  
Por su gran ayuda y tiempo  
que me dedicó.

A MI PADRINO:

M.V.Z. Antonio Cesar S.

A MI JURADO:

M.V.Z. Octavio Rivera Martínez  
M.V.Z. J. Antonio Glez. Mendoza  
Q.F.B. Yolanda López Illán  
M.V.Z. J. de Jesús Trujillo Aguirre  
M.V.Z. Fco. Javier Medina Ambriz

Al Dr. Q.F.B. Ernesto Noriega Valencia  
Por su colaboración en la realización  
del presente trabajo.

Al M.V.Z. Ricardo García Lozano

A TODAS AQUELLAS PERSONAS:

Que me ayudaron a través  
de mi carrera.

## I N D I C E

INTRODUCCION	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	5
HIPOTESIS	6
OBJETIVO GENERAL	7
OBJETIVOS PARTICULARES	7
MATERIAL	8
MÉTODO	42
RESULTADOS	13
DISCUSION	16
CONCLUSIONES	17
RESUMEN	18
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	35

## INTRODUCCION

Las referencias más antiguas de mataderos datan de -- unos 2,500 años A.C., en Roma existía el oficio de carnicero desde esta época, sin embargo, no se sabe con precisión cuándo esta práctica surgió como actividad industrial, aunque se infiere que su inicio coincidió con la fundación de las grandes ciudades (9).

Desde el comienzo de las civilizaciones antiguas los pueblos dominantes y los más progresistas se alimentaron con carne (9), entre éstas la carne de bovino constituye la base de numerosos platillos que se utilizan en la alimentación humana ( 12 ), además de las características nutricionales --- otras propiedades especiales a saber:

- Proteína 18-22% ( según la naturaleza del corte y clasificación del animal).
- Alto valor biológico ( por sus aminoácidos esenciales y balance de ellos ).
- Digestibilidad, superior a la proteína de origen vegetal.

La carne se considera como el alimento básico para el humano, puesto que la necesidad de proteína para un hombre - adulto es de 1 gr/Kg de peso corporal; niños lactantes 3.5 - gr/Kg.: niños de 12 a 13 años 2.5 gr/Kg., se requiere que -- cuando menos el 50% de éstas deban ser cubiertas por proteínas de origen animal preferentemente (12,9), sin embargo, -- con las proteínas vegetales un humano puede vivir sin problemas.

A través de los años surgieron varios tipos de matanza:

- Matanza kosher.-Este método consiste en seccionar los gran

des vasos, tanto de entrada como de salida del corazón, por lo cual el animal sufre un estres prolongado, ya que la -- muerte se presenta por choque hipovolémico.

- Pistola de dardo, se usa en animales de difícil manejo, se logra con el disparo de un dardo con anestésico o sedante - lo cual permite la captura del animal para facilitar el sa\_ crificio.
- Mazo, consiste en un traumatismo en la zona craneo-frontal- para lesionar masa encefálica y provocar un estado de incons\_ ciencia al animal, se utiliza fundamentalmente en equinos.
- Armas de fuego, al disparar una bala que se incruste en la- masa encefálica, provoca un estado de inconsciencia.
- Bióxido de carbono, se introduce a los animales a una cáma\_ ra de gas con una concentración de 50 a 60% de bióxido de - carbono, preferentemente mezclado con 30% de oxígeno que -- provoca inconsciencia.
- Electricidad, se coloca un electrodo 5 cm. arriba de cada - ojo y se hace pasar una corriente de 600 V., 6 amp. durante dos segundos, esto genera despolarización de las células -- nerviosas.
- Puntilla, se secciona a nivel del tallo cerebral a través - de la articulación occipitoatlantoidea.
- Pistola de émbolo oculto, el émbolo de la pistola penetra - al cráneo y destruye la corteza cerebral (2).

Cabe señalar que la mayoría de los métodos provocan la inconsciencia del animal antes de ser desangrado, esto desde - hace muchos años es parte de los métodos Europeos.

Cada uno de los procesos descritos inducen a diferentes grados de alarma en los animales que se sacrifican, ya que los animales expuestos a una serie de factores que provocan "estres" originan siempre 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 estres, 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 ( 7, 13 ).

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. ( 10 ), reportaron casos de adenocarcinoma vaginal en mujeres jóvenes cuyas madres habían recibido terapia con estrógenos durante la preñez. La dosis aplicada se encontraba en el rango de 0.1 a 100 mg. por día durante tres meses.

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 ) (8). Existen de 15,000 a 65,000 sitios receptores de las células blanco capa



ces 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 (8), 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  $8.4 \times 10^{12}$  moléculas. Al comer hígado del animal se absorbe en intestino el 3% o sea,  $2.5 \times 10^{11}$  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  $2.2 \times 10^{17}$  moléculas. La evidencia indica que con las dosis altas de residuos de estrógenos calculados anteriormente no existe peligro en el humano. (8)

Sin embargo Delane (8), 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 bastarían para provocar cáncer.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Para que los consumidores tengan acceso a carne de calidad es necesario que el manejo del ganado en el transporte hacia los mataderos, durante su estancia en ellos y al momento del sacrificio sea el adecuado, ya que diversos estudios (1,2,4), demuestran que bajo otras circunstancias como el transporte prolongado, cambios climáticos severos, inanición, ruidos, etc. se producen un estado de excitación general en el animal que se conoce como "tensión" (estres) (3, 5, 8, 24) que tiene gran relación con la calidad de la carne, debido a que se modifican los niveles químicos de iones  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$ ,  $Ca^{++}$  y  $O_2$ ,  $CO_2$ , así como las concentraciones hormonales normales del organismo especialmente de estrógenos a nivel de músculo estriado. (6,7).

### HIPOTESIS

La concentración muscular de Estradiol varía con el tipo de sacrificio debido a la diferencia en intensidad del estrés que se produce.

## OBJETIVO GENERAL

Establecer las consecuencias de los dos procedimientos de sacrificio que se utilizan en la actualidad en la mayoría de los rastros, cuantificándose las concentraciones de estradiol retenidas en masas musculares de animales que fueron sometidos a un estres antes del sacrificio.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Determinar la concentración muscular de estradiol en animales sacrificados mediante el método de puntilla y por pistola de émbolo oculto.
- 2.- Establecer la variación de la hormona descrita en relación con el tipo de sacrificio.

## MATERIAL

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  $\text{CO}_3\text{K}_2$  anhidro.
- 3.- Alcohol metílico absoluto. cinco litros y medio. Redestílese con  $\text{CO}_3\text{K}_2$  anhidro.
- 4.- Acetato de etilo. Un litro. Redestílese con  $\text{CO}_3\text{K}_2$  anhidro.
- 5.- Tolueno. Ocho litros y medio. Redestílese con  $\text{CO}_3\text{K}_2$  anhidro.
- 6.- Acetona. Doscientos ml. Redestílese con  $\text{CO}_3\text{K}_2$  anhidro.
- 7.- Hexano. Quinientos ml. Redestílese con  $\text{CO}_3\text{K}_2$  anhidro.
- 8.- Formamida. Trescientos ml. Redestílese con  $\text{CO}_3\text{K}_2$  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.
- 16.- 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 juegos.
- 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.- Frascos 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



## METODO:

Para el presente trabajo se obtuvieron 12 muestras de mas musculares de pierna provenientes de 6 bovinos sacrificados en el Rastro Municipal de Zapopan, Jal.; todos estos animales fueron uniformados respecto a los siguientes parámetros: raza cebuina, edad entre 18 y 30 meses, machos y peso entre - 300 y 400 Kgs.; sometidos además a las condiciones más parecidas de manejo.

De estos bovinos 3 provinieron de finalización en corrales de engorda y fueron sacrificados por el método de pistola de émbolo oculto, el resto con origen alimenticio en pastoreo fueron sacrificados mediante puntilla que provoca traumatismo y sección a nivel de tallo cerebral a través de la articulación atlanto-occipital.

Una vez sacrificado el animal, eviserado, se tomaron las muestras, en seguida se trasladaron 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. \*(11).

\* La descripción de la técnica se encuentra en el apéndice al final del trabajo.

## RESULTADOS

Los dos grupos presentaron valores de estradiol por encima de los normales descritos por los investigadores Co--rreia A.A., Graca F. Da ( 12) ( gráfica ).

El grupo de animales sacrificados por el método de puntilla presentó valores de estradiol muy cercanos a los normales ( cuadro No. 1 y gráfica ).

Los animales correspondientes al grupo sacrificado con el método de pistola de émbolo oculto se encontró los valores duplicados a los descritos normales ( cuadro No.2 y gráfica ).

CUADRO No. 1.- VALORES DE ESTRADIOL EN MASAS MUSCULARES PROVENIENTES DE TRES BOVINOS SACRIFICADOS POR EL METODO DE PUNTILLA.

MUESTRAS	CANTIDAD EN pg/gr
A	18
A <sub>1</sub>	20
B	22
B <sub>1</sub>	22
C	18
C <sub>1</sub>	19

$$\bar{X} = 19.83 \pm 2$$

CUADRO No. 2.- VALORES DE ESTRADIOL EN MASAS MUSCULARES PROVENIENTES DE TRES BOVINOS SACRIFICADOS POR EL METODO DE PISTOLA DE EMBOLO OCULTO.

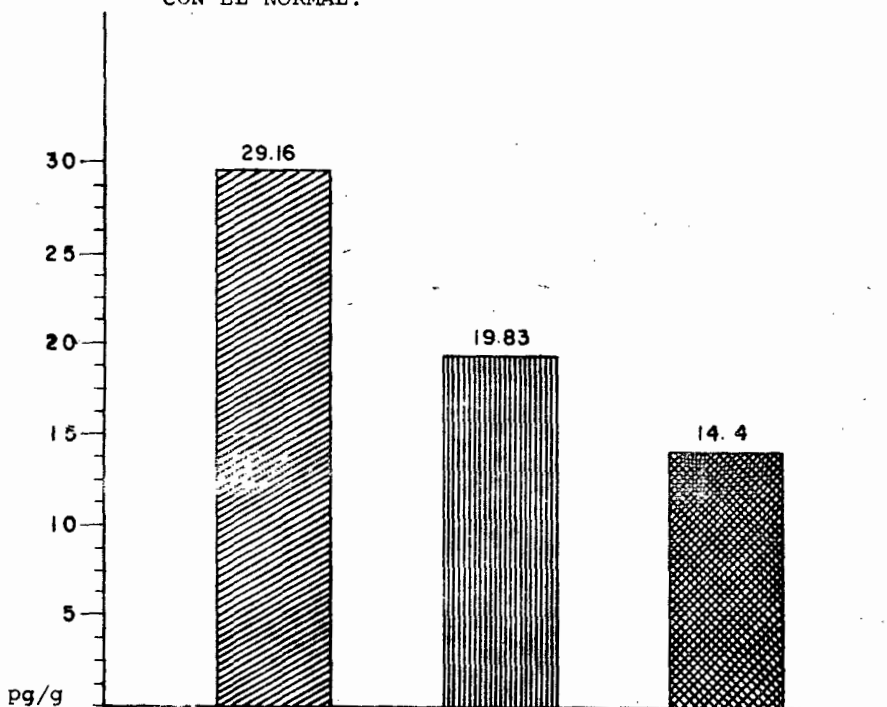
MUESTRAS	CANTIDAD EN pg/gr
D	28
D <sub>1</sub>	30
E	28
E <sub>1</sub>	27
F	32
F <sub>1</sub>	30

$$\bar{X} = 29.16 \pm 2.5$$

NOTA: Las muestras representadas con la misma letra provienen de la misma, únicamente trabajadas por separado para verificar la exactitud de la técnica, obteniendo un margen de error de 0 a 2 pg/g.

GRAFICA: -

VALORES DE ESTRADIOL EN MASAS MUSCULARES DE BOVINOS COMPARANDO DOS TIPOS DE SACRIFICIO- CON EL NORMAL.



Animales sacrificados con pistola de émbolo oculto



Animales sacrificados con puntilla



Valores normales descritos por los investigadores Correia A.A., Graca F. Da. ( 7 )

## DISCUSION

La técnica de cromatografía en capa delgada permitió de tectar estradiol en concentraciones inferiores a los 20 pg/g de carne. Este método de determinación de estradiol es sencillo y rápido pero con el único inconveniente que los reactivos necesarios son costosos.

Los investigadores Correia, A.A., Graca F. Da.(7) en sus trabajos realizados en el año 1979 determinaron las cantidades de estradiol encontrando 14.4 pg/g de carne los cuales fueron considerados como normales. Los resultados obtenidos en el presente trabajo están por encima de los descritos como normales.

Las concentraciones de estradiol detectadas en las muestras provenientes del grupo sacrificado con pistola de émbolo oculto fueron superiores a las encontradas en aquellas -- provenientes de los animales sacrificados por el método de puntilla, con esto se infiere que el primer grupo de animales estuvo expuesto a un estres mayor.

## CONCLUSIONES

Para la determinación de estradiol es factible utilizar la técnica de cromatografía en capa delgada por su sencillez y prontitud que se puede obtener los resultados y además el margen de error tan reducido que ofrece 0 a 2 pg/g de carne ( cuadros 1 y 2 ). El margen de error puede atribuirse también que la muestra tomada tuviese mayor o menor cantidad de grasa entre las fibras musculares, conociendo el origen lipídico del estradiol, éste se fijará a las grasas principalmente. ( 5, 10 ).

Las cantidades de estradiol en masas musculares variarán con la cantidad de estrés provocado antes del sacrificio, los animales sacrificados por el método de pistola de émbolo oculto presentaron concentraciones mayores de estradiol a los encontrados en el grupo de animales sacrificados por el método de puntilla, por lo que se deduce que el método de puntilla es más adecuado.

Las variaciones en las concentraciones de estradiol entre los dos grupos estudiados es alto, por esta razón pudiera existir otros factores que alteraron los valores de estradiol, para esto debería continuarse con la investigación.

Los valores de estradiol encontrados en los dos grupos están por encima de los valores normales (7) esto sugiere se adopten tipos de manejo y matanza menos estresantes.

El presente trabajo permitirá en un futuro desarrollar la técnica de cromatografía en capa delgada dentro de la F.-M. V.Z. de la U. de G. De esta manera poder reducir costos en posteriores trabajos.

## RESUMEN

Con el objeto de establecer las consecuencias de los procedimientos de sacrificio que se utilizan en la actualidad, en la mayoría de los rastros, en el presente trabajo se estudió los niveles de estradiol retenidas en masas musculares ( pierna ) determinadas por el método de cromatografía en capa delgada, a dos grupos de bovinos sacrificados por pistola de émbolo oculto y por puntilla.

Cada tipo de sacrificio induce a diferentes grados de alarma en los animales; los animales expuestos a una serie de factores que provoquen "estres" originan siempre 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 estres, 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. (7).

Los valores de estradiol obtenidos en el grupo de animales sacrificados con puntilla fueron poco superiores a los descritos como normales por los investigadores Correia A.A., - Graca F.Da. ( 14.4 pg/g de carne ) en cambio los resultados encontrados en el grupo de animales sacrificados por el método de pistola de émbolo oculto fueron duplicadas las cantidades.

## APENDICE

## Determinación de estradiol:

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<sub>21</sub>" 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 maçerado de carne en un frasco de 3.75 litros de boca ancha y de color marrón, al cual se agregaron previamente 15 ml. de ácido acético 6 N y 5 ml. de formal. 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 150 ml. de cloruro de metileno y se mezcla por rotación 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 destilada. 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 filtra 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 sílica gel F.

En un embudo de decantación de 3000 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 sílica 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, al 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 esteroides.

Se colocan el 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 la

terales 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 --- frasco 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 el 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 filtra 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 a 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 de 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 de 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 vari-lla de vidrio. La fase se evapora parcialmente en unos 10 mi-nutos.

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 ro-tar cuidadosamente el balón para que el residuo se disuelva en el disolvente. Mediante una micropipeta se aplica cuanti-tativamente esta solución de esteroides en la línea de parti-da del segundo cromatograma, empleando la misma téc-nica indi-cada 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 cromatográ-fica durante 7 horas.

Se seca 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 de 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 CROMATOGRAFICO

#### a) Preparación de la cámara cromatográfica

Se recubre el recipiente cromatográfico con una doble capa de placas de sílico 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 re--

servan 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.

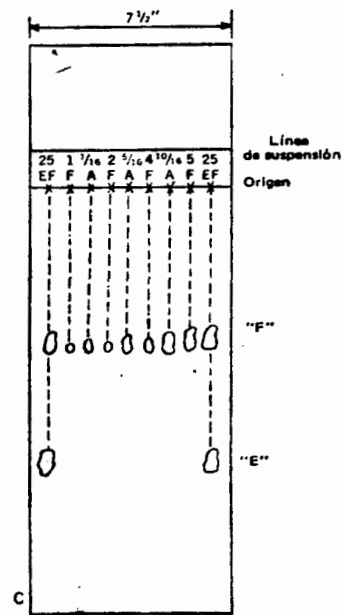
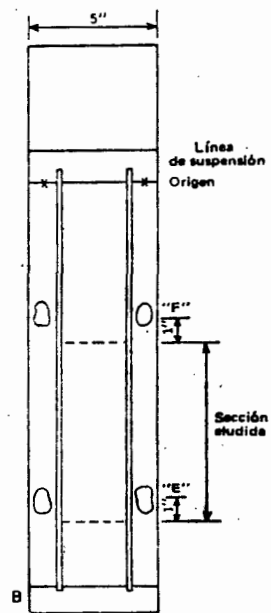
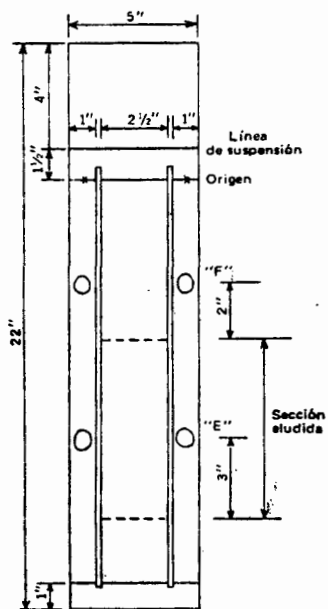
#### b) Cromatografía.-

Se corte 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 (1:1:1:0 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, aproxima





madamente, 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 seca 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 alcalina de tetrazol 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 impregándolo 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.

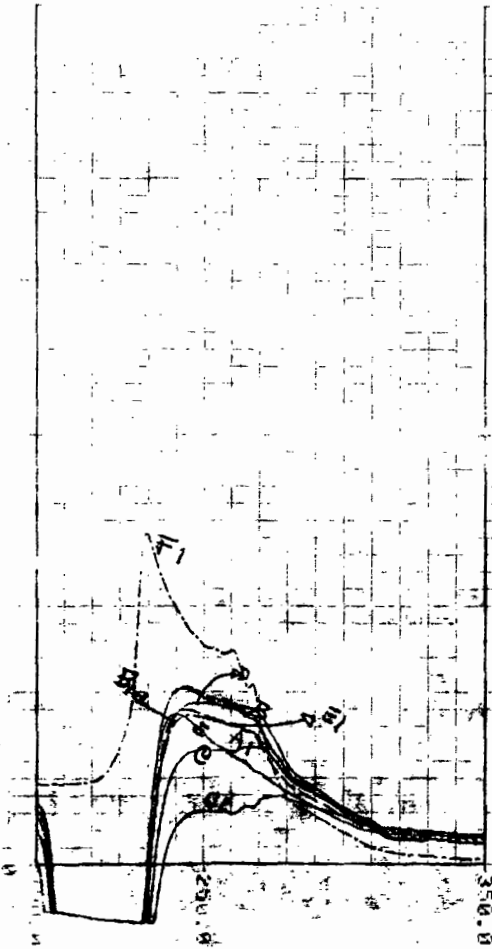
Para hacer la determinación cuantitativa del estradiol se hizo un raspado de la mancha formada en el cromatograma, -

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:

$$\frac{\text{D.O. Muestra}}{\text{D.O. Patrón}} \times \text{concentración del patrón} = \text{pg./g.}$$



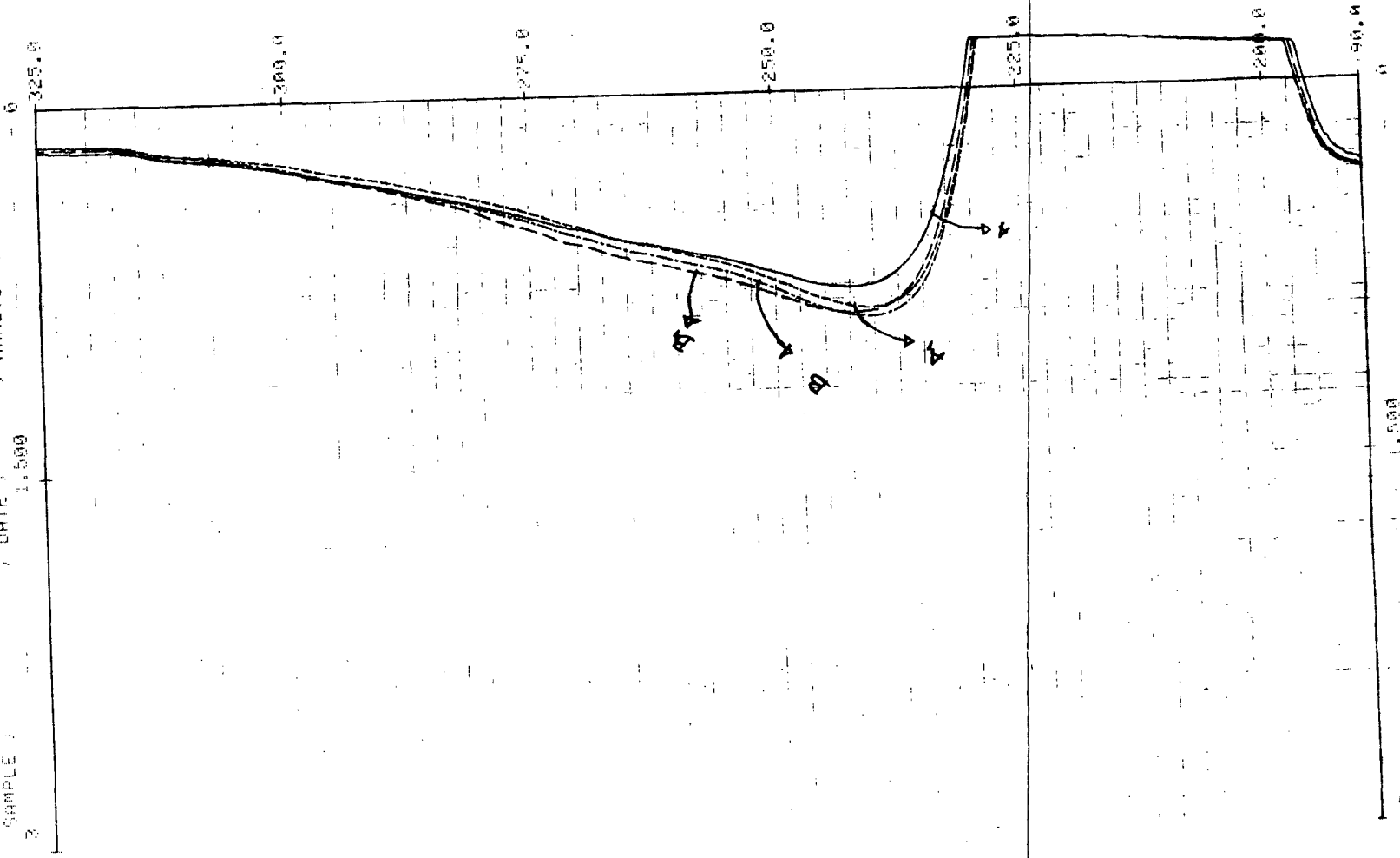
RANGE LOW HIGH  
 SRS. M 4 350  
 END WAVE NM 190  
 SAMPLE T20  
 DATE 2/10/68  
 ANALYST  
 SPEED 2.000  
 SLIT 2  
 CYCLE CHANGING  
 4



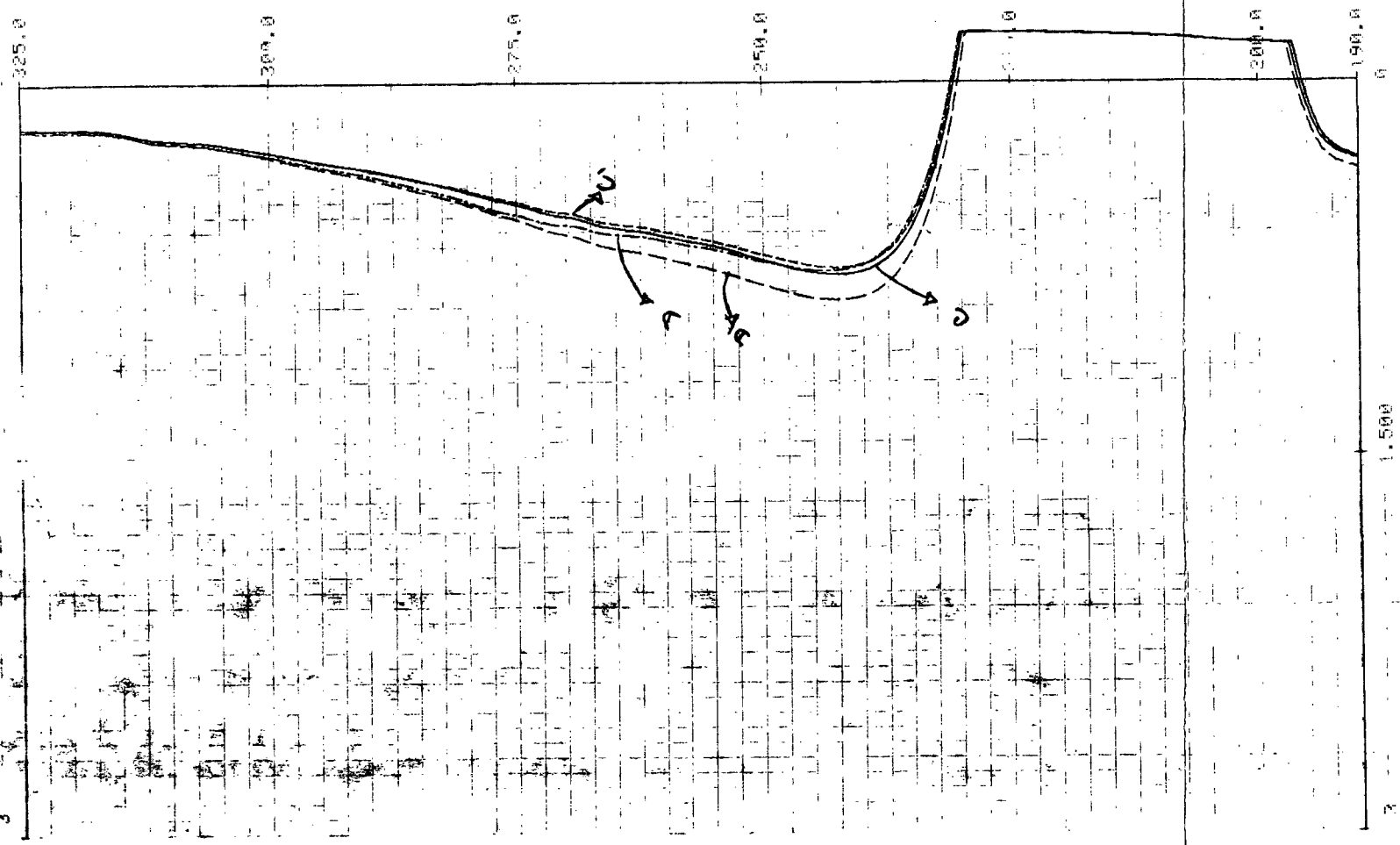
RANGE LOW HIGH START ML(CHM) END ML(CHM)  
ABS. 0 3 325 198

SCALE(MM/CM) SPEED SLIT CYCLES(MIN)  
5 FAST 2 0

SAMPLE 3 DATE 1.500 ANALYST

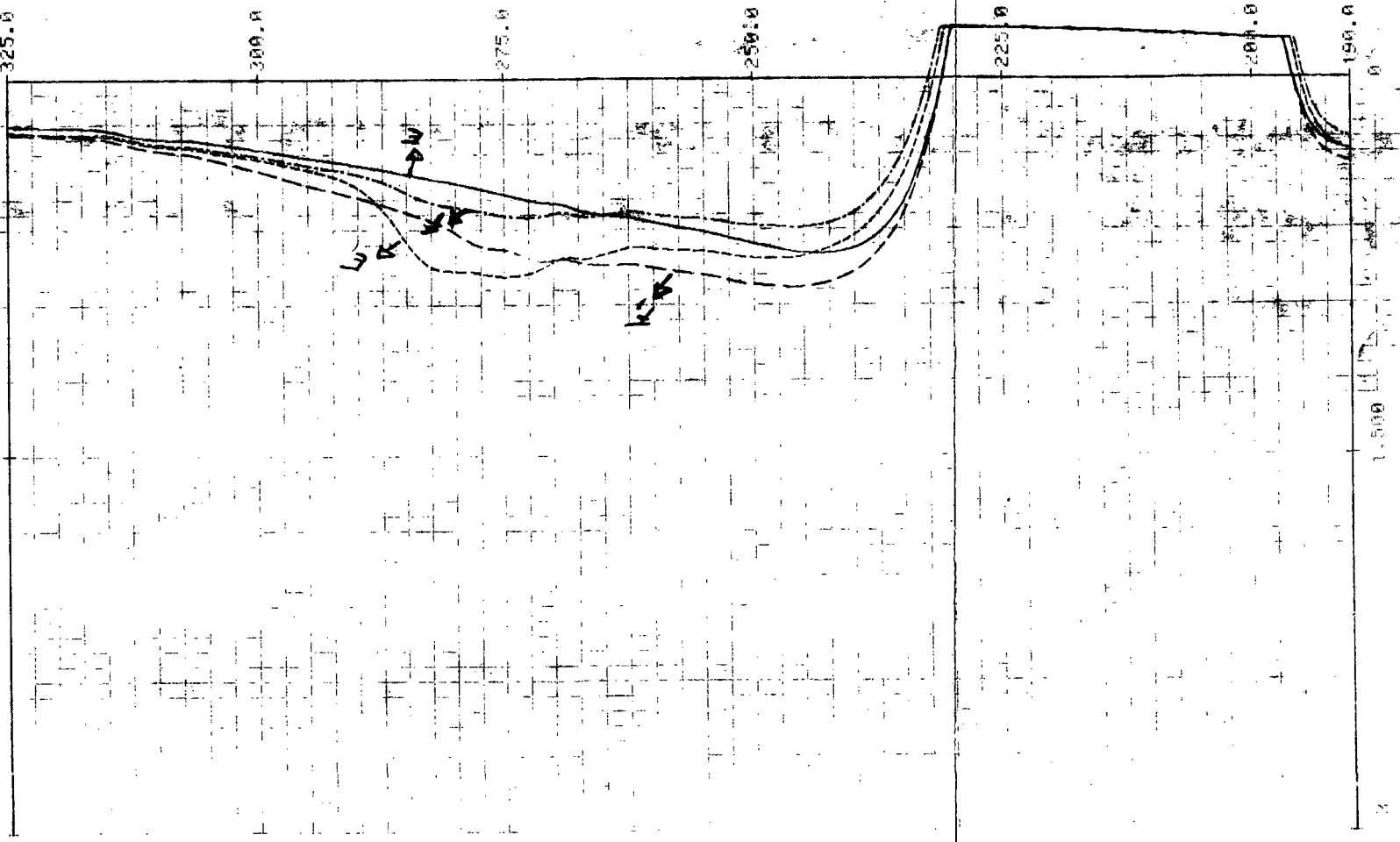


CHARGE LOW PISA PART (CON) END (MIN) 325.0  
 ASS. 0 3 5 5  
 SCALE (MIN) SP. SLIT VC. I. (MIN) 5 2 0  
 SAMPLE 100 ORT ANALYSIS 3



1.500

RANGE LOW HIGH START ML(MM) END ML(MM) T  
 ABS. 0 2 325 190  
 SCALE(NM/CM) SPEED SCIT CYC.T.(MIN)  
 5 FAST 2 0  
 SAMPLE 3 DATE 7 ANALYST  
 1.500



## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- ALUJA A.S., Berruecos J.M. 1973. Problemas de aprovisionamiento de carne en el D.F. y su trascendencia al bienestar humano. Rev. Vet. México. 2 Pp. 166-175
- 2.- ALUJA A.S. 1985. Necropsias en animales domésticos: - Métodos de eutanasia, CECSA. México, P. 13
- 3.- ANDRADE D.S.J. 1982. Patología especial de los animales domésticos. 2da. edición; Endocrinología. Interamericana. México. P. 399
- 4.- BAREHAM J.R. 1973. The concept of stress. Vet. Rec. - 93. Pp. 682-683.
- 5.- BHAGAVAN N.V. 1978. Bioquímica. Interamericana S.A. México.
- 6.- CERVENKA J. 1969. Influencia of cattle transportation under a high temperature of meat valve after slaughter. Act. Vet. Br. 38 Pp. 269-272
- 7.- CORREIA A.A. Díaz, Graca 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
- 8.- COUNCIL on agricultural science and technology veterinary and human toxicology. 1977. 19 P. 133
- 9.- FISHER P., Bender A. 1978. Valor nutritivo de los Alimentos. Limusa, México.



- 10.- LEHNINGER A.L. 1978. Bioquímica: Aspectos bioquímicos de la acción hormonal. Omega, S.A. España. P. 817
- 11.- LEVINSON Samuel A. 1972. Diagnóstico Clínico de Laboratorio. El Ateneo, Argentina.
- 12.- NIINIVAARA P.F. Antila P. 1973. Valor nutritivo de la carne. Acribia. España.
- 13.- THORNTON H. 1971. Relación entre el estres fisiológico y la calidad de la carne. Rev. Vet. México 3  
P. 29-31