

ANALISIS DE AGENTES TIREOSTATICOS EN PRODUCTOS CARNICOS

M.A. LOSADA DÍAZ, J. BOATELLA RIERA, M.C. DE LA TORRE BORONAT

Departamento de Bromatología, Toxicología y Análisis Químico Aplicado.
Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona

RESUM

Es fa una revisió bibliogràfica sobre la utilització del Metiltiouracil (MTU) com a finalitzador, de les seves implicacions i de les diferents tècniques per a la seva detecció. Se n'aplica una, proposada per De Brabander i Verbeke, que utilitza una CCF per a la detecció final, en l'anàlisi de 36 mostres de tiroïdes procedents de bestiar boví i porcí.

Paraules clau: Metiltiouracil, anàlisi.

SUMMARY

After a bibliographical review about the employ and problems of the methylthiouracile (MTU) as meat finalizer and its usual analytical procedures, it has ben applied the proposed method by De Brabander and Verbeke, which uses the TLC for the final detection. It has been analyzed 36 samples of bovine and swine thyroids.

Key words: Methylthiouracile, detection of.

INTRODUCCION

Durante el año 1980, los medios de información se hicieron eco de la problemática del empleo de finalizadores en la alimentación del ganado vacuno y su presencia en los derivados cárnicos.

Se presentaba un problema con doble vertiente. En primer lugar, su presencia en alimentos significaba un peligro para la salud pública (especialmente los estrógenos de síntesis) (1). Por otra parte, y para el caso concreto de los agentes tiroestáticos, es indudable que la utilización de los mismos supone un fraude para el consumidor, ya que la ganancia de peso obtenida en reses y añojos no es debida a un aumento en la producción de carne sino que tiene su origen en una retención hídrica (2). Esto se traduce, en la mayoría de los casos, en un sobrepeso de un 10-15 % aproximadamente (1).

El empleo de antitiroideos en la alimentación animal es relativamente reciente. El descubrimiento de los tiouracilos sintéticos se debe a Kennedy (1942) (3). Este autor observó en estos compuestos propiedades bociógenas. Posteriormente, en 1948, Venero obtuvo resultados positivos en la ganancia de peso en cerdos alimentados con dietas que contenían tiouracilos (4). Anteriormente, ya se conocía el hecho de que algunas plantas utilizadas en la alimentación del ganado tenían propiedades antitiroideas; este es el caso de ciertas crucíferas como el trébol blanco, coles, nabos, algunas gramíneas, etc.(5). Esto dio pie al uso masivo de este tipo de sustancias para completar la última fase del cebo, ya que según algunos au-

tores, además de los efectos positivos sobre la ganancia de peso, se observaba una mejora en el índice de conversión del pienso (1).

El Metiltiouracilo (MTU) se ha hecho muy popular en el mundo ganadero durante la última época, dado que su uso como finalizador ha ido reportando amplios beneficios, es un producto relativamente barato, de fácil administración y de resultados rápidos (40 días) (1).

Este agente actúa a nivel glandular inhibiendo la formación de hormonas tiorideas (figura 3), provocando, como consecuencia, un estado hipotiroideo en el animal, con una hipertrofia e hiperplasia glandular o bocio. Dato particularmente interesante, pues ya el tamaño y el peso de la tiroides son orientativos sobre el posible tratamiento del animal con las citadas sustancias (figuras 1 y 2).

Otros efectos paralelos se traducen en una retención hídrica en el tramo gastrointestinal y en el tejido conectivo. Hay un descenso del metabolismo basal y un aumento en el contenido de grasas. Asimismo, al inicio del tratamiento se observa una cierta acción anabolizante.

Otra ventaja aparente que ofrecía el uso de tiroestáticos era el de producir carnes más blancas.

Frente a estas ventajas económicas para el ganadero, ya sea a nivel cualitativo o cuantitativo, surgían una serie de riesgos, especialmente el peligro de sobredosificación o bien por prolongación del tratamiento. Así, por ejemplo, se producían una serie de trastornos relacionados con la retención hídrica,

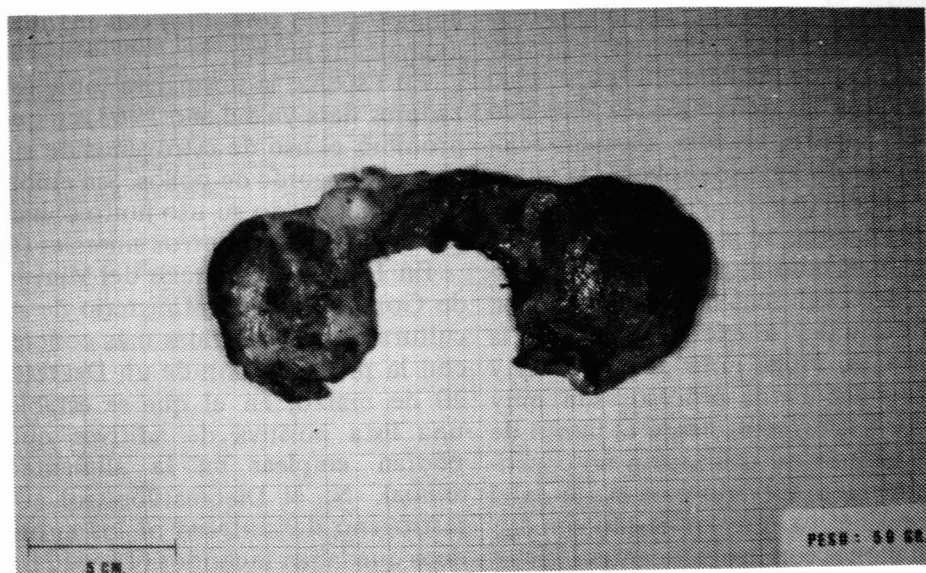


FIGURA 1 – Muestra núm. 36. Tiroides de peso normal.
Animal no tratado.

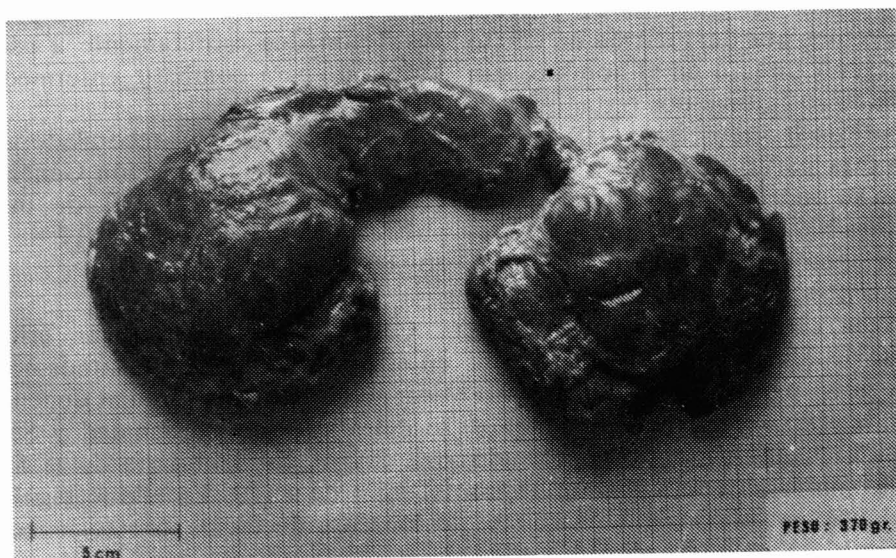


FIGURA 2 – Muestra núm. 32. Hipertrofia tiroidea.
Animal tratado con MTU.

que originaban un encharcamiento general, localizándose edemas subcutáneos duros, principalmente en el bajo vientre y en las extremidades. Hay pérdida de apetito, anemia, timpanizaciones, pudiendo incluso provocar la muerte del animal (6).

Estos agentes se metabolizan parcialmente formando el glucurónido correspondiente (del cual no se conoce bien la estructura) y se excreta junto con la fracción de droga libre por la orina y por la bilis. Estos procesos son muy rápidos, y por esto, desde el punto de vista sanitario, su utilización no constituye un riesgo elevado para la salud del consumidor, ya que los residuos hallados en carnes son insignificantes (7).

En cuanto al posible riesgo carcinogénico, aunque Doniach (8) y Christov (9) realizaron distintos estudios experimentales con antitiroideos, Vaderhaan y Sonie no encontraron pruebas concluyentes que demuestren un efecto cancerígeno directo en el hombre, aún recibiendo los individuos tratados dosis terapéuticas de tireostático (10).

Por otra parte, un problema adicional que se podría presentar es el de que las carnes hidrohémicas (con un contenido de agua mayor de lo normal) sean más susceptibles de una contaminación bacteriana, con los consiguientes perjuicios que de ello deriven (11).

Así, pues, parece ser que, por el momento, la utilización de los citados tireostáticos no supone un elevado riesgo sanitario, sino más bien un hecho fraudulento para el consumidor.

La legislación internacional no ha permanecido impasible, y en sus diferentes años se ha ido prohibiendo su

empleo como promotor del engorde de animales de abasto.

En España, la normativa sobre finalizadores data ya del año 1963, en que se prohibió el uso de estrógenos de síntesis en el engorde de pollos. Sin embargo estaba permitido su uso junto con el de los antitiroideos en otros animales (6).

En 1975, a instancias del Ministerio de Gobernación, el Ministerio de Agricultura adoptó medidas más concretas, con la promulgación de un Decreto, el 20 de marzo, en el que se establecía una lista positiva de aditivos que se podían emplear en la alimentación animal. Ni el Dietilestilbestrol (DES) (estrógeno de síntesis) ni los antitiroideos quedaban incluidos (11 y 12).

En 1977, el Ministerio de Agricultura reforzó esta legislación con dos nuevas resoluciones: una para estrógenos de síntesis y otra para tireoestáticos. Sólo quedaban autorizados aquellos productos destinados estrictamente a uso veterinario, para combatir enfermedades y trastornos.

Todo esto quedó recopilado en la Resolución de la Dirección General de Producción Agraria del 3 de marzo, publicada en el B.O.E. del 12 de marzo (13).

Con el objeto de unificar criterios en el cumplimiento de la citada normativa, se publicó una Circular dependiente del Ministerio de Sanidad y Seguridad Social, Subsecretaría de la Salud, en julio de 1979. En ella se regulan la colocación de avisos, toma y conservación de muestras, peso límite de las glándulas y levantamiento de actas, entre otros temas (14).

Como base de la legislación europea, Diario Oficial una Directiva prohibiendo el uso de sustancias con carácter hormonal y tiroestático (15).

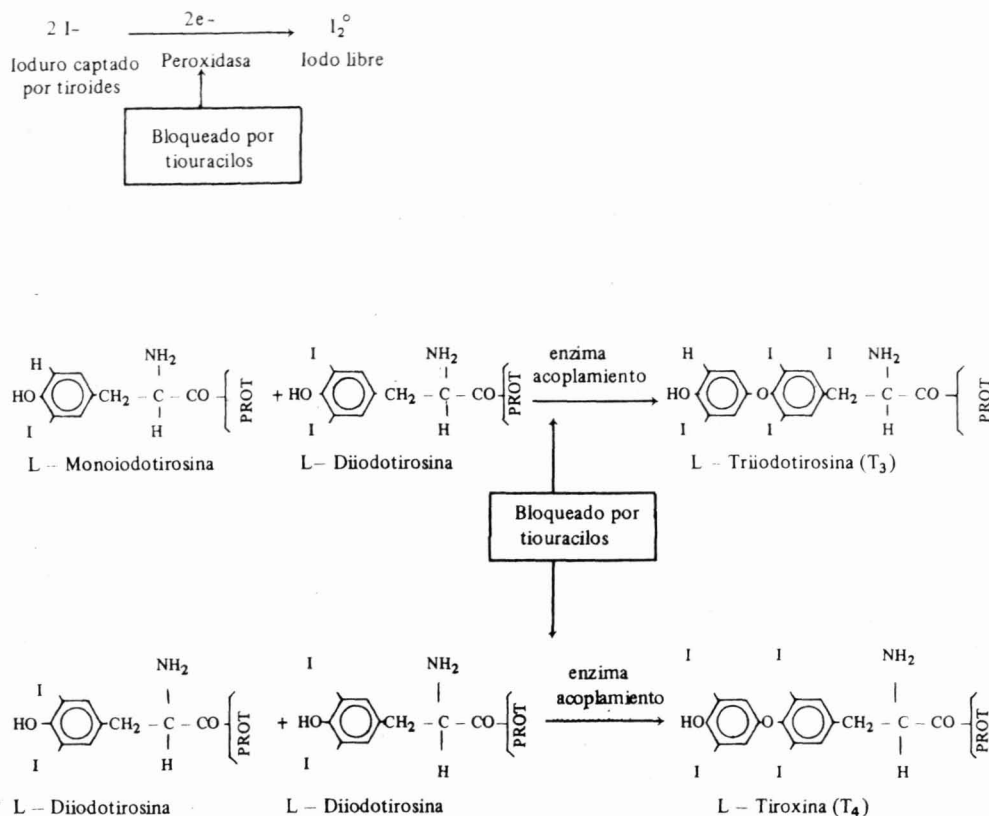


FIGURA 3 - Mecanismo de acción del metil-tiouracilo.

PARTE EXPERIMENTAL

El interés práctico de este trabajo radica, precisamente, en la necesidad de disponer lo más rápido posible de un resultado cualitativo. Por ello, hasta cierto punto, puede sacrificarse la precisión del mismo con el fin de ganar en

rapidez y sencillez del método. En el mismo sentido, hay que señalar que la aplicación de estas determinaciones posee interés en el control de las reses que llegan a los mataderos, y es aquí donde deben practicarse, por lo que en

la actualidad no puede pensarse en la aplicación de sofisticadas técnicas instrumentales para este tipo de control.

Es, precisamente, con estos criterios que se han elegido y estudiado las siguientes técnicas:

1.- TECNICAS CROMATOGRÁFICAS

1.1.- Método descrito por Saldaña, Carbonell y Alonso (16)

Se basa en la visualización de los diferentes tiouracilos (2-tiouracilo, 4-metil-2-tiouracilo y el 4-propil-2-tiouracilo), previa separación por cromatografía en capa fina, revelando con el reactivo dicloroquinona-clorimida o bien utilizando luz UV a 254 nm.

Método

Se someten 25 g de tiroides triturados a un desengrasado en Soxhlet con éter de petróleo durante unas 15 horas.

La muestra desengrasada se macera en 10 ml de metanol, manteniéndose en agitación durante 20 minutos, se filtra y se evapora la fase metanólica a sequedad en rotavapor a 40°C. El residuo seco se recoge en 30 ml de una mezcla de cloroformo/metanol (1:1).

La purificación se realiza por cromatografía en columna de óxido de aluminio (grado de actividad I) eluyendo con mezclas de polaridad creciente. Se desprecian los 8 primeros mililitros, y los restantes eluatos se evaporan a sequedad y se disuelven de nuevo en 25 ml de metanol.

La separación se lleva a cabo por cromatografía en capa fina, sembrando cantidades de 5 µl en una placa de sili-

cagel F₂₅₄. Como eluyente se emplea una mezcla de cloroformo/metanol (90:10). La placa, una vez seca, se observa bajo luz ultravioleta a 254 nm y aparecen las manchas correspondientes a los tiouracilos. Para visualizar las manchas de modo permanente, puede pulverizarse con la placa una solución de dicloroquinona-clorimida en isopropanol (0,4 %), obteniendo una coloración amarilla por formación de un complejo formado entre el reactivo y los tiouracilos.

Comentario

Es una técnica sencilla y asequible a cualquier laboratorio por escasos que sean sus medios.

Como inconvenientes principales cabría señalar, en primer lugar, la duración del proceso, puesto que el desengrasado de la muestra requiere un mínimo de 15 horas. Por otra parte, en las extracciones se producen pérdidas notables, lo cual, junto con la presencia de numerosas impurezas en el extracto final, hace que la detección cromatográfica sea problemática.

1.2.- Método descrito por De Brabander y Verbeke

Se basa en la separación de varios antitiroideos (tiouracilo y sus derivados

metil, propil y fenil, junto con el metilmercaptoimidazol) por cromatografía en capa fina. Previamente se obtiene un complejo formado por el tiroestático y el 7-Cl-Nitrobenzofurazano, que, una vez revelado con cisteína en solución alcohólica, da fluorescencia al UV a 366 nm. La identificación se realiza por comparación de Rf con los patrones.

Método

En el procedimiento de extracción hemos introducido algunas modificaciones que nos han permitido una mayor comodidad en el trabajo.

Se maceran 20 g de muestra triturada con 100 ml de metanol durante 20 minutos. Luego se centrifuga el extracto a 2.000 g durante 3 minutos. Pasar aproximadamente la décima parte del sobrenadante a un tubo de extracción y acidificar con 1 ml de ácido clorhídrico 1N. La grasa se elimina por extracciones sucesivas con éter de petróleo y éter etílico para eliminar los lípidos más polares.

La purificación se realiza por columna de resinas intercambiadoras de aniones DOWEX 50W-X8 eluyendo con metanol al 75 %. El extracto percolado se concentra en rotavapor hasta 1 ml. Luego se diluye con 5 ml de solución reguladora de fosfatos (pH 8).

La obtención del derivado se realiza en baño de agua a 40°C durante 1 hora, añadiendo 0,1 ml del reactivo en solución acetónica. Al finalizar, acidificar con ácido clorhídrico y extraer el derivado con éter etílico. Se concentra hasta 0,5 ó 0,2 ml y proceder a cromatografiar en capa fina. Se utilizan placas de silicagel

sin indicador de fluorescencia. La placa se activa a 110°C, una hora, y se siembran porciones de 50 µl. El eluyente empleado es una mezcla de cloroformo/metanol (95:5). El revelador empleado se compone de cisteína en solución alcohólica, y bajo luz UV a 366 nm se aprecia una coloración amarillo-verdosa que permite una mejor visualización de las manchas. El exceso de reactivo avanza con el frente del disolvente. El tiroestático se identifica por comparación de Rf con el patrón.

Esta técnica permite detectar concentraciones de 20 ppb, aunque los autores señalan el límite de detección en 10 ppb.

Comentario

Es una técnica sencilla, aunque un tanto laboriosa, pero dada la escasa complejidad del material utilizado permite analizar distintas muestras al mismo tiempo.

Por otra parte, la obtención de un derivado con un reactivo específico permite aumentar la sensibilidad del método.

Hemos estudiado una variante del mismo, aplicando la cromatografía líquida de alta presión como método de separación y cuantificación. Para ello, una vez extraído el derivado en solución etérea, concentramos e inyectamos directamente en el cromatógrafo bajo las siguientes condiciones:

Columna	=	ODS-18
Fase móvil	=	metanol
Flujo	=	1 ml/min
Longitud de onda del detector	=	278 nm

Esta variante permite, además, realizar de forma rápida un análisis cualitativo y cuantitativo.

2.- TECNICA COLORIMETRICA

2.1.- Método descrito por Van Waes (18)

Se basa en la determinación de metiltiouracilo por colorimetría, previa formación de un complejo coloreado con la dicloroquinona-clorimida que se lee en espectrofotómetro a 435 nm. (Gráfico I)

Método

Se maceran 20 g de muestra triturada en 10 ml de metanol, agitando mecánicamente durante 30 minutos.

Una vez filtrado, se concentra el sobrenadante hasta tener un volumen final de 25 ml. El concentrado se traslada a un embudo de decantación y se añaden 25 ml de agua y 60 ml de éter etílico. Una vez separadas las fases, se lava la capa etérea con 12,5 ml de agua, se recogen junto con la fracción acuosa anterior y se evaporan a sequedad.

El residuo seco se redisuelve en 30 ml de una mezcla de cloroformo/metanol (1:1).

La purificación se realiza percolando la solución obtenida por una columna de óxido de aluminio (grado de actividad I), utilizando disolventes de pola-

ridad creciente (cloroformo/metanol a 1:1, metanol, metanol al 75 % y por último metanol).

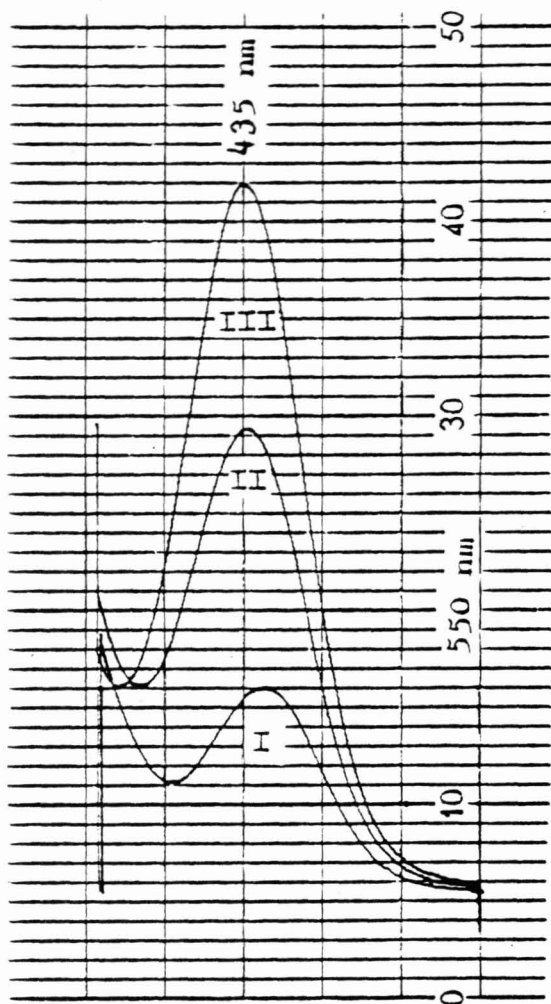
Despreciar los 8 primeros ml y evaporar el extracto a sequedad.

Para desarrollar la coloración se redisuelve el extracto seco en 21 ml de solución reguladora pH 7,6, se añade un ml de solución de dicloroquinona-clorimida, se agita y se deja reposar durante 20 minutos.

El complejo coloreado se extrae con cloroformo y se procede a la lectura bajo la luz UV a 435 nm. Los resultados pueden cuantificarse estableciendo previamente una curva de calibrado con concentraciones conocidas de patrón.

Comentario

Es una técnica relativamente sencilla y posiblemente más rápida que la anterior. Ofrece buena recuperación y su sensibilidad, si bien no es tan elevada, es aceptable para este tipo de determinaciones. Sin embargo, presenta, a nuestro juicio, el problema de la presencia de posibles interferencias al efectuar la lectura en el colorímetro.



GRAFICA I – Espectro al visible de soluciones de MTU de concentraciones 0,02; 0,04 y 0,06 mg/ml (18)

RESULTADOS

Los resultados analíticos han sido obtenidos según el método cromatográfico en capa fina descrito por Brabander y Verbeke (17), pues, a nuestro juicio, ofrece ventajas en relación con los otros métodos estudiados.

Las muestras analizadas corresponden a tiroides de bóvidos procedentes del Matadero de Mercabarna y tiroides de cerdo suministrados por el Servei d'Higiene Alimentària de la Conselleria de Sanitat i Seguretat Social de la Gene-

ralitat de Catalunya.

Hemos de destacar que en el caso de tiroides de terneros (animales en los que el fraude se hace más evidente) la mayoría de las muestras eran escogidas entre las que sobrepasaban los 70 g de peso (límite establecido por la legislación española para una tiroides normal de bóvidos) (8) (Figuras 1 y 2).

Las glándulas se recibieron y conser-

varon congeladas hasta el mismo momento del análisis, ya que, de no ser así, se habría producido una merma considerable en la concentración de tireostático debido a su rápido metabolismo.

A continuación exponemos detalladamente los resultados obtenidos para cada tipo de muestra en las Tablas I y II.

TIROIDES DE TERNERA				
Muestra núm.	Peso (g)	Fecha	Lectura	Agente
1	60	3-3-81	—	—
2	67	11-3-81	—	—
3	168	16-3-81	+	MTU
4	175	18-3-81	+	MTU
5	134	18-3-81	+	MTU
6	119	23-3-81	+	MTU
7	157	26-3-81	+	MTU
8	214	2-4-81	+	MTU
9	148	6-4-81	+	MTU
10	177	6-4-81	—	—
11	162	6-4-81	—	—
12	190	28-4-81	+	MTU
13	182	28-4-81	+	MTU
24	320	19-5-81	+	MTU
31	179	16-6-81	+	MTU
32	370	16-6-81	+	MTU
33	258	25-6-81	+	MTU
34	110	18-9-81	+	MTU
35	146	20-9-81	+	MTU
36	59	25-1-82	—	—

TABLA I

TIROIDES DE CERDO				
Muestra núm.	Peso (g)	Fecha	Lectura	Agente
15	40	4-5-81	+	Dudoso
16	46	4-5-81	+	Dudoso
17	44	4-5-81	+	Dudoso
18	41	12-5-81	-	---
19	40	12-5-81	-	---
20	38	12-5-81	-	---
21	43	12-5-81	+	MTU
22	39	19-5-81	-	---
23	32	19-5-81	-	---
25	41	25-5-81	-	---
26	35	28-5-81	-	---
27	43	3-6-81	-	---
28	37	3-6-81	-	---
29	60	3-6-81	+	MTU
30	29	3-6-81	-	---

TABLA II'

COMENTARIOS

1.— De la revisión bibliográfica realizada, se deduce que el uso de antitiroideos como agentes finalizadores en el engorde del ganado vacuno y porcino, si bien no supone un elevado riesgo para la salud —debido a los bajos niveles residuales hallados— es evidente que representan un peligro potencial, y en cualquier caso un fraude para el consumidor. Precisamente, por estos motivos, está prohibida su utilización.

2.— Por lo que a las técnicas analíticas se refiere, la que presenta mayores

ventajas es la propuesta por De Brabander y Verbeke, debido a su sencillez, buena recuperación, sensibilidad y a que no precisa un instrumental complejo, ya que una simple cromatografía en capa fina es capaz de detectar concentraciones del orden de 20 ppb (referidas a tiroides).

3.— En los resultados obtenidos hemos conseguido una buena correlación entre el peso del tiroides y la presencia de agente tireostático. Si bien algunas muestras, glándulas de peso elevado,

han dado un resultado negativo debido al rápido metabolismo de estas sustancias.

4.— La frecuencia de positivos es considerable, aunque, lógicamente, no es representativa de la situación real, ya que se tomaron muestras sospechosas en la mayoría de los casos.

BIBLIOGRAFIA

- COSTA BATLLORI, P. - Actualidad sobre el empleo de aditivos y estimulantes en las raciones destinadas al engorde de rumiantes *ITEA* 28, 45-52 (1977).
- LITTER, M. - *Farmacología Experimental y Clínica*, 5a. ed., Ed. El Ateneo 1035-1048 (1979).
- CASTAÑO ROSADO, M. - Lesiones estructurales y ultraestructurales observadas en tiroides y adenohipófisis de bóvidos alimentados con dietas conteniendo 6-metil-2-tiouracilo. - *Terap & Veterinaria* 30, 79-99 (1975).
- RODRIGUEZ SANCHEZ, M. - Aspectos de terneros tratados con 6-metil-2-tiouracilo. *Terap & Veterinaria* 24, 69-75 (1974).
- GOUNELLE, H., PERRAULT, M., RAOUL, Y et TRUHAUT, R. - *L'Hygieniste et le Médecin devant les problèmes de l'alimentation animale*. Présidence de M. le Professeur J. Cheymol, membre de l'Académie Nationale de Médecine.
- VILACIS ARGILA, J. - Las hormonas en la producción de la carne. *Filón*, 42-29 Enero (1981).
- SITAR, D.S. y THORNHILL, D.P. - Propylthiouracil: Absorption, Metabolism and Excretion in the albino rat. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 183, (2), 440-448 (1972).
- DONIACH, I. - Experimental thyroid tumours. In: Smithers, D. ed., *Tumours of the thyroid gland*, Edinburg, London, E. & S. Livingstone, 73-99 (1970).
- CHRISTOV, K. y RAICHEV, R. - Experimental thyroid carcinogenesis. In: Altman K.V. et al. eds. - *Current Topics in Pathology* 56 79-114 (1972).
- I.A.R.C. - Monographs on the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans - *Sex Hormones* 21, Lion, 24-140 (1979).
- JIMENEZ, R., HUESCAR, J., REUVERS, T - Tireostáticos: su detección en animales de abasto - *Boletín del Centro Nacional de Alimentación y Nutrición* 1, 23-25 (1980).
- DECRETO 851/1975 del Ministerio de Agricultura, del 20 de marzo, por el que se establece la reglamentación de las sustancias y productos que intervienen en la alimentación de los animales - *B.O.E.* (23 abril 1975)
- RESOLUCION de la Dirección General de Producción Agraria, por la que se prohíbe el uso en ganadería de las sustancias anti-tiroideas - *B.O.E.* n. 61 (1977).
- CIRCULAR del Ministerio de Sanidad y Seguridad Social, Subsecretaría de la Salud, núm. 029/79. Contenido: *Control sanitario de la carne*, (1979).
- DIRECTIVE du Conseil du 31 Juillet 1981, concernant l'interdiction de certaines substances à effet hormonal et de substances à effet thyrostatique. - *Journal Officiel des Communautés Européennes*, (1981).
- MINISTERIO DE AGRICULTURA - Separación e identificación de 2-tiouracilo: 4(6) metil-2-tiouracilo y 4(6) propil-2-tiouracilo en aditivos para piensos y materiales biológicos por cromatografía en capa fina. *Comunicaciones I.N.I.A. Serie Higiene y Sanidad*, núm. 2 (1980).

- BRABANDER, H.F. y VERBEKE, R. - Detection of antithyroid residues in meat and some organs of slaughtered animals. - *Journal of Chromatography* 108, 141-151 (1975).
- VAN WAES, H. - Dosage du methylthiouracile (MTU) dans la viande. - *Rev. Agric* 26, 435-439 (1973).