



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

DESARROLLO DE MÉTODOS RÁPIDOS DE DETECCIÓN DE RESIDUOS MEDICAMENTOSOS EN ANIMALES DE GRANJA

TESIS DOCTORAL

Presentada por:
María Milagro Reig Riera

Dirigida por:
Prof. Dr. Fidel Toldrá Vilardell

Valencia, Septiembre de 2010



MINISTERIO
DE CIENCIA
E INNOVACIÓN



FIDEL TOLDRÁ VILARDELL, DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS Y PROFESOR DE INVESTIGACIÓN DEL INSTITUTO DE AGROQUÍMICA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS.

HACE CONSTAR: que el trabajo de investigación titulado “Desarrollo de métodos rápidos de detección de residuos medicamentosos en animales de granja” que presenta Dña. María Milagro Reig Riera por la Universidad Politécnica de Valencia, ha sido realizado en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC) bajo mi dirección y que reúne las condiciones para optar al grado de doctor.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo la presente en Valencia a 1 de Septiembre de 2010.

Fdo: Prof. Dr. Fidel Toldrá

Avda. Agustín Escardino, 7
46980 PATERNA (VALENCIA)
ESPAÑA
TEL.: 963 90 00 22
FAX: 963 63 63 01

Resumen

El uso de sustancias medicamentosas como promotores de crecimiento en la alimentación de animales de granja y en acuicultura es una práctica ilegal en la Unión Europea. Dada la incidencia que puedan tener las sustancias administradas a los animales para la salud de los consumidores, la Unión Europea estableció un reglamento para todos los países miembros que corresponde a la voluntad de proteger la salud pública.

La prohibición de dichas sustancias promotoras del crecimiento ha motivado un mercado negro a nivel europeo que precisa de estrictos controles sistemáticos para su detección. Los medicamentos veterinarios más utilizados en estos casos fraudulentos son aquellos que tienen una acción anabolizante, hormonal o tireostática.

El objetivo principal de este trabajo consiste en el desarrollo de métodos analíticos rápidos y la evaluación de su aplicación como técnicas de "screening" o criba en el control sanitario de residuos medicamentosos y de sustancias promotoras del crecimiento en animales de granja. Concretamente, se desarrollan protocolos de análisis rápidos y específicos para detectar residuos de β -agonistas (clembuterol y mabuterol), lactonas del ácido resorcílico (zeranol), antimicrobianos (carbadox), agentes antitiroideos (metil-tiouracilo) y corticoides (dexametasona) en muestras de agua de beber, orina y pienso de distintas especies animales.

Se han utilizado los métodos inmunológicos tipo ELISA debido a su especificidad, rapidez y gran número de muestras que se pueden analizar de forma simultánea. La cromatografía líquida de alta resolución ha sido también una herramienta muy eficaz para la detección de varias sustancias.

Todos los métodos puestos a punto y optimizados para los analitos y respectivas matrices estudiados demostraron buena sensibilidad y robustez y han podido ser validados conforme a la normativa vigente que afecta a todos los países miembros de la Unión Europea (Decisión 2002/657/EC).

Resum

L'ús de substàncies medicamentoses com a promotors de creixement en l'alimentació d'animals de granja i en aquicultura és una pràctica il·legal a la Unió Europea. Atesa la incidència que puguin tenir les substàncies administrades als animals, la Unió Europea va establir un reglament per a tots els països membres que correspon a la voluntat de protegir la salut pública.

La prohibició d'aquestes substàncies promotores del creixement ha motivat un mercat negre a nivell europeu que necessita estrictes controls sistemàtics per a la seva detecció. Els medicaments veterinaris més utilitzats en aquests casos fraudulents són aquells que tenen una acció anabolitzant, hormonal o tireostàtica.

L'objectiu principal d'aquest treball consisteix en el desenvolupament de mètodes analítics ràpids i l'avaluació de la seva aplicació com a tècniques de screening o cribatge en el control sanitari de residus medicamentosos i de substàncies promotores del creixement en animals de granja. Concretament, es desenvolupen protocols d'anàlisi ràpids i específics per detectar residus de β -agonistes (clenbuterol i mabuterol), lactones de l'àcid resorcílic (zeranol), antimicrobians (carbadox), agents antitiroïdals (metil-tiouracilo) i corticoides (dexametasona) en mostres de aigua de beure, orina i pinso de diferents espècies animals.

S'han utilitzat els mètodes immunològics tipus ELISA per la seva especificitat, rapidesa i gran nombre de mostres que es poden realitzar de forma simultània. La cromatografia líquida d'alta resolució ha estat també una eina molt eficaç per a la detecció de diverses substàncies.

Tots els mètodes posats a punt i optimitzats per als analits i respectives matrius estudiades van demostrar bona sensibilitat i robustesa i han pogut ser validats d'acord amb la normativa vigent que afecta tots els països membres de la Unió Europea (Decisió 2002/657/EC).

Abstract

The use of veterinary drugs as growth promoters in feed for farm animals and aquaculture is illegal in the European Union. Given the impact that these administered substances may have for consumers' health, the EU established a regulation for all member countries that corresponds to the desire to protect the public health.

The ban for the use of such growth promoters created a black market at an European level that required a strict and systematic control for its detection. Veterinary drugs most used in these fraudulent cases are those with an anabolic, hormonal or thyrostatic effect.

The main goal of this work consists of the development of rapid analytical methods and the evaluation of its application as screening techniques for the sanitary control of veterinary substances and growth promoters in farm animals. More specifically, protocols for rapid and specific analysis are developed for residues of β -agonists (clenbuterol and mabuterol) resorcyclic acid lactones (zeranol), antibacterial (carbadox), antithyroid agents (methyl thiouracil), and corticosteroids (dexamethasone) in samples of drinking water, urine and feed of various animal species.

Immunological methods have been used due to their specificity, rapid processing time and large number of samples that may be performed simultaneously. The high resolution liquid chromatography has also been a very effective tool for the detection of several substances in a relatively short period of time.

All the developed and optimised methods for the analysis of analytes in their respective matrices have shown good stability and robustness and have been validated according to the current normative affecting to all European Union member countries. All these methods have been validated according to Decision 2002/657/EC.

A mi padre

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a mi director de tesis, el Doctor Fidel Toldrá Vilardell, por su confianza, su dirección y su valiosa ayuda en mi formación profesional e investigadora.

A las compañeras del Laboratorio de Residuos, Natalia y Leticia, por los momentos compartidos de trabajo, alegría y buen humor. Y también a Lorena por los buenos y malos momentos.

A los compañeros del Laboratorio de Ciencia de la Carne por su amistad y a todas las personas del IATA con quienes compartí mi tiempo durante la realización de esta tesis.

A mi familia, en especial a mis hijos, Fidel y Silvia, que siempre han sabido entender mis necesidades a pesar de su edad y siempre me han animado a continuar.

A mi marido, Fidel, por tener siempre su cariño, su apoyo incondicional, su comprensión y su amistad.

A los evaluadores del borrador de esta tesis por el interés mostrado y por el tiempo dedicado. Sus correcciones y sugerencias contribuyeron a mejorar la presente tesis.

Gracias a todos

Se agradece el proyecto realizado dentro del Convenio con la Conselleria de Agricultura, Pesca y Alimentación de la Generalitat Valenciana, 2001 a 2005, titulado "Realización de un plan de análisis integrado en el programa de control de residuos en animales vivos y sustancias para la alimentación animal" así como los proyectos "Desarrollo y validación de métodos cromatográficos rápidos para el screening de antibióticos en carne" A-05/08 en 2008, y "Desarrollo y validación de métodos cromatográficos rápidos para el screening de antibióticos, tipo nitrofuranos y sus metabolitos, en carne" A-01/09 en 2009, ambos financiados por la Plataforma de Investigación en Seguridad Alimentaria de la Conselleria de Sanidad de la Generalitat Valenciana.

Indice

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	11
2.1. Principales grupos de promotores de crecimiento y sus efectos en los animales	
2.1.1. Agentes Antitiroideos	13
2.1.2. Corticoides	15
2.1.3. β -Agonistas	16
2.1.4. Hormonas esteroideas y otras sustancias con acción hormonal.	17
2.1.5. Tranquilizantes	18
2.1.6. Antibióticos	19
2.2. Problemática del uso de sustancias promotoras del Crecimiento. Historial de intoxicaciones	20
2.3. Legislación Internacional Reguladora: Unión Europea	23
2.3.1. Plan de vigilancia de residuos	24
2.3.2. Límite máximo de residuos	34
2.4. Regulaciones en otros países	38
2.5. Normativas Reguladoras de la metodología analítica	39
2.5.1. Directiva Europea de métodos analíticos	39
2.5.2. Interpretación de los resultados	40
2.5.3. Definiciones de los límites de decisión y Capacidad de detección	41

2.5.4. Validación	42
2.5.5. Procedimiento de validación	43
2.6. Metodologías analíticas	44
2.6.1. Muestras	46
2.6.2. Preparación de las muestras	47
2.6.2.1. Agua	50
2.6.2.2. Piensos	50
2.6.2.3. Orina	50
2.6.2.4. Pelo	51
2.6.3. Métodos de criba o screening	51
2.6.3.1. Ensayos ELISA	52
2.6.3.1. Cromatografía de inmunoafinidad	59
2.6.3.2. Técnicas cromatográficas	61
2.6.4. Métodos confirmatorios	62
2.6.5. Criterios de funcionamiento adicionales y otros requisitos que deben cumplir todos los métodos cuantitativos	65
2.6.5.1. Veracidad de los métodos cuantitativos	65
2.6.5.2. Precisión	65
2.7. Descripción de los principales grupos y sustancias más representativas	65
2.7.1. Análisis de sustancias del grupo A	68
2.7.2. Análisis de sustancias del grupo B	70
3. OBJETIVOS	75
4. PLAN DE TRABAJO	81
5. MATERIALES Y MÉTODOS	85
5.1. Determinación de residuos mediante ensayos ELISA	87
5.1.1. Materiales	87
5.1.2. Reactivos	87

5.1.3.	Preparación de la muestra	87
5.1.3.1.	Protocolo de extracción de β -agonistas en agua	87
5.1.3.2.	Protocolo de extracción de β -agonistas en orina	88
5.1.3.3.	Protocolo de extracción de β -agonistas en pienso	88
5.1.3.4.	Protocolo de extracción de zeranól en pienso	88
5.1.4.	Condiciones de uso para los ensayos ELISA	88
5.1.4.1.	β -agonistas	89
5.1.4.2.	Zeranól	90
5.1.5.	Procedimiento a seguir en los ensayos ELISA	91
5.1.5.1.	β -agonistas	91
5.1.5.2.	Zeranól	92
5.2.	Determinación de residuos de sustancias por cromatografía líquida de alta resolución con detección por red de diodos (HPLC-DAD)	92
5.2.1.	Materiales	92
5.2.2.	Reactivos	93
5.2.3.	Determinación de carbadox	93
5.2.3.1.	Preparación de la muestra de pienso	94
5.2.3.2.	Extracción	94
5.2.3.3.	Purificación	94
5.2.3.4.	Determinación mediante HPLC-DAD	94
5.2.3.5.	Procedimiento general	95
5.2.3.6.	Confirmación: Co-cromatografía	96
5.2.4.	Determinación de metil-tiouracilo en orina	97
5.2.4.1.	Preparación de la muestra de orina y protocolo de extracción	97
5.2.4.2.	Determinación mediante HPLC-DAD	97
5.2.4.3.	Procedimiento general	98

5.2.4.4.	Confirmación: Co-cromatografía	99
5.2.5.	Determinación de dexametasona	99
5.2.5.1.	Preparación de la muestra y protocolo de extracción para pienso	100
	Preparación de la muestra y protocolo de extracción para agua	100
5.2.5.2.	Determinación mediante HPLC-DAD	101
5.2.5.3.	Procedimiento general	102
5.2.5.4.	Confirmación: Co-cromatografía	103
5.3.	Análisis estadístico	104
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	105
6.1.	Validación de métodos de criba con ensayos ELISA para β -agonistas	107
6.1.1.	Especificidad	107
6.1.2.	Aplicabilidad (cambios menores)	108
6.1.3.	Estabilidad	109
6.1.4.	Capacidad de detección (CC β)	109
6.1.5.	Robustez (cambios importantes)	110
6.2.	Validación de métodos de criba con ensayos ELISA para zeranol (α -zearalenol)	111
6.2.1.	Especificidad	111
6.2.2.	Aplicabilidad (cambios menores)	111
6.2.3.	Estabilidad	112
6.2.4.	Capacidad de detección (CC β)	112
6.2.5.	Robustez (cambios importantes)	113
6.3.	Validación del método de criba por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para carbadox	114
6.3.1.	Especificidad	114

6.3.2. Aplicabilidad (cambios menores)	115
6.3.3. Estabilidad	116
6.3.4. Rectas de calibrado	116
6.3.5. Recuperación	117
6.3.6. Repetibilidad	118
6.3.7. Reproducibilidad intralaboratorio	120
6.3.8. Limite de decisión ($CC\alpha$)	120
6.3.9. Capacidad de detección ($CC\beta$)	121
6.3.10. Robustez (cambios importantes)	121
6.4. Validación del método de análisis de metil-tiouracilo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	121
6.4.1. Especificidad	121
6.4.2. Aplicabilidad (cambios menores)	122
6.4.3. Estabilidad	123
6.4.4. Rectas de calibrado	125
6.4.4.1 Recta de calibrado con patrones puros	125
6.4.4.2 Recta de calibrado sobre orina enriquecida con patrones puros	126
6.4.5. Recuperación	126
6.4.6. Repetibilidad	128
6.4.7. Reproducibilidad intralaboratorio	128
6.4.8. Límite de decisión ($CC\alpha$)	129
6.4.9. Capacidad de detección ($CC\beta$)	129
6.4.10. Robustez (cambios importantes)	129
6.5. Validación del método de análisis de dexametasona mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	131
6.5.1. Especificidad	131
6.5.2. Aplicabilidad (cambios menores)	132

6.5.3. Estabilidad	132
6.5.4. Rectas de calibrado	133
6.5.4.1. Rectas de calibrado de patrones puros	133
6.5.4.2. Rectas de calibrado sobre agua	134
6.5.4.3. Rectas de calibrado sobre pienso	136
6.5.5. Recuperación	136
6.5.6. Repetibilidad	137
6.5.7. Reproducibilidad intra-laboratorio	137
6.5.8. Límite de decisión ($CC\alpha$)	139
6.5.9. Capacidad de detección ($CC\beta$)	140
6.5.10. Robustez (cambios importantes)	140
6.5.11. Precisión	140
7. CONCLUSIONES	143
8. BIBLIOGRAFÍA	147
9. APÉNDICES	159

I. Stability of β -agonist methyl boronic derivatives before GC-MS analysis. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 529, 293-297. 167

II. Methods for rapid detection of chemical and veterinary drug residues in animal foods. *Trends in Food Science and Technology*, 2006, 17, 482-489. 175

III. A chromatography method for the screening and confirmatory detection of dexamethasone. *Meat Science*, 2006, 74, 676-680. 185

IV. Liquid chromatography for the rapid screening of growth promoter residues in meat. Food Analytical Methods, 2008, 1, 2-9	193
V. Veterinary drug residues in meat: Concerns and rapid methods for detection. Meat Science, 2008, 78, 60-67.	203
VI. Capítulos de libro	213

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

CE	Comisión Europea
CEE	Comunidad Económica Europea
CL	Cromatografía Líquida
CV	Coefficiente de variación
DAD	Detector de diodos
DX	Dexametasona
EDTA	Ácido etilendiamin tetraacético
EIA	Inmunoensayo
ELISA	Inmunoensayo enzimático competitivo
EFSA	Agencia Europea de Seguridad Alimentaria
EMA	Agencia Europea del Medicamento
ENAC	Entidad Nacional de Acreditación
FAO	Food and Agricultural Organization
FDA	Food and Drug Administration
GC	Cromatografía de gases
GC-MS	Cromatografía de gases con detector de masas
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
HPTLC	Cromatografía en Capa Fina de Alto Resolución
IC	Columna de Inmunoafinidad
IDA	Ingesta Diaria Admisible
IS	Patrón Interno
LC-MS	Cromatografía Líquida con Detector de Masas
LLE	Extracción Líquido – Líquido con disolventes
LMR	Límite Máximo de Residuos

mm	Milímetro
M	Molar
m/z	Masa/Carga
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
Min	Minuto
MIP	polímeros de impresión molecular
mL	Mililitro
MRLP	Límite Mínimo Exigido de Funcionamiento
MS	Espectrometría de masas
N	Normal
nm	Nanómetro
ng	Nanogramo
°C	Grado Centígrado
OMS	Organización Mundial de la Salud
PI	Patrón interno
PNIR	Plan Nacional de Investigación de Residuos
ppb	Partes por billón
ppm	Partes por millón
R ²	Coefficiente de Correlación
Rec.	Recuperación
RIVM	Instituto Nacional para la Salud Pública y Medioambiente de Holanda
rpm	Revoluciones por minuto
SD	Desviación Standard
SANCO	Directorado General para la Salud y el Consumo de la Comisión Europea
SPE	Extracción en Fase Sólida
T	Temperatura

t_r	Tiempo de Retención
UE	Unión Europea
UNE	Una Norma Europea
USDA	Departamento de Agricultura de EEUU
UV	Ultravioleta
UV-VIS	Ultravioleta-Visible
X	Media
μ	Micra
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
λ	Longitud de Onda

INDICE DE FIGURAS

Figura	Pié de figura	Página
1	Estructura química, 6 – metil – tiouracilo	14
2	Estructura química, 1 metil-imidazol 2 tior	14
3	Estructura química de la dexametasona	16
4	Estructura química del clenbuterol	17
5	Estructura química del carbadox	20
6	Evolución de las técnicas analíticas en el tiempo (De Brabender et al., 2009).	44
7	Protocolo de preparación de la muestra por extracción en fase sólida	49
8	Principio básico de la técnica ELISA indirecto o competitivo. A) Se fija el antígeno a los pocillos. B) Se añade al pocillo la muestra previamente incubada con el antígeno primario. C) Adición del anticuerpo secundario marcado con una enzima cuyo producto es coloreado	54
9	Diferencias de absorbancia para un mismo tiempo de lectura entre una muestra conforme (negativa) y una no conforme (positiva)	55
10	Ejemplo del esquema general del procedimiento a seguir en el análisis de residuos en carne	58
11	Esquema de la cromatografía de inmunoafinidad	60
12	Kit ELISA: (A) Kit completo (B) Adición de reactivos y muestras (C) lavado de la placa (D) adición de sustrato y (E) lectura de absorbancia.	89
13	Protocolo de extracción de dexametasona en pienso	101
14	Protocolo de extracción de dexametasona en agua	102
15	Cromatograma de una muestra blanco de pienso (a) lectura a 365 nm. (b) lectura a 306 nm.	114

16	Cromatograma de una muestra blanco de pienso enriquecido con 80 µg/g de carbadox, nitrofurazona, nitrofurantoina, furazolidona y furaltadona. (a) lectura a 365 nm. (b) lectura a 306 nm.	115
17	Recta de calibrado de patrones puros de carbadox	117
18	Cromatograma de una solución patrón de 20 µg/mL de carbadox	117
19	Recta de calibrado sobre pienso enriquecido con carbadox	118
20	Cromatograma de una muestra blanco de orina con adición de 5,6 dimetil – tiouracilo (PI)	122
21	Cromatograma que muestra los tiempos de retención de 5,6 dimetil tiouracilo (DMTU), 6-propil-2tiouracilo (PTU), 2-tiouracilo (TU), y 6 metil-2-tiouracilo (MTU)	123
22	Recta de calibrado del análisis de MTU con patrones puros	126
23	Recta de calibrado del análisis de MTU en orina	127
24	Cromatograma de una muestra blanco de orina enriquecida a nivel de límite de decisión.	130
25	Cromatograma con patrones puros de corticoides: Betametasona (BT), dexametasona (DX), patrón interno (IS)	131
26	Estabilidad del patrón puro de dexametasona almacenado en congelación	133
27	Estabilidad de la dexametasona en la matriz agua siendo las muestras fortificadas con dexametasona a nivel de CCα y almacenadas en congelación	134
28	Recta de calibrado en el análisis de patrones puros de dexametasona	135

29	Recta de calibrado en el análisis de dexametasona en agua	135
30	Recta de calibrado en el análisis de dexametasona en pienso	136
31	Cromatograma de agua fortificada con dexametasona a nivel de CC α (26 ppb)	139

INDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Página
1	Directivas, Reglamentos y Decisiones de la Unión Europea en relación con los residuos de medicamentos veterinarios	24
2	Clasificación de sustancias del Anexo I de la Directiva 96/23/EC	26
3	Ejemplos de kits ELISA disponibles comercialmente para el análisis de sustancias promotoras del crecimiento	53
4	Límites de detección de kits ELISA para diferentes residuos y distintas matrices	57
5	Métodos de screening o criba utilizados en la detección de determinados analitos específicos	62
6	Métodos de confirmación adecuados para residuos de algunas de las sustancias de los grupos A y B del Anexo I de la Directiva 96/23/CE	63
7	Lista de sustancias pertenecientes al grupo A según la Directiva 96/23/EC y algunas de las sustancias más representativas	66
8	Lista de sustancias pertenecientes al grupo B según la Directiva 96/23/EC y algunas de las sustancias más representativas	67
9	Resumen de los principales métodos de análisis de las sustancias pertenecientes a los grupos A y B según la Directiva 96/23/EC	71
10	Secuencia de adición de reactivos y muestras de β -agonistas en los kits ELISA	90
11	Secuencia de adición de reactivos y muestras de zeranol en los kits ELISA	91
12	Recuperación de carbadox en muestras de pienso avícola con adición de cantidades controladas	119

13	Repetibilidad de las muestras de pienso enriquecidas con 3 concentraciones distintas de carbadox	119
14	Reproducibilidad intralaboratorio del método de análisis de piensos enriquecidos con 4 concentraciones de carbadox	120
15	Estabilidad del analito en la matriz orina enriquecida con 200 ng/mL de MTU	124
16	Pérdida del analito en la matriz orina enriquecida con 200 ng/mL de MTU y conservada en frascos de vidrio o plástico y en fresco o 4°C	125
17	Recuperación de MTU en el análisis de muestras de orina enriquecidas a distintos niveles	127
18	Repetibilidad del análisis de MTU en muestras de orina enriquecidas a distintos niveles	128
19	Reproducibilidad intralaboratorio de los análisis de MTU en muestras de orina enriquecidas a distintos niveles	129
20	Recuperación de dexametasona en muestras de agua y pienso	137
21	Repetibilidad en el análisis de dexametasona en muestras de agua y pienso	138
22	Reproducibilidad intralaboratorio en el análisis de dexametasona en muestras de agua y pienso	138
23	Reproducibilidad calculada mediante la ecuación de Hortwitz como referencia para la precisión del método de análisis de la dexametasona en agua y pienso	141