

De: Carmen Hernandez <Carmen.Hernandez@pahc.com>
Enviado el: martes, 19 de junio de 2018 10:58 a. m.
Para: Cofemer Cofemer
CC: Fernando Sanchez
Asunto: Manifestación uso de Carbadox - Número de expediente 12/00461/070518
Datos adjuntos: Carta manifestacion-Carbadox.pdf; 17-12-22 Exhibit 1.Investigation-of-residues-sp.pdf; 18-06-12 Executive Summary carbadox-ok-sp.pdf; Tabla de Límites Maximos 2017.pdf; 2017 Programa Nal Monitoreo Residuos Toxicos-sp.pdf; 18-06-17 Documento Tecnico Mecadox-LH rev RPB-CH.PDF

Importancia: Alta

A quien corresponda,

Nos permitimos hacer llegar los siguientes comentarios en relación al “ACUERDO POR EL QUE SE DA A CONOCER EL LISTADO DE SUSTANCIAS O PRODUCTOS PROHIBIDOS PARA USO O CONSUMO EN ANIMALES DESTINADOS AL ABASTO” publicado el pasado 7 de mayo en el portal de la Comisión Federal de Mejora Regulatoria con el fin de que los particulares emitan comentarios a dicho proyecto normativo.

Los comentarios y observaciones adjuntas son exclusivamente sobre el **CARBADOX**,

Consideramos muy valioso, que la Secretaría señale claramente la consulta y recomendaciones del CONASA a este acuerdo, y exhiba el análisis de riesgo que se hubiera realizado para prohibir las sustancias mencionadas en el acuerdo.

Cabe mencionar que estamos solicitando la revisión de la información adjunta a fin de que sea removido el Carbadox de esta lista.

Motivo por el cual solicitamos su valioso apoyo, sin más por el momento, agradezco de antemano la atención que brinde a la presente, gracias.

Saludos/Kind regards

Carmen Hernández | Regulatory Affair Manager Mexico & CAM
Phibro Animal Health Corporation
Calle Francisco de Quevedo #117 | Torre A, Piso 6 Col. Arcos Vallarta | Guadalajara, JAL, 44130 México
Direct: +52. 333.882.2880 | Mobile: +1.442.173.2878
carmen.hernandez@pahc.com | www.pahc.com



Guadalajara, Jalisco a 18 de Junio del 2018

**SECRETARÍA DE ECONOMÍA
COMISIÓN NACIONAL DE MEJORA REGULATORIA**

Blvd. Adolfo López Mateos No. 3025, piso 8,
San Jerónimo Aculco, Del. Magdalena Contreras
C.P. 10400 México, Ciudad de México
Tel. (55) 5629-9500 ext. 22602.

A quien corresponda:

Asunto: Manifestación al acuerdo por el que se da a conocer el listado de sustancias o productos prohibidos para uso o consumo en animales destinados al abasto.

En relación al Acuerdo por el que da a conocer el listado de sustancias o productos prohibidos para uso o consumo en animales destinados al abasto y en el que el Carbadox está enlistado, se anexa información que demuestra la seguridad en cerdos, para los trabajadores, para el consumidor y para el medio ambiente. Diversas autoridades tanto científicas como gubernamentales alrededor del mundo, periódicamente han revisado estas investigaciones.

La FDA afirmó que el ácido quinoxalin-2-carboxílico (QCA) es inerte, desde el punto de vista biológico y no es de importancia toxicológica. JECFA han determinado que QCA es seguro y los residuos de QCA no tienen importancia toxicológica. Es rápidamente metabolizado por el cerdo a su principal metabolito, el ácido quinoxalin-2-carboxílico.

Mecadox®, marca de Phibro Animal Health para carbadox, ha sido específicamente formulado para reducir al mínimo la liberación de Carbadox a partir de la premezcla o de los alimentos que la contienen. Es esta propiedad de baja polvosidad la que ofrece certeza en la seguridad para los trabajadores que manejan Carbadox.

Estudios han demostrado categóricamente que los residuos derivados del Carbadox que permanecen al término del periodo de retiro, incluyen el QCA unido al tejido (metabolito inocuo, no carcinogénico), refutando así los alegatos de la FDA de que los residuos unidos a tejidos eran presumiblemente carcinogénicos.

Cabe mencionar que estamos solicitando la revisión de la información adjunta a fin de que sea removido el carbadox de esta lista.

HEALTHY ANIMALS. HEALTHY FOOD. HEALTHY WORLD.®

Documentación que se anexa con el presente:

- Investigación de los Residuos No Extraíbles en tejidos de cerdos en crecimiento tratados [¹⁴ C] - Carbadox vía oral a una tasa de dosificación de 55 mg/kg de alimento terminado. (Estudio en Instalaciones de prueba No. 225322, INFORME 37714).
- Resumen Ejecutivo
- Maximun residues limit table, 2017
- Programa Nacional de Control y Monitoreo de residuos tóxicos en bienes de origen animal, recursos acuícolas y pesqueros 2017 y resultados del 2016
- Documento técnico

Sin más por el momento, agradezco de antemano la atención que brinde a la presente, gracias.

Atentamente

Ing. Fernando Sánchez
Representante Legal
P.B. Animal Health de México S. de R.L. de C.V.

carmen.hernandez@pahc.com
Direct: +52. 333.882.2880 | Mobile: +1.442.173.2878

Junio 12, 2018

Resumen Ejecutivo

Estudios contemporáneos que caracterizan a los residuos persistentes relacionados con ^{14}C carbadox a partir de estudios de residuos totales radioactivos.

El propósito de los estudios contemporáneos

Las evaluaciones históricas sobre seguridad demostraron que cuando se usa según la autorización, los tejidos comestibles resultantes de animales tratados con carbadox son seguros para el consumo humano. Como es el caso con todos los medicamentos de absorción sistémica en el animal de destino, estas evaluaciones de seguridad abordaron la extinción adecuada de los residuos de importancia toxicológica. Las evaluaciones toxicológicas convencionales determinan que los residuos ligados a tejidos no estén disponibles, que sean inertes desde el punto de vista toxicológico y que no tengan consecuencias para el animal de destino o los consumidores subsiguientes de los tejidos comestibles, ya que se han vuelto químicamente inseparables del tejido.

Se llevó a cabo trabajo contemporáneo para abordar el problema de seguridad hipotético generado por la FDA de EE.UU. La FDA postuló que si el residuo unido era carbadox o algún residuo de importancia toxicológica, entonces esto representaría una situación de inseguridad alimentaria para los seres humanos. No había evidencia para esta suposición y el abordaje contradice las metodologías establecidas de seguridad de residuos en tejidos. Está claro que era muy poco probable que los residuos unidos pudieran ser carbadox o cualquier otro metabolito de importancia toxicológica, ya que todos éstos pueden ser extraídos con solventes y medidos con relativa facilidad. Por el contrario, los residuos unidos se consideran, de manera convencional, como inertes desde el punto de vista toxicológico. Esta solicitud requirió que Phibro administrara carbadox radiomarcado con anillo de ^{14}C a animales experimentales y que después caracterizara todos el ^{14}C persistente, por lo menos, hasta el nivel en que pudiera determinarse si era de importancia toxicológica o no. Esto no había podido alcanzarse técnicamente antes. La FDA advirtió que cualquier material no caracterizado se consideraría como si fuera el medicamento original carbadox.

Ácido quinoxalin-2-carboxílico

La degradación metabólica de carbadox es relativamente simple, y ha sido publicada por la FDA, JECFA, el patrocinador y otros autores. Carbadox (CBX), se metaboliza rápido en desoxicarbadox (DCBX) mediante la pérdida de dos átomos de oxígeno a partir del anillo central de carbono. DCBX es entonces degradado en QCA al perder la cadena lateral reactiva de metil-carbazato. Por lo general, carbadox y desoxicarbadox se consideran con potencial cancerígeno, mientras que QCA es inerte, desde el punto de vista metabólico, no cancerígeno y sin importancia toxicológica.

La FDA afirmó que el ácido quinoxalin-2-carboxílico (QCA) es inerte, desde el punto de vista biológico y no es de importancia toxicológica. Esto es coherente con todas las revisiones establecidas, incluyendo las de JECFA que han determinado que QCA es seguro y los residuos de QCA no tienen importancia toxicológica.

HEALTHY ANIMALS. HEALTHY FOOD. HEALTHY WORLD.®

QCA es el metabolito marcador regulatorio más común que se usa para garantizar la adecuada depleción de carbadox y desoxicarbadox en los tejidos comestibles, aunque Canadá usa al desoxicarbadox como su marcador regulatorio. En el informe de JECFA sobre carbadox de 2003, se hace notar que en esos estudios que QCA no era un marcador adecuado para monitorear los metabolitos cancerígenos de carbadox en hígado... y que QCA no garantizaba la ausencia de residuos cancerígenos. Esta observación y los datos a los que se refería reforzaron que el uso de QCA como un metabolito marcador requiere que la extracción analítica necesite la hidrólisis simple de tejido. La hidrólisis del tejido no se llevó a cabo para recuperar el QCA para los datos de JECFA 2003, dado que ese no era el propósito del estudio. En estudios recientes sobre el destino metabólico de carbadox realizados para la FDA de EE.UU. por Phibro Animal Health, se reafirmó que QCA es de hecho, el metabolito terminal de carbadox y se incluyó el paso de extracción hidrolítica bien documentado. QCA es un muy adecuado marcador regulatorio para detectar la ausencia de residuos potencialmente cancerígenos.

Resumen: El objetivo fue caracterizar todos los residuos unidos para determinar si éstos incluían algún elemento inseguro.

Resultado: Todos los residuos unidos se caracterizaron y, con base en la caracterización, se confirmaron como seguros. Los estudios dilucidaron un entendimiento adicional sobre el metabolismo de carbadox. Confirmaron que la mayor parte de la dosis total de carbadox se excreta rápido, lo que era bien sabido. Pequeñas cantidades de carbadox y desoxicarbadox se recuperan a los 7 días, pero no a los 21 días. Todos los residuos a los 42 días son aductos QCA-polipéptido inertes y estables. QCA puede ser recuperado usando la extracción por hidrólisis del tejido y cuantificación establecidas para garantizar la ausencia de residuos con potencial cancerígeno.

Antecedentes

Los estudios de residuos radioactivos totales (TRR por sus siglas en inglés), son un componente del paquete de metabolismo estándar y residuos, que se llevan a cabo para la evaluación de seguridad alimentaria en humanos de los medicamentos veterinarios destinados a ser administrados en animales productores de alimento.

En el estudio TRR, se hace una preparación experimental, no comercial, marcada radioactivamente del medicamento veterinario de prueba. Para estos estudios se pueden usar diferentes radiomarcadores, incluyendo el carbono 14 (^{14}C). Cabe hacer notar que el producto comercial no contiene radioactividad. El material con ^{14}C usado en los estudios TRR comprende una síntesis especial no relacionada con la producción comercial.

El propósito de los estudios TRR con ^{14}C es permitir una determinación simple y universal de la absorción, distribución y destino (retención o excreción) del medicamento de prueba administrado a los animales experimentales. Los productos excretados y residuos, así como sus concentraciones se detectan y miden mediante la medición de la concentración del marcador ^{14}C . El ^{14}C no está presente en los tejidos de los animales control, por encima de concentraciones *de-minimus*.

El estudio TRR se usa para determinar en qué órganos de los animales de prueba y cuáles residuos están presentes en mayores concentraciones para determinaciones futuras de LMR. Las determinaciones de TRR en tejidos sólo miden el ^{14}C . Caracterizan los residuos en aquéllos

HEALTHY ANIMALS. HEALTHY FOOD. HEALTHY WORLD.®

que tienen una función biológica y consecuencia (p.ej., actividad toxicológica) y aquellos residuos que son productos de degradación inertes desde el punto de vista biológico, algunos de los cuales pueden ser simplemente ^{14}C en el conjunto estructural de carbono. Se requieren estudios adicionales que comprenden la caracterización química y determinación de metabolitos del medicamento específicos, de interés y se requiere que evalúen la relevancia biológica (identidad y concentración) de los residuos.

La evaluación química de residuos sólo puede medir la fracción de residuo extraíble. La fracción extraíble es la proporción de los residuos totales que pueden extraerse en una forma química identificable como un derivado del medicamento original. Los residuos no extraíbles o ligados son la fracción de residuo que no puede extraerse químicamente del tejido del animal y sólo se conocen porque representan una porción del residuo de ^{14}C total calculado que no ha sido considerado en la fracción extraíble. Los residuos unidos son sólo valores estimados. No pueden ser caracterizados químicamente y se asume, de manera convencional, que son inertes, desde el punto de vista biológico para el animal de destino y, de modo subsiguiente, para el consumidor del tejido.

El trabajo contemporáneo se llevó a cabo para abordar el problema hipotético presentado por la FDA de EE.UU. en el cual la Agencia postuló que: si el residuo unido era carbadox o cualquier residuo de importancia toxicológica, entonces esto representaría una situación insegura de los alimentos para humanos. No hubo evidencia para esta suposición y el abordaje contradice las metodologías de seguridad establecidas para los residuos en tejidos. Después de afirmar que el hígado es el órgano con la mayor concentración de residuos en todos los puntos de tiempo, los estudios se enfocaron en el tejido hepático ya que este tejido proporciona la medida más sensible de cualquier residuo de interés. Los residuos con importancia toxicológica podrían detectarse en tejido muscular un día después de retirar el medicamento, pero no a los 7 días.

Resumen de técnicas de estudio

La dosificación apropiada del carbadox radiomarcado con ^{14}C se estableció en 7 días, usando un abordaje convencional de medición de concentraciones plasmáticas para asegurar que se alcanzaban concentraciones estables.

La caracterización del residuo fundamental se enfocó en el tejido hepático recolectado después de un periodo de retiro de 42 días, ya que eso abordaba la preocupación hipotética planteada por la FDA de EE.UU. Esto es, ¿hay residuos de interés toxicológico presentes en el alimento? No se detectaron residuos de importancia toxicológica en hígado sujeto a un periodo de retiro de 21 días. No se detectaron residuos de importancia toxicológica en tejido muscular sujeto a un periodo de retiro de 7 días.

Aunque todas las técnicas analíticas usadas en estos estudios estuvieron bien establecidas, el abordaje que produjo el avance del conocimiento comprendió una combinación única de técnicas. Esto incluyó la radio cromatografía de capa fina más antigua (r-TLC) para proporcionar una detección universal de metabolitos persistentes de interés toxicológico no identificados previamente. Una vez que se afirmó que no había presentes nuevos metabolitos de importancia toxicológica, la plataforma analítica se movió a técnicas basadas en HPLC. Una serie única de pasos de extracción se empleó para recuperar progresivamente los residuos extraíbles con solvente (ninguno a los 42 días), entonces, el residuo unido se

HEALTHY ANIMALS. HEALTHY FOOD. HEALTHY WORLD.®

caracterizó usando digestión enzimática del tejido y cromatografía de exclusión de tamaño. Todo el residuo persistente se recuperó y confirmó como QCA inerte unido a elementos tisulares proteínicos.

Los estudios de unión mecánica *in vitro* confirmaron que carbadox y desoxicarbadox tienen afinidad por lisina y reaccionan para producir un aducto terminal irreversible QCA-lisina. El QCA libre no se une con lisina ya que es inerte.

Resumen del estudio fundamental sobre caracterización de residuos

Se ha llevado a cabo un análisis cualitativo exhaustivo de los residuos ligados en hígado de cerdo, después de 7 días de dosificación de [^{14}C]-Carbadox, seguidos por un periodo de retiro de 42 días.

En este estudio, 100% del total de residuos radioactivos se extrajo y caracterizó por cromatografía de exclusión de tamaño con radio detección, filtración por peso molecular, electroforesis en gel con radio detección y HPLC-MS/MS de alta resolución.

La cromatografía por exclusión de tamaño y filtración por peso molecular mostraron que los residuos radioactivos eran macromoléculas, en su mayoría con peso molecular mayor a 30 kDa. La cromatografía por exclusión de tamaño (radio detección y detección UV) y electroforesis en gel (con tinción específica de proteína y radiodetección) indicó que la radioactividad estaba unida a proteína.

La hidrólisis del residuo proteínico usando una base fuerte liberó QCA marcado con ^{14}C .

En la investigación de la naturaleza de los residuos ligados a proteína, la HPLC-MS/MS de alta resolución permitió la identificación de QCA ligado covalentemente con lisina. La observación de las masas exactas para QCA ligado a péptidos, junto con la identificación de múltiples fragmentos que eran coherentes con QCA ligado covalentemente con lisina que se originaban de esas masas exactas, proporcionaron evidencia para apoyar la identificación molecular de QCA ligado a lisina.

De manera adicional, la presencia de carbadox y desoxicarbadox se investigó mediante LC-MS/MS. Ninguno fue detectado en ninguna de las muestras analizadas.

Otras secciones / problemas

Países en los que actualmente el uso de Mecadox® (marca de carbadox) está permitido en cerdos

- México
- Nueva Zelanda
- Rusia
- Estados Unidos

En México, Rusia y EE.UU. el uso del producto antes del sacrificio está restringido por el requerimiento de un periodo de retiro mínimo de 42 días.

En Nueva Zelanda el producto aprobado es Mecadox Plus que es un producto con combinación fija que contiene Carbadox 50 g/kg y un antihelmíntico, citrato de morantel, a razón de 30 g/kg. En Nueva Zelanda Mecadox Plus sólo puede ser usado en cerdos hasta de 40 kg de peso vivo y es aplicable un periodo de retiro mínimo de 35 días antes del sacrificio.

Importancia veterinaria, costo de desarrollar un nuevo medicamento veterinario y consideraciones relacionadas

Uso veterinario

Carbadox se usa en cerdos jóvenes en crecimiento para tratar/prevenir la disentería porcina. Además, es efectivo para el control de ciertas enfermedades entéricas causadas por bacterias gram negativas, incluyendo salmonelosis. Aunque el producto tiene un periodo de retiro de 42 días, rara vez se usa en los 90 días previos al sacrificio.

La disentería porcina es causada por miembros del género bacteriano de espiroquetas *Brachyspira* spp.

Después de casi 50 años de uso, carbadox sigue siendo un agente antibacteriano efectivo para esta indicación y se considera ampliamente como el agente antibacteriano de control más importante para la disentería porcina.

Importancia Veterinaria y Médica

Carbadox es un medicamento antibacteriano veterinario que no se usa en humanos, no tiene uso análogo en humanos ni antimicrobianos relacionados de uso humano. Como se hizo notar previamente, es un agente único e importante de control para disentería porcina y algunas enfermedades entéricas por gram negativos en cerdos.

La ausencia de cualquier relación funcional con cualquier producto antibacteriano de uso humano, combinado con una larga historia de eficacia antibacteriana en cerdos jóvenes en crecimiento, hace de carbadox una herramienta importante para los veterinarios y productores de cerdos.

La introducción de varias restricciones nacionales, combinado con las preferencias de consumidores contra el uso de antimicrobianos “de importancia médica” en animales de consumo, ha aumentado la importancia veterinaria de carbadox conforme las preocupaciones importantes, reales o imaginarias, han limitado, de manera seria, el número total de medicamentos antimicrobianos disponibles para animales de consumo. La pérdida potencial de uno de los pocos antimicrobianos con alta efectividad, SIN importancia médica.

HEALTHY ANIMALS. HEALTHY FOOD. HEALTHY WORLD.®

Carbadox se usa para tratar/prevenir/controlar disentería porcina en cerdos jóvenes. Aunque el producto tiene un periodo de retiro de 42 días, rara vez se usa el producto en los 90 días previos al sacrificio. La necesidad técnica combinada con el mayor beneficio económico se enfoca al uso en cerdos jóvenes en crecimiento.

La disentería porcina es causada por miembros del género bacteriano de espiroquetas *Brachyspira* spp.

Carbadox sigue siendo muy efectivo para esta indicación y se considera, ampliamente, como el agente de control de disentería porcina más importante.

Resumen: Carbadox es muy efectivo, tiene pocas alternativas reales si es que las tiene y es uno de los pocos antimicrobianos sin importancia médica que es efectivo contra enfermedades por bacterias gram negativas. En esencia, carbadox es irremplazable y su pérdida en el mercado llevará a un incremento en el nivel de enfermedad y será una desventaja competitiva para los productores mexicanos en relación a los productores extranjeros que tienen acceso legal a Carbadox. En América del Norte, la ventaja será para los productores estadounidenses que exportarán con base en el TLC. Cualquier propuesta para restringir la entrada de carne de cerdo estadounidense a México podría traer consigo medidas compensatorias y restricciones como represalias comerciales importantes por parte de EE.UU. contra México.

Costo de desarrollar un nuevo medicamento antimicrobiano para cerdos

Las estimaciones de la industria varían mucho con respecto al costo para desarrollar un nuevo medicamento y pueden variar desde \$10 millones de dólares a más de \$100 millones. En realidad el límite inferior refleja sólo parte del costo de llevar una molécula bien identificada a través de los procesos de desarrollo de datos y aprobación regulatoria. Una presentación de la reunión del CCRVDF, llevada a cabo en Chicago, en 2018, por *Health for Animals* indicó que el proceso de escrutinio y rechazo de una molécula que comienza con 10,000 moléculas candidatas rechazará a todas menos 1-5 de 10,000 candidatas antes de incurrir en los costos regulatorios veterinarios finales. Esta estimación de 1:10,000 “éxitos” fue para cualquier tipo de medicamento veterinario. Para un antimicrobiano, tan sólo la tasa de éxito puede ser más baja, con costos mayores. Esa presentación se enfocó, únicamente, en la toxicología y estudios de residuos y su costo se estimó en unos \$6.2 millones de dólares. Todos los demás estudios regulatorios podían llegar fácilmente a un costo regulatorio de \$15-20 millones de dólares. Como se indicó, este valor asume que se ha descubierto una molécula candidata exitosa. Deberá agregarse el costo de escrutinio y evaluación de miles de candidatos no exitosos.

En el área específica de nuevos medicamentos antibacterianos, debe considerarse el aspecto adicional de la conservación potencial de los nuevos desarrollos para medicina humana. Con una preocupación global a la alta respecto a la resistencia microbiana, puede ser realista asumir que NO habrá nuevos antimicrobianos para animales de consumo en un futuro. Además, muchas políticas gubernamentales piden la remoción de antimicrobianos usados, en la actualidad, para manejar las enfermedades de los animales de consumo. El desarrollo de nuevas y muy efectivas soluciones no antimicrobianas para las enfermedades bacterianas de los animales y humanos es, en gran medida, especulativo e imaginario. Por lo general son declaraciones inocentes de relaciones públicas hechas para dar esperanzas al

HEALTHY ANIMALS. HEALTHY FOOD. HEALTHY WORLD.®

público e incluso, si fueran exitosas, una vez más sería probable que se conservaran para el uso humano.

Es poco probable que haya nuevos medicamentos antibacterianos para uso en animales de consumo en el futuro y es casi seguro que cualquiera que se pierda no será reemplazado, de modo que los productores de animales y los veterinarios tendrán que manejarse, de manera permanente, sin esa solución. Una versión limitada de esta situación aplica a la industria de los pavos en EE.UU. La FDA ha prohibido ahora todos los medicamentos aprobados previamente para la enfermedad de cabeza negra (histomoniasis) porque esos compuestos eran viejos y no tenían establecidos ADIs/LMRs. Algo importante es que ningún patrocinador estaba preparado para invertir en trabajo adicional para apoyar el uso seguro de estos medicamentos. Cuando ocurra un brote grave de cabeza negra no habrá control para la enfermedad y con frecuencia, la mortalidad resultante es tan alta que el limitado número de aves que sobreviva deberá ser sacrificado, de manera humanitaria, ya que no es económicamente viable terminar su engorda. Como carbadox, los medicamentos anti histomonas conllevan recomendaciones del riesgo de manejo del Codex, respecto a que el consumidor deberá ser protegido de residuos (dañinos) en los alimentos. Por fortuna para los productores de cerdos, Phibro ha llevado a cabo la inversión contemporánea para actualizar los datos de residuos en alimentos para cumplir con las necesidades actuales y afirmar la seguridad de las condiciones de uso autorizadas. Esto proporciona a los reguladores la ciencia que necesitan para apoyar la continuación de la autorización de carbadox para usarse en cerdos.

Resumen: Sería muy difícil y costoso desarrollar una nueva alternativa para carbadox. Además es poco probable que incluso si se desarrollara una nueva alternativa antimicrobiana se permitiera su uso en animales de consumo. Casi a ciencia cierta se restringiría para uso en humanos. Desarrollar una solución no antimicrobiana que fuera efectiva es, simplemente, una propuesta hipotética en este momento y otra vez, si se desarrollara probablemente se conservaría para uso humano.

La inversión reciente en la caracterización de los residuos de carbadox apoya el uso seguro de este medicamento según su autorización y proporciona la evidencia científica para los reguladores a fin de retener la autorización de carbadox.

Pérdida de competitividad inducida por política en la UE

La Unión Europea ha disminuido de manera tan significativa la competitividad de su sector de producción de animales de consumo en las últimas dos décadas, que los productores domésticos con frecuencia no pueden competir con los granjeros extranjeros que no tienen estas restricciones arbitrarias. Muchas corporaciones agropecuarias de la UE han reubicado su producción en jurisdicciones mas amigables desde el punto de vista agropecuario, incluyendo a Brasil.

La UE está trabajando en la actualidad en una “legislación de reciprocidad” y acuerdos bilaterales de libre comercio, que utiliza para alentar a los países proveedores a someterse a desventajas de producción similares a las experimentadas por los agricultores de la UE en un intento de poner en igual desventaja a los productores no pertenecientes a la UE. Queda por ver si los países que comercian con la UE dañarán voluntariamente sus propias economías agropecuarias para ayudar a la competitividad de los granjeros de la UE y si cualquiera de

HEALTHY ANIMALS. HEALTHY FOOD. HEALTHY WORLD.®



los beneficios prometidos es suficiente para compensar los incrementos en el costo de los alimentos en esos países proveedores.

La pérdida de carbadox en México reduciría la capacidad de los productores mexicanos para manejar las enfermedades entéricas en cerdos como ha pasado en la UE.

Bajo el TLC, cualquier reducción en la competitividad doméstica debida a la pérdida de carbadox en México puede proporcionar una ventaja competitiva significativa para los porcicultores de EE.UU. donde carbadox sigue autorizado. El costo de este cambio económico propuesto correrá a cargo de los productores mexicanos.

Carbadox en EE.UU.

Mecadox® (marca de carbadox) está autorizado actualmente para usarse en EE.UU. y ha estado aprobado por más de 40 años. En 2016 la FDA emitió un Aviso de Oportunidad para Audiencia en relación a carbadox. En marzo 2018 la Agencia detuvo (suspendió) definitivamente este procedimiento legal. No hay una claridad definitiva con respecto a la probabilidad del resultado final de la revisión de la FDA. Una interpretación es que al suspender públicamente los procedimientos legales, la Agencia considera que dichos procedimientos legales contra carbadox ya no son relevantes para el futuro estatus de aprobación de carbadox en EE.UU.

HEALTHY ANIMALS. HEALTHY FOOD. HEALTHY WORLD.®

Carbadox (Mecadox®)

Documento técnico

Carbadox es un compuesto antimicrobiano manufacturado sintéticamente. Phibro Animal Health manufactura el Carbadox en forma de premezcla (Mecadox®) para adicionarse en el alimento de los cerdos como agente terapéutico para el tratamiento de enfermedades entéricas.

En la industria porcina mexicana el compuesto ha sido utilizado como tratamiento de primera elección para infecciones entéricas debido a su eficiencia en comparación con otras moléculas. Los líderes del mercado enfocan su uso durante el periodo del destete, el cual se caracteriza por cambios ambientales, nutricionales y sociales que causan una alta incidencia de infecciones entéricas y reducción del bienestar animal.

Diversos estudios muestran que el control óptimo de las infecciones entéricas durante esta etapa crítica, reduce la mortalidad, mejora la relación consumo de alimento/ganancia de peso durante la vida productiva del cerdo y reduce los días necesarios para alcanzar el peso de sacrificio.

El uso de Carbadox en la porcicultura representa una herramienta de eficiencia y rentabilidad, el cual es utilizado aproximadamente en más de la mitad de la producción nacional que impacta de forma significativa en la cantidad de carne de cerdo producida.

En el sentido opuesto, la no disponibilidad de Carbadox predispondría a la muerte de miles de cerdos, a la reducción del bienestar animal y una considerable disminución en la rentabilidad de las empresas porcícolas.

Durante los pasados 40 años se han conducido estudios científicos para demostrar la seguridad del Carbadox en cerdos, para los trabajadores, para el consumidor y para el medio ambiente. Diversas autoridades tanto científicas como gubernamentales alrededor del mundo, periódicamente han revisado estas investigaciones.

No existe evidencia indicativa de que el Carbadox cause cáncer en humanos. Se llevó a cabo un estudio de toxicidad con Carbadox durante dos años en primates, a niveles de 2, 4 y 8 veces la dosis recomendada en cerdos. No se encontraron efectos adversos o anormalidades a la necropsia. Un estudio de toxicidad de dos años conducido en ratas, a niveles de 1, 2 y 4 veces la dosis recomendada en cerdos, mostró necrosis hepática dependiente de la dosis e hiperplasia benigna. Tres de catorce ratas alimentadas con 10 veces la dosis desarrollaron tumores en el hígado 14 a 16 meses después de la administración de la droga. No hay evidencia de que el Carbadox dañe el material genético de las células germinales. Estudios reproductivos durante tres generaciones realizados en ratas alimentadas con la dosis recomendada, mostraron que Carbadox no tuvo efectos adversos sobre fertilidad, reproducción, lactancia o el neonato.

El metabolismo del Carbadox es similar en ratas, monos y cerdos. Debido a que no se notan efectos adversos en monos y cerdos, parece ser que la toxicidad hepática observada en la rata representa una sensibilidad específica de especie de la rata al Carbadox. Esta hepatotoxicidad bien puede ser causada por la excepcional actividad regenerativa del hígado que se sabe ocurre en las ratas. El valor predecible de los tumores inducidos experimentalmente en roedores está lejos de ser absoluto y poco se sabe acerca de su valor predecible para humanos. La sacarina es otro ejemplo clásico de un compuesto que resulta específico de especie en su toxicidad hacia ratas, aun cuando su uso en humanos es seguro.

Metabolismo y eliminación

Carbadox es rápidamente metabolizado por el cerdo a su principal metabolito, el ácido quinoxalin-2-carboxílico (QCA, por sus siglas en inglés). El desoxicarbadox es un metabolito intermedio, de formación temprana y de vida corta. Tanto el Carbadox como el desoxicarbadox prácticamente desaparecen (<2 ppb) de todos los tejidos comestibles del cerdo, incluyendo el hígado, dentro de las 72 horas siguientes al retiro del alimento medicado. Aún con nulo periodo de retiro, ninguno de los tres componentes ha sido encontrado en tejido muscular a concentraciones por arriba de los niveles máximos permitidos (MRL) de 30 ppb. El QCA es el único residuo detectado en el hígado después de 72 horas de periodo de retiro. La seguridad del QCA ha sido probada mediante prolongados estudios de toxicidad en ratas, sin efectos adversos después de dos años a una dosis de 50 mg/Kg/día (20 veces la dosis). Este y otros estudios han demostrado que el QCA no es carcinogénico. Se realizó un estudio en cerdos para determinar el perfil de eliminación del QCA de hígado y músculo después del periodo de retiro de un alimento conteniendo Carbadox a razón de 55 ppm. Los niveles de QCA en hígado estuvieron por debajo del nivel de tolerancia de 30 ppb después de un periodo de retiro de 28 días.

El QCA desaparece del tejido muscular, pero se encuentra en el hígado. Por lo tanto, el hígado se ha identificado como el órgano blanco para el QCA. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha recomendado niveles residuales máximos de 30 ppb de QCA en hígado (36^{vo} Reporte del Comité Conjunto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimenticios, 1990).

Seguridad

Mecadox[®], la marca de Phibro Animal Health para carbadox, ha sido específicamente formulado para reducir al mínimo la liberación de Carbadox a partir de la premezcla o de los alimentos que la contienen. Es esta propiedad de baja polvosidad la que ofrece certeza en la seguridad para los trabajadores que manejan Carbadox. Los estudios de riesgo han pronosticado una dosis virtualmente segura (VSD, por sus siglas en inglés). La VSD para Carbadox es $1.2 - 4.7 \times 10^{-4}$ mg/Kg peso al día. Se llevó a cabo una serie de estudios donde se midió la exposición e ingestión potenciales de los trabajadores al Carbadox. El rango obtenido en los trabajadores expuestos fue $<0.08 - 0.25 \times 10^{-4}$ mg/Kg de peso al día, equivalente a menos de una décima de la VSD. Las Buenas Prácticas de Manufactura e higiene en el trabajo, como son el uso de mascarillas contra polvo y el funcionamiento adecuado del equipo resultan en márgenes de seguridad aún mayores.

El ingrediente activo de Mecadox, Carbadox, es un miembro de la familia de las quinoxalinas. Investigado mundialmente por varias décadas. Mecadox, el carbadox original. Antimicrobiano con excelente acción contra las principales bacterias patógenas intestinales: *Brachyspira hyodysenteriae* (disentería porcina) *Salmonella choleraesuis*, *E. coli*, *Clostridium* spp. *Lawsonia intracellularis* (Ileitis). Mejorador de la productividad en diversas condiciones de crianza, favorece el mejor aprovechamiento del alimento y promueve mayor depósito de tejido muscular

Administración y Dosis

Mecadox* se administra por vía oral mezclado en el alimento a razón de 55 ppm de Carbadox en animales jóvenes (hasta 35 Kg PV) con un periodo de retiro de 42 días.

Phibro versus la FDA

El 11 de julio de 2016 Phibro remitió a la Food and Drug Administration (FDA) los hallazgos de varios nuevos estudios que confirman la seguridad del Carbadox.

- En abril de 2016 Phibro presentó un expediente con datos, información y análisis de soporte para la audiencia, que incluía los hallazgos de nuevos estudios que confirmaban la seguridad del Carbadox.
- En su “Noticia de Oportunidad para una Audiencia” (NOOH, por sus siglas en inglés), el Centro de Medicina Veterinaria (CVM) puede revisar nueva evidencia de soporte generada respecto al algún medicamento.
- Los nuevos estudios presentados por Phibro confirmaron la seguridad del Carbadox, refutando así la propuesta del CVM de retirar la aprobación para el uso del Carbadox en alimento medicado para cerdos.
- Los datos presentados refutan contundentemente lo que planteaba el CVM, y reconfirmaron que el Carbadox es seguro.
- Adicionalmente se hizo ver al CVM que retirar su aprobación traería como consecuencia un impacto dañino tanto en la salud porcina como en la salud de los humanos, y particularmente en la industria porcina.
- Científicos de los Laboratorios Charles River así como de la Universidad de Edimburgo, hicieron investigaciones con métodos científicos para extraer y analizar ubicar los residuos de Carbadox unidos a los tejidos, mucho más allá de lo se había logrado detectar previamente.
- Phibro ha trabajado y llevado a cabo en los últimos 4 años la tecnología más avanzada, denominada Residuo Radioactivo Total, y otras técnicas de extracción adaptadas específicamente para aclarar las inquietudes de la FDA.
- En todos los estudios realizados, no hubo residuos carcinogénicos detectables en la carne de los animales tratados con Carbadox.
- Los científicos lograron extraer el 100% de los residuos presentes al final del periodo de aprobación de 42 días aprobado por la FDA, y determinaron que no hay residuos dañinos presentes.
- Las investigaciones realizadas incluyo la caracterización de los residuos, para demostrar que son seguros.
- Es importante señalar que la FDA se basó para su decisión de retirar la aprobación, en estudios realizados en 1990-1991; en 2003 y 2009, pero esas referencias no probaban que el Carbadox no fuera seguro, solo sustentaban la hipótesis de que los metabolitos eran potencialmente carcinogénicos.
- Se concluye que los estudios demostraron categóricamente que los residuos derivados del Carbadox que permanecen al término del periodo de retiro, incluyen el QCA unido al tejido (metabolito inocuo, no carcinogénico), refutando así los alegatos de la FDA de que los residuos unidos a tejidos eran presumiblemente carcinogénicos.
- En pocas palabras, Phibro demostró que el Carbadox es seguro.

Para terminar y respecto a salud pública, se resalta el hecho de que el Carbadox no se usa en medicina humana, por lo cual fue preferido para tratar enfermedades de los animales.

El retiro del Carbadox:

- a) Sería contrario a los objetivos de salud pública respecto al uso responsable de antibióticos.
- b) Conduciría al mayor uso de antibióticos alternativos de uso en humanos, para tratar enfermedades entéricas en cerdos
- c) Aumentaría la probabilidad de resistencia antimicrobiana de difícil control en patógenos bacterianos importantes en salud animal.
- d) Es contrario a los objetivos de la actual iniciativa antimicrobiana de la FDA. En su "Guía para la Industria (GFI) #209 y #213, la FDA busca asegurar el "uso juicioso de los antimicrobianos médicamente importantes" utilizados para tratar enfermedades en humanos para fines del 2016.
- e) No existe un sustituto terapéutico o preventivo ideal para el Carbadox.

Finalmente, se resalta que:

1. La no disponibilidad de Carbadox ha tenido serias consecuencias en otros países que no deberían reflejarse en los países que sí lo utilizan, como EUA y México.
2. En una encuesta entre especialistas veterinarios en porcinos en EUA, manifestaron que se oponen a la prohibición del uso del Carbadox.
3. Los especialistas expresaron la preocupación de que al retirar el Carbadox, aumentarían las enfermedades como *Salmonella*, disentería porcina y *Escherichia coli*.
4. Algunos estimaban que la remoción del Carbadox traería muertes de más de un millón de cerdos al año.
5. También afectaría a la economía del país, pues aumentarían los costos por el tratamiento de enfermedades que normalmente se controlan con el Carbadox. Se estima que, en EUA, el costo del primer año de su retiro en la industria porcícola costaría 200 millones de dólares; y se prevé que los costos anuales continuarían creciendo hasta alcanzar 345 millones de dólares.

El Carbadox se ha venido utilizando con seguridad en los Estados Unidos de América por más de 40 años. No se han encontrado residuos en los tejidos a los cuales se le puedan atribuir efectos cancerígenos.

Phibro continuará proveyendo la investigación información necesaria para que el público, la autoridad y los porcicultores tengan la tranquilidad de su uso seguro.

TABLA DE LÍMITES MÁXIMOS DE RESIDUOS, 2017.

Los valores de la tabla se encuentran en unidades de µg/kg= partes por billón (PPB).

ND= No detectado, límite de tolerancia cero.

NA= No aplica, no se monitorea en esa especie y/o matriz.

Las celdas en color gris se consideran límite de tolerancia cero hasta que se establezca un límite.

FAMILIA	COMPUESTOS	MATRÍZ	BOVINO	EQUINO	PORCINO	OVINO	AVE	CAPRINO	CERVIDO	CRUSTÁCEOS	PECES	ABEJAS				
ESTILBENOS	DIETILESTILBESTROL (DES)	HÍGADO MÚSCULO	ND ND	ND ND	ND ND	ND ND	ND ND	ND ND	ND ND	NA ND	NA ND	NA				
TIROSTATICOS	METILTIOURACILO	MÚSCULO ORINA	ND ND	ND ND	ND ND	ND ND	ND ND	ND ND	ND ND	NA	NA	NA				
	FENILTIOURACILO	MÚSCULO ORINA	ND ND	ND ND	ND ND	ND ND	ND ND	ND ND								
	DIMETILTIOURACILO	MÚSCULO ORINA	ND ND	ND ND	ND ND	ND ND	ND ND	ND ND								
	PROPILTIOURACILO	MÚSCULO ORINA	ND ND	ND ND	ND ND	ND ND	ND ND	ND ND								
ESTEROIDES	ACETATO DE MELENGESTROL	MÚSCULO HÍGADO	1 10							NA	NA	NA				
		ORINA MÚSCULO								NA	NA					
	ETINILESTRADIOL	HÍGADO ORINA								NA	NA					
		MÚSCULO HÍGADO														
	TRENBOLONA (17α-TRENBOLONA)	ORINA MÚSCULO								NA	NA					
		HÍGADO	2 10													
	NORTESTOSTERONA (EPI-NANDROLONA)	ORINA MÚSCULO								NA	NA					
		HÍGADO														
	BOLDENONA	ORINA MÚSCULO								NA	NA					
		HÍGADO														
	DEXAMETASONA	MÚSCULO HÍGADO	1 2	1 2	1 2	0.75 2	0.75 2	0.75 2	0.75 2	NA	NA					
		LECHE	0.3													
	ESTANOZOLOL (16β-HIDROXOESTANOZOLOL)	ORINA MÚSCULO														
HÍGADO																
METILTESTOSTERONA	ORINA MÚSCULO															
	HÍGADO															
ACIDO LACTONAS RESORSILICAS	ZERANOL Y METABOLITO TALERANOL	MÚSCULO HÍGADO	2 10							NA	NA	NA				
β-AGONISTAS	CLENBUTEROL, BROMBUTEROL, CLORBROMBUTEROL MABUTEROL, HIDROXIMETILCLENBUTEROL Y SALBUTAMOL	MÚSCULO HÍGADO RIÑON GRASA ORINA SUERO LECHE	ND ND ND ND ND ND ND	ND ND ND ND ND ND NA	ND ND ND ND ND ND NA	ND ND ND ND ND ND NA	ND ND ND ND ND ND NA	ND ND ND ND ND ND NA	ND ND ND ND ND ND NA	NA	NA	NA				
		ZILPATEROL	MÚSCULO HÍGADO RIÑON	10 12 15	ND ND ND	ND ND ND	ND ND ND	ND ND ND	ND ND ND				ND ND ND			
			RACTOPAMINA	MÚSCULO HÍGADO RIÑON GRASA	10 40 90 10	ND ND ND ND	10 40 90 10	ND ND ND ND	ND ND ND ND				ND ND ND ND	ND ND ND ND		
				ANFENICOLES	CLORANFENICOL	MÚSCULO HUEVO MIEL LECHE	ND NA NA ND	ND NA NA NA	ND NA NA NA				ND NA NA NA	ND NA NA NA	ND NA NA NA	ND NA NA NA
		FLORFENICOL				MÚSCULO HÍGADO RIÑON MÚSCULO HÍGADO RIÑON LECHE	200 3000 300 50 50 50 50	100 2000 300 50 50 50 50	300 2000 500 50 50 50 50				300 3000 500 50 50 50 50	200 2500 300 ND ND ND ND	100 3000 300 50 50 50 50	100 NA NA 50 NA NA NA
			TIANFENICOL		MÚSCULO HÍGADO RIÑON LECHE	50 50 50 50	NA NA NA NA	NA NA NA NA	NA NA NA NA				NA ND ND NA	NA 50 50 50	NA NA NA NA	NA NA NA NA
		NITROIMIDAZOLES		DIMETRIDAZOL (2-hidroximetil-1-metil-5-nitro-1H-imidazol (HMNNI))	MÚSCULO HUEVO MIEL LECHE	ND NA NA ND	ND NA NA NA	ND NA NA NA	ND NA NA NA				ND NA NA NA	ND NA NA NA	ND NA NA NA	ND NA NA NA
	METRONIDAZOL (HIDROXI-METRONIDAZOL)		MÚSCULO HUEVO MIEL LECHE		ND NA NA ND	ND NA NA NA	ND NA NA NA	ND NA NA NA	ND NA NA NA	ND NA NA NA	ND NA NA NA		ND NA NA NA	NA		
			RONIDAZOL (2-hidroximetil-1-metil-5-nitro-1H-imidazol (HMNNI))		MÚSCULO HUEVO MIEL LECHE	ND NA NA ND	ND NA NA NA	ND NA NA NA	ND NA NA NA	ND NA NA NA	ND NA NA NA		ND NA NA NA	ND NA NA NA	NA	
					IPRONIDAZOL (HIDROXI-IPRONIDAZOL)	MÚSCULO HUEVO MIEL LECHE	ND NA NA ND	ND NA NA NA	ND NA NA NA	ND NA NA NA	ND NA NA NA		ND NA NA NA	ND NA NA NA	ND NA NA NA	NA
NITROFURANOS				FURALTADONA (AMOZ)		MÚSCULO HUEVO MIEL LECHE	ND NA NA ND	ND NA NA NA	ND NA NA NA	ND NA NA NA	ND NA NA NA	ND NA NA NA	ND NA NA NA	ND NA NA NA	NA	
	FURAZOLIDONA (AOZ)					MÚSCULO HUEVO MIEL LECHE	ND NA NA ND	ND NA NA NA	ND NA NA NA	ND NA NA NA	ND NA NA NA	ND NA NA NA	ND NA NA NA	ND NA NA NA	NA	
			NITROFURANTOINA (AHD)			MÚSCULO HUEVO MIEL LECHE	ND NA NA ND	ND NA NA NA	ND NA NA NA	ND NA NA NA	ND NA NA NA	ND NA NA NA	ND NA NA NA	ND NA NA NA	NA	
						MÚSCULO HUEVO MIEL LECHE	ND NA NA ND	ND NA NA NA	ND NA NA NA	ND NA NA NA	ND NA NA NA	ND NA NA NA	ND NA NA NA	ND NA NA NA	NA	

	NITROFURAZONA (SEM)	HUEVO	NA	NA	NA	NA	ND	NA	NA	NA	NA	NA	NA	ND
		MIEL	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
β- LACTAMICOS	PENICILINA	LECHE	ND	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		MUSCULO	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	NA
		HIGADO	50	50	50	50	50	50	50	50	NA	NA	NA	NA
		RIÑON	50	50	50	50	50	50	50	50	NA	NA	NA	NA
	AMPICILINA	MIEL	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		LECHE	4.0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		MUSCULO	10	50	10	50	50	50	50	50	50	50	50	NA
		HIGADO	10	50	10	50	50	50	50	50	NA	NA	NA	NA
	DICLOXACILINA	RIÑON	10	50	10	50	50	50	50	50	NA	NA	NA	NA
		LECHE	4.0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		MUSCULO	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	NA
		HIGADO	300	300	300	300	300	300	300	300	NA	NA	NA	NA
	OXACILINA	RIÑON	300	300	300	300	300	300	300	300	NA	NA	NA	NA
		MUSCULO	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	NA
	CLOXACILINA	HIGADO	300	300	300	300	300	300	300	300	NA	NA	NA	NA
		MUSCULO	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	NA
AMINOGLUCOSIDOS	ESTREPTOMICINA Y DIHIDROESTREPTOMICINA SOLAS O EN COMBINACIÓN	HIGADO	600	500	600	600	600	600	500	500	NA	NA	NA	NA
		HIGADO	600	500	600	600	600	500	500	500	NA	NA	NA	NA
		RIÑON	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	NA	NA	NA	NA
		HUEVO					1000				NA	NA	NA	NA
	NEOMICINA	MIEL	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		LECHE	200	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		MUSCULO	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	NA
		HIGADO	500	500	500	500	500	500	500	500	NA	NA	NA	NA
		RIÑON	10000	5000	10000	10000	10000	10000	5000	5000	NA	NA	NA	NA
		HUEVO	NA	NA	NA	NA	500	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
TETRACICLINAS	TETRACICLINA, CLORTETRACICLINA, OXITETRACICLINA Y SUS 4-EPIMEROS CORRESPONDIENTES, SOLAS O EN COMBINACIÓN	LECHE	1500	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		MIEL	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		MUSCULO	200	100	200	200	200	100	100					NA
		HIGADO	600	300	600	600	600	300	300	NA	NA	NA	NA	NA
	DOXICICLINA	RIÑON	1200	600	1200	1200	1200	600	600	NA	NA	NA	NA	NA
		HUEVO	NA	NA	NA	NA	400	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		MIEL	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		LECHE	100	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	TETRACICLINA Y SU 4-EPIMERO CLORTETRACICLINA Y SU 4-EPIMERO OXITETRACICLINA Y SU 4-EPIMERO	MUSCULO	100		100		100							NA
		HIGADO	300		300		300				NA	NA	NA	NA
MACROLIDOS	ERITROMICINA	RIÑON	600		600		600				NA	NA	NA	NA
		MUSCULO									100	100	100	100
		HIGADO									100	100	100	100
		MUSCULO									200	200	200	200
	SULFADIMETOXINA	HUEVO	200	200	200	200	100	200	200	200	200	200	200	200
		HIGADO	200	200	200	200	100	200	200	NA	NA	NA	NA	NA
		RIÑON	200	200	200	200	100	200	200	NA	NA	NA	NA	NA
		HUEVO	NA	NA	NA	NA	50	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
SULFONAMIDAS	SULFADIMETOXINA	LECHE	40	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		MIEL	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		MUSCULO	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
		HIGADO	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	SULFAPIRIDINA	HUEVO	NA	NA	NA	NA	100	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		MIEL	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		LECHE	100	NA	NA	NA	100	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		MUSCULO	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	SULFAMETAZINA (sulfadimidina)	HIGADO	100	100	100	100	100	100	100					NA
		HUEVO	NA	NA	NA	NA	100	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		MIEL	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		LECHE	25	NA	NA	NA	100	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	SULFATIAZOL	MUSCULO	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
		HIGADO	100	100	100	100	100	100	100					NA
		HUEVO	NA	NA	NA	NA	100	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		MIEL	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	SULFADOXINA	LECHE	100	NA	NA	NA	100	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		MUSCULO	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
		HIGADO	100	100	100	100	100	100	100					NA
		HUEVO	NA	NA	NA	NA	100	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	SULFAMERAZINA	MIEL	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		LECHE	100	NA	NA	NA	100	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		MUSCULO	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
		HIGADO	100	100	100	100	100	100	100					NA
	SULFACLOROPIRIDAZINA	HUEVO	NA	NA	NA	NA	100	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		MIEL	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		LECHE	100	NA	NA	NA	100	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		MUSCULO	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	SULFADIAZINA	HIGADO	100	100	100	100	100	100	100					NA
		HUEVO	NA	NA	NA	NA	100	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		MIEL	NA	NA	NA	NA	99	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		LECHE	100	NA	NA	NA	100	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	SULFISOXASOL	MUSCULO	100	100	100	100	100	100	100	100				NA
		HIGADO	100	100	100	100	100	100	100					NA
		HUEVO	NA	NA	NA	NA	100	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		MIEL	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	SULFAQUINOXALEINA	LECHE	100	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		MUSCULO	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
		HIGADO	100	100	100	100	100	100	100					NA
		HUEVO	NA	NA	NA	NA	100	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
QUINOLONAS	ENROFLOXACINO Y CIPROFLOXACINO SOLAS O EN COMBINACION	LECHE	100	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		MUSCULO	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
		HIGADO	300	200	200	300	200	300	200	NA	NA	NA	NA	NA
		MIEL	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	DANOFLOXACINO	MUSCULO	200	100	100	100	200	100	100	100	100	100	100	100
		HIGADO	400	200	50	200	400	200	200	NA	NA	NA	NA	NA
		MIEL	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		MUSCULO					10							NA
	SARAFLOXACINO	HIGADO					80							NA
		MIEL	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		MUSCULO	400	300	400	400	300	400	400	300	300	300	300	NA
		HIGADO	1400	800	800	1400	1900	1400	1400	NA	NA	NA	NA	NA
	MARBOFLOXACINO	MIEL	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		MUSCULO	150		150									NA

		HIGADO	150		150				NA	NA	NA	NA
		MIEL	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	FLUMEQUINA	MUSCULO	500	200	500	500	500	200	200	200	600	NA
		HIGADO	500	500	500	500	500	500	500	NA	NA	NA
		MIEL	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	ACIDO OXOLINICO	MUSCULO	100	100	100	100	100	100	100	100	100	NA
ANTHELMINTICOS (BENCIMIDAZOLES)		HIGADO	150	150	150	150	150	150	150	NA	NA	NA
		MIEL	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	ALBENDAZOL	MUSCULO	100	200	200	200	200	200	200			
		HIGADO	100	200	200	200	200	200	200	NA	NA	
	CARBENDAZIM	MUSCULO	100	100	100	100	100	100	100			
		HIGADO	100	100	100	100	100	100	100	NA	NA	
	FENBENDAZOL Y METABOLITO OXFENDAZOL, SOLAS O EN COMBINACION	MUSCULO	100	100	100	100		100	100			
		HIGADO	500	500	500	500		500	500	NA	NA	
	CAMBENDAZOL	HIGADO	100	100	100	100	100	100	100	NA	NA	
	TIABENDAZOL Y SU METABOLITO 5-OH TIABENDAZOL, SOLAS O EN COMBINACION	MUSCULO	100	100	100	100	100	100	100			
ANTHELMINTICOS (IMIDAZOLES)		HIGADO	100	100	100	100	100	100	100	NA	NA	
	MEBENDAZOL	HIGADO	100	100	100	100	100	100	100	NA	NA	
ANTHELMINTICOS (IVERMECTINAS)	LEVAMISOL	MUSCULO	10		10	10						NA
		HIGADO	100		100	100	100				NA	NA
	IVERMECTINA H2B1a	MUSCULO	10		20							
		HIGADO	100		15	15				NA	NA	
	ABAMECTINA	MUSCULO				20						
		HIGADO	100			25				NA	NA	
ANTHELMINTICOS (IVERMECTINAS)	DORAMECTINA	MUSCULO	10	40	5							
		HIGADO	100	100	100					NA	NA	
	MOXIDECTINA	MUSCULO	20	50		50			20			
		HIGADO	100	100		100			100	NA	NA	
	MONENSINA	MUSCULO	10			10	10	10		NA	NA	
		HIGADO	20			20	10	20		NA	NA	
ANTICOCCIDIANOS	SALINOMICINA	MUSCULO								NA	NA	
		MUSCULO					200			NA	NA	
	NICARBAZINA	HIGADO					200			NA	NA	
		HUEVO	NA	NA	NA	NA		NA	NA	NA	NA	
CARBAMATOS	ALDICARB	MUSCULO	10	10	10	10		10	10	NA	NA	
	OXAMYL	MUSCULO	20	20	20	20	20	20	20	NA	NA	
	METHOMIL	MUSCULO	20	20	20	20	20	20	20	NA	NA	
PIRETROIDES	CIPERMETRINA	GRASA	1000	200	200	1000	100	200	200			
	DELTAMETRINA	GRASA	500	500	500	500		500	500			
	PERMETRINA	GRASA	1000	1000	1000	1000		1000	1000			
	FENVALERATO	GRASA	1000	1000	1000	1000		1000	1000			
	FLUVALINATO	MIEL	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
TRANQUILIZANTES	CARAZOOL	MUSCULO	5		5							
	AZAPERONE Y METABOLITO AZAPEROL	MUSCULO			60							NA
ANTIINFLAMATORIOS	FLUNIXIN	MUSCULO	20	10	50							
		HIGADO	300	100	200							NA
QUINOXALINICOS	FENILBUTAZONA Y METABOLITO OXIFENBUTAZONA CARBADOX (QCA)	MUSCULO	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND			NA
		MUSCULO	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND			NA
PLAGUICIDAS ORGANOCOLORADOS		HUEVO	NA	NA	NA	NA	ND	NA	NA	NA	NA	
		GRASA	300	300	300	300	300	300	300			NA
	ALDRIN	HUEVO	NA	NA	NA	NA	300	NA	ND	NA	NA	
		MIEL	NA	NA	NA	NA	NA	NA	ND	NA	NA	
		LECHE	ND	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
		GRASA	300	300	300	300	300	300	300			NA
	BHC Y SUS METABOLITOS	HUEVO	NA	NA	NA	NA		NA	NA	NA	NA	
		MIEL	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
		LECHE	100	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
		GRASA	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000			NA
	DDT Y METABOLITOS	HUEVO	NA	NA	NA	NA		NA	NA	NA	NA	
		MIEL	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
		LECHE	50	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
		GRASA	300	300	300	300	300	300	300			NA
	DIELDRIN	HUEVO	NA	NA	NA	NA		NA	NA	NA	NA	
		MIEL	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
		LECHE	ND	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
		GRASA	300	300	300	300	300	300	300	NA	NA	NA
	ENDRIN	HUEVO	NA	NA	NA	NA		NA	NA	NA	NA	
		MIEL	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
		LECHE	ND	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
		GRASA	200	200	200	200	200	200	200			NA
	HEPTACLORO	HUEVO	NA	NA	NA	NA		NA	NA	NA	NA	
		MIEL	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
		LECHE	6	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
		GRASA	200	200	200	200	200	200	200			NA
	HEPTACLORO EPOXIDO	HUEVO	NA	NA	NA	NA		NA	NA	NA	NA	
		MIEL	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
		LECHE	50	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
		GRASA	200	200	200	200	200	200	200			NA
	ENDOSULFAN Y METABOLITOS	HUEVO	NA	NA	NA	NA		NA	NA	NA	NA	
		MIEL	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
		LECHE	50	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GRASA	7000	7000	4000	7000	4000	7000	7000			NA
	LINDANO	HUEVO	NA	NA	NA	NA		NA	NA	NA	NA	NA
		MIEL	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
		LECHE	ND	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GRASA	3000	3000	3000	3000	3000	3000	3000			NA
		HUEVO	NA	NA	NA	NA		NA	NA	NA	NA	NA
	METOXICLORO	MIEL	NA	NA	NA	NA		NA	NA	NA	NA	NA
		LECHE	ND	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		GRASA	100	100	100	100	100	100	100			NA
	MIREX	HUEVO	NA	NA	NA	NA		NA	NA	NA	NA	NA
		MIEL	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
		LECHE	ND	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
BIFENILOS POLICLORADOS	AROCLOR 1242	GRASA	3000	3000	3000	3000	3000	3000	3000	NA	NA	
	AROCLOR 1248	GRASA	3000	3000	3000	3000	3000	3000	3000	NA	NA	
	AROCLOR 1254	GRASA	3000	3000	3000	3000	3000	3000	3000	NA	NA	
	AROCLOR 1260	GRASA	3000	3000	3000	3000	3000	3000	3000	NA	NA	
	AROCLOR 1016	GRASA	3000	3000	3000	3000	3000	3000	3000	NA	NA	
	AROCLOR 1221	GRASA	3000	3000	3000	3000	3000	3000	3000	NA	NA	
		AROCLOR 1232	GRASA	3000	3000	3000	3000	3000	3000	NA	NA	
		MUSCULO	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	NA	NA	
		HIGADO	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	NA	NA	
		MIEL	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	100
		LECHE	15	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
		MUSCULO	20	20	100	20	50	20	20			NA
	DICLORVOS	HIGADO	20	20	100	20	50	20	20			
		MIEL	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
		LECHE	20	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
		MUSCULO	700	700	700	700	700	700	700			NA

**PROGRAMA NACIONAL DE CONTROL Y MONITOREO
DE RESIDUOS TÓXICOS EN BIENES DE ORIGEN
ANIMAL, RECURSOS ACUÍCOLAS Y PESQUEROS 2017
Y RESULTADOS DEL
2016**

Marzo 2017

INDICE

<u>CONTENIDO</u>	<u>PAG.</u>
1. INTRODUCCIÓN	3
2. MARCO LEGAL	4
2.1. Regulación	4
2.2. Autoridad Responsable	7
2.3. Registro y Control de Medicamentos Veterinarios	12
3. OBJETIVOS DEL PROGRAMA	14
3.1. Generales	14
3.2. Específicos	14
4 ESTRATEGIAS	15
4.1. Prioridades de Detección de Residuos	15
4.2. Laboratorios	16
4.3. Garantía de Calidad en el Laboratorio	18
4.4. Métodos Analíticos	19
4.5. Resultados de Laboratorio	19
4.6. Actividades de Monitoreo y Vigilancia	20
4.7. Sistema de vigilancia	21
4.8. Acciones Correctivas	22
5. SUSTANCIAS CONSIDERADAS PARA SU MONITOREO 2017, NÚMERO DE MUESTRAS A OBTENER EN EL PROGRAMA NACIONAL 2017 Y RESULTADOS DE OBTENIDOS EN LOS BIENES DE ORIGEN ANIMAL INCLUIDOS EN EL PROGRAMA 2016	22

PROGRAMA NACIONAL DE CONTROL Y MONITOREO DE RESIDUOS TÓXICOS EN BIENES DE ORIGEN ANIMAL, RECURSOS ACUÍCOLAS Y PESQUEROS 2016

1. INTRODUCCIÓN

México es un país comprometido en preservar la salud pública y animal, así como mantener un nivel competitivo y de calidad en sus productos, estableciendo medidas con las que proporciona mayor certeza a la inocuidad de los alimentos; como parte de estas acciones se regula la presencia de residuos y contaminantes, tales como aditivos, promotores de crecimiento, medicamentos veterinarios, plaguicidas, entre los principales.

El gobierno federal mexicano como responsable de la inocuidad de los alimentos establece medidas sanitarias y fitosanitarias para asegurar el control en la presencia de residuos tóxicos y contaminantes; una de las líneas de trabajo se ejerce a través del “**GRUPO DE TRABAJO INTERINSTITUCIONAL**”, coordinado por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (**SAGARPA**), en el que participan otras dependencias del sector oficial como la Secretaría de Salud (**SS**), la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (**SEMARNAT**), la Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca (**CONAPESCA**), la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (**COFEPRIS**), la Secretaría de Economía (**SE**), el Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (**INECC**), así como Instituciones Académicas y de Investigación, tales como, Universidad Nacional Autónoma de México (**UNAM**), Universidad Autónoma de Nuevo León (**UANL**), Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada Baja California (**CICESE**), las Organizaciones No Gubernamentales (**ONG's**) el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (**CIAD**) los Comités Nacionales de Sistema Producto Pecuario, representantes del sector privado, representado por los productores pecuarios y acuícolas; la industria farmacéutica y de los alimentos para animales, transformadores, comercializadores. El grupo opera proponiendo y aprobando estrategias para el buen desempeño y mejora de los programas en la materia, asegurando que los productos cumplan con los estándares nacionales e internacionales de inocuidad y calidad, evitando la presencia de sustancias de alto riesgo para la salud de la población y el ambiente.

En el marco de las acciones para dar una certeza al consumidor en la inocuidad de los alimentos que se producen en México, el 5 de enero de 1984 se publicó en el Diario Oficial de la Federación el Programa de Control de Residuos Tóxicos, Productos y Subproductos de Origen Animal, Procedentes de Unidades de Producción Pecuaria o de Plantas y Establecimientos Tipo Inspección Federal; por lo que se ha monitoreado carne y productos cárnicos desde ése año, bajo un esquema creciente que ha incorporado gradualmente diferentes compuestos y alimentos tales como miel, ovoproductos, productos acuícolas y sus derivados.

Los resultados obtenidos a la fecha han orientado acciones inductivas que tienen como finalidad avanzar en el control y monitoreo de residuos tóxicos, para aportar mayor confianza al comercio nacional e internacional de alimentos con bases suficientes para garantizar su inocuidad.

En virtud de que los productos pecuarios mexicanos requieren fortalecer la calidad e inocuidad, y basada en los criterios de los organismos internacionales, es recomendable considerar y en su caso adoptar u homologar, para que de manera oportuna se beneficie la constatación de alimentos en apoyo a la salud animal y humana, es por ello que el 09 de Octubre del 2014, se publica en el Diario Oficial de la Federación (DOF) *el Acuerdo por el que se establecen los criterios para determinar los Límites Máximos de Residuos (LMR) tóxicos y contaminantes, de funcionamiento de métodos analíticos, el Programa Nacional de Control y Monitoreo de Residuos Tóxicos en los bienes de origen animal, recursos acuícolas y pesqueros y Programa de Monitoreo de Residuos Tóxicos en animales, así como el módulo de consulta, los cuales se encuentran regulados por la Secretaría de Agricultura, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA)* del que se desprende el “Programa Nacional de Control y Monitoreo de Residuos Tóxicos en los bienes de origen animal, recursos acuícolas y pesqueros y Programa de Monitoreo de Residuos Tóxicos en animales”, como instrumento que complementa, amplía y profundiza las acciones que a la fecha se desarrollan.

2. MARCO LEGAL

2.1. Regulación

México trabaja constantemente en la modernización del marco jurídico en el cual se desarrolla el fomento y normatividad de las actividades agropecuarias, acuícolas y pesqueras, incorporando la participación de los integrantes de cadena producción-consumo, de tal forma que el presente programa se deriva del siguiente contexto jurídico:

La Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos, en su artículo 4, que establece la garantía constitucional de la protección de la salud y la prolongación y mejora de la calidad de vida de la población; asimismo la obligatoriedad que tiene el estado de proporcionarla.

La Ley Orgánica de la Administración Pública Federal, en su artículo 35, Fracciones II y IV, donde se señala la atribución que tiene la Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación (SAGARPA), para establecer programas y acciones que tiendan a fomentar la productividad, la rentabilidad de las actividades económicas rurales, así como programas de sanidad animal, última reforma publicada en el Diario Oficial de la Federación el 27 de enero de 2015.

La Ley Federal de Sanidad Animal; en sus artículos 6 fracciones I, II, V, XII, XIII; 10, 17, 18 fracciones II, III, IV, V, VI, VII, VIII, 36, 91 fracción IV, 95, 160 y 162 faculta el establecimiento y monitoreo de límites máximos permisibles de residuos tóxicos, la inspección y verificación para el cumplimiento de la Ley y las normas oficiales, así mismo determina, evalúa, dictamina, registra, autoriza o certifica los límites máximos de residuos entre otros. Última Reforma publicada en el Diario Oficial de la Federación el jueves 07 de junio de 2012.

La Ley General de Pesca y Acuicultura Sustentables establece en sus artículos 116, 117, 124, 125, 126, 127, 133 y 134 la facultad para realizar la verificación y en su caso activación de dispositivos de emergencia y aplicación de medidas, cuando se sospeche o tenga evidencia de presencia de residuos tóxicos, en niveles que puedan afectar su inocuidad.

Así como la aplicación de las sanciones correspondientes, última Reforma publicada en el Diario Oficial de la Federación el jueves 23 de enero de 2014.

La Ley de Organizaciones Ganaderas, Artículo 5, fracción I. que indica que las Organizaciones Ganaderas, tienen por objeto promover y fomentar entre sus agremiados la adopción de tecnologías adecuadas para el desarrollo sustentable y sostenible y explotación racional de las diversas especies ganaderas, última reforma publicada en el Diario Oficial de la Federación el lunes 9 de abril de 2012.

La Ley Federal Sobre Metrología y Normalización, artículos 73, 74, 78, 81 y 83, donde se señala que las Normas Oficiales Mexicanas (NOM) son de observancia obligatoria. Mientras que los artículos 88, 91, 101, 102, 103, 105 y 108, resaltan la actividad de muestreo, análisis y monitoreo de contaminantes, última Reforma publicada en el Diario Oficial de la Federación el lunes 14 de julio de 2014.

Para lo anterior, se vienen aplicando Normas Oficiales Mexicanas (NOM) de observancia obligatoria. En materia de salud animal, se cuenta con 48 diferentes Normas Oficiales Mexicanas; de ellas a continuación se enlistan las que son relativas a los criterios y especificaciones para el monitoreo y control de residuos tóxicos en alimentos de origen animal.

Norma Oficial Mexicana NOM-022-ZOO-1995. Características y especificaciones zoosanitarias para las instalaciones, equipo y operación de establecimientos que comercializan productos químicos, farmacéuticos, biológicos y alimenticios para uso en animales o consumo por estos, publicada en el Diario Oficial de la Federación el miércoles 31 de enero de 1996.

Norma Oficial Mexicana NOM-025-ZOO-1995. Características y especificaciones zoosanitarias para las instalaciones, equipo y operación de establecimientos que fabriquen productos alimenticios para uso en animales o consumo por estos, publicada en el Diario Oficial de la Federación el lunes 16 de octubre de 1995.

MODIFICACION a la Norma Oficial Mexicana NOM-026-ZOO-1994, Características y especificaciones zoosanitarias para las instalaciones, equipo y operación de establecimientos que fabriquen productos químicos, farmacéuticos y biológicos para uso en animales, publicada en el Diario Oficial de la Federación el jueves 7 de noviembre de 2002.

Norma Oficial Mexicana NOM-030-ZOO-1995. Especificaciones y procedimientos para la verificación de carne, canales, vísceras y despojos de importación en puntos de verificación zoosanitaria, publicada en el Diario Oficial de la Federación el miércoles 17 de abril de 1996.

Norma Oficial Mexicana NOM-040-ZOO-1995. Especificaciones para la comercialización de sales puras antimicrobianas para uso en animales o consumo por éstos, publicada en el Diario Oficial de la Federación el viernes 4 de octubre de 1996.

Norma Oficial Mexicana NOM-061-ZOO-1999. Especificaciones zoosanitarias de los productos alimenticios para consumo animal, publicada en el Diario Oficial de la Federación el miércoles 11 de octubre de 2000.

Norma Oficial Mexicana NOM-064-ZOO-2000. Lineamientos para la clasificación y prescripción de los productos farmacéuticos veterinarios por el nivel de riesgo de sus ingredientes activo. Fecha de publicación en el DOF lunes 27 de enero de 2003; Así como el acuerdo por el que se modifica el diverso por el que se establece la clasificación y prescripción de los productos farmacéuticos veterinarios por el nivel de riesgo de sus ingredientes activos, fecha de publicación en el Diario Oficial de la Federación el lunes 5 de marzo de 2012.

Norma Oficial Mexicana NOM-030-PESC-2000. Que establece los requisitos para determinar la presencia de enfermedades virales de crustáceos acuáticos vivos, muertos, sus productos o subproductos en cualquier presentación y artemia (*Artemia spp*), para su introducción en el territorio nacional y movilización en el mismo, así como el *AVISO mediante el cual se dan a conocer las enfermedades exóticas de los crustáceos acuáticos sujetas a diagnóstico obligatorio para su importación y movilización en los Estados Unidos Mexicanos*, que no se incluyen en la citada Norma, a fin de certificar la condición sanitaria de los crustáceos acuáticos, con fines de importación y movilización nacional, publicado el miércoles 18 de abril de 2012 en el Diario Oficial de la Federación.

Norma Oficial Mexicana NOM-159-SSA1-1996. Bienes y servicios. Huevo, sus productos y derivados. Disposiciones y especificaciones sanitarias, publicado en el Diario Oficial de la Federación el jueves 2 de diciembre de 1999.

Reglamento Interior del SENASICA, Artículo 16, específicamente fracción XX Establecer la participación en el Programa Nacional de Control y Monitoreo de Residuos Tóxicos, así como establecer el aseguramiento del cumplimiento de los límites máximos de residuos permitidos en bienes de origen animal; y Artículo 18, fracción VII Establecer el desarrollo, fomento y actualización de los programas nacionales que se emitan en materias de monitoreo de residuos tóxicos y de contaminantes en los bienes de origen animal, vegetal, acuícola y pesquero, así como los programas en materia de Buenas Prácticas Pecuarias, Agrícolas, Acuícolas y Pesqueras en la producción primaria; publicado en el Diario Oficial de la Federación el jueves 21 de julio de 2016.

Reglamento de la Ley Federal de Sanidad Animal en sus artículos 24, 25, 26 establece las disposiciones de buenas prácticas pecuarias y buenas prácticas de manufactura en Establecimientos TIF, determinará las características del Programa Nacional de Control y Monitoreo de Residuos Tóxicos en los bienes de origen animal, última Reforma en el Diario Oficial de la Federación el jueves 07 de junio de 2012.

Reglamento en Materia de Registros, Autorizaciones de Importación y Exportación y Certificados de Exportación de Plaguicidas, Nutrientes Vegetales y Sustancias y Materiales Tóxicos o Peligrosos, publicado en el Diario Oficial de la Federación el 28 de diciembre de 2004 y el Decreto por el que se reforman, adicionan y derogan diversas

disposiciones del Reglamento en Materia de Registros, Autorizaciones de Importación y Exportación y Certificados de Exportación de Plaguicidas, Nutrientes Vegetales y Sustancias y Materiales Tóxicos o Peligrosos, publicado en el Diario Oficial de la Federación el 13 de febrero de 2014.

Acuerdo por el que se establecen los criterios para determinar los Límites Máximos de Residuos (LMR) tóxicos y contaminantes, de funcionamiento de métodos analíticos, el Programa Nacional de Control y Monitoreo de Residuos Tóxicos en los bienes de origen animal, recursos acuícolas y pesqueros y Programa de Monitoreo de Residuos Tóxicos en animales, así como el módulo de consulta, los cuales se encuentran regulados por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, publicado en el Diario Oficial de la Federación el jueves 9 de octubre de 2014.

Acuerdo por el que se modifica el diverso por el que se establece la clasificación y prescripción de los productos farmacéuticos veterinarios por el nivel de riesgo de sus ingredientes activos, publicado en el Diario Oficial de la Federación el lunes 5 de marzo de 2012.

Este marco legal se ha visto enriquecido con la elaboración de lineamientos específicos que norman diferentes aspectos de la producción de alimentos, buscando en todos los casos que la producción se dé bajo las mejores condiciones y que los alimentos ofertados reúnan la calidad e inocuidad requerida.

La autoridad central sanitaria del SENASICA ha desarrollado esquemas de mitigación de riesgos en la cadena productiva de ganado desde la crianza hasta la engorda del mismo, esquema que se implementa con el objeto de que los animales que se envían al sacrificio en un Establecimiento TIF provienen de unidades de producción pecuaria certificada en buenas prácticas pecuarias.

Aunado a esto también se cuenta con un esquema de control de mercancías pecuarias que obliga mediante mandato legal a impedir enviar productos que no satisfagan los requerimientos normativos sanitarios para poder exportar productos de origen mexicano.

2.2. Autoridad Responsable

La regulación, el control y prevención de la contaminación ambiental y la presencia de residuos tóxicos en alimentos en México, son responsabilidad de las siguientes instituciones de la Administración Pública Federal:

- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT).
- Secretaría de Salud (SS).
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA).

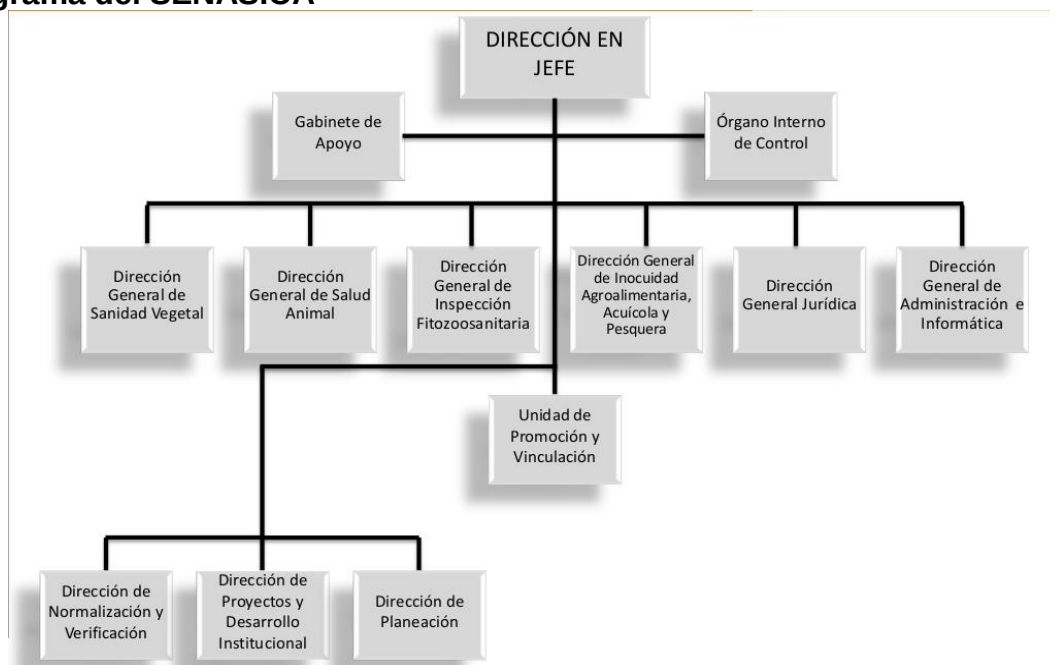
La SEMARNAT es la responsable de la aplicación de la regulación para mejoramiento del ambiente y el establecimiento de criterios ecológicos para la conservación de los recursos naturales.

La SS entre otras funciones, debe apoyar al mejoramiento de las condiciones sanitarias del medio y operativas para propiciar un desarrollo satisfactorio del hombre, así mismo lleva a cabo programas para evaluación e investigación de la calidad sanitaria en alimentos y bebidas.

En México el registro de plaguicidas se realiza a través de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) de la Secretaría de Salud (SS), con la colaboración de (SAGARPA) y la (SEMARNAT), de común acuerdo con las atribuciones que les otorga el Reglamento en Materia de Registros, Autorizaciones de Importación y Exportación y Certificados de Exportación de Plaguicidas, Nutrientes Vegetales y Sustancias y Materiales Tóxicos o Peligrosos, así como la Ley General de Salud, Ley Federal de Sanidad Animal, Ley Federal de Sanidad Vegetal, Ley Federal Sobre Metrología y Normalización y la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente, respectivamente.

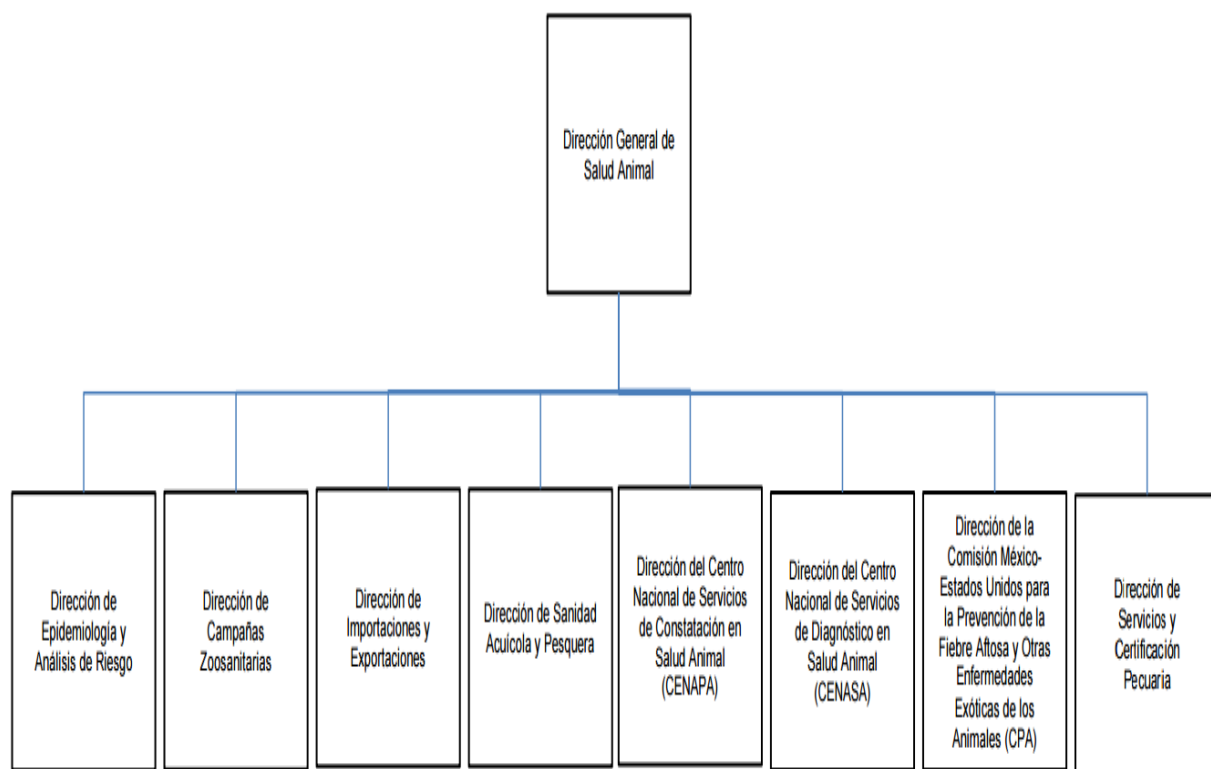
La SAGARPA a través del Servicio Nacional Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), es responsable de asegurar la inocuidad y calidad de los alimentos de origen animal producidos internamente, de los que ingresan al país a través de los puntos de ingreso y del control de los residuos tóxicos en ellos, por lo que elabora y evalúa programas de monitoreo y seguimiento epidemiológico (en caso de violaciones a los límites de tolerancia), además le corresponde ejercer el control de productos químicos farmacéuticos, plaguicidas, biológicos, alimentos, equipos y servicios para animales.

Organigrama del SENASICA



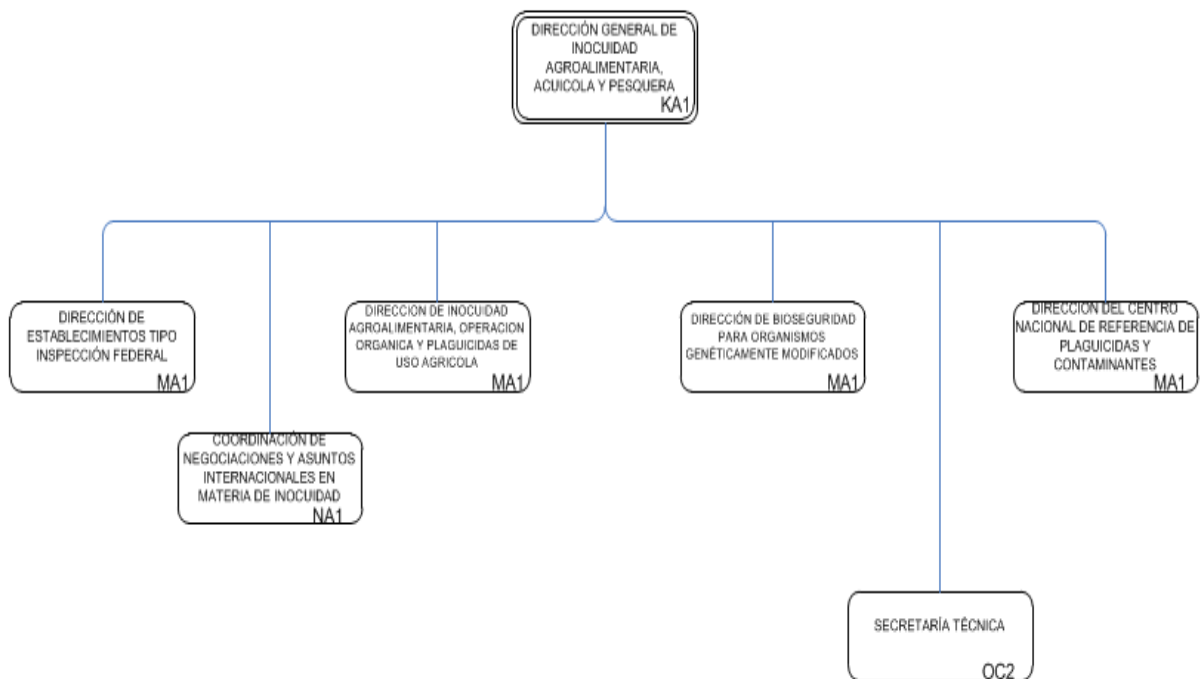
La Dirección General de Salud Animal (DGSA) del SENASICA es la Unidad Administrativa responsable de la aplicación de los programas encaminados a sanidad pecuaria y el control y registro de medicamentos así como es responsable del área de diagnóstico ya que es en esta Dirección General donde se integra el laboratorio nacional de referencia (CENAPA), este control hace que se a estratégica la participación de esta área en la conformación y ejecución del programa nacional; de igual forma es importante señalar que la DGSA tiene áreas de apoyo que también son de importancia en la aplicación y toma de decisión del programa ya que se cuenta con un área específica de análisis de riesgo la cual da pautas a seguir sobre las políticas que la autoridad debe generar

Organigrama de la DGSA



La Dirección General de Inocuidad Agroalimentaria, Acuícola y Pesquera (DGIAP) regula a los organismos genéticamente modificados, la producción orgánica, los sistemas de reducción de riesgos de contaminación aplicados en la producción y procesamiento primario de alimentos agrícolas, pecuarios, acuícolas, pesqueros (DIAOOPA) y la Dirección de Establecimientos Tipo Inspección Federal (DETIF) encargada de la inspección veterinaria en los establecimientos procesadores de productos cárnicos y ovoproductos teniendo el propósito de obtener productos de óptima calidad higiénico-sanitaria con reconocimiento internacional, ya que cuentan con sistemas de inspección y controles de alto nivel que promueven la reducción de riesgos de contaminación de sus productos.

Organigrama de la DGIAAP



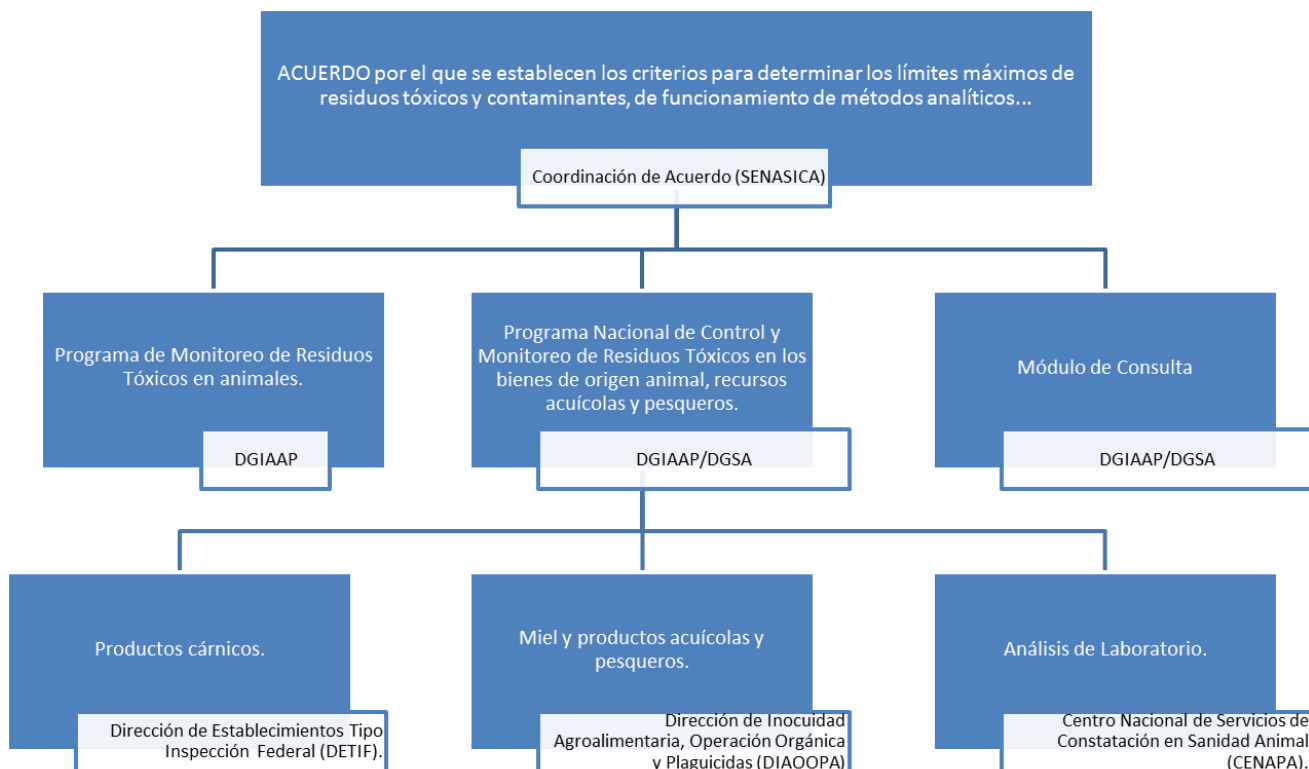
Dentro de las atribuciones que tiene la SAGARPA en materia de plaguicidas de uso agrícola y específicamente la DGIAAP como parte de ésta, es la vigilancia y aplicación de la Ley Federal de Sanidad Vegetal, así como de las Normas Oficiales Mexicanas "NOM-032-FITO-1995 "Por la que se establecen los requisitos y especificaciones fitosanitarios para la realización de estudios de efectividad biológica de plaguicidas agrícolas y su dictamen técnico.", NOM-033-FITO-1995 "Por la que se establecen los requisitos y especificaciones fitosanitarias para el aviso de inicio de funcionamiento que deberán cumplir las personas físicas o morales interesadas en comercializar plaguicidas agrícolas.", NOM-034-FITO-1996 "Por la que se establecen los requisitos y especificaciones fitosanitarias para el aviso de inicio de funcionamiento que deberán cumplir las personas físicas o morales interesadas en la fabricación, formulación, formulación por maquila, formulación y/o maquila e importación de plaguicidas agrícolas.", NOM-052-FITO-1997 "Por la que se establecen los requisitos y especificaciones fitosanitarias para presentar el aviso de inicio de funcionamiento por las personas físicas o morales que se dediquen a la aplicación aérea de plaguicidas agrícolas." a fin de emitir el dictamen técnico de efectividad biológica y la certificación de establecimientos que se dedican a la fabricación, formulación, formulación y/o maquila, maquila, importación, comercialización y aplicación aérea de plaguicidas agrícolas.

De igual forma dentro de la regulación nacional específicamente en el *Acuerdo por el que se establecen los criterios para determinar los Límites Máximos de Residuos (LMR) tóxicos y*

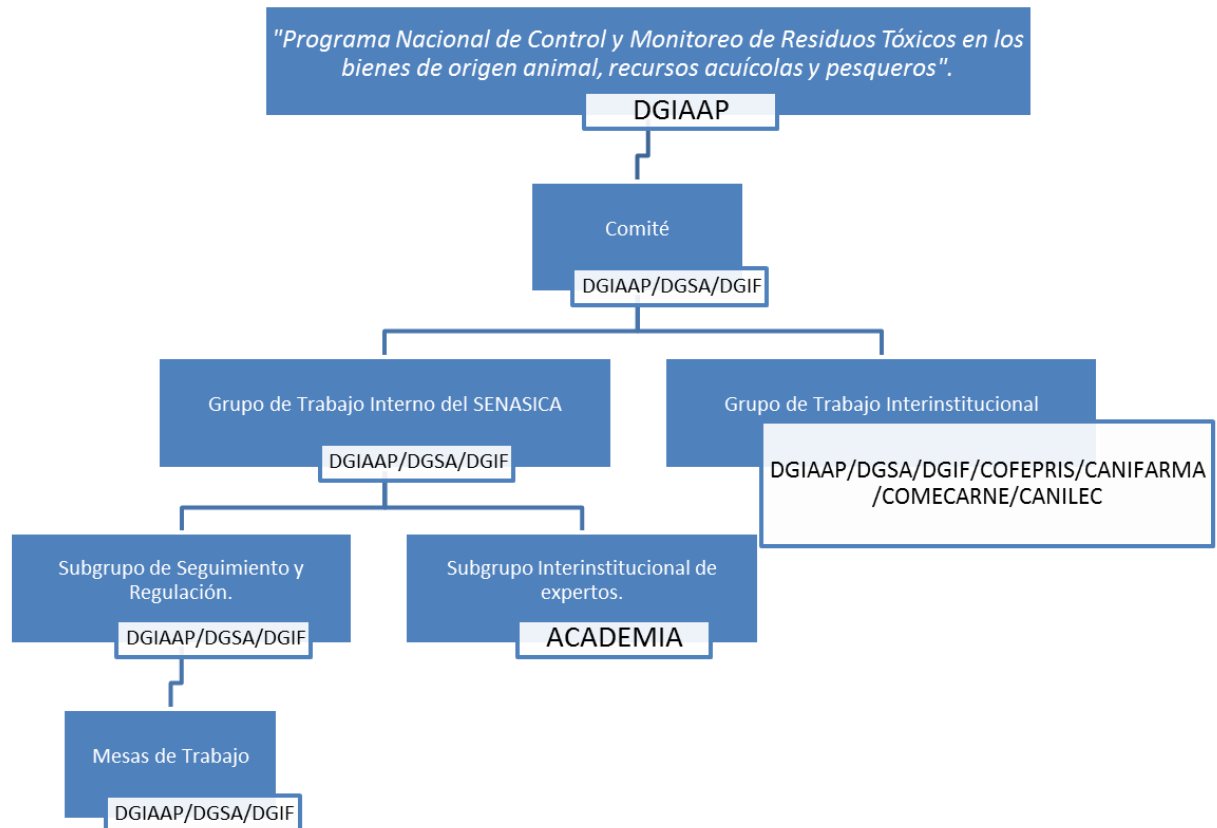
contaminantes, de funcionamiento de métodos analíticos, el Programa Nacional de Control y Monitoreo de Residuos Tóxicos en los bienes de origen animal, recursos acuícolas y pesqueros y Programa de Monitoreo de Residuos Tóxicos en animales, así como el módulo de consulta, donde se prevé una estructura desarrollada para el fortalecimiento normativo y técnico del programa nacional, este módulo de consulta mencionado, tiene como estructura los siguientes componentes de referencia y consulta:

1. Programas Nacionales de Control y Monitoreo de Residuos Tóxicos disponible en la presente liga en la página web del SENASICA: <http://www.gob.mx/senasica/acciones-y-programas/programas-nacionales-de-control-y-monitoreo-de-residuos-toxicos>
2. Criterios para el funcionamiento, aplicación e interpretación de métodos analíticos, disponible en la presente liga en la página web del SENASICA: <http://www.gob.mx/senasica/documentos/criterios-para-el-funcionamiento-aplicacion-e-interpretacion-de-metodos-analiticos?state=published>
3. Tabla de límites máximos de residuos tóxicos y contaminantes. disponible en la presente liga en la página web del SENASICA: <http://www.gob.mx/senasica/documentos/limites-maximos-de-residuos-toxicos-y-contaminantes?state=published>

Organigrama del Acuerdo de límites máximos



Organigrama del Programa Nacional de Control y Monitoreo de Residuos Tóxicos y Contaminantes (PNMRTyC)



2.3. Registro y Control de Medicamentos Veterinarios.

En México los medicamentos veterinarios no pueden ser comercializados sin el registro que otorga la autoridad responsable; el registro de medicamentos veterinarios lo realiza el SENASICA a través de la Dirección General de Salud Animal (DGSA), llevando el control nacional de los medicamentos veterinarios y productos alimenticios que pretenden ser aprobados para su venta y los que ya cuentan con aprobación, además de autorizar las renovaciones periódicas de los productos que ya se encuentran en el mercado y aprobar a los laboratorios de constatación y control de calidad en la materia.

El registro se debe efectuar en aquellos productos que por sus características de composición, usos o indicaciones y limitaciones, pueden representar un riesgo a los animales, para quien los aplican y para los consumidores de los productos o subproductos de esos animales; los productos que deben registrarse son: biológicos, químicos, farmacéuticos, promotores del crecimiento, alimenticios, alimentos medicados, nutracéuticos, herbolarios, homeopáticos, fórmulas magistrales y derivados de la biotecnología.

Dentro de los requisitos establecidos para el registro de productos veterinarios está el presentar información que garantice la calidad, eficacia e inocuidad del producto, tanto para el animal como para el consumidor de productos alimenticios procedentes de animales tratados.

Por lo anterior es necesario partir de una base que permita estructurar un expediente de registro que incluya la información: administrativa, técnica del producto, de seguridad y eficacia, de residuos (incluyendo métodos analíticos para detección de los contaminantes en alimentos), así como información de pruebas de campo y control de productos.

Esta es una medida sanitaria que debe aplicarse tanto a los productos nacionales, como a los procedentes de otros países, con la finalidad de:

- Proteger la salud de los animales mediante el uso de productos de calidad, seguridad y eficacia probada.
- Asegurar que los productos sean elaborados y manejados de acuerdo a las instrucciones y especificaciones, disminuyendo riesgos zoonos.
- Regular un adecuado control de calidad de los productos en su elaboración, almacenamiento, distribución, comercialización y utilización, para coadyuvar a garantizar la calidad y utilización óptima de los mismos.
- Vigilar que los productos químicos, farmacéuticos y biológicos usados en los animales, ya sea con fines preventivos, de diagnóstico, control, tratamiento o como promotores, contribuyen al incremento de la producción pecuaria nacional.
- Promover y vigilar la observancia del tiempo de retiro de los productos en los animales, para disminuir los riesgos a la salud humana.
- Proteger a las personas y los animales de la presencia de riesgos resultantes de contaminantes, toxinas y microorganismos patógenos presentes en los productos veterinarios.
- Prevenir los perjuicios causados en el país como resultado de la entrada o propagación de plagas o enfermedades atribuibles al comercio de productos.
- Asegurar que la información comercial proporcionada en el etiquetado de los productos garantiza su uso y manejo adecuado.
- Salvaguardar el ambiente y permitir el libre comercio de medicamentos entre países.

Con respecto a los diversos productos farmacéuticos y otras sustancias que se utilizan en la prevención y tratamiento de las enfermedades que afectan a los productos acuícolas mexicanos, los señalamientos citados en párrafos anteriores, aplican también para la acuicultura.

3. OBJETIVOS DEL PROGRAMA

3.1. Generales

- Coadyuvar al mejoramiento de la inocuidad y calidad de los alimentos de origen animal, incluyendo los productos acuícolas y pesqueros, induciendo mejores técnicas de manejo y procesamiento de los productos, con la participación de otras dependencias federales y estatales, así como de productores, industriales y agentes comerciales de la cadena productiva.
- Contribuir a la certificación de la inocuidad y calidad de los alimentos mexicanos, tanto en el mercado nacional como en el de exportación.

3.2. Específicos

- Diagnosticar, prevenir y controlar los residuos tóxicos y contaminantes en bienes de origen animal, recursos acuícolas y pesqueros.
- Contribuir a la calidad higiénica sanitaria en los productos y subproductos de origen animal.
- Disminuir el riesgo para la salud humana por la presencia de residuos tóxicos en los alimentos.
- Ampliar el control sobre el uso y aplicación de los productos químico-farmacéuticos, biológicos y alimenticios en animales.
- Reforzar y vigilar el muestreo en bienes de origen animal, recursos acuícolas y pesqueros, para monitorear el cumplimiento de los límites máximos de residuos tóxicos y contaminantes.
- Disponer de información que permita identificar la problemática de contaminación en bienes de origen animal, recursos acuícolas y pesqueros regionalmente, para orientar el establecimiento de medidas preventivas que conlleven a la eliminación de los factores o prácticas que la originan.
- Dar a conocer los límites máximos de residuos tóxicos y contaminantes, que pueden o no estar presentes en bienes de origen animal y recursos acuícolas y pesqueros, con el fin de garantizar la detección oportuna de los mismos.
- Identificar y dar seguimiento a las principales fuentes de contaminación, a fin de determinar las medidas zoonos sanitarias, de buenas prácticas pecuarias y de manufactura, de seguridad y correctivas que deben aplicarse
- Propiciar líneas de investigación sobre medicamentos y plaguicidas inocuos para la salud humana.

Este Programa toma como base diversas normas y recomendaciones nacionales e internacionales, entre las que destacan: el Comité del *Codex Alimentarius* Internacional (CODEX), Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), Organización Mundial de la Salud (OMS), Organización Panamericana de la Salud (OPS), Organización Mundial del Comercio (OMC), Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), Organización Internacional de Normalización (ISO), así como requisitos internacionales, como son las resoluciones del *Compound Evaluation System* del Servicio de Inspección y Seguridad de los Alimentos de Departamento de Agricultura de los Estados Unidos y la Directiva 96/23/CE, de la Unión Europea.

4. ESTRATEGIAS

La SAGARPA a través del SENASICA, es responsable de asegurar la inocuidad y calidad de los alimentos de origen animal y vegetal producidos internamente, de los que ingresan al país a través de los puntos de ingreso y del control de los residuos tóxicos en ellos, por lo que se elaboran y evalúan programas de monitoreo y seguimiento epidemiológico (en caso de violaciones a los límites máximos de residuos), además le corresponde ejercer el control de productos químicos, farmacéuticos, plaguicidas, biológicos, alimentos, equipos y servicios para animales.

Por lo anterior la SAGARPA, lleva a cabo un programa de monitoreo permanente para vigilar y controlar el contenido de residuos tóxicos de medicamentos veterinarios, aditivos y contaminantes ambientales de los productos de origen animal, tanto en productos de consumo interno como de exportación. Para alcanzar los objetivos se cuenta con un marco operativo donde se define y orientan las acciones del Programa, dando prioridades de acción, así como el entorno de la participación de los particulares mediante mecanismos legales que lo sustentan.

Los aspectos generales y particulares que se consideran bajo las estrategias son:

- Promover la acreditación, aprobación y control de laboratorios para análisis.
- Detección de residuos tóxicos en alimentos de origen animal para establecer prioridades que nos permitan aplicar medidas de control en el uso de medicamentos y con ello favorecer la calidad de los productos.
- Promover el desarrollo de nuevos productos para el proceso de producción comercialización y consumo de alimentos.
- Integrar un banco de información que permita identificar poblaciones generadoras de productos contaminados.
- Determinación de poblaciones, niveles de frecuencia y métodos de muestreo.
- Aplicación de medidas de control (correctivos).

Para la ejecución y supervisión del cumplimiento del Programa, se ha publicado en el Diario Oficial de la Federación, el *Acuerdo por el que se establecen los criterios para*

determinar los límites máximos de residuos tóxicos y contaminantes, de funcionamiento de métodos analíticos, el Programa nacional de control y monitoreo de residuos tóxicos en los bienes de origen animal, recursos acuícolas y pesqueros, y Programa de monitoreo de residuos tóxicos en animales, así como el módulo de consulta los cuales se encuentran regulados por la secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

El Acuerdo establece un módulo de consulta de observancia para personas físicas y morales; que por vía electrónica podrán informarse y conocer los límites máximos de residuos tóxicos y contaminantes, funcionamiento de métodos analíticos, el programa nacional de control y monitoreo de residuos tóxicos en los bienes de origen animal, recursos acuícolas y pesqueros, y el programa de monitoreo de residuos tóxicos en animales que serán la base para garantizar la detección oportuna de residuos tóxicos y contaminantes, garantizando la inocuidad de las mercancías reguladas, recursos acuícolas y pesqueros.

El muestreo de los bienes de origen animal, recursos acuícolas y pesqueros se realizará en cualquiera de los diferentes niveles del proceso productivo y de comercialización, incluyendo para este año 2017 la implementación de un Sistema de Producción Segregado (Split System), esquema implementado por un grupo comercializador de bienes de origen animal y el cual es vigilado desde todos los eslabones de la cadena productiva bovina por la DIAOOPA perteneciente a la DGIAAP, considerando para ello las características de producción y comercialización de las diferentes plantas productoras de alimentos, así como la existencia de sistemas de producción agrícolas y pecuarios que pudiesen influir en la aparición de contaminantes, con lo cual se avanza en el aseguramiento de la calidad e inocuidad de los productos y se dispone de elementos para promover la corrección de fallas en los niveles en que se requiera.

4.1. Prioridades de detección de residuos

El Grupo de Trabajo del Programa de Monitoreo y Control de Residuos Tóxicos y Contaminantes, coordinado por el SENASICA, determina las prioridades en cuanto a la identificación de residuos tóxicos tales como: antibióticos, sulfonamidas, hormonales, plaguicidas organoclorados y organofosforados, antiparasitarios, promotores de crecimiento, metales pesados y otros; analizando y evaluando el grupo que representa mayor riesgo para la salud pública y animal.

Para los casos de residuos de medicamentos, se establece:

- Si deja residuos en los alimentos.
- El riesgo potencial de los compuestos químicos.
- El grado de exposición del consumidor, considerando el uso de esa sustancia y su metabolismo por el organismo.
- La capacidad analítica de los laboratorios en México.
- El grado de exposición es evaluado tomando en cuenta: la cantidad de productos comerciales registrados con una base química determinada.

- Informes estadísticos de comercialización de productos veterinarios y agroquímicos.
- Informes de contaminación y/o uso ilegal de sustancias químicas emitidos por entidades internacionales, nacionales o regionales de reconocida capacidad científica.
- Las prácticas sanitarias terapéuticas y técnicas más usadas en agricultura y ganadería.
- Los datos sobre el consumo anual de los productos potencialmente contaminados.

Para los compuestos químicos que no se clasifican como medicamentos veterinarios tales como aditivos, agroquímicos, productos de uso industrial o doméstico, sustancias presentes naturalmente en el ambiente etc., se utilizarán criterios similares.

A fin de disponer de información sobre sustancias que pudieran ser señaladas como peligrosas y para promover acciones cuando estos productos se utilicen, se mantiene una estrecha relación con los Grupos de Trabajo involucrados en aspectos sobre inocuidad alimentaria, establecidos en el seno de Comité Técnico Consultivo Nacional de Sanidad Animal (CONASA).

La evaluación del riesgo potencial se basa en estudios que realiza la SAGARPA, la SS y la SEMARNAT o bien, por la información generada por organizaciones e instituciones de amplio reconocimiento internacional como: CODEX; Informes del Comité de Expertos de FAO/OMS sobre Aditivos Alimentarios y de la Reunión Mixta FAO/OMS sobre Residuos de Plaguicidas; Informe del Comité de Expertos de Productos Veterinarios de la Unión Europea (UE) y de otros países; *Food and Drug Administration (FDA)*; *National Residues Program Food Safety and Inspection Service (FSIS)* y trabajos científicos de Instituciones de reconocimiento nacional e internacional.

4.2. Laboratorios

La responsabilidad del análisis de muestras del Programa de Monitoreo y Control de Residuos Tóxicos y Contaminantes en Alimentos de Origen Animal recae en el Laboratorio Oficial de Referencia denominado “Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal” (CENAPA), dependiente de la Dirección General de Salud Animal del SENASICA, ubicado en el municipio de Jiutepec, del estado de Morelos.

Como laboratorio de referencia, cumple las siguientes funciones:

- Definir los métodos oficiales de análisis.
- Evaluar y aprobar métodos alternativos.
- Participar en la elaboración de Normas Oficiales Mexicanas en materia de residuos tóxicos y contaminantes.
- Indicar los lineamientos para adquirir, preparar y controlar los patrones de referencia de las distintas sustancias objeto de análisis.

- Establecer las pruebas intercomparación que deberán realizar los laboratorios aprobados, para mantener un estricto control de calidad de los análisis que en cada uno de ellos se realice y verificar su operación a través de visitas de inspección.
- Fomentar la capacitación, intercambio y homologación técnica y en sistemas de calidad nacional e internacionalmente.
- Coadyuvar en el proceso de acreditación y aprobación de laboratorios, así como en el establecimiento de las condiciones para su aprobación y refrendo.

4.3 Garantía de Calidad en el Laboratorio

El CENAPA mantiene un estricto programa de aseguramiento de calidad de acuerdo con las Normas Mexicanas de calidad que están basadas en las Guías ISO 17025:2005 y 9001:2008, ISO 17043:2010, principalmente (homologas a las guías ISO, 17025,17043 y 9001), así como en Guías Eurachem.

Rutinariamente, antes de que cada serie de muestras se analice, se debe evaluar la respuesta del equipo para cada método analítico y se ajusta la respuesta para las concentraciones de cada analito de interés.

Los factores de corrección de las recuperaciones tales como estándar interno o muestras fortificadas se utilizan como evidencias de aseguramiento de la calidad interlaboratorio para cada serie de muestras analizadas, lo que garantiza que el método se desarrolla adecuadamente. Si la recuperación o el estándar interno se salen del rango para el análisis, se investiga la causa del desvío y se toman acciones correctivas y preventivas, que quedan registradas y archivadas.

Otros controles utilizados en cada juego de muestras analizados, es la utilización de muestras control negativas (blancos), blanco de reactivos y solventes, así como blancos de cristalería (solvente producto del enjuague del lote de material de cristal que se utilizará en la corrida en cuestión).

Para asegurar la confiabilidad de los estándares analíticos, se adquieren con compañías químicas reconocidas y se cuenta con los certificados de pureza y trazabilidad.

La reproducibilidad y validez de los métodos o las modificaciones hechas, son corroboradas a través de protocolos de validación, comparación de resultados con los obtenidos por los métodos oficiales, extracciones por duplicado de muestras fortificadas, comparación de los resultados obtenidos por diferentes analistas usando el mismo método y fortificando muestras en la misma serie sin conocimiento del analista.

A través de protocolos de validación metodológica desarrollados y aplicados previo a la aprobación, los laboratorios deben demostrar que cumplen con los parámetros exigidos, tales como recuperación, especificidad, precisión, reproducibilidad, capacidad de detección, capacidad de cuantificación y robustez, entre los principales. Las validaciones se desarrollan mediante procedimientos basados en guías internacionales, especialmente es las desarrolladas por la ISO, FDA, USDA, Eurachem y en especial en la Decisión 2002/657/EC.

El desempeño analítico de los laboratorios es auditado internamente por auditores internos calificados y externamente por la Entidad Mexicana de Acreditación, la Asociación de Normalización y Certificación (con reconocimiento por la I.Q. NET), El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América y la Comisión Europea de Residuos.

El CENAPA participa rutinariamente en intercambios de muestras interlaboratorio bajo un programa anual nacional e internacional. Por otra parte el Centro coordina una red de aseguramiento de calidad en el que bajo un programa establecido anualmente se contaminan muestras con concentraciones de analitos conocidos. Los resultados son evaluados y en forma confidencial el laboratorio es notificado de su desempeño en comparación con los demás laboratorios.

Internacionalmente se ha participado con intercomparaciones a través de intercambios de muestras interlaboratorio con laboratorios oficiales de Estados Unidos de América (EUA), BIPEA, Entidad Australiana de Acreditación, Asociación de Químicos Analíticos de los E.U.A. y la Red Interamericana de Laboratorios de Análisis en Alimentos (RILAA).

4.4 Métodos Analíticos:

Serán determinados conforme a lo que marca el *Acuerdo por el que se establecen los criterios para determinar los límites máximos de residuos tóxicos y contaminantes, de funcionamiento de métodos analíticos, el Programa Nacional de Control y Monitoreo de Residuos Tóxicos en los bienes de origen animal, recursos acuícolas y pesqueros, y Programa de Monitoreo de Residuos Tóxicos en animales, así como el módulo de consulta, los cuales se encuentran regulados por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación*, que fue publicado el día jueves 9 de octubre de 2014 en el Diario Oficial de la Federación, y que llega a sustituir 12 Normas Oficiales Mexicanas en donde se describían los métodos analíticos para la determinación de residuos tóxicos, así como sus Límites Máximos de Residuos (LMR).

4.5. Resultados de Laboratorio

El resultado se obtienen en un máximo de 10 días a partir de la fecha en que se recibió la muestra en el laboratorio, sin embargo en los casos en que se requiere confirmación de resultados, el tiempo de entrega de resultados se amplía, en función a la fecha de recepción de la muestra de retención, hasta por 10 días más, dependiendo del compuesto a confirmar.

Los resultados del laboratorio son notificados a la Dirección General de Inocuidad Agroalimentaria, Acuícola y Pesquera (DGIAAP), los resultados de las muestras con residuos por encima de los límites máximos permisibles, se informan inmediatamente a la DGIAAP para que se inicie la coordinación de acciones y su correspondiente seguimiento.

En el caso de productos acuícolas, el laboratorio notifica los resultados obtenidos con una copia dirigida a la Dirección General de Organización y Fomento de la Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca, así como a la Dirección de Sanidad Acuícola y Pesquera a efecto de que se inicie la coordinación de acciones y su correspondiente seguimiento.

4.6. Actividades de Monitoreo y Vigilancia del Programa

Para la identificación de posibles residuos de sustancias tóxicas el muestreo se realizará bajo dos vertientes, una en la que se aplicará en forma general a fin de disponer de información sobre áreas afectadas y productos nocivos y otra, en donde se enfocará la toma de muestras hacia aquellas zonas en donde se identifique la presencia de estas sustancias, definiéndose como muestreo insesgado o de monitoreo y muestreo dirigido o de vigilancia, respectivamente.

El esquema de generación de información se enriquece con los resultados del monitoreo, que se utiliza para atender la certificación de calidad requerida por un país o mercado comprador.

La selección de animales para analizar la presencia de residuos tóxicos, se realiza básicamente en las unidades de producción y en establecimientos de sacrificio con certificación Tipo Inspección Federal, en estos últimos se realiza de manera aleatoria de acuerdo al plan anual de muestreo y/o en el momento en que la materia prima ingresa a la planta de transformación en el caso de ovoproductos.

La cantidad de muestras que se requiere tomar de diferentes tipos de animales, tejidos y/o productos alimenticios es el reflejo de la aplicación de un análisis de riesgos desarrollado por la DGSA aplicando criterios específicos como:

- I. Autorización y uso de fármacos y químicos agrícolas
- II. Autorización y uso de fármacos y químicos de uso veterinario
- III. Retrospectiva de los resultados de residuos arrojados en el año inmediato anterior y el comportamiento de tres años atrás.
- IV. Volúmenes de producción por especie y situación geográfica.
- V. Destino de los productos (exportación o consumo local)
- VI. Especificaciones de muestreo estadístico aceptados internacionalmente.
- VII. Sensibilidad y disponibilidad de técnicas de laboratorio.

Para la detección de residuos químicos; se toma como base las directrices que se encuentran publicadas con el objeto de establecer un programa de reglamentación del control de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos del *Codex Alimentarius*, así como en la Directiva 96/23/EC, y la decisión de la Comisión Europea 97/747/CE de tal forma que el régimen de muestreo en conjunción con controles nacionales internos proporciona valores confiables.

El muestreo se ajusta al cronograma anual y al procedimiento general establecido por la Dirección General de Inocuidad Agroalimentaria, Acuícola y Pesquera, basado en el Volumen 3 (1994) *Codex Alimentarius*: Residuos de Medicamentos Veterinarios en los Alimentos, 2ª. ed., debiendo prestar atención especial a los procedimientos de colecta, empaque, registro de datos, documentación requerida y envío de casos al laboratorio oficial.

Para el caso específico del Sistema de Producción Segregado (Split System) se han asignado la cantidad de 16 muestras; mismas que serán obtenidas de bovinos propiedad del grupo Sukarne y que serán sacrificados exclusivamente en el establecimiento TIF No. 120 “Sukarne Producción, S.A. de C.V.”

Volumen de Producción y Exportación 2016

Producto	Producción Nacional	Exportación U.E
Equino	128,086 cabezas	0
Porcino	8,550,454 cabezas	0
Ovino	41,893 cabezas	0
Caprino	192,702 cabezas	0
Huevo	311,501 toneladas	0
Ave	892,087,653 cabezas	0
Miel	***64,960 ton	*** 21,317.572 toneladas
Camarón	***101,604.53 toneldas	*** 1,145.802 toneladas
Bovino	3,281,690 cabezas	0
Mojarra/Tilapia	**135,129 toneladas	0
Leche de Bovino	**11, 395 millones de litros	0
Split System Sistema de producción segregado		
Bovino	*4000 cabezas en confinamiento	0

Cifras redondeadas

- ** Datos de referencia de Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), Atlas Agroalimentario 2016; información correspondiente al año 2015.
- * Datos proporcionados por la empresa Sukarne Producción S.A. de C.V. TIF 120

Fuente:

- *****Miel y Camarón:** Información proporcionada por la Dirección de Inocuidad Agroalimentaria, Operación Orgánica y Plaguicidas de Uso Agrícola.
- **Bovino, Porcino, Ovino, Caprino y Equino:** Sistema de Inspección Veterinaria proporcionada por la Subdirección de Dictaminación y Certificación de Establecimientos Tipo Inspección Federal y Subdirección de Mantenimiento de la Certificación de Establecimientos Tipo Inspección Federal.
- **Ave y Huevo:** Informes mensuales de los Establecimientos Tipo Inspección Federal e información Proporcionada por la Subdirección de Mantenimiento de la Certificación de Establecimientos Tipo Inspección Federal.

4.7. Sistema de vigilancia

Los resultados de los análisis realizados por el laboratorio se concentrarán en una base de datos, mismos que se utilizan para definir acciones para la puesta en marcha de muestreos dirigidos y programas de asistencia técnica que apoyen la eliminación del uso de productos químicos y contaminantes, así como técnicas de manejo y control específicas. Estos resultados son emitidos por el sistema de emisión de reportes de laboratorio mediante una plataforma electrónica llamada “SINALAB” los cuales son generados de manera electrónica ayudando a que se reciban de manera inmediata una vez generado el resultado, dichos resultados son enviados a los responsables operativos del programa así como a la coordinación del mismo.

4.8. Acciones correctivas

Las medidas de vigilancia y corrección, se aplicarán por las autoridades en cualquier fase de la cadena productiva, en coordinación con las diferentes organizaciones de productores y comercializadores, a fin de asegurar la calidad de éstos y en su caso, se aplicarán sanciones de carácter administrativo y judicial, lo que sustenta el cumplimiento y permite disminuir significativamente los problemas detectados en los productos, procurando en todo momento incurrir en reincidencias en el cumplimiento de los límites máximos de residuos tóxicos y contaminantes o de la constatación de la presencia de sustancias prohibidas en los animales, bienes de origen animal y recursos acuícolas y pesqueros.

Para el caso de los productos cárnicos con certificación TIF ante la obtención de un resultado por encima de los límites máximos permisibles se deberá seguir el *“procedimiento de atención rápida de alertas emitidas por laboratorios oficiales, autorizados y reporte de otros países por resultados de límites máximos permisibles, productos prohibidos y contaminaciones en productos y subproductos cárnicos certificados como Tipo Inspección Federal”*, publicado en la página web: <http://sdg.senasica.gob.mx/?id=491>

5. Sustancias consideradas para su monitoreo 2017, Número de Muestras a obtener en el Programa nacional 2017 y Resultados de obtenidos en los bienes de origen animal incluidos en el Programa 2016

Para este año 2017 de manera acostumbrada se realizara el muestreo aleatorio insesgado, sin embargo en los casos que se requiera y mediante el acuerdo con el grupo interno de trabajo del SENASICA, a lo largo del año se podrán establecer muestreos dirigidos, para el reforzamiento del monitoreo como efecto de resultados arriba de los límites máximos permisibles, este se podría implementar de acuerdo a las especificaciones definidas en el Programa.

En el **Anexo 1** se presentan las características del Programa Nacional de Residuos Tóxicos y Contaminantes en Bienes de origen Animal 2017, que incluye el listado de sustancias a evaluar, tejidos blanco, métodos de análisis, límites de detección, niveles de acción (límites máximos de residuos tóxicos y contaminantes) y número de muestras para cada combinación de sustancia-producto. Cabe señalar que el programa anual se orientará con base en el monitoreo verificado en años anteriores y en especial en el año 2016. En el **Anexo 2** se presentan los resultados del año 2016.

MVZ María Teresa Valenzuela Remolina

Technical Veterinary Translation • Writing • Proofreading

June 7th, 2018

TRANSLATOR'S STATEMENT

I, María Teresa Valenzuela Remolina, hereby declare that I translated the attached file **Exhibit 1. Investigation-of-residues-sp.pdf** from **English** into **Spanish** and that, to the best of my ability, it is a true and correct translation that fully reflects the content, meaning and style of the original text. I further certify that I am a professional and qualified translator skilled in both English and Spanish to render and certify such translation.



MVZ María Teresa Valenzuela Remolina

- EXPEDIENTE 1256.18 -

- ACTA NOTARIAL NÚMERO 13450 TRECE MIL CUATROCIENTOS CINCUENTA -

- TOMO 269 DOSCIENTOS SESENTA Y NUEVE -

En la Ciudad de Tequisquiapan, Cabecera Municipal del mismo nombre, del Estado de Querétaro a los 7 siete días del mes de junio de 2018 dos mil dieciocho, Yo, **LICENCIADA GABRIELA MENDOZA NÚÑEZ**, Notario Adscrito a la Notaría Pública número 11 once de la Demarcación Notarial de San Juan del Río, Querétaro, de la cual es titular el Licenciado Gil Mendoza Pichardo, HAGO CONSTAR: La **RATIFICACIÓN DE DOCUMENTO Y FIRMA QUE OTORGA LA SEÑORA MARÍA TERESA VALENZUELA REMOLINA.**

- PROTESTA DE LEY -

Se le hace saber las penas aplicables a quienes se conducen con falsedad en las declaraciones ante Notario, por lo que quedando debidamente apercibida de ello, protesta formalmente conducirse con verdad en las declaraciones que emita en el presente Instrumento.

AVISO DE PRIVACIDAD: Hago del conocimiento de la compareciente que sus datos personales serán protegidos de acuerdo a lo establecido por la Ley Federal de Protección de Datos Personales en Posesión de los Particulares y, que el tratamiento que se haga de sus datos será con la finalidad de dar cumplimiento a las obligaciones contractuales aquí pactadas, así como para observar estrictamente lo establecido por el artículo 68 sesenta y ocho de la Ley del Notariado para el Estado de Querétaro.

- RATIFICACION -

La compareciente, señora **María Teresa Valenzuela Remolina**, manifiesta que el motivo de su presencia ante la suscrita Notario es la de ratificar el contenido íntegro y la firma que consta en el documento denominado "Declaración del Traductor", fechado el día 7 siete de junio de 2018 dos mil dieciocho y que consta en una foja tamaño carta, útil por un solo lado, y que la compareciente reconoce como suya la firma que lo calza por haber sido puesta de su puño y letra, para los efectos legales a que haya lugar.

- GENERALES -

Por sus generales la otorgante manifestó ser mexicana por nacimiento, originaria de la Ciudad de México, donde nació el día 8 ocho de enero de 1961 mil novecientos sesenta y uno, soltera, profesionista, con domicilio en calle Camino San Francisco número 4 cuatro, Fraccionamiento Granjas Residenciales de Tequisquiapan, en la ciudad de Tequisquiapan, Querétaro, se identifica con credencial de elector.

Yo, la Notario, **CERTIFICO:** Conocer a la compareciente por haberse identificado conforme se menciona en este Instrumento, a quien conceptúo con capacidad legal para contratar y obligarse; haber tenido a la vista el documento que se menciona y del cual agrego una copia fotostática simple al Apéndice de este Libro Protocolo bajo el mismo número de Acta Notarial; haber leído la presente y hecho las explicaciones de Ley, manifestando su conformidad así lo ratifica y firma, ante mí.- Doy fe.

ANTE MI.

LIC. GABRIELA MENDOZA NÚÑEZ

NOTARIO ADSCRITO.




SRA. MARÍA TERESA VALENZUELA REMOLINA.



PRUEBA 1

INFORME FINAL

**Estudio en Instalación de Prueba No. 225322,
Informe No. 37714**

**Una Investigación de los Residuos No Extraíbles en Tejidos de Cerdos
en Crecimiento Tratados con [^{14}C]-Carbadox Vía Oral a una Tasa de
Dosificación de 55 mg/kg de Alimento Terminado**

MODIFICACIÓN 3 AL INFORME

INSTALACIÓN DE PRUEBA:

Charles River Laboratories Edinburgh Ltd
Elphinstone Research Centre
Tranent, East Lothian
EH33 2NE, Reino Unido

PATROCINADOR:

Phibro Animal Health
Glenpointe Centre East, 3rd Floor
300 Frank W. Burr Blvd Suite 21
Teaneck, NJ 07666
EE.UU.

CONTENIDO

1	DECLARACIÓN DE CONFORMIDAD	7
2	DECLARACIÓN DE ASEGURAMIENTO DE CALIDAD	8
3	PERSONAL RESPONSABLE	13
4	RESUMEN	14
5	INTRODUCCIÓN.....	15
5.1	Antecedentes y Objetivos del Estudio.....	15
5.2	Ubicación del Estudio	15
5.3	Fechas del Estudio	15
5.4	Información de Archivo.....	15
6	MATERIAL Y MÉTODOS.....	16
6.1	Artículo de Prueba	16
6.2	Materiales de Referencia	16
6.3	Solventes y Reactivos	17
6.4	Muestras	18
6.5	Extracción de Residuos Ligados a Tejidos usando Hidrólisis Ácida y Digestión Enzimática de Proteasa (Método Enzimático Múltiple)	18
6.5.1	Extracción con Solvente.....	18
6.5.2	Hidrólisis Ácida de Residuos No Extraíbles con Solventes.....	19
6.5.3	Digestión Enzimática con Proteasa de Residuos No Extraíbles con Solventes (Método Enzimático Múltiple).....	20
6.5.4	Hidrólisis Básica del Digesto de Enzima Proteasa	20
6.5.5	Solubilización Surfactante de Residuos No Digeribles con Proteasa.....	21
6.6	Solubilización de Urea y Desnaturalización de Residuos No Extraíbles con Solventes	22

6.6.1	Caracterización de Residuos Solubles en Urea por Filtración por Peso Molecular	22
6.6.2	Solubilización SDS de Residuos Insolubles en Urea	23
6.6.3	Preparación de Digestos de Tripsina para Análisis LCMS	25
6.7	Métodos Cromatográficos/Espectrométricos	25
6.8	Elucidación de Estructura	25
6.8.1	Medición Exacta de Masa.....	26
6.8.2	Patrón de Isótopos	26
6.9	Cuantificación de Radioactividad por Conteo de Centelleo Líquido	26
6.10	Adquisición de Datos Electrónicos	27
7	RESULTADOS.....	28
7.1	Extracción con Solvente.....	28
7.2	Hidrólisis Ácida de Residuos No Extraíbles con Solventes.....	28
7.3	Digestión Enzimática Múltiple de Residuos No Extraíbles con Solventes.....	28
7.4	Solubilización con Urea de Residuos No Extraíbles con Solventes	30
7.5	Análisis de Espectrometría de Masas de Especies QCA-Lisina	31
7.6	Electroforesis en Gel.....	33
8	CONCLUSIONES	33
9	CUADROS.....	34
10	FIGURAS	36
11	APÉNDICES	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Hidrólisis ácida y digestión enzimática múltiple de residuos no extraíbles con solventes.....	36
Figura 2	Análisis Radio-TLC de Residuos Recuperados en la Fracción Orgánica del Hidrolizado Básico del Digesto de Proteasa (Método 2).....	37
Figura 3	Análisis Representativo del Estándar de Referencia de QCA por LCMS de Alta Resolución (Método 3)	38
Figura 4	Análisis Representativo del Estándar de Referencia de Carbadox por LCMS de Alta Resolución (Método 8)	40
Figura 5	Análisis Representativo del Estándar de Referencia de Desoxicarbadox por LCMS de Alta Resolución (Método 8).....	42
Figura 6	Análisis Representativo del Estándar de Referencia de QCA por LCMS de Alta Resolución (Método 8)	44
Figura 7	Confirmación de QCA por LCMS de Alta Resolución usando el Método 3....	46
Figura 8	SEC del Digesto de Proteasa (Método 4)	48
Figura 9	Identificación de QCA en el Digesto del Péptido 2-3 kDa por LCMS (Método 5)	49
Figura 10	Generalidades de Solubilización de Urea de los Residuos No Extraíbles con Solventes	52
Figura 11	SEC y Electroforesis en Gel de Residuos Solubles en Urea >100 kDa (Método 6 y Método 9).....	53
Figura 12	Electroforesis en Gel de Residuos Solubles en SDS (Método 9)	54
Figura 13	Análisis LC-MS Representativo de la Mitad Postulada de QCA-Lisina-Lisina Derivada de Material Soluble en Urea >100 kDa (Método 7).....	55
Figura 14	Análisis LC-MS Representativo de un Péptido Tríptico Derivado de Material Soluble en Urea >100 kDa y que se Postula que Contiene QCA Ligado a Lisina (Método 7).....	59
Figura 15	Análisis LC-MS Representativo de un Péptido Tríptico Derivado de Material Soluble en SDS >30 kDa y que se Postula que Contiene QCA Ligado a Lisina (Método 7).....	63
Figura 16	Análisis LC-MS Representativo de un Péptido Tríptico Derivado de Material Soluble en Urea <100 kDa y que se Postula que Contiene QCA Ligado a Lisina (Método 7) 65	
Figura 17	Interpretación de Características del Espectro de Masa de una Mitad QCA-Lisina.....	69

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1	Detección de Carbadox, Desoxicarbadox y QCA (Método 1)	34
Cuadro 2	Solubilización de Residuos Radioactivos Usando un Método de Solubilización en Urea.....	35

LISTA DE APÉNDICES

Apéndice 1	Métodos Analíticos.....	71
Apéndice 2	Análisis LC-MS/MS de Muestras Enriquecidas con Estándares de Referencia de Carbadox, Desoxycarbadox y QCA a razón de 1 ng/ml	82
Apéndice 3	Preparación y Análisis de una Mitad Sintética de QCA-Lisina.....	94
Apéndice 4	Ejemplo de Diagrama de Flujo de Extracción con Solvente	97
Apéndice 5	Hidrólisis Ácida de Residuos No Extraíbles con Solventes	98
Apéndice 6	Digestión Enzimática Múltiple (Mezcla de Enzimas 4-5)	99
Apéndice 7	Hidrólisis de Base de Residuos Lábilés a Proteasa	100
Apéndice 8	Aislamiento y Digestión de Péptidos con Peso Molecular Estimado de 2-3 kDa.....	101
Apéndice 9	Solubilización y Digestión de Residuos No Digeridos.....	102
Apéndice 10	Solubilización en Urea de Residuos No Extraíbles con Solventes	103
Apéndice 11	SPE de Residuos Solubles en Urea<100 kDa	104
Apéndice 12	Solubilización SDS de Residuos Insolubles en Urea.....	105
Apéndice 13	Solubilización en Urea de Residuos Solubilizados en SDS.....	106
Apéndice 14	Información de Conformidad de la Modificación	107

1 DECLARACIÓN DE CONFORMIDAD

Título del estudio: Una Investigación sobre los Residuos No Extraíbles en Tejidos de Cerdos en Crecimiento Tratados con [¹⁴C]-Carbadox Vía Oral a una Tasa de Dosificación de 55 mg/kg de Alimento Terminado

Las reglamentaciones de BPL no son aplicables a estudios de esta naturaleza, por lo tanto no se hace un enunciado de cumplimiento de las BPL. No obstante, como Director del Estudio, confirmo que el estudio se llevó a cabo en una instalación que cumple con las BPL y que las prácticas y procedimientos adoptados durante su realización fueron coherentes con los principios OECD de las Buenas Prácticas de Laboratorio como se establece en el Instrumento Estatutario de BPL del Reino Unido con excepción del programa (XCalibur 4.0) usado para controlar el espectrómetro de masas Q-Exactive Plus y procesar los datos de este instrumento. La validación de este programa se inició durante el periodo de este estudio. El plan de validación se llevó a cabo con éxito, no se documentaron discrepancias y se demostró que el sistema operaba con precisión y fiabilidad de acuerdo con los requisitos predeterminados del sistema y los atributos de calidad. La validación del sistema fue auditado en su totalidad y se terminó el 1 de septiembre de 2017. No se considera que el estatus de validación del programa XCalibur durante la fase experimental de este estudio afecte la integridad científica de la información.

Además, se llevó a cabo una auditoría retrospectiva de los datos en bruto e informe por parte de Control de Calidad.

Este estudio se realizó de acuerdo con los procedimientos aquí descritos y este informe representa un registro verdadero y preciso de los resultados obtenidos.

<Firma autógrafa>
Martha A Green
Directora del estudio

22 diciembre 2017
Fecha

La Declaración de Conformidad del informe final original se firmó el 6 de julio de 2016.

1 COMPLIANCE STATEMENT

Study Title: An Investigation of Non-Extractable Residues in Tissues from Growing Swine Treated with [¹⁴C]-Carbadox Orally at a Dose Rate of 55 mg/kg of Finished Feed

GLP regulations are not applicable to studies of this nature therefore no claim of GLP compliance is made. Nevertheless, as Study Director, I confirm that the study was conducted in a GLP compliant facility and that the practices and procedures adopted during its conduct were consistent with the OECD Principles of Good Laboratory Practice as incorporated into the United Kingdom Statutory Instrument for GLP with the exception of the software (XCalibur 4.0) used to control the Q-Exactive Plus mass spectrometer and process data from this instrument. The validation of this software was initiated during the period of this study. The validation plan was successfully executed, no discrepancies were documented and the system was demonstrated to operate accurately and reliably according to the predetermined system requirements and quality attributes. The system validation was fully audited and completed on 01 September 2017. The validation status of the XCalibur software during the experimental phase of this study is considered not to affect the scientific integrity of the data.

In addition a retrospective audit of the raw data and report was conducted by QA.

The study was conducted according to the procedures herein described and this report represents a true and accurate record of the results obtained.



Martha A Green
Study Director

22 December 2017

Date

The Compliance Statement in the original final report was signed on 06 July 2016.

2 DECLARACIÓN DE ASEGURAMIENTO DE CALIDAD

Título del estudio: Una Investigación sobre los Residuos No Extraíbles en Tejidos de Cerdos en Crecimiento Tratados con [¹⁴C]-Carbadox Vía Oral a una Tasa de Dosificación de 55 mg/kg de Alimento Terminado

La Unidad de Aseguramiento de la Calidad de Charles River llevó a cabo auditorías de informe sobre este estudio, detalladas a continuación:

<u>Fecha(s) de actividad de AC</u>	<u>Actividad</u>	<u>Fecha de Informe a la Gerencia y al Director del Estudio</u>
04, 07-11 noviembre 2016	Modificación Borrador del Informe	11 noviembre 2016
12 diciembre 2016	Modificación 1 Informe Final	12 diciembre 2016
03 marzo 2017	Modificación 2 Informe Final	03 marzo 2017
12-14 diciembre 2017	Modificación 3 Informe Final	14 diciembre 2017

Aunque los estudios Sin BPL no requieren inspecciones de AC, la Espectrometría de Cualitativa de Masas es inspeccionada, de manera rutinaria, y entre las fechas del 11 de junio de 2015 al 7 de abril de 2016 fue inspeccionada trimestralmente. El resultado de cada inspección se informa a la Gerencia y, en caso de ser relevante, al Director del Estudio.

Las instalaciones relevantes para este estudio están incluidas en el programa de inspección anual de instalaciones de Charles River. El resultado de cada inspección se informa a la gerencia.

Se considera que este informe describe de manera precisa y completa los procedimientos usados en el estudio y los resultados obtenidos.

<Firma autógrafa>
Jordán Burns
Aseguramiento de la calidad

22 DIC. 2017
Date

La Declaración de Conformidad del informe final original se firmó el 6 de julio de 2016.

RAZONES PARA LA PUBLICACIÓN DE LA MODIFICACIÓN 1 AL INFORME

La Modificación 1 al informe se emitió después de una auditoría retrospectiva de los datos e informe del estudio. Después de la auditoría, la declaración de conformidad se revisó y la declaración de aseguramiento de calidad se incluyó para detallar los procedimientos de aseguramiento de calidad que fueran aplicables al estudio. Se actualizaron algunos errores menores; todos los cambios se listan a continuación.

- Página 7: Declaración de conformidad revisada después de auditoría.
- Página 8: Declaración de Aseguramiento de Calidad revisada para incluir detalles de la auditoría
- Página 9: Se incluyó la página de emisión de la modificación
- Antes página 9, ahora página 10: Auditores de AC agregados a la lista de personal responsable
- Antes página 12, ahora página 13: ‘Y’ eliminado para corregir título de la Sección 6.1
- Antes página 12, ahora página 13: Se cambió la ‘fecha de caducidad’ en la Sección 6.2 para ‘día de volver a probar’ para estar de acuerdo con el certificado de análisis
- Antes página 14, ahora página 15: Se revisó la fuente del tejido control en la Sección 6.4
- Antes página 17, ahora página 18: Se cambiaron los detalles del tiempo de incubación en la Sección 6.5.5 a 16 h
- Antes página 17, ahora página 18: Se cambió la descripción de incubación en la Sección 6.6 para eliminar ‘agitar’ de las condiciones de incubación
- Antes página 65, ahora página 66: Detalles del programa Analyst agregados al Método 1 en Apéndice 1.
- Antes página 68, ahora página 69: Se eliminó la resolución especificada en el Método 3 del Apéndice 1 dado que el valor declarado era de las especificaciones del fabricante y no se había determinado de manera experimental en este estudio
- Antes página 96, ahora página 97: Corrección del tiempo de incubación y peso de la enzima usada se agregó al diagrama de flujo en Apéndice 9
- Nueva Página 102: Información de conformidad de la modificación incluida en el Apéndice 14.

Como consecuencia de estos cambios, la paginación y el contenido fueron actualizados y el informe se volvió a emitir en su totalidad.

RAZONES PARA LA PUBLICACIÓN DE LA MODIFICACIÓN 2 AL INFORME

La modificación 2 al informe se emitió para revisar la conformidad de la información modificada que se incluyó en el Apéndice 14 en la modificación 1 al informe. Algunos errores menores se actualizaron; todos los cambios se listan abajo.

- Página 8: Declaración de Aseguramiento de Calidad revisada para incluir detalles de auditoría
- Antes página 19, ahora página 21: Se corrigió la ortografía de solubilización en el título de la Sección 6.6.2
- Antes página 26, ahora página 27: Se corrigió la ortografía de solubilización en la Sección 7.5
- Antes página 29, ahora página 30: Se corrigió un error tipográfico en la palabra enzima en el encabezado de la 5a columna del encabezado
- Antes página 102, ahora página 103: Se revisó la información del cambio de conformidad en el Apéndice 14

Como consecuencia de estos cambios, se actualizaron la paginación y el contenido y el informe se volvió a emitir en su totalidad.

RAZONES PARA LA PUBLICACIÓN DE LA MODIFICACIÓN 3 AL INFORME

La modificación 3 al informe se emitió para tratar los comentarios notados por la FDA después de su revisión del informe. La declaración de conformidad se revisó después de completar la validación del programa (XCalibur 4.0) usado para controlar el espectrómetro de masas Q-Exactive Plus y procesar los datos de ese instrumento. Se actualizaron algunos errores menores; todos los cambios se listan abajo.

- Página 7: Se revisó la Declaración de Conformidad después de completar la validación del programa Xcalibur 4.0
- Página 8: Se cambió la Declaración de Aseguramiento de Calidad para incluir detalles de la auditoría de AC de la modificación 3 al informe
- Antes página 13, ahora página 15: Sección 5.4, los detalles sobre archivo de datos en bruto se adaptaron para enunciar cuándo fueron archivados los datos
- Antes página 15, ahora página 17: Se agregaron la descripción del uso del estándar crudo de QCA-lisina y la referencia en el Apéndice 3 que detalla la preparación de la QCA-lisina en la Sección 6.2.
- Antes página 16, ahora página 18: Mayores detalles sobre la enzima tripsina se agregaron en la Sección 6.3.
- Antes página 16, ahora página 18: Se agregó la justificación de por qué no se reportó el análisis de DPRA de incubación de mezclas en la Sección 6.4.
- Antes página 18, ahora página 20: Se incluyó el texto que describe las enzimas usadas y las condiciones de incubación que faltaban por error en la Sección 6.5.3 del informe
- Antes página 19, ahora página 21: Se incluyeron los detalles del paso de extracción que faltaban por error en la Sección 6.5.5 en el informe
- Antes página 20, ahora página 22: Se agregaron los Métodos de digestión de tripsina en la Sección 6.6.1.
- Antes página 20, ahora página 23: Se agregaron los Métodos de digestión de tripsina en la 6.6.1.1.
- Antes página 21, ahora página 24: Se agregaron los Métodos de digestión de tripsina en la Sección 6.6.2.
- Página 25: Se agregó una nueva sección que describe la preparación de los digestos de tripsina para el análisis LCMS (Sección 6.6.3)
- Página 26: Se agregó una nueva sección que describe el análisis LSC y la eficiencia en la combustión (Sección 6.9)
- Página 27: Se agregó una nueva sección que describe la adquisición de datos electrónicos (Sección 6.10)
- Antes página 29, ahora página 33: Se agregó aclaración en la Sección 7.6 para detallar que la comparación se hizo por valoración visual
- Antes página 71, ahora página 75: Corrección a la versión de Xcalibur
- Antes página 74, ahora página 78: Corrección a la versión de Xcalibur
- Antes página 75, ahora página 79: Corrección a la versión de Xcalibur

- Antes página 103, ahora página 107: Se actualizó la redacción de la caracterización del artículo de prueba discutida en el Apéndice 14
- Antes página 103, ahora página 107 y 108: El Apéndice 14 se actualizó para incluir tres puntos adicionales, mantenimiento del calendario maestro (Página 107), informes de inspección (Página 108) y retención de registros (Página 108)

Como consecuencia de estos cambios, se actualizaron la paginación y el contenido y el informe se volvió a emitir en su totalidad.

3 PERSONAL RESPONSABLE

Directora del Estudio: Martha A Green

Recopilación de Informes: Martha A Green

Aseguramiento de la Calidad: Donna Cunningham
Alison Drennan

4 RESUMEN

Se llevó a cabo un análisis exhaustivo cualitativo de los residuos ligados a hígado de cerdo después de una dosificación de 7 días con [^{14}C]-Carbadox y seguido por un periodo de retiro de 42 días.

En este estudio, el 100% de los residuos radioactivos totales se extrajo y caracterizó por cromatografía de exclusión de tamaño con radio detección, filtración por peso molecular, electroforesis en gel con radio detección y HPLC-MS/MS de alta resolución,

La cromatografía de exclusión de tamaño y la filtración por peso molecular mostraron que los residuos radioactivos eran macromoléculas, en su mayoría, con un peso molecular mayor a 30 kDa. La cromatografía de exclusión de tamaño (con radiodetección y UV) y la electroforesis en gel (con una tinción específica de proteína y radiodetección) indicaron que la radioactividad estaba ligada a proteína. La hidrólisis del residuo proteínico usando una base fuerte liberó QCA marcado con ^{14}C .

La investigación de la naturaleza de los residuos ligados a proteína por HPLC-MS/MS de alta resolución, permitió la identificación del QCA ligado covalentemente a lisina. La observación de masas exactas para péptidos ligados al QCA, junto con la identificación de fragmentos múltiples consistentes con el QCA ligado a lisina covalentemente y que se originan de esa masa exacta, proporcionaron evidencia para apoyar la identificación molecular del QCA ligado a lisina.

De manera adicional, la presencia de carbadox y desoxicarbadox fue investigada mediante LC-MS/MS. Ninguno fue detectado en ninguna de las muestras analizadas.

5 INTRODUCCIÓN

5.1 Antecedentes del Estudio y Objetivos

Estudios previos realizados en Charles River (Charles River Estudio No. 286584) indicaron que el tejido hepático, obtenido después de 42 días de retiro, posteriores a 7 días de dosificación con [^{14}C]-carbadox, no contenía carbadox, desoxicarbadox o QCA libres mayores al límite de detección de ese método. Se encontró que todos los residuos radioactivos eran material que no podía ser cromatografiado, todos los residuos radioactivos permanecían en el origen de las placas TLC.

Esto llevó a la hipótesis de que los residuos radioactivos estaban unidos a material proteínico.

Las metas de este estudio fueron la extracción del 100% de los residuos radioactivos ligados, caracterizar la naturaleza de los residuos ligados e idealmente, identificar la especie radioactiva que está ligada al tejido hepático.

Se siguieron dos abordajes de extracción de residuos radioactivos en este estudio. Inicialmente, se investigó la extracción de residuos ligados mediante hidrólisis ácida o un proceso de digestión enzimática múltiple. Estos experimentos proporcionaron evidencia que apoya la sugerencia de que los residuos radioactivos estaban ligados a proteína. El segundo abordaje empleó los métodos de solubilización y desnaturalización de urea usado, de manera típica, en los análisis de proteómica. Utilizando este abordaje, se extrajo y caracterizó 100% de los residuos radioactivos ligados y se obtuvo la evidencia para apoyar la identificación de QCA ligado covalentemente a lisina.

En ningún momento en este estudio se detectaron carbadox o desoxicarbadox libres.

5.2 Ubicación del Estudio

Este estudio se llevó a cabo en Charles River Laboratories Edinburgh Ltd, Elphinstone Research Centre, Tranent, East Lothian, EH33 2NE, Reino Unido.

5.3 Fechas del Estudio

Inicio del estudio:	20 agosto 2015
Fecha de inicio experimental:	21 agosto 2015
Fecha de terminación experimental:	28 junio 2016
Fecha de terminación del estudio:	06 julio 2016

5.4 Información de Archivo

Toda la información en bruto, generada durante este estudio, se envió al Archivo Científico de Charles River Laboratories Edinburgh Ltd el 6 de julio de 2016. Todos los datos en bruto se retendrán por 2 años después de la emisión del informe final. Después del periodo de 2

años se consultará al Patrocinador con respecto a la eliminación, transferencia o almacenamiento continuo de los datos en bruto.

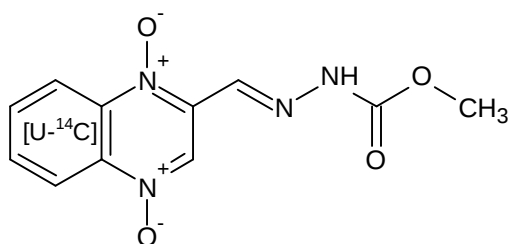
La copia original firmada del informe final se almacenará de manera indefinida en el Archivo Científico de Charles River Laboratories Edinburgh Ltd.

6 MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Artículo de prueba

El material de prueba investigado en este estudio fue [^{14}C]-Carbadox.

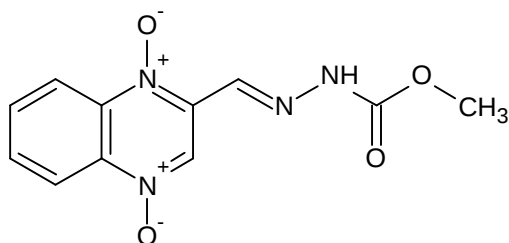
Nombre: [Fenil-U- ^{14}C]-Carbadox
Lote No.: 7915JJN012-2
Pureza radioquímica: 98.3%
Actividad específica: 48.1 $\mu\text{Ci/mg}$
Estructura:



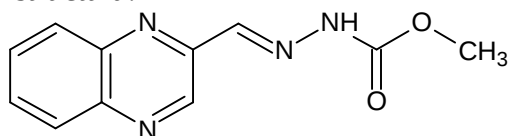
6.2 Materiales de referencia

El patrocinador proporcionó carbadox no radiomarcado. Desoxicarbadox y ácido 2-quinoxalincarboxílico (QCA) se obtuvieron de Sigma-Aldrich. Estos se usaron como estándares de referencia y para controlar los experimentos. Los detalles de cada referencia son los siguientes:

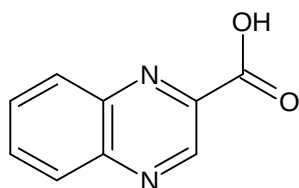
Nombre: Carbadox
Lote No.: 3E121-84QCS
Peso molecular: 262
Pureza: 99.4%
Fecha para volver a probar: 16 de octubre de 2016
Condiciones de almacenamiento: +2-8°C, oscuridad
Estructura:



Nombre: Desoxycarbadox
Lote No.: SZBD315XV
Peso molecular: 230
Pureza: 99.8%
Caducidad: 11 de noviembre de 2016
Condiciones de almacenamiento: Ambiente
Estructura:



Nombre: Ácido 2-quinoxalincarboxílico (QCA)
Lote No.: 02010CJV
Peso molecular: 174
Pureza: 97.7%
Condiciones de almacenamiento: Ambiente
Estructura:



Un estándar de referencia crudo para QCA-lisina se sintetizó para ayudar a identificar el QCA ligado a lisina en muestras de tejido solubilizadas. La síntesis se describe en el apéndice 3. La síntesis dio como resultado una mezcla de QCA libre, mitades mono y bi-QCA-lisina adecuadas para ayudar a identificar el QCA ligado a lisina en muestras de hígado solubilizadas.

6.3 Solventes y Reactivos

Todos los solventes y reactivos fueron de grado analítico o un equivalente adecuado. A lo largo del estudio se utilizó agua ultrapura Milli-Q.

Enzima	Proveedor
Proteasa de <i>Streptomyces griseus</i> , Tipo XIV	Sigma
Leucina aminopeptidasa	Sigma
Prolidasa	Sigma
Carboxipeptidasa W	Sigma
Carboxipeptidasa Y	Alfa Aesar ThermoFisher Scientific
Tripsina de páncreas porcino	Sigma

6.4 Muestras

Los hígados de cerdos dosificados con [¹⁴C]-Carbadox (tasa de dosificación meta de 55 mg/kg de alimento/día) por 7 días consecutivos y sacrificados 42 días después de la dosis final, se obtuvieron del estudio de Charles River No. 286584. Estas muestras de hígado se usaron para investigar la naturaleza de los residuos radioactivos.

Hígado disponible en el comercio se usó para generar extractos de hígado control para usarse en otros estudios. El tejido hepático de control se usó también en los experimentos de fortificación realizados en el Estudio Charles River 286563.

En este estudio, se analizaron mezclas de incubación de un sistema de prueba *in vitro*, un ensayo directo de reactividad de péptido, Charles River Estudio No. 797773, para ayudar en las investigaciones sobre los mecanismos potenciales de unión a proteína. Sin embargo, como el DPRA fue un sistema de prueba *in vitro*, podría indicar los mecanismos químicos de unión, pero ofrecería poco o ningún indicio sobre el metabolismo biológico que da como resultado la unión a proteína. El análisis de la muestra del DPRA fue, por lo tanto, reemplazado por análisis de las muestras de tejido hepático solubilizado con mayor relevancia biológica y por esa razón el análisis de las muestras del DPRA no se incluyó en el informe.

6.5 Extracción de Residuos Ligados a Tejidos usando Hidrólisis Ácida y Digestión Enzimática de Proteasa (Método Enzimático Múltiple)

6.5.1 Extracción con Solvente

Alícuotas de hígado (hasta 4 × ca 50 g) se mezclaron con metanol (3 ml de solvente por 1 g de tejido). Las muestras fueron homogeneizadas usando un homogeneizador elevado y separadas en un extracto solvente y sólidos pos extracción (PES) mediante centrifugación (ca 4000 rpm, ca 10 min). Los sólidos residuales se homogeneizaron y el procedimiento de extracción se repitió dos veces con metanol, luego 3 veces con hexano. Los extractos se combinaron para producir un solo extracto de metanol y un solo extracto de hexano. Alícuotas de cada extracto se removieron para determinar la radioactividad total por LSC y el contenido radioactivo de los PES se determinó mediante análisis de combustión. Las extracciones con solvente se llevaron a cabo en varias ocasiones para producir suficientes PES a fin de desarrollar métodos para alcanzar una solubilización completa de residuos radioactivos.

Modificación 3 al Informe

6.5.2 Hidrólisis Ácida de Residuos No Extraíbles con Solventes

Los sólidos pos extracción (PES) que permanecen después de la extracción con solventes (residuos no extraíbles con solventes) se sometieron a un procedimiento agresivo de hidrólisis ácida. En la Figura 1 se presenta un resumen de este procedimiento.

Una alícuota de los PES de la extracción con solvente (1 g) se mezcló con ácido clorhídrico (HCl, 6 M, 5 ml) y se incubó en un recipiente de vidrio a presión a *ca* 105°C por 2 días. El hidrolizado se enfrió y después se particionó con cloroformo (2 × 10 ml). La fracción acuosa se neutralizó mediante la adición de hidróxido de sodio (NaOH, 5 M) después se particionó con cloroformo (2 × 10 ml). La fracción acuosa neutra resultante se alcalinizó al agregar NaOH (5 M) y ésta también se particionó con cloroformo (2 × 10 ml). Las 4 fracciones que se produjeron se describieron como la fracción orgánica ácida, la fracción orgánica neutra, la fracción orgánica básica y la fracción acuosa. Se tomaron alícuotas de cada fracción para LSC.

Una alícuota replicada de los PES de la extracción con solventes se sometió a las mismas condiciones de hidrólisis pero se incubó por 6 días. El hidrolizado de esta incubación se particionó como se describió antes pero usando cloroformo:metanol (4:1 v/v) en lugar de cloroformo. La recuperación procedimental después de la hidrólisis de 6 días fue baja, sin embargo, la distribución de residuos en cada fracción fue comparable con la hidrólisis de 2 días. El análisis LC-MS/MS subsecuente fue comparable tanto para la hidrólisis de 2 días como la de 6 días. Por estas razones sólo se presentan los resultados de la hidrólisis de 2 días.

Las fracciones acuosas finales se centrifugaron (*ca* 10 min, *ca* 4000 rpm) y el sobrenadante se removió. Se agregó metanol (20 ml) a cada comprimido y se mezcló por vórtice y sonicación. Se removió el extracto de metanol del material no soluble mediante centrifugación (*ca* 5 min, *ca* 4000 rpm). La radioactividad en los sobrenadantes de la fracción acuosa y en los extractos de metanol se sometió a ensayo por LCS.

6.5.2.1 Preparación del hidrolizado ácido para el análisis por LC-MS/MS

El sobrenadante de la fracción acuosa obtenido después de la hidrólisis ácida (Apéndice 5, L14AS.Aq2) se neutralizó con la adición de HCl (6 M). Alícuotas de la fracción neutralizada se filtraron usando filtros de jeringa de nylon de 0.45 µm. Los filtrados se analizaron mediante LSC y esto confirmó que toda la radioactividad fue recuperada en el filtrado. Réplicas de los filtrados se combinaron y analizaron mediante LC-MS/MS (Método 1) para investigar la presencia de carbadox, desoxicarbadox y QCA.

Una alícuota de filtrado se enriqueció con la mezcla de estándares de referencia, de modo que cada estándar estuviera presente a razón de 1.0 ng/ml. El análisis de las muestras enriquecidas mediante LC-MS/MS se llevó a cabo para indicar si la matriz de la muestra tenía algún efecto sobre la detección de carbadox, desoxicarbadox y QCA.

6.5.3 Digestión Enzimática con Proteasa de Residuos No Extraíbles con Solventes (Método Enzimático Múltiple)

Los sólidos pos extracción (PES) que permanecen después de la extracción con solventes (residuos no extraíbles con solventes) se sometieron a una digestión enzimática exhaustiva.

Una alícuota de PES de la extracción por solventes se mezcló con tampón de fosfato (0.1 M. pH7, 5 ml de tampón por 1 g de muestra) y se incubó a *ca* 37°C por 24 h. Se agregó la enzima proteasa de *Streptomyces griseus* (*ca* 15-40 mg/g de muestra) y se continuó la incubación por *ca* 24-72 h. Después, se agregaron aminopeptidasa de leucina y prolidasa, entonces, *ca* 24 h después de la adición de estas enzimas, se ajustó el pH a pH 5 y se agregaron carboxipeptidasa W y/o carboxipeptidasa Y, se continuó la incubación por *ca* 24 h hasta 7 días después de la adición de carboxipeptidasa.

Al completar la incubación el digesto se centrifugó (*ca* 4000 rpm, *ca* 5-10 min) y el sobrenadante se removió. El comprimido se mezcló con acetonitrilo:agua (1:1 v/v, 2-25 ml) con la ayuda de vórtice y centrifugado. El sobrenadante se combinó con el sobrenadante obtenido de la centrifugación de la mezcla de digestión enzimática para producir un solo digesto enzimático.

Con el fin de permitir que se investigara la naturaleza de los residuos en el digesto de proteasa y en el comprimido no digerido, se repitió la digestión con algunas variaciones en los tiempos de incubación, pero se obtuvieron resultados similares independientemente de esto. Los detalles de incubación se incluyen en los Apéndices 6, 8 y 9.

6.5.3.1 Preparación del digesto de proteasa para análisis por LC-MS/MS (MRM)

El digesto de proteasa se diluyó con agua 1:9 v/v antes de la LC-MS/MS. Una alícuota del digesto diluido se enriqueció con la mezcla de estándares de referencia, de modo que cada estándar estaba presente a razón de 1.0 ng/ml. El análisis de las muestras enriquecidas mediante LC-MS/MS (Método 1) se realizó para indicar si la matriz de la muestra tenía algún efecto sobre la detección de carbadox, desoxicarbadox y QCA.

6.5.4 Hidrólisis Básica del Digesto de Enzima Proteasa

La naturaleza de los residuos radioactivos recuperados en el digesto de proteasa se investigó mediante una hidrólisis básica agresiva. Una alícuota del digesto de proteasa (25 ml) se mezcló con un volumen igual de NaOH (5 M) y se incubó en un envase de vidrio a presión a *ca* 105°C por 2 días.

6.5.4.1 Desalado del hidrolizado básico

Una alícuota del hidrolizado básico se neutralizó usando HCl (6 M) después se secó bajo nitrógeno y la muestra seca se extrajo con metanol. El material soluble en metanol se separó de las sales insolubles por centrifugación.

6.5.4.2 Extracción líquido-líquido del hidrolizado básico

El hidrolizado básico se particionó con un volumen igual de éter dietílico. Las fracciones orgánica básica y acuosa básica se recolectaron por separado. La fracción acuosa básica se acidificó usando HCl (6M) y después se particionó con un volumen aproximado igual de éter dietílico. Las fracciones orgánica ácida y orgánica básica se recolectaron por separado y la fracción acuosa ácida fue concentrado bajo nitrógeno. El embudo de separación se enjuagó con agua para remover el material residual del embudo.

6.5.4.3 Aislamiento de QCA por TLC

Un componente correspondiente a QCA detectado por radio-TLC se aisló mediante TLC preparativo. La fracción completa (L14BS.Org3, Apéndice 7) se aplicó a través de varias placas TLC y fue eluido usando el método TLC descrito en el Apéndice 1 (Método 2). La región de interés se escindió de cada placa y el sílice se extrajo con metanol. El material soluble se separó del sílice por centrifugación, se concentró y reconstituyó en agua para el análisis radio-LCMS (Método 3).

6.5.5 Solubilización Surfactante de Residuos No Digeribles con Proteasa

Una proporción significativa de los residuos radioactivos totales permaneció en el comprimido después de una extensa digestión enzimática. La naturaleza de esos residuos fue investigada por solubilización del comprimido después de la digestión enzimática con dodecil sulfato de sodio (SDS).

El comprimido después de la digestión enzimática se mezcló con SDS (solución acuosa al 2%) y se incubó a 37°C por 3 días, en ese momento el comprimido parecía estar en solución. La muestra solubilizada se mezcló con éter dietílico:etanol (1:1 v/v) y se almacenó en el congelador para mantenerlo a -20°C por *ca* 16 h. La muestra se centrifugó (*ca* 4000 rpm, 5 min) y el sobrenadante, el material soluble en SDS, se decantó. Se extrajo el comprimido con metanol:agua /1:1 v/v) con la ayuda de vórtice y entonces se centrifugó y se removió el sobrenadante. La radioactividad en las fracciones solubles en SDS se cuantificaron mediante LSC. En estas fracciones se recuperó relativamente poca radioactividad. La muestra fue insuficiente para permitir tanto la cuantificación de radioactividad en la fracción insoluble en SDS por LSC como mayor investigación de los residuos insolubles en SDS. Por esa razón se asumió que la mayoría de la radioactividad permaneció en la fracción insoluble en SDS.

La naturaleza de los residuos insolubles en SDS se investigó mediante mayor digestión enzimática. El comprimido insoluble en SDS se incubó con tampón fosfato (0.1 M, pH7, 5 ml de tampón por 1 g de muestra) por 24 h, después de digirió como se describió en la Sección 6.5.3. Después de la incubación con carboxipeptidasa W por *ca* 24 h se agregó carboxipeptidasa Y y la muestra se incubó por otras *ca* 24 h antes de ser extraída con acetonitrilo:agua (1:1 v/v) como se describió en la Sección 6.5.3.

6.6 Solubilización en Urea y desnaturalización de los Residuos No Extraíbles con Solvente

La digestión química y enzimática de los residuos no extraíbles por solvente no resultó en una solubilización suficiente para permitir la caracterización/identificación de residuos radioactivos de carbadox. Por esta razón, se desarrolló un método alternativo con el uso de solubilización en urea, reducción de sulfuros y alquilación.

Tejido hepático homogeneizado se extrajo con metanol y hexano como se describió en la Sección 6.5.1.

Una alícuota de los PES de extracción por solvente (*ca* 50 g) se mezcló con tampón tris-HCl (50 mM, 500 ml) que contenía urea (8 M, pH 8) y se incubó a temperatura ambiente por *ca* 22 horas. La muestra solubilizada se trató con un agente reductor de bisulfuro, DL-ditiotreitol (DTT, 10 mM) e incubó por 1 h en un baño de agua para mantener la temperatura a 37°C. Un agente alquilante, yodoacetamida (IAA, 20 mM), se usó entonces para alquilar los grupos tiol cisteína y así, prevenir que se volvieran a formar los enlaces bisulfuro. La incubación se llevó a cabo en la oscuridad a temperatura ambiente. La reacción IAA fue inactivada después de 30 min al agregar más DRR (20 mM). El material solubilizado se removió después de centrifugar (*ca* 4000 rpm, *ca* 20 min). El material insoluble (el comprimido pos centrifugación) se sometió al mismo procedimiento de solubilización y las fracciones solubilizadas resultantes se combinaron para obtener una sola muestra soluble en urea. El contenido radioactivo del material insoluble que permaneció fue determinado mediante análisis de combustión.

6.6.1 Caracterización de los Residuos Solubles en Urea mediante Filtración de Peso Molecular

Se utilizaron filtros centrífugos de peso molecular para caracterizar el material soluble en urea y para concentrar dicho material.

El material soluble en urea se aplicó a filtros de peso molecular de 100 kDa y se centrifugaron (*ca* 3000 g) hasta que toda la muestra hubiera sido filtrada. El material mayor a 100 kDa no pasó por el filtro. Cada fracción se analizó por LSC. Una cantidad significativa de radioactividad estuvo presente en ambas fracciones.

El material soluble en urea >100 kDa se caracterizó más por cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) y digestión con tripsina. Las fracciones de 6-7 min, 9-10 min y 10-11 min obtenidas después de la cromatografía de exclusión de tamaño (1 ml cada una) fueron

tomadas para digestión con tripsina. Cada fracción se filtró usando filtros de peso molecular centrífugos (100 kDa). Las muestras se aplicaron al filtro de peso molecular y se centrifugaron a *ca* 3000 g por *ca* 1 h. El material que no pasó por el filtro (>100 kDa) se diluyó a un volumen de *ca* 300 µl con Urea 8 M, tampón Tris-HCl 50 mM con pH 7.3 (ac). Alícuotas de cada muestra (250 µl) se diluyeron más, a un volumen de 2 ml usando tampón Tris-HCl 20 mM con pH 7.3 (ac) y se agregaron *ca* 0.5 mg de tripsina. Las muestras se incubaron a *ca* 37°C por 68 h. Después de la incubación, una alícuota (1 ml) de muestra digerida se preparó para el análisis por LCMS usando el método SPE descrito en la Sección 6.6.3.

6.6.1.1 Caracterización de material soluble en urea <100 kDa

El material soluble en urea <100 kDa se caracterizó usando extracción de fase sólida (SPE). Se usó una columna flash empacada con resina C18 de fase inversa para remover la alta concentración de urea (8M) presente en el filtrado (material <100 kDa). La resina C18 se acondicionó usando TFA al 0.1% (ac). La muestra se acidificó para tener TFA *ca* al 0.07%, se cargó en la columna y se recolectó el eluido inicial (fracción 2) antes de enjuagar la columna con TFA al 0.1% (ac) (*ca* 3 volúmenes de la columna) para tener la fracción 3. La columna fue eluida usando TFA al 0.1% en acetonitrilo:agua (1:1 v/v) recolectado en 3 fracciones (fracción 4-7). El contenido orgánico de la fase móvil de elución se incrementó (TFA al 0.1% en acetonitrilo) y una fracción más se recolectó (fracción 8). Con el fin de confirmar que carbadox, desoxicarbadox y QCA serían retenidos en la resina C18, se llevó a cabo un experimento en el que carbadox, desoxicarbadox y QCA fueron aplicados a la misma columna.

Las fracciones eluidas con TFA al 1% en acetonitrilo/agua (1:1 v/v) y TFA al 0.12% en acetonitrilo se combinaron y sometieron a digestión con tripsina. Las fracciones combinadas se redujeron a sequedad bajo nitrógeno y se reconstituyeron usando 4.5 ml de tampón Tris-HCl 20 mM con pH 7.3 (ac) y 0.5 ml de acetonitrilo. Una alícuota de muestra reconstituida (50 µl) se diluyó con la adición de 1.8 ml de tampón Tris-HCl 20 mM con pH 7.3 (ac) y 0.2 ml de acetonitrilo y se ajustó a pH 8 usando Tris(hidroximetil)amino-metano. Una alícuota de la muestra con pH ajustado (1.5 ml) se mezcló con *ca* 0.5 mg de tripsina y se incubó a *ca* 37°C por 18 h. Después de la incubación, se preparó una alícuota de muestra digerida para análisis LCMS usando el método SPE descrito en la Sección 6.5.3.

6.6.2 Solubilización de Residuos Insolubles en Urea en SDS

Una cantidad significativa de radioactividad permaneció insoluble después del proceso de solubilización en urea. El material insoluble en urea se trató con surfactante (SDS) para solubilizar los residuos radioactivos restantes. La muestra se mezcló con solución acuosa de SDS al 2% (100 ml) con la ayuda de sonicación por *ca* 10 min. La muestra se incubó entonces por *ca* 18 horas a *ca* 37°C en un baño de agua con agitación. Se agregó SDS adicional (solución acuosa al 2%, 20 ml) a la muestra y se continuó la incubación (*ca* 30 min, *ca* 45°C). La muestra se incubó por *ca* 2 horas más con un aumento de temperatura de 5°C

cada 30 min hasta alcanzar los 65°C. Después de *ca* 2 horas la muestra fue sonicada, la temperatura se incrementó de 65°C a 90°C y la incubación continuó por otra hora. Después de una hora se permitió que la temperatura disminuyera, gradualmente, a 37°C. Después de *ca* 17 horas el material soluble en SDS e insoluble en SDS se separó por centrifugación (*ca* 4000 rpm, *ca* 10 min).

La fracción insoluble en SDS se mezcló con metanol (20 ml) para extraer cualquier material residual soluble. La mezcla se mezcló con vórtice, se centrifugó (*ca* 4000 rpm, *ca* 10 min) y el sobrenadante se removió. La fracción insoluble en SDS se mezcló entonces con hexano (20 ml) y se extrajo como se describió antes. Alícuotas de cada extracto se removieron para determinación de la radioactividad total mediante LSC, el material insoluble se sometió a más solubilización con SDS.

El material insoluble se mezcló con una solución acuosa de SDS al 2% (20 ml), se sonicó e incubó a *ca* 37°C. Después de *ca* 72 h de incubación la muestra se homogeneizó y la incubación continuó como se describió antes. El material soluble en SDS e insoluble en SDS se separó por centrifugación (*ca* 4000 rpm, *ca* 10 min) y el sobrenadante. Las fracciones solubles en SDS resultantes se combinaron. En esta etapa toda la radioactividad se detectó en las fracciones solubles, lo que indicó que cualquier radioactividad remanente en la fracción insoluble era insignificante (es decir, <LOQ). Así, al usar una combinación de solubilización con urea y SDS todos los residuos no extraíbles con solvente fueron solubilizados.

Se usaron filtros centrífugos de peso molecular (30 kDa) para caracterizar el material solubilizado con SDS y para concentrar las proteínas solubilizadas antes de hacer una mayor solubilización usando el método de la urea (Sección 6.6). Toda la muestra solubilizada con SDS se aplicó a los filtros de peso molecular 30 kDa. El material menor a 30 kDa, incluyendo SDS pasó a través del filtro (descrito como filtrado SDS). El material que no pasó por el filtro (>30 kDa) se disolvió en urea (8 M en tampón tris-HCl 50 mM) y se filtró usando el mismo filtro. Este procedimiento se repitió dos veces más y cada filtrado se combinó para producir un solo filtrado descrito como el filtrado de urea. El material >30 kDa se envió a mayor solubilización usando el método de solubilización con urea descrito en la Sección , después se hizo digestión por tripsina o SEC seguido por digestión por tripsina.

Una alícuota (0.4 ml) de material >30 kDa solubilizado usando el método de solubilización con urea se tomó para la digestión con tripsina. La muestra se diluyó usando 2.8 ml de tampón tris-HCl 20mM con pH 7.5 (ac) y se mezcló con *ca* 0.5 mg de tripsina antes de incubarse a *ca* 37°C por 24 h. Después de la incubación, se preparó una alícuota (1 ml) de muestra digerida para análisis LCMS usando el método SPE descrito en la Sección 6.5.3.

Las fracciones SEC de 5-6 min y 6-7 min del material >30 kDa se solubilizan usando el método de solubilización con urea se combinaron y concentraron por filtración centrifuga de peso molecular (filtro 30 kDa, 3000 g, 30 min). Una alícuota (0.4 ml) del filtrado (<30 kDa) se

diluyó usando 2.8 ml de tampón Tris-CHl 20 mM Tris-HCl con pH 7.5 (ac) y mezcló con *ca* 0.5 mg de tripsina antes de ser incubado a *ca* 37°C por 24 h. Después de la incubación una alícuota (1 ml) de muestra digerida se preparó para el análisis por LCMS usando el método SPE descrito en la Sección 6.6.3.

6.6.3 Preparación de Digestos de Tripsina para el Análisis por LCMS

Las muestras digeridas con tripsina se prepararon para el análisis por LCMS mediante SPE. Cartuchos SPE C18 (Bakerbond C18, 500 mg, 6 ml) se acondicionaron con 3 volúmenes de columna de TFA al 0.1% (ac). Una alícuota de 1 ml de cada muestra digerida se cargó en la columna y lavó con 10 ml de TFA al 0.1% (ac). La columna fue eluida usando 10 ml de TFA al 0.1% en acetonitrilo:agua (1:1 v/v). Los eluidos resultantes se redujeron a un volumen de 1 ml bajo nitrógeno.

6.7 Métodos Cromatográficos/Espectrométricos

Método	Metodología	Instrumento	Uso
1	MRM	ABSciex API 5000	Detección de CBX, DCBX, QCA
2	TLC	NA	Aislamiento y confirmación de QCA
3	IMS-ToF	Waters Synapt G2-S HDMS	Detección de CBX, DCBX, QCA Confirmación de QCA
4	HPLC	Shimadzu Prominence	SEC, rango de peso molecular de 20-3000 Da
5	Quad-Orbitrap	Thermo Scientific Q-Exactive Plus	Confirmación de QCA
6	HPLC	Shimadzu Prominence XR	SEC, rango de peso molecular de 5-700 kDa
7	Quad-Orbitrap	Thermo Scientific Q-Exactive Plus	Identificación de residuo ligado
8	Quad-Orbitrap	Thermo Scientific Q-Exactive Plus	Análisis de estándar de referencia
9	Electroforesis en gel	Invitrogen Xcell SureLock Mini-Cell	Separación de proteínas y péptidos

6.8 Elucidación de la estructura

La identificación de los metabolitos de carbadox se basó en el cálculo de la formula molecular a partir de masas exactas de los iones detectados y los espectros iónicos del producto característico e inferidos por comparación con los espectros de iones de producto para artículos de referencia representativos (*p.ej.*, estándar de referencia de QCA, bi-QCA-lisina) y por interpretación de fragmentos significativos.

El objetivo del estudio fue identificar la naturaleza de los residuos radioactivos ligados en lugar de determinar la secuencia de aminoácidos dentro de los péptidos detectados.

Cada muestra del estudio que se corrió en este estudio se probó para QCA, carbadox y desoxicarbadox al extraerse para el ion molecular $[M+H]^+$ en el espectro completo de escaneo de masa y observar si aparecía un pico con un tiempo de retención que coincidiera con el estándar de referencia en el cromatograma iónico extraído. Las muestras de hígado solubilizadas que se analizaron por LC-MS fueron probadas para iones (molecular y

iones producto) que se consideraron diagnósticos de una mitad QCA-lisina. Las pruebas se hicieron de manera manual, al extraer esos iones y usando una detección basada en un programa (software). Los resultados de detección del programa se revisaron de modo manual para detectar falsos positivos.

6.8.1 Medición de Masa Exacta

La medición de masa exacta se usó para diferenciar entre los metabolitos potenciales de Carbadox y componentes endógenos no relacionados y para determinar la estructura de los metabolitos. El error de masa exacto (ppm) se calculó a partir de una comparación de la masa medida con la masa teórica para una asignación sugerida. Un error de masa exacto bajo (<5 ppm) apoya la asignación. Por el contrario, un error de masa exacta grande podría refutar la asignación.

$$\text{Error de masa exacta (ppm)} = \left(\frac{\text{Masa medida} - \text{Masa teórica}}{\text{Masa teórica}} \right) \times 1000000$$

6.8.2 Patrón de Isótopos

La presencia de un carbono 14 radiomarcado universal en la solución dosificada con [¹⁴C]-Carbadox da como resultado iones con masa elevada. Esto permite un patrón de isótopo, es decir, [M], [M+2]...etc., correspondiente a los átomos ¹⁴C incorporados en la estructura. Sin embargo, debido al radiomarcador universal, el patrón de isótopo sólo se observó en el espectro completo de escaneo de masa para los iones más intensos.

El patrón de isótopo también se usó para identificar el estado de carga de los iones detectados.

6.9 Cuantificación de Radioactividad por Conteo de Centelleo Líquido

Todas las muestras preparadas en fluido de centelleo se analizaron por 5 minutos junto con blancos representativos usando un Analizador de Centelleo Líquido Packard 2100TR (Perkin Elmer Limited) con corrección automática de inactivación por el método de estándar externo. Los valores de la muestra blanco representativa se sustrajeron de los conteos para dar las desintegraciones netas por minuto (dpm) para cada muestra. Las muestras se analizaron por duplicado y se calculó la media. El porcentaje de tolerancia se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación, para demostrar la confianza en las mediciones.

$$\% \text{ Tolerancia} = \left(\frac{(\text{Media} - \text{Más baja})}{\text{Media}} \right) \times 100$$

Las muestras sólidas fueron quemadas usando un Tri-Carb Automatic Sample Oxidiser Modelo 307 (Perkin Elmer). El ¹⁴CO₂ resultante fue absorbido en Carbosorb® y mezclado con líquido de centelleo Permafluor® E⁺. La eficiencia de combustión y el acarreamiento se

verificaron para cada lote al quemar blancos y estándares de control de calidad que contenían Spec-Check™-¹⁴C. La eficiencia de la combustión estuvo dentro del rango de 95-101%.

6.10 Adquisición de datos electrónicos

Los siguientes sistemas de software se usaron para la adquisición electrónica de datos en este estudio. Todos los sistemas se validaron de acuerdo con 21 CFR Parte 11.

Metodología	Instrumento	Programa
LSC	Analizador de Centelleo Líquido Packard 2100TR	TransCount (Versión 2)
MRM	ABSciex API 5000	Analyst Versión 1.4.2
TLC e imágenes de electroforetograma en gel	Fuji FLA5000	Software Aida Image Analyser (Versión 4.06)
Radio HPLC	β-RAM Model 5	LabLogic LAURA 4.2
IMS-ToF	Waters Synapt G2-S HDMS	MassLynx 4.1 SCN 871 & 916
IT-ToF-LC-MS	Shimadzu Prominence XR y IT-ToF LC-MS	Shimadzu LCMS Solutions Versión 3.6
Quad-Orbitrap	Thermo Scientific Q-Exactive Plus	Thermo XCalibur 4.0

7 RESULTADOS

Se siguieron dos abordajes para la extracción de residuos radioactivos en este estudio. El tejido hepático homogeneizado se extrajo, inicialmente, con metanol y hexano para producir los residuos no extraíble con solventes que iban a ser investigados.

En principio, fue investigada la extracción de residuos ligados mediante hidrólisis ácida o un proceso de digestión enzimática múltiple (Figura 1). Estos experimentos proporcionaron evidencia para apoyar la sugerencia de que los residuos radioactivos estaban ligados a proteína. El segundo abordaje empleó solubilización en urea y desnaturalización, métodos que se usan de manera típica en los análisis proteómicos (Figura 9). Con este abordaje 100% de los residuos radioactivos se extrajo y caracterizó y se obtuvo evidencia para apoyar la identificación de QCA covalentemente unido a lisina.

7.1 Extracción con solvente

La mayoría (típicamente >95% TRR) de los residuos radioactivos permaneció en los sólidos pos extracción (PES) después de la extracción de tejido hepático con metanol seguido por hexano. Los residuos recuperados en el extracto de metanol representaron *ca* 5% TRR sin residuos detectables recuperados en el extracto de hexano. En el Apéndice 4 se presenta un ejemplo de diagrama de flujo para la extracción por solvente de hígado. La extracción por solvente se llevó a cabo en varias ocasiones para producir suficiente PES para desarrollar los métodos para alcanzar la solubilización completa de residuos radioactivos. Se obtuvieron resultados similares para cada solvente de extracción.

7.2 Hidrólisis Ácida de Residuos No Extraíbles con Solventes

Se llevó a cabo un procedimiento agresivo de hidrólisis ácida en el material (comprimido) que quedó después de la extracción inicial con solvente (Apéndice 5). Este procedimiento liberó muy pocos TRR, sólo 15% TRR. El material liberado por hidrólisis ácida se sometió a ensayos de QCA, DXBX y CBX usando LC-MS/MS (Método 1) y no se detectó ninguno (Cuadro 1).

7.3 Digestión Enzimática Múltiple de Residuos No Extraíbles con Solventes

El esquema de digestión enzimática delineado en la Figura 1 y en el Apéndice 6 se diseñó para extraer la máxima cantidad de radioactividad de los residuos no extraíbles con solvente. El material que fue extraído se caracterizó por cromatografía de exclusión de tamaño (Método 4), LC-MS/MS (Método 1) e hidrólisis ácida/básica.

De manera típica, la digestión enzimática liberó *ca* 52% TRR de residuos no extraíbles con solvente. El análisis de este digesto de enzimas se realizó mediante HPLC-MS/MS y no se detectó carbadox, desoxicarbadox o QCA libre (Cuadro 1). El hecho de que se liberara tanta radioactividad con esta técnica que empleó enzimas proteasa para descomponer, específicamente, a las proteínas indicó que los residuos radioactivos estaban relacionados con material proteínico.

Una muestra de este digesto enzimático se hidrolizó bajo condiciones alcalinas (Apéndice 7). La hidrólisis básica permitió que QCA fuera extraído con acidificación y extracción líquido-líquido en la fase orgánica y así se obtuvo una muestra (que comprendió 6.2% de TRR) adecuada para el análisis por LC-MS/MS (Método 1) y TLC (Método 2).

Ni carbadox ni desoxicarbadox se detectaron por LC-MS/MS (Método 1, Cuadro 1). QCA fue detectado en la fracción orgánica ácida mediante análisis radio-TLC (Método 1, Figura 2). La identificación del QCA radiomarcado se confirmó mediante LCMS de alta resolución (Figura 7). Se usó TLC preparativo para aislar QCA. Los picos de radiocromatogramas (38.5 min) y EIC (38.79 min) para el QCA aislado (m/z 175.0502) fueron coherentes con el estándar de referencia de QCA (TR 38.63 min, Figura 3). Nota, los cromatogramas y el espectro de masas para los estándares de referencia se presentan en las Figuras 3 a 6.

Una alícuota del hidrolizado básico se desaló y analizó mediante LC-MS/MS (Método 1) y TLC (Método 2). No se detectaron ni carbadox ni desoxicarbadox en la fracción desalada mediante LC-MS/MS (Método 1, Cuadro 1) o por TLC (Método 2). QCA se detectó mediante LC-MS/MS en una de las transiciones usadas (Método 1, Cuadro 1).

El análisis del digesto de proteasa por cromatografía de exclusión de tamaño (SEC, Método 4) indicó una región de radioactividad que correspondía al material con peso molecular *ca* 2-3 kDa (Figura 8). Dado que la SEC siguió a la digestión enzimática, el material 2-3 kDa sería coherente con una molécula radio marcada unida a proteína que fue digerida por la mezcla enzimática en péptidos con peso molecular en el rango de *ca* 2-3 kDa. Esto proporcionó mayor evidencia que apoya la hipótesis de que los residuos radioactivos estaban ligados a proteína.

La región de radioactividad (que se asumió era un peso molecular *ca* 2-3 kDa) se aisló y digirió usando el método enzimático múltiple (Apéndice 8). El análisis de la fracción péptida digerida de 2-3 kDa por LC-MS/MS indicó que QCA estaba presente en la muestra (Figura 9). El EIC para el ion con m/z 175.0502 ($[M+H]^+$) mostró un pico con tiempo de retención de 36.8 min (Figura 9), la medición exacta de la masa confirmó la fórmula $C_9H_7N_2O_2$ (0.8 ppm). El pico en el digesto péptido de 2- 3 kDa fue coherente con el pico a los 36.6 min para el estándar de referencia de QCA (Figura 6). Ni carbadox ni desoxicarbadox fueron detectados.

Una proporción considerable del residuo radioactivo (*ca* 44% TRR) no se liberó con la digestión de proteasa y permaneció en el comprimido obtenido después de la digestión. La solubilización SDS y mayor digestión del material solubilizado liberó un poco más de los TRR (8.7% TRR), pero el resto (17% TRR) permaneció sin digerir (Apéndice 9).

7.4 Solubilización en Urea de los Residuos No Extraíbles con Solvente

El esquema de digestión enzimática múltiple indicó con fuerza que los residuos radioactivos estaban asociados con proteínas, probablemente en la forma de QCA ligado a proteína, que requeriría condiciones alcalinas fuertes para ser liberado del residuo proteínico. Con base en esas observaciones, se diseñó un esquema de extracción que digiriera por completo todo el material en el tejido hepático homogeneizado de 42 días. Tal método permitiría el análisis para identificar los residuos radioactivos y determinar si algún compuesto carcinogénico preocupante existía en la muestra de hígado con retiro de 42 días.

En este procedimiento, descrito en la Figura 10 y del Apéndice 10 al Apéndice 13, La extracción de los residuos no extraíbles con solventes (Figura 10, Caja 1B) utilizó solubilización en urea y desnaturalización, ruptura de la unión bisulfuro, seguido por alquilación de los grupos sulfhídrico reducidos (Figura 10, Caja 2) y digestión con tripsina (Figura 10, Caja 9, 11, 14 y 17) típica del proceso de digestión usado en análisis proteómico. Resúmenes de los TRR liberados mediante estos procedimientos se presentan en el Cuadro 2 y la Figura 10. Las muestras que se obtienen con este proceso se analizan mediante LC-MS de alta resolución (Método 7).

El material soluble en urea constituyó 56.5% TRR (Figura 10, Caja 2A), el resto de la radioactividad permaneció en el comprimido insoluble en urea que se sometió a mayor extracción, solubilización y digestión.

La filtración centrífuga por peso molecular se realizó en la fracción soluble en urea con el fin de concentrar y limpiar la muestra para mayor análisis. El material >100 kDa (31.3% TRR, Figura 10, Caja 4A) se fraccionó más, con base en el peso molecular, mediante SEC para separar las proteínas presentes con base en su tamaño (Método 6). La distribución de especies radiomarcadas (determinada por análisis LSC de cada fracción del eluido) se correlacionó bien con la distribución del material no radiomarcado (determinado por detección UV concurrente) que indicó que la radioactividad unida estaba relacionada, por lo general, con el total de proteínas presentes en la fracción >100 kDa (Figura 11). La electroforesis en gel (con una tinción específica de proteína y radiodetección, Método 9) indicó que la radioactividad estaba relacionada con todas las proteínas presentes en la fracción >100 kDa (Figura 11). Así, mediante radio electroforesis en gel, el 31.3% TRR en la fracción >100 kDa se caracterizó como unido a proteína. El análisis por electroforesis en gel (Método 9) proporcionó mayor evidencia para apoyar la sugerencia de que los residuos radioactivos estaban ligados a proteína y esto se discute más en la Sección 7.6. La digestión de fracciones representativas (Figura 10, Caja 6A-C) con tripsina (Figura 10, Caja 9) y el análisis de los digestos de tripsina mediante LCMS de alta resolución (Método 7) permitieron la identificación tentativa de una mitad QCA-lisina (Figura 10, Caja 10).

El material <100 kDa (25.2% TRR, Figura 10, Caja 4B) se fraccionó por SPE usando una resina C18 (Apéndice 11). La urea y otros compuestos pequeños y/o con alta polaridad que pasaron a través de la columna y no fueron retenidos por la resina C18, representaron 6.3% TRR (Figura 10, Caja 7A). No se detectó radioactividad en las siguientes fracciones que

podrían contener moléculas un poco menos polares que hubieran sido retenidas por la columna pero que fueron eluidas por el solvente (Figura 10, Caja 7B). La mayor parte de la radioactividad retenida en la resina C18 fue eluida con acetonitrilo acidificado:agua o con acetonitrilo acidificado, fracciones 5-8 (Figura 10, Caja 7C). Estas fracciones representan más compuestos hidrofílicos que fueron retenidos fuertemente por la columna SPE. Estas fracciones se analizaron entonces por HPLC-MS y no se detectaron carbadox, desoxicarbadox o QCA libre (Figura 10, Caja 11-13). El análisis de los estándares de referencia de carbadox, desoxicarbadox y QCA usando el método SPE demostraron que estos compuestos fueron retenidos por la resina y, en caso de estar presentes en las muestras, estos compuestos no podrían recuperarse en la primera fracción, sino en las fracciones eluidas con las mezclas de acetonitrilo acidificado/acetonitrilo:agua.

Se liberó muy poca radioactividad mediante extracción por metanol o hexano del material insoluble en urea (Figura 10, Caja 2B-C). Esto indicó que la mayor parte de los residuos continuaban ligados. Los residuos insolubles en urea se sometieron a un riguroso procedimiento de solubilización SDS (Figura 10, Caja 3 y Apéndice 12) que dio como resultado la solubilización completa del residuo radioactivo remanente (32.9% TRR, Figura 10, Caja 3A-C). La electroforesis en gel (con una tinción específica para proteína y radiodetección) indicó que la radioactividad estaba relacionada con la totalidad de las proteínas presentes en la fracción soluble en SDS (Figura 12). Así, mediante radio electroforesis en gel, el 32.9% TRR en la fracción solubilizada en SDS se caracterizó como ligado a proteína.

La filtración centrífuga por peso molecular se llevó a cabo en la fracción soluble en SDS (Figura 10, Caja 5), con el fin de remover el SDS y limpiar la muestra para mayor análisis. El material <30 kDa constituyó un total de 5.5% TRR (Figura 10, Caja 5B, C). La mayoría de los residuos fue >30 kDa (Figura 10, Caja 5A) y se sometió a mayor solubilización y desnaturalización con urea (Figura 10, Caja 8). El material solubilizado en urea (23.1% TRR, Apéndice 13) se analizó por SEC y/o digestión con tripsina (Figura 10, Caja 14-18) para permitir la identificación tentativa de la mitad QCA-lisina.

7.5 Análisis de las especies de QCA-lisina por Espectrometría de Masas

Fracciones selectas resultantes del procedimiento de solubilización en urea descrito en la Figura 10 se analizaron mediante espectrometría de masas de alta resolución. La presencia de QCA ligado a lisina se demostró en estas fracciones, con base en la observación de iones producto coherentes con la mitad QCA-lisina.

Fracción			Detección de fragmentos de ion QCA-LIS postulado (S/N)
Soluble en urea, Caja 2A	>100 kDa, Caja 4A	Fracciones SEC (Caja 6C) digeridas con tripsina (Caja 9)	S
	<100 kDa, Caja 4B	Fracciones SPE 5-8 (Caja 7C) digeridas con tripsina (Caja 11)	S
Soluble en SDS, Caja 3C	>30 kDa, Caja 5A	Digeridas con tripsina, Caja 17	S

El espectro de masas que suministró evidencia de la unión de QCA a lisina se presenta en las Figuras 13 a 16, y la interpretación de estos datos en la Figura 17. El espectro correspondiente a un fragmento de QCA-lisina derivado de un péptido lisina-lisina (Figura 13) y un péptido de 6 aminoácidos que contenía lisina se presentan como datos representativos (Figura 14 a Figura 16). Se observó un espectro similar para otros péptidos postulados para incluir la mitad QCA-lisina pero no se presentan en este informe.

Se observó QCA-lisina mediante el análisis LC-MS del digesto de tripsina de los residuos solubles en urea >100 kDa, (Figura 10, Caja 4A, 6C, 9, 10). El ion molecular con m/z 283.1482 ($[M+3H]^{3+}$) se asignó como un péptido QCA-Lis-Lis-Ala-Ala-His-His. Esta asignación fue apoyada por un error de masa exacta bajo para los isótopos ^{12}C , ^{13}C y ^{14}C y los datos de fragmentación que fueron críticos para la identificación (Figura 14).

El EIC para el ion con m/z 283.1489 ($[M+3H]^{3+}$) mostró un pico con un tiempo de retención de 27.5 min (Figura 14); se detectaron picos con tiempos de retención similares EIC (m/z 283.1489) para el material soluble en SDS >30 kDa (Figura 10, Caja 5A; Figura 15) y material soluble en urea <100 kDa (Figura 10, Caja 7C; Figura 16). La medición exacta de masa del isótopo ^{12}C del ion molecular (Figura 14) confirmó la fórmula $C_{39}H_{57}N_{14}O_8$ y el isótopo asignado ^{13}C y ^{14}C también presentaron un error de masa exacta bajo que apoyó la asignación. La fragmentación del ion molecular protonado ($[M+3H]^{3+}$) resultó en iones producto con m/z 285, 257, 240 y 212 que se consideran indicativos de QCA-Lis (Figura 14 y Figura 16). Los fragmentos iónicos con m/z 129 y 110 confirmaron la presencia de los aminoácidos lisina e histidina, respectivamente, en la secuencia péptida (N.B. alanina fue muy baja para ser detectada bajo el Método 7). El fragmento iónico con m/z 147 fue postulado como derivado de una lisina a partir del extremo terminal C del péptido, lo cual fue coherente con un digesto de tripsina.

Los datos de fragmentación son críticos para la identificación de QCA-lisina (Figura 17). Sería muy poco probable que estos fragmentos iónicos se formaran a partir de otras estructuras potenciales con la misma fórmula empírica como QCA-lisina que pudieran estar presentes en un digesto de tripsina de proteína solubilizada.

7.6 Electroforesis en Gel

El resultado de la electroforesis en gel complementa la conclusión extraída de la SEC de material soluble en urea >100 kDa de que los residuos radioactivos eran macromoléculas, con mayor probabilidad proteínas.

El material que se aplicó al gel migró, con base en la carga y el tamaño, a través del gel. La tinción específica para proteína reaccionó con el material que había migrado a través del gel lo que indicó que éste era un material proteínico. Las proteínas que migraron a través del gel se detectaron usando imágenes de fósforo y la radio imagen resultante fue coherente con las proteínas teñidas, según la valoración visual. La buena correlación entre la distribución de especies radiomarcadas (determinadas por imágenes de fósforo) y la distribución de proteínas (determinada por la tinción específica de proteínas) indicó que las especies radioactivas estaban ligadas al proteoma, de manera no específica.

8 CONCLUSIONES

En este estudio, 100% de los residuos radioactivos totales se extrajo y caracterizó mediante cromatografía de exclusión de tamaño con radio detección, filtración por peso molecular, electroforesis en gel con radio detección y HPLC-MS/MS de alta resolución.

La cromatografía de exclusión por tamaño y la filtración por peso molecular mostraron que los residuos radioactivos eran macromoléculas, sobre todo mayores a un peso molecular de 30 kDa. La cromatografía de exclusión por tamaño (con radiodetección y UV) y la electroforesis en gel (con tinción específica para proteína y radiodetección) indicaron que la radioactividad estaba ligada a proteína.

La investigación de la naturaleza de los residuos ligados a proteína mediante LCMS de alta resolución, permitió la identificación de QCA unido covalentemente a lisina. La observación de las masas exactas para péptidos ligados a QCA junto con la identificación de fragmentos múltiples que fueron coherentes con QCA ligado covalentemente con lisina que se originaron de esas masas exactas, proporcionaron evidencia para apoyar la identificación molecular de QCA ligado a lisina. La hidrólisis del residuo proteínico usando una base fuerte liberó QCA radiomarcado con ^{14}C .

Además, la presencia de carbadox y desoxycarbadox fue investigada por LC-MS/MS. Ninguno de los cuales fue detectado en las muestras analizadas.

El presente estudio presenta evidencia para apoyar la identificación de QCA-lisina y, por lo tanto, apoya la hipótesis de que el destino metabólico de QCA es unirse a proteína.

9 CUADROS

Cuadro 1 Detección de Carbadox, Desoxicarbadox y QCA (Método 1)

Analito	Transición	Hidrolizado ácido	Digesto enzimático	Digesto enzimático desalado hidrolizado básico	Fracción orgánica de digesto de proteasa hidrolizado básico
Carbadox	A	N	N	N	N
	B	N	N	N	N
	C	N	N	N	N
Desoxicarbadox	A	N	N	N	N
	B	N	N	N	N
	C	N	N	N	N
QCA	A	N	N	N	N
	B	N	N	S	S
	C	N	N	N	N

S – Detectado

N – No detectado

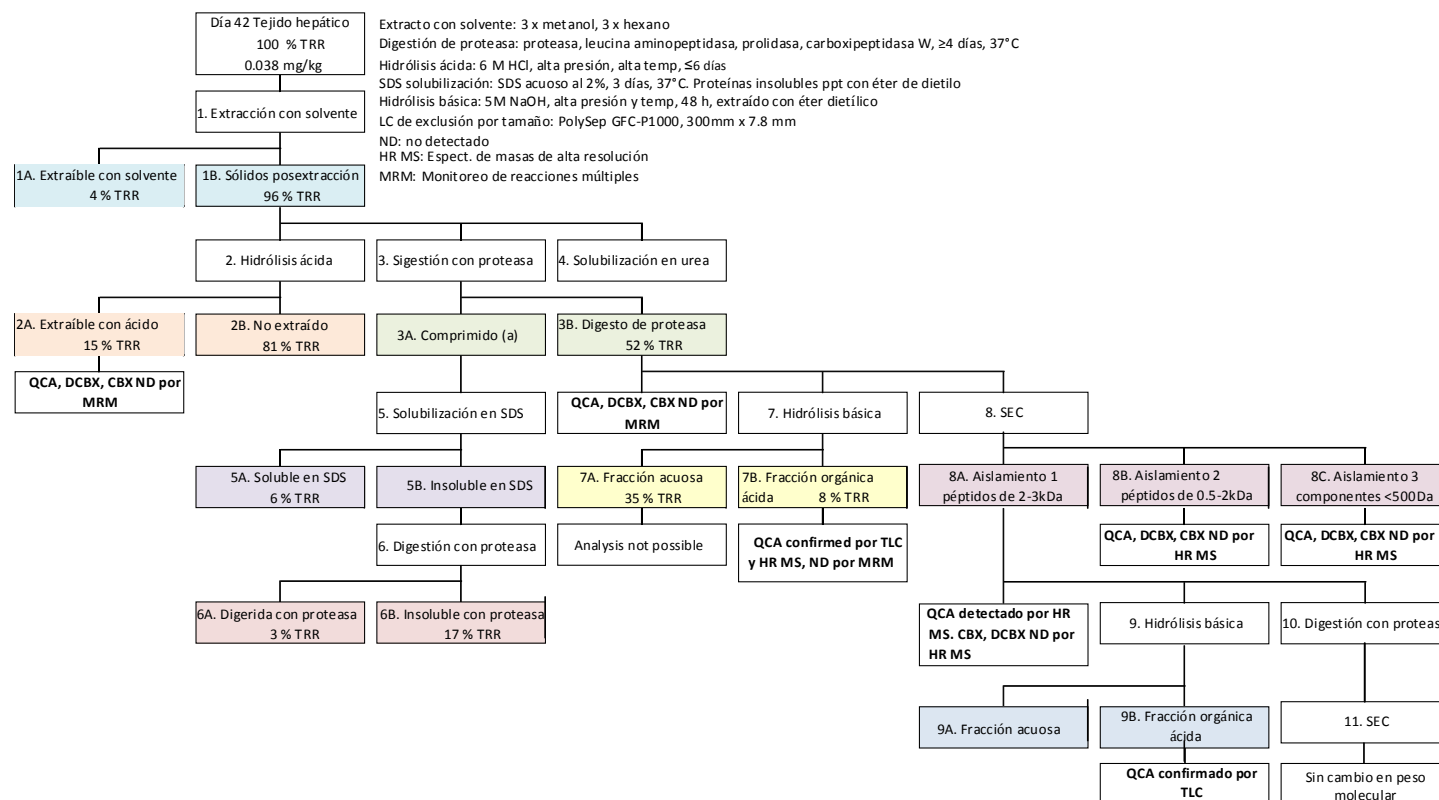
Cuadro 2 Solubilización de Residuos Radioactivos Usando un Método de Solubilización en Urea

Fracción	Caja (a)	% TRR
Extracto inicial con solvente	1A	5.4
Soluble en urea	2A	56.5
Soluble en metanol (después de solubilización en urea)	2B	3.9
Soluble en hexano (después de solubilización en urea)	2C	1.3
Soluble en SDS	3C	32.9
Total		100

(a) Refiérase a la Figura 10 para detalles de las cajas de referencia.

10 FIGURAS

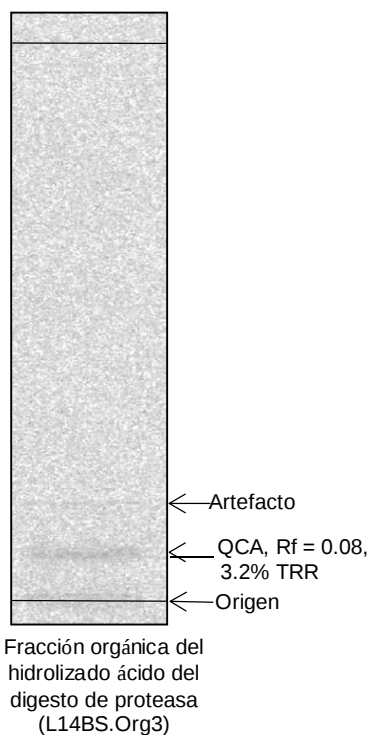
Figura 1 Hidrólisis Ácida y Digestión Enzimática Múltiple de Residuos No Extraíbles con Solvente



La hidrólisis ácida (Caja 2), la digestión con proteasa (Caja 3) para el análisis del digesto de proteasa (Cajas 3B, 7 y 8) y la digestión de proteasa para permitir la solubilización en SDS (Caja 5) del material no digerible se llevaron a cabo en paralelo usando alícuotas replicadas pos extracción con solvente PES (Caja 1B).

Figura 2 **Análisis Radio-TLC de Residuos Recuperados en la Fracción Orgánica del Hidrolizado Básico del Digesto de Proteasa (Método 2)**

Placa TLC: TLC 1



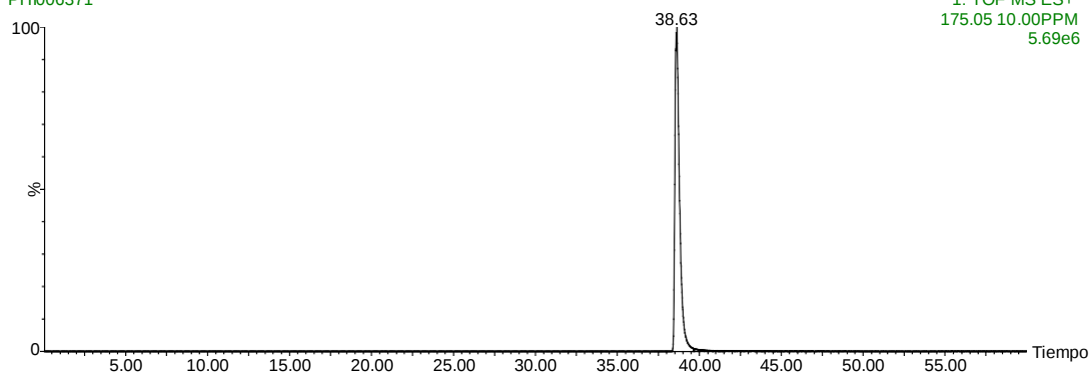
Nota: La angosta banda de radioactividad de la radioactividad observada en la placa más arriba que la de QCA se consideró un artefacto cromatográfico. Un artefacto así puede ser el resultado de la evaporación continua y condensación de la fase móvil dentro de la TCL y/o saturación incompleta de la fase de vapor que causa cambios sutiles en la composición de la fase móvil a través de elución. El artefacto no eluye en la región correspondiente a QCA, carbadox o desoxycarbadox.

**Figura 3 Análisis Representativo del Estándar de Referencia de QCA
por LCMS de Alta Resolución (Método 3)**

A. Cromatograma del ion extraído para m/z 175.0502

Sample 16 (QCA)
PHI006371

13-Nov-2015 16:25:00
1: TOF MS ES+
175.05 10.00PPM
5.69e6

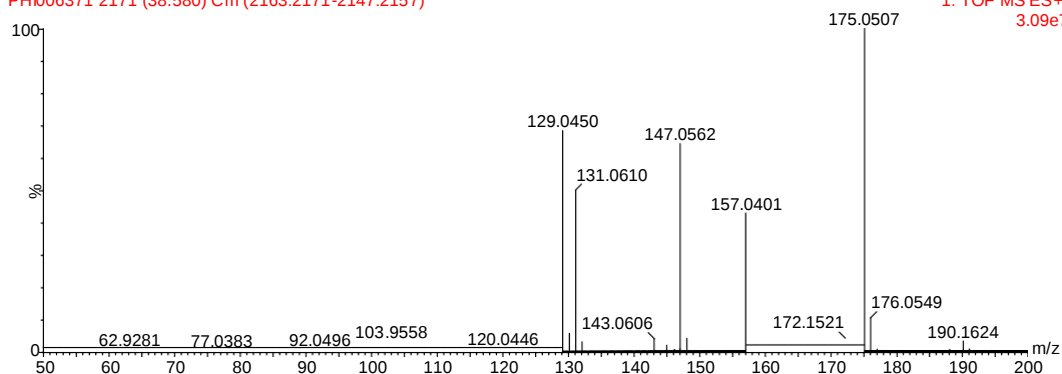


B. Espectro de Masas Completo Expandido

Sample 16 (QCA)

PHI006371 2171 (38.580) Cm (2163:2171-2147:2157)

13-Nov-2015 16:25:00
1: TOF MS ES+
3.09e7



C. Producto Ion de Espectro de Masas de MS/MS Expandido

Sample 16 (QCA)

PHI006371 2173 (38.623) Cm (2169:2175-2147:2155)

13-Nov-2015 16:25:00
2: TOF MS ES+
2.54e6

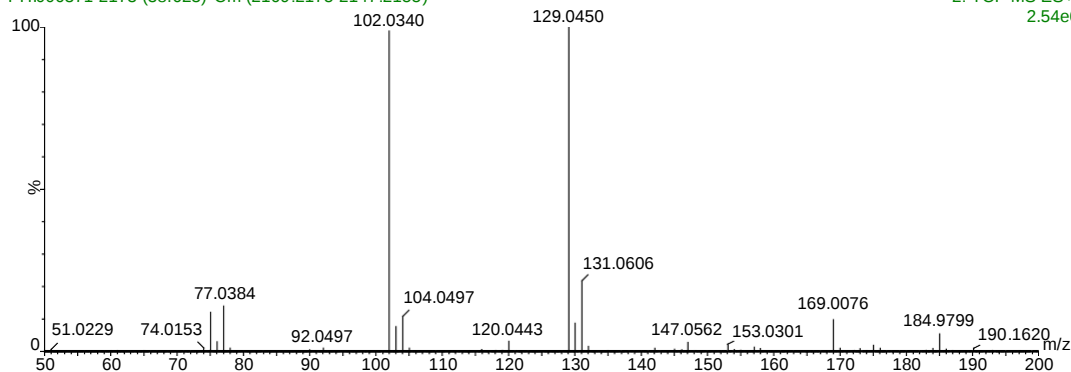


Figura 3 **Análisis Representativo del Estándar de Referencia de QCA
por LCMS de Alta Resolución (Método 3) continuación**

D. Estructuras Postuladas para los Iones Observados

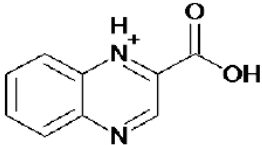
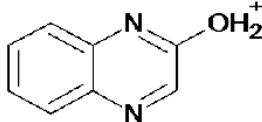
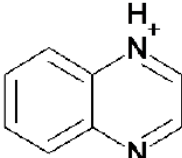
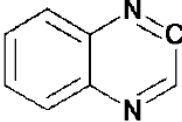
Estructura Postulada	Masa del Ion Observado (Da)	Masa Teórica del Ion (Da)	Formula elemental del ion
	175.0507	175.0502	C ₉ H ₇ N ₂ O ₂
	147.0562	147.0553	C ₈ H ₇ N ₂ O
	131.0610	131.0604	C ₈ H ₇ N ₂
	129.0450	129.0447	C ₈ H ₅ N ₂

Figura 4 Análisis Representativo del Estándar de Referencia de Carbadox por LCMS de Alta Resolución (Método 8)

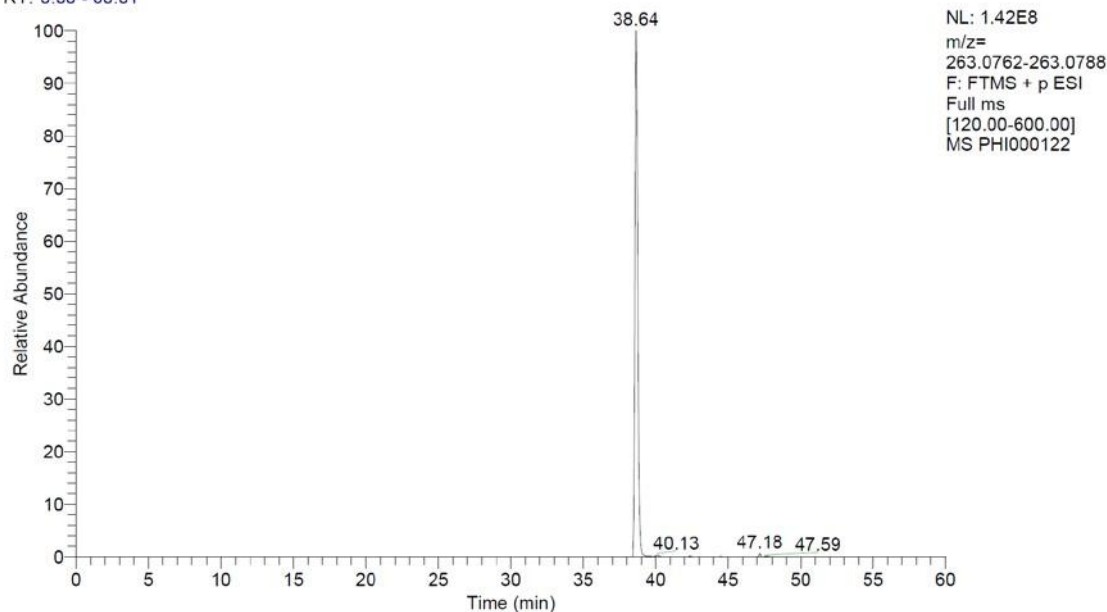
A. Cromatograma del ion extraído para m/z 263.0775

C:\Xcalibur\data\225322\PHI000122

06/16/16 16:59:28

QCA, CBX, DCBX 0.01 mg/ml

RT: 0.00 - 60.01



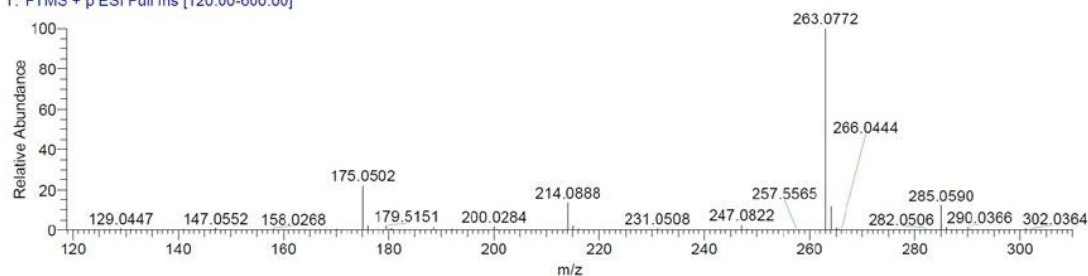
B. Escaneo Completo Expandido y Producto Ion de Espectro de Masas MS/MS

C:\Xcalibur\data\225322\PHI000122

06/16/16 16:59:28

QCA, CBX, DCBX 0.01 mg/ml

PHI000122 #15283-15364 RT: 38.58-38.74 AV: 4 SB: 19 38.03-38.41, 39.16-39.78 NL: 1.14E8
T: FTMS + p ESI Full ms [120.00-600.00]



PHI000122 #15249 RT: 38.49 AV: 1 NL: 1.08E6

F: FTMS + c ESI d Full ms2 263.08@hcd71.67 [50.00-285.00]

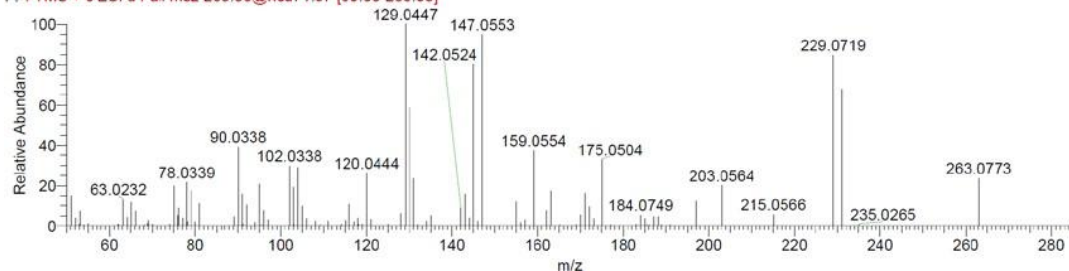


Figura 4 **Análisis Representativo del Estándar de Referencia de Carbadox por LCMS de Alta Resolución (Método 8) continuación**

C. Estructuras Postuladas para los Iones Observados

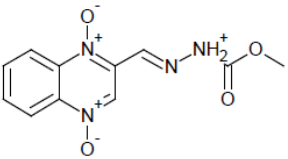
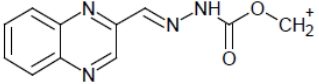
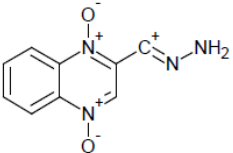
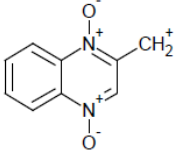
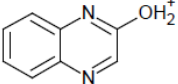
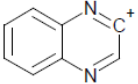
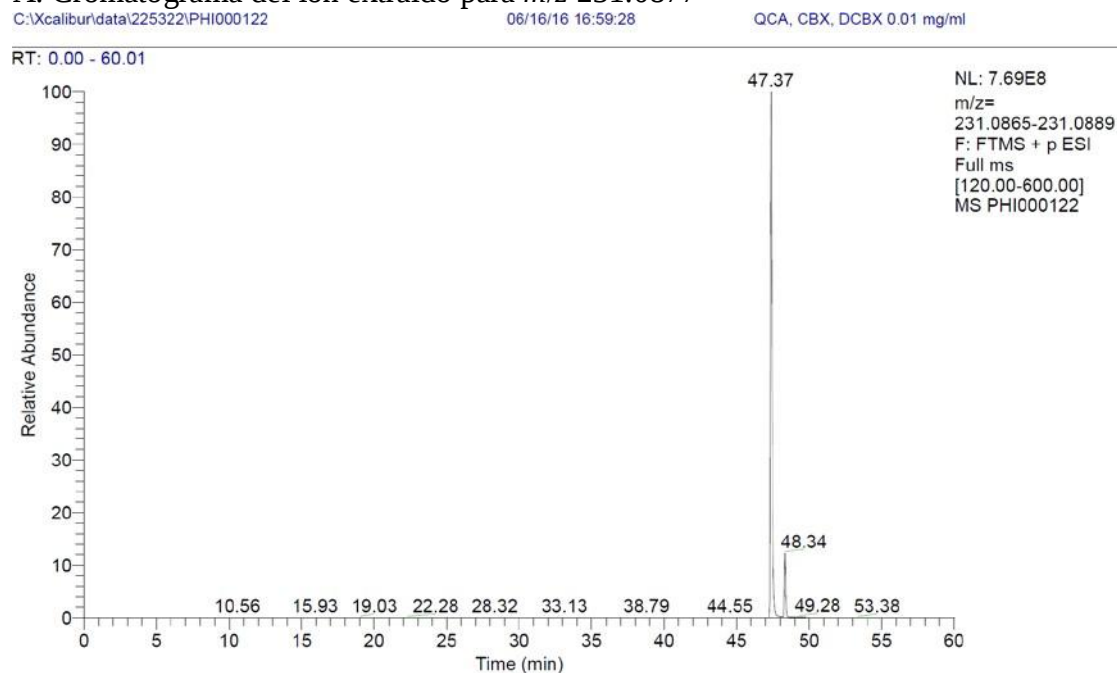
Estructura Postulada	Masa del Ion Observado (Da)	Masa Teórica del Ion (Da)	Formula elemental del ion
	263.0772	263.0775	C ₁₁ H ₁₁ N ₄ O ₄
	229.0719	229.0720	C ₁₁ H ₉ N ₄ O ₂
	203.0564	203.0564	C ₉ H ₇ N ₄ O ₂
	175.0504	175.0502	C ₉ H ₇ N ₂ O ₂
	147.0553	147.0553	C ₈ H ₇ N ₂ O
	129.0447	129.0447	C ₈ H ₅ N ₂

Figura 5 **Análisis Representativo del Estándar de Referencia de Desoxicarbadox por LCMS de Alta Resolución (Método 8)**

A. Cromatograma del ion extraído para m/z 231.0877



B. Escaneo completo expandido y producto ion de espectro de masas MS/MS

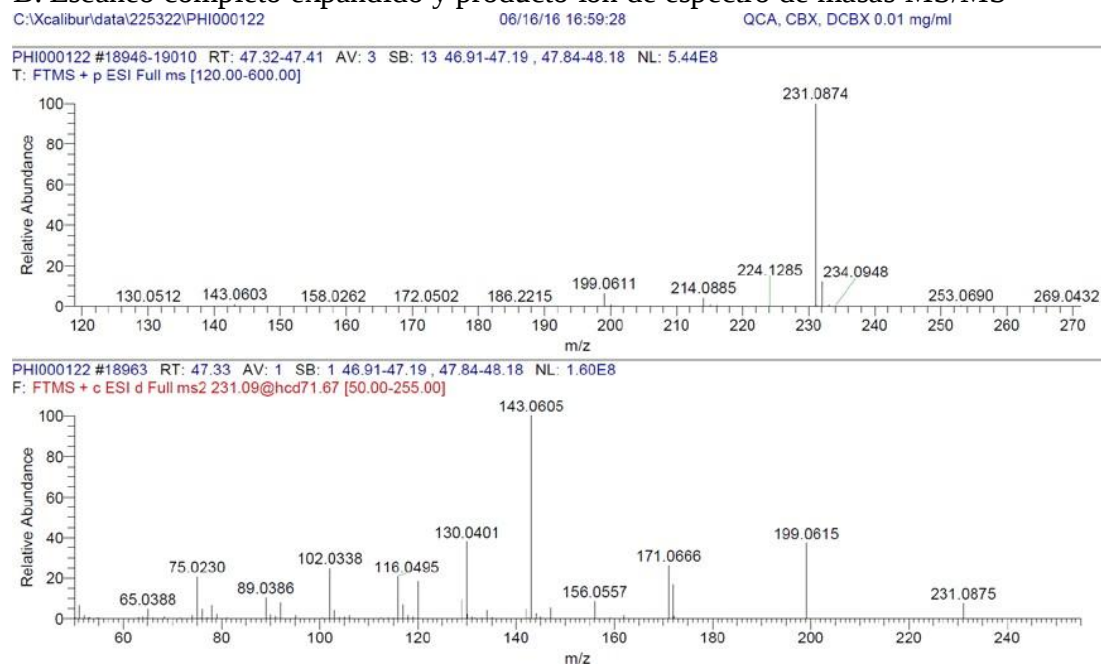


Figura 5 **Análisis Representativo del Estándar de Referencia de Desoxycarbadox por LCMS de Alta Resolución (Método 8)**
continuación

C. Estructuras Postuladas para los Iones Observados

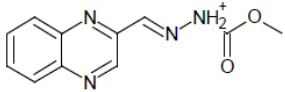
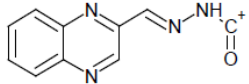
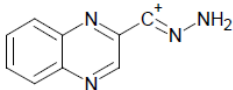
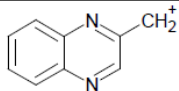
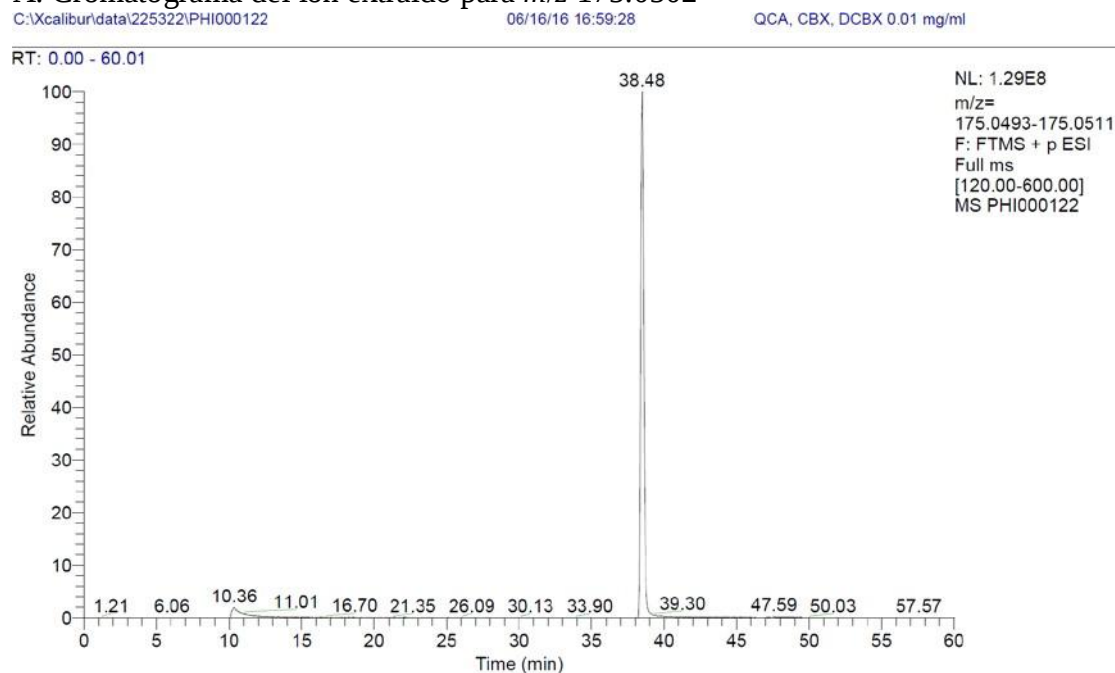
Estructura Postulada	Masa del Ion Observado (Da)	Masa Teórica del Ion (Da)	Formula elemental del ion
	231.0874	231.0877	C ₁₁ H ₁₁ N ₄ O ₂
	199.0615	199.0614	C ₁₀ H ₇ N ₄ O
	171.0666	171.0665	C ₉ H ₇ N ₄
	143.0605	143.0604	C ₉ H ₇ N ₂

Figura 6 Análisis Representativo del Estándar de Referencia de QCA por LCMS de Alta Resolución (Método 8)

A. Cromatograma del ion extraído para m/z 175.0502



B. Escaneo completo expandido y producto ion de espectro de masas de MS/MS

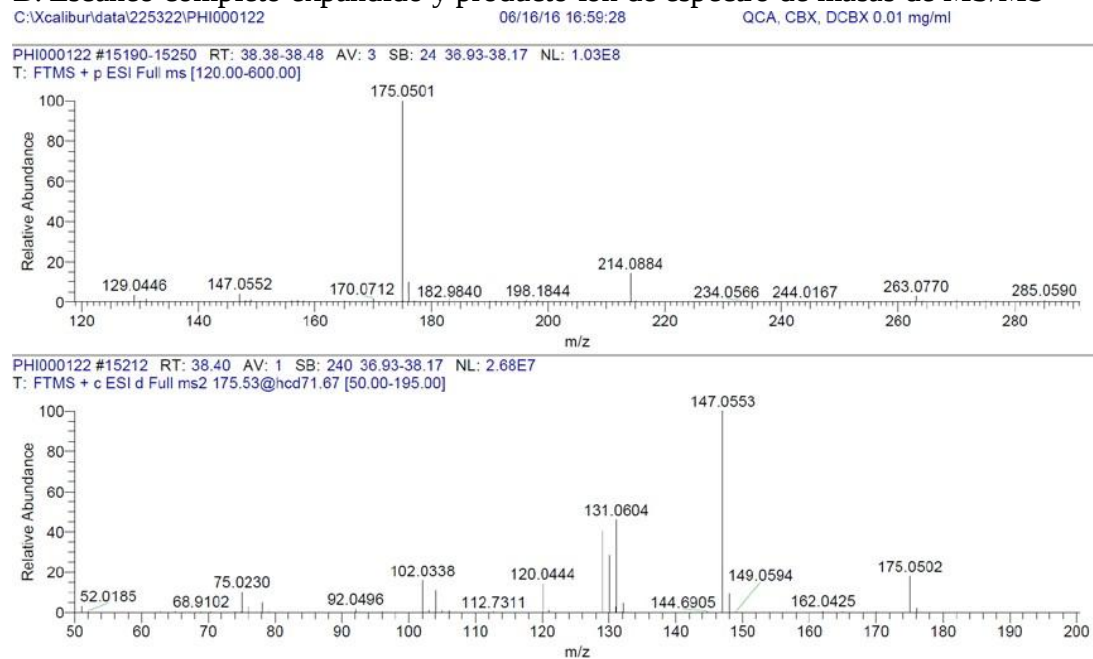


Figura 6 **Análisis Representativo del Estándar de Referencia de QCA
por LCMS de Alta Resolución (Método 8) continuación**

C. Estructuras Postuladas para los Iones Observados

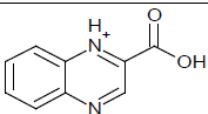
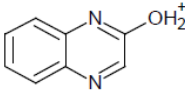
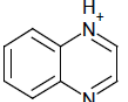
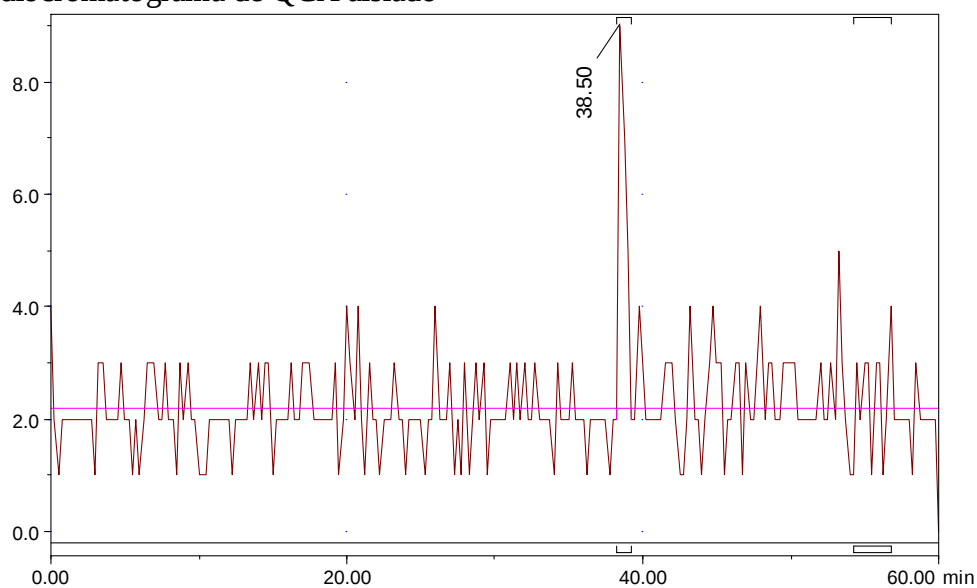
Estructura Postulada	Masa del Ion Observado (Da)	Masa Teórica del Ion (Da)	Formula elemental del ion
	175.0501	175.0502	C ₉ H ₇ N ₂ O ₂
	147.0553	147.0553	C ₈ H ₇ N ₂ O
	131.0604	131.0604	C ₈ H ₇ N ₂

Figura 7 Confirmación de QCA por LCMS de Alta Resolución usando el Método 3

Nombre de archivo MS: PHI006370
Nombre de archivo Laura: 8623 437 L14BS.Si.Aq1.Evaluation
Nombre de muestra: L14BS.Si.Aq1 (de hidrolizado básico de digesto de enzima L14BS.PRO.1E)

A. Radiocromatograma de QCA aislado



Nombre	Retención (min)	%ROI
Región 1	38.50	100.00

B. Cromatograma del ion extraído para m/z 175.0502

L14BS.Si.Aq1
PHI006370

13-Nov-2015 14:30:30
1: TOF MS ES+
175.05 10.00PPM
1.01e3

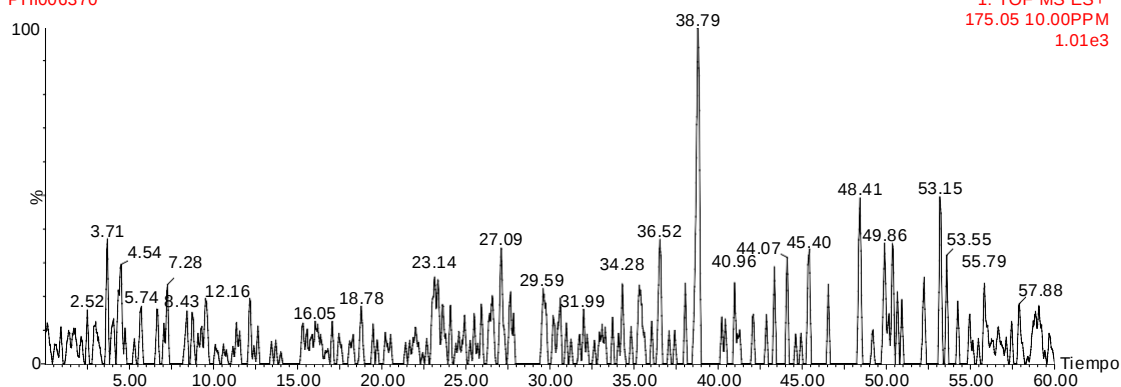
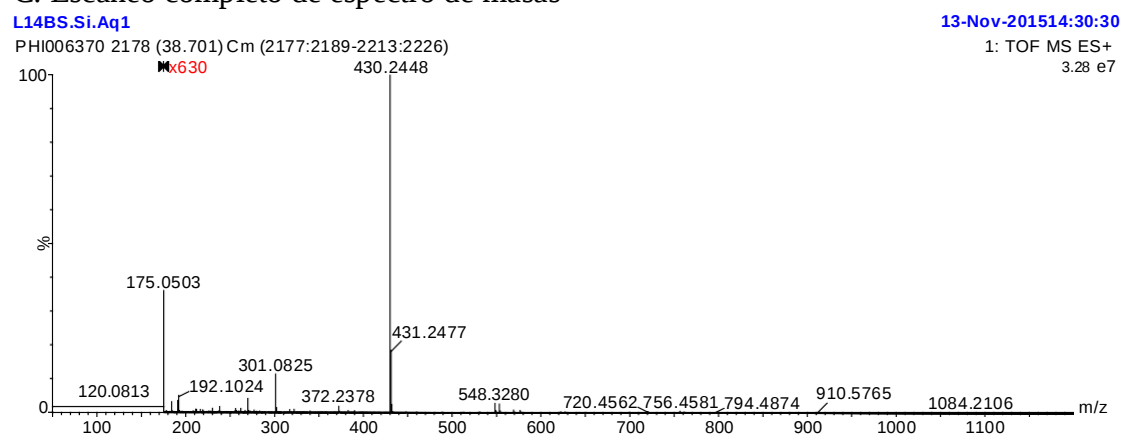


Figura 7 Confirmación de QCA por LCMS de Alta Resolución usando el Método 3 continuación

C. Escaneo completo de espectro de masas



D. Estructura postulada para el ion observado

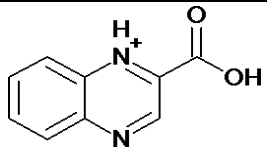
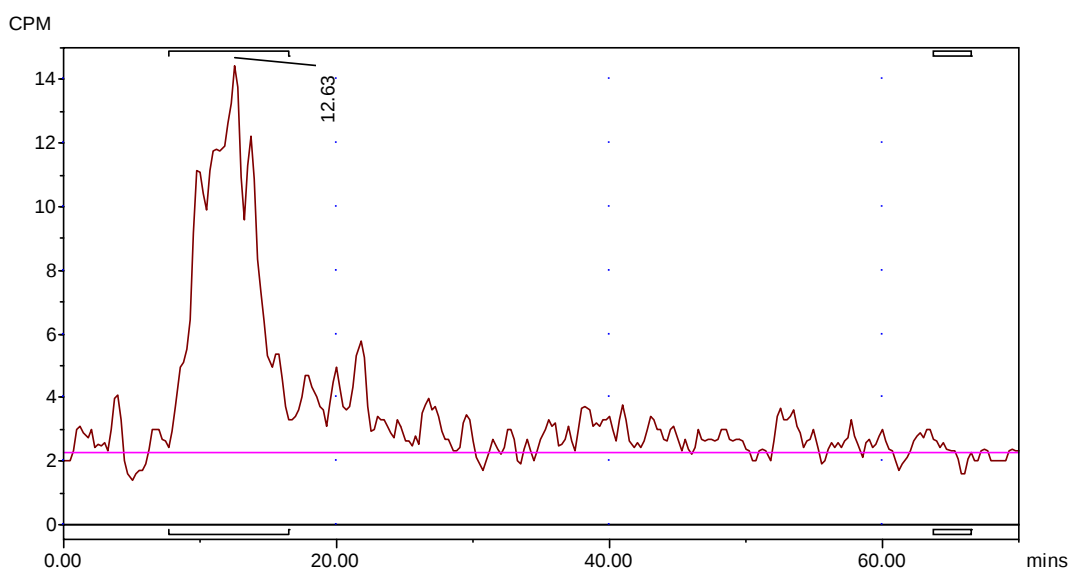
Estructura Postulada	Masa del Ion Observado (Da)	Masa Teórica del Ion (Da)	Formula elemental del ion
	175.0503	175.0502	C ₉ H ₇ N ₂ O ₂

Figura 8 SEC del Digesto de Proteasa (Método 4)

Nombre de archivo HPLC: PHI016090
Nombre de archivo Laura: 8551 067 L14BS.PRO.2ES.
Nombre de muestra de evaluación: L14BS.PRO.2ES



**Figura 9 Identificación de QCA en el Digesto de Péptido de 2-3 kDa por LCMS
(Método 5)**

Nombre de archivo MS: PHI000078

Nombre de la muestra: L14H.PES.3I1C3R

A. Cromatograma del ion extraído para m/z 175.0502

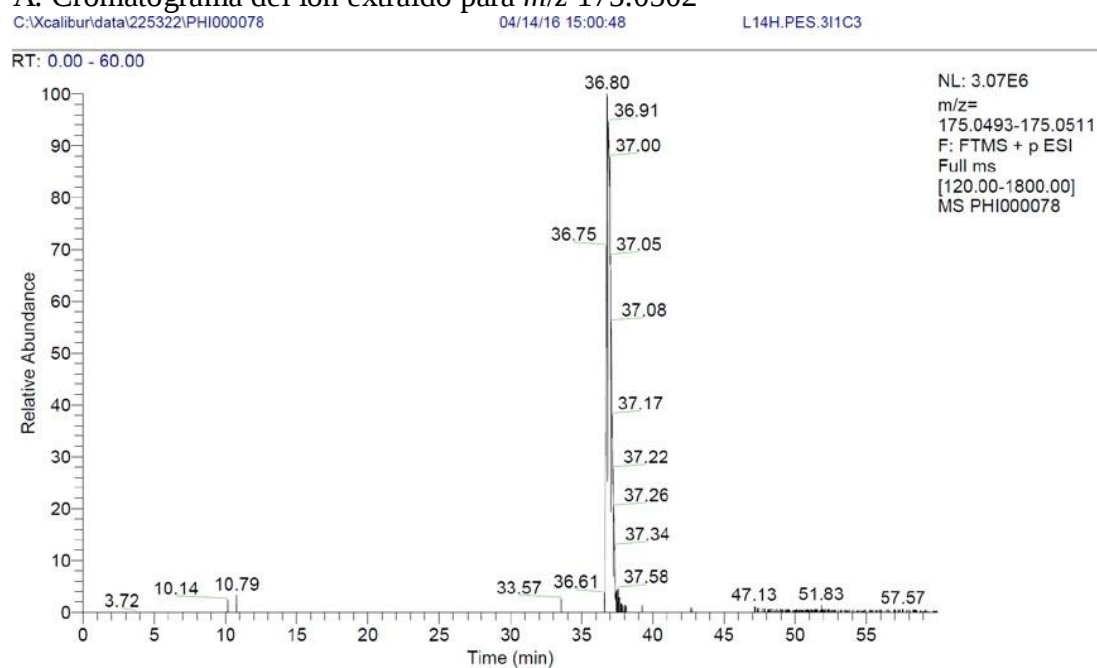
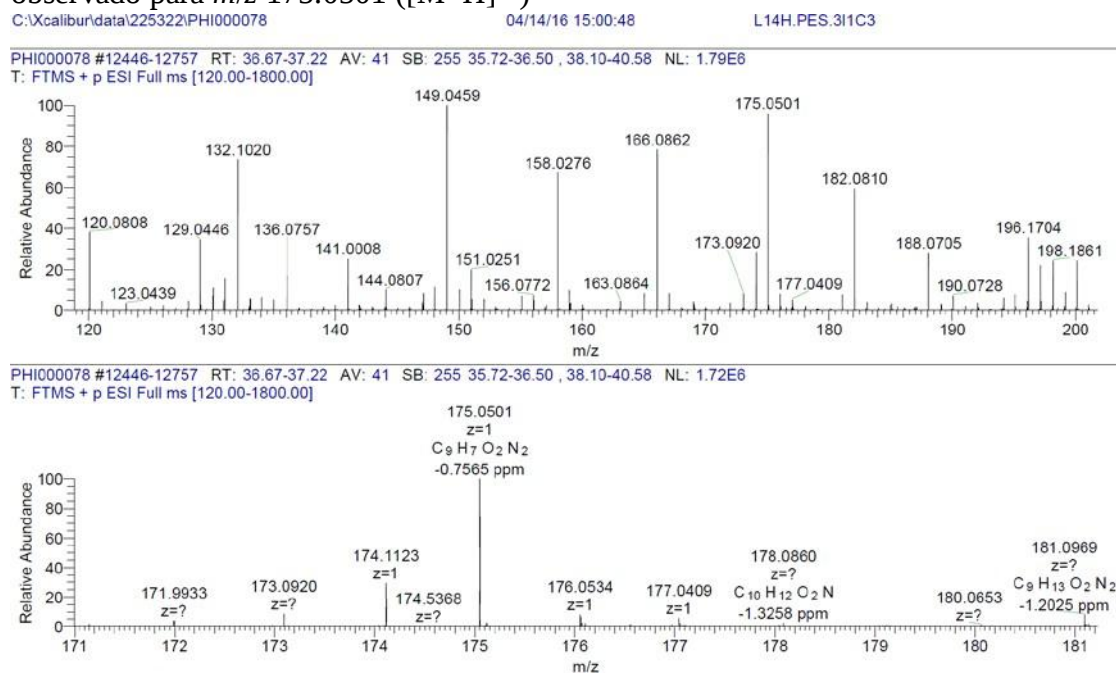


Figura 9 Identificación de QCA en el Digesto de Péptido de 2-3 kDa por LCMS (Método 5) continuación

B. Escaneo completo expandido del espectro de masas con el patrón del isótopo observado para m/z 175.0501 ($[M+H]^+$)



C. Estructura postulada para el ion observado

Estructura Postulada	Masa del Ion Observado (Da)	Masa Teórica del Ion (Da)	Formula elemental del ion
	175.0501	175.0502	C ₉ H ₇ N ₂ O ₂

**Figura 9 Identificación de QCA en el Digesto de Péptido de 2-3 kDa por LCMS
(Método 5) continuación**

D. Cromatograma del ion extraído para el estándar de referencia de QCA (m/z 175.0502) analizado usando el Método 5

Nombre de archivo MS: PHI000073

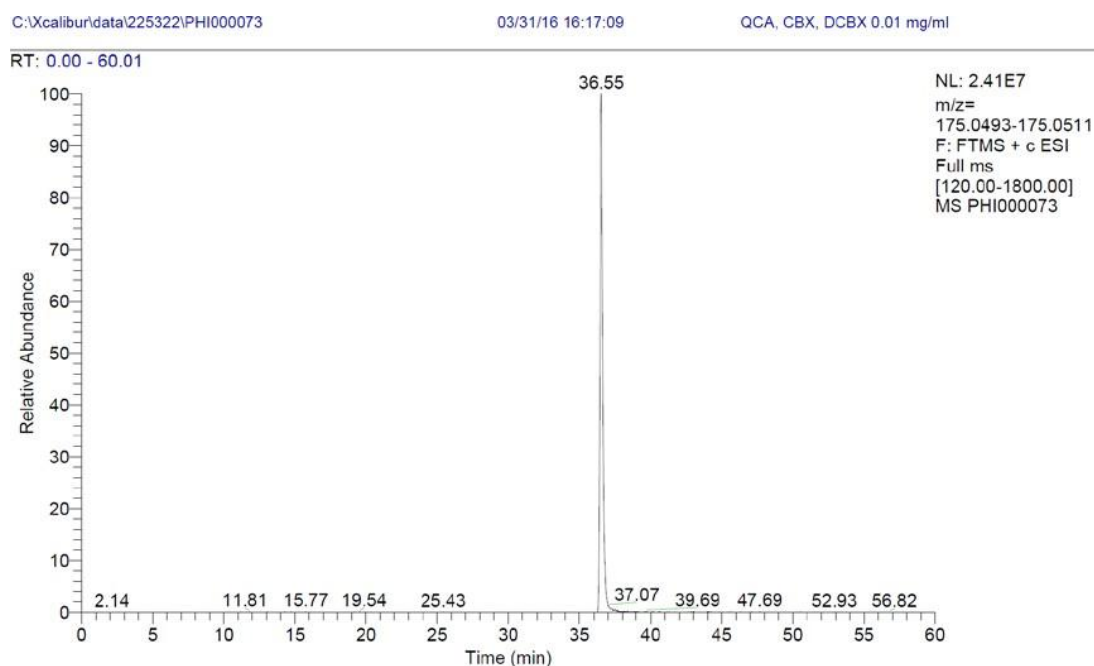
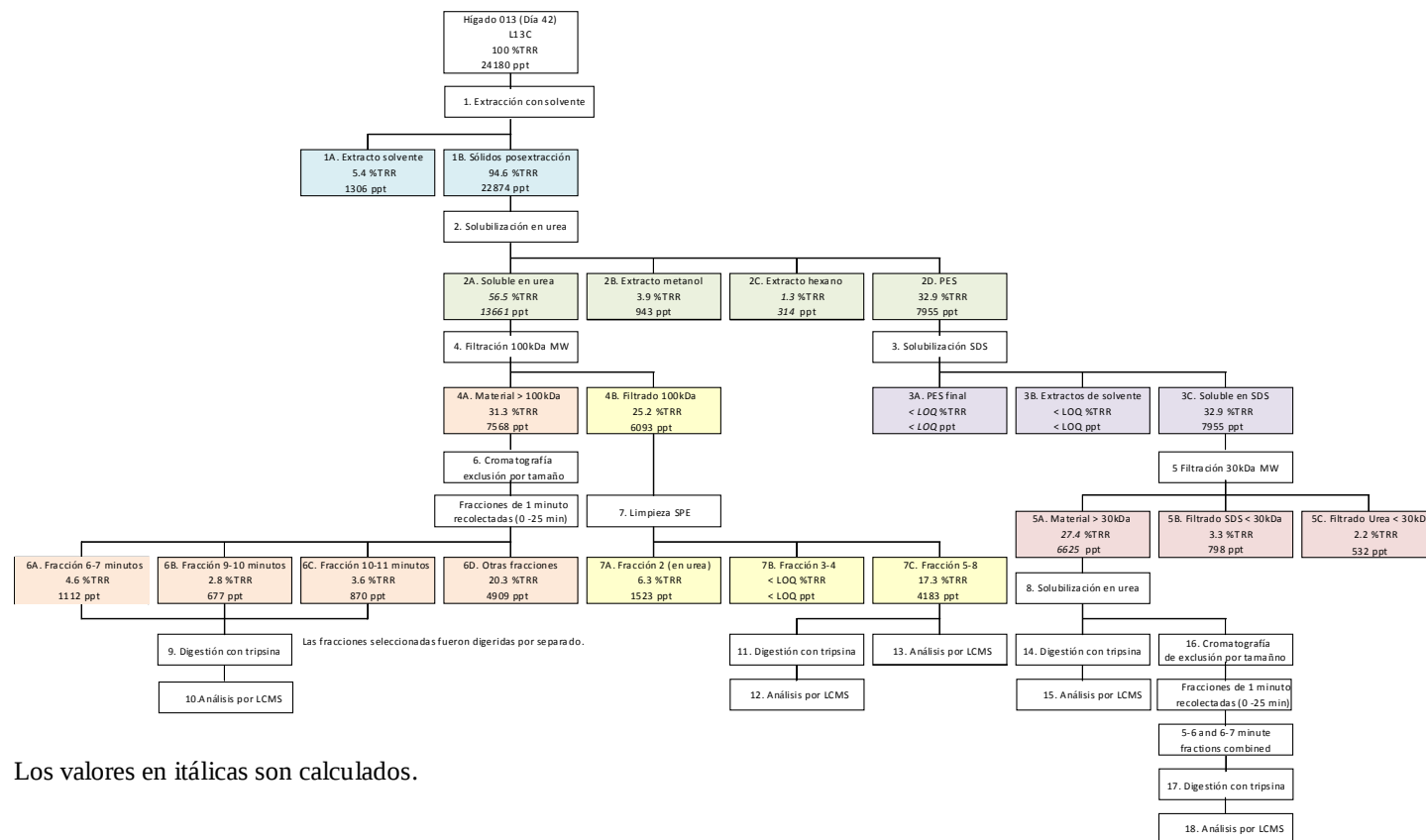


Figura 10 Generalidades de la Solubilización en Urea de los Residuos No Extraíbles con Solventes

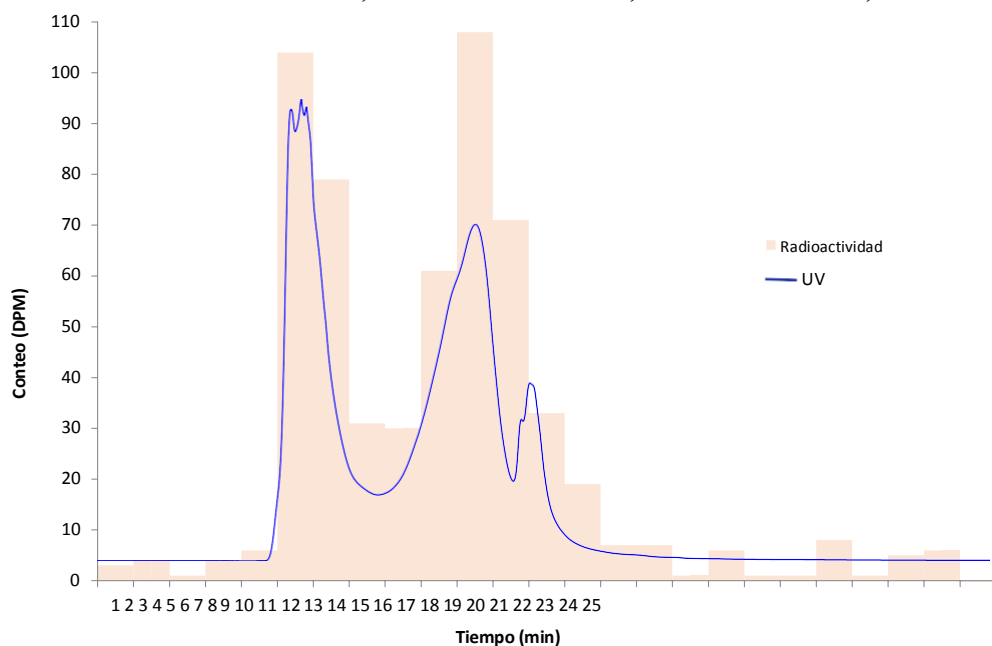


3A La radioactividad no se midió, por lo tanto no se puede calcular un valor LOQ. 3B La radioactividad fue >LOD pero <LOQ, el LOQ se calculó como 122 ppt; 7B La radioactividad en las fracciones 3-4 fue <LOD, el LOD se calculó como 47-328 ppt, El LOQ se calculó como 169-1199 ppt.

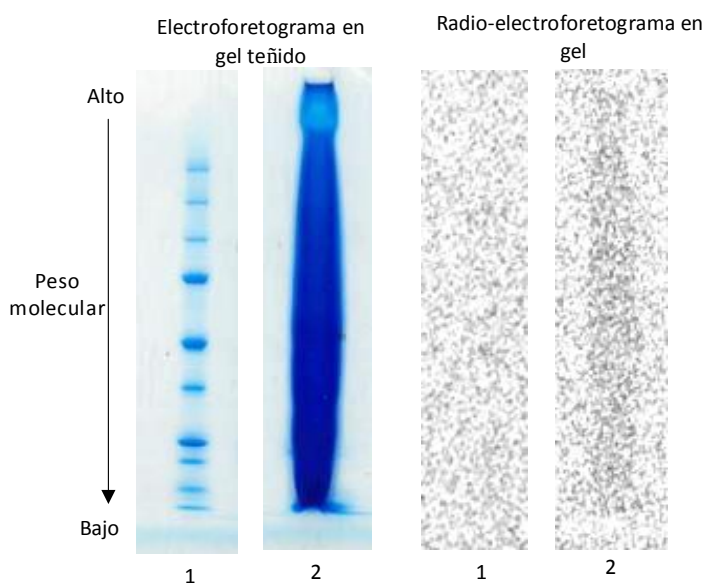
Figura 11 SEC y Electroforesis en Gel de Residuos Solubles en Urea >100 kDa (Método 6 y Método 9)

Radiocromatograma SEC y cromatograma UV superpuestos (no se muestra la escala UV)

Archivos: PHI018153- PHI018154, PHI018156-PHI018157; Muestra: L13C.SCD; Referencia: Figura 10, Caja 6



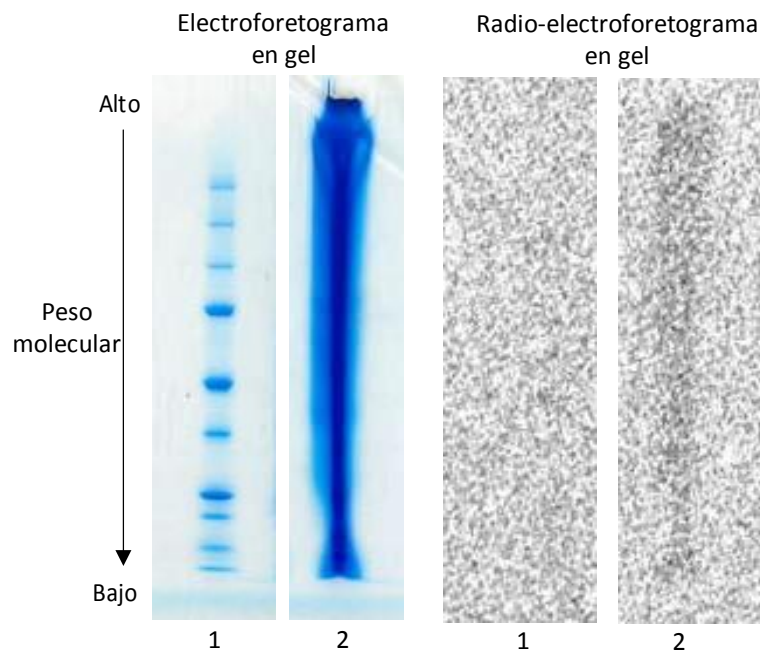
Electroforetograma en gel (Gel Ref GEP3)



1. Marcadores de peso molecular estándar de proteína (no se detectaron en el radio-electroforetograma)
2. Material soluble en urea con peso molecular >100 kDa (código de muestra L13C.SCD)

Figura 12 Electroforesis en Gel de Residuos Solubles en SDS (Método 9)

Electroforetograma en gel (Gel Ref GEP3)



1. Marcadores de peso molecular estándar de proteína (no se detectaron en el radio-electroforetograma)
2. Material solubilizado en SDS (código de muestra L13C.SDS.3E)

Figura 13 **Análisis LC-MS Representativo de una Mitad QCA-Lisina-Lisina Postulada Derivada de Material Soluble en Urea >100 kDa (Método 7)**

Nombre archivo MS: PHI000116
Nombre muestra: L13C.SCd11.TD2
Referencia: Figura 10, Caja 6C, Caja 10

A. Cromatograma del ion extraído para m/z 216.1237 ($[M+2H]^{2+}$)

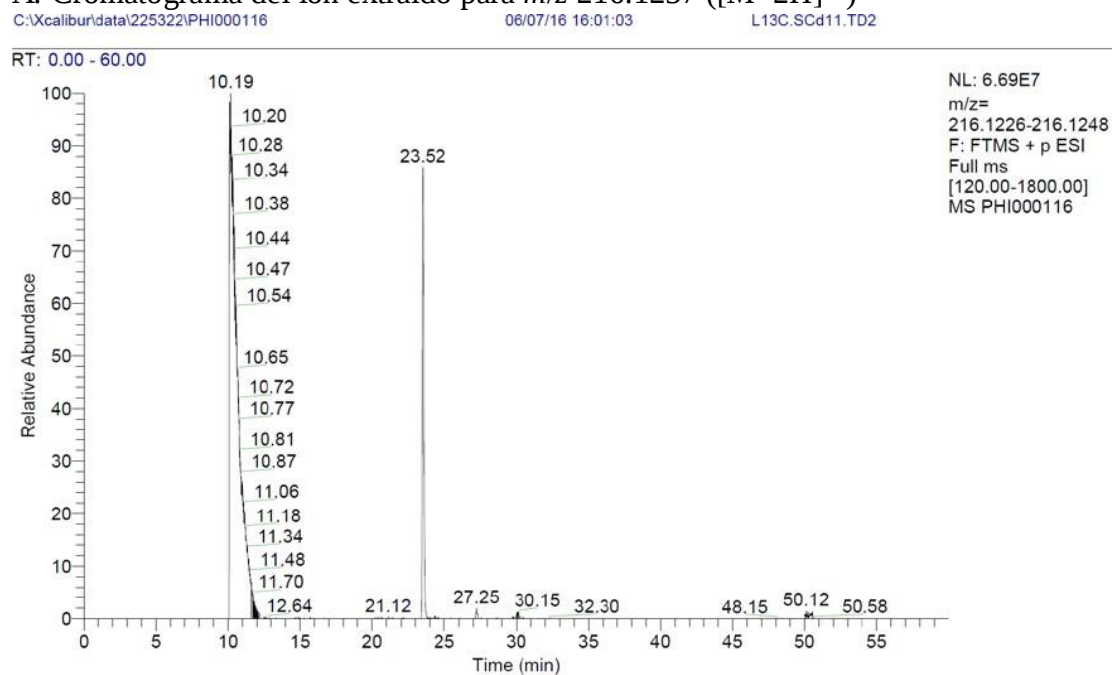


Figura 13 **Análisis LC-MS Representativo de una Mitad QCA-Lisina-Lisina**
Postulada Derivada de Material Soluble en Urea >100 kDa (Método
7) continuación

B. Escaneo completo expandido de espectro de masas con patrón de isótopos observados para m/z 216.1233 ($[M+2H]^{2+}$)

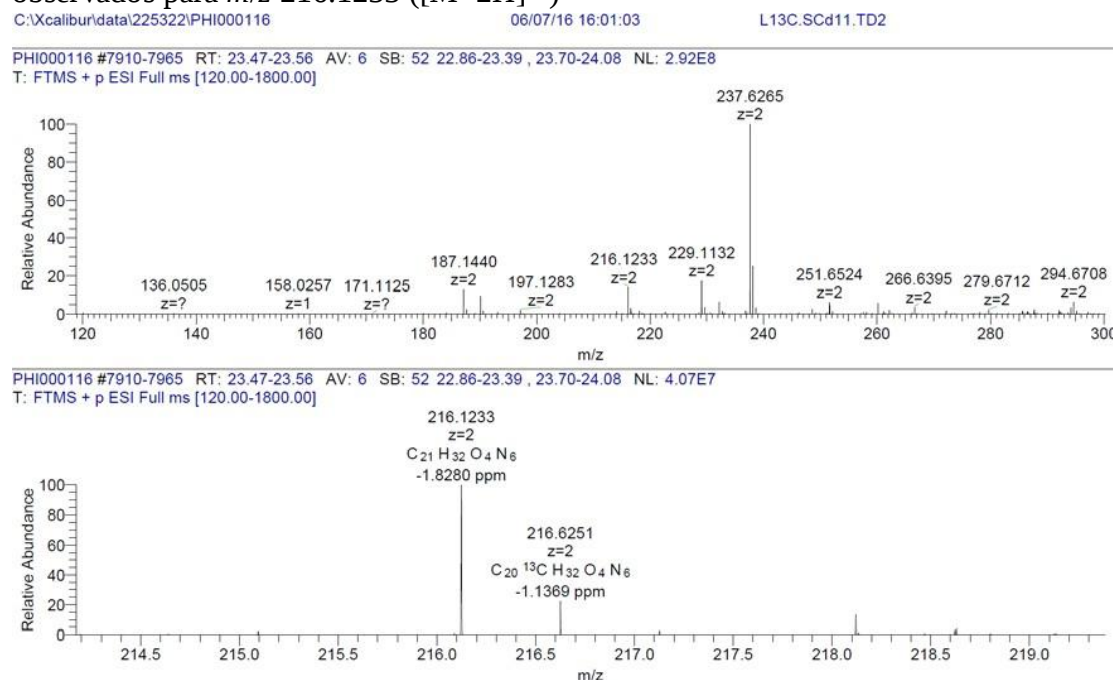


Figura 13 **Análisis LC-MS Representativo de una Mitad QCA-Lisina-Lisina**
Postulada Derivada de Material Soluble en Urea >100 kDa (Método
7) continuación

C. Espectro de masas del producto ion de MS/MS expandido

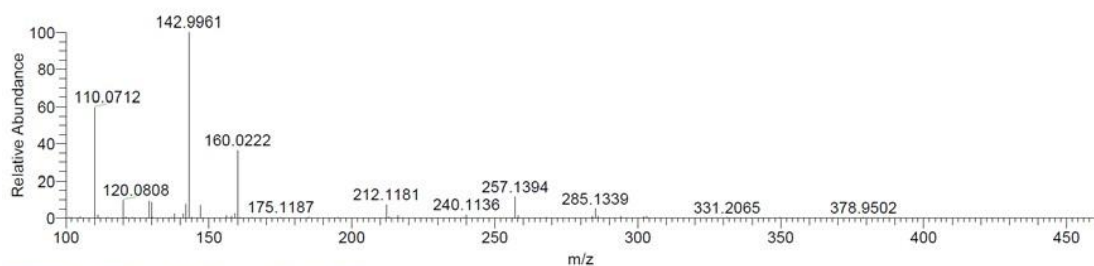
C:\Xcalibur\data\225322\PHI000116

06/07/16 16:01:03

L13C.SCd11.TD2

PHI000116 #7903 RT: 23.46 AV: 1 NL: 4.59E6

F: FTMS + c ESI d Full ms2 216.13@hcd35.00 [100.00-460.00]



PHI000116 #7903 RT: 23.46 AV: 1 NL: 4.59E6

F: FTMS + c ESI d Full ms2 216.13@hcd35.00 [100.00-460.00]

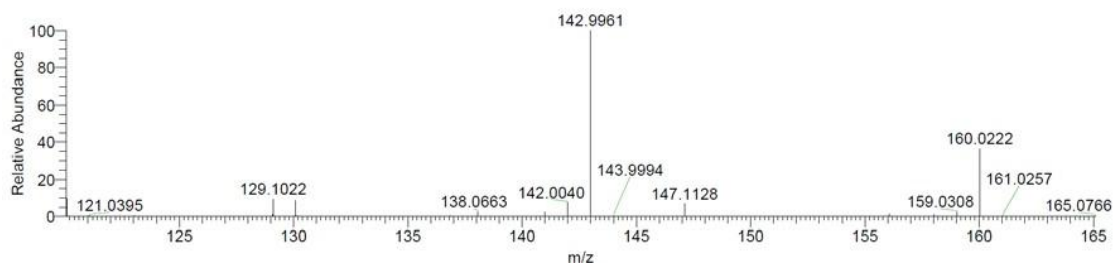


Figura 13 **Análisis LC-MS Representativo de una Mitad QCA-Lisina-Lisina**
Postulada Derivada de Material Soluble en Urea >100 kDa (Método
7) continuación

D. Estructuras Postuladas para los Iones Observados

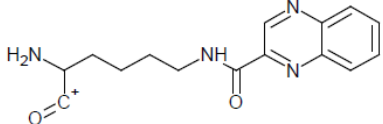
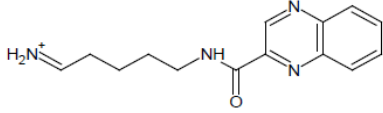
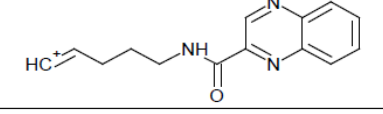
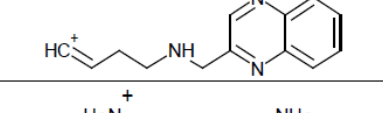
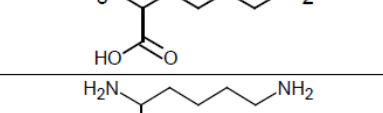
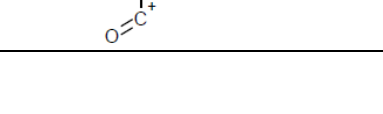
Estructura postulada	<i>m/z</i> del ion observado	Teórico de <i>m/z</i> del ion	Fórmula elemental del ion
$[(\text{QCA-Lis-Lis})+2\text{H}]^{2+}$	216.1233	216.1237 [M+2H] ²⁺	C ₂₁ H ₃₂ N ₆ O ₄
	285.1339	285.1346	C ₁₅ H ₁₇ N ₄ O ₂
	257.1394	257.1397	C ₁₄ H ₁₇ N ₄ O
	240.1136	240.1131	C ₁₄ H ₁₄ N ₃ O
	212.1181	212.1182	C ₁₃ H ₁₄ N ₃
	147.1128	147.1128	C ₆ H ₁₅ N ₂ O ₂
	129.1022	129.1022	C ₆ H ₁₃ N ₂ O

Figura 14 **Análisis LC-MS Representativo de un Péptido Triptico Derivado de Material Soluble en Urea >100 kDa y Postulado para Contener QCA Ligado a Lisina (Método 7)**

Nombre archivo MS: PHI00116
Nombre muestra: L13C.SCd.11.TD2
Referencia: Figura 10, Caja 6C, Caja 10

A. Cromatograma del ion extraído para m/z 283.1489 ($[M+3H]^{3+}$)

C:\Xcalibur\data\225322\PHI000116

06/07/16 16:01:03

L13C.SCd11.TD2

RT: 0.00 - 60.00

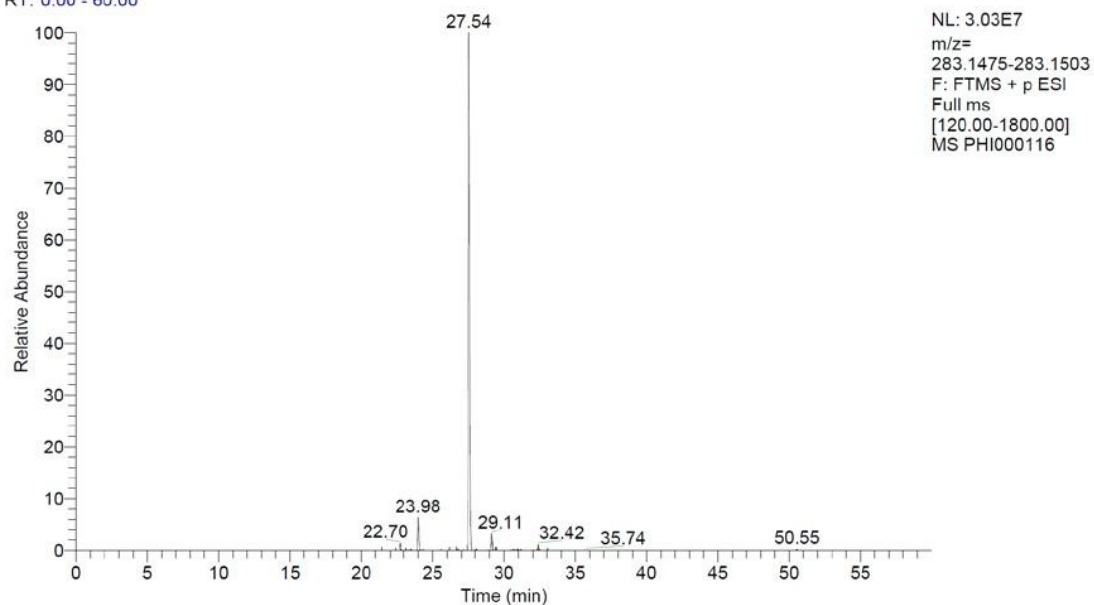
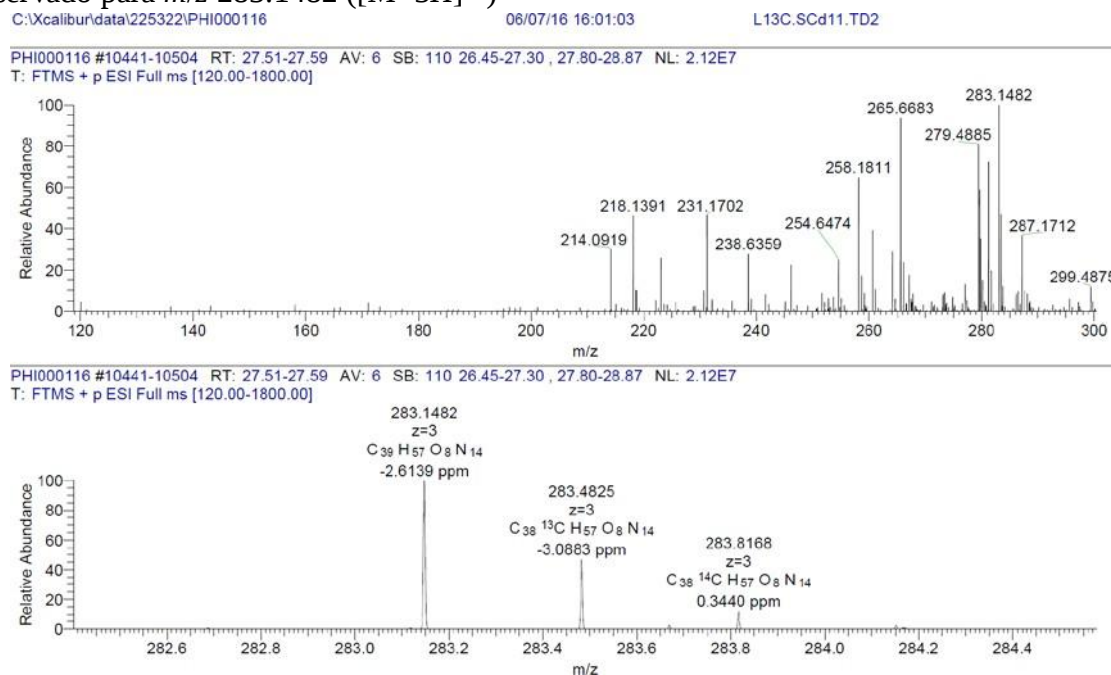


Figura 14 **Análisis LC-MS Representativo de un Péptido Tríptico Derivado de Material Soluble en Urea >100 kDa y Postulado para Contener QCA Ligado a Lisina (Método 7) continuación**

B. Escaneo completo expandido del espectro de masas con patrón de isótopos observado para m/z 283.1482 ($[M+3H]^{3+}$)



C. Espectro de masas del ion producto de MS/MS

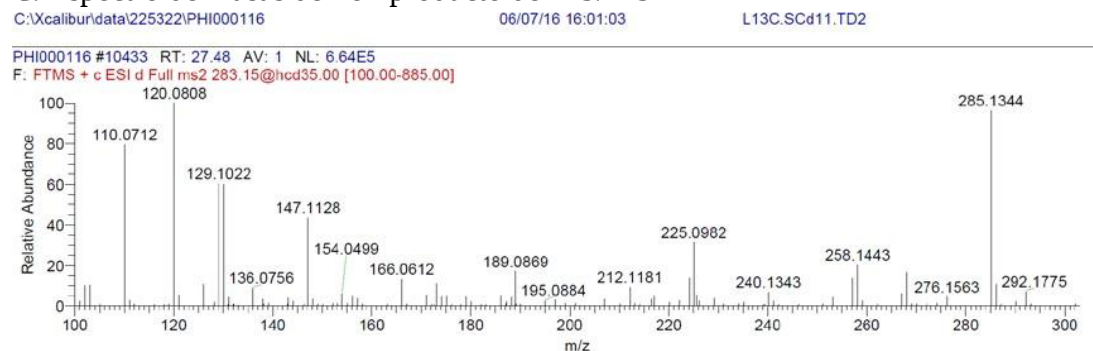


Figura 14 **Análisis LC-MS Representativo de un Péptido Tríptico Derivado de Material Soluble en Urea >100 kDa y Postulado para Contener QCA Ligado a Lisina (Método 7) continuación**

D. Espectro de masas del ion producto de MS/MS expandido

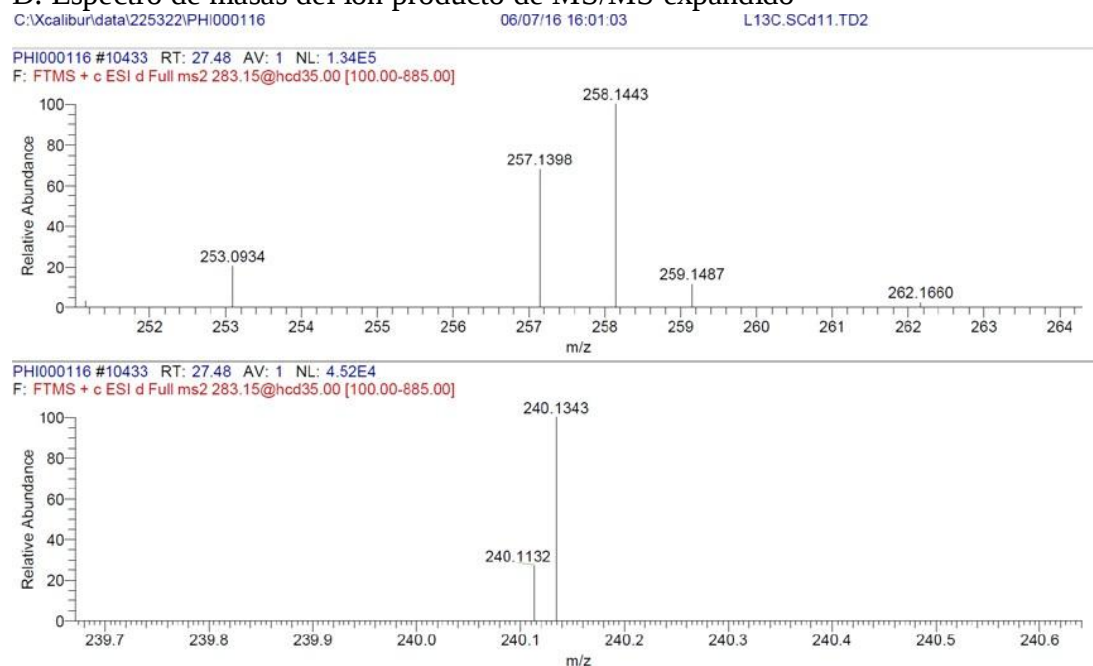


Figura 14 **Análisis LC-MS Representativo de un Péptido Tríptico Derivado de Material Soluble en Urea >100 kDa y Postulado para Contener QCA Ligado a Lisina (Método 7) continuación**

E. Estructuras Postuladas para los Iones Observados

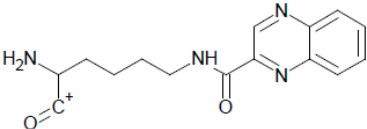
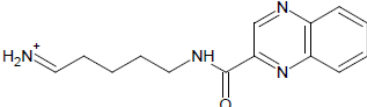
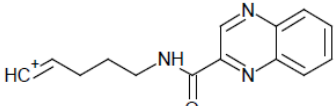
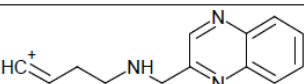
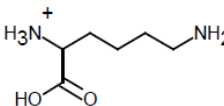
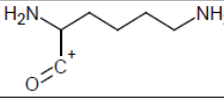
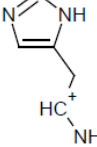
Estructura postulada	<i>m/z</i> del ion observado	Teórico de <i>m/z</i> del ion	Fórmula elemental del ion
$[(\text{QCA-Lis-Lis-Ala-Ala-His-His})+3\text{H}]^{3+}$	283.1482	283.1489 [M+3H] ³⁺	C ₃₉ H ₅₇ N ₁₄ O ₈
	285.1344	285.1346	C ₁₅ H ₁₇ N ₄ O ₂
	257.1398	257.1397	C ₁₄ H ₁₇ N ₄ O
	240.1132	240.1131	C ₁₄ H ₁₄ N ₃ O
	212.1181	212.1182	C ₁₃ H ₁₄ N ₃
	147.1128	147.1128	C ₆ H ₁₅ N ₂ O ₂
	129.1022	129.1022	C ₆ H ₁₃ N ₂ O
	110.0712	110.0713	C ₅ H ₈ N ₃

Figura 15 Análisis LC-MS Representativo de un Péptido Triptico Derivado de Material Soluble en SDS >30 kDa y Postulado para Contener QCA Ligado a Lisina (Método 7)

Nombre de archivo MS: PHI000120
Nombre muestra: L13C.SDSa6-7.TD2
Referencia: Figura 10, Caja 5A, Caja 18

A. Cromatograma del ion extraído para m/z 283.1489 ($[M+3H]^{3+}$)

C:\Xcalibur\data\225322\PHI000120

06/16/16 14:04:49

L13C.SDSa6-7.TD2

RT: 0.00 - 60.00

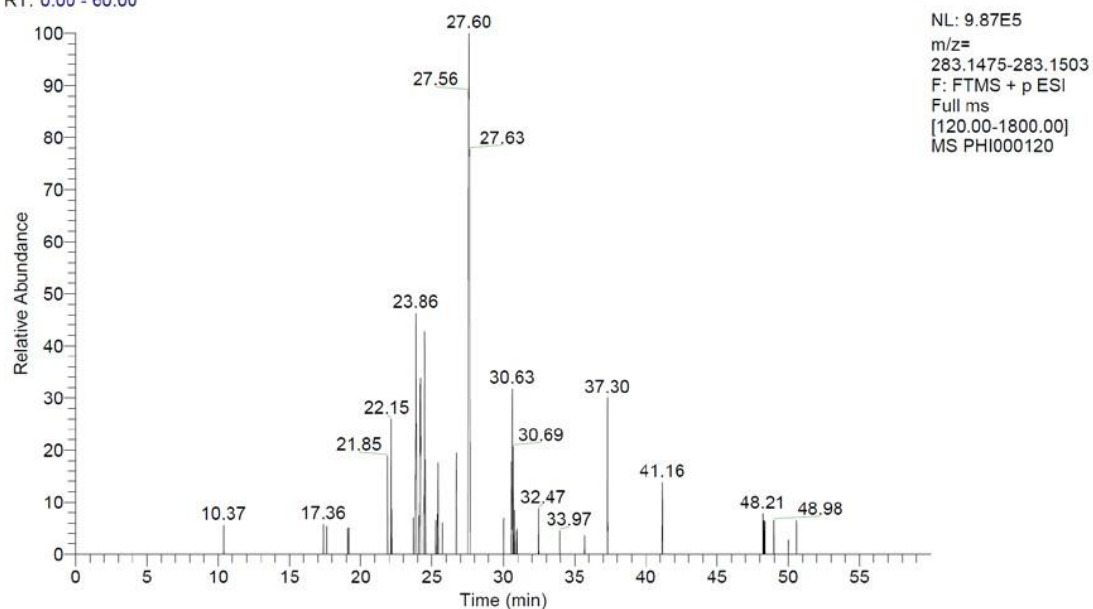
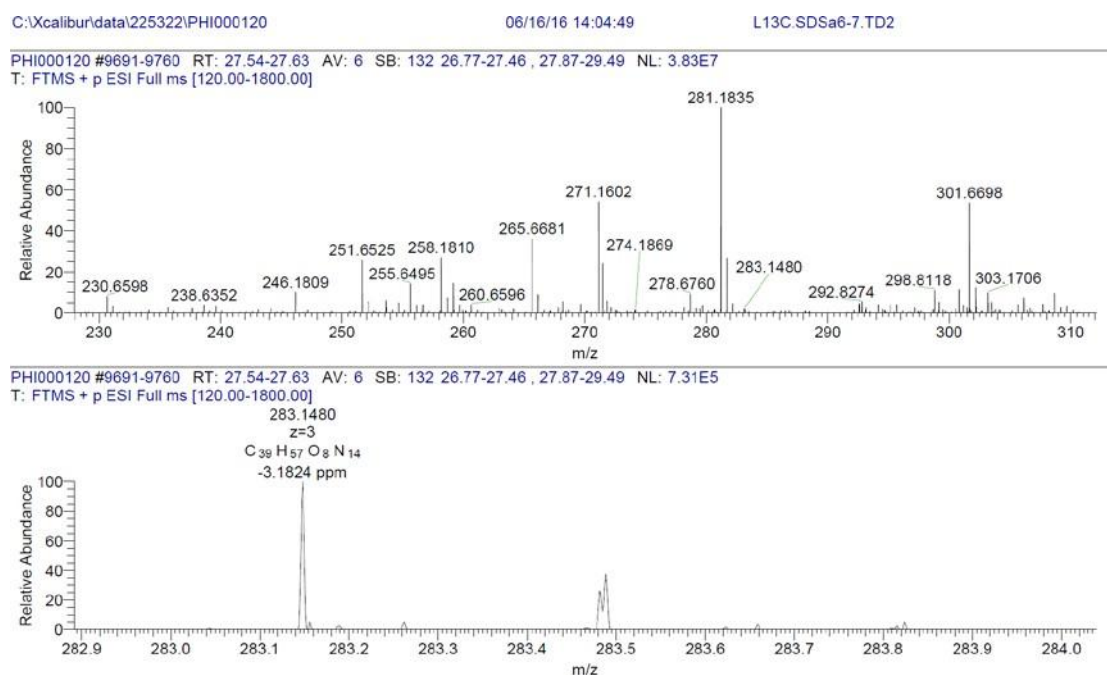


Figura 15 **Análisis LC-MS Representativo de un Péptido Tríptico Derivado de Material Soluble en SDS >30 kDa y Postulado para Contener QCA Ligado a Lisina (Método 7) continuación**

B. Escaneo completo expandido de espectro de masas con patrón de isótopos observado para m/z 283.1480 ($[M+3H]^{3+}$)



C. Estructuras Postuladas para los Iones Observados

Estructura postulada	m/z del ion observado	Teórico de m/z del ion	Fórmula elemental del ion
$[(QCA-Lis-Lis-Ala-Ala-His-His)+3H]^{3+}$	283.1480	283.1489 $[M+3H]^{3+}$	C ₃₉ H ₅₇ N ₁₄ O ₈

Figura 16 **Análisis LC-MS Representativo de un Péptido Triptico Derivado de Material Soluble en Urea >100 kDa y Postulado para Contener QCA Ligado a Lisina (Método 7)**

Nombre de archivo MS: PHI000117
Nombre de muestra: L13C.SM.TD2
Referencia: Figura 10, Caja 7C, Caja 12

A. Cromatograma del ion extraído para m/z 283.1489 ($[M+3H]^{3+}$)

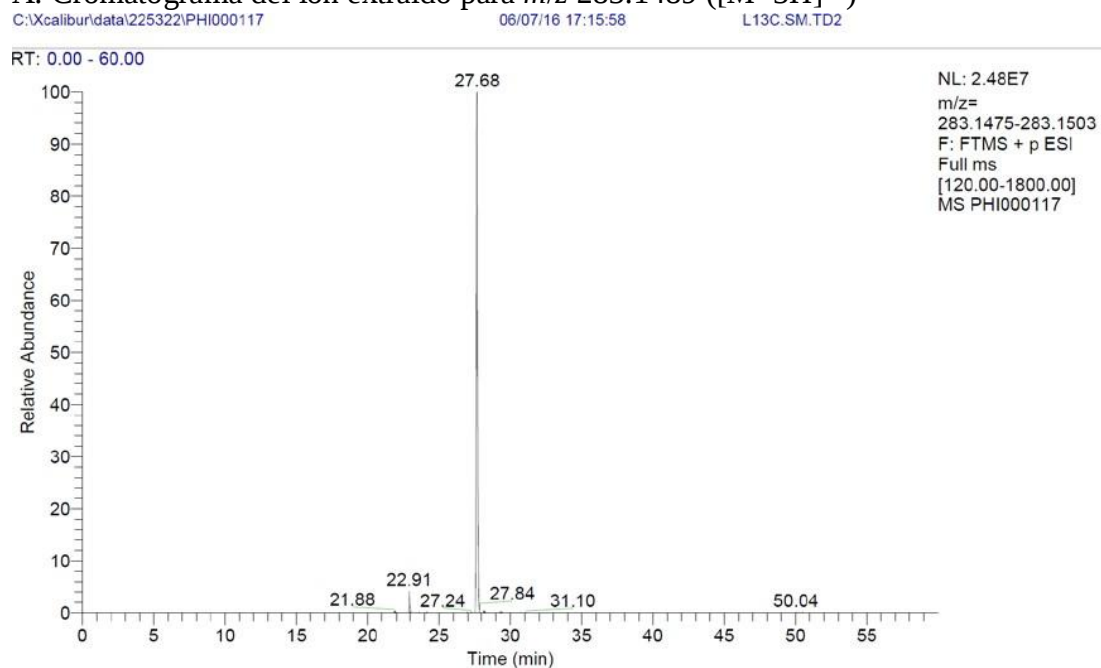
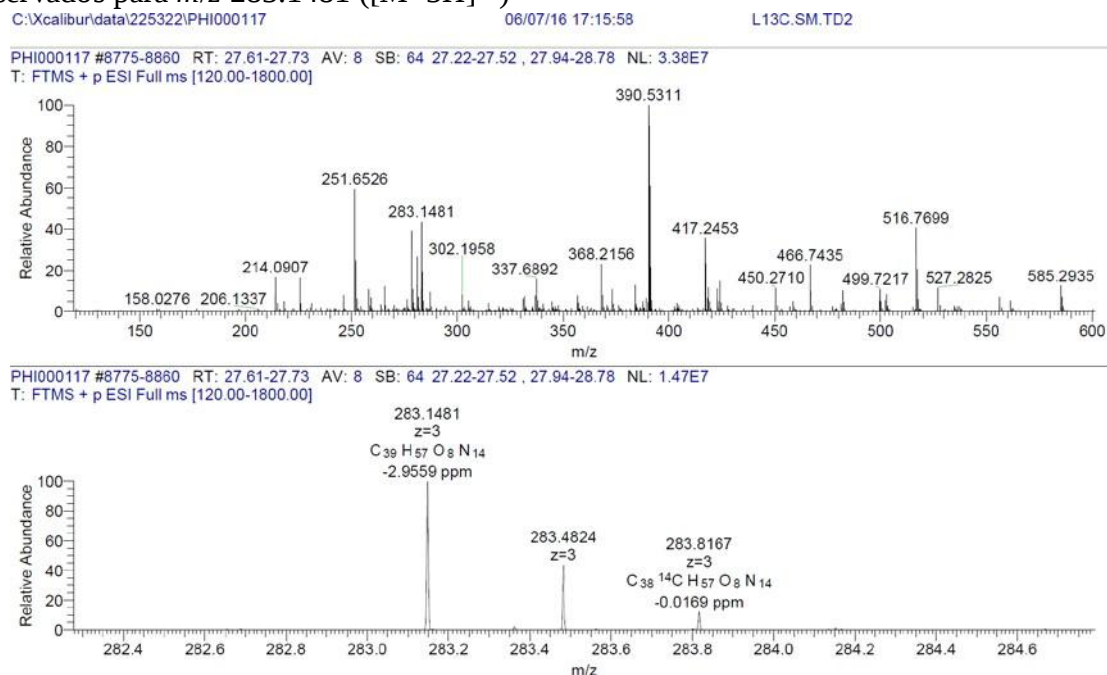


Figura 16 **Análisis LC-MS Representativo de un Péptido Triptico Derivado de Material Soluble en Urea >100 kDa y Postulado para Contener QCA Ligado a Lisina (Método 7) continuación**

B. Escaneo completo expandido del espectro de masas con patrón de isótopos observados para m/z 283.1481 ($[M+3H]^{3+}$)



C. Espectro de masas de ion producto de MS/MS

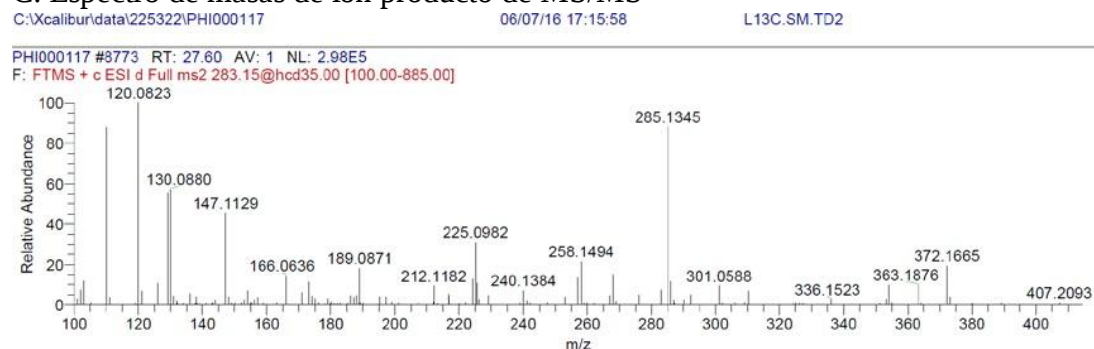
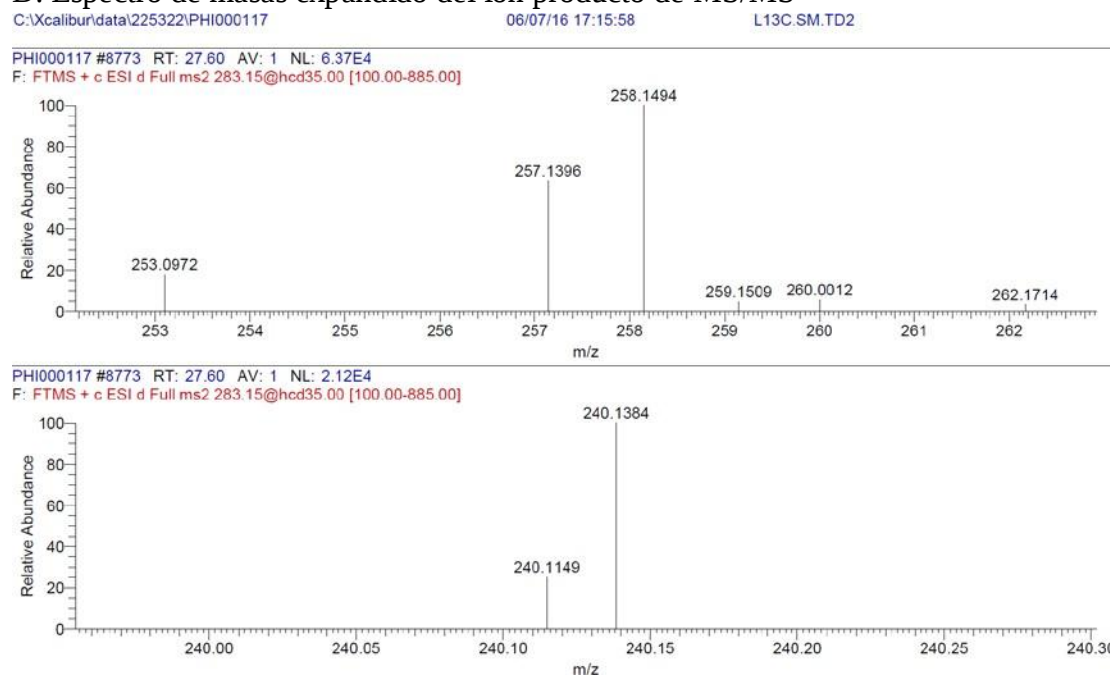


Figura 16 **Análisis LC-MS Representativo de un Péptido Triptico Derivado de Material Soluble en Urea >100 kDa y Postulado para Contener QCA Ligado a Lisina (Método 7) continuación**

D. Espectro de masas expandido del ion producto de MS/MS



E.

F. Espectro de masas expandido del ion producto de MS/MS

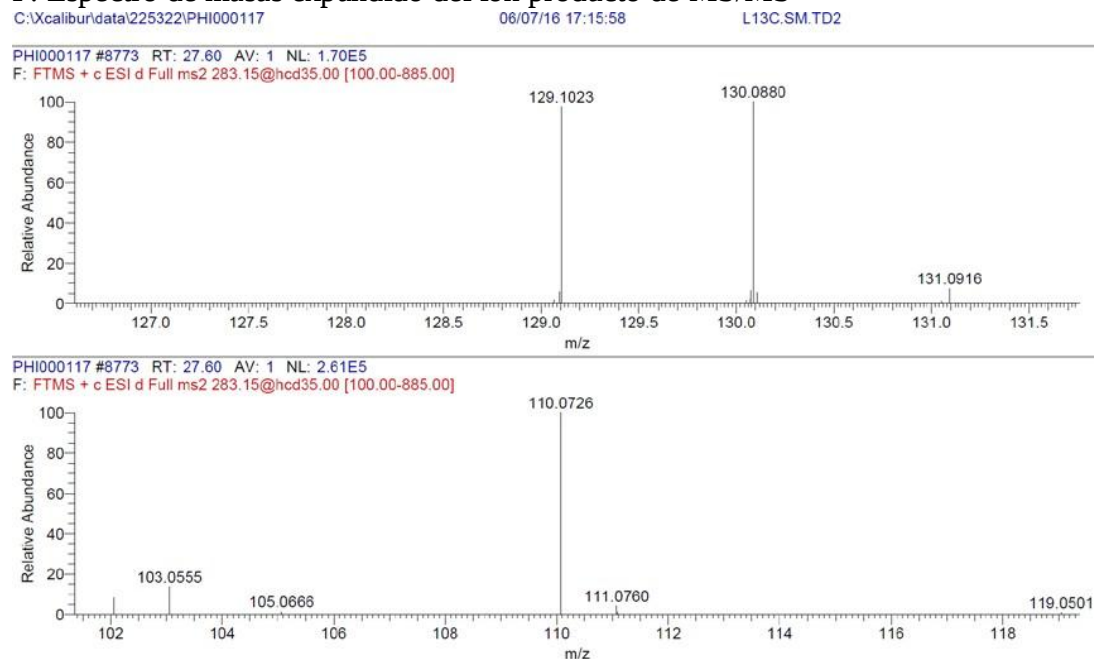


Figura 16 **Análisis LC-MS Representativo de un Péptido Tríptico Derivado de Material Soluble en Urea >100 kDa y Postulado para Contener QCA Ligado a Lisina (Método 7) continuación**

G. Estructuras Postuladas para los Iones Observados

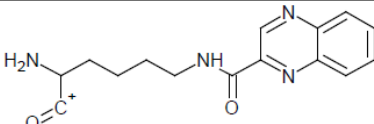
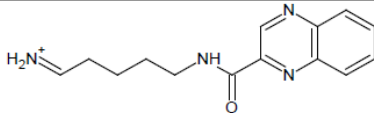
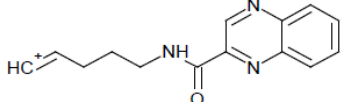
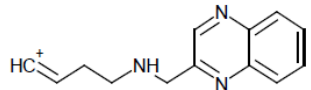
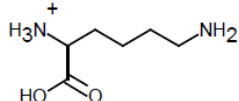
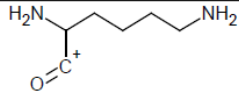
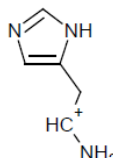
Estructura postulada	<i>m/z</i> del ion observado	Teórico de <i>m/z</i> del ion	Fórmula elemental del ion
$[(\text{QCA-Lis-Lis-Ala-Ala-His-His})+3\text{H}]^{3+}$	283.1481	283.1489 [M+3H] ³⁺	C ₃₉ H ₅₇ N ₁₄ O ₈
	285.1345	285.1346	C ₁₅ H ₁₇ N ₄ O ₂
	257.1396	257.1397	C ₁₄ H ₁₇ N ₄ O
	240.1149	240.1131	C ₁₄ H ₁₄ N ₃ O
	212.1182	212.1182	C ₁₃ H ₁₄ N ₃
	147.1129	147.1128	C ₆ H ₁₅ N ₂ O ₂
	129.1023	129.1022	C ₆ H ₁₃ N ₂ O
	110.0726	110.0713	C ₅ H ₈ N ₃

Figura 17 Interpretación de los Espectros de Masa Característicos de la Mitad QCA-Lisina

La masa exacta para el pico mostrado en el EIC de abajo es coherente con la masa de un péptido compuesto por QCA-lis-lis-ala-ala-his-his (note que la secuencia absoluta no fue determinada).

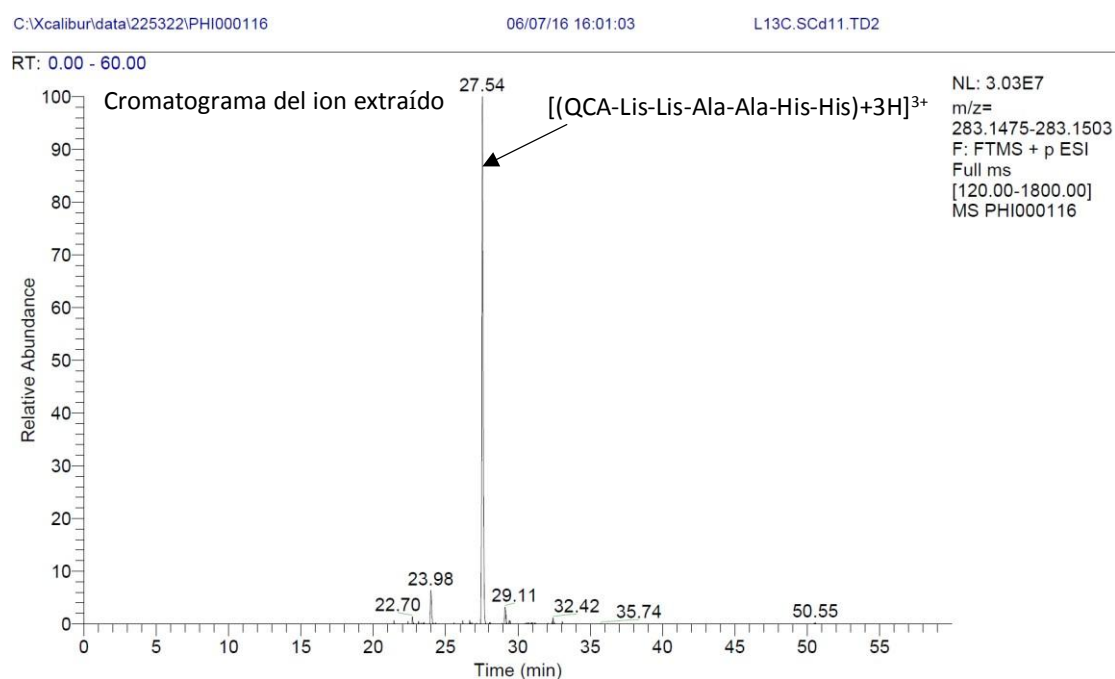
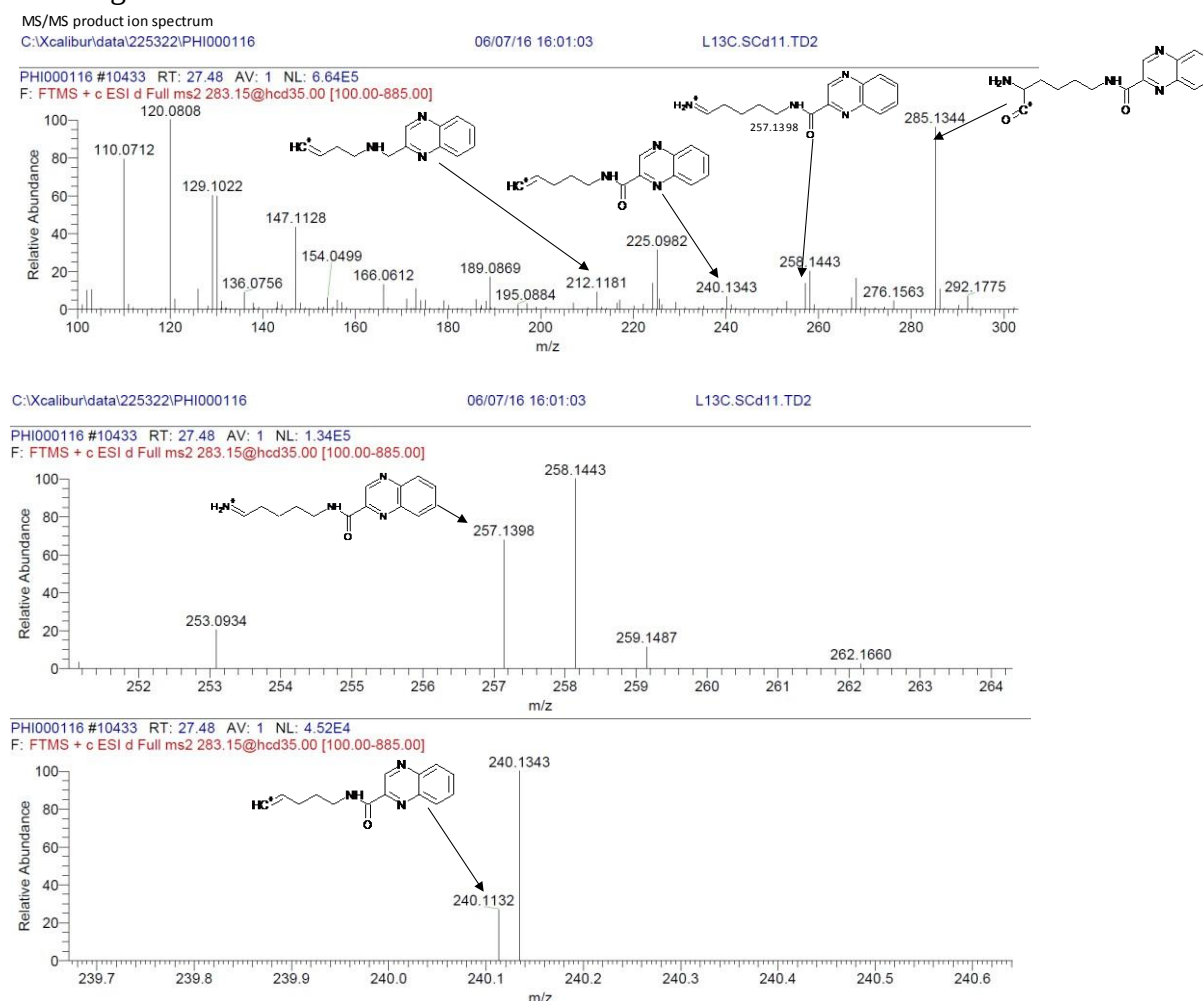


Figura 17 Interpretación de los Espectros de Masa Característicos de la Mitad QCA-Lisina, continuación

Los espectros del ion producto derivado de este péptido demuestra múltiples fragmentos ion que fueron coherentes con una especie en la cual QCA está ligado a lisina y, por lo tanto, incorporado en el proteoma de una manera no específica. Las estructuras postuladas para los iones característicos de una mitad QCA-lisina se muestran con el espectro del ion producto como sigue.



La observación de una masa exacta para este péptido junto con la identificación de múltiples fragmentos, que fueron coherentes con QCA ligado covalentemente a lisina que se origina de esta masa exacta, proporciona evidencia para apoyar la identificación molecular de QCA ligado a lisina.

11 APÉNDICES

Apéndice 1 Métodos Analíticos

Método 1

El método 1 se usó para investigar la presencia de carbadox, desoxicarbadox y QCA después de la hidrólisis química y/o digestión enzimática de residuos no extraíbles con solventes.

Instrumentación:

Espectrómetro de masas: AB Sciex API 5000
Bombas LC: Perkin Elmer PE LC-200
Auto muestreador: CTC PAL
Manejo de datos: Analyst Versión 1.4.2

Condiciones LC:

Columna analítica: Intakt Scherzo SS-C18, 150 × 4.6 mm, 3 µm
Columna guarda: Phenomenox Security Guard C18, 4 × 3 mm,
5 µm Fase móvil A: Ácido fórmico al 0.1% (acuoso)
Fase móvil B: Ácido fórmico al 0.1% en acetonitrilo
Tasa de flujo: 1 ml/min
Temperatura de columna: 40°C
Volumen de inyección: 50 µl

Gradiente

Tiempo (min)	% A	% B
0	100	0
5	100	0
50	0	100
55	0	100
56	100	0
60	100	0

Válvula de conmutación:

Tiempo (min)	Posición de válvula	MS/MS
0	A	No
14	B	Sí
28	A	No
60	A	No

Parámetros del Espectrómetro de Masas:

Modo de ionización: Turbospray

Polaridad: Positiva
Tipo de escaneo: MRM
Resolución Q1: Unidad
Resolución Q2: Unidad
Tiempo de estabilización: 0 ms
Pausa MR: 5.007 ms
Temperatura: 700°C
Voltaje ionspray: 5500 V
Gas de cortina: 30
Gas CAD: 10
GS1: 50
GS2: 50
Calentador de interface: Encendido
EP: 10
CXP: 5
Dwell: 150 ms

Analito	Transición	Masa Q1	Masa Q3	DP	CE
Carbadox	A	263.1	231.2	61	19
	B	263.1	229.1	61	26
	C	263.1	90.1	61	45
Desoxicarbadox	A	231.2	199.2	41	18
	B	231.2	171.2	41	25
	C	231.2	143.2	41	32
QCA	A	175.1	147.2	54	22
	B	175.1	131.2	54	23
	C	175.1	104.1	54	35

Estándares de referencia y muestras enriquecidas

Carbadox, Desoxicarbadox y QCA se prepararon como una mezcla estándar con cada uno presente a razón de 1.0 µg/ml en acetonitrilo. Esta mezcla patrón estándar se diluyó a 1.0 ng/ml, 0.6 ng/ml y 0.1 ng/ml con agua. Las muestras de hidrolizado ácido y digesto de proteasa se enriquecieron con carbadox, desoxicarbadox y QCA (1 ng/ml de cada uno). Los hidrolizados básicos de digesto de proteasa (hidrolizado desalado y fracción orgánica del hidrolizado) se enriquecieron con QCA a razón de 1 ng/ml. Los cromatogramas para el análisis de muestras enriquecidas con estándares de referencia se incluyen en el Apéndice 2.

Método 2

TLC se llevó a cabo usando placas de gel de sílice Merck Silica Gel 60 F₂₅₄ (20 × 20 cm, 0.25 mm de grosor). Las placas TLC fueron eluidas en condiciones de vapor saturado con cloroformo:metanol (9:1 v/v) que contenía ácido fórmico al 0.2%. Este método se usó para TLC analítico y preparativo.

Los estándares de referencia radiomarcados de carbadox, desoxicarbadox y QCA se detectaron mediante visualización con una lámpara UV.

Las áreas radioactivas en las placas de TLC se detectaron por un instrumento de bioimagen, que brinda una representación bidimensional de las áreas radioactivas de la placa. El instrumento. El instrumento (Fuji FLA5000) es un sistema de imagen auto-radiográfico que usa placas fosfóricas de almacenamiento, que han sido expuestas a placas de TLC reveladas. Después de exponer por 7 días, las pantallas fosfóricas de almacenamiento se cargaron al instrumento de imagen y se escanearon. Se produjeron auto-radiogramas que se usaron para cuantificar los componentes radioactivos individuales. Los auto-radiogramas se procesaron usando el programa de análisis Aida Image Analyser (Versión 4.06).

Método 3

El método 3 se usó para el análisis confirmatorio de QCA. El estándar de referencia de QCA se analizó usando este método.

Instrumentación

Espectrómetro de masas	Waters Synapt G2-S HDMS
HPLC	Sistema Shimadzu Nexera Modular HPLC Solvent Mixer 1.7 ml
Radio Detector	LabLogic β -RAM Model 5 (300 μ L flujo de celda)
Manejo de datos	LabLogic LAURA 4.2 Shimadzu LC Solutions Versión 5.5 MassLynx 4.1 SCN 871 y 916

Condiciones LC

Columna	Agilent Zorbax Bonus RP 150 x 4.6 mm, 5 μ m
Pre-columna	Security Guard C18, 3 x 4 mm
Tasa de flujo	1 ml/min
Rango de detección PDA	190 – 800 nm
Temperatura de columna	30°C
Fase móvil A	Ácido trifluoroacético al 0.1% (ac)
Fase móvil B	Ácido trifluoroacético al 0.1% en acetonitrilo
Gradiente:	

Tiempo (mins)	%A	%B
0	98	2
15.00	98	2
40.00	75	25
45.00	5	95
50.00	5	95
50.01	98	2
60.00	98	2

Condiciones del espectrómetro de masas

Ajustes específicos del compuesto

Ionización	Electrospray
Polaridad	Positiva
Voltaje capilar	3.0 kV
Flujo de gas del nebulizador	6.0 Bar
Flujo de la fuente de gas	0 L/h
Cono muestra	40 V
Flujo de gas del cono	10 L/h
Compensación de origen:	50 V
Compensación transferencia de onda gradual	25 V
Energía iónica	1.0 V
Temperatura fuente	120°C
Temp de desolvatación	350°C
Flujo de gas de desolvatación	600 L/h
Energía de colisión de trampa	4.0 V
Transferencia de energía de colisión	2.0 V
Flujo de gas en trampa	2.0 ml/min (Argón)
Flujo de gas en celda de helio	180 ml/min
Flujo de gas IMS	90 ml/min (Nitrógeno)
Análisis de ion producto:	
Modo recolección de datos	MSe Centroid
Modo analizador	Modo resolución
Rango de escaneo	50-1200 Da
Tasa de escaneo	0.5 s
Energía de colisión de trampa	15- 60 eV

Método 4

El método 4 se uso para caracterizar el peso molecular aproximado del material radiomarcado liberado por la digestión enzimática (método enzimático múltiple) de residuos no extraíbles por solvente.

Instrumentación:

HPLC:	Sistema Shimadzu Prominence Modular HPLC Mezclador solventes (volumen de mezclado 1.7 ml)
Manejo de datos	Shimadzu LCMS Solutions Versión 3.6 Shimadzu Class Agent Manager Versión 2.3

Condiciones LC:

Columna	Phenomenex PolySep GFC-P 1000 300 x 7.8 mm
Rango de peso molecular	20 - 3,000 Da
Pre-columna	PolySep GFC-P, 35 x 7.8 mm
Tasa de flujo	0.6 ml/min
Rango de detección PDA	190 – 800 nm
Temperatura de columna	30°C
Fase móvil A	Ácido fórmico al 0.1% (ac)
Fase móvil B	Acetonitrilo

Gradiente:

Tiempo (mins)	%A	%B
0	90	10
60.00	90	10

Método 5

El método 5 se usó para identificar el QCA presente en el digesto péptido enzimático de 2-3 kDa.

Instrumentación

Espectrómetro de masas	Thermo Scientific Q-Exactive Plus
HPLC	Sistema Shimadzu Nexera X2 Modular HPLC Solvent Mixer 1.7 ml
Radio Detector	LabLogic β-RAM Model 5 (200 µl celda de flujo)
Manejo de datos	LabLogic LAURA 4.2 Shimadzu LC Solutions Versión 5.8 Thermo Scientific XCalibur 4.0

Condiciones LC

Columna	YMC Triart C18 250 x 4.6 mm, 3 µm
Pre-columna	Security Guard C18, 3 x 4 mm
Tasa de flujo	1 ml/min
Rango de detección PDA	190 – 800 nm
Temperatura de columna	40°C
Fase móvil A	Ácido fórmico al 0.1% (ac)
Fase móvil B	Ácido fórmico al 0.1% Acetonitrilo
Gradiente:	

Tiempo (mins)	%A	%B
0	98	2
10.00	98	2
40.00	75	25
45.00	0	100
50.00	0	100
50.01	98	2
60.00	98	2

Condiciones MS

Ajustes específicos del compuesto	
Ionización	Ionización en electrospray calentado (HESI)
Polaridad	Positiva
Voltaje de spray (Positivo/Negativo)	3.5 kV
Tasa de flujo de gas de revestimiento	45 l/h
Tasa de flujo de gas auxiliar	10 l/h
Tasa de flujo de gas de barrido	2 l/h
Temperatura capilar	320°C
Nivel RF de lente S	50 V
Temperatura del calentador auxiliar de gas	400°C

Ajustes de análisis DDA

Modo de recolección de datos	Full MS / de-MS ²	
CID en origen	0.0 eV	
Lista de inclusión	-	
	Full MS	de-MS ²
Resolución (FWHM)	70,000	17,500
Objetivo AGC	3e6	1e5
IT máximo	250 ms	50 ms
Conteo de bucle	-	20
TopN	-	20

Ventana de aislamiento (compensación)	-	1.2 (0.0) m/z
Tipo de espectro de datos	perfil	cancroide
Rango escaneo	120-1800 m/z	200-2000 m/z
Primera masa fija	-	100 m/z
Energía de colisión normalizada (NACE)	-	28
Objetivo ABC mínimo	-	5e3
Umbral de intensidad	-	1e5
Exclusión de carga	-	No asignado, 1
Exclusión dinámica	-	15 s

Método 6

El método 6 se usó para SEC de residuos solubles en urea >100 kDa

Instrumentación:

HPLC:	Sistema Shimadzu Prominence XR Modular HPLC
	Mezclador solventes (volumen de mezclado 1.7 m)
Manejo de datos	Shimadzu LC Solutions Versión 5.5
	Shimadzu Class Agent Manager Versión 2.3

Condiciones LC:

Columna	Phenomenex BioSep SEC s4000, 300 x 7.8 mm
Rango de peso molecular	5,000 - 700,000 Da (estado desnaturalizado en 6 M GnHCl)
Pre-columna	Security Guard GFC 4000, 3 x 4 mm
Tasa de flujo	1 ml/min
Rango de detección de PDA	190 – 800 nm
Temperatura de columna	25°C
Fase móvil A	8 M Urea, 50 mM tampón Tris-HCl a pH 7.3
(ac) Fase móvil B	Acetonitrilo

Gradiente:

Tiempo (mins)	%A	%B
0	100	0
25.00	100	0

Método 7

El método 7 se usó para el análisis de digestos de tripsina para la identificación de péptidos postulados para contener QCA ligado a un aminoácido tripsina.

Instrumentación:

Espectrómetro de masas	Thermo Scientific Q-Exactive Plus
HPLC	Sistema Shimadzu Nexera X2 Modular HPLC Solvent Mixer 1.7 ml
Radiodetector	LabLogic β -RAM Model 5 (200 μ l célula de flujo)
Manejo de datos	LabLogic LAURA 4.2 Shimadzu LC Solutions Versión 5.8 Thermo Scientific XCalibur 4.0

Condiciones LC:

Columna	YMC Triart C18 250 x 4.6 mm, 3 μ m
Pre-columna	Security Guard C18, 3 x 4 mm
Tasa de flujo	1 ml/min
Rango de detección de PDA	190 – 800 nm
Temperatura de columna	40°C
Fase móvil A	Ácido fórmico al 0.1% (ac)
Fase móvil B	Ácido fórmico al 0.1% en Acetonitrilo
Gradiente:	

Tiempo (mins)	%A	%B
0	100	0
10.00	100	0
40.00	75	25
45.00	0	100
50.00	0	100
50.01	100	0
60.00	100	0

Condiciones MS

Ajustes específicos del compuesto	
Ionización	Ionización por electrospray calentado (HESI)
Polaridad	Positiva/
Voltaje del espray (Positivo/Negativo)	3.5 kV
Tasa de flujo de gas del revestimiento	45 l/h
Tasa de flujo auxiliar de gas	10 l/h
Tasa de flujos de gas de barrido	2 l/h
Temperatura de capilar	320°C
Nivel RF del lente S	50 V
Temperatura del calentador de gas auxiliar	400°C

Ajustes de análisis DDA

Modo de recolección de datos	Full MS / dd-MS ²	
CID dentro de fuente	0.0 eV	
Lista de inclusión	-	
	Full MS	dd-MS ²
Resolución (FWHM)	70,000	17,500
Objetivo AGC	3e6	1e5
IT máximo	250 ms	50 ms
Conteo de bucle	-	10,
TopN	-	10,
Ventana aislamiento (compensación)	-	1.2 (0.0) m/z
Tipo de datos de espectro	perfil	centroide
Rango escaneo	120-1800 m/z	200-2000 m/z
Primera masa fija	-	100 m/z
Energía de colisión normalizada (NCE)	-	35
Objetivo AGC mínimo	-	5e3
Umbral de intensidad	-	1e5
Exclusión de carga	-	No asignada, 1
Exclusión dinámica	-	6.0 s

Método 8

El método 8 se usó para el análisis de estándares de referencia de carbadox, desoxicarbadox y QCA. La instrumentación y las condiciones LC usadas fueron las descritas para el Método 7.

Instrumentación:

Espectrómetro de masas	Thermo Scientific Q-Exactive Plus
HPLC	Sistema Shimadzu Nexera X2 Modular
	HPLC Solvent Mixer 1.7 ml
Radio Detector	LabLogic β-RAM Model 5 (200 µl flujo de célula)
Manejo de datos	LabLogic LAURA 4.2
	Shimadzu LC Solutions Versión 5.8
	Thermo Scientific XCalibur 4.0

Condiciones LC:

Columna	YMC Triart C18 250 x 4.6 mm, 3 µm
Pre-columna	Security Guard C18, 3 x 4 mm
Tasa de flujo	1 ml/min
Rango de detección PDA	190 – 800 nm
Temperatura de columna	40°C
Fase móvil A	Ácido fórmico al 0.1% (ac)
Fase móvil B	Ácido fórmico al 0.1% en Acetonitrilo

Gradiente:

Tiempo (mins)	%A	%B
0	100	0
10.00	100	0
40.00	75	25
45.00	0	100
50.00	0	100
50.01	100	0
60.00	100	0

Ajustes específicos del compuesto

Ionización	Ionización por electrospray calentado (HESI)
Polaridad	Positiva/
Voltaje del espray (Positivo/Negativo)	3.5 kV
Tasa de flujo de gas del revestimiento	45 l/h
Tasa de flujo auxiliar de gas	10 l/h
Tasa de flujos de gas de barrido	2 l/h
Temperatura de capilar	320°C
Nivel RF del lente S	50 V
Temperatura del calentador de gas auxiliar	400°C

Ajuste de análisis DDA

Modo de recolección de datos	Full MS / dd-MS ²
CID en fuente	0.0 eV
	175.0502 [M+H] ⁺ , 231.0877 [M+H] ⁺ , 263.0775 [M+H] ⁺ , 173.0357 [M-H] ⁻ , 229.0731 [M-H] ⁻ , 261.0629 [M-H] ⁻ , 459.1775 [M+H] ⁺ , 230.0924 [M+2H] ²⁺ , 303.1452 [M+H] ⁺
Lista de inclusión	Full MS dd-MS ²
Resolución (FWHM)	70,000 17,500

Objetivo AGC	3e6	1e5
IT máximo	250 ms	50 ms
Conteo de bucle	-	10
TopN	-	10
Ventana aislamiento (compensación)	-	1.2 (0.0) m/z
Tipo de datos de espectro	Perfil	centroide
Rango escaneo	120-600 m/z	200-2000 m/z
Primera masa fija	-	-
Energía de colisión normalizada (NCE)	-	35, 70, 110
Objetivo AGC mínimo	-	5e3
Umbral de intensidad	-	1e5
Exclusión de carga	-	-
Exclusión dinámica	-	10.0 s

Método 9

El método 9, electroforesis en gel, se usó para comparar el material total proteína/péptido en muestras solubilizadas con el total de residuos radioactivos en esas muestras.

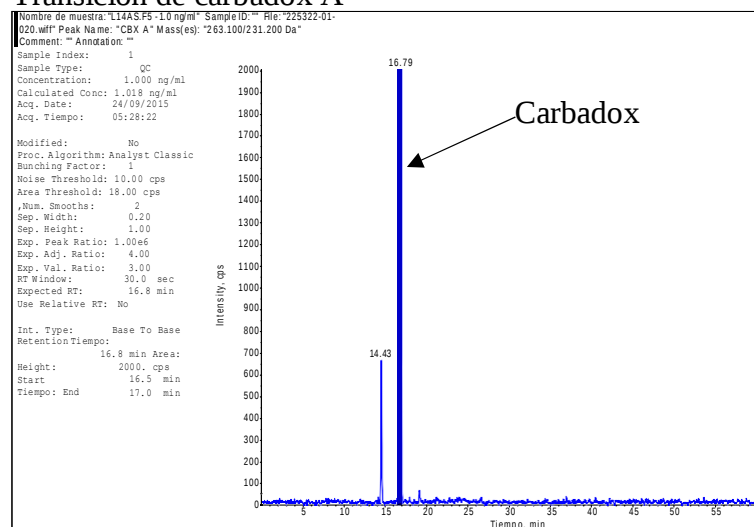
Las muestras se diluyeron con un volumen igual de tampón 4 LDS para muestra (Invitrogen) y se calentaron a 95°C por 5 min. Las muestras se enfriaron a temperatura ambiente antes de aplicar 15 µl a un gel vaciado de antemano Nupage 4-12% Bis-Tris (Invitrogen) junto con Estándares de Proteína sin Teñir Precision Plus Protein™ (BioRad). Las muestras se sometieron a electroforesis a 50-150 V por aproximadamente 2 h en un tampón corriente MOPS SDS (20×) en una mini célula Xcell SureLock (Invitrogen). Los geles se tiñeron en coomassie coloidal ((NH₄)₂SO₄ al 10%, ácido ortofosfórico al 10%, coomassie G-250 al 0.12%, Metanol al 20%) de un día para otro y se destiñeron en agua. La tinción coloidal de azul de coomassie tiene una alta especificidad por las proteínas lo que permite que la tinción se use para cuantificación de proteínas dentro del material biológico. Los Estándares de Proteína no Teñidos Precision Plus Protein™ estaban en su estado original y se usaron para la comparación relativa de tamaño. En este estudio los estándares de proteína confirmaron que los geles corrieron con éxito, no se sacaron conclusiones sobre los pesos moleculares de las especies en las muestras a partir de esto geles. De arriba a abajo, el peso molecular de las proteínas en el Estándar de Proteína es como sigue: 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15 y 10 kDa.

Los radio perfiles se obtuvieron al exponer los geles electroforéticos a pantallas de fósforo por 2 días usando el método de generación de imágenes descrito para radio TLC (Método 2).

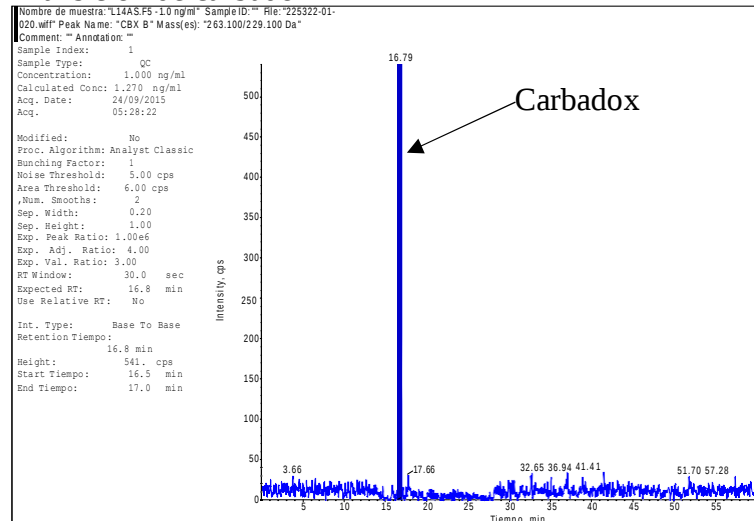
Apéndice 2 Análisis LC-MS/MS de muestras enriquecidas con estándares de referencia de Carbadox, Desoxicarbadox y QCA a razón de 1 ng/ml

**Hidrolizado ácido enriquecido con estándares de referencia Nombre
de archivo: 225322-01-020; Nombre de muestra: L14AS.F5**

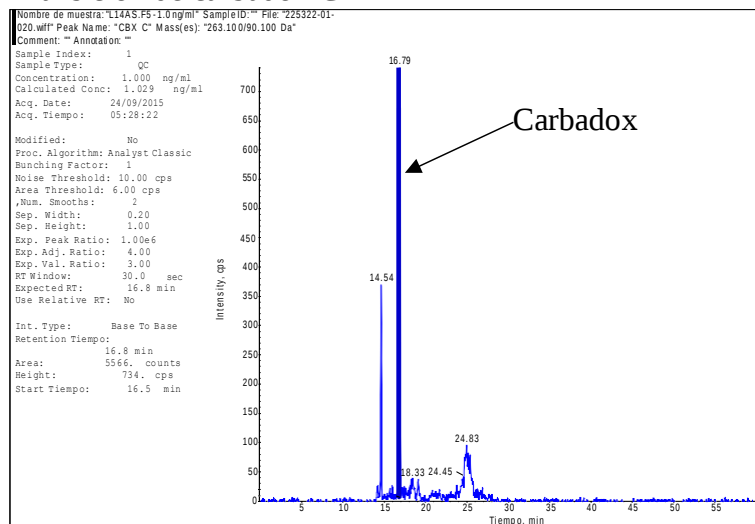
Transición de carbadox A



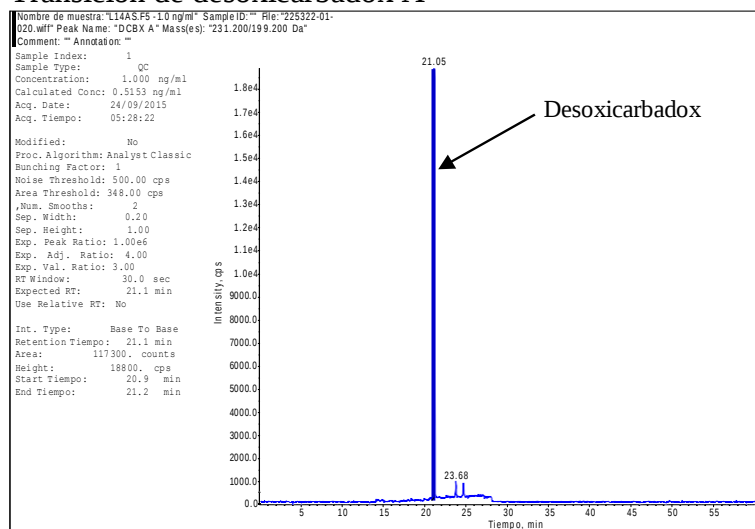
Transición de carbadox B



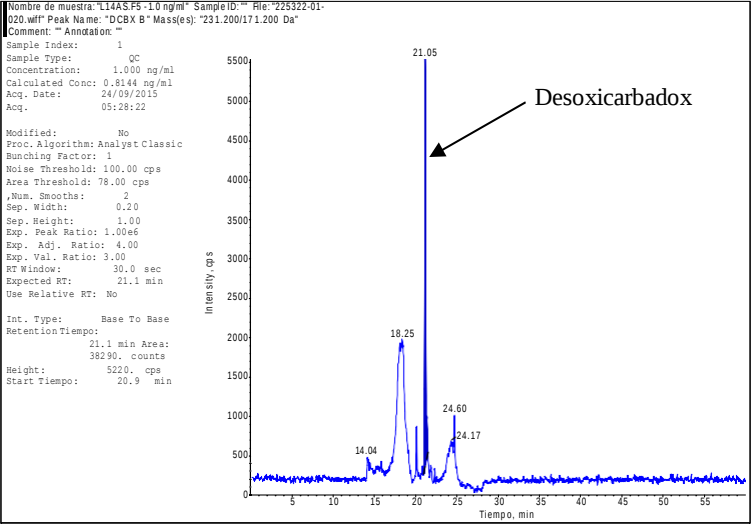
Transición de carbadox C



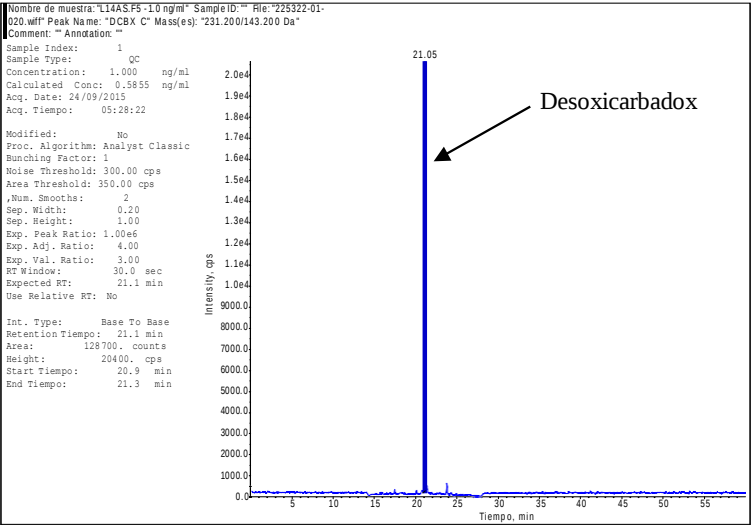
Transición de desoxicarbadox A



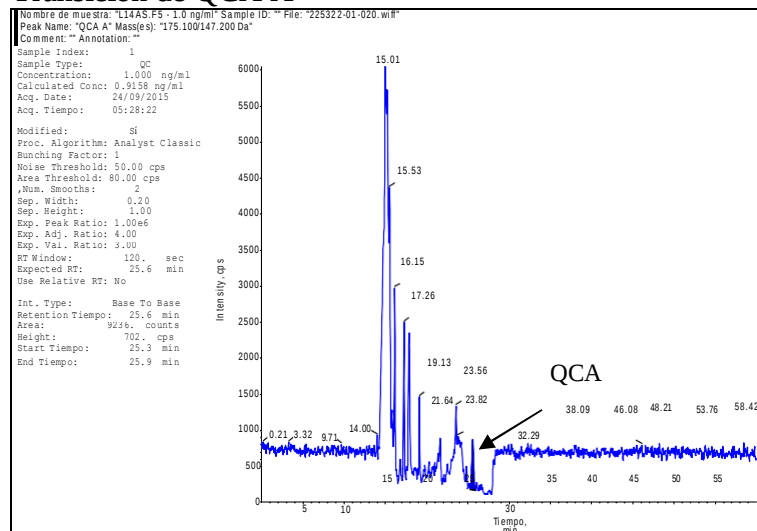
Transición de desoxicarbadox B



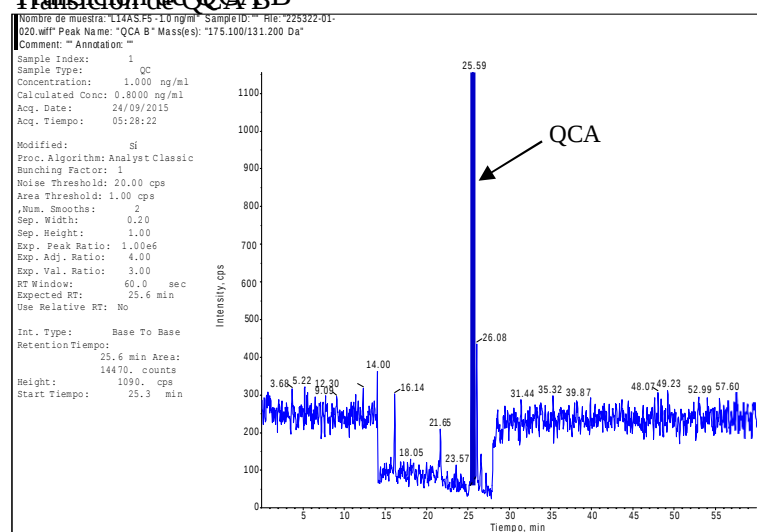
Transición de desoxicarbadox C



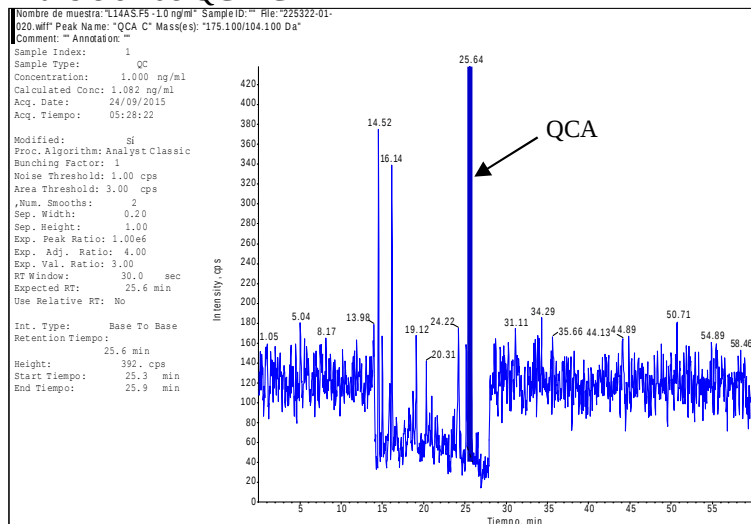
Transición de QCA A



Transición de QCA/B



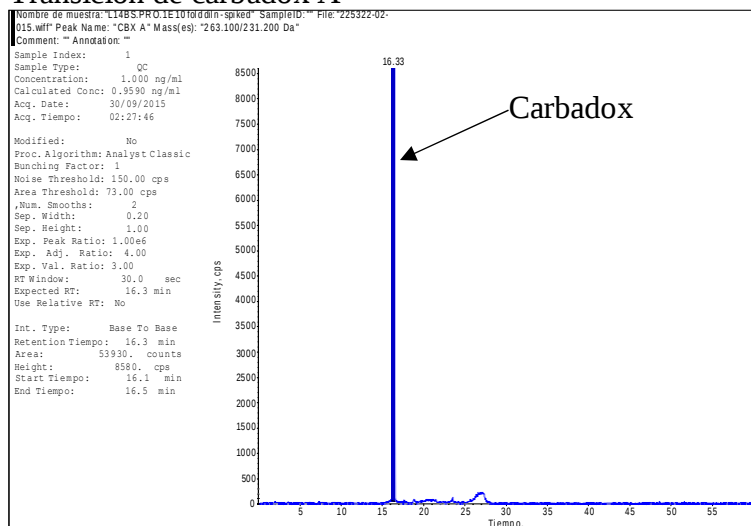
Transición de QCA C



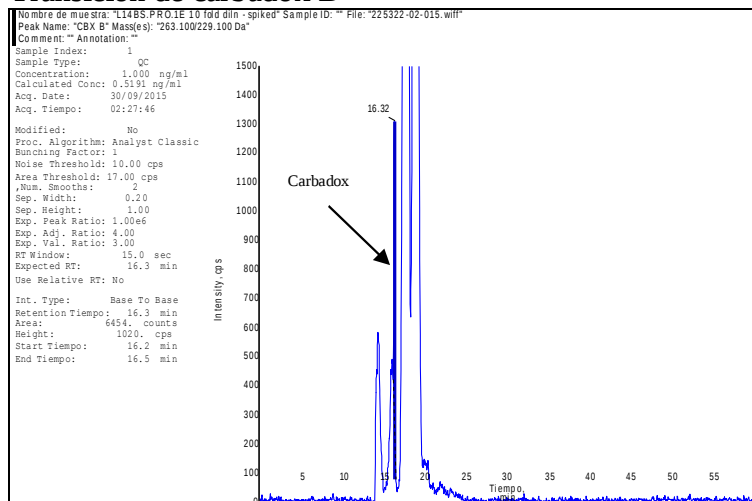
Digesto de proteasa enriquecido con estándares de referencia

Nombre de archivo: 225322-02-015; Nombre de muestra: L14BS.PRO.1E

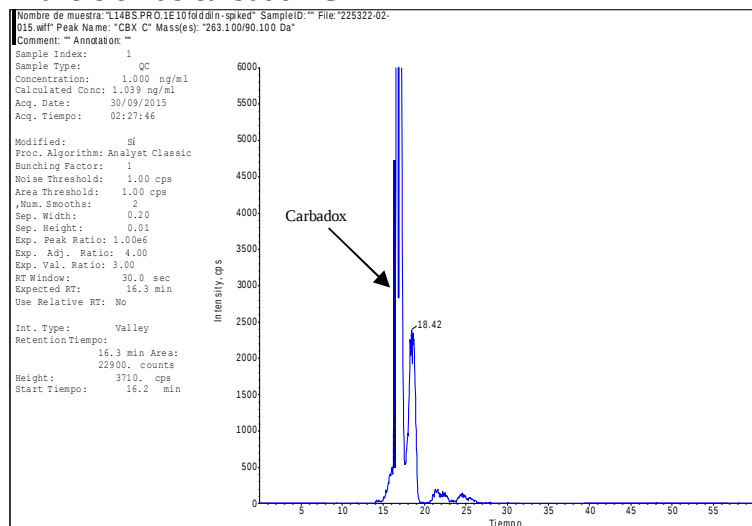
Transición de carbadox A



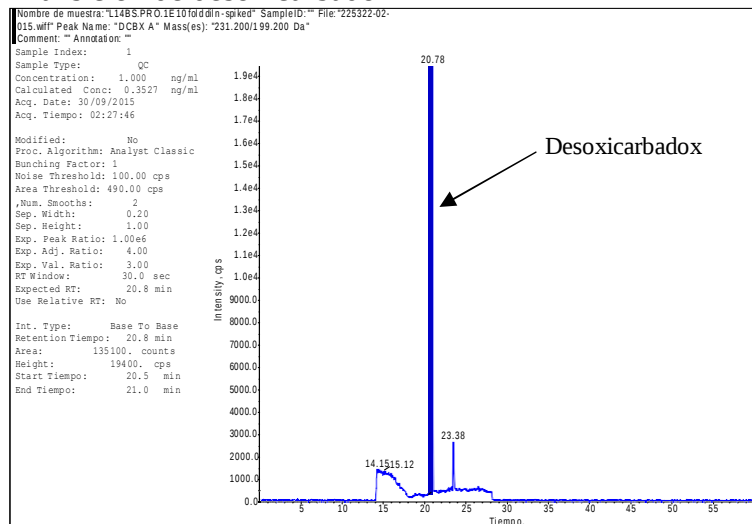
Transición de carbadox B



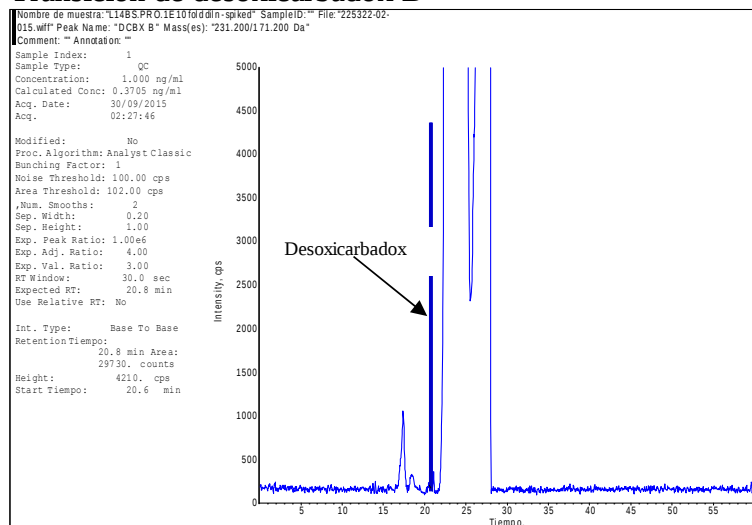
Transición de carbadox C



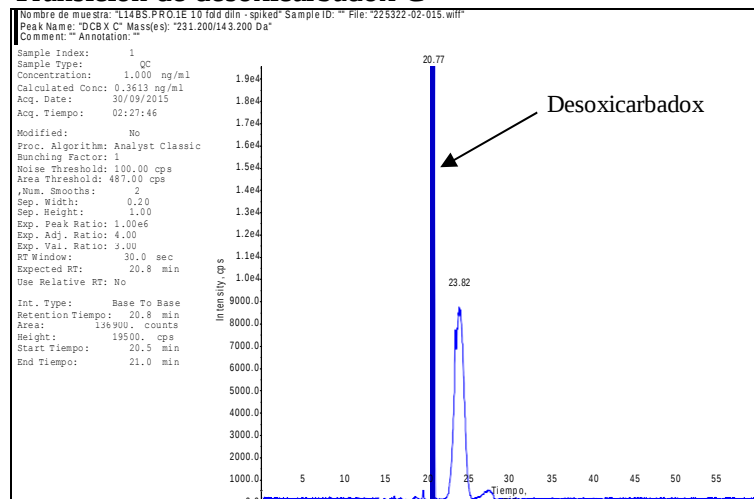
Transición de desoxicarbadox A



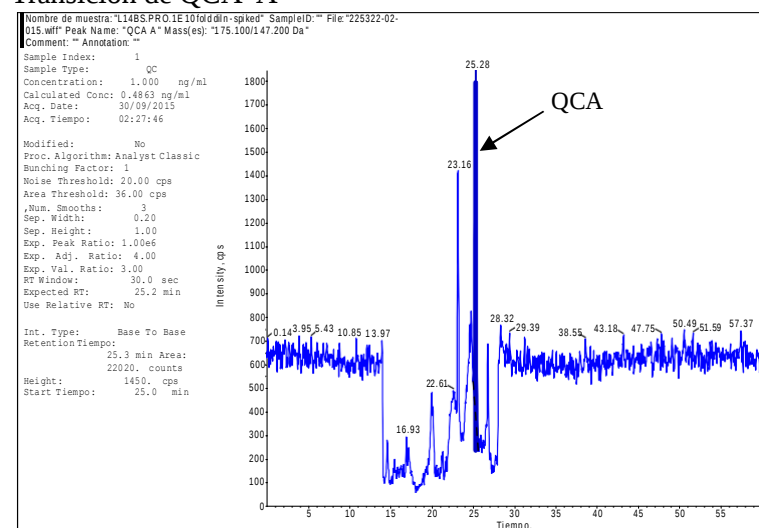
Transición de desoxicarbadox B



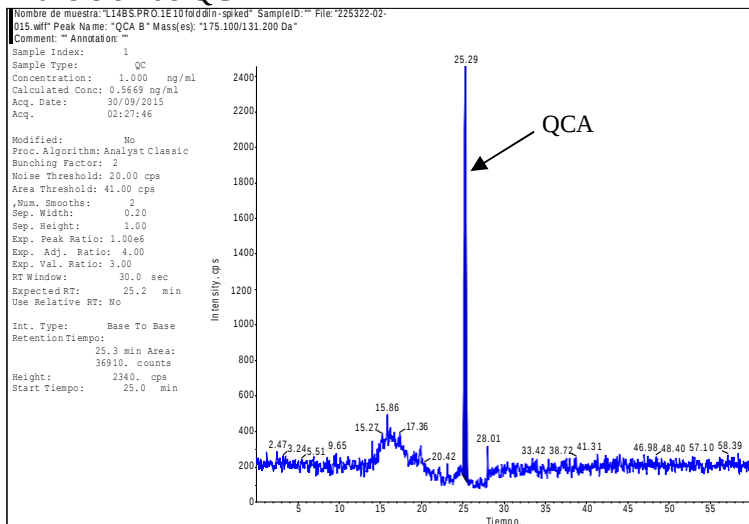
Transición de desoxicarbadox C



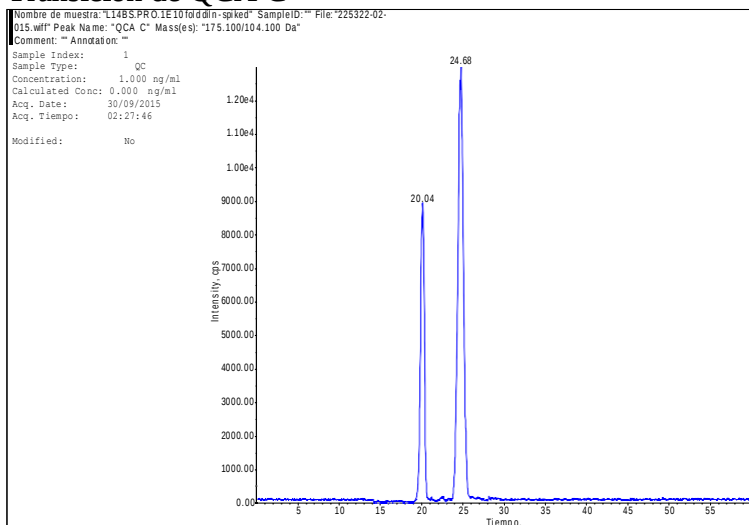
Transición de QCA A Transición de QCA A



Transición de QCA B



Transición de QCA C

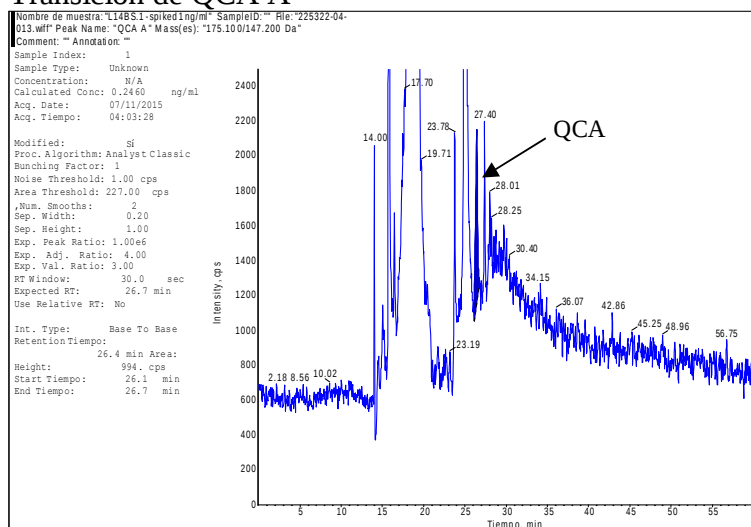


Estándar no detectado

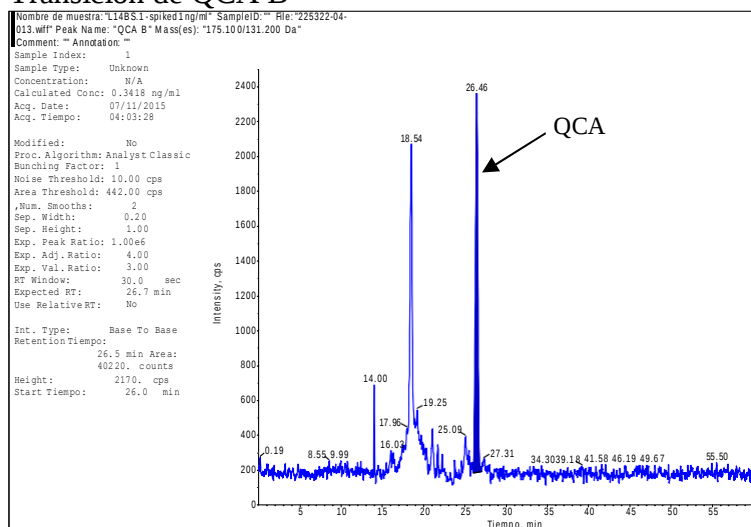
Hidrolizado básico de digesto de proteasa desalado enriquecido con estándar de referencia de QCA

Nombre de archivo: 225322-04-013; Nombre de muestra: L14BS.1

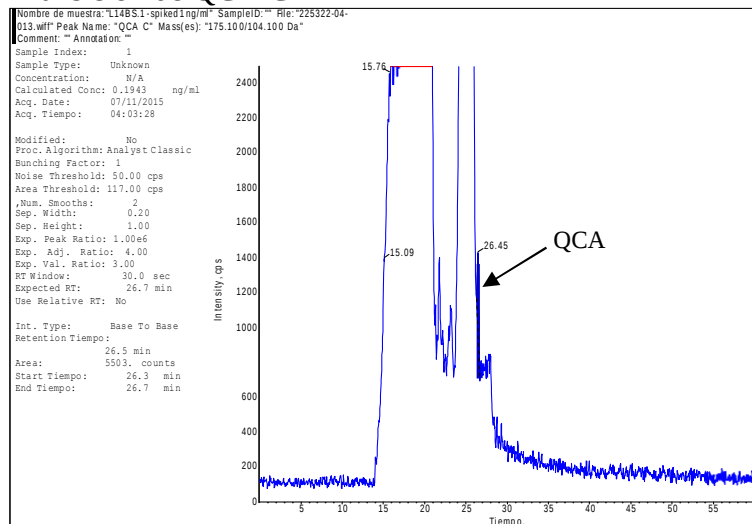
Transición de QCA A



Transición de QCA B



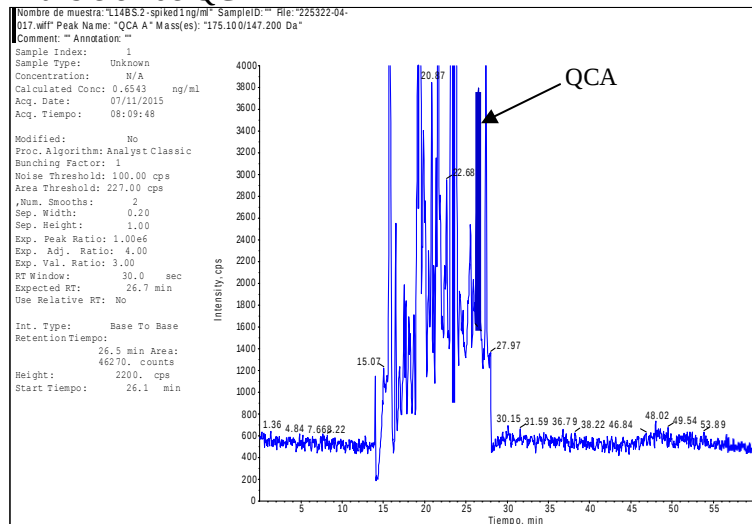
Transición de QCA C



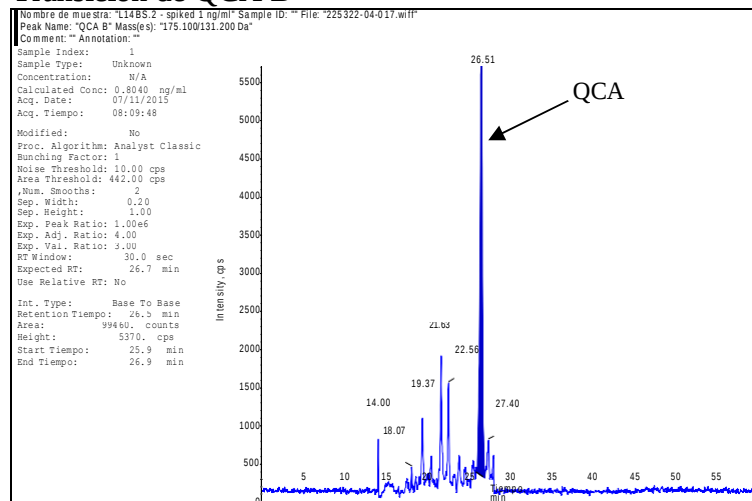
Fracción orgánica de hidrolizado básico de digesto de proteasa enriquecido con estándar de referencia de QCA

Nombre de archivo: 225322-04-017; Nombre de muestra: L14BS.2

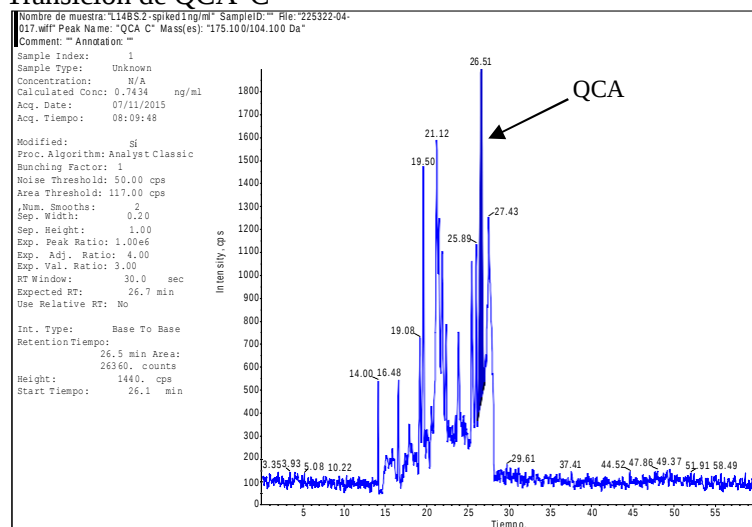
Transición de QCA A



Transición de QCA B



Transición de QCA C Transición de QCA C



Apéndice 3 Preparación y Análisis de una Mitad de QCA-Lisina Sintética

Un estándar de referencia crudo para QCA-lisina se sintetizó vía cloruro de acilo de QCA y el producto fue analizado por LC-MS para ayudar a identificar QCA ligado a lisina en muestras de tejido solubilizado.

Método de preparación:

Al ácido 2-quinoxalinecarboxílico (0.100 g, 0.574 mmol) se agregaron solución de diclorometano (5 ml), 2.0 M cloruro de oxalilo (0.4 ml, 0.8 mmol) y dimetilformamida (2 gotas). Después de 1.5 h agitando a temperatura ambiente, se agregó diclorometano (5 ml) y la mezcla concentrada para permitir el cloruro de acilo crudo. Al mono clorhidrato de L-Lisina (0.1363 g, 0.7462 mmol) se agregó trietil amina cargada (120 µl) y la mezcla se enfrió en un baño de hielo. El cloruro de acilo crudo en diclorometano (5 ml) se agregó a la mezcla y la reacción se dejó equilibrar a temperatura ambiente agitando por 30 min. La mezcla de reacción cruda se lavó con HCl (1 M) y salmuera, se concentró a secado y se reconstituyó con metanol.

El análisis del producto por LCMS (Método 8) indicó que estaba presente una mezcla de QCA libre, mitades mono- y bi-QCA-lisina. El EIC representativo, espectro de masas y iones fragmentos observados para la mitad bi-QCA-lisina se presentan a continuación. Los iones fragmento observados se usaron para identificar QCA ligado a lisina como parte de un péptido mayor en muestras solubilizadas de hígado.

MS Nombre de archivo: PHI00119

Nombre de muestra: QCA-lisina

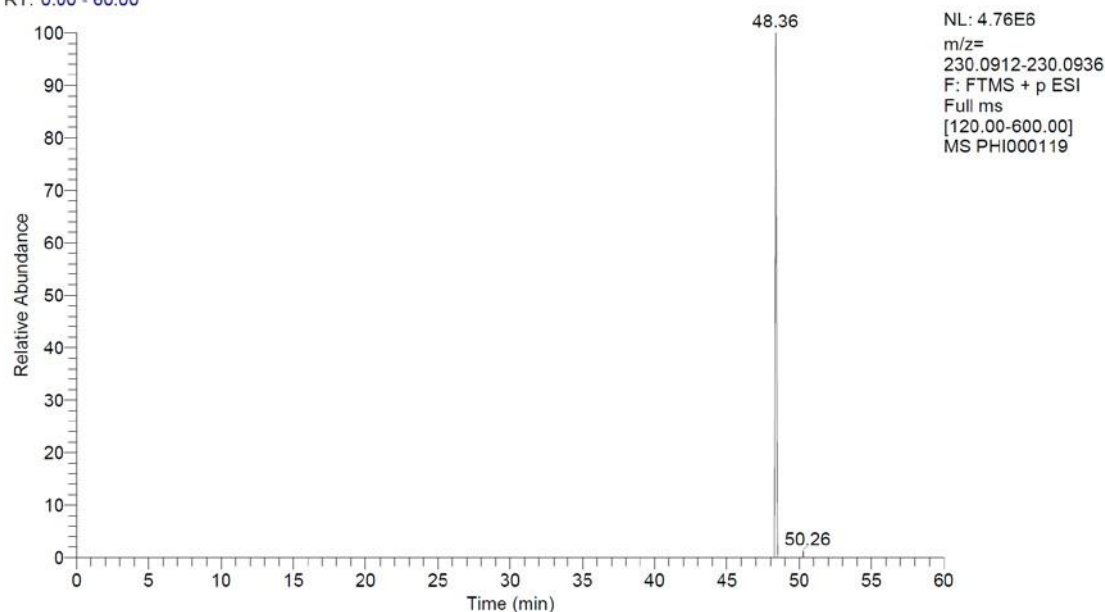
A. Cromatograma del ion extraído para m/z 230.0924 ($[M+2H]^{2+}$)

C:\Xcalibur\data\225322\PHI000119

06/16/16 10:42:46

QCA-Lysine (0.01 mg/ml)

RT: 0.00 - 60.00



B. Escaneo completo expandido y espectro de masas del producto ion de MS/MS

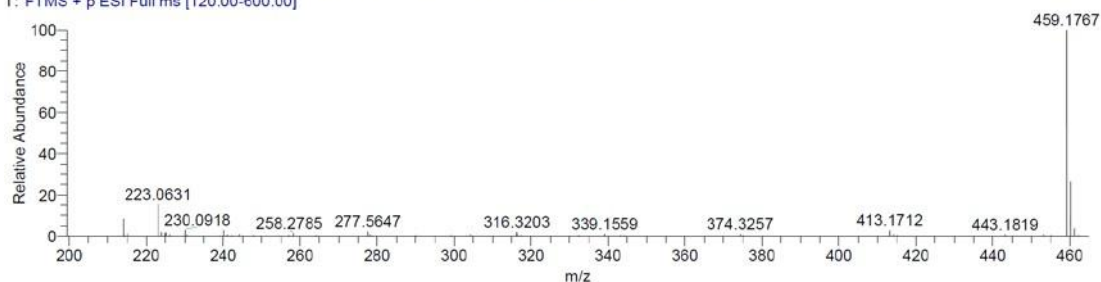
C:\Xcalibur\data\225322\PHI000119

06/16/16 10:42:46

QCA-Lysine (0.01 mg/ml)

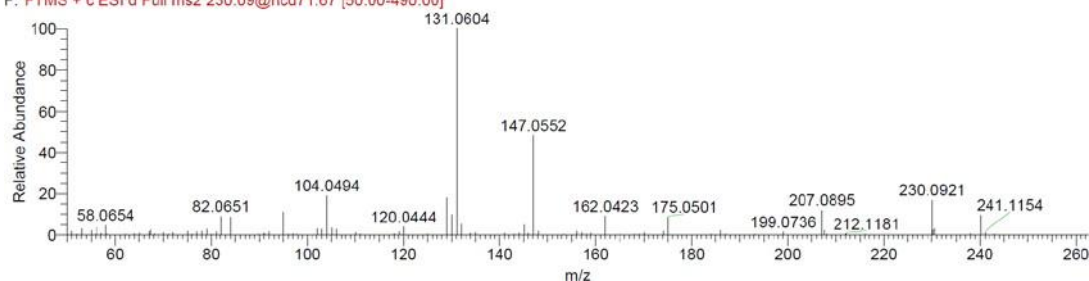
PHI000119 #19604 RT: 48.36 AV: 1 SB: 24 47.42-48.01, 48.82-49.44 NL: 1.59E8

T: FTMS + p ESI Full ms [120.00-600.00]



PHI000119 #19586 RT: 48.32 AV: 1 NL: 8.62E5

F: FTMS + c ESI d Full ms2 230.09@hcd71.67 [50.00-490.00]



C. Espectro expandido de ion producto de MS/MS

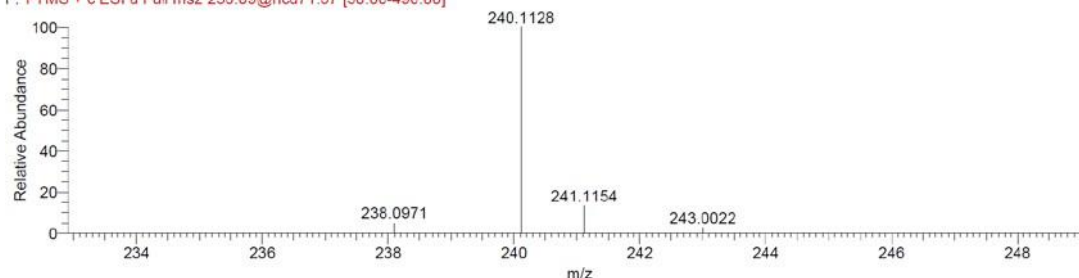
C:\Xcalibur\data\225322\PHI000119

06/16/16 10:42:46

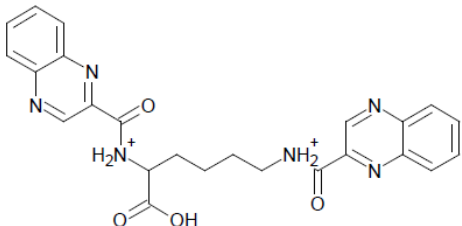
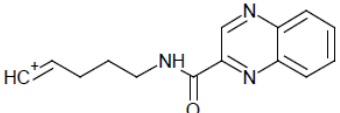
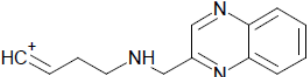
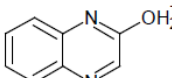
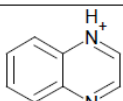
QCA-Lysine (0.01 mg/ml)

PHI000119 #19586 RT: 48.32 AV: 1 NL: 8.23E4

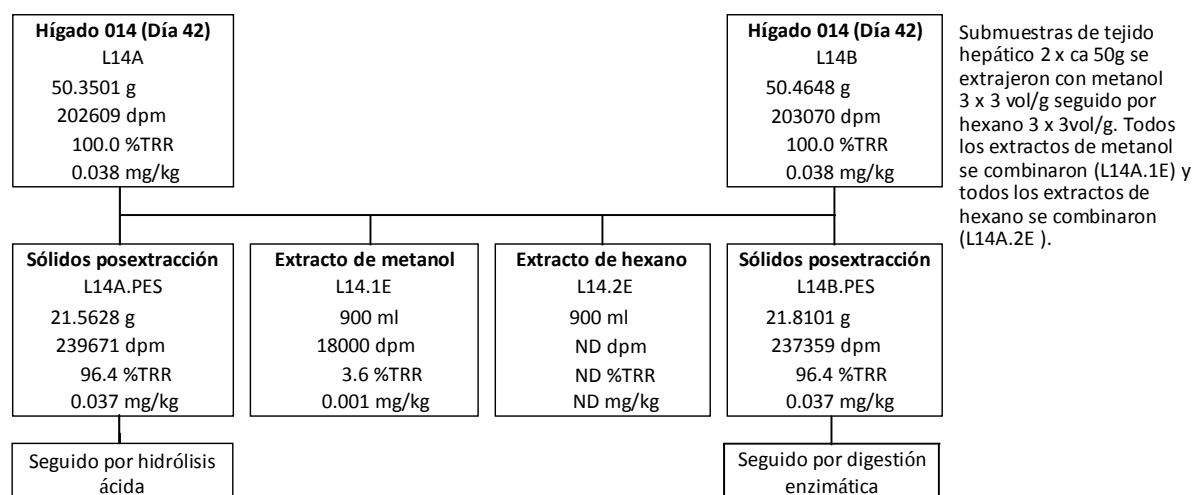
F: FTMS + c ESI d Full ms2 230.09@hcd71.67 [50.00-490.00]



D. Estructuras Postuladas para los Iones Observados

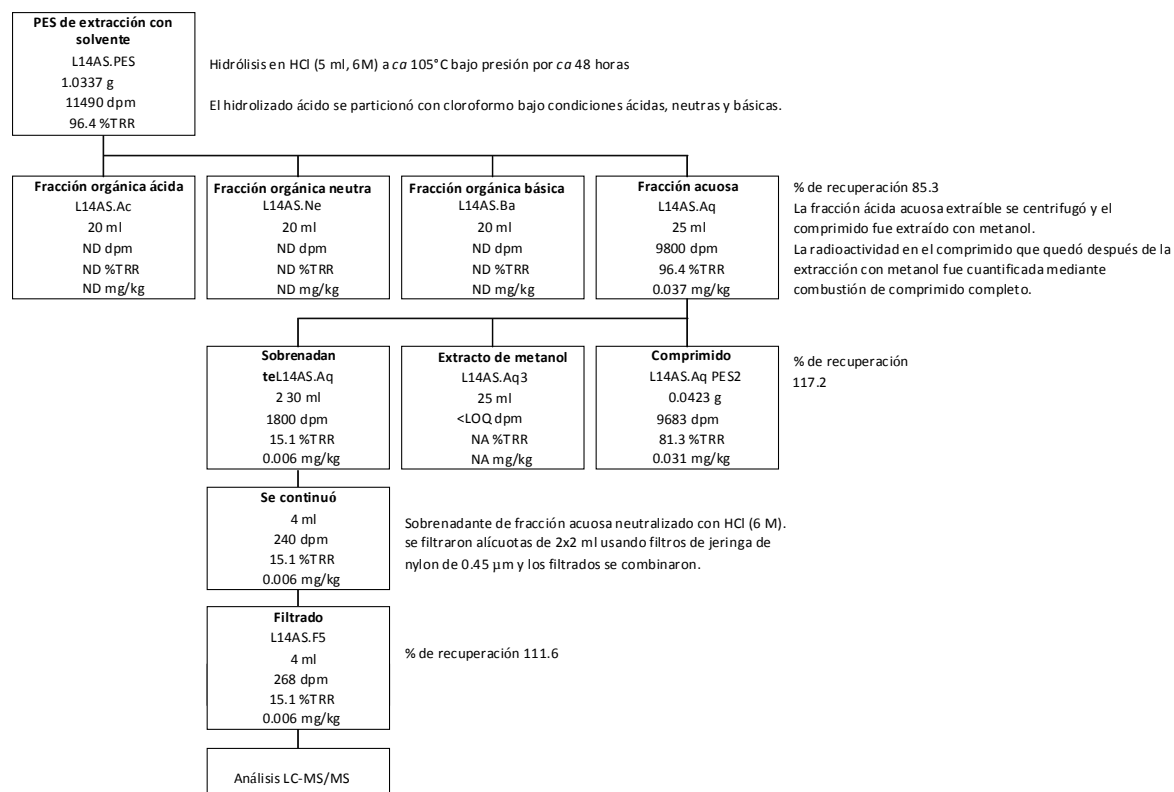
Estructura postulada	<i>m/z</i> del ion observado (Da)	<i>m/z</i> teórica del ion (Da)	Fórmula elemental del ion
	230.0918	230.0924 [M+2H] ²⁺	C ₂₄ H ₂₄ N ₆ O ₄
	240.1128	240.1131	C ₁₄ H ₁₄ N ₃ O
	212.1181	212.1182	C ₁₃ H ₁₄ N ₃
	147.0552	147.0553	C ₈ H ₇ N ₂ O
	131.0604	131.0604	C ₈ H ₇ N ₂

Apéndice 4 Ejemplo de Extracción con Solvente Diagrama de Flujo

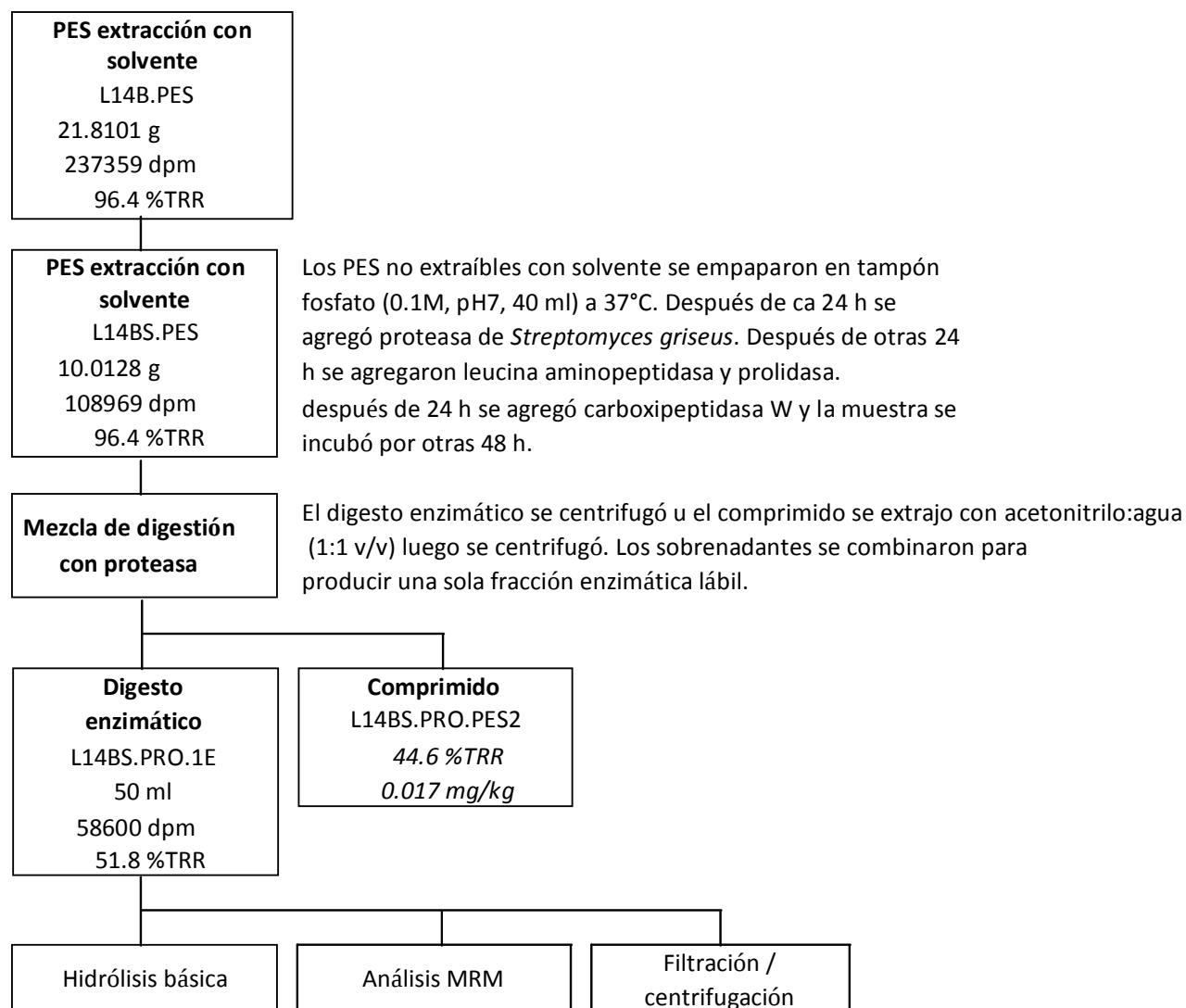


Este procedimiento se repitió para general PES adicionales para mayor extracción. Los resultados de la extracción repetida fueron comparables con recuperación del 95.4% TRR en los PES y 4.6% TRR recuperado en el extracto de metanol.

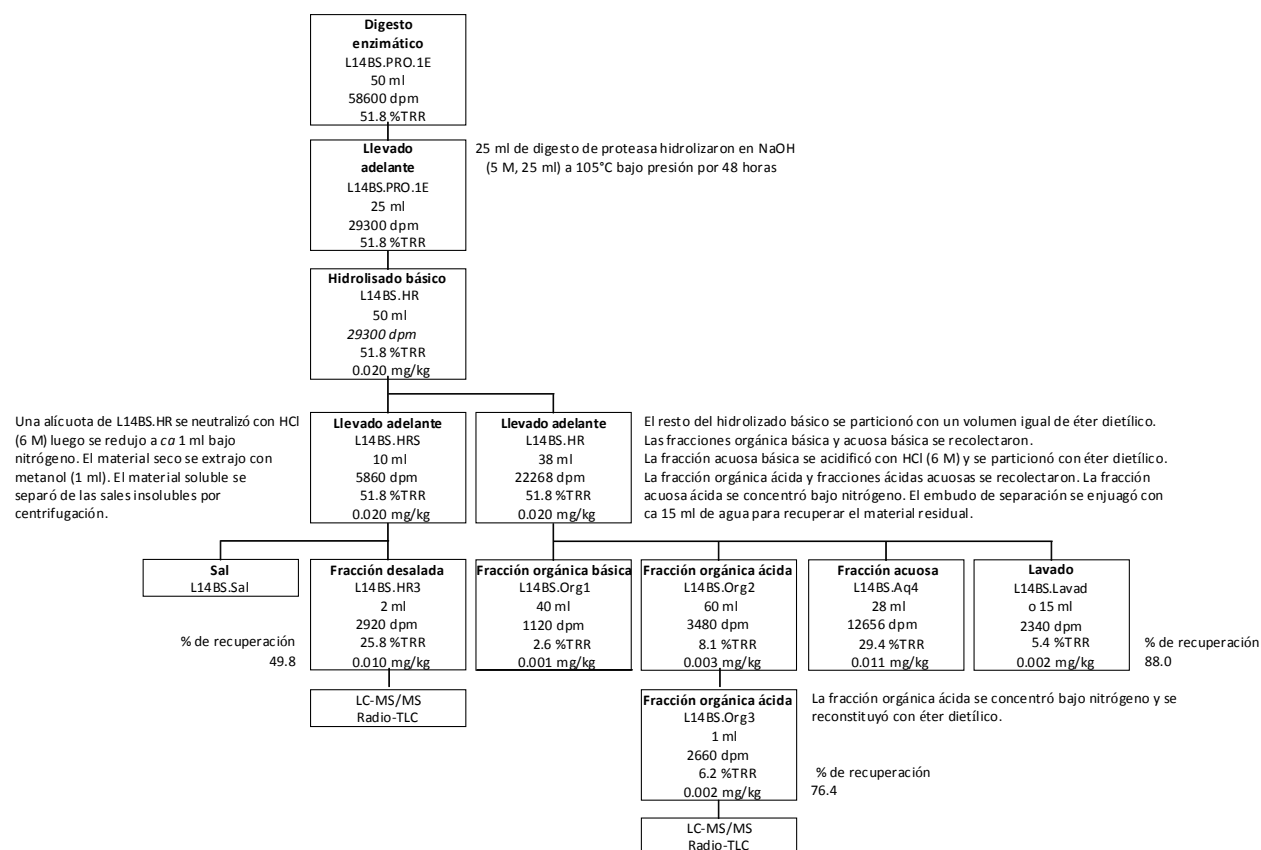
Apéndice 5 Hidrólisis Ácida de Residuos No Extraíbles con Solvente



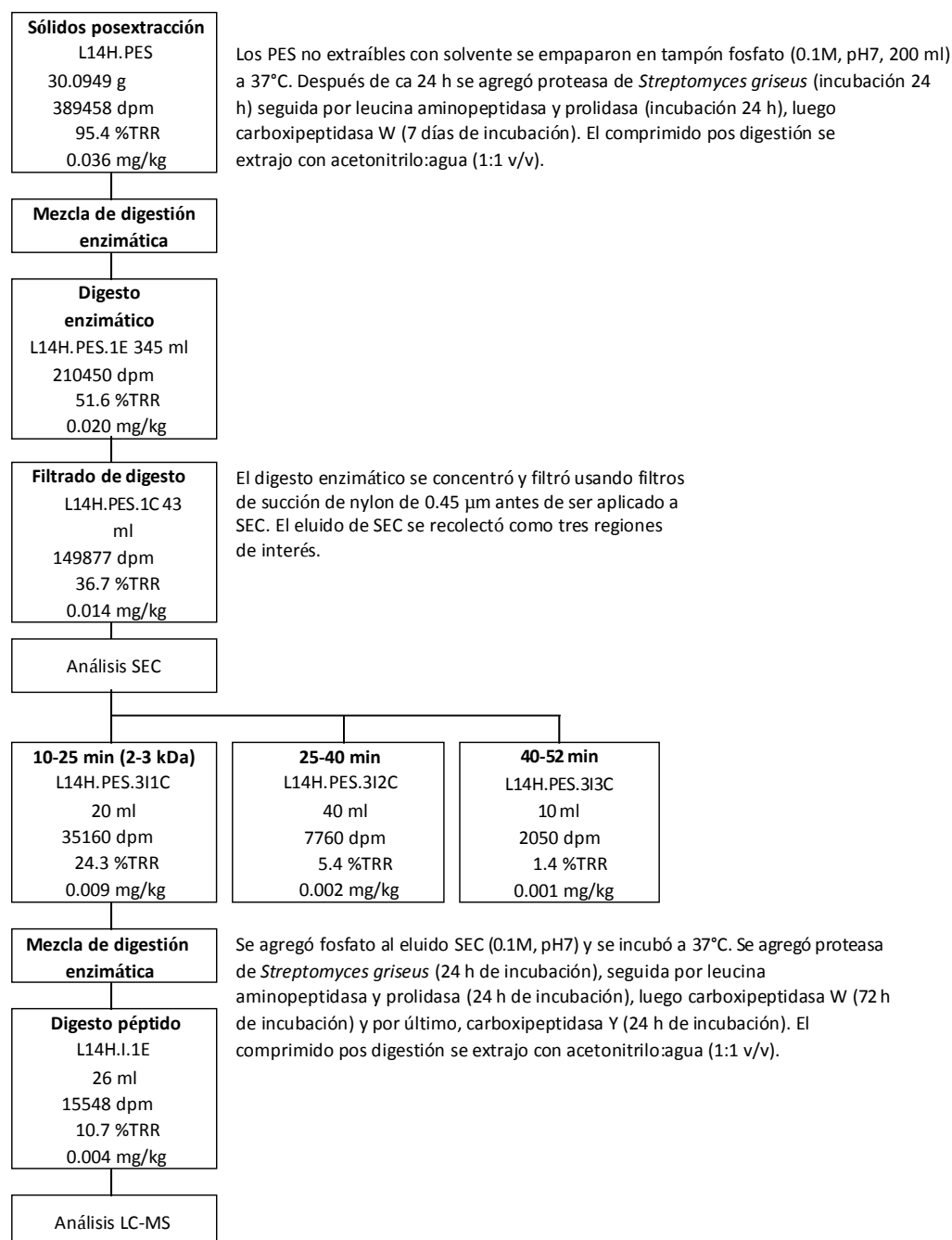
Apéndice 6 Digestión Enzimática Múltiple (Mezcla de 4-5 Enzimas)



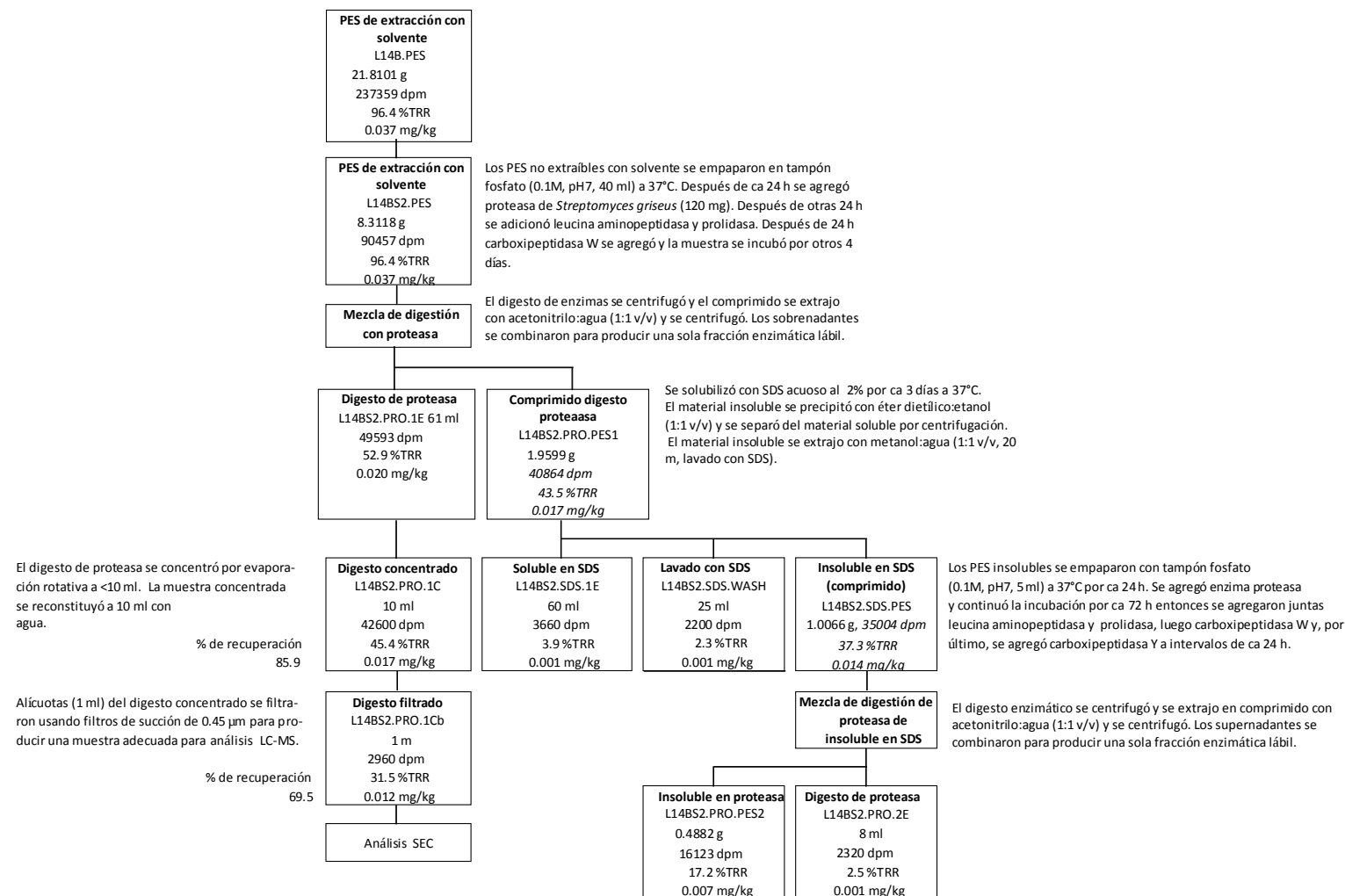
Apéndice 7 Hidrólisis Básica de Residuos Lábiles de Proteasa



Apéndice 8 Aislamiento y Digestión de Péptidos con un Peso Molecular Estimado de 2-3 kDa

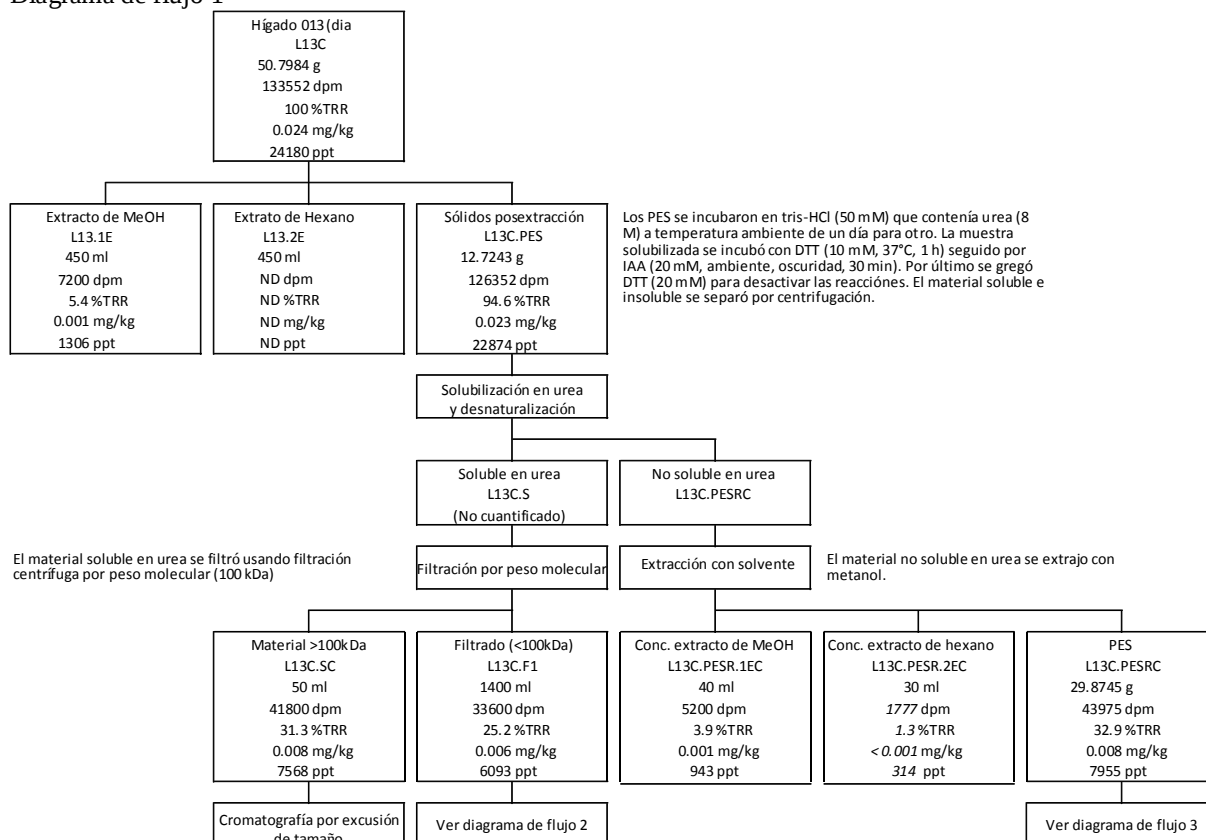


Apéndice 9 Solubilización y Digestión de Residuos No Digeridos



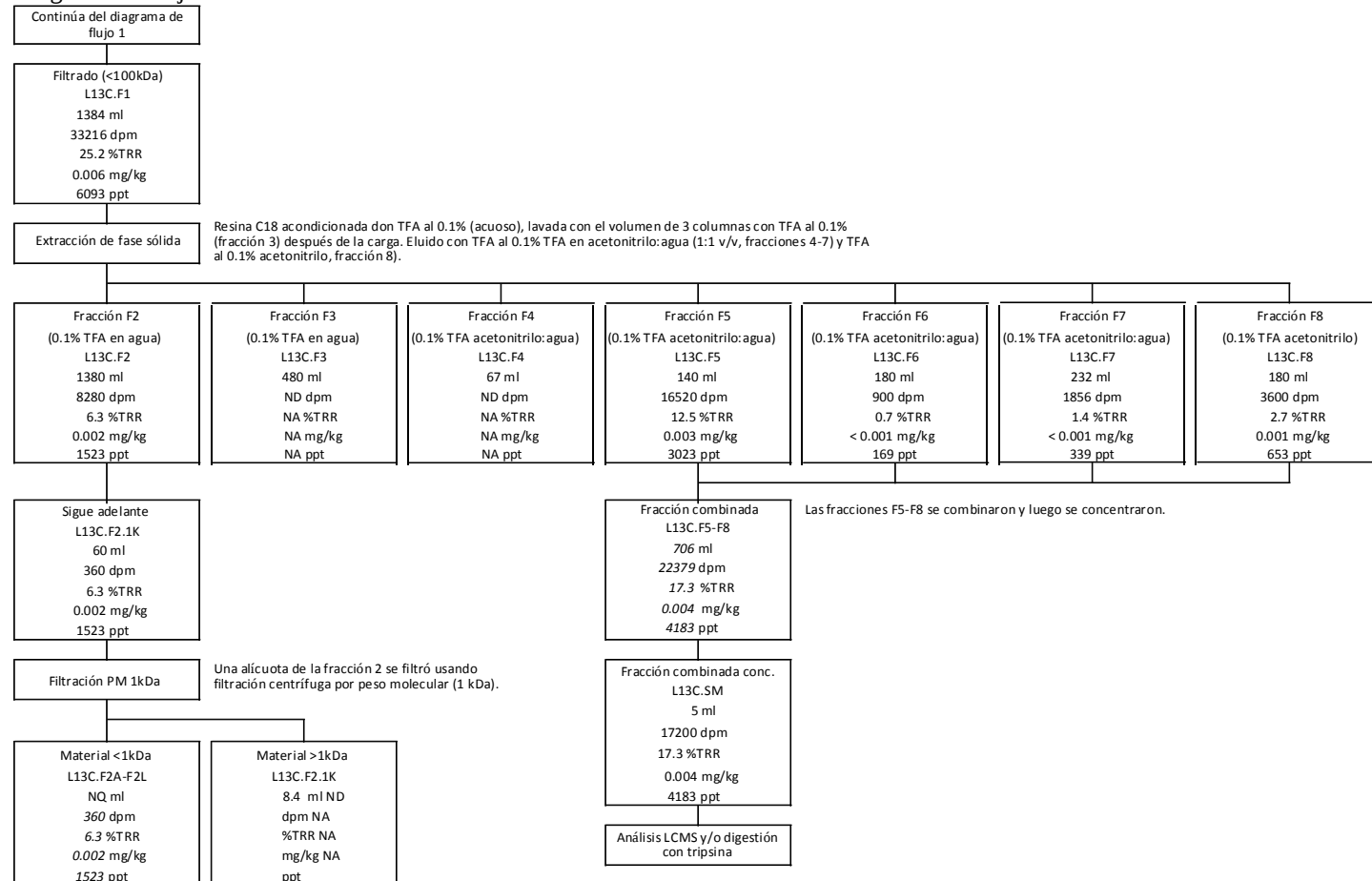
Apéndice 10 Solubilización en Urea de Residuos No Extraíbles con Solvente

Diagrama de flujo 1



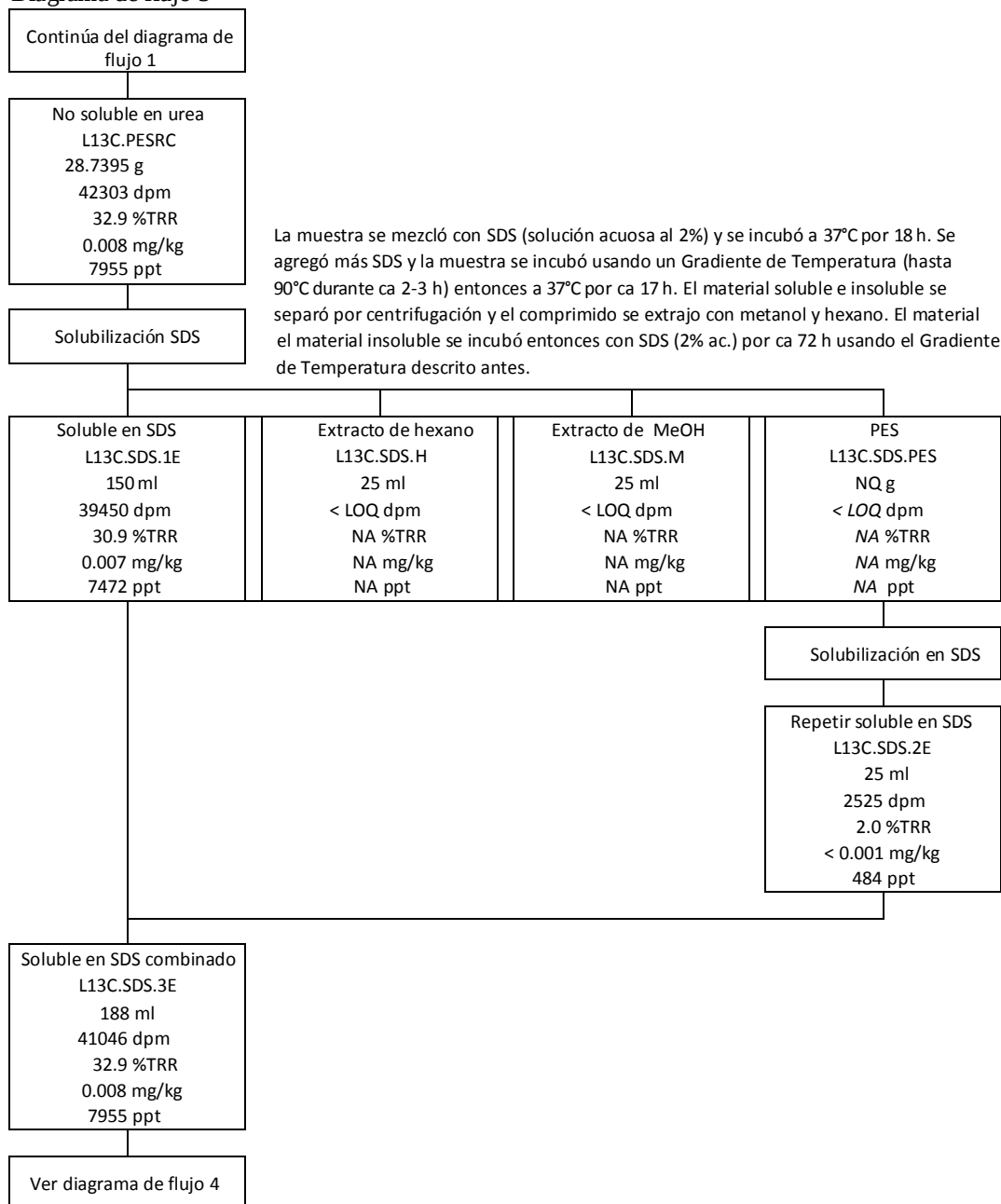
Apéndice 11 SPE de Residuos Solubles en Urea <100 kDa

Diagrama de flujo 2



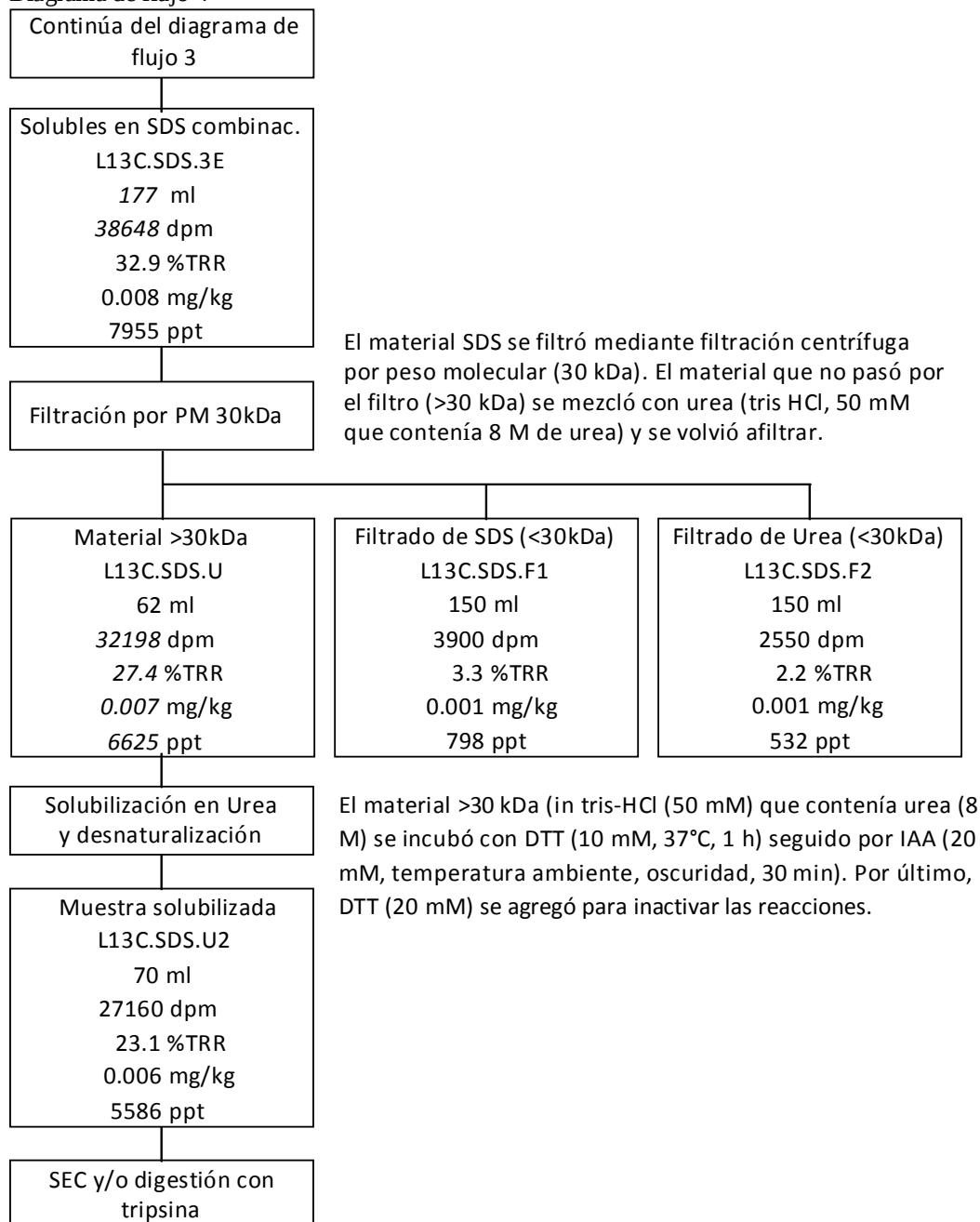
Apéndice 12 Solubilización en SDS de Residuos Insolubles en Urea

Diagrama de flujo 3



Apéndice 13 Solubilización en Urea de Residuos solubilizados en SDS

Diagrama de flujo 4



Apéndice 14 Información de Conformidad de la Modificación

Requisito de BPL-FDA (21 CFR Parte 58)	Requisito BPL-OECD como se incorpora en el Instrumento Estatutario3106 Reino Unido	Procedimiento de estudio No BPL-OECD enviado a FDA	Impacto sobre la integridad y la validez
Envases de almacenamiento deben ser asignados a los artículos de prueba mientras dure el estudio (FDA 58.108 (c)).	No hay un requisito para envases de almacenamiento que deban ser asignados a los artículos de prueba mientras dure el estudio.	El artículo de prueba se suministró en un solo contenedor y se dividió en alícuotas en envases separados según se requirió durante el estudio.	Ninguno (a)
La caracterización del artículo de prueba debe llevarse a cabo para las BPL (FDA 58.105 (a)).	No se requiere la caracterización del artículo para llevarse a cabo bajo reglamentaciones de BPL.	El artículo de prueba fue suministrado con un certificado de análisis completo no BPL al inicio del estudio. Además, un estudio completo BPL para caracterizar el artículo de prueba se completó para el 28 de septiembre de 2014, antes de iniciar este estudio.	Ninguno (b)
Datos deben ser archivados antes de terminar el estudio o al terminarlo. (FDA 58.33).	Los datos se archivarán al completar el estudio.	Los datos se archivaron en el momento de terminar el estudio, lo que es un Procedimiento Estándar de Operación de Charles River. El estudio se finalizó el 06 de julio de 2016 y los datos se archivaron el 06 de julio de 2016.	Ninguno (c)
AC debe realizar inspecciones específicas al estudio (FDA 58.35).	Se permiten inspecciones con base en el proceso	No se requirieron inspecciones de AC en el estudio no BPL, sin embargo, las inspecciones de proceso de la Espectrometría de Masas Cualitativa relevantes para el trabajo llevado a cabo en este estudio se realizaron trimestralmente en las Instalaciones de Prueba y fueron detalladas en la declaración de AC.	Ninguno (d)

Requisito de BPL-FDA (21 CFR Parte 58)	Requisito BPL-OECD como se incorpora en el Instrumento Estatutario 3106 Reino Unido	Procedimiento de estudio No BPL-OECD enviado a FDA	Impacto sobre la integridad y la validez
AC debe mantener una copia del calendario maestro (FDA 58.35).	AC debe tener acceso a una copia actualizada del calendario maestro.	Un calendario maestro que incluye toda la información listada en FDA 58.35 es mantenido en la instalación de prueba por AC que incluye todos los estudios bajo BPL y no BPL.	Ninguno
AC debe enviar periódicamente actualizaciones del estatus por escrito a TFM y los Directores del Estudio (FDA 58.35).	Los resultados de inspección son informados a TFM y los Directores del Estudio, no obstante, no hay un requisito de que AC proporcione actualizaciones de estatus.	AC proporciona un informe de estatus mensual detallando cualquier acción pendiente de AC a TFM y los Directores del Estudio.	Ninguno
Se deben retener registros por 2 años después de la autorización de la FDA a una solicitud de comercialización o 5 años después de presentar una solicitud de comercialización O 2 años después de completarlo cuando no hay una solicitud de comercialización, lo que ocurra primero (FDA 58.195).	Los registros deben retenerse por el periodo especificado por la autoridad regulatoria adecuada.	El protocolo estableció que los registros se retendrían por 2 años (equivalente a 2 ciclos de revisión) entonces se consultará al Patrocinados si se continúa el almacenamiento, se transfiere o se desecha el material.	Ninguno (e)

(a) No hay impacto ya que se mantuvo información adecuada del producto y la responsabilidad del artículo de prueba se documentó por completo en cumplimiento con las BPL de OECD tal como está incorporado en el Instrumento Estatutario 3106 del Reino Unido, como se hubiera declarado si este fuera un estudio con BPL.

(b) No hay impacto ya que se terminó una caracterización completa con BPL para el 18 de septiembre de 2014.

(c) No hay impacto ya que los datos fueron archivados en el momento de terminar el estudio según el Procedimiento Estándar de Operación de Charles River.

(d) La realización de inspecciones de proceso en lugar de inspecciones específicas del estudio no tiene impacto dado que esto cumple con las BPL de OECD tal como está incorporado en el Instrumento Estatutario 3106 del Reino Unido, como se hubiera declarado si este hubiera sido un estudio BPL.

(e) Los datos del estudio se retendrán según el protocolo. Después de 2 años el Patrocinador será contactado con respecto a continuar el almacenamiento del material, transferirlo o destruirlo.