

01674

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**



**MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION Y
DE LA SALUD ANIMAL**

**FORMACION DE UN DERIVADO FLUORESCENTE DEL CLENBUTEROL
Y SU COMPARACIÓN CON EL METODO DE ELISA Y CROMATOGRAFIA DE
LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION (HPLC) CON DETECTOR ULTRAVIOLETA**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

P R E S E N T A:

JUANA GALLEGOS RUBIO

TUTOR: DR. RENE ROSILES MARTINEZ

**COMITÉ TUTORAL: DRA. MARIA DE LA SALUD RUBIO LOZANO
DRA. MARIA DE LOS ANGELES VALDIVIA LOPEZ**

MEXICO, D.F.

2005

m349121



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Juana Gallegos Rubio

FECHA: 7-October-2005

FIRMA: JZ

DEDICATORIA

DEDICATORIA

Con todo mi amor y agradecimiento a Dios. Por ser el dueño de mi vida y mi tiempo, por ser el motor de mi vida y el autor intelectual de cuanto pienso, hago y digo.

A mi familia por su cariño, comprensión y apoyo, en especial a mi madre, eterna inspiración de mis mayores logros....."Bendígame madre, y sepa que jamás saldrá de mí obra sin piedad y sin limpieza" (José Martí)

GRACIAS.....

Al Dr. René Rosiles Martínez por la dirección de este trabajo de tesis, su apoyo incondicional y por ser un ejemplo digno de seguir.

A la Dra. Ma. de la Salud Rubio Lozano y a la Dra. Ma. de los Angeles Valdivia por el apoyo como comité tutorial de este trabajo. Gracias por su tiempo, ayuda y recomendaciones.

Al MVZ Janitzio Bautista Ordoñez por su ayuda, sus consejos y por su infinita paciencia.

A Laura, Lupita, la Sra. Aure y al Sr. Jaime por su valiosa asistencia brindada durante mi estancia en el laboratorio de Toxicología. No tengo palabras para agradecer el tiempo compartido conmigo, así como la confianza, solidaridad y la buena voluntad mostradas para mí.

A la Dra. Ofelia Flores subdirectora del CENAPA, por proporcionar las muestras para la realización de este trabajo.

Al Dr. Rubén Merino por su valiosa colaboración.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	VI
ABSTRACT	VII
1. INTRODUCCIÓN.	1
2. REVISION DE LA LITERATURA	
2.1 Generalidades de los Agonistas β -Adrenérgicos	3
2.2 Mecanismo de Acción	4
2.3 Generalidades del Clenbuterol	6
2.3.1 <i>Propiedades Físico-Químicas del Clenbuterol</i>	7
2.3.2 <i>Usos del Clenbuterol</i>	8
2.3.3 <i>Efectos del Clenbuterol en el ser humano</i>	9
2.3.4 <i>Efectos del clenbuterol en el animal</i>	10
2.4 Farmacocinética del Clenbuterol	11
2.5 Residuos de Clenbuterol en productos de origen animal	12
2.6 Técnicas analíticas para determinar Clenbuterol	13
2.7 Derivatización Fluorescente	15
2.7.1 <i>Fluorescencia</i>	15
2.7.2 <i>Derivatización</i>	16
2.8 Agentes Derivatizantes	16
2.8.1 <i>Cloruro de Benzoilo</i>	16
2.8.1.1 <i>Propiedades Físico Químicas</i>	16
2.8.1.2 <i>Propuesta de reacción del clenbuterol y el Cloruro de Benzoilo</i>	17
2.8.2 <i>Ortoftaldialdehido</i>	18

	Pág.
2.8.2.1 <i>Propiedades Físico Químicas</i>	18
2.8.2.2 <i>Propuesta de reacción del clenbuterol con el OPA</i>	19
2.9 Justificación	21
2.10 Hipótesis	21
2.11 Objetivos	21
3. MATERIALES Y METODOS	22
3.1 <i>Ensayos para la identificación de las características espectrofotométricas de los componentes de la reacción para la formación del derivatizado del clenbuterol</i>	24
3.2 <i>Ensayos para la formación e identificación de las condiciones en cromatografía de capa fina del derivatizado del clenbuterol</i>	25
3.3 <i>Ensayos para la formación e identificación del derivado fluorescente entre el clenbuterol con el OPA y con el Cloruro de benzoilo por Fluorometría</i>	27
3.4 <i>Determinación de las concentraciones de clenbuterol por ELISA</i>	28
3.5 <i>Ensayos para identificar la concentración de clenbuterol por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) con detectores de luz ultravioleta y visible</i>	29
3.6 <i>Determinación de la concentración de clenbuterol por cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia</i>	30
4. RESULTADOS	32
4.1 <i>Identificación de las características espectrofotométricas de los componentes de la reacción para la formación del derivado del clenbuterol</i>	32
4.2 <i>Identificación de las condiciones en cromatografía de capa fina (CCF) del derivado del clenbuterol con el OPA</i>	35
4.3 <i>Identificación del derivado fluorescente del clenbuterol por Fluorometría</i>	37
4.4 <i>Determinación de las concentraciones de residuos de clenbuterol por ELISA</i>	40

	Pág.
<i>4.5 Identificación de la concentración de residuos de clenbuterol por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) con detectores de luz ultravioleta y visible</i>	42
<i>4.6 Determinación de residuos de clenbuterol por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) con detector de Fluorescencia</i>	45
<i>4.6.1 Optimización de las variables</i>	46
<i>4.6.2 Derivatización del clenbuterol</i>	47
5. DISCUSIÓN	52
6. CONCLUSIÓN	59
7. LITERATURA CITADA	60

RESUMEN

RESUMEN

En la presente investigación, se realizaron ensayos para la identificación de clenbuterol en su molécula original, a través de Cromatografía de Capa Fina (CCF), Fluorometría, Enzimoanálisis (ELISA) y Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) fase-inversa con detector Ultravioleta (UV) y Fluorescencia. Los ensayos para la formación de un derivado fluorescente se llevaron a cabo con Ortoftaldialdehído (OPA) y Cloruro de Benzoilo (Cl Benzoilo). En el ensayo por CCF se identificó el clenbuterol con luz UV; en el ensayo por fluorescencia, se formó un derivado con el OPA y la reacción que mejor se derivatizó fue a un pH de 9.3. Asimismo, se identificó el clenbuterol por ELISA, encontrando resultados positivos para la molécula del clenbuterol en muestras de carne de bovino. El clenbuterol fue eluido de la columna C18 (250 X 4.6 mm I. D.), con la fase móvil hecha de acetonitrilo en buffer de fosfato al 0.02 M, (25:75, v/v) y a un rango de pH de 4.8-8.0. La derivatización del clenbuterol con Cl-benzoilo, no se logró ya que al ponerlos en contacto se formó un precipitado. Se logró la derivatización fluorescente del clenbuterol al reaccionar el grupo amino primario del clenbuterol con el OPA en la presencia de 2-mercaptoetanol. El límite de detección para CLAR-UV fue de 4 ng/30 µl; entre tanto el límite de detección para CLAR-Fluorescencia fue establecido de acuerdo a la cantidad máxima permisible mediante un método de adición y fue de 7ng/30 µl. Se corroboró la identificación del clenbuterol por CLAR-UV. Por la prueba de ELISA se detectó clenbuterol a 450 nm en concentraciones que fueron de 607.9 a 10,335.9 ppt en hígado; de 467.9 a 33,101.7 ppt en retina y de 5248 ppt en músculo. El límite de detección del método utilizado es de 40 ppt en músculo e hígado y de 200 ppt en retina. El porcentaje de recuperación de clenbuterol en las muestras control positivo fue del 90%. Finalmente, se compararon los métodos analíticos de ELISA con el de CLAR con detectores de UV y Fluorescencia en su sensibilidad y especificidad; observando que el método CLAR-Fluorescencia resultó ser más sensible y específico.

Palabras clave: CLENBUTEROL, DERIVATIZACIÓN, FLUORESCENCIA, ORTOFTALDIALDEHIDO, CLORURO DE BENZOILO, CLAR-UV, ELISA

ABSTRACT

ABSTRACT

The present investigation, were made assay for the identification of clenbuterol as original molecule, through thin-layer chromatography (TLC), Fluorometric method, Enzyme Immunoassay (ELISA) and high performance liquid chromatography (HPLC) reverse-phase with ultraviolet detection (UV) and fluorescence detection. The assays for the fluorescent derivative was made with o-Phthaldialdehyde (OPA) and Benzoyl Chloride (Cl Benzoyl). In the assay by TLC clenbuterol was identified with light UV; in the assay by fluorescence, a derivative with the OPA and the reaction formed that better derivatized went to pH of 9.3. Also clenbuterol by ELISA was identified, finding positive results for the molecule of clenbuterol in samples of bovine meat. Clenbuterol was eluated through C18 (250 X 4.6 mm I.D.) with the mobile phase done of acetonitrile in phosphate buffer at 0.02 M (25:75, v/v) and to a pH range between 4.8-8.0. There where no derivatitation between clenbuterol and Cl Benzoyl because when mixture they precipitated. The derivatitation fluorescent of clenbuterol when reacting was obtained primary the amine group of clenbuterol with the OPA in the presence of 2-mercaptoethanol. The limit of detection for HPLC-UV was of 4 ng/30 µl; while the limit of detection for HPLC-Fluorescence was established according to the permissible maximum amount by means of an addition method and was of 7 ng/30 µl. The identification of clenbuterol by HPLC-UV was corroborated. By the assay ELISA was detected clenbuterol to 450 nm in 10,335.9 concentrations that went from 607.9 ppt in liver; from 467.9 to 33,101.7 ppt in retina and of 5248 ppt in muscle. The limit of detection of the used method is of 40 ppt in muscle and liver and of 200 ppt in retina. The percentage of recovery of clenbuterol in the samples positive control was of 90%. Finally, the analytical methods of ELISA with the one of HPLC with UV and Fluorescence detectors in their sensitivity and specificity were compared; observing that the HPLC-Fluorescence method was more sensitive and specific.

Key words: CLENBUTEROL, DERIVATIZATION, FLUORESCENCE, O-PHTHALDIALDEHYDE, BENZOYL CHLORIDE, HPLC-UV, ELISA

INTRODUCCIÒN

1. INTRODUCCIÓN

El clenbuterol es un agonista β -adrenérgico, cuyo nombre químico es: 4-amino-3,5 dicloro- α -terbutil-aminometil-bencil alcohol, puede tener dos presentaciones, una en sólido y otra en líquido. Es una arilamina, de acción prolongada que se almacena en tejidos comestibles como hígado, riñón, músculo, humor vítreo, timo o fluidos corporales como es el plasma, orina y bilis (González et al., 1996; Sauer et al., 1995).

En Medicina Veterinaria, el clenbuterol, se utiliza como medicamento, en el tratamiento de bronconeumonías por su acción broncodilatadora. También se emplea como inhibidor del músculo liso uterino. Sin embargo, su uso como aditivo en la alimentación de ganado genera un efecto anabolizante, ejerciendo una acción lipolítica sobre las células adiposas y sobre el músculo. Al mismo tiempo, actúa sobre el anabolismo proteico produciendo una hipertrofia muscular (Galmés et al, 1995; Blass et al, 1998; Ramos et al., 1998b); este efecto ha sido usado como promotor de la ganancia de peso en el ganado, a tal grado que se ha abusado, provocando de esta manera su prohibición y por ende la generación de estrategias para prevenir el mal uso del mismo.

Para el clenbuterol, se han desarrollado diversos métodos analíticos de identificación y cuantificación en muestras de tejido de: hígado, riñón, músculo, grasa, suero sanguíneo, orina, bilis, pelo, retina y alimentos para animales. Estos se pueden clasificar en métodos de detección y de cuantificación además de los confirmativos (Kuiper et al., 1998). Los de detección generalmente son ensayos inmuno-enzimáticos cualitativos que detectan la presencia de la droga con base en una reacción inmuno-enzimática competitiva (Elliot et al., 1993; Elliot et al., 1995; Sporano et al., 1998). Los métodos confirmativos emplean más la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) y la cromatografía de gases en conjunto con la espectrometría de masas (John et al., 1993; González et al., 1996; Sporano et al., 1998). Estas técnicas son mucho más específicas y precisas que los inmunoensayos, aunque mucho más costosas. Se utilizan como confirmativas, especialmente si el resultado de los análisis tiene implicaciones legales. Asimismo dentro de estos métodos de

identificación y cuantificación puede recurrirse a los métodos de detección de la fluorescencia, una vez que se haya logrado hacer que los compuestos fluorescán. Es bien conocido que una vez que los compuestos fluorescen la sensibilidad de detección se incrementa alrededor de mil veces; además de tener cierta capacidad confirmatoria. Así para la detección fluorescente de aminas primarias (las cuales no fluorescen), el reactivo Ortoftaldialdehido (OPA) es usado generalmente en combinación con un compuesto thiol, usualmente 2-mercaptoetanol (ME) para formar un derivado altamente fluorescente. Esta reacción ha sido ampliamente usada para la detección de aminas y aminoácidos en sistemas cromatográficos. Por lo tanto, el presente trabajo tiene como objetivo evaluar la viabilidad de la metodología instrumental para la determinación de los derivados fluorescentes del clenbuterol con los reactivos OPA y Cl de Benzoilo. Además comparar los métodos analíticos de ELISA con el de CLAR con detectores de UV y Fluorescencia en su sensibilidad y especificidad.

REVISIÓN DE LA LITERATURA

2. REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1 GENERALIDADES DE LOS AGONISTAS β -ADRENERGICOS

En 1948 Alquist, descubre 2 sistemas de receptores en donde los fármacos adrenergicos ejercían su acción y que ellos a su vez eran antagonistas en sus funciones, denominándolos alfa (α) cuya función era principalmente excitatoria y los beta (β) con acción principalmente inhibitoria.

En 1967, Lands y colaboradores lograron ver una diferenciación adicional de los efectos beta adrenergicos, denominando β_1 a los que causan lipólisis y estímulo cardiaco y los β_2 que provocan broncodilatación y vasopresión entre otros. El estímulo β_2 adrenergico provoca una activación del complejo receptor β -adeníl ciclasa y ello cataliza la producción de 3,5 AMP cíclico a partir de ATP, produciendo la llamada respuesta “fisiológica” (efecto broncodilatador e inhibición de granulación de las células cebadas).

Posterior a una serie de experimentos se comprobó que la actividad de los agentes adrenérgicos guardaba relación con la estructura de las catecolaminas, aquellos poseen un anillo bencénico con 2 radicales hidroxil adyacentes y una cadena lateral amina; al modificar la estructura original se obtienen cambios en su actividad siendo de esta manera como se han originado una serie de medicamentos con mayor selectividad para estimular los receptores β_2 y producir broncodilatación, con menor actividad cardiovascular y mayor duración de su efecto.

Dichos cambios estructurales dieron origen inicialmente a 3 grupos de broncodilatadores: las catecolaminas representadas por la adrenalina e isoproterenol, los resorcinoles como el metaproterenol, la terbutalina, el fenoterol y las saligeninas a las que pertenece el salbutamol y a medida que avanzan las investigaciones se obtienen nuevos derivados de la estructura original como es el caso de las feniletanolaminas como el Clenbuterol.

El Clenbuterol, es un fármaco β_2 selectivo; fue sintetizado por Keck y colaboradores en 1972, difiere químicamente de otros β_2 simpaticomiméticos como el salbutamol, fenoterol, orciprenalina y sustancias similares, que tienen su estructura básica de feniletanolaminas; por el hecho de que en el anillo bencénico en las posiciones 3-5 se liga el ión cloro, pero en el caso de salbutamol esta posición está ocupada por metanol (Rico, 2002).

2.2 MECANISMO DE ACCIÓN

Los agonistas β -AR son moléculas orgánicas que se unen a los receptores β -AR, dando lugar al complejo agonista-receptor, que a su vez activa a la proteína Gs (proteína que estimula la adenililciclase). La adenililciclase, es la enzima que produce el monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), una de las principales moléculas de señalización intracelular. Esta molécula produce sus efectos al unirse a la subunidad reguladora de la cinasa proteínica A, para liberar la subunidad catalítica que fosforila a un buen número de proteínas intracelulares (Figura 1). Estas proteínas tienen papeles funcionales vitales para una variada gama de funciones que van desde permitir la entrada de Ca^{++} a la célula, hasta medir la síntesis de proteínas clave para el funcionamiento celular.

Los receptores beta, se localizan por fuera de la superficie de la membrana celular y con ello reconocen y ligan el acoplamiento de los beta agonistas como droga. Para los receptores beta estos componentes son los más parecidos a una parte del sistema de la enzima adenililciclase. La fijación de las drogas beta adrenergicas a estos receptores permite la acumulación del AMP cíclico. El AMP cíclico permite la relajación de la musculatura lisa de los bronquios y del útero debido a la estimulación de los receptores β_2 . Por lo tanto, el tratamiento de las enfermedades respiratorias con drogas betamiméticas se consideran selectivos, gracias a su acción broncodilatadora (Cajal y Álvarez., 2002).

En el aspecto lípidico los β_2 -agonistas estimulan la lipólisis e inhiben la lipogénesis a través de la acción del AMPc citoplasmático. En cuanto al metabolismo de los

carbohidratos, estimulan la degradación del glucógeno e inactivan su síntesis porque actúan sobre la liberación de la insulina y del glucagón por parte del páncreas. Son agentes potencialmente hiperglicemiantes (Rico, 2002).

En el metabolismo proteico, actúan sobre el incremento del tamaño muscular al provocar una hipertrofia de la célula muscular estriada. Parece ser que éste incremento proteico se debe más bien a una inhibición de la degradación de las proteínas que al incremento de su síntesis (Rico, 2002).

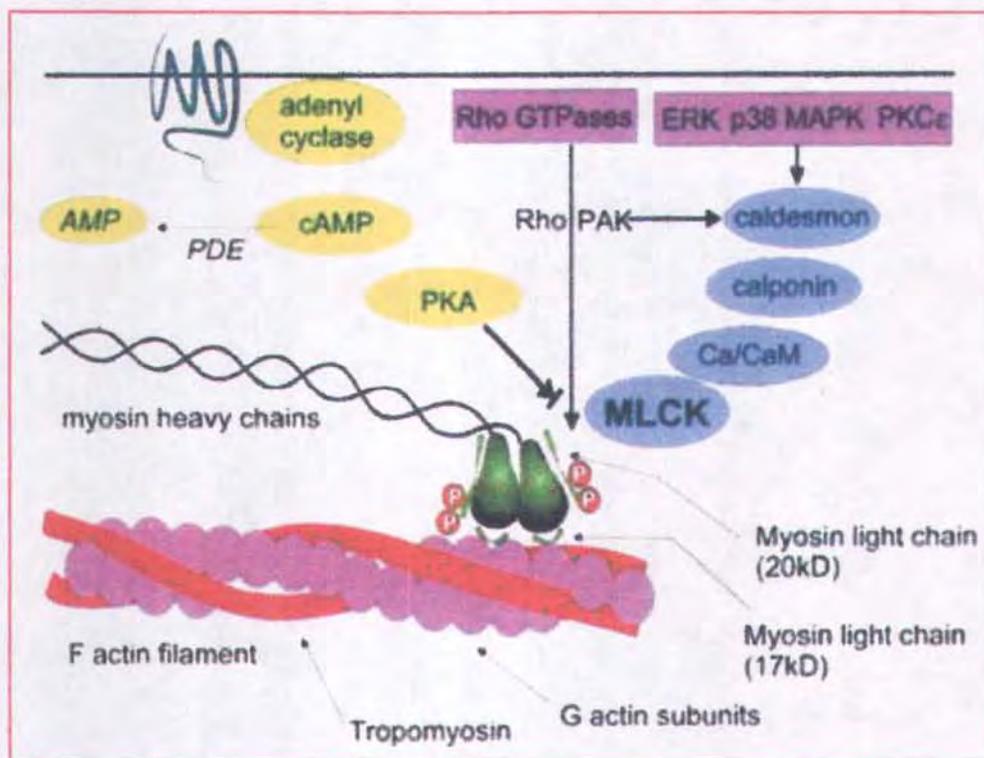


Figura 1. Mecanismo de acción de los Agonistas β-adrenérgicos.

El tratamiento de los mamíferos con agonistas β-AR causa incremento en la cantidad ARNt para varias proteínas del músculo esquelético. En este contexto, después del tratamiento con β-AR se incrementan: El ARNm para la miosina de cadena ligera; el ARNm de la α-actina y el inhibidor de la proteasa calpaína calpastatina. Los agonistas β-AR pueden incrementar el flujo sanguíneo a ciertas regiones del cuerpo. Este aumento permite el

proceso de hipertrofia en el músculo esquelético al transportar mayores cantidades de sustratos y fuentes de energía para la síntesis de proteína.

2.3 GENERALIDADES DEL CLENBUTEROL

El clenbuterol constituye un miembro de las denominadas fenetanolaminas, medicamentos que, como grupo, requieren la presencia de un anillo aromático con un grupo hidroxilo en la posición β del grupo alifático para mostrar actividad. La presencia del grupo nitrogenado y la sustitución de R por un grupo voluminoso, a menudo cíclico, no alifático, hace más específica a la molécula por los receptores β -adrenérgicos como en el caso de la dobutamina. Con excepción de este último sustituyente, las catecolaminas naturales del organismo (epinefrina y norepinefrina) son muy similares a los agonistas β -AR. Empero, tanto el clenbuterol como todos los agonistas β -AR muestran importantes diferencias en las actividades intrínsecas, ello se debe a las características de los grupos sustituyentes. Asimismo, las diferentes sustituciones propician las distintas características farmacocinéticas; a su vez, las diferentes capacidades de distribución y permanencia en el organismo determinan la magnitud del efecto del agonista β -AR y la persistencia de residuos en los tejidos animales (Sumano y Ocampo, 2002).

Cuando los OH- son sustituidos por un halógeno como en el caso del clenbuterol (cloro), se evita la biotransformación por las enzimas catecol-O-metil-transferasas (COMT) a nivel tisular y se hace lenta la biotransformación hepática. Al mismo tiempo, la presencia del cloro en el clenbuterol lo hace más liposoluble que sus análogos y por ende, tiende a difundir más profundamente en los tejidos inclusive la grasa animal. Los compuestos β -AR presentan una cadena lateral (señalada como β). Esta puede ser levógira o dextrógira. Para algunos compuestos como el clenbuterol la parte activa es la levorrotada.

2.3.1 Propiedades Físico-Químicas del Clenbuterol

El nombre químico del clenbuterol es: 4-amino-3,5 dicloro- α -terbutil-aminometil-bencil alcohol, cuya fórmula molecular es: $C_{12}H_{19}N_2OCl_3$, presenta un peso molecular de 313.65, puede tener dos presentaciones, una en sólido y otra en líquido. En sólido como polvo es incoloro o como sustancia líquida de color blanco amarillento, un punto de fusión de $174^\circ C$. El polvo es muy soluble en agua, metanol y etanol, ligeramente soluble en cloroformo y el líquido, es soluble en agua, metanol y etanol y muy soluble en cloroformo. Es estable en agua caliente ($100^\circ C$) y en aceite caliente ($260^\circ C$), por lo que no se descompone con los procesos de ebullición, rostizado, freído ni microondas. Su fórmula estructural se presenta en la Figura 2.

CLENBUTEROL

Fórmula molecular: $C_{12}H_{19}N_2OCl_3$

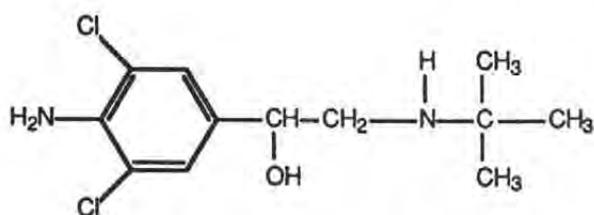


Figura 2. Fórmula estructural del clenbuterol.

El clenbuterol químicamente es básicamente una arilamina, de acción prolongada que se almacena en hígado y riñón, se metaboliza por reacciones de N-oxidación en ocho metabolitos, dos de los cuales (N-hidroxyarilamina y N-nitrosoclenbuterol) aún mas tóxicos que el compuesto original. Presenta una eliminación bifásica, la primera ocurre a las diez horas después de haberse suspendido la administración, y la segunda después de varios días y se excreta principalmente por orina (Figura 3) (Zalko, 1997) (Mersmann, 1998).

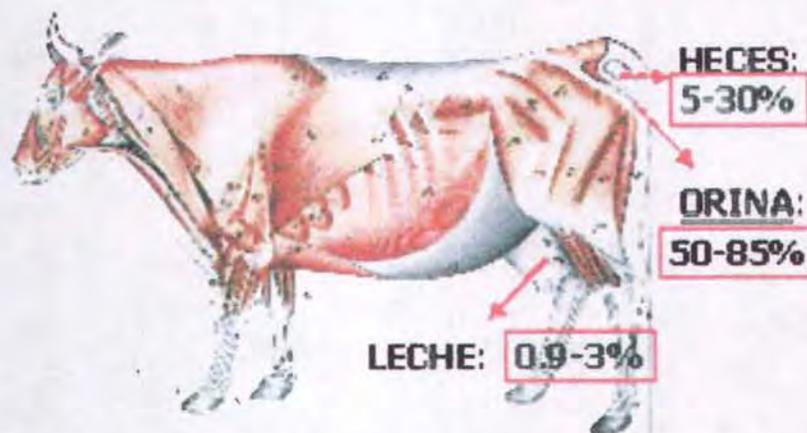


Figura 3. Concentración porcentual de la excreción del Clenbuterol en bovino (a los 4-15 días de su administración)

2.3.2 Usos del Clenbuterol

El clenbuterol fue aprobado para utilizarse en Medicina Veterinaria en 1978 como broncodilatador por vía parenteral y oral en más de 20 países y por su eficacia se considera que es una parte esencial en el arsenal disponible para el clínico tanto en Medicina Humana como en Medicina Veterinaria. En el hombre ofrece el beneficio de inducir una notoria broncodilatación a dosis de 10, 20 y hasta 40 mg/adulto

En Medicina Veterinaria, se emplea el Clenbuterol para el tratamiento de enfermedades respiratorias donde la obstrucción de los pasajes aéreos es un problema, pueden ser de origen broncoespasmódico o por bronquiolítico y acumulación de moco, también ayuda en la mejora de la actividad mucociliar, y en la enfermedad respiratoria crónica así como en el tratamiento de bronquitis y bronconeumonías en combinación con antibióticos; es muy útil en la profilaxis de alergias, en bovinos y equinos a dosis de 0.8 mg/kg (Galmés et al, 1995; Ramos et al, 1998a, Sanz, 1995). También se emplea como estimulante del útero en los partos de yeguas, ovejas y vacas a dosis de 300-450 mg/animal. Además, su uso como aditivo en la alimentación de ganado genera un efecto anabolizante, ejerciendo una acción

lipolítica sobre las células musculares y adiposas y, al mismo tiempo, actúa sobre el anabolismo proteico produciendo una hipertrofia muscular (Galmés et al, 1995; Blass et al, 1998; Ramos et al., 1998b). Al ejercer su acción lipolítica, causa una reducción considerable en los depósitos de grasa (aproximadamente 18%) y favorece la síntesis de proteína (arriba del 15%), lo cual permite la producción de la canal libre de grasa con un desarrollo extraordinario de la masa muscular (Alpizar, et al., 1993; González, et al., 1996). Sin embargo, así como tiene usos permitidos el clenbuterol, también se usa indebidamente. El uso indebido del clenbuterol inicia desde que la patente expira y se convierte en un producto genérico entre 1985 y 1988. El mal uso de los β -agonistas es el resultado de un manejo y comercialización no controlada de compañías que venden el clenbuterol como sal pura o a granel. En 1984 era ya ampliamente conocido que los β -agonistas incluyendo el Clenbuterol podría influenciar el desempeño productivo de los animales destinados para consumo humano (Cajal y Álvarez., 2002).

2.3.3 Efectos del Clenbuterol en el ser humano

La adición de clenbuterol al alimento de los animales a dosis elevadas y carentes de un tiempo de retiro antes del sacrificio, conduce a la exposición de los humanos por el consumo de cantidades altas en los tejidos comestibles, especialmente en el hígado. Estos acúmulos pueden originar intoxicaciones en las personas que consuman dichos tejidos cuando el período de retiro del fármaco, no ha sido el suficiente como para que desaparezca totalmente de los productos destinados a consumo humano. El consumo de hígado con concentraciones elevadas de clenbuterol ha dado lugar a episodios de intoxicación que cursan con temblores fácilmente identificables como: taquicardias y palpitaciones, acompañados frecuentemente de nerviosismo, cefaleas y mialgias, con una duración aproximada de 40 horas (Blass et al, 1998; Luño et al, 1999). Existen informes que indican que la persistencia de clenbuterol en plasma y orina es baja, pero este persiste en el hígado a tiempos mucho más largos, que en otros tejidos comestibles y es detectable en el hígado hasta por mas de 2 semanas después del retiro de la droga del alimento de los animales

(O' Keeffe et al., 1998). Se ha demostrado que el pelo presenta también una alta capacidad de fijación de clenbuterol con valores detectables hasta meses después de retiro del tratamiento (Blass et al., 1998). El pelo se puede obtener en animales *in vivo* pero los niveles de clenbuterol son proporcionales a la concentración de melanina, por lo que en animales de pelo claro no servirá como matriz; además puede presentar problemas debido a contaminaciones cruzadas (Elliot et al., 1995b).

Los efectos que se han documentado debido a una sobredosis aguda-extrema, no derivada de la ingesta de productos con residuos de clenbuterol, sino producto de una sobredosis accidental o de productos farmacéuticos de la línea humana que contienen clenbuterol, se acentúa la taquicardia, el adormecimiento de las manos, el nerviosismo, los temblores y puede haber necrosis del miocardio por disminución de la perfusión generada por el acortamiento de la diástole, etapa en la que se lleva a cabo la irrigación del miocardio por la coronarias.

2.3.4 Efectos del Clenbuterol en el animal

En bovinos el clenbuterol induce a dosis bajas, consideradas como promotoras del rendimiento productivo: aumento de la presión sanguínea, incremento transitorio de la frecuencia cardiaca durante 24 horas aproximadamente, incremento de la tasa metabólica y se ha informado que aumenta la tasa de cojeras. No se tienen documentados los efectos de una sobredosis de clenbuterol en esta especie, pero no deben diferir de lo anterior más que en su magnitud. A dosis promotoras de la producción o superiores, el problema del uso ilegal del clenbuterol se centra mayormente en los riesgos que presenta para el consumidor la ingesta de productos de origen animal contaminados con clenbuterol (Sumano y Ocampo, 2002).

2.4 FARMACOCINETICA DEL CLENBUTEROL.

El clenbuterol es un agonista β -adrenérgico que comparte propiedades fisicoquímicas con otros agonistas β -adrenergicos; además su comportamiento es similar dentro de los organismos en ciertos aspectos. Alcanzan concentraciones plasmáticas máximas (C_{pmax}) en 1-3 horas tanto en animales domésticos como en el hombre. Se ha documentado en becerros, que el nivel pico inicial de clenbuterol después de una dosis de $5\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, considerada como promotora del rendimiento, fue de 0.5 ng/ml a las 2-7 horas después del tratamiento. Después de 21 días, el nivel pico llega a 1.1 ng/ml cuatro horas después de la dosificación debido probablemente a que se ha alcanzado el denominado estado estable con un ligero nivel de acumulación. En vacas lactantes dosificadas de manera crónica con clenbuterol a razón de $5\mu\text{g}/\text{kg}$ cada 12 horas, se alcanzó un nivel plasmático máximo de $5-5.5\text{ ng/ml}$ de 5-7 días después de su administración (Stoffel y Meyer., 1993). La biodisponibilidad total de clenbuterol sólo se puede estimar restando la excreción de su radioactividad urinaria, después de la administración oral de β -agonista radiactivamente marcado.

Como se detalló anteriormente, los agonistas β -AR tienen un anillo aromático, algunos de ellos halogenados como el clenbuterol. Todos se metabolizan por oxidación y conjugación microsomal. El clenbuterol en particular posee una vida media prolongada (Smith., 1998)

En el ganado bovino, el clenbuterol se excreta por la leche, a una concentración promedio de 12.5 ng/ml (rango: 5.5 a 22.5 ng/ml). Stoffel y Meyer (1993), administraron clenbuterol a vacas a dosis de $10\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso, detectándose una concentración en leche de $3-9\text{ ng/ml}$ de leche. En las curvas de eliminación plasmática del clenbuterol en el ganado, se distinguen dos fases: una primera con vida media de aproximadamente 10 h y una segunda de aproximadamente 120 horas, lo cual resulta en la acumulación de residuos en una amplia gama de tejidos (Elliot, et al., 1993; Elliot, et al., 1995).

2.5 RESIDUOS DE CLENBUTEROL EN PRODUCTOS DE ORIGEN ANIMAL.

La dosis promotora del crecimiento óptima del clenbuterol en el ganado bovino, es aproximadamente de 0.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso. Empero, como se ha visto que se pueden mejorar aún más los rendimientos de las canales, no es raro que los productores administren al ganado bovino de cinco hasta diez veces la dosis mencionada (Peters., 1989). El incremento en el rendimiento en canal no es lineal al incremento en la dosis, se afecta a dosis elevadas el bienestar del animal y se puede afectar su salud, por lo que esta práctica no es justificable y el razonamiento es más bien primitivo.

En un estudio realizado por Sauer y col. (1994), se administró clenbuterol vía oral a diez veces la dosis terapéutica (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso cada 12 horas durante 21 días) en becerros Holstein-Friesian y se determinaron las principales variables farmacocinéticas y el patrón de eliminación de los residuos en los órganos y tejidos habituales, así como en varios compartimentos del ojo y fluidos corporales. Se determinaron residuos a las seis horas y a las uno, dos, cuatro, ocho y dieciséis días después de terminado el tratamiento. Las concentraciones del clenbuterol, fueron más elevadas en el hígado que en el riñón, bilis y orina, a partir del día dos del retiro. Sin embargo, las concentraciones en la coroides/retina fueron diez veces mayores que en el hígado en todos los tiempos después de terminado el tratamiento. Asimismo, las concentraciones de clenbuterol en los tejidos del ojo fueron en el siguiente orden, de más a menos: coroides, retina, córnea, esclerótica, humor acuoso, humor vítreo. Dado el peso de estas estructuras, es absurdo pensar que su acumulación a este nivel puede representar un peligro real. Sin embargo, su acumulación en retina y coroides puede ser útil para proporcionar información relevante sobre el uso del clenbuterol en animales enviados a rastro. Con base en el criterio de cero residuos, Elliot (1998), recomienda un tiempo de retiro de cuatro semanas cuando se utiliza una dosis convencional para mejorar el rendimiento en canal. Sin embargo, no hace referencia al tiempo requerido utilizando otras dosificaciones. La melanina es el componente ocular responsable de la fijación del clenbuterol, lo cual se demostró en residuos oculares de ratas albinas y ratas

testigo ya que ambas presentaron la misma cantidad de residuos de clenbuterol, mientras que las ratas con ojos pigmentados mostraron clara evidencia de acumulación.

2.6 TECNICAS ANALITICAS PARA DETERMINAR CLENBUTEROL.

Tratándose del monitoreo de sustancias prohibidas, en donde el límite máximo de residuos permisibles es cero (o bien el límite mínimo de detección del método), las características para la elección de la metodología a usar en el laboratorio, deben ser perfectamente evaluados en función de la cantidad y tipo de muestras a procesar, la rapidez y costo por muestra y la confiabilidad y sensibilidad de la metodología (Sauer et al., 1995; Flores, et, al., 2002; Elliot, et al., 1995a). La tendencia internacional es monitorear residuos utilizando la combinación de métodos presuntivos y confirmatorios, lo que permite trabajar un mayor número de muestras e incrementar la confiabilidad del resultado final.

En el caso del clenbuterol, se han desarrollado diversos métodos analíticos en muestras de tejido (hígado, riñón, músculo, grasa), suero sanguíneo, orina, bilis, pelo, retina, alimentos para animales y sus ingredientes, aplicando técnicas variadas, entre las principales: enzimoimmunoensayo (ELISA), Radioinmunoanálisis (RIA), Cromatografía en capa fina (CCF), Electroforesis capilar, Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), Cromatografía de Gases (CG) y estas dos últimas con sus modalidades con acoplamiento a Espectrometría de Masas (MS) (Flores at al., 2002; Boyd and O' Keeffe, 1994). La CLAR con detección electroquímica o fluorescencia proporciona sensibilidad para una combinación de β -agonistas. La detección ultravioleta (UV) solo tiene una buena sensibilidad después de un procedimiento de derivatización post-columna.

ELISA, es una prueba inmunológica, utilizada exitosamente en varios países, es una prueba usada ampliamente en la detección de dopaje en humanos o animales y para el monitoreo del uso ilegal del Clenbuterol y otros β -agonistas (Flores at al., 2002). Tiene la ventaja de que se puede manejar un elevado número de muestras lo que repercute en la disminución

del precio por muestra analizada, es un método muy sensible y rápido, requiere de inversión mínima en equipo, materiales y reactivos; están disponibles diversos procedimientos de extracción para muestras: suero, orina, leche, bilis, hígado, riñón, músculo, retina, pelo, ingredientes y alimentos terminados para animales. (Morgado et al., 1993; Boyd et al., 1996; González et al., 1996; García et al., 1997; Blass et al., 1998; Flores et al., 2002). De las ventajas de los métodos enzimoenzimáticos, se pueden señalar el número importante de muestras que se procesan en una corrida (96), si se comparan con las diez muestras por CLAR, el tiempo de análisis es de aproximadamente 27 h y tiene una sensibilidad de 0.1 ppb, pero también presentan una desventaja importante que es el entrecruzamiento de las reacciones con otros beta agonistas, como la terbutalina, el salbutamol, el cimaterol entre otros; lo que reduce su aplicabilidad para el control de residuos. La ventaja principal de la CLAR es la confiabilidad de sus resultados de un 99.9%, una sensibilidad del orden de las partes por trillón (ppt), siendo su mayor desventaja el tiempo en el análisis que es de 72 h (Peña, 2002).

La Cromatografía de Gases (CG) o líquidos (CLAR), resulta la mejor elección en cuanto a niveles de detección ($\geq 0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$), cuantificación ($\geq 1 \mu\text{g}/\text{kg}$), recuperación (80-110%), correlación (coeficiente ≥ 0.999) y repetitibilidad ($\text{CV} \leq 4$), aunque ambas tienen el inconveniente del elevado costo por muestra analizada, la necesidad de contar con patrones (estándares de referencia) certificados, mantenimiento y calibración especializada de manera constante, solventes con un grado adecuado al tipo de cromatografía, la inversión inicial en equipo y sus aditamentos es elevada, el personal que desarrolle los análisis y opere el equipo debe tener un grado de especialización y actualización adecuado (Flores et al., 2002).

El método aprobado para determinar la seguridad del consumidor, se basa en los conceptos de consumo diario aceptado (CDA) y el límite máximo de residuos (LMR). El CDA se calcula con el nivel máximo sin efecto del medicamento, multiplicado por el peso del consumidor sobre el factor de seguridad. El LMR se determina tomando en cuenta los consumos locales de los alimentos y un factor de seguridad. Para el clenbuterol el CDA es

de 0.004 mg/kg según la FAO/OMS. Los límites máximos de residuos para el músculo y grasa del ganado es de 0.2 mg/kg, de 0.05 mg/Kg en leche y de 0.6 mg/Kg en hígado y riñón (Peña, 2002).

2.7 DERIVATIZACION FLUORESCENTE

Aunque se han usado varios reactivos de derivatización fluorescente en análisis de residuos de drogas, estos se reemplazan con hidrógenos activos de hidroxil, sulfidril, y grupos amino tomados en cuenta para más aplicaciones.

2.7.1 Fluorescencia

La Fluorescencia es el tipo de luminiscencia, en la que un átomo o molécula emite radiación visible pasando del estado electrónico alto a otro más bajo. El término se reduce al fenómeno en el que el intervalo de tiempo entre la absorción y emisión de la energía es extremadamente corto (10^{-8} a 10^{-3} segundos). Esto distingue a la fluorescencia de la fosforescencia, en la que el intervalo de tiempo se puede extender a varias horas. Los materiales fluorescentes pueden ser líquidos o sólidos orgánicos e inorgánicos (Hawley., 1988).

La fluorimetría es útil particularmente en el análisis de drogas, y la no fluorescencia de muchos compuestos ha estimulado el desarrollo de reactivos los cuales ayudan a la formación de derivados fluorescentes. Los métodos fluorescentes tienen ventajas debido a sus excelentes límites de detección, su selectividad y la posibilidad de combinarse con las técnicas de inyección de flujo con métodos automáticos o semiautomáticos (Viñas, et al., 1998).

2.7.2 Derivatización

Los residuos de drogas que no son suficientemente absorbidos o fluorescentes se presentan usualmente, previos a su análisis a través de técnicas físico-químicas, para algún tipo de derivatización primero se intenta aumentar la detectabilidad del analito. Además, la formación de derivados relativamente no polares ofrece ventajas para una extracción y purificación exitosas.

En la selección de un procedimiento de derivatización para cierto analito, se deben tomar en cuenta varias medidas. El reactivo derivatizante puede ser selectivo para un grupo funcional simple, no tóxico, capaz de introducir un alto grado de sensibilidad, estable sobre períodos de tiempo prolongado, y capaz de reaccionar rápidamente y cuantitativamente con el analito bajo condiciones suaves de rendimiento de un derivado simple con una manipulación mínima. El derivado puede exhibir estabilidad sobre el tiempo y posee propiedades cromatograficas favorables. Los procedimientos de derivatización fluorescente, ultravioleta, visible, enzimático y fotoquímico han sido usados con sucesos de variación dentro del campo del análisis de residuos de drogas.

2.8 AGENTES DERIVATIZANTES

2.8.1 CLORURO DE BENZOILO

2.8.1.1 Propiedades Físico-Químicas

El grupo e agentes derivatizantes para el clenbuterol serán aquellos que tendrán la posibilidad de reaccionar con el grupo amino en la molécula del clenbuterol. El cloruro de benzoilo químicamente es 4-(2-Phtalimyl), y sus propiedades físico-químicas, refieren que es un líquido incoloro de olor picante, lacrimógeno, que con el agua se hidroliza fácilmente

formando ácido benzoico y desprendiendo ácido clorhídrico y calor, es soluble en éter, benceno y disulfuro de carbono. Su fórmula estructural se presenta en la Figura 4.

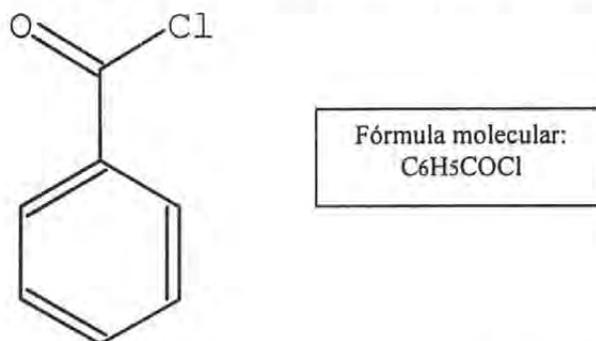


Figura 4. Fórmula estructural del Cloruro de Benzoilo

El Cloruro de Benzoilo se absorbe y se distribuye rápidamente en el aparato digestivo. La excreción principalmente se da en la orina como *S - N benzyl-* acetylcysteine, alcohol benzyl y benzaldehide. Todos estos compuestos son irritantes para la piel y en las membranas mucosas.

El cloruro de benzoilo es mutagénico y genotóxico. Además se descompone rápidamente con el calor y en contacto con los álcalis, los alcoholes, las aminas y el sulphoxide dimethyl, causa peligro de fuego y de explosión. Reacciona violentamente con los oxidantes fuertes. Reacciona con agua y el vapor produce calor.

Esta sustancia es muy tóxica. Es un irritante severo y corrosivo. La inhalación prolongada puede ser fatal. La exposición aguda a la piel y a los ojos causa rojez, dolor y quemaduras localizadas. La inhalación causa dolor en la garganta al toser.

2.8.1.2 Propuesta de reacción del Clenbuterol y el Cloruro de Benzoilo

Los halogenuros de ácido son los más reactivos de todos los derivados de los ácidos carboxílicos. El ión halogenuro es un buen grupo saliente. Unido al carbono positivo de un

grupo carbonilo, se desplaza aun más fácilmente que cuando está unido a un carbono alquílico.

Aunque todos los cloruros de ácido experimentan la hidrólisis ácida y alcalina para dar los ácidos carboxílicos, las velocidades de reacción varían. Un cloruro de ácido, que tiene un grupo alquilo voluminoso unido al grupo carbonilo, reacciona más lentamente que otro cloruro de ácido con un grupo alquilo pequeño. El efecto del tamaño del grupo alquilo sobre la velocidad de reacción es un problema de solubilidad en agua, más bien que de impedimento estérico. Un cloruro de ácido con un grupo alquilo pequeño es más soluble y reacciona con más rapidez. Un incremento del tamaño de la porción alquílica hace al cloruro de ácido menos soluble en agua; y la reacción es más lenta. Si la hidrólisis de diferentes cloruros de ácido se lleva a cabo en un disolvente inerte, que disuelve a ambos: cloruro de ácido y agua, las velocidades de hidrólisis son similares.

El cloruro de benzoilo, es muy estable por los dobles enlaces que tiene y aunque si puede haber una resonancia entre el cloruro y el cloro, el cloro que tiene este último es muy fuerte entonces es muy difícil que presente color.

2.8.2 ORTOFTALDIALDEHIDO

2.8.2.1 Propiedades Físico-Químicas

Los aldehídos son compuestos de fórmula general: $R-CH=O$ donde el grupo R puede tener muy diversas características estructurales, puede ser saturado, insaturado, alifático cíclico, aromático y de estructura muy simple hasta muy compleja. Estos compuestos, por tener el grupo carbonilo $C=O$ son catalogados dentro de un grupo muy extenso denominado de "Compuestos Carbonílicos". Este grupo carbonilo presente en los aldehídos determina grandemente sus propiedades físicas y químicas, tales como el alto momento bipolar debido a la distribución electrónica no uniforme de la unión carbono-oxígeno; el alto punto de

ebullición con respecto a compuestos no polares de peso molecular semejante se debe a la polaridad mencionada; el grupo carbonilo es también el responsable de la gran facilidad con que intervienen en reacciones de adición nucleofílica ya que, debido a la gran atracción electrónica que ejerce el átomo de oxígeno, ocasiona una deficiencia electrónica en el átomo de carbono, en el cual se origina un lugar ideal para el ataque de agentes nucleofílicos.

El OPA fue originalmente introducido como un reactivo alternativo a la ninhidrina en la postcolumna de derivatización y suministró un significativo incremento en la sensibilidad. Los aminoácidos reaccionan con el OPA en presencia de un reductor fuerte, en condiciones alcalinas (pH 9-11), dando un compuesto fluorescente. La separación en fase reversa seguida de detección fluorescente constituye un método de detección rápido, sensible y selectivo para todos los aminoácidos con grupos amino primario (Tateda et al., 1998). El OPA, tiene como fórmula molecular $C_8H_6O_2$; Peso molecular: 134.13. La Figura 5 muestra la fórmula estructural del Ortoftaldialdehído.

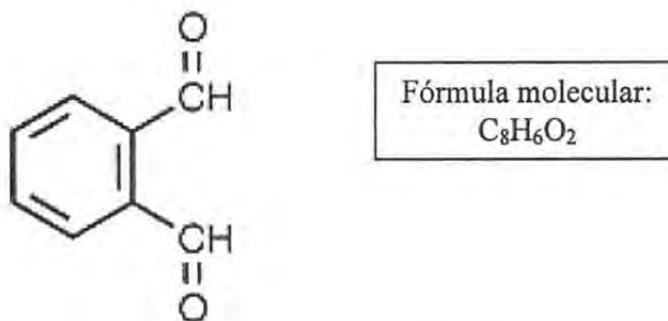


Figura 5. Fórmula estructural del Ortoftaldialdehído.

2.8.2.2 Propuesta de reacción del Clenbuterol con el OPA

El OPA, es conocido por reaccionar con aminas primarias en la presencia de un thiol como lo es el 2-mercaptoethanol, para formar un aducto altamente fluorescente. Esta reacción fluorescente ha sido ampliamente usada para la detección de aminas y aminoácidos en

sistemas cromatográficos. En la ausencia de un thiol, el OPA puede reaccionar con la histidina, histamina, agmatina, espermidina, serotonina y glutathione para obtener aductos fluorescentes bajo las condiciones apropiadas para la reacción como lo es el pH y ha sido usado como un reactivo fluorogénico selectivo para el análisis de estas aminas y aminoácidos biogénicos en muestras biológicas (Tateda et al., 1998).

Las condiciones, características y el mecanismo de derivatización del OPA en aminoácidos y aminas han sido discutidos con detalle. Estudios recientes se han llevado a cabo dentro y fuera del sistema cromatográfico, demostrando el motivo y el fondo de la inestabilidad de la parte fuerte del grupo amina primaria conteniendo compuestos: todos los derivados del OPA proporcionan el "menos estable" productos que contienen en su estructura inicial el radical $-CH_2-NH_2-$. (Kutlán y Molnár-Perl., 2002).

El OPA, es un compuesto que en ciertas condiciones proporciona fluorescencia y favorece el ambiente con la estructura de clenbuterol para que fluoresca, debido al flujo de electrones de la molécula.

2.9 JUSTIFICACIÓN

Uno de los grandes retos para un laboratorio es la elección del procedimiento más apropiado para la detección preliminar de las drogas de abuso. En este sentido, esto va a depender del número de muestras y analitos a determinar, el requerimiento de sensibilidad y especificidad del método, del personal con que se cuenta, de los equipos disponibles y del presupuesto del laboratorio (Sunshine, 1988). Este concepto es usado entre la cromatografía de capa fina como un método preliminar objetivo pero adolece de la sensibilidad que caracteriza a la cromatografía de líquidos de alta resolución.

Actualmente el clenbuterol se identifica por la prueba de ELISA, la cual es una metodología no específica para este, es decir puede determinar otros β -agonistas como el Salbutamol, Cimaterol, Mabutero, Terbutalina, Brombuterol y otros. También se determina por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) con detector ultravioleta, cuya sensibilidad es buena, pero podría ser mejorada. Por lo que la intención de este estudio es realizar ensayos buscando la formación de un derivado fluorescente que incremente la sensibilidad en la determinación de residuos de clenbuterol y su identificación por CLAR con detector de fluorescencia.

2.10 HIPÓTESIS

El clenbuterol puede ser determinado por Cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de fluorescencia al formar un derivado con el Cloruro de Benzoilo ó con Ortoftaldialdehido, que permitirá incrementar la sensibilidad y especificidad en comparación con los métodos de ELISA y Cromatografía de Líquidos Alta Resolución con detector ultravioleta.

2.11 OBJETIVOS

General

1. Implementar la metodología instrumental diferencial para la determinación de los derivados fluorescentes del clenbuterol con los reactivos OPA y Cl de Benzoilo.

Específicos

1. Realizar pruebas para obtener la máxima longitud de onda del Clenbuterol, Cl de benzoilo, OPA y sus respectivos derivados. Con esto se obtendrá el espectro de emisión óptimo de los compuestos y sus agentes derivatizantes en una amplia gama de longitudes de onda.
2. Realizar ensayos analíticos por Cromatografía en Capa Fina y Fluorometría para obtener un derivado fluorescente del clenbuterol con el Cl de benzoilo y OPA y poder establecer las mejores condiciones para cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)
3. Identificar y cuantificar el clenbuterol en: hígado, músculo y retina de muestras positivas a clenbuterol por ELISA y por CLAR-UV después de la formación de los derivados fluorescentes con CLAR- FLUORESCENCIA.

MATERIAL Y METODOS

3. MATERIAL Y METODOS

A continuación se presenta un diagrama (Figura 6), en el cual se muestra el curso de los ensayos realizados en este estudio.

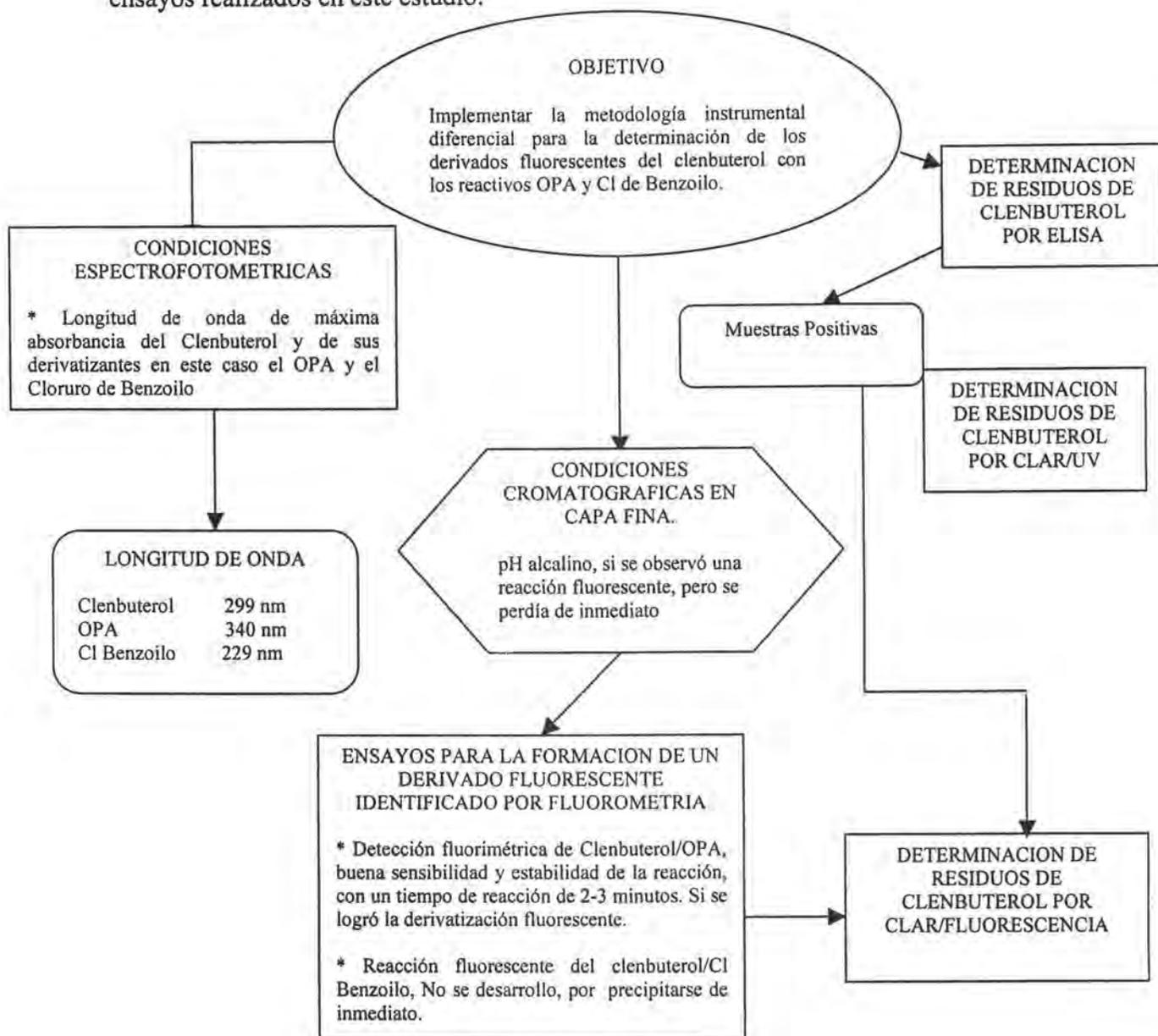


Figura 6.- Cronología de ensayos para la formación e identificación del derivatizado del clenbuterol con el OPA y con el Cl-benzoilo

Con el objeto de poner en evidencia la formación del derivado fluorescente por la reacción entre el Clenbuterol con el Cl-benzoilo y el Clenbuterol con el Orthoftaldialdehido (OPA), se realizaron los siguientes ensayos, donde se consideraron las posibilidades de efecto del pH y la temperatura. El compuesto esperado de la reacción del Clenbuterol con OPA y con Cl Benzoilo, es la formación de un compuesto fluorescente.

3.1 Ensayos para la identificación de las características espectrofotométricas de los componentes de la reacción para la formación del derivatizado del clenbuterol

Pruebas: se usa para obtener la longitud de onda de máxima absorbancia del clenbuterol y de sus derivatizantes en este caso con el OPA y el Cl-Benzoilo.

La exploración de la longitud de onda para cada compuesto, donde el espectro de excitación esta representado por una gráfica de la intensidad luminiscente observada en un punto de luminiscencia máxima en función de la longitud de onda de emisión de la muestra. Esta se consigue al hacer que el espectrofotómetro explore a intervalos de cada 5 nm desde 190 hasta 600 nm; con esto se obtendrá el espectro de emisión de los compuestos y sus agentes derivatizantes en una amplia gama de longitudes de onda (Fessenden., 1994).

Se empleó un espectrofotómetro para luz ultravioleta y visible y exploración en el rango de 190-600 nm. En este se les midieron la longitud de onda cada 5 nm: al Clenbuterol químicamente puro, a la mezcla de una cantidad constante de clenbuterol y cantidades decrecientes de Cl-Benzoilo y OPA, y de sus respectivos derivados. Se utilizaron dos soluciones para disolver los compuestos:

- a) **Solución A:** Mezcla de acetonitrilo-fosfato de potasio al 0.02M (25:75, v/v) ajustado a un pH de 2.8 con ácido ortofosfórico. El eluato fue degasificado cuidadosamente con helio, filtrándose previamente con un flujo de 1 ml/min.

- b) **Solución B:** Mezcla de: metanol, acetonitrilo y fosfato de sodio; en una relación 25:25:50, v/v. El fosfato de sodio al 0.005 M, ajustado a un pH de 9.3 con tetraborato de sodio al 0.05M.

Para calibrar el espectrofotómetro, se utilizaron ambas soluciones. Posteriormente, fueron analizadas las siguientes muestras:

- a) Clenbuterol
- b) Ortoftaldialdehído
- c) Cloruro de Benzoilo
- d) Clenbuterol + Ortoftaldialdehido
- e) Clenbuterol + Cloruro de Benzoilo
- f) Clenbuterol derivatizado
- g) Ortoftaldialdehido derivatizado y Clenbuterol + Ortoftaldialdehido derivatizado en una relación mol/mol.

3.2 Ensayos para la formación e identificación de las condiciones en cromatografía de capa fina del derivatizado del clenbuterol

La Cromatografía de Capa Fina, (CCF) es un procedimiento que se utiliza para separar moléculas relativamente pequeñas, es decir, la idea básica es la separación de los componentes de una mezcla. Este procedimiento se llevó a cabo con la finalidad de identificar los compuestos que se aplicaron en la placa: Clenbuterol, OPA, Cl de Benzoilo y sus derivatizantes.

a) Reactivos.

Los reactivos empleados en la CCF fina fueron: estándar de clenbuterol químicamente puro, placas CCF RP-18F254s silicagel fase inversa; silicagel 60-G, silicagel 60-H fase normal. Se preparó la fase móvil con buffer de fosfato: acetonitrilo: metanol; variando el pH gradualmente de ácido a alcalino (4-9) y la concentración de las disoluciones.

b) Muestras aplicadas en la Cromatoplaça.

* **Solución A:** La Solución A, consta de estándar de Clenbuterol a una concentración de 3.5 mg/25 ml.

* **Solución B:** Esta compuesta de una solución de OPA.

* **Solución C:** Es una solución derivatizada la cual se preparó con 100 µl de Clenbuterol y 100 µl de OPA (relación 1:1). Ambos compuestos se mezclaron y se pusieron a calentar a 40° C durante 10 minutos.

* **Solución D:** Es una solución derivatizada la cual se preparó con 100 µl de Clenbuterol y 100 µl de OPA (relación 1:1). Ambos compuestos se mezclaron y se aplicaron a temperatura ambiente.

* **Solución E:** Esta formada por OPA sobre una aplicación previa de Clenbuterol; ambas se aplicaron directamente en la placa a temperatura ambiente; con el fin de lograr la derivatización *in situ*.

c) Condiciones Cromatográficas de capa fina

Se utilizaron las siguientes fases móviles, en tres diferentes tipos de placas (fase estacionaria). (1) Placas 60-H silicagel, (2) Placas 60-G silicagel fase normal y (3) Placas RP-18F254s silicagel fase-inversa. En la primera placa se utilizó la primera fase móvil, en la segunda placa se utilizó la segunda fase móvil mientras que en la última placa se utilizó la tercera, cuarta, quinta y sexta fases móviles.

* **Fase móvil 1:** consiste en una mezcla de tolueno: etil acetato: acetona: 3:2:1, v/v.

* **Fase móvil 2:** consta de una mezcla de cloroformo: metanol: 80:20 v/v con un pH alcalino (9.3)

* **Fase móvil 3:** consiste en una mezcla de acetonitrilo-fosfato de potasio al 0.02M (25:75, v/v) ajustado a un pH de 2.8 con ácido ortofosfórico. Esta fue degasificada cuidadosamente con helio filtrándose previamente con un flujo de 1ml/min.

* **Fase móvil 4:** consta de una mezcla de acetonitrilo-fosfato de sodio al 0.005 M (50:50, v/v) ajustado a un pH de 9.3 con tetraborato de sodio al 0.05M.

* **Fase móvil 5:** consta de una mezcla de metanol: acetonitrilo: fosfato de sodio; 25:25:50, v/v, con un pH alcalino (9.3).

* **Fase móvil 6:** compuesta de una mezcla de metanol: acetonitrilo: fosfato de sodio; 35:15:50, v/v, con un pH alcalino (9.3).

d) Desarrollo de la Cromatoplaça

En una placa de vidrio de 20 X 20 cm, recubierta con una fase estacionaria se aplicó una muestra a un centímetro del borde en uno de los extremos de la placa con 5 µl de solución A y paralelamente una muestra del mismo volumen de las soluciones B, C, D y E.

El desarrollo de la placa se hizo en una cámara hermética con fase móvil líquida (eluyente) formada por distintos compuestos polares (se describen abajo) en una relación mol/mol. La fase móvil, asciende por la placa y arrastra las moléculas, las cuales se moverán según la afinidad que muestren por la fase móvil y/o estacionaria. Los compuestos migraran como bandas a una distancia de equilibrio entre las fases. La identificación de la reacción se obtiene observando la placa con luz UV. Finalmente se procede a la identificación de los analitos por comparación de las distancias recorridas por los mismos con las de los patrones. Para ello se utiliza un parámetro que es el r_F o factor de retraso.

3.3 Ensayos para la formación e identificación del derivado fluorescente entre el clenbuterol con el OPA y con el Cl-benzoilo, por Fluorometria

El desarrollo e identificación de los compuestos formados en los ensayos para la formación de un derivado fluorescente se llevaron a cabo con clenbuterol, OPA y Cl-benzoilo, en un Fluorometro (sistema cerrado). Las lecturas de la reacción se tomaron cada 15 segundos durante 30 minutos. Las longitudes de onda excitación/emisión que se utilizaron fue de 336/455 nm. Las muestras se trabajaron a temperatura ambiente.

a) Cloruro de Benzoilo: a cada muestra se le adicionó 3 ml de buffer de fosfato (PO₄), 300 µl de estándar de Clenbuterol (3.5 mg/25 ml) y 1 ml de Cl Benzoilo, obteniendo al mezclarse un rango de pH 2.0-2.5.

b) Ortoftaldialdehido: a cada muestra se le adicionó 3 ml de buffer de fosfato (PO₄), 300 µl de estándar de Clenbuterol (3.5 mg/25 ml) y 1 ml de OPA, obteniendo al mezclarse un rango de pH 9.0-10.0. Para la interpretación, las lecturas dadas en transmitancia se cambiaron a logaritmo, para su interpretación.

3.4 Determinación de las concentraciones de clenbuterol por ELISA

Se determinó la concentración de clenbuterol en hígado, músculo y retina de bovino, mediante un ensayo inmuno-enzimático competitivo (ELISA) (R-Biopharm, 1996). Las muestras que ya se habían identificado como positivas fueron proporcionadas por el Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal (CENAPA), se identificaron y se llevaron al Laboratorio de Toxicología, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, donde se les volvió a aplicar esta prueba para confirmar los resultados. Para músculo se tomaron 2 g de muestra finamente molida y se sometieron al proceso de extracción ácida descrito por Sporano et al., (1998). La muestra se suspendió por duplicado, en 8 ml de una solución de HCl 0.1 N y se homogenizó durante 30 s. Seguidamente, se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min. Tomando 20 µl del sobrenadante para el ensayo. Para hígado y retina se tomaron 5 g de muestra y se sometieron al proceso de extracción descrito en el boletín técnico #5 de Neogen "Procedimientos de extracción para clenbuterol". Junto con las muestras se corrieron soluciones estándar de clenbuterol con concentraciones de 0, 100, 300, 900, 2700 y 8100 ppt, para obtener la curva estándar. Al finalizar la reacción inmuno-enzimática, las placas se leyeron en un lector ELISA a 450 nm. El límite de detección del método utilizado es de 40 ppt en músculo e hígado y de 200 ppt en retina. El porcentaje de recuperación de clenbuterol en las muestras control positivo fue del 90%.

3.5 Ensayos para identificar la concentración de clenbuterol por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) con detectores de luz ultravioleta y visible

a) Aparatos

El sistema cromatográfico consta de una bomba binaria modelo serie 200 equipado con un automuestreador. La separación cromatográfica se llevó a cabo sobre una columna C8 (250 X 4.6 mm I.D). La detección se desarrolló con el Detector de Arreglo de Diodos ultravioleta/visible, el extracto se degasificó en línea con helio, se filtró con membrana de nylon de 0.044 μm , escaneado en el rango de 190-350 nm; conectado a una estación de trabajo, usando software Total Chrom v. 5.1 e impresora.

b) Condiciones Cromatográficas

El método de extracción utilizado para esta técnica en músculo, hígado y retina es descrito por González, et al (1996). Una vez terminado el proceso de extracción, las muestras se resuspendieron en 1 ml de fase móvil bufferada. La fase móvil sobre la que se partió consiste en una mezcla de acetonitrilo en buffer de fosfato de potasio al 0.02 M (25:75, v/v) ajustado a un pH de 2.8 con ácido ortofosfórico (González et al 1996). Posteriormente se empezó a variar el pH de la mezcla gradualmente de 2.8-9.3. Las condiciones de pH y concentración de buffer que se probaron fueron las siguientes:

- Fosfato de potasio al 0.02 M (25:75, v/v); pH 2.8
- Fosfato de potasio al 0.02 M (25:75, v/v); pH 4.0
- Fosfato de potasio al 0.02 M (25:75, v/v); pH 6.0
- Fosfato de potasio al 0.02 M (25:75, v/v); pH 8.0
- Fosfato de potasio al 0.02 M (25:75, v/v); pH 8.5
- Fosfato de potasio al 0.02 M (25:75, v/v); pH 9.3

Las longitudes de onda fueron de 336 y de 455 nm (excitación/emisión). La lectura se tomó a los 10 minutos, y el volumen de inyección fue de 30 μl . A continuación, se colocó en el

automuestreador una alícuota de 30 μ l de estándar de clenbuterol químicamente puro (0.007 mg/ml), para construir la curva de calibración y 30 μ l de cada muestra procesada.

3.6 Determinación de la concentración de Clenbuterol por Cromatografía Líquida de Alta Resolución con detector de Fluorescencia

a) Aparatos

El sistema cromatográfico consta de un sistema isocrático. La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna C₈ (250 X 4.6 mm I.D); la derivatización postcolumna se realizó mediante una bomba isocrática conectada con una T a la salida de la columna y antes del detector con un serpentín de 45 cm. La detección se desarrolló con el detector de Fluorescencia, explorando en el rango de 336-455 nm (excitación/emisión); conectado a una estación de trabajo, usando software Total Chrom v. 5.1 e impresora.

b) Condiciones Cromatográficas

La fase móvil consiste en una mezcla de acetonitrilo en buffer de fosfato de potasio al 0.02M (25:75, v/v) ajustado en un rango de pH de 4.8 a 8.0. Este se degasificó con un sistema de helio en línea, con filtro de membrana de 0.044 μ m (González et al 1996).

c) Procedimiento

El método de extracción utilizado para esta técnica en músculo, hígado y retina es descrito por González, et al (1996). Una vez terminado el proceso de extracción, las muestras se resuspendieron en 1 ml de fase móvil bufferada y se congelaron a -20°C hasta su análisis. Se inyectó una alícuota de 20 μ l de estándar de clenbuterol (0.007 mg/ml) en un sistema CLAR con un tiempo de corrida de 10 minutos. Las condiciones fueron 336-455 nm (excitación/emisión). El desarrollo del método se basa en la reacción de derivatización del grupo amino primario con Ortoftaldialdehído en la presencia de 2-mercaptoetanol; obteniendo un producto fluorescente. El límite de detección para CLAR-Fluorescencia se estableció a la cantidad mínima detectable mediante el método de adición.

El método fluorimétrico con inyección-flujo para determinar clenbuterol usando una reacción de OPA-mercaptopetanol (ME) se describe en la Figura 7.

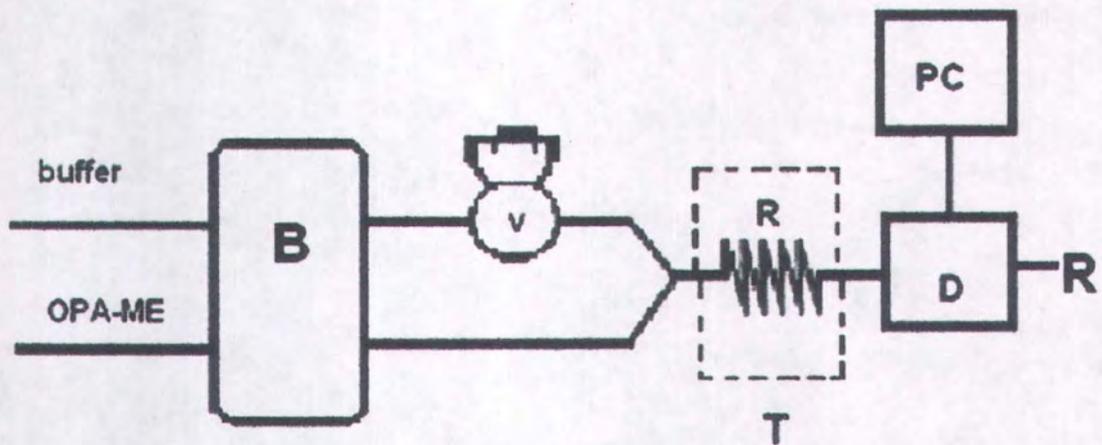


Fig. 7. Método Fluorimétrico con Inyección-Flujo para determinar Clenbuterol usando una reacción de OPA-ME. (B) Bomba peristáltica, Flujo 1.0 ml/min; (V) Válvula de inyección (muestra 20 μ l); (R) Serpentin; (T) Termostato a 25°C; (D) Detector de Fluorescencia, 336/455 nm (excitación/emisión); (PC) Computadora; (R) Residuo.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

Todos los ensayos realizados en este estudio se llevaron a cabo entre el clenbuterol, el Cloruro de Benzoilo y el Ortoftaldialdehído. La refracción del clenbuterol con el OPA fue positiva, pero con el cloruro de benzoilo se formo un precipitado sin lograr la reacción esperada; de esta forma todos los ensayos se desarrollaron entre el OPA y el clenbuterol.

4.1 Identificación de las características espectrofotometricas de los componentes de la reacción para la formación del derivado del clenbuterol

En el Cuadro 1 se observa la longitud de onda obtenida para cada compuesto químicamente puro y sus respectivas derivatizaciones. Asimismo, en las Figuras 8 a la 12 se presenta la longitud de onda de los compuestos químicamente puros y sus derivatizaciones correspondientes.

Cuadro 1. Máxima Absorbancia del Clenbuterol, OPA, Cl de Benzoilo y sus derivatizaciones

Máxima absorbancia del compuesto en solución	
COMPUESTO	LONGITUD DE ONDA (absorbancia)
CLENBUTEROL	210.1 nm
ORTOFTALDIALDEHIDO	203.2 nm
CLORURO DE BENZOILO	303 nm
Máxima absorbancia del compuesto derivatizado	
COMPUESTO	LONGITUD DE ONDA (absorbancia)
CLENBUTEROL + OPA	201.8 nm
CLENBUTEROL + Cl BENZOILO	285.1 nm

Al concluir la exploración de longitud de onda de los compuestos se obtuvo la absorbancia máxima y mínima del Clenbuterol, OPA y Cl de Benzoilo y sus respectivos derivatizados.

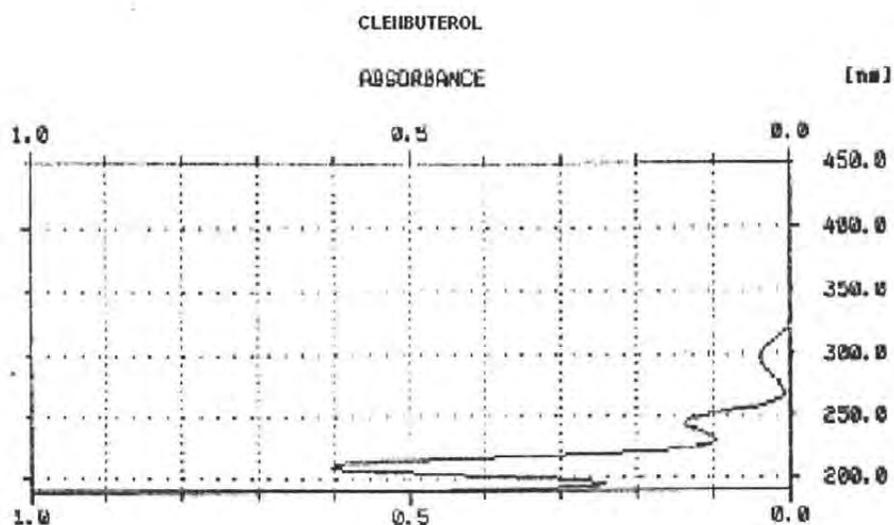


Figura 8. Longitud de Onda del Clenbuterol. Máxima y mínima absorbancia (210.1 nm y 195.7 nm) para este compuesto. En este barrido se utilizó la primera fase móvil. Relación 1:1



Figura 9. Longitud de onda del Cloruro de Benzoilo. Absorbancia máxima de 303.0 nm y una mínima de 191.0 nm. En este barrido se utilizó la primera fase móvil. Relación 1:10

CLENBUTEROL + CLORURO DE BENZOILO

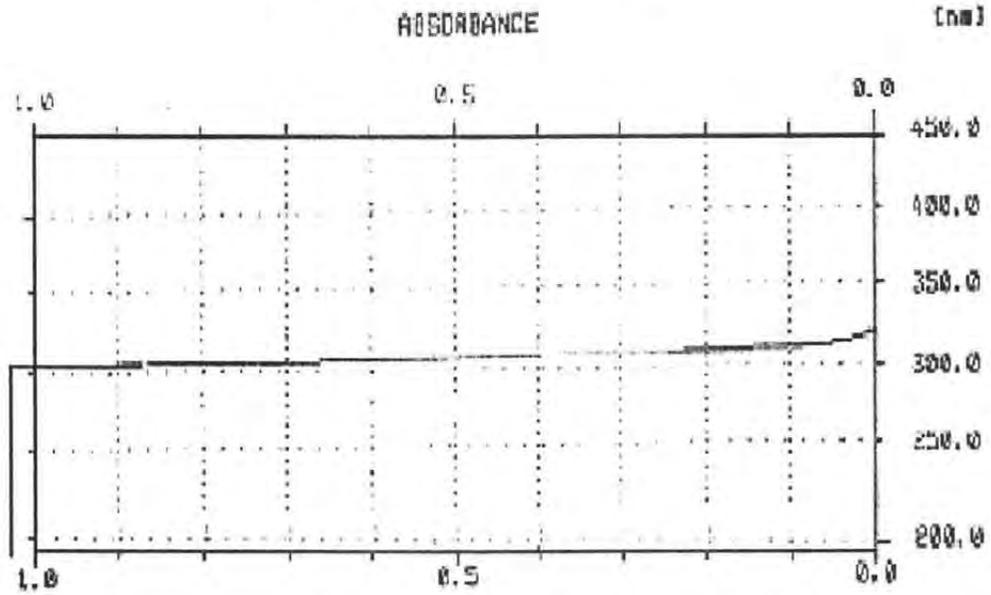


Figura 10. Longitud de onda del Clenbuterol + Cloruro de Benzoilo. Absorbancia máxima de 285.1 nm y una mínima de 190.7 nm. En este barrido se utilizó la primera fase móvil. La relación del derivatizado es 3:10

ORTOFTALDIALDEHIDO

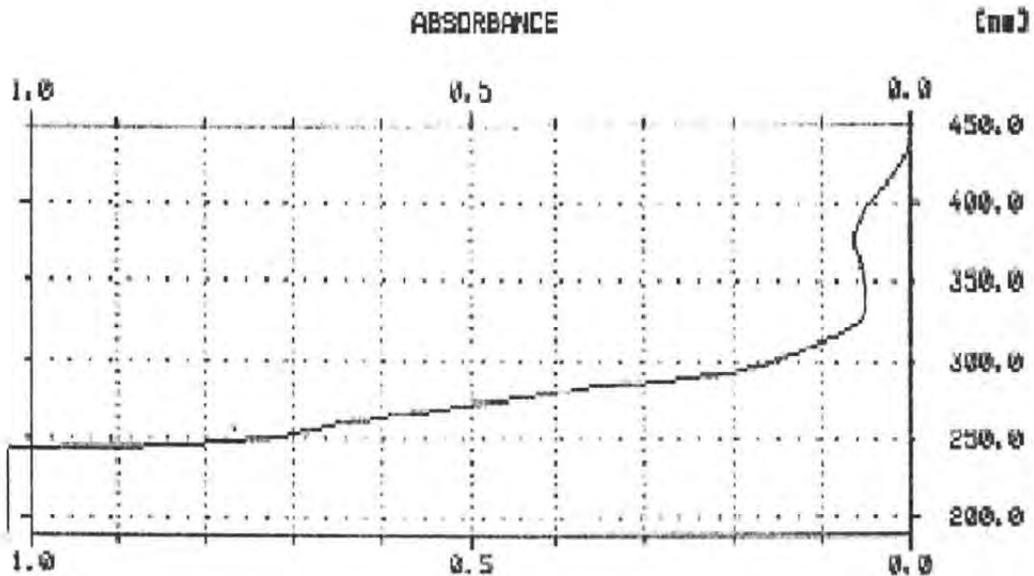


Figura 11. Longitud de onda del Ortoftaldialdehido. Esta figura, presenta una absorbancia máxima de 203.2 nm y una mínima de 192.3 nm. En este barrido se utilizó la primera fase móvil. Relación 1:1

CLENBUTEROL + ORTOFTALDIALDEHIDO

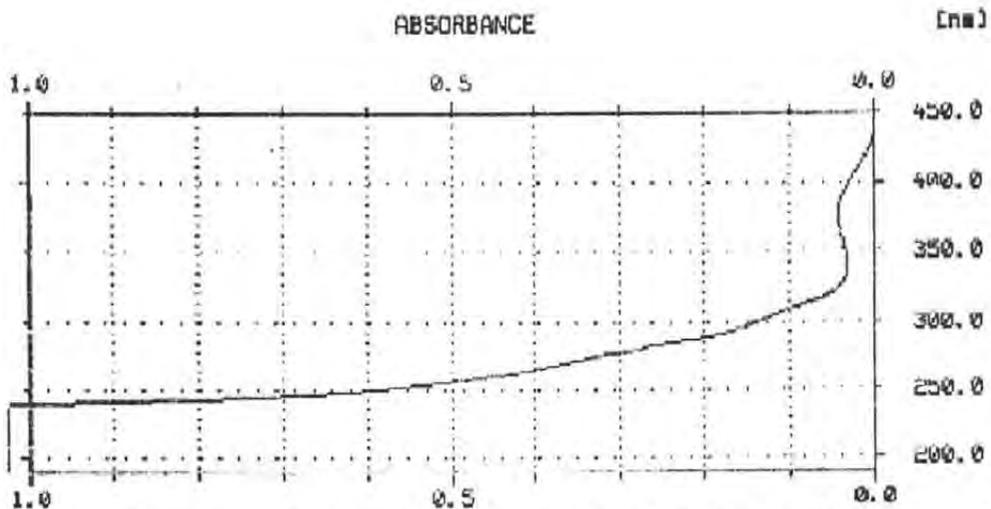


Figura 12. Longitud de onda del Clenbuterol + Ortoftaldialdehido. La absorbancia máxima de este derivatizado es de 201.8 nm y la mínima de 190.9 nm. En este barrido se utilizó la primera fase móvil. La relación 1:1.

En este estudio se observó que la longitud de onda se modifica cuando se mezcla el clenbuterol con el derivatizante, en este caso con el OPA y el Cl de benzoilo. De este modo, se siguió trabajando en la afinación de las cantidades de OPA, Cl de benzoilo y clenbuterol para obtener una relación óptima para el desarrollo fluorescente.

4.2 Identificación de las condiciones en cromatografía de capa fina (CCF) del derivado del clenbuterol con el OPA

En el análisis por cromatografía de capa fina se observó un compuesto fluorescente con un r_F de solo unos milímetros (5 mm) y con una duración de 20 segundos (Figura 14).

Cuando las placas se eluyeron a un pH ácido (acetonitrilo: fosfato de potasio), no se observó la separación de los compuestos (Figura 13). Sin embargo, cuando se cambió el pH de la fase móvil (metanol: acetonitrilo: fosfato de sodio) de ácido a alcalino (9.3), se observó la separación de los compuestos (Figura 14).

Los resultados obtenidos en el presente análisis no reflejan una buena sensibilidad de la CCF. Por lo que posterior a la CCF, se decidió desarrollar ensayos para la formación de un derivado fluorescente en un Fluorómetro (sistema cerrado) cambiando las condiciones de trabajo, principalmente el pH de ácido (2.8) a alcalino (9-10).

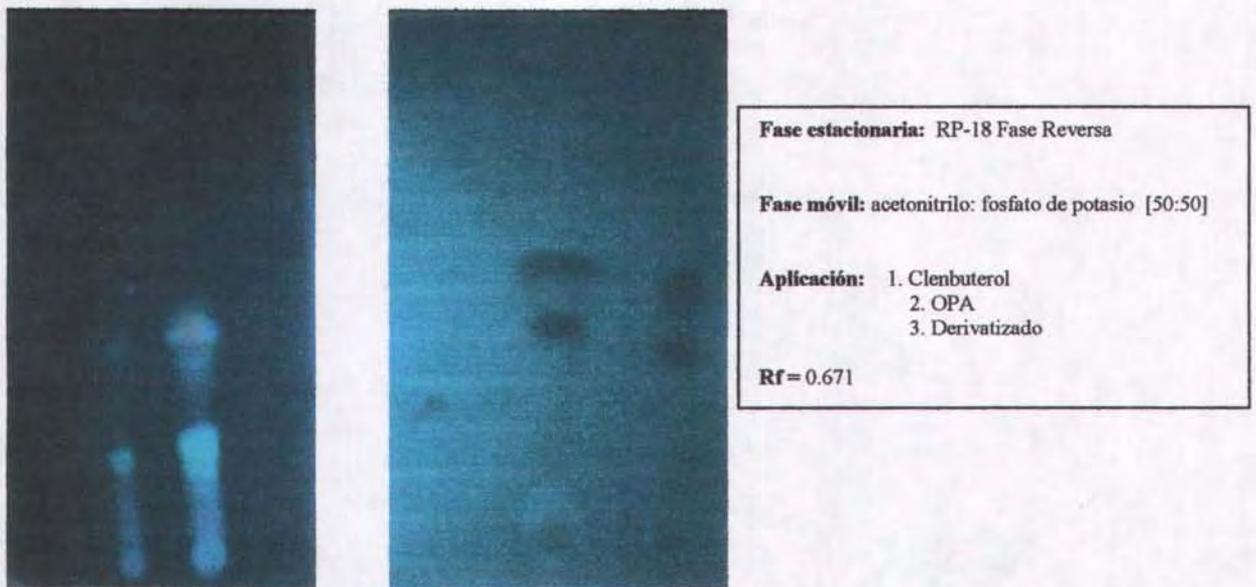
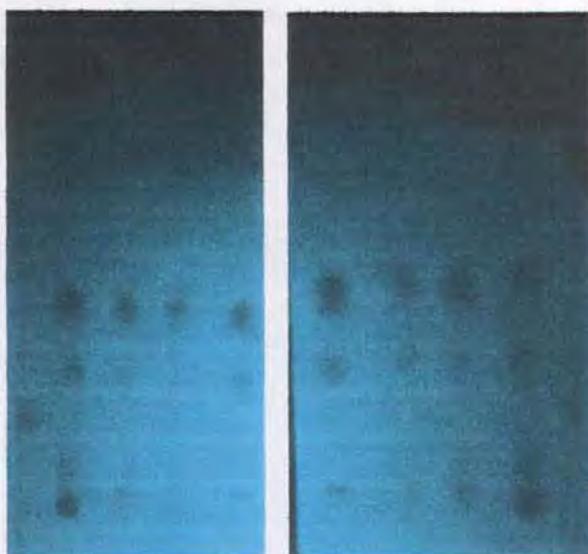


Figura 13. Cromatoplasas eluidas a pH ácido (2.8).



Fase estacionaria: RP-18 Fase Reversa

Fase móvil: metanol: acetonitrilo: fosfato de sodio [25:25:50]

Aplicación:

1. Clenbuterol
2. OPA
3. Derivatizado (clenbuterol + OPA) a 40° C
4. Derivatizado a temperatura ambiente
5. Clenbuterol + OPA aplicados directamente en la placa

R.f = 0.426

Figura 14. Cromatoplasas eluidas a pH alcalino (9.3).

4.3.- Identificación del derivado fluorescente del Clenbuterol por Fluorometria

Por el método de fluorometría se identificó el derivatizado del clenbuterol con OPA. Los ensayos para la formación del derivado fluorescente se llevaron a cabo con OPA y Cl Benzoilo, en un Fluorómetro a un pH alcalino (9-10).

La Figura 15, muestra el comportamiento Fluorimétrico entre el Clenbuterol/OPA, esta reacción fue pH dependiente, y se llevó a cabo a temperatura ambiente. En las muestras se observa una buena sensibilidad y estabilidad de la reacción, además se identificó un tiempo de reacción de 2-3 minutos, después de este tiempo la reacción fue disminuyendo hasta perderse por completo. En la Figura 16, se observa el mismo comportamiento de Clenbuterol/OPA, ambas gráficas solo difieren en que a estas muestras se le agregaron 600 µl de un patrón de Clenbuterol, y a las muestras de la Figura 15, se les agregó sólo 300 µl. Además el pH fue un factor crítico, influenciando la sensibilidad, por lo cual este efecto fue cuidadosamente considerado. Por lo tanto, sí se logró la derivatización fluorescente del

grupo amino primario del clenbuterol con el OPA en la presencia de 2-mercaptoetanol. Por otra parte, la reacción fluorescente del clenbuterol con Cl Benzoilo, no se desarrolló, porque el reactivo se presentaba muy inestable y se precipitaba de inmediato como se observa en la Figura 17.

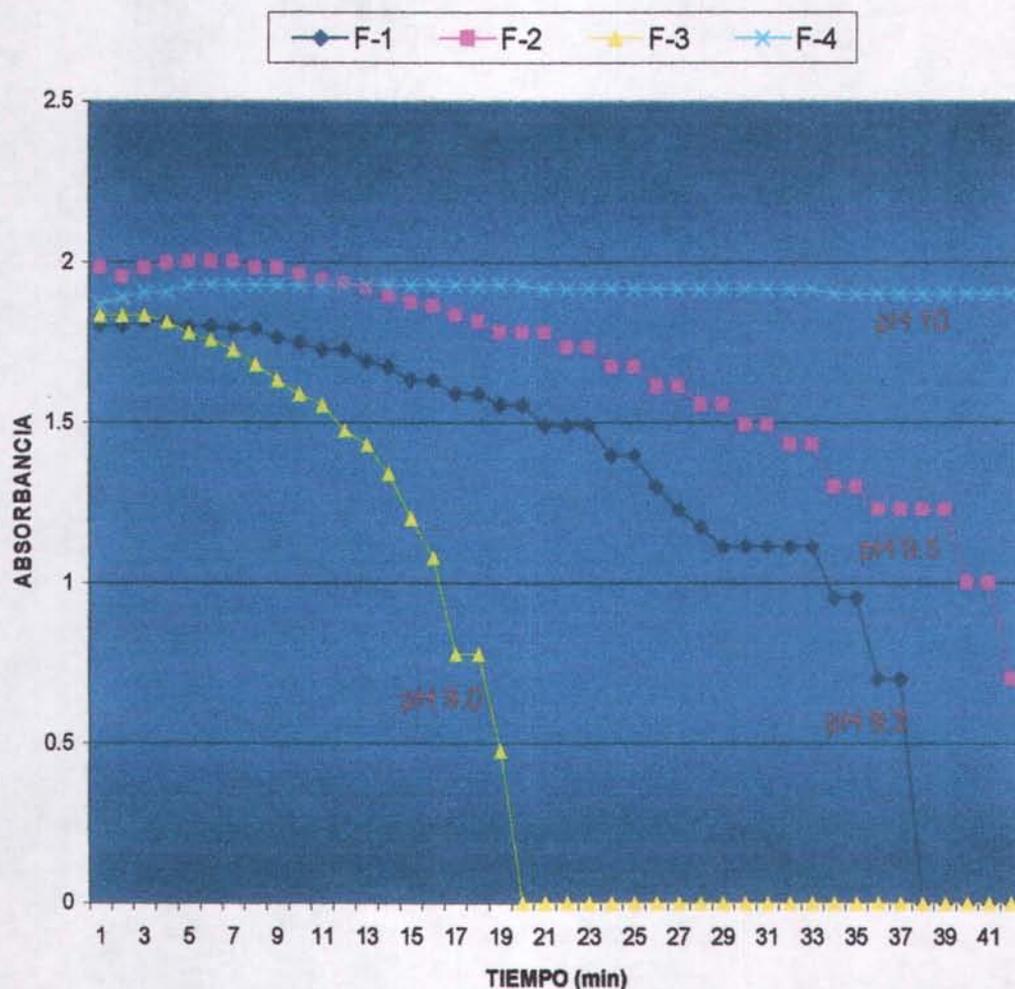


Figura 15. FLUOROMETRIA (F) DEL DERIVATIZADO ENTRE EL CLENBUTEROL / OPA pH DEPENDIENTE Y A TEMPERATURA AMBIENTE

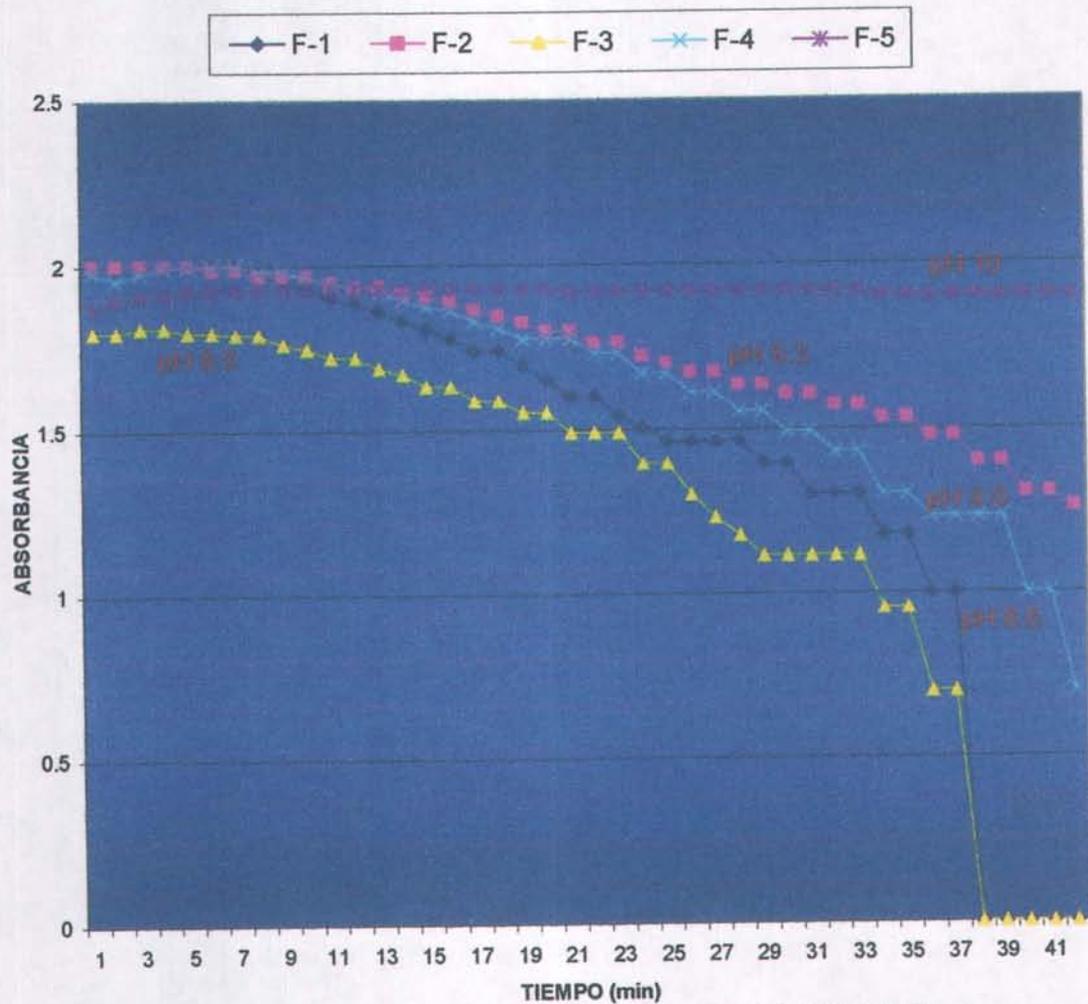


Figura 16. FLUOROMETRIA (F) ENTRE EL CLENBUTEROL / OPA
pH DEPENDIENTE A TEMPERATURA AMBIENTE

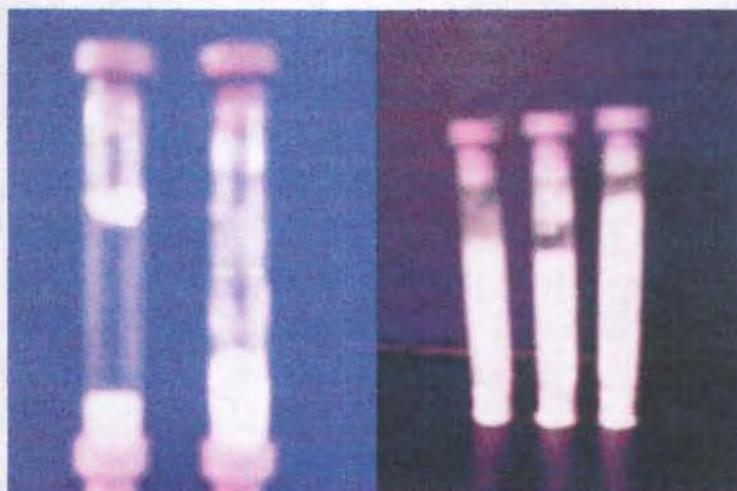


Figura 17. Precipitación del Cloruro de Benzoilo al mezclarse con clenbuterol y buffer de fosfato.

4.4 Determinación de las concentraciones de residuos de clenbuterol por ELISA

Se logró confirmar la identificación del clenbuterol por ELISA en muestras de hígado, retina y músculo de otro laboratorio, donde ya se habían identificado como positivas.

Se detectó clenbuterol en todas las muestras analizadas (Cuadro 1), en niveles que fueron de 607.9 a 10,335.9 ppt en hígado; de 467.9 a 33,101.7 ppt en retina y de 5248 ppt en músculo respectivamente. Estos valores superan las 40 y 200 ppt de clenbuterol permitidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1998) como límite máximo de residuos para hígado, retina y músculo correspondientemente.

Cuadro 1. Concentración de Clenbuterol por ELISA en hígado, retina y músculo de bovino.

Muestra	Concentración clenbuterol (ppt)	Muestra	Concentración clenbuterol (ppt)	Muestra	Concentración clenbuterol (ppt)
*H-025	5,025.2	**R-057	26,658.3	***M-1	5248
H-028	5,163.4	R-061	32,553.8	M-2	5248
H-629	5,225.2	R-1752	7,274.9	M-105	0.0
H-630	4,890.5	R-1756	33,101.7		
H-631	4,150.8	R-2690	0.0		
H-632	5,113.4	R-2695	0.0		
H-634	6,404.7	R-2727	533.1		
H-635	3,821.7	R-2740	467.9		
H-1644	2,842.3	R-2831	30,081.5		
H-1649	10,335.9	R-2834	31,555.2		
H-2240	3,948.0	R-2838	14,077.4		
H-2826	3,375.5	R-2840	30,081.0		
H-2827	607.9	R-2842	14,725.8		
H-2828	671.2				

*H = Hígado

**R = Riñón

***M = Músculo

En este ensayo ELISA permitió la detección de muestras positivas a la presencia de clenbuterol, de acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, el uso del ensayo ELISA demostró ser confiable en la repetición del experimento con las muestras que dieron resultado positivo, por lo tanto puede recomendarse su uso como un método analítico rápido y efectivo para la detección de clenbuterol en muestras de hígado y otros tejidos de especies animales destinadas al consumo humano. Sin embargo al no ser una prueba específica para el clenbuterol, debido a que los anticuerpos de esta prueba muestran reacciones cruzadas con la epinefrina, la norepinefrina y con otros β -agonistas (salbutamol, Terbutalina etc.); se recomienda la confirmación de los resultados por métodos analíticos más exactos, como la Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

4.5 Identificación de la concentración de residuos de clenbuterol por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) con detectores de luz ultravioleta y visible

Por el método de cromatografía de líquidos de alta resolución con detector ultravioleta se obtuvieron los siguientes resultados. En la Figura 18 se muestra un cromatograma de estándar de clenbuterol. La corrida del espectro del pico corresponde al tiempo de retención del clenbuterol (2.24 min. con una Columna C₈) lo cual nos indica su identidad (característica máxima de 299 nm). Este cromatograma se creó para identificar el clenbuterol químicamente puro y observar su comportamiento solo y en la muestra. La Figura 19 muestra un cromatograma de un extracto de hígado con adición de estándar de clenbuterol (50 µl/g de hígado). El tiempo de retención del clenbuterol fue de 2.44 minutos. En la Figura 19 se observa un ligero corrimiento del estándar de clenbuterol con respecto al estándar solo, lo que nos indica que el clenbuterol se está comportando de forma diferente cuando es adicionado a la muestra.

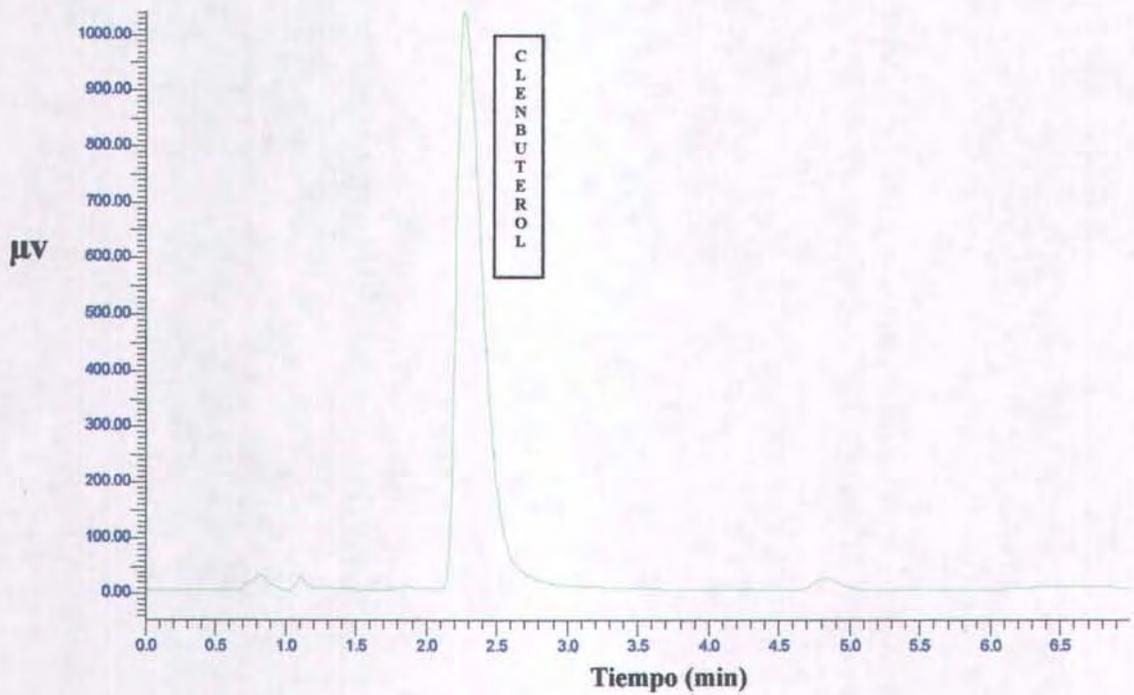


Fig. 18. Tiempo de retención (2.5 min.) del clenbuterol por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con luz Ultravioleta

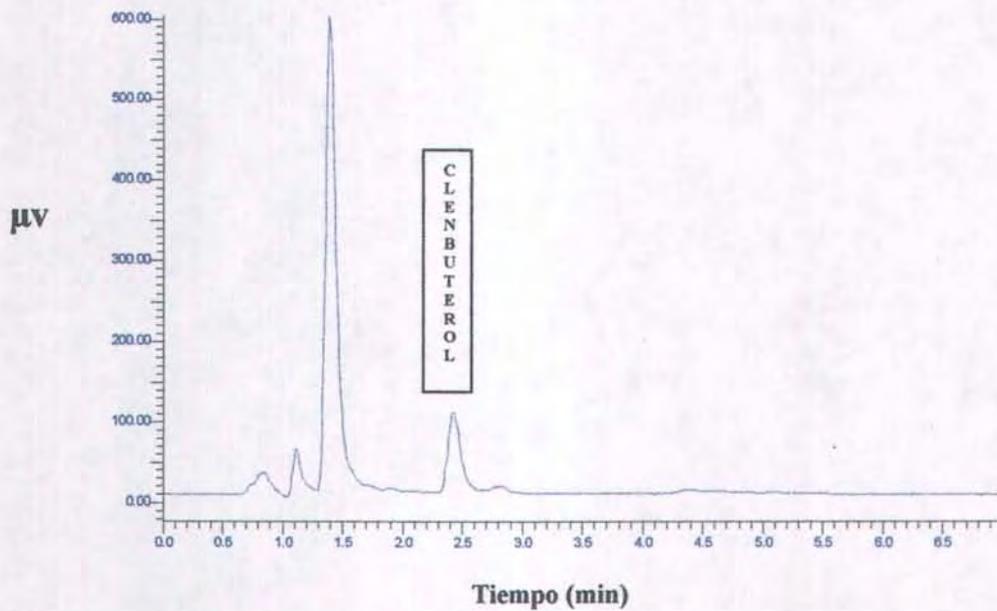


Fig. 19 Tiempo de retención (2.44 min) de un extracto de hígado con adición de estándar de clenbuterol (50 $\mu\text{l/g}$ de hígado), por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con luz Ultravioleta

El cromatograma de la Figura 20 presenta un extracto de músculo con adición de estándar de clenbuterol (50 μ l/g de músculo). El tiempo de retención del clenbuterol fue de 2.40 minutos, muy similar al de la muestra de hígado con adición de clenbuterol. El porcentaje de recuperación de clenbuterol en esta muestra fue de 45.22 %. En esta Figura se observa que el tiempo de retención del clenbuterol en músculo es casi idéntico al que se está presentando en hígado.

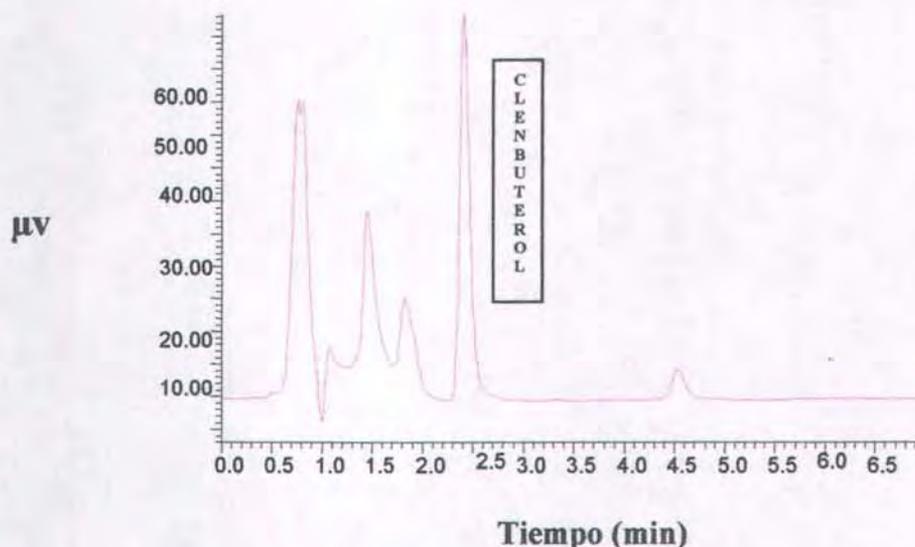


Fig. 20 Tiempo de retención (2.5 min) de un extracto de músculo con adición de estándar de clenbuterol (50 μ l/g de músculo), por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con luz Ultravioleta

Al finalizar, la inyección de todas las muestras bajo las condiciones cromatográficas ya referidas se construyó una curva de calibración y se calculó el límite de detección del método CLAR-UV el cual fue de 4 ng/30 μ l. Asimismo, se obtuvo un porcentaje de recuperación del 40%, a partir de la utilización de un método de adición en una muestra. Se observó que CLAR-UV, no tiene los niveles de detección de ELISA.

4.6 Determinación de la concentración de Clenbuterol por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) con detector de Fluorescencia

La secuencia de la reacción es importante; se obtuvieron mejores resultados analíticos mezclando OPA y ME antes de la adición del clenbuterol (amina). De igual manera se probaron varios ensayos para obtener la configuración óptima. Se obtuvieron buenos resultados usando un sistema cromatografico como se muestra en la Figura 21.

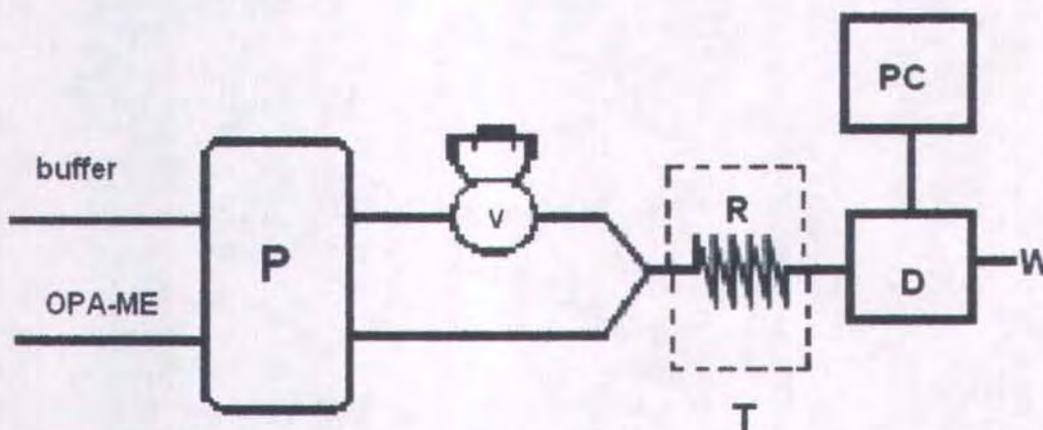


Figura 21. Método Fluorimetrico con Inyección-Flujo para determinar Clenbuterol usando una reacción de OPA-ME. (P) Bomba peristáltica, Flujo 1.0 ml/min; (V) Válvula de inyección (muestra 20 μ l); (R) Serpentin; (T) Termostato a 25°C; (D) Detector de Fluorescencia, 336/455 nm (excitación/emisión); (PC) Computadora; (W) Residuo.

4.6.1 Optimización de las variables Químicas

Los parámetros experimentales fueron optimizados para obtener una máxima fluorescencia. El pH fue un factor crítico, influenciando la sensibilidad, por lo cual este efecto fue cuidadosamente considerado. La intensidad de la fluorescencia fue monitoreada en función del pH, usando diferentes soluciones de fosfato-buffer de borato, con un pH de entre 4 a 9.3. La solución de OPA fue preparada usando las mismas soluciones de buffer. En la Figura 22 se observó que la fluorescencia no aparece debajo de un pH de 8.0, mientras que el incremento del pH a 9.3 produce una fluorescencia ligera; por lo que este valor fue señalado como óptimo.

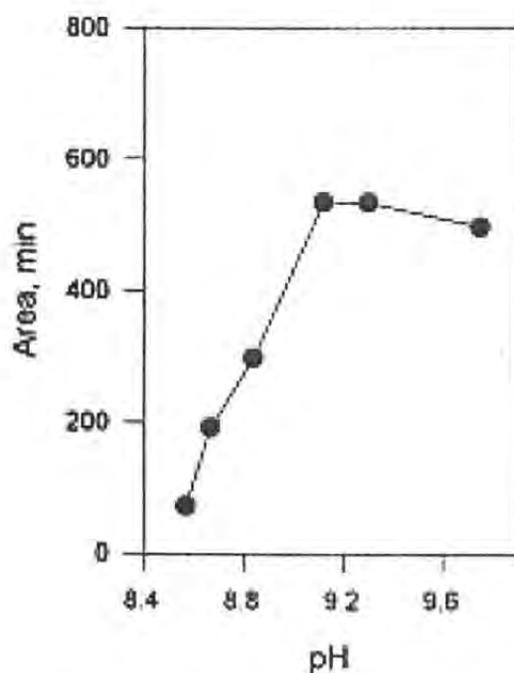
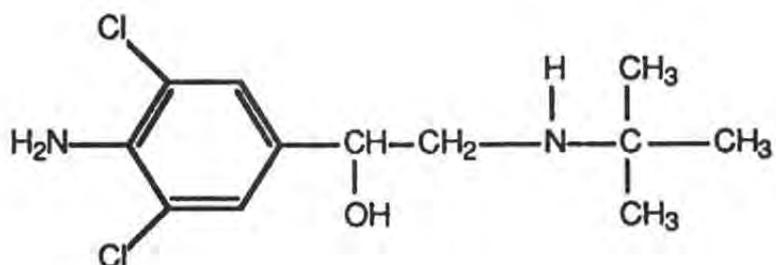


Figura 22. Influencia del pH, sobre la intensidad de fluorescencia. Clenbuterol inyectado 20 μ l/ml

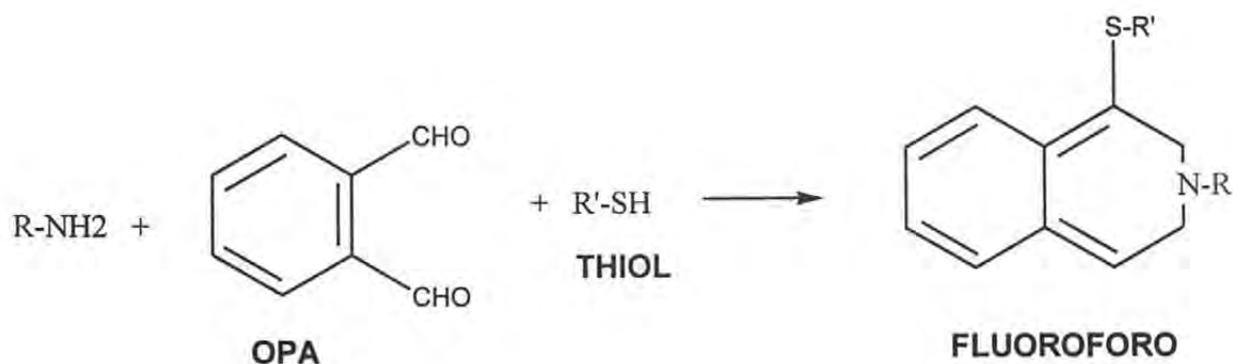
4.6.2 Derivatización del Clenbuterol

El clenbuterol es una amina simpaticomimética (β -agonista), con la siguiente estructura:

CLENBUTEROL



El mecanismo propuesto para explicar la reacción del clenbuterol con el OPA (en presencia de 2-mercaptoetanol) se describe a continuación en una reacción hipotética:



Para la detección fluorescente del grupo amino se utilizó el reactivo OPA en combinación con un compuesto thiol, que fue el 2-mercaptoetanol. La amina aromática observada en la reacción con un sustituyente como es el grupo metil o un anillo aromático *orto* se encargó de derivatizar el grupo funcional amino.

El efecto del ME fue muy importante al añadirse al OPA porque en la ausencia de este thiol, la fluorescencia prácticamente no existía.

La falta de interferencia a partir del área de las muestras con clenbuterol en el cromatograma y la detección de fluorescencia del clenbuterol a $\lambda_{ex} = 336 \text{ nm}$ y $\lambda_{em} = 455 \text{ nm}$ garantizan alta selectividad del método. La probabilidad de que otros compuestos desarrollen propiedades fluorescentes a esta excitación y emisión y a $\text{pH} = 9.3$ es muy bajo.

Por el método de cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de fluorescencia se obtuvieron los siguientes resultados. En la Figura 23 se muestra un cromatograma de estándar de clenbuterol. La corrida del espectro del pico corresponde al tiempo de retención del clenbuterol (4 min. con una Columna Cs). Este cromatograma se creó para identificar el clenbuterol químicamente puro y observar su comportamiento solo y en la muestra. La Figura 24 muestra un cromatograma de un extracto de hígado con adición de estándar de clenbuterol (50 $\mu\text{l/g}$ de hígado). El tiempo de retención del clenbuterol fue de 4.5 minutos. En la Figura 24 se observa un ligero corrimiento del estándar de clenbuterol con respecto al estándar solo, lo que nos indica que el clenbuterol se está comportando de forma diferente cuando es adicionado a la muestra.

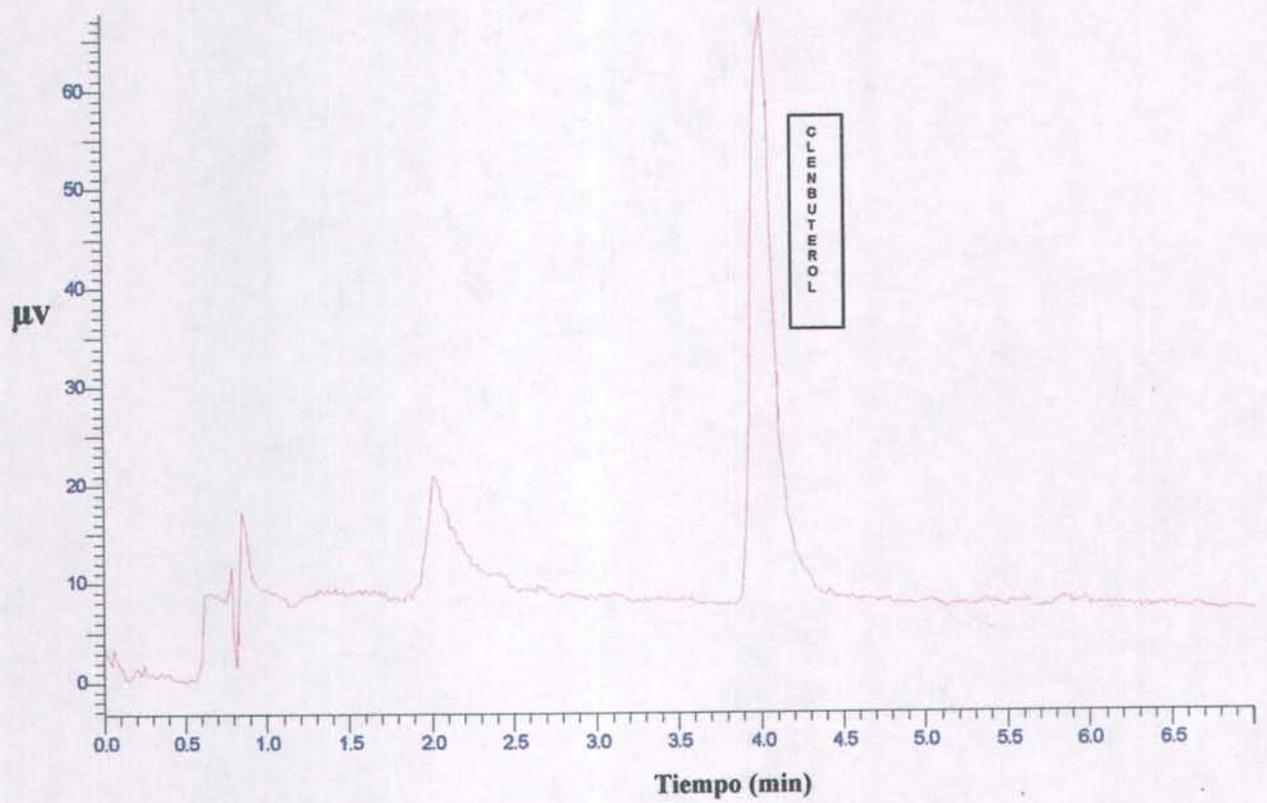


Fig 23. Cromatograma de Estándar de Clenbuterol por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con detector de Fluorescencia.

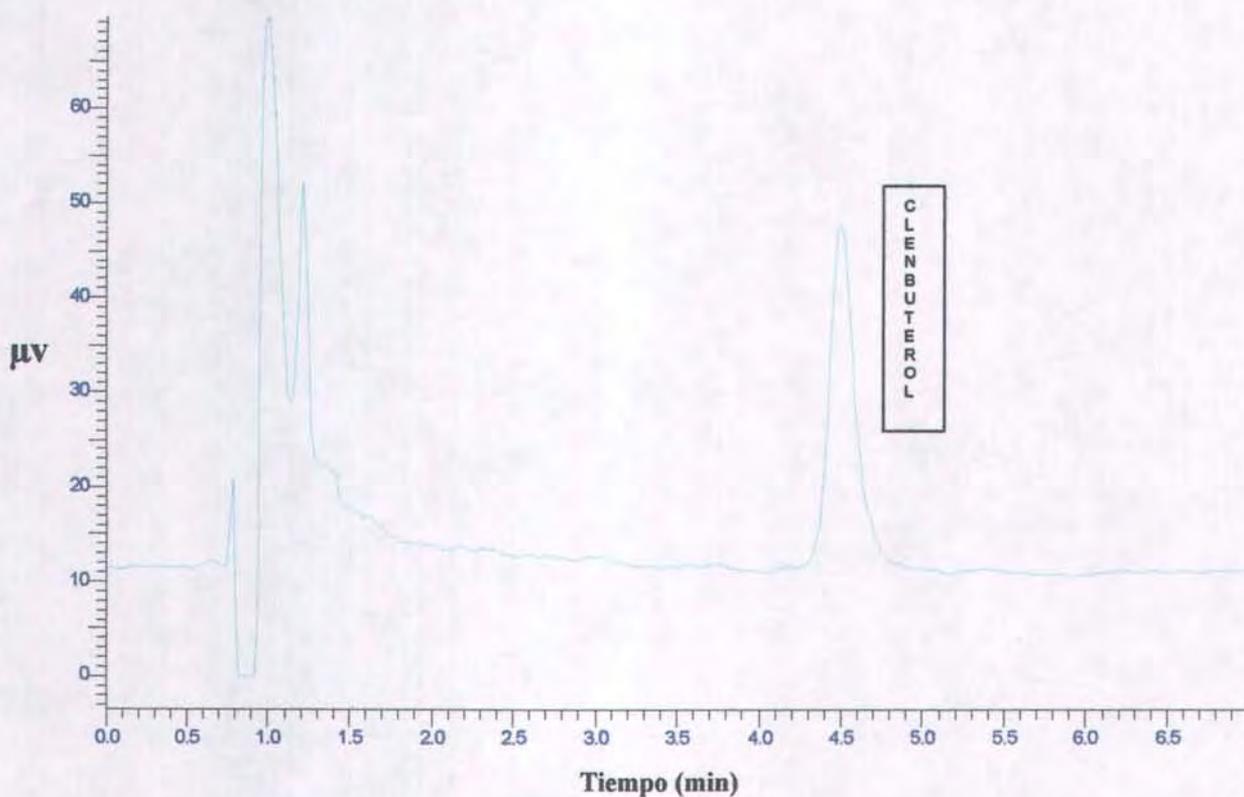


Fig 24. Cromatograma de extracto de Hígado con Clenbuterol por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con detector de Fluorescencia.

Al finalizar, la inyección de las muestras bajo las condiciones cromatograficas ya referidas se construyó una curva de calibración y se calculó el límite de detección del método CLAR-Fluorescencia el cual fue de 7 ng/30 µl. Asimismo, se obtuvo un porcentaje de recuperación del 70%, a partir de la utilización de un método de adición en una muestra. Se observó que CLAR-Fluorescencia, presenta un límite de detección y un porcentaje de recuperación mayor a CLAR-UV.

Finalmente se elaboró un cuadro (Cuadro 2) que muestra la sensibilidad, especificidad y costo de cada método descrito en este estudio. Se observa que la cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia es una prueba que puede utilizarse con buenos resultados para la determinación de residuos de clenbuterol con suficiente especificidad. Se observa que ELISA es un método superior a otros métodos respecto a costos.

Cuadro 2. Descripción de la sensibilidad, especificidad y costo de los métodos evaluados en este estudio.

MÉTODO	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD	COSTO
CCF	BAJA	ALTA	BAJO
FOTOMETRIA	MEDIA	MEDIA	BAJO
CLAR-UV	ALTA	ALTA	ALTO
CLAR-FLUORESCENCIA	ALTA	ALTA	ALTO
ELISA	MEDIA	BAJA	BAJO

CCF = Cromatografía de Capa Fina

CLAR-UV = Cromatografía Líquida de Alta Resolución con detector ultravioleta

CLAR-Fluorescencia = Cromatografía Líquida de Alta Resolución con detector de Fluorescencia

ELISA = Prueba de Enzimoimmunoanálisis

DISCUSIÒN

5. DISCUSIÓN

Exploración de la Longitud de Onda

El barrido se realizó con la finalidad de ver la longitud de onda de los compuestos en su estructura original; exploración que según Miller (1988), Pickering (1976); Abbott y Andrews 1973, cada componente de una solución tiene su patrón de absorción de luz, característico. Comparando la longitud de onda y la intensidad del máximo de absorción de luz de una muestra versus soluciones Standard, es posible determinar la identidad y la concentración de componentes disueltos en la muestra (solución incógnita) como se hizo en este estudio con el Clenbuterol, Ortoftaldialdehído y Cloruro de Benzoilo. Browning (1971); Gouw (1972) y Giddings (1965), mencionan que las ventajas que presenta la espectrofotometría sobre otros métodos analíticos de laboratorio son las que siguen: es rápida, precisa, versátil, fácil de usar, eficiente y barata en costo.

Ralph y Joan Fessenden (1994), mencionan que la base de la espectrofotometría es que muchas sustancias tienen color propio, o pueden dar lugar a productos finales coloreados en ciertas reacciones químicas, en este estudio se utilizó un compuesto que fluoresce por sí mismo como lo es el Ortoftaldialdehído, compuesto químico utilizado en este estudio.

Determinación del derivatizado del clenbuterol con el OPA por cromatografía en capa fina

Tal y como afirma Segura y De la Torre (1992), el método para separar un agente tóxico de la matriz en la cual está embebido está relacionado con las características del mismo, el desafío está en separar el agente tóxico con pureza y cantidad suficientes para permitir caracterizarlo y cuantificarlo. Los métodos para separación desde hace mucho han planteado un gran reto para los toxicólogos analíticos. El mismo autor sostiene, que las sustancias orgánicas no volátiles, tales como fármacos prescritos, sustancias ilegales (clenbuterol), plaguicidas, productos naturales, etc., son sólidos o líquidos y los

procedimientos de separación por lo general se fundamentan en extracciones diferenciales, sea líquido-líquido o sólido-líquido. Estas extracciones con frecuencia no son eficientes, y la recuperación de la sustancia tóxica desde la matriz puede ser inadecuada. Dentro de las técnicas analíticas, la cromatografía de capa fina (CCF) es un método ampliamente sugerido en la literatura por su sensibilidad y gran especificidad. En este sentido, Lillsunde y col., (1991), establecieron que el límite de detección de la CCF para una gran variedad de drogas es de 1 mg/ml o menos.

La cromatografía en capa fina como la describen Bauer, et al., 1991, permite la separación de los componentes de una muestra por su solubilidad entre la fase estacionaria o sólida y la fase móvil o líquida que pueden estar en una mezcla, su identificación de acuerdo al tiempo de retención y su cuantificación al apreciar la intensidad de la banda del compuesto. Por la aplicación en las placas, en este estudio se determinó que el grado de arrastre de las sustancias depende de su solubilidad, en las fases. En este estudio se observa, que después de arrastrar y revelar una sustancia pura en el cromatograma, el compuesto de interés se observa como una mancha bien definida ya sea a simple vista o por la reacción con algún revelador, en este caso se utilizó luz Ultravioleta para poder observar el recorrido del compuesto. Y cuando se analizan sustancias complejas o mezclas, cada componente aparece en el trayecto del cromatograma de acuerdo a su solubilidad en la fase móvil. En el análisis por cromatografía de capa fina se observó un compuesto fluorescente como una mancha bien definida con un r_F de solo unos milímetros y con una duración de 20 segundos.

Además se observó que esta técnica es especialmente útil para la separación de pequeñas cantidades de sustancias, como también hace referencia y describe Domínguez (1975). Se trata fundamentalmente de una cromatografía basada en un fenómeno de adsorción (equilibrio de adsorción entre un sólido estacionario y una fase líquido móvil), aunque pueden estar presentes simultáneamente otros fenómenos físicos que determinan parcialmente la separación cromatográfica (Götz, et al., 1980; Zlatkis y Kaiser, 1977). La

separación es rápida; las manchas o bandas obtenidas son muy compactas y es posible por lo tanto detectar compuestos a concentraciones muy bajas (Touchstone, et al., 1983).

Identificación del derivado fluorescente por Fluorometría

En este estudio los ensayos para la formación de un derivado fluorescente se llevaron a cabo con OPA y Cl Benzoilo, en un Fluorómetro con un pH alcalino (9-10). En las muestras se observa una buena sensibilidad y estabilidad de la reacción, además se identificó un tiempo de reacción de 2-3 minutos. Ralph y Joan Fessenden (1994), mencionan que la sensibilidad es una ventaja considerable de la fluorimetría respecto a la espectrofotometría.

Por otra parte, la reacción fluorescente del clenbuterol con Cl Benzoilo, no se desarrolló, porque el reactivo se presentaba muy inestable y se precipitaba de inmediato. Wang, et al., 1999, describe que el cloruro de benzoilo es mutagénico y genotóxico. Además se descompone rápidamente con el calor y en contacto con los álcalis, los alcoholes y las aminas. Reacciona violentamente con los oxidantes fuertes y con el agua.

Por otra parte Osajda y Mlochowski (2002), mencionan que aunque todos los cloruros de ácido experimentan la hidrólisis ácida y alcalina para dar los ácidos carboxílicos, las velocidades de reacción varían. Un cloruro de ácido, que tiene un grupo alquilo voluminoso unido al grupo carbonilo, reacciona más lentamente que otro cloruro de ácido con un grupo alquilo pequeño, lo cual coincide con lo observado en este estudio ya que el cloruro de benzoilo, es muy estable por los dobles enlaces que tiene y aunque si puede haber una resonancia entre el clenbuterol y el cloruro, el cloro que tiene este último es muy fuerte entonces es muy difícil que presente color.

Análisis de la concentración de residuos de clenbuterol por ELISA

Se detectó clenbuterol en todas las muestras analizadas en niveles que fueron de 607.9 a 10,335.9 ppt en hígado; de 467.9 a 33,101.7 ppt en retina y de 5248 ppt en músculo respectivamente. Estos valores superan las 40 y 200 ppt de clenbuterol permitidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1998) como límite máximo de residuos para hígado, retina y músculo correspondientemente. Además estas cifras constituyen un indicador del peligro potencial para la salud que representa el empleo del clenbuterol como promotor de crecimiento en el ganado bovino en México.

Según los estudios de la OMS, la ingestión máxima diaria de clenbuterol no debe sobrepasar los 0.004 $\mu\text{g}/\text{kg}$ peso corporal, para evitar la ocurrencia de signos clínicos asociados con la intoxicación. Con base en esta información, la cantidad máxima que puede ingerir una persona adulta de 60 kg de peso, sería de 0.24 μg mientras que los límites máximos de residuos correspondientes en ganado bovino son 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en músculo y 0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en hígado y riñones.

Los niveles más altos de clenbuterol en músculo (5248 ppt) que se detectaron en el presente trabajo, resultan muy inferiores a los encontrados en carne de bovino involucrada en varios casos de intoxicación colectiva asociados con el clenbuterol, en los que la droga se detectó en niveles entre 0.8 y 7.4 ppm (Sporano, et al., 1998) y 1.14 ppm (Brambilla, et al., 2000). Pérez (2002), establece un límite máximo de residuos en bovinos que es de 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en músculo, y 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en hígado y riñón, límites que están por debajo de los encontrados en este trabajo.

Este ensayo ELISA permitió la detección rápida de muestras positivas a la presencia de clenbuterol; de acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, el uso del ensayo demostró ser confiable en la repetición del experimento con las muestras que dieron resultado positivo, sin embargo ELISA es una prueba no específica, esto es que proporciona la detección no solo del clenbuterol sino de otros β -agonistas como lo es el

salbutamol, la terbutalina, el zilpaterol entre otros. Por otra parte se demostró que se puede utilizar como una prueba de rutina para determinar las posibles muestras contaminadas y posteriormente confirmar los resultados a través de pruebas más específicas como los métodos de Cromatografía Líquida de Alta Resolución, los cuales de acuerdo con Meyer et al., (1991), Gleixner, et al., (1996), y Boyd, et al., (1996), son una herramienta útil para realizar la diferenciación de los diferentes compuestos β -agonistas.

Determinación de residuos de clenbuterol por cromatografía de líquidos y detector con luz ultravioleta

Son pocos los métodos reportados en la literatura que hacen referencia a la determinación de clenbuterol. García, et, al., 2004, menciona que hay diversas técnicas para la determinación de β -agonistas (clenbuterol), como la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) con detector ultravioleta o detección electroquímica. En este estudio la que se utilizó fue CLAR- ultravioleta. La CLAR- UV, es un método que se aplicó para la determinación del clenbuterol en diferentes matrices como hígado, músculo y retina.

Generalmente para la determinación de β -agonistas por la técnica de CLAR, se utilizan las columnas de fase-reversa debido a la interacción hidrofóbica de las moléculas con las fases estacionarias de la C8 o C18 (Boyd, et al., 1996), mismas que se utilizaron para la realización de este estudio. Además este mismo autor menciona que el clenbuterol se ha medido por CLAR con detector ultravioleta a una longitud de onda de 222 y 245 nm; lo cual no hace referencia a la longitud de onda de este trabajo (longitud de onda del clenbuterol químicamente puro 299 nm).

Al observarse en este estudio que la CLAR-UV no proporciona la sensibilidad suficiente para la determinación de clenbuterol se recurre a una alternativa; que es cambiar el detector ultravioleta a fluorescente; ya que este detector confiere una ventaja adicional de selectividad para la detección de clenbuterol. La sensibilidad de este método varía pero se ha reportado un límite de detección de 1 ppb (Boyd, et al., 1996).

La identidad del clenbuterol fue verificada por CLAR-UV. Las altas concentraciones de este compuesto en hígado, músculo y retina fueron identificadas en los cromatogramas correspondientes. (Dürsch y Meyer, 1992), mencionan que el clenbuterol puede ser separado de otros compuestos eficientemente por CLAR-UV, como fue el caso de este trabajo. Asimismo, afirman que la combinación de técnicas CLAR/ELISA puede facilitar la identificación del analito en caso de tener muestras sospechosas aún después de haberle realizado uno de estos métodos de forma individual y previo a la confirmación final.

Determinación de residuos de clenbuterol por Cromatografía Líquida de Alta Resolución y detector de Fluorescencia

Los métodos fluorescentes como se observó en este estudio y como lo describe López-Eroz, et al., (2000), proporcionan ventajas en el análisis farmacéutico debido a sus excelentes límites de detección, su selectividad y su fácil combinación con otras técnicas.

La secuencia de la reacción obtenida es importante; se obtuvieron mejores resultados analíticos mezclando OPA y ME antes de la adición del clenbuterol (amina). De igual manera se probaron varios ensayos para obtener la configuración óptima. En este estudio, los parámetros experimentales fueron optimizados para obtener una máxima fluorescencia. El pH fue un factor crítico, influenciando la sensibilidad, por lo cual este efecto fue cuidadosamente considerado. La intensidad de la fluorescencia fue monitoreada en función del pH, usando diferentes soluciones de fosfato-buffer de borato, con un pH de entre 4 a 9.3. La solución de OPA fue preparada usando las mismas soluciones de buffer. En la Figura 22 se observó que la fluorescencia no aparece debajo de un pH de 8.0, mientras que el incremento del pH a 9.3 produce una fluorescencia ligera; por lo que este valor fue señalado como óptimo. Estos resultados son semejantes a los que reporta Viñas, et., al 1998.

Para la detección fluorescente del clenbuterol (aminas), el reactivo OPA se uso generalmente en combinación con un compuesto thiol, usualmente 2-mercaptoetanol. De

acuerdo con Stoev y Michailova (2000), el OPA es un reactivo fluorogénico específico para aminas aromáticas primarias la cual produce fluoróforos de alta fluorescencia y potencial selectivo teniendo características de excitación-emisión similares ($\lambda_{ex} = 395-410$ nm y $\lambda_{em} = 490-510$ nm); en este estudio la excitación/emisión utilizadas fueron de: 336/455 nm. Lo anterior coincide con lo que especifica Adur, et al., (1998), una sustancia fluorescente (fluoróforo) absorbe luz de una determinada longitud de onda (su espectro de excitación) y la emite a otra longitud de onda más larga (su espectro de emisión). Por lo tanto, cuando es iluminada a su longitud de excitación y observada a través de un filtro que solo permite pasar luz con la longitud de onda de la luz emitida, la sustancia aparecerá brillante sobre un fondo oscuro generando así una imagen de alto contraste. La intensidad y el color de la luz emitida son característicos de la molécula fluorescente.

Como lo describe Ichinose, et al (1998), para la detección fluorescente en cantidades de picomol de aminas primarias, el reactivo OPA es usado comúnmente en combinación con un thiol, usualmente el 2-mercaptoetanol. Las aminas aromáticas con un substituyente como es el grupo metil o un anillo aromático *orto* derivatizan el grupo funcional amino.

El efecto del ME fue muy importante al añadirse al OPA porque en la ausencia del thiol, la fluorescencia prácticamente no existe. Viñas, et al., 1998, mencionan que la fluorimetría es útil particularmente en el análisis de la droga, y la no fluorescencia de muchos compuestos ha estimulado el desarrollo de reactivos los cuales ayudan a la formación de derivados fluorescentes. Los métodos fluorescentes presentan ventajas debido a su excelente límite de detección, su selectividad y la posibilidad de combinarse con técnicas de inyección de flujo en métodos automáticos o semiautomáticos usando instrumentación económica.

La falta de interferencia a partir del área de las muestras con clenbuterol en el cromatograma y la detección de fluorescencia del clenbuterol a $\lambda_{ex} = 336$ nm y $\lambda_{em} = 455$ nm garantizan alta selectividad del método. La probabilidad de que otros compuestos desarrollen propiedades fluorescentes a esta excitación y emisión y a pH = 9.3 es muy bajo.

CONCLUSIÒN

6. CONCLUSIONES

Independientemente de si el clenbuterol en grandes cantidades puede o no afectar la salud pública, es evidente que el uso de un fármaco prohibido por las autoridades de un país, para cualquier fin en la producción pecuaria representa un delito y como tal deberá tipificarse y castigarse.

Es obligación del veterinario procurar la producción de productos de origen animal de alta calidad, lo que incluye la vigilancia de un nivel de residuos de fármacos acorde a los estándares internacionales (*Codex Alimentarius*, FDA, Comunidad Europea, etc.). No obstante, es justo aclarar que el clenbuterol no es especialmente peligroso para el ser humano; con un retiro adecuado, los residuos de clenbuterol dejan de ser un peligro. El presente trabajo demostró que el clenbuterol puede ser determinado con buena sensibilidad usando un procedimiento muy simple basado sobre la derivatización fluorescente de la droga con el reactivo Ortoftaldialdehído en la presencia de un thiol como lo es el 2-mercaptoetanol. Los resultados obtenidos permiten postular que este procedimiento debe ser usado como método de análisis del clenbuterol en la industria veterinaria como análisis cuantitativo. Al verificar la identidad del clenbuterol por CLAR-Fluorescencia, se observó que las concentraciones de este compuesto en hígado, músculo y retina fueron identificadas con buena selectividad. CLAR-Fluorescencia muestra buena sensibilidad y es más selectiva que con detector ultravioleta.

Además de acuerdo con estos resultados concluimos que la CCF no se puede aplicar como ensayo presuntivo o de screening en el análisis de clenbuterol.

Se propone que se siga trabajando, dado que se incrementa la sensibilidad con un derivado fluorescente, además es importantísimo que se siga desarrollando un método de separación ya que la fase reversa utilizada en este estudio no fue la adecuada por las características de pH y por lo tanto, de ionización de nuestro compuesto que no eran separados adecuadamente en el sistema propuesto originalmente. También se propone seguir

trabajando en la formación de compuestos fluorescentes, porque estos son una excelente alternativa para la determinación de clenbuterol en muestras orgánicas.

Podemos concluir que la técnica ELISA de competición, es un método rápido, sensible y fiable para la detección de clenbuterol, aunque no es específica. Las características de esta técnica permiten el análisis de un número elevado de muestras simultáneamente y la obtención de resultados en un corto espacio de tiempo, por lo que la hacen eficaz para su utilización como método de *screening* en el control del empleo de clenbuterol que asegure una carne libre del mismo para los consumidores.

LITERATURA CITADA

7. LITERATURA CITADA.

- 1.- Abbott, D. y Andrews, R. S. Introducción a la Cromatografía. 3ra. Edición. Colección Exedra. Editorial Alhambra. España. 1973.
- 2.- Adur, F. J; Balducci F. D; García J. C; García J; Vilá José F; Izaguirre M. F. y Casco, Víctor. 1998. Laboratorio de Microscopia.
- 3.- Alpizar, S. O; F, Pérez; G. E. Ávila; S. V. Valles; C. C. López y L. C. Ocampo. 1993. Efecto de un agonista β -adrenergico en la alimentación de pollos de engorda. Veterinaria México. 24 (1), 37-41.
4. - Bauer, K; L. Gros and W. Sauer. Thin Layer Chromatography: An Introduction. Hüthig Verlag. Germany. 1991.
5. - Blass, A; J.C. Illera,; G. Silvan y M. Illera.. 1998. Cinética del anabolizante clenbuterol en plasma medida mediante ELISA. Invest. Agri. Prod. Sanid. Anim. 13 (1, 2 y 3), 135-144.
6. - Boyd, D. and M. O' Keeffe. 1994. Matrix solid-phase dispersion as a multiresidue extraction technique for β -agonists in bovine liver tissue. The Analyst. 119, 1467-1470.
7. - Boyd, D; M. O' Keeffe and M. R. Smyth. 1996. Methods for the determination of β -agonists in biological matrices. A Review. The Analyst. 121, 1R-10R.
8. - Brambilla, G. T; Cenci; F. Franconi; R. Galarini; A. Macri; F. Rondoni; M. Strozzi and A. Loizzo. 2000. Clinical and Pharmacology profile in a clenbuterol epidemic poisoning of contaminated beef meat in Italy. Toxicology Letters. 114:47-53.
9. - Browning, D. R. Cromatografía-Toray-Masson. España. 1971.
- 10.- Cajal, M. C. y A. R. Álvarez. 2002. El lado positivo del uso de clenbuterol en ganadería, como broncodilatador y tocolítico. Simposium Internacional sobre Beta-agonistas y su uso en Medicina Veterinaria. 29 y 30 de Julio.
- 11.- Domínguez, X. A. Cromatografía en Papel y en Capa Delgada. Serie de Química. Organización de los Estados Americanos. N° 16. U.S.A. 1975.
- 12.- Dürsch, I. and H. H. D. Meyer. 1992. A Multi-residue Enzyme Immunoassay for Screening illegary used β -agonists. Food Agr Immunol. 4, 211-218.

13. - Elliot, T. C; J. D. G. McEvoy, W. J. McCaughey, D. H. Shortt and S. R. H. Crooks. 1993. Effective laboratory monitoring for the abuse of the beta-agonist clenbuterol in cattle. *The Analyst*. 118, 447-448.
14. - Elliot, T. C; J. W. Mc Caughey, H. R. S. Crooks, G. D. J. McEvoy and G. D. Kennedy. 1995. Residues of Clenbuterol in Cattle Receiving Therapeutic Doses: Implications for Differentiating Between Legal and Illegal Use. *Veterinary Quarterly*. 17, 100-102.
15. - Elliot, T. C; H. R. S. Crooks and J. W. McCaughey. 1995a. Development of a rapid Screening Test to Detect β -Agonist Residues in Bovine Eye and Hair. *Vet Record*. 137, 643-644.
16. - Elliot, C. T; J. D. McEvoy; W. J. McCaughey; S. R. H. Crooks and S. A. Hewitt. 1995b. Improved detection of the β -agonist clenbuterol by analysis of retina extracts. *Vet Record*. 132, 301-302.
- 17.- Elliot, C. T; C. S. Thompson; Cor. J. M. Arts; S. R. H. Crooks; M. J. van Baak; E. R. Verheij and G. A. Baxter. 1998. Screening and confirmatory determination of ractopamine residues in calves treated with growth promoting doses of the β -agonist. *The Analyst*. 123, 1103-1107.
- 18.- Fessenden, R. J. and J. S. Fessenden. *Química Orgánica*. 1994. Edit. Iberoamericana. México, D.F. Pp.71-79.
19. - Flores, H. O; J. L. M. Delgadillo y E. F. Ontiveros. 2002. Técnicas analíticas para β -agonistas. *Simpusium Internacional sobre Beta-agonistas y su uso en Medicina Veterinaria*. 29 y 30 de Julio.
- 20.- Galmés, A.T; A. C. Mariano; P. J. Oliver; P. F. González y C. de la Calleja. 1995. Descripción de un brote producido por consumo de carne tratada con clenbuterol en Baleares. *Alimentaria*. 23-25.
- 21.- García, T; P. E. Hernández; B. Sanz y R. Martín. 1997. Revisión: Los residuos en la inspección de la carne. *Food Science and Technology Internacional*. 3: 391-403.
- 22.- García, I. L. Sarabia; M. Cruz Ortiz and J. M. Aldama. 2004. Three-way models and detection capability of a gas chromatography-mass spectrometry method for the determination of clenbuterol in several biological matrices; the 2002/657/EC European Decision. *Analytica Chimica Acta*. 515:1, 55-63.

23. - Giddings, J.C. Dynamics of Chromatography. Part I. Marcel Dekker. USA. 1965.
24. - Gleixner, A; H. Sauerwein and H. H. D. Meyer. 1996. Detection of the Anabolic β 2-Adrenoceptor Agonist Clenbuterol in Human Scalp Hair by HPLC/EIA. *Clinical Chemistry*. 42:11, 1869-1871
25. - Gouw, T.H. Guide to Modern Methods of Instrumental Analysis. Wiley Interscience. USA. 1972
- 26.- González, G. P; T. F. Fernández; O. C. Maríz; C. A. F. Sampayo; C. F. Abuín and A. C. Sáez. 1996. Rapid and simple determination of clenbuterol residues in retina by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B*. 677, 167-171.
27. - Götz, W; A. Sachs and H. Wimmer. Thin-Layer Chromatography. Gustav Fisher. Verlag. Germany. 1980.
- 28.- Hawley, G. G. Diccionario de Química y de Productos Químicos. Edit. Omega. Barcelona 1988. Pp. 409
29. - Ichinose, N; Schwedt G; Schnepel F. M. and Adachi K. Fluorometric Analysis in Biomedical Chemistry "Trends and Techniques Including HPLC Applications". Edit. A Wiley Interscience. 1998. Pp.60-79
30. - John B.W, Armstrong H.S, Cannavan A, Elliot C.T, Glenn K. D. 1993. Detection of clenbuterol residues in bovine liver, muscle, retina and urine using gas chromatography/mass spectrometry. *Biological Mass Spectrometry*, 22:336-330
31. - Kutlán, D. y I. Molnár-Perl. 2002. New aspects of the simultaneous analysis of amino acids and amines as their o-phthaldialdehyde derivatives by high-performance liquid chromatography. *Analysis of wine, beer and vinegar. Journal of Chromatography A*. 1, 1-12.
32. - Kuiper H.A, Noordam M.Y, Van Dooren-Flipsen MMH, Schilt R, Roos AH. 1998. Illegal use of β -adrenergic agonists: European Community. *Journal of Animal Science*, 76: 195-207.
33. - Lillsunde P. y Korte T. Comprehensive Drug Screening in Urine Using Solid Phase Extraction and Combined TLC and GC/MS Identification. *Journal of Analytical Toxicology*. 1991; 15: 71-81.
34. - López-Eroz, C; P. Viñas; F. J. Cerdán; M. Hernández-Cordoba. 2000. Determination of clenbuterol in pharmaceutical preparations by reaction with o-phthalaldehyde using a flow-injection fluorimetric procedure. *Talanta*. 53, 47-53.

35. - Luño, M; A. J. Beltrán; I. Jaime and P. Roncales. 1999. Textural Assessment of Clenbuterol Treatment in Beef. *Meat Science*. 51, 297-303.
36. - Mersmann, J. H. 1998. Overview of the Effects of β -Adrenergic Receptor Agonists on Animal Growth Including Mechanisms of Action. *Journal of Animal Science*. 7, 160-172.
37. - Meyer, H. H. D; L. Rinke and I. Dürsch. 1991. Residue screening for the β -agonists clenbuterol, salbutamol and cimaterol in urine using enzyme immunoassay and high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*. 564, 551-556.
38. - Miller, James M. *Chromatographic: Concepts and Contrasts*. Wiley - Interscience. USA. 1988.
- 39.- Morgado, M; M. Juárez, M. Ramos y J. Gómez. 1993. Drogas de uso veterinario que pueden inferir en la detección de β -agonistas en placa fina. *Alimentaria*. Noviembre. 25-28.
- 40.- NOM-EM-015-ZOO-2002. Norma Oficial Mexicana de Emergencia. Especificaciones técnicas para el control de beta-agonistas en los animales.
41. - O' Keeffe, M. J; M. O' Keeffe, J. D. Glennon, A. R. Lightfield and R. J. Maxwell. 1998. Supercritical fluid extraction of clenbuterol from bovine liver tissue. *The Analyst*. 123, 2711-2714.
- 42.- OMS. 1998. Evaluación de residuos de ciertos fármacos de uso veterinario en los alimentos. 47° Informe del Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en aditivos Alimentarios. Organización Mundial de la Salud. Serie de Informes Técnicos, 876. 92 pp.
43. - Osajda, M. and J. Mlochowski. 2002. The reactions of 2-(chloroseleno) benzoyl chloride with nucleophiles. *Tetrahedron*. 58, 7531-7537.
- 44.- Peña, B. S. D. 2002. El uso del clenbuterol en la producción animal y sus riesgos a la salud humana. Seminario aditivos empleados en la alimentación animal y sus implicaciones en la salud pública. Abril 18-19, México, D. F.
45. - Pérez, F. B. 2002. Los efectos tóxicos del clenbuterol. Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Veterinaria.
- 46.- Peters, A. R. 1989. β -agonistas as repartitioning agents: a review. *Veterinary Record*. 124: 417-420.
- 47.- Pickering, W.F. *Química Analítica Moderna*. Editorial Reverté. España. 1976

- 48.- Ramos, F; C. Santos; A. Silva y M. I. N. Da Silveira. 1998a. β 2-Adrenergic agonista residues: simultaneous methyl- and butylboronic derivatization for confirmatory análisis by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 716, 366-370.
- 49.- Ramos, F; C. M. Castillo and N. M. I. Da Silveira. 1998b. Occurrence of β 2-Adrenergic Agonist Residues in urine of animal meat producers in Portugal. *Journal of AOAC International*. 81:3, 544-548.
50. - Rico, A. 2002. Agonistas β 2. Simposio Internacional sobre Beta-agonistas y su uso en Medicina Veterinaria. UNAM. 29 y 30 de Julio.
51. - R-Biopharm. 1996. RIDASCREEN Clenbuterol. Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of clenbuterol and other β -agonists. R-Biopharm GmbH. Art. No. 1705. Darmstadt, Germany.
52. - Sauer, M. J. and S. P. L. Anderson. 1994. In vitro and in vivo studies of drug residue accumulation in pigmented tissues. *The Analyst*. 119, 2553-2556.
53. - Sauer, J. M; H. R. J. Pickett, S. Limer and S. N. Dixon. 1995. Distribution and Elimination of Clenbuterol in Tissues and Fluids of calves following prolonged Oral Administration at a Growth-Promoting Dose. *Journal Veterinary Pharmacology and Therapeutic*. 18, 81-86.
- 54.- Sanz, P. B. 1995. Problemas de Salud Pública ocasionados por el empleo en la alimentación animal del clembuterol y otros agentes promotores del crecimiento (2ª parte). *Eurocarne*. 38,57-66.
- 55.- Segura, J. y De La Torre R. Introducción. *Current Issues of Drugs Abuse Testing*. First International Symposium, 1992.
56. - Sunshine I. Epilogue. *Current Issues of Drug Abuse Testing*, First International Symposium. 1988; p 267-271.
57. - Smith, J. D. 1998. The Pharmacokinetics, Metabolism and Tissue residues of β -Adrenergic Agonists in Livestock. *Journal of Animal Science*. 76, 173-194.
58. - Sporano, V; L. Grasso; M. Esposito; G. Oliviero; G. Brambilla and A. Loizzo. 1998. Clenbuterol Residuos in Non-Liver Containing Meat as a Cause of Collective Food Poisoning. *Veterinary Human and Toxicology*. 40:3, 141-143.
59. - Stoffel, B. and H. H. D. Meyer. 1993. Effects of the β -adrenergic agonist clenbuterol in cows: lipid metabolism, milk production, pharmacokinetics and residues. *Journal of Animal Science*. 71, 1875-1881.

60. - Stoev, G. and Al Michailova. 2000. Quantitative determination of sulfonamide residues in food of animal origin by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*. 871, 37-42
- 61.- Sumano, H.; L. Ocampo y L. Gutiérrez. 2002. Clenbuterol y otros β -agonistas, ¿Una opción para la producción pecuaria o un riesgo para la salud pública? *Vet. Méx.* 33:137-159
62. - Tateda, N.; K. Matsuhisa; K. Hasebe; N. Kitajima y T. Miura. 1998. High-performance liquid chromatographic method for rapid and highly sensitive determination of histidina using postcolumn fluorescence detection with o-phthaldialdehyde. *Journal of Chromatography B*. 718, 235-241.
63. - Touchstone, J. and M. F. Dobbins. Murrell F. *Practice of Thin Layer Chromatography*. 2nd Edition. Willey Interscience. U.S.A. 1983.
- 64.- Viñas, P; C. López-Erroz; F. J. Cerdan; M. Hernández-Córdoba. 1998. *Talanta*. 47, 455.
- 65.- Wang, T; Z. Zhang and N. A. Meanwell. 1999. Selective benzylation of primary amines in the presence of secondary amines. *Tetrahedron Letters*. 40, 6745-6747.
66. - Zalko D; Debrauwer L; Bories G y Tuilliez 1997. Evidence for a new and mayor metabolic pathway of clenbuterol involving in vivo formation of an N-hydroxarylamine. *Che.Res.Toxicol*, 10: 197-204.
67. - Zlatkis, A. and Kaiser, R.E. *HPTLC. High Performance Thin-Layer Chromatography*. Vol. 9. *Journal of Chromatography Library*. Elsevier. 1977.