



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN**

**“DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO
ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR CLENBUTEROL
EN ORINA BOVINA POR ELECTROFORESIS
CAPILAR CON DETECTOR DE FLUORESCENCIA
INDUCIDA POR LÁSER”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

P R E S E N T A:

VANESSA GARCÍA NIEVES

ASESOR: DRA. MA. GABRIELA VARGAS MARTÍNEZ



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.

Mi más sincero agradecimiento a:

A mis padres Mary y Andrés por que ustedes me dieron la seguridad y las bases para poder vivir felizmente y por haberme apoyado incondicionalmente a lo largo de mi vida y gracias a ustedes pude terminar la carrera. Ustedes son los mejores padres del universo. Los Amo!!!

A mi hermano Edwin por que siempre estuviste ahí a mi lado haciéndome reír y siendo muy felices. Te Amo!!!

A mi esposo Ale por darme tu Amor y tu mano, y sobre todo por darnos esta hija tan hermosa Reny, ustedes dos son los pilares que me hacen seguir luchando día con día y contra todo, también te quiero agradecer por este nuevo hogar que hemos formado. Los Amo!!!

A Gaby por haberme aceptado en su laboratorio y haberme enseñado tantas cosas no solo profesionalmente sino también de la vida.

A la UNAM, Fes-Cuautitlán por abrirme las puertas a unas de las mejores universidades del mundo y darme la mayor enseñanza de mi vida.

ÍNDICE

RESUMEN	1
OBJETIVOS	2
INTRODUCCIÓN	3
CAPITULO 1. MARCO TEÓRICO	
1. CLENBUTEROL	
1.1. Propiedades fisicoquímicas	5
1.2. Farmacocinética	5
1.3. Usos	6
1.4. Toxicidad en humanos	6
1.5. Mecanismo de incremento de masa muscular y lipólisis	6
1.6. Límites máximos de residuos	7
1.7. Técnicas de monitoreo y derivatización	7
2. LA ELECTROFORESIS CAPILAR (EC) PARA EL MONITOREO DE FÁRMACOS EN FLUIDOS BIOLÓGICOS	
2.1. Fundamento de la separación en EC y esquema general de instrumentación	8
2.2. La Separación Electroforética	8
2.3. El Flujo Electroosmótico (EOF)	9
2.4. Tipos de Electroforesis Capilar	11
2.5. Formas de detección	13
3. TEORÍA DE LA EMISIÓN DE LA FLUORESCENCIA	
3.1. Teoría de la Fluorescencia	18
3.2. Fluorescencia inducida por láser	19
4. DERIVATIZACIÓN	
4.1. Agentes derivatizantes más comunes	21
4.2. Isotiocianato de Fluoresceína isomero 1 (FITC)	22
4.2.1. Mecanismo de reacción	23

CAPITULO 2. PARTE EXPERIMENTAL	
2.1. Equipo y reactivos	24
2.2. Metodología general	26
CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
CONCLUSIONES	52
ANEXOS	
ANEXO 1. Reportajes de intoxicación por el uso de Clenbuterol (CBT)	53
ANEXO 2. Conceptos de Validación	57
ANEXO 3. Calculo del límite de detección	73
ANEXO 4. Símbolos y abreviaturas	75
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

RESUMEN

En este proyecto se desarrolló un método analítico para llevar a cabo la cuantificación de clenbuterol (CBT) en orina bovina por Electroforesis Capilar de Zona con Detección de Fluorescencia Inducida por Láser, realizando una preconcentración en línea por medio de extracción de Fase Sólida. La importancia de desarrollar un método para cuantificar esta sustancia radica en que se ha utilizado desde hace varios años de forma ilegal en veterinaria como promotor de crecimiento de animales, especialmente en bovinos, causando un aumento considerable en la masa muscular y al mismo tiempo un detrimento en la acumulación de grasa. La presencia de residuos en los productos provenientes de los bovinos causa un serio daño a la salud de los consumidores. Es por ello que se requiere tener un método confiable, para lo cual se llevo a cabo la validación del sistema. Este método es económico para el monitoreo rutinario de CBT en orina bovina.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un método analítico y evaluar algunos de sus parámetros de validación para cuantificar Clenbuterol (CBT) en orina bovina por Electroforesis Capilar de Zona empleando un Detector de Fluorescencia Inducida por Láser y utilizando la técnica de Extracción en Fase Sólida como pretratamiento de la muestra, para aplicarlo al monitoreo rutinario en ganado bovino.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Optimizar parámetros como el pH, la concentración, la composición del buffer de corrida, la concentración del derivatizante así como la longitud del capilar para tener una buena resolución del CBT lo cual permita su cuantificación.
- Evaluar los siguientes parámetros de validación: precisión y linealidad del sistema, precisión del método, así como el límite de detección y cuantificación con la finalidad de comprobar si el método desarrollado es confiable.

INTRODUCCIÓN

En México la administración de CBT al ganado bovino ha causado una fuerte problemática, la cual ha sido reportada en múltiples medios de comunicación, ya que la población que consume carne, hígado y ojos de res contaminados sufren una fuerte intoxicación, la cual puede terminar hasta en la muerte. Muy frecuentemente se presentan reportes de intoxicación con CBT en diversas partes de la república como el del pasado 20 de Noviembre del 2005 en Jalisco, donde fueron reportados 225 enfermos por ingerir res contaminada con CBT. Estos reportes acusan a la Sagarpa de no vigilar a los ganaderos que emplean anabólicos ^[1]. Cabe hacer mención que para los ganaderos es muy fácil obtener el CBT, ya que es usado en la industria farmacéutica humana como broncodilatador y los medicamentos que contienen esta sustancia son de libre venta.

El 18 de Abril del 2006, se alertó a la población por la existencia de carne contaminada en Zacatecas en el cual, las autoridades reconocen la incapacidad para controlar el uso del CBT en ganado ^[2]. En la indagatoria del 16 de Noviembre del 2006 la PGR cita al líder de ganaderos ^[3] y el 27 de Noviembre, los ganaderos admiten el uso de CBT para aumentar el peso de las reses y tener mayores ganancias ^[4]. Hasta el 23 de Febrero del 2007, fue prohibida la venta de hígado ante los riesgos por CBT, esto debido a que nueve personas sufrieron intoxicaciones al consumirlo ^[5]. Para el monitoreo del CBT como sustancia prohibida a nivel veterinario, actualmente se cuenta con tres métodos oficiales publicados en la Norma Oficial Mexicana NOM 015-ZOO-2002 ^[6], los cuales consisten en: un método de monitoreo basado en un ensayo inmunoenzimático, y un método de confirmación basado en Cromatografía de Gases de Alta Resolución. Debido a que el método de confirmación es demasiado costoso y por lo tanto no es utilizado para el control en forma práctica, en este trabajo se plantea la utilización de un método alternativo, basado en la separación del CBT por Electroforesis Capilar y su detección utilizando la fluorescencia inducida por láser. La cuantificación en orina se llevó a cabo

debido a que no es necesario sacrificar al animal para poder monitorear el CBT, aunque en este fluido se presentan límites de cuantificación menores a los límites reportados para el pelo que es la muestra propuesta por la NOM 015-ZOO-2002. El método desarrollado además de ser aplicado a muestras de orina y pelo también resulto útil para ser utilizado en muestras de hígado bovino.

CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO

1. CLENBUTEROL

1.1. Propiedades fisicoquímicas del CBT

El Clenbuterol (CBT), (clorhidrato de 4-amino-(*t*-butilamino)metil)-3,5-diclorobencil alcohol) es un β -adrenérgico^[7]. Es un polvo de color blanco que se obtiene por la síntesis de las fentanolaminas^[8]. El CBT debe almacenarse a 4°C por no más de dos meses^[9]. En la figura 1.1 se muestra la estructura del CBT.

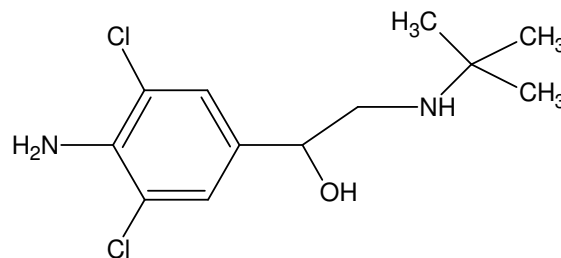


Fig. 1.1. Estructura del CBT

1.2. Farmacocinética

La absorción del clenbuterol por vía oral es rápida y casi completa entre 15 y 45 minutos, alcanza niveles máximos en el plasma aproximadamente a las 2 horas; a partir del cual su eliminación se realiza en forma bifásica. Una fase de eliminación corta que muestra una vida media de una hora y la fase de eliminación prolongada, con una vida media de 3 a 6 horas. Dado su efecto selectivo β_2 adrenérgico, en el útero ejerce un efecto relajante (tocolítico) en el mismo. La eliminación se lleva a cabo fundamentalmente por vía renal, el 87 % del fármaco se elimina en un periodo superior a las 86 horas siguientes a la administración y prácticamente el 100 % se elimina por vía urinaria. El 75 % de

la sustancia original permanece inalterada en el plasma y solo una pequeña parte se metaboliza^[10].

1.3. Usos

Se utiliza en la industria farmacéutica humana y veterinaria como agente broncodilatador, cardiotónico y tocolítico, y de forma ilegal como promotor de crecimiento en animales. La administración de CBT al ganado bovino de dosis (10 y 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ por día) 10 veces mayores a las dosis terapéuticas, presenta efectos anabólicos, causando un aumento considerable en la masa muscular por medio de la estimulación de los receptores β -adrenérgicos en la superficie de las células^[11]. En tejido muscular el clenbuterol promueve la síntesis de proteínas, y al mismo tiempo produce hipertrofia de las células por inhibición de la proteólisis. Este tipo de compuestos también se utilizan para estimular la secreción de hormonas de crecimiento y de la insulina^[8].

1.4. Toxicidad en humanos

La ingestión de carne bovina contaminada con 160 ppm de CBT causa intoxicación severa en humanos, desencadenada en los siguientes síntomas: vértigo, dolor de cabeza, mialgia, artralgia, problemas gastroentéricos^[12], temblor de los músculos, taquicardia acompañada de nerviosismo, y a largo plazo causa efectos metabólicos como disminución del potasio en sangre, modificación de las concentraciones metabólicas y de los adipocitos^[13]. Estos síntomas aparecen de 15 minutos a 6 horas después de la ingestión y tienen una duración de 90 minutos a 6 días^[8].

1.5. Mecanismo de incremento de masa muscular y lipólisis

En el tejido muscular los β -adrenérgicos promueven la síntesis de proteínas, así como hipertrofia celular por inhibición de la proteólisis. En el tejido adiposo promueve lipólisis, esto resulta en la reducción de grasa hasta un 40% e incrementa 40% la síntesis de proteínas^[14].

1.6. Límites Máximos de Residuos

La administración al ganado de CBT en cantidades por arriba de las permitidas, causan una acumulación importante en músculo y en mayor cantidad, en el hígado de los animales^[13], lo cual, desencadena una seria intoxicación en los consumidores de productos contaminados^[9], es por eso que la Unión Europea ha propuesto límites máximos permitidos para residuos de CBT en orina de bovino de 1 ppb.

Los residuos generalmente se acumulan en el hígado de los animales, y persisten después de 25-30 días de la ingestión^[15].

1.7. Técnicas de monitoreo, extracción y derivatización

El CBT ha sido cuantificado en orina bovina por inmunoensayo^[9], cromatografía plana, cromatografía de líquidos (HPLC) con detección UV^[9,15,16], con un sistema de arreglo de electrodos^[17] o espectroscopia de masas^[15], cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas (CG-MS)^[18-20] electroforesis capilar con detección UV^[21,22], análisis de inyección de flujo con detección fluorimétrica^[23], con extracción líquido-líquido^[15] y extracción en fase sólida^[18,24,25].

El CBT se ha derivatizado con una mezcla de N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida^[24], acetato de etilo-metil-ácido butilborónico^[25] para cuantificarse por CG-MS^[26,27].

2. ELECTROFORESIS CAPILAR PARA EL MONITOREO DE FÁRMACOS EN FLUIDOS BIOLÓGICOS

2.1. Electroforesis Capilar

Electroforesis Capilar es una técnica relativamente nueva, la cuál se basa en el movimiento de moléculas cargadas eléctricamente en un medio conductor líquido usualmente acuoso, bajo la influencia de un campo eléctrico. La Electroforesis se puede llevar a cabo con un capilar, como se indica en la figura 2.1 ^[28].

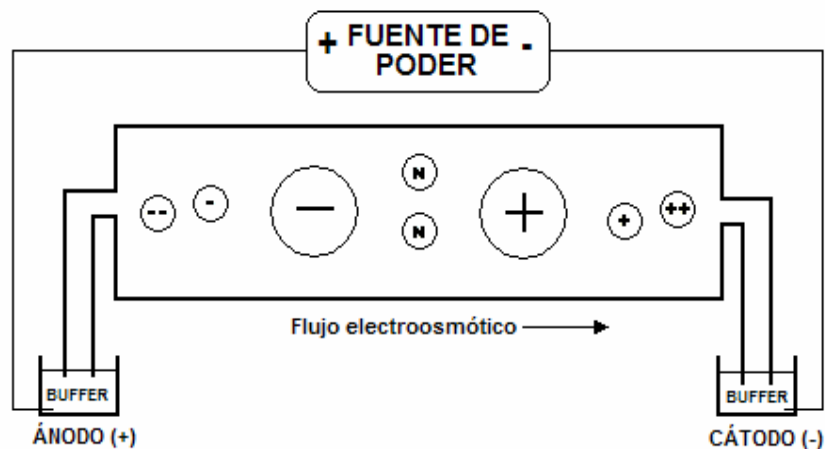


Fig. 2. 1. Representación esquemática del capilar en electroforesis ^[28].

2.2. La Separación Electroforética

La separación electroforética se lleva a cabo llenando el capilar con un amortiguador (buffer), llamado electrolito o buffer de corrida, los cuales son conectados a contenedores llenos con el mismo buffer. En estos contenedores se encuentran electrodos conectados a una fuente de poder. Si la muestra se coloca y un campo eléctrico es aplicado, los iones en la muestra migrarán a través del capilar a diferentes velocidades. La velocidad de migración depende del tamaño de los iones, de su magnitud y carga ^[28].

Los cationes cargados positivamente migrarán hacia el electrodo cargado negativamente, el cátodo, y los aniones cargados negativamente migrarán hacia el electrodo cargado positivamente, el ánodo. Un ión pequeño migrará más rápido que uno más grande de la misma carga. Un ión con una carga alta migrará más rápido que una de menor carga, si los iones son del mismo tamaño. De este modo, un ión divalente migrará con mayor rapidez que un ión monovalente del mismo tamaño. Moléculas con carga neutra no son influenciadas por el campo eléctrico^[28].

Bajo la influencia de un campo eléctrico, el buffer y las moléculas neutras migrarán debido a la electroósmosis. El flujo electroosmótico del buffer se mueve en dirección al electrodo negativo y acarrea los solutos presentes. Los cationes se mueven a una velocidad superior a la del flujo electroosmótico, mientras que las moléculas neutras a la misma velocidad, y los aniones lo hacen lentamente, de tal manera que, el orden en que las moléculas alcanzan el electrodo negativo en este ejemplo es: cationes, moléculas neutras y aniones. Las moléculas neutras se desplazan en el capilar a la misma velocidad y no son separadas. Las moléculas neutras pueden separarse usando un tipo de electroforesis capilar conocida como Cromatografía Capilar Micelar Electrocinética, en la cual se añade un surfactante al buffer de corrida^[28].

Las moléculas separadas se pueden analizar colocando algún tipo de detector cerca de la parte final del tubo. La salida del detector es una gráfica de la respuesta del detector contra el tiempo, llamada electroferograma^[28].

Las mezclas de los compuestos químicos se pueden separar por electroforesis capilar en base a su relación carga-tamaño^[28].

2.3. Flujo electroosmótico

El flujo electroosmótico (FEO) se origina por la presencia del campo eléctrico en una solución iónica cuando entra en contacto un electrolito con una superficie sólida cargada. Los iones en el sistema (incluyendo a los contraiones de los grupos silanol ($-\text{SiO}^-$, H^+ , Na^+ , K^+) bajo la influencia del voltaje aplicado

son desplazados hacia el cátodo de acuerdo a su carga y arrastran el disolvente con ellos dada su solvatación, este proceso es llamado flujo electroosmótico^[28].

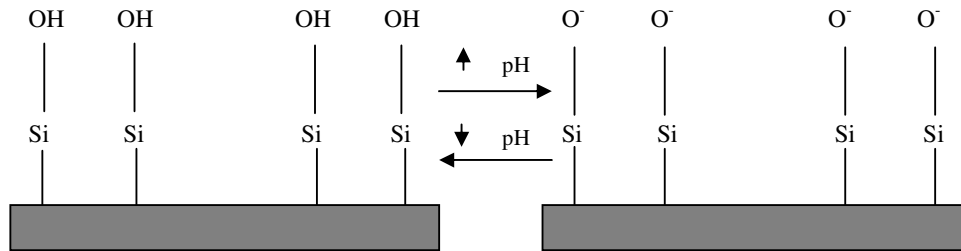


Fig. 2. 2. Representación esquemática del equilibrio de los grupos silanol en la pared del capilar de sílice fundida en función del pH^[28].

Bajo condiciones alcalinas la superficie del sólido posee un exceso de cargas negativas (Fig. 2.2). Esto puede resultar de la ionización de la superficie (equilibrio ácido-base), de la adsorción de las especies iónicas a la superficie, o de ambas. Para la sílice fundida probablemente ocurren ambos procesos, aunque el FEO se controla más por el gran número de grupos silanol (SiOH) que pueden existir en forma ionizada (SiO⁻). Aunque el punto isoeléctrico exacto de la sílice fundida es difícil de determinar, se sabe que el FEO llega a ser significativo a pH mayor de 4. Los materiales no iónicos como el teflón también exhiben cierto FEO, y se presume resulta en la absorción de aniones por la superficie de la pared del capilar^[28].

Los contraiones (en la mayoría de los casos cationes), se localizan cerca de la superficie para mantener el balance de la carga, forman la doble capa y crean un potencial muy cerrado en la pared^[29]. El potencial que se origina entre la pared del capilar (grupos silanol ionizados) y los contraiones del electrolito soporte es denominado potencial zeta (ζ), el cual está dado por la siguiente ecuación:

$$\zeta = \frac{4\pi\eta\mu_{eo}}{\epsilon}$$

Donde: η = viscosidad del medio

ϵ = constante dieléctrica del medio

μ_{eo} = coeficiente de flujo electroosmótico

La velocidad lineal del flujo electroosmótico está dada por la ecuación:

$$V_{eo} = \frac{\epsilon E \zeta}{4\pi\eta}$$

El potencial zeta es determinado por la carga de la superficie de la pared del capilar, esta carga depende fuertemente del pH, por lo que, la magnitud del FEO varía con el pH^[29].

2.4. Tipos de Electroforesis Capilar

2.4.1. Electroforesis Capilar de Zona (ECZ)

Este tipo de Electroforesis es el más utilizado debido a que se aplica a la separación de aniones y cationes, sin neutros en la misma corrida y fácilmente. En ECZ, el capilar se llena con el buffer de composición constante y los viales de destino se llenan con el mismo buffer. La figura 2.3 representa la separación de los analitos. La muestra se inyecta dentro del capilar, el cual se llena con buffer, al aplicar voltaje, el soluto migra a través del capilar, los solutos migran a través del capilar como si fueran zonas. Los solutos se separan por su movimiento a través del capilar por medio de sus diferentes velocidades de migración, las cuales dependen de las movilidades electroforéticas. El flujo electroosmótico transporta a los solutos a través del capilar, del ánodo al cátodo^[28].

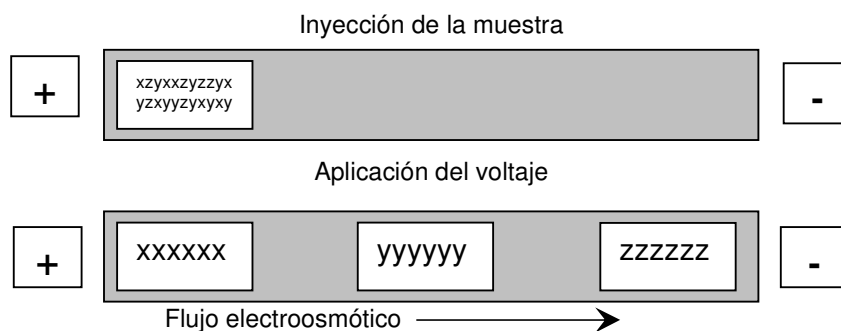


Fig. 2.3. Representación de la separación por Electroforesis Capilar de Zona^[28].

2.4.2. Cromatografía Capilar Micelar Electrocinética (CCME)

Este tipo de Electroforesis Capilar se utiliza para separar compuestos neutros, y se basa en la partición de los solutos entre micelas y el buffer de corrida. Los surfactantes, también llamados detergentes, son moléculas con una parte hidrofóbica al final de la molécula y una parte hidrofílica en la otra parte. Los surfactantes pueden ser catiónicos, switeriónicos o no iónicos. Cuando un surfactante está presente en la solución a una concentración mayor que la concentración crítica micelar (CCM), forma micelas, las cuales son agregaciones individuales de moléculas de detergentes. Dependiendo del tipo de surfactante es el número de moléculas, y esto a su vez, está referido a su número de agregación (NA)^[28].

En CCME se utiliza como buffer de corrida, un buffer conteniendo micelas. La figura 2.4 ilustra el principio de este tipo de electroforesis. En el capilar, las micelas con cargas negativas son atraídas hacia el ánodo, pero el flujo electroosmótico las atrae hacia el cátodo. La solución buffer que contiene las micelas se mueve del vial de entrada al vial de salida. Si se utiliza un buffer con un surfactante catiónico, la dirección del flujo electroosmótico debe ser reversa, y será necesario aplicar polaridad reversa al voltaje. Las moléculas de la muestra se distribuyen entre el buffer y las micelas, y la cantidad de tiempo que pasen en las micelas es proporcional a la hidrofobicidad^[28].

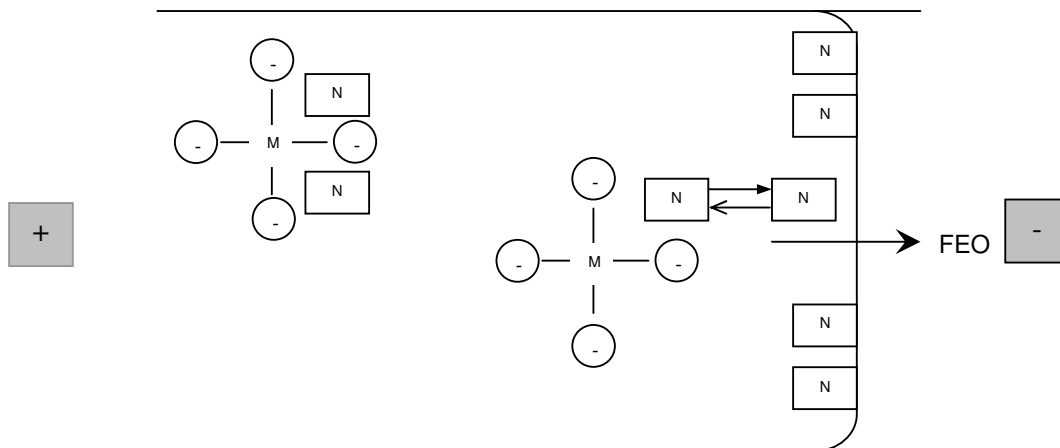


Fig. 2.4. Ilustración esquemática de la CCME. Las micelas se representan por la M, con cargas negativas alrededor de ella. Las micelas son atraídas hacia el ánodo, pero el flujo electroosmótico las atrae hacia el cátodo^[28].

Las moléculas hidrofílicas pasan todo el tiempo en el buffer y son acarreadas a lo largo del capilar a la velocidad del flujo electroosmótico, son las primeras en migrar. Estas moléculas son totalmente insolubles en las micelas y arriban a t_0 . Moléculas muy hidrofóbicas se solubilizan totalmente en las micelas y pasan todo el tiempo en las mismas, estas moléculas son acarreadas a través del capilar a la misma velocidad que las moléculas. Las moléculas que son parcialmente solubles en las micelas y el buffer eluyen entre t_0 y t_m . Sus tiempos de migración t_m son proporcionales a la cantidad de tiempo que pasen en las micelas^[28].

2.5. Formas de detección

2.5.1. Detección por absorbancia de luz ultravioleta/visible

La detección basada en la absorbancia de luz ultravioleta o visible (UV/vis) es empleada comúnmente en electroforesis capilar. Como se muestra en la figura 2.5, la intensidad de la luz, I_{in} , entra en el capilar, donde la muestra absorbe algo de luz, la luz sale del capilar a una intensidad menor I_{out} , la cual

es detectada por el fotodetector, usualmente un fotoiodo. La transmitancia, T , se da por la ecuación,

$$T = I_{out} / I_{in} \quad \text{Eq. 2.5.1.1}$$

El principio de la detección UV/vis se basa en la ley de Beer, donde la absorbancia, A , se da por la siguiente fórmula,

$$A = \log 1/T = abC \quad \text{Eq. 2.5.1.2}$$

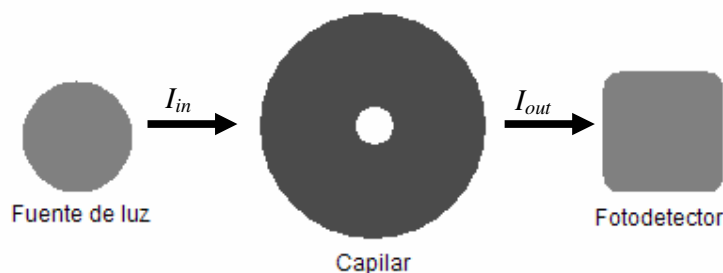


Fig. 2.5. Detección UV/vis.

donde: a , es la absortividad (se utiliza para referirse al coeficiente de extinción), b , es el la longitud de la luz en la muestra en cm (diámetro interno del capilar) y C , es la concentración del soluto. Cuando la unidad de concentración es molaridad, “ a ” se refiere a la absortividad molar y se abrevia con el símbolo ϵ , y tiene unidades de $L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. La absortividad depende del cromóforo del soluto, la longitud de onda, la longitud de la luz incidente, pH y la composición del buffer de corrida. Las medidas del fotodetector de la intensidad de la luz y el detector electrónico convierten la absorbancia utilizando las ecuaciones 2.5.1.1 y 2.5.1.2^[30].

El cromóforo es la luz absorbida por una parte de la molécula. La porción UV del espectro electromagnético se encuentra entre 190 a 350 nm, y la porción visible de 350 a 800 nm. La mayoría de los compuestos absorben a 190 nm^[30].

Debido a que la absorbancia es dependiente de la absortividad, la altura del pico también lo es; incluso si son inyectadas dos cantidades iguales de dos compuestos diferentes, la altura de los picos correspondientes puede ser diferente debido a que poseen diferentes absortividades. Por consiguiente, la sensibilidad de la detección UV/Vis es dependiente de los analitos. Con detección de absorbancia UV/vis, las concentraciones mínimas detectables se encuentran en el rango de $10^{-5} - 10^{-7} \text{ M}$ ^[30].

Entre los principales componentes de un detector de UV/Vis con longitud de onda variable, se encuentra la lámpara de deuterio, la fuente de luz más común. La luz blanca, típicamente de 190 – 800 nm, incide sobre un prisma, la cual difracta la luz en diferentes longitudes de onda. La longitud de onda es seleccionada por la rotación de la rejilla hasta que la longitud de onda apropiada pase a través de una ranura presente en un bloqueador de todas las longitudes restantes. Una sección de la poliimida es removida del capilar, y ésta área sirve como una celda de detección. La luz monocromática pasa a través del capilar y es recibida por un fotodetector, el cual, es usualmente un fotodiodo. La señal de salida del fotodetector se expresa en unidades de absorbancia (AU). Existe otro tipo de detector UV/vis, el detector de arreglo de diodos (DAD, del inglés *diode array detector*), también llamado detector de arreglo de fotodiodos (PAD, del inglés *diode array photodetector*). En este caso, la luz blanca pasa primero a través del capilar, después incide en el prisma, que se encuentra fijo, y es difractada en diferentes longitudes de onda. La luz incide en un arreglo de diodos; típicamente, existen entre 200 y 500 diodos en un arreglo. Cada diodo posee un rango de longitud de onda angosto, y la longitud de onda es seleccionada por muestreo electrónico a partir del diodo apropiado^[30].

2.5.2. Detección por fluorescencia

Cuando la energía en forma de luz golpea a una molécula, parte de esa energía se desprende en forma de calor y parte como luz. Dependiendo de las transiciones electrónicas dentro de una molécula, la luz emitida puede ser fluorescente o fosforescente. La fluorescencia ocurre cuando un electrón

desciende desde un singulete excitado a un estado inferior, mientras que la fosforescencia ocurre cuando la transición de un electrón es de un triplete excitado a un estado inferior. En la fluorescencia, la luz es emitida en aproximadamente 10^{-8} segundos después de que la molécula ha sido excitada, en cambio, en la fosforescencia, la luz puede ser emitida por varios segundos. La luz también puede ser emitida como resultado de una reacción química, la cual es referida como quimioluminiscencia^[30].

La energía emitida en forma de fluorescencia es menor que la energía incidente. Por lo tanto, la longitud de onda luz empleada para la excitación es menor que la longitud de onda emitida. Cuando un detector de fluorescencia es empleado, dos longitudes de onda son especificadas, excitación y emisión. Similarmente, hay dos espectros de fluorescencia asociados con un compuesto, un espectro de excitación y uno de emisión. Existen longitudes de onda máximas para la excitación y para la emisión, y estas pueden ser determinadas a partir del espectro^[30].

La eficiencia cuántica es la fracción de las moléculas excitadas que fluorescen. Aproximadamente el 10% de los compuestos orgánicos tienen una eficiencia cuántica alta, suficiente para ser detectada^[30].

2.5.3. Detección por fluorescencia inducida por láser

El número de moléculas excitadas es proporcional a la intensidad de radiación incidente, y los láseres producen una alta intensidad de radiación para la excitación. Un láser puede ser concentrado en un diámetro interno de un capilar y, por lo tanto, la luz incide directo sobre los solutos^[30].

Debido a la alta intensidad de la luz incidente y la capacidad de enfocar la luz dentro del diámetro interno del capilar, la fluorescencia inducida por láser (LIF) proporciona una alta sensibilidad^[30].

El funcionamiento del LIF, figura 2.6, consiste en el direccionamiento de la luz proveniente del láser por los lentes dentro del diámetro de un capilar. Una

sección de poliacrilamida que cubre al capilar es removida y sirve como ventanilla. La luz emitida es concentrada en ángulos rectos, pasando a través de un filtro y detectada por un fotomultiplicador. El filtro elimina la posibilidad de alguna dispersión de la luz^[30].

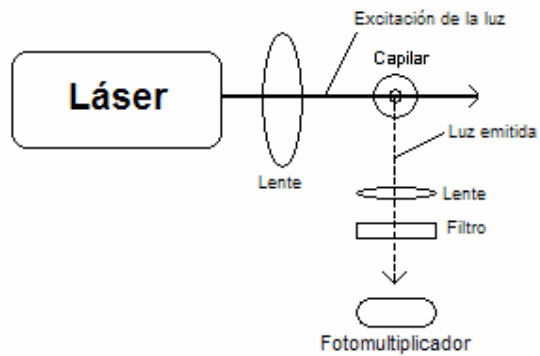


Fig. 2.6. Fluorescencia inducida por láser^[30].

3. TEORÍA DE LA EMISIÓN DE LA FLUORESCENCIA

3.1. Teoría de la Fluorescencia

La fluorescencia es un proceso de emisión, en el cual, se excitan átomos o moléculas por la absorción de energía que proviene de un haz de radiación electromagnética^[29]. La fluorescencia es el resultado de un proceso de tres etapas (figura 3.1) que ocurre en ciertas moléculas (generalmente hidrocarburos poliaromáticos o heterociclos) llamados fluoróforos, dichas etapas son: excitación, tiempo de vida del estado excitado y, emisión de fluorescencia.

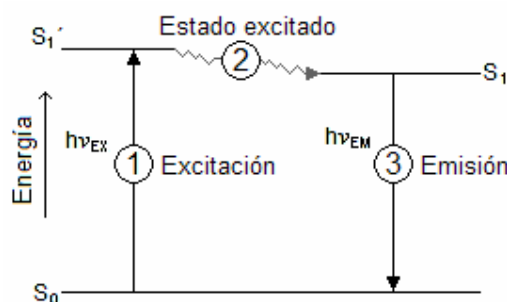


Fig. 3.1. Diagrama del proceso de fluorescencia^[30].

En la etapa de excitación, la energía $h\nu_{EX}$ de un fotón es provista por una fuente externa como es una lámpara incandescente o un láser, la cual es absorbida por el fluoróforo, creando un estado electrónico excitado (S_1'); este proceso distingue a la fluorescencia de la quimioluminiscencia, en la cual, el estado excitado es generado por una reacción química. La segunda etapa se designa como el tiempo de vida del estado excitado, ya que dura un tiempo finito, comúnmente de 1 a 10 nanosegundos. Durante este tiempo, el fluoróforo sufre cambios conformacionales y puede ser sujeto a múltiples interacciones con su entorno molecular. Este proceso tiene dos importantes consecuencias, la primera radica en que la energía de S_1' es parcialmente disipada, originándose un estado excitado relajado (S_1), del cual se origina la emisión de

fluorescencia; no todas las moléculas excitadas originalmente por absorción, regresan a su estado basal (S_0) por la emisión de fluorescencia. En la última etapa de la fluorescencia, la energía $h\nu_{EM}$ de un fotón es emitida, regresando el fluoróforo a su estado S_0 . La diferencia en la energía o en la longitud de onda representada por $(h\nu_{EX} - h\nu_{EM})$, se conoce como desplazamiento de Stokes, el cual es fundamental en la sensibilidad las técnicas de fluorescencia porque permite la detección de fotones de emisión contra fotones de excitación. En contraste, la espectrofotometría de absorción requiere la medición de la luz transmitida y de la luz de incidencia a la misma longitud de onda^[30].

3.2. Fluorescencia Inducida por Láser

La sensibilidad de la detección de la fluorescencia es proporcional a la intensidad de la luz emitida. La intensidad de la luz emitida es dependiente con respecto a la eficiencia cuántica del soluto fluorescente y del número de moléculas excitadas. A mayor número de moléculas excitadas, el número de moléculas que emitan luz incrementará, así como, la altura del pico detectado. El número de moléculas excitadas es proporcional con la intensidad de la radiación incidente; el láser produce radiación de mayor intensidad por excitación. Debido a que el láser posee una cualidad espacial buena, se concentra principalmente en sitios pequeños. El láser puede dirigirse dentro del diámetro de un capilar, por lo tanto, toda la luz incide directamente sobre el fluoróforo^[28].

La alta intensidad de la luz incidente y la precisión de concentración de la luz en todo el diámetro del capilar en la fluorescencia inducida por láser o LIF (laser-induced fluorescence), permiten obtener una alta sensibilidad.

El funcionamiento del LIF (figura 3.2), consiste en el direccionamiento de la luz proveniente del láser por los lentes dentro del diámetro de un capilar. Una sección de poliacrilamida que cubre al capilar es removida y sirve como ventanilla. La luz emitida es concentrada en ángulos rectos, pasando a través de un filtro y detectada por un fotomultiplicador. El filtro elimina la posibilidad de alguna dispersión de la luz.

Existe una variedad de compuestos que pueden emplearse como un láser, incluyendo el argón, helio-cadmio y helio-neón. Existen tres criterios principales en la selección del láser. Primero, la longitud del láser debe estar cercana a la longitud de excitación máxima del fluoróforo analizado. Usualmente, los componentes de una mezcla poseen diferentes absorbancias máximas, por lo tanto, la longitud de onda seleccionada del láser debe ser aquella en la cual todos los componentes presenten una absorbancia^[28].

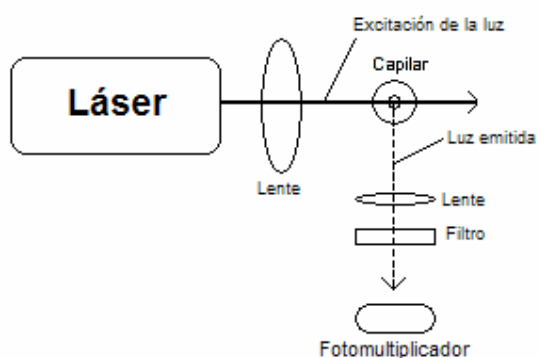


Fig. 3.2. Fluorescencia inducida por láser^[28].

4. DERIVATIZACIÓN

La derivatización es una técnica utilizada para transformar un compuesto químico en un producto con una estructura química similar, llamada derivado. Generalmente un grupo funcional del compuesto participa en la reacción de derivatización y transforma el analito a un derivado de la reactividad, solubilidad, ebullición, estado de agregación o composición química. Resultando en una nueva propiedad química que puede ser utilizada para la cuantificación o separación del analito^[31].

Tabla 4.1. Agentes derivatizantes más comunes^[31].

FUNCIÓN		AGENTE DERIVATIZANTE	LONGITUD DE ONDA DE EXCITACIÓN (λ)	LONGITUD DE ONDA DE EMISIÓN (λ)
AMINAS	Aminas primarias y secundarias	Isotiocianato de fluoresceína (FITC)	488 nm	512 nm
		4-fluoro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD-F)	328 nm	No reportado
		Cloruro de dansil	328 nm	563 nm
		Fluoresceína	494 nm	518 nm
	Aminas primarias	Naftaleno 2,3-dicarboxi aldehído (NDA)	419 nm	493 nm
		3-(4-carboxibenzoil)-quinolina-2-carboxi aldehído (CBQCA)	442 nm	550 nm
Fluorescamina		380 nm	464 nm	
	Ortoftaldehído (OPA)	334 nm	455 nm	
HIDROXI	Alcohol	Fluoresceína-5-carbonilazida	300 nm	No reportado
	Azúcares	9-aminopireno-1,4,6 trisulfonato (APTS)	353 nm	520 nm
		9-amininaftaleno-1,4,6 trisulfonato (ANTS)	424 nm	520 nm
		Fluorescamina	494 nm	518 nm
TIOLES	Aminoácidos, pépticos y proteínas	5-yodo acetomido fluoresceína (IAF)	492 nm	515 nm
		4-fluoro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD-F)	328 nm	No reportado
ALDEHÍDOS Y CETONAS		Fluoresceína-5-tiosemicarbazida	492 nm	516 nm
CARBOXILOS		5-bromometil fluoresceína	492 nm	515 nm

4.2. Propiedades del Isotiocianato de Fluoresceína Isómero 1 (FITC)

El derivatizante utilizado en este trabajo fue el FITC, el cual tiene un peso molecular de 389.38 g/mol y esta representado por la siguiente estructura:

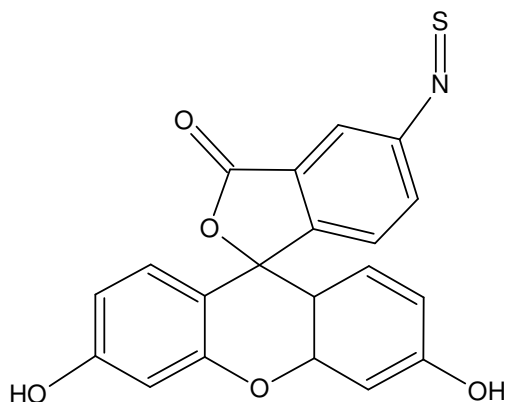


Fig. 4.1. Estructura del FITC, fórmula molecular ($C_{21}H_{11}NO_5S$)

Este agente derivatizante reacciona con aminas primarias y secundarias, y la cinética de reacción depende de la concentración de la amina y del FITC, el pH del buffer de preparación. Normalmente las reacciones entre las aminas e isotiocianatos se dan utilizando un buffer de carbonatos a un pH de entre 8.5 a 9.5^[31].

El FITC presenta dos longitudes de onda, una de emisión a 488nm y otra de excitación a 520nm, estas se representan en la siguiente figura^[31].

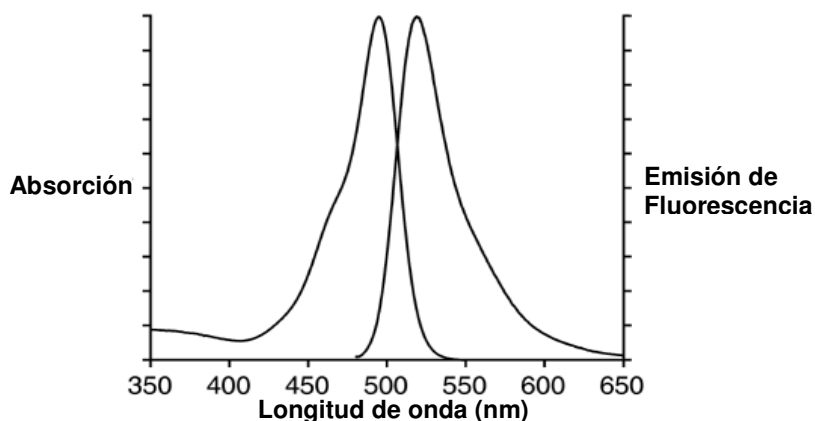
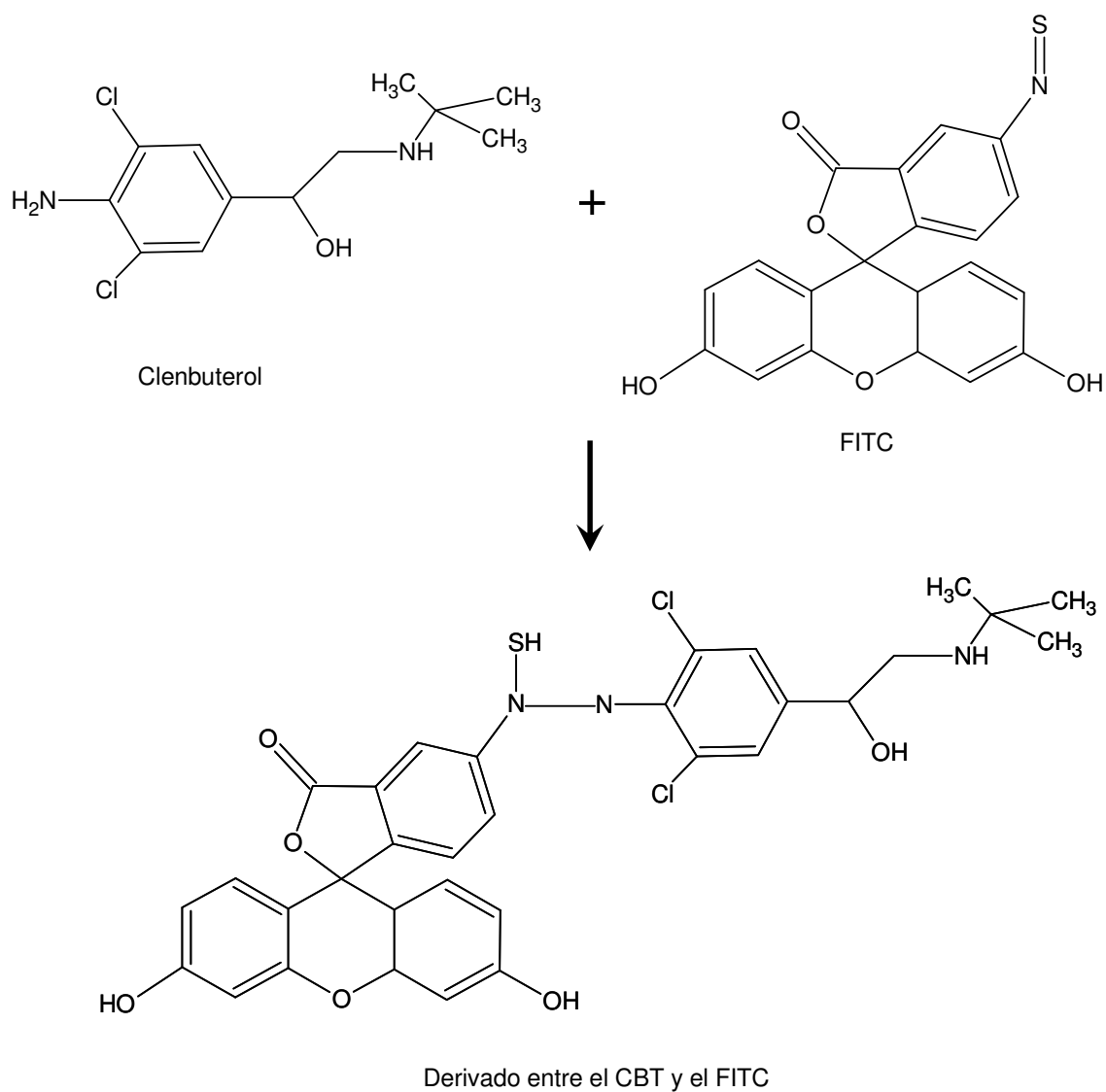


Fig. 4.2. Espectros de emisión y absorción de fluorescencia del FITC en buffer de carbonatos pH 8.0.

4.2.1. Mecanismo de reacción entre el FITC y el Clenbuterol^[31].

CAPÍTULO 2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Reactivos y equipo

Reactivos

- ⊕ Clorhidrato de clenbuterol, estándar secundario (Sigma-Aldrich Química, St. Louis, MO, USA)
- ⊕ Isotiocianato de fluoresceína isómero 1 (FITC), 99 % de pureza (Sigma-Aldrich Química, St. Louis, MO, USA)
- ⊕ Ácido bórico, grado reactivo (J.T. Baker, Xalostoc, Edo. de Méx., México)
- ⊕ Tetraborato de sodio decahidratado, grado reactivo (J.T. Baker, Xalostoc, Edo. de Méx., México)
- ⊕ Bicarbonato de Sodio, grado reactivo (J.T. Baker, Xalostoc, Edo. de Méx., México)
- ⊕ Acetato de amonio, grado reactivo (J.T. Baker, Xalostoc, Edo. de Méx., México)
- ⊕ Hidróxido de sodio, grado reactivo (J.T. Baker, Xalostoc, Edo. de Méx., México)
- ⊕ Ácido clorhídrico, 37.0 % de pureza (Técnica Química, DF, México)
- ⊕ Dimetil sulfóxido (DMSO), 99.0 % de pureza (Técnica Química, DF, México)
- ⊕ Acetonitrilo, 99.0 % de pureza (Técnica Química, DF, México)
- ⊕ Ácido acético, 99.8 % de pureza (J.T. Baker, Xalostoc, Edo. de Méx., México)
- ⊕ Metanol, grado HPLC (J.T. Baker, Xalostoc, Edo. de Méx., México)
- ⊕ Ácido trifluoroacético, grado reactivo (J.T. Baker, Xalostoc, Edo. de Mex., México)
- ⊕ Nitrógeno, 99.0% de pureza (Aga, Tlalnepantla, Edo. de Mex., Mexico)
- ⊕ Agua desionizada de 15.8 mΩ, obtenida de un sistema Milli-Q Plus (Molsheim, Francia).

Equipo

Se utilizó un equipo de electroforesis capilar P/ACE™ MDQ de Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA), equipado con un detector de fluorescencia inducida por láser (LIF), con una longitud de onda de excitación de 488 nm (argón ión láser) y una longitud de onda de emisión a 520 nm. Capilar de sílice fundida de 66.6 cm de longitud total (55.6 cm de longitud efectiva) y 75 µm de diámetro interno de Polymicro Technologies (Phoenix AZ, USA). Al inicio de cada día el capilar se lavó con agua desionizada durante 2 min, 10 min con NaOH 0.1 M, 3 min con agua desionizada y 10 min con el buffer de corrida. Todos los análisis se realizaron a 25°C.

- ✦ Balanza analítica 10 mg a 250 g (Boeco, BCBC100; Alemania)
- ✦ Agitador magnético (Thermolyne Cimarec 2; E.U.A)
- ✦ Centrifuga (Beckman Coulter, Allegra 21; E.U.A)
- ✦ Sonicador (Elma, Transsonic 570; Alemania)
- ✦ Equipo Manifold (Alltech drying attachment for vacuum Manifolds; Deerfield; E.U.A.)
- ✦ Bomba de vacío (Alltech, Benchtop Vacuum Station; E.U.A.)
- ✦ Baño de agua (Analogo, Poli Science; E.U.A)

Materiales

- ✦ Columnas para extracción en fase sólida MIP4SPE (MIP Technologies, Lund, Suecia)
- ✦ 3 vasos de precipitados de 25 mL
- ✦ 1 vaso de precipitados de 1000 mL
- ✦ 2 matraces volumétricos de 5 mL
- ✦ 2 matraces volumétricos de 25 mL
- ✦ 3 matraces volumétricos de 100 mL
- ✦ 1 matraz volumétrico de 500 mL
- ✦ 1 pipeta volumétrica de 0.5 mL
- ✦ 5 pipetas volumétricas de 1 mL
- ✦ 2 pipetas volumétricas de 2 mL
- ✦ 1 pipeta volumétrica de 5 mL
- ✦ 2 pipetas volumétricas de 10 mL

- ✦ 1 barra magnética
- ✦ Filtros
- ✦ 25 viales ámbar

2.2. Metodología general

Preparar las siguientes soluciones:

- ✦ Hidróxido de sodio 1 M
- ✦ Ácido clorhídrico 1 M
- ✦ Buffer de carbonatos 10 mM, pH 9.5
- ✦ Buffer de boratos mezcla 70 mM, pH 9.0
- ✦ Buffer de acetato de amonio 25 mM, pH 6.7
- ✦ Buffer de acetato de amonio [0.5 M], pH 5.0
- ✦ Mezcla de acetonitrilo-ácido acético 98:2
- ✦ Mezcla de acetonitrilo-agua 70:30
- ✦ Mezcla de metanol-ácido trifluoacético 99:1

Preparación de las soluciones

Buffer de boratos mezcla [70 mM], pH 9.0, 500 mL

Pesar 1.36 g de ácido bórico y 4.93 g de tetraborato de sodio en un vaso de precipitados, agregar 450 mL de agua desionizada y agitar hasta disolver. Ajustar el pH de la solución 1 M, llevar a la marca de aforo a 500 mL con agua desionizada y agitar.

Estándar de Clenbuterol [0.1 ppm]

Pesar 10 mg de clenbuterol, llevar a la marca de aforo a 100 mL con buffer de carbonatos (solución stock 100 ppm). Tomar 1 mL de la solución stock de clenbuterol, llevar a la marca de aforo a 100 mL con buffer de carbonatos (solución A 1 ppm). Tomar 10 mL de la solución A, llevar a la marca de aforo a 100 mL con buffer de carbonatos (solución B 0.1 ppm). Colocar las soluciones en viales ámbar entre 4 y 8 °C.

Estándar de FITC (120 veces más concentrado) [168 ppm]

Pesar 10 mg de FITC, llevar a la marca de aforo a 25 mL con DMSO (solución stock 400 ppm). Tomar 10.5 mL de la solución stock, llevar a la marca de aforo a 25 mL con buffer de carbonatos (solución A 168 ppm). Colocar las soluciones en viales ámbar entre 4 y 8 °C.

Procedimiento de Derivatización

Blanco

Tomar 2 mL de buffer de carbonatos, adicionar 200 mL de la solución A de FITC. Sonicar por 10 segundos y colocar la solución en un baño de agua a 25 °C por 24 horas.

Placebo

Tomar 2 mL de la solución B de clenbuterol, adicionar 200 mL de la solución A de FITC. Sonicar por 10 segundos y colocar la solución en un baño de agua a 25 °C por 24 horas.

Después de 24 horas de reacción se retiran las soluciones del baño de agua y se colocan en hielo durante su análisis.

Metodología de análisis

Las muestras fueron introducidas al equipo por inyección hidrodinámica aplicando 1.5 psi por 5 seg, lavando 5 min con buffer de corrida entre cada corrida, posteriormente se colocó un paso de espera (wait) con buffer de corrida para enjuagar las puntas del capilar y finalmente la separación se realizó a 30 kV a temperatura de 25 °C.

2.3. Extracción en fase sólida

Preparación de la muestra

Pasar la orina bovina por un filtro, centrifugar el sobrenadante (3000 g por 10 minutos), tomar 1 mL de la solución B colocarlo en un matraz aforado de 5 mL, llevar a la marca de aforo con la orina. Realizar una dilución 1:1 de la orina cargada con acetato de amonio 25 mM pH 6.7 (pH final 7.0).

Acondicionamiento de la columna

Pasar a través de la columna 1 mL de metanol, 1 mL de agua y 1 mL de acetato de amonio 25 mM pH 6.7

Aplicación de la muestra

Colocar 10 mL de la preparación de la muestra en la columna

Elusión de las interferencias

Eluir las interferencias con:

- 1 mL de agua (elusión de la sal y los componentes de la matriz)
- 2 minutos de vacío (~-0.7 bar) (secado de la columna)
- 1 mL de acetonitrilo / 2% de ácido acético (lavado selectivo, elusión de interferencias hidrofóbicas enlazadas)
- 1 mL del buffer de acetato de amonio 0.5 M pH 5 (elusión de las sustancias iónicas unidas pero no de sustancias selectivas enlazadas)
- 1 mL de acetonitrilo en agua al 70 % (lavado para la elusión de las sustancias hidrofóbicas enlazadas e interferencias de hidrógenos unidos)
- 2 minutos de vacío (~-0.7 bar) (secado de la columna)

Eluir el clenbuterol con:

- 2 veces con 1 mL de metanol / ácido trifluoroacético al 1%
- 2 minutos de vacío entre cada fracción

Evaporar la solución y reconstituir con la solución A de isotiocianato de fluoresceína isómero 1.

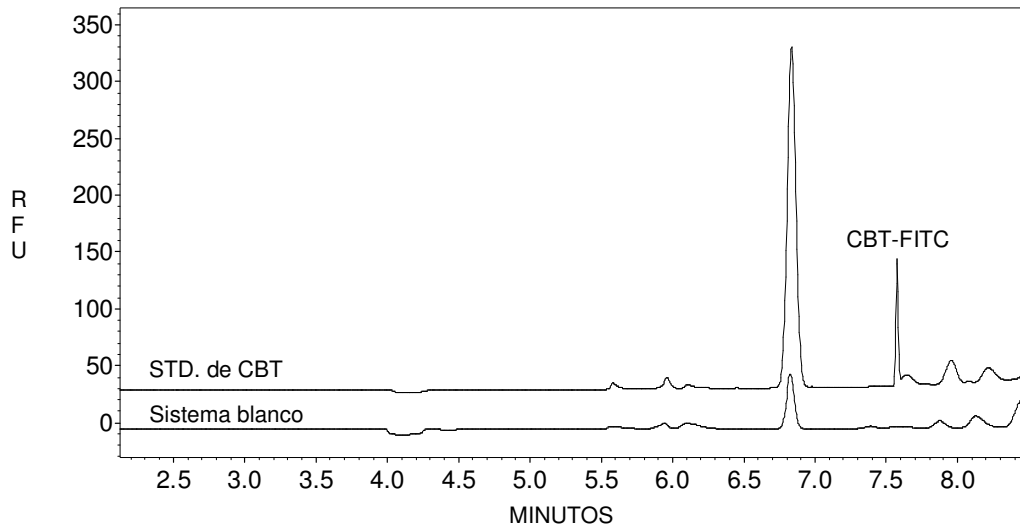
Sonicar la mezcla y colocarla en un baño de agua a 25 °C durante 24 horas posteriormente retirar la solución del baño de agua y colocarla en hielo. Preparar un blanco de la misma manera, cambiar la solución de clenbuterol por buffer de carbonatos [10 mM]. Introducir la muestra al equipo con las condiciones antes mencionadas.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente estudio se analizó el CBT por medio de la Electroforesis Capilar acoplada a un Detector de Fluorescencia Inducida por Láser (FIL), se utilizó este detector ya que esta técnica de detección es mas sensible que UV y para este proyecto se requiere cuantificar trazas. Para llevar a cabo el análisis del CBT por esta técnica es necesario realizar una reacción de derivatización con un colorante, en este caso se utilizó Isotiocianato de Fluoresceína isómero 1, el cual reacciona con grupos amino. Esta reacción de derivatización se realiza por que el CBT no tiene fluorescencia propia.

En un trabajo previo se estudiaron algunas condiciones del método analítico como: la concentración y el pH del buffer de boratos, la concentración del colorante. Las condiciones propuestas fueron buffer de boratos preparado con tetraborato de sodio, concentración 50 mM a pH de 9.5, se utilizó un capilar de 60 cm de longitud total (49 cm de longitud efectiva), las muestras se introdujeron al equipo por inyección hidrodinámica aplicando 5 psi de presión por 5 segundos, lavando 2 minutos con buffer de corrida entre cada corrida, y finalmente a 25 kV la temperatura se mantuvo en 25 °C. Los estándares de CBT y el colorante se prepararon en buffer de carbonatos 20mM.

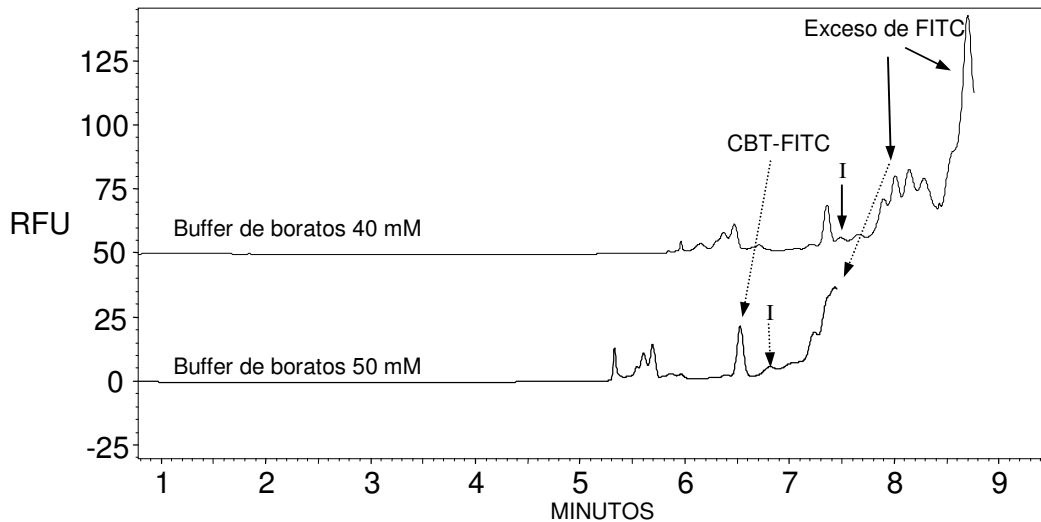
Inicialmente se trabajó con las condiciones propuestas en un trabajo anterior. En el electroferograma de la gráfica 3.1 se puede observar que el pico del CBT no se encuentra resuelto, ya que se observa un hombro a la derecha del pico, por lo que se modificaron algunas condiciones al método inicial reportado en un trabajo previo.



Gráfica 3.1. Electroferograma con las condiciones iniciales del derivado de CBT a 100 ppm.

3.1. Efecto de la concentración del buffer en la resolución

Para mejorar la resolución del pico del CBT con respecto a otros picos relacionados con el colorante, se disminuyó la concentración del buffer de boratos de 50 mM a 40 mM, pH de 9.5.

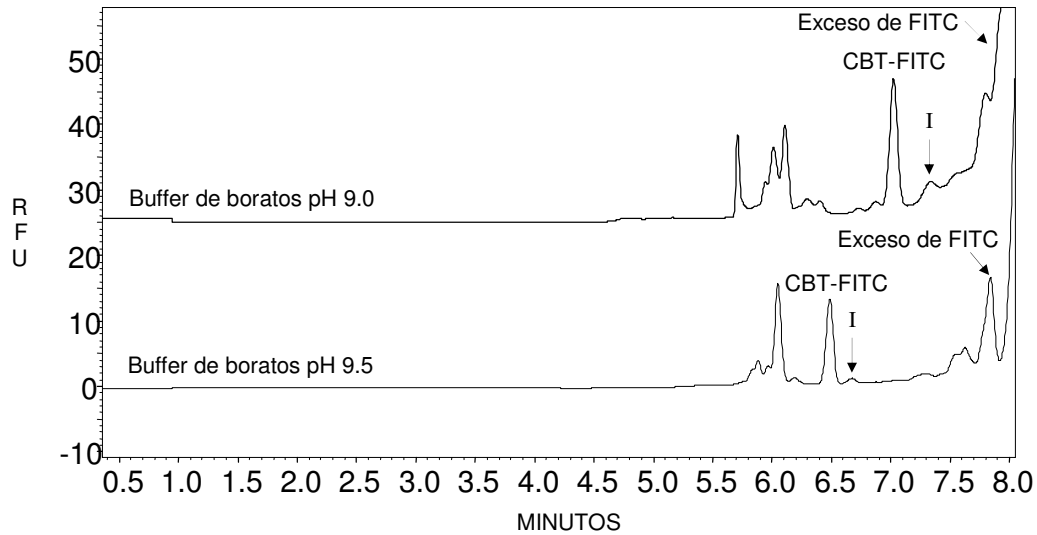


Gráfica 3.2. Electroferograma del derivado de CBT a 2 ppm. Diferentes concentraciones del buffer de boratos. Capilar de 60 cm de longitud total (49 cm de longitud efectiva).

Como se observa en el electroferograma de la gráfica 3.2, al disminuir la concentración del buffer de 50 mM ($R_s = 1.10$) a 40 mM ($R_s = 0.88$), no se tiene una mejora en la resolución entre el derivado de CBT y el pico interferente (I), sino el efecto contrario, con un ligero aumento en el tiempo de migración. El hecho de seleccionar un buffer menos concentrado en subsecuentes experimentos se debió a que físicamente no fue posible continuar con el buffer de 50 mM pues se obtenían corrientes inadmisibles ($170 \mu\text{A}$), con el capilar empleado.

3.2. Efecto del pH del buffer en la resolución

Con el fin de aumentar la resolución del pico del CBT con respecto a los otros picos se disminuyó el pH del buffer de boratos 40 mM de 9.5 a 9.0. En la gráfica 3.3 se puede observar el aumento en la resolución.

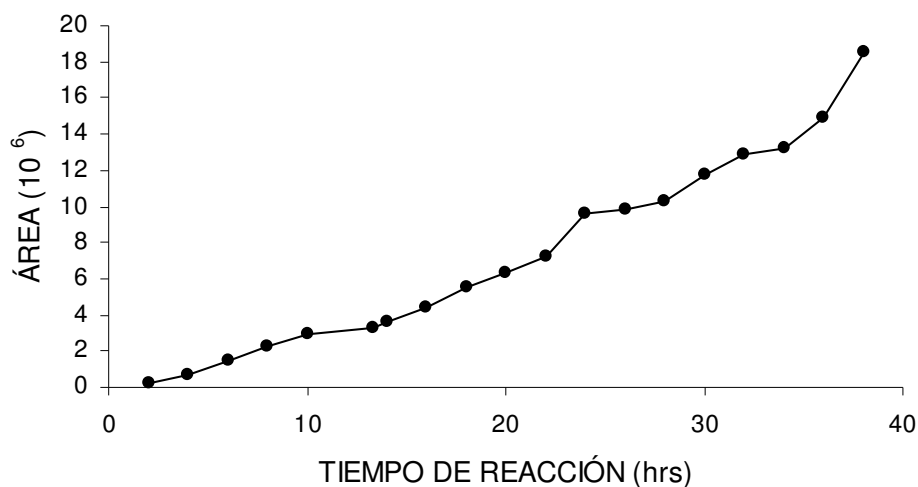


Gráfica 3.3. Electroferograma a diferentes pH del buffer de boratos. Concentración del derivado 2 ppm

Al disminuir el pH del buffer de 9.5 a 9.0, se tiene una mejora sustancial en la resolución del CBT con respecto al pico interferente (I), la cual fue de 1.37, así como un aumento considerable en la eficiencia, aunque se incrementó ligeramente el tiempo de migración de 6.5 a 7.0, se necesitaba tener picos resueltos.

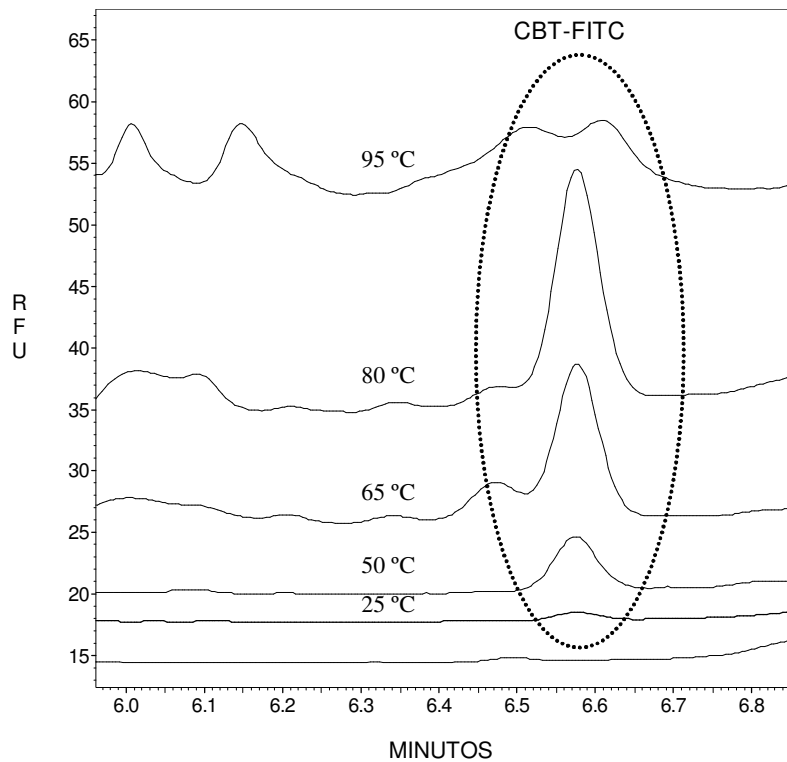
3.3 Cinética de reacción

Utilizando un derivado de CBT-FITC [2 ppm], en buffer de carbonatos [10 mM], pH 9.5, con buffer de boratos [40 mM], pH 9.0 como buffer de corrida, se realizó una cinética de reacción para encontrar el tiempo óptimo para la formación del derivado de CBT-FITC, dicha cinética se realizó a 25 °C durante 38 horas. En la gráfica 3.4 se observa que el derivado de CBT-FITC reacciona lentamente por más de 38 horas, sin mostrar una meseta, a la cual se pueda cuantificar sin tener variaciones entre un sistema y otro.



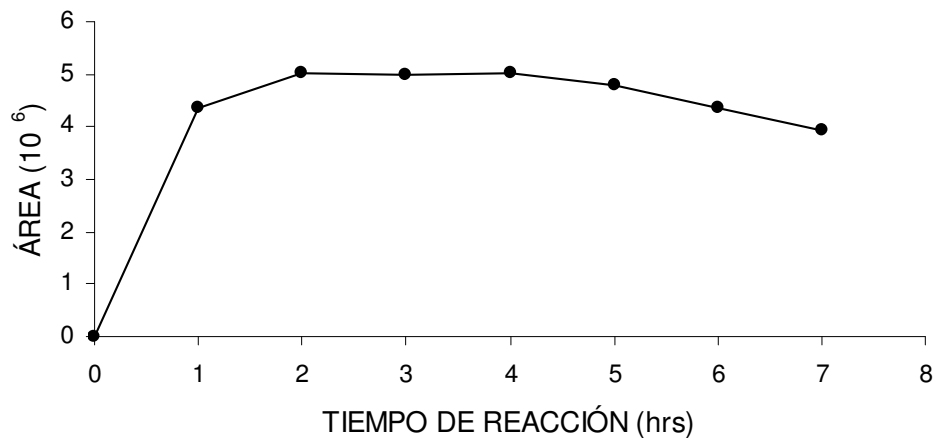
Gráfica 3.4. *Cinética de reacción a 25 °C*

Para disminuir el tiempo de reacción se colocó el derivado de CBT-FITC a reaccionar a diferentes temperaturas (50, 65, 80 y 95 °C), en un baño de agua durante 3 horas. En la gráfica 3.5 se muestra como aumenta la señal del CBT, conforme aumenta la temperatura. A 95 °C el CBT sufre una descomposición, esto se observa por la presencia de dos picos juntos. Debido a que a 80 °C se tiene un aumento considerable de la señal del CBT se realizó una cinética de reacción a esta temperatura.



Gráfica 3.5. Electroferograma a diferentes temperaturas de reacción.

En la grafica 3.6 se presenta la cinética de reacción a 80 °C, se observa que el tiempo de reacción entre el CBT y el FITC disminuye considerablemente y se observa una meseta, pero se afecta la señal proporcionada por el CBT, ya que al comparar ambas cinéticas de reacción se observa que a 25 °C se tiene una mayor área a 24 horas de reacción (9561245), que a 80 °C (5005364), por lo que finalmente se decidió usar las condiciones de la cinética a 25 °C por 24 horas.



Gráfica 3.6. Cinética de reacción a 80 °C.

Al llevar a cabo la reacción a 25 °C y con la finalidad de detener la reacción se colocó el derivado en un baño de hielo, se corroboró que la reacción se detiene, tomando una muestra del sistema en baño de hielo cada hora durante 5 horas, esta muestra se analizó en el equipo. Posteriormente se realizó un análisis estadístico de las áreas obtenidas en el equipo, obteniendo un coeficiente de variación de 1.06 % el cual muestra que a las diferentes horas de muestreo la reacción se detiene. En la tabla 1 se muestran las áreas a las diferentes horas de muestreo y los tiempos de migración (TM), así como los coeficientes de variación obtenidos.

Tabla 3.1. *Resultados estadísticos de las áreas a diferentes horas de muestreo.*

CORRIDA	TM	ÁREA
1	6.47	9057036
2	6.49	9049848
3	6.50	9116453
4	6.52	9311690
5	6.47	9158565
6	6.46	9097795
PROM. =	6.49	9147506.17
S =	0.02	97668.33
CV =	0.35%	1.07%

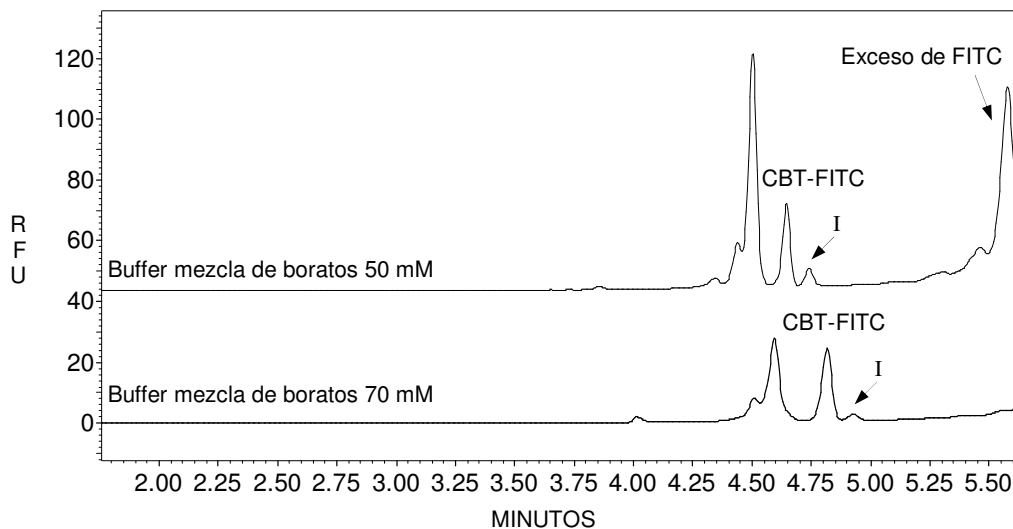
Se realizaron algunas modificaciones al método debido a que se presentaron problemas de caída en la corriente del equipo por la elevada corriente proporcionada por el buffer de boratos 40 mM, pH 9.0 (165 μ A).

Cabe mencionar que al tener valores altos en la corriente el buffer de corrida puede calentarse, inclusive puede hervir, provocando la formación de burbujas, con la consecuente caída en la corriente (al no cerrar el circuito de conducción eléctrica). La alta corriente también genera calor y provoca un gradiente de temperatura y una consecuente dispersión (ensanchamiento) del pico del analito.

3.4. Efecto de la composición del buffer de boratos en la corriente del equipo

Para disminuir la corriente en el equipo se preparó el buffer de boratos mezclando tetraborato de sodio y ácido bórico, se utilizó la ecuación de Henderson-Hasselbalch para obtener las cantidades a pesar.

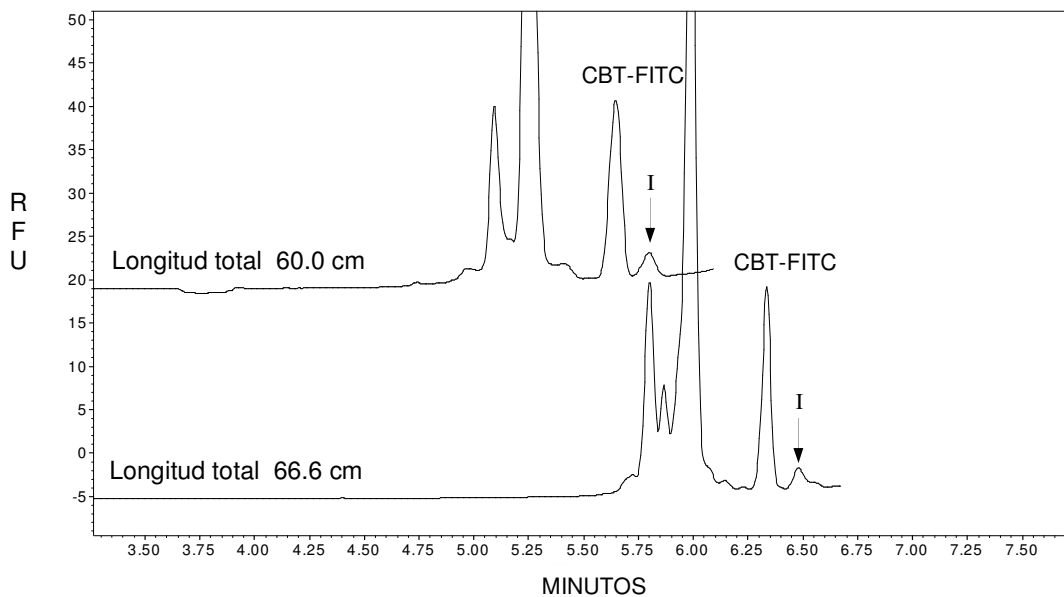
Se estudiaron dos diferentes concentraciones del buffer mezcla de boratos a pH de 9.0, la primera concentración fue 50 mM ($R_s = 1.29$), y la segunda de 70 mM ($R_s = 1.45$), como se puede observar en el electroferograma de la gráfica 3.7, al aumentar la concentración del buffer de boratos aumenta el tiempo de migración y disminuye la eficiencia del pico del CBT de 23983 a 16213, pero se obtuvo una mejora en la resolución del CBT, con una corriente aceptable ($77 \mu\text{A}$). Por lo tanto se decidió trabajar con buffer de concentración 70 mM.



Gráfica 3.7. Electroferograma a diferentes concentraciones del buffer mezcla de boratos.

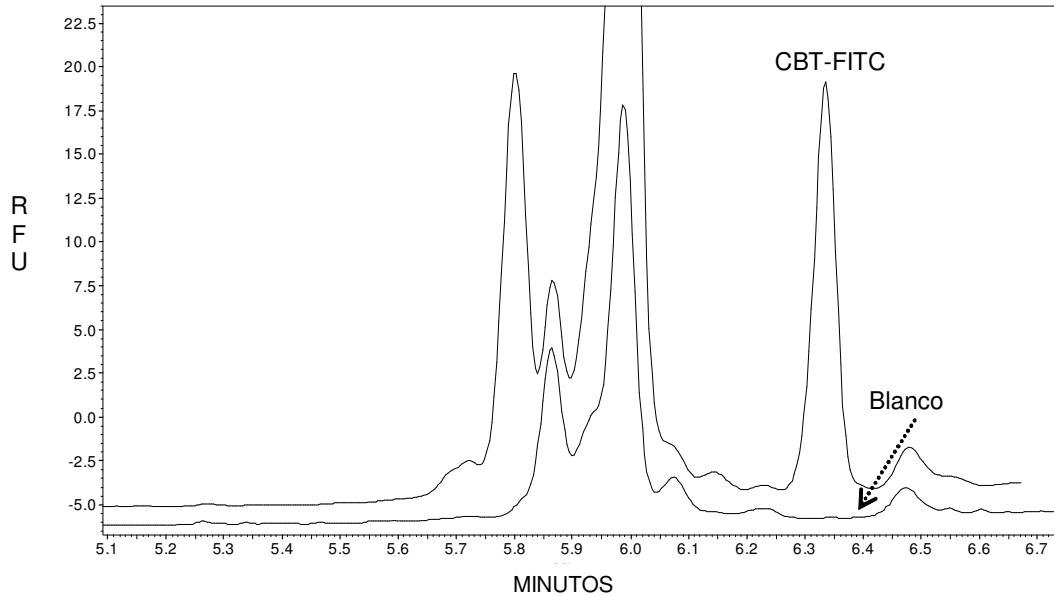
3.5. Efecto de la longitud del capilar en la resolución y eficiencia de los picos

Se analizó el derivado de CBT-FITC con dos capilares de diferente longitud, el primero con el cual se realizaron los experimentos anteriores fue de 60 cm de longitud total (49 cm de longitud efectiva) con una resolución de 1.45 y 16213 platos teóricos y el segundo de 66.6 cm de longitud total (55.6 cm de longitud efectiva) con una resolución de 1.56 y 28413 platos teóricos. En el electroferograma de la gráfica 3.8 se observa que con el capilar de 66.6 cm de longitud, se tienen picos más eficientes y resueltos, aunque con un tiempo de migración mayor, y en este caso se requiere tener picos más resueltos aunque se sacrifique un poco el tiempo de análisis.



Gráfica 3.8. Electroferograma del efecto de la longitud del capilar en la separación

En el electroferograma de la gráfica 3.9 se muestra el derivado del CBT-FITC y un sistema blanco preparado de la misma forma que el CBT, en este electroferograma se observa que no hay ninguna interferencia del colorante en el pico del CBT.



Gráfica 3.9. Electroferograma del sistema blanco y del derivado de CBT

3.6. Condiciones finales de análisis

Las muestras fueron introducidas al equipo por inyección hidrodinámica aplicando 1.5 psi por 5 segundos, lavando 5 minutos con buffer de corrida entre cada corrida, posteriormente se colocó un paso de espera (wait) con buffer de corrida para enjuagar las puntas del capilar y finalmente la separación se realizó a 25 kV a temperatura de 25 °C.

El buffer de corrida fue boratos preparado con tetraborato y ácido bórico de concentración 70 mM, pH de 9.0, utilizando un capilar de 66.6 cm de longitud total (55.6 cm de longitud efectiva).

3.7. Efecto de la inyección electrocinética en la precisión del sistema

Se estudiaron algunos parámetros con este tipo de inyección, sin lograr obtener una buena precisión, esto debido a que este tipo de inyección se da por aplicación de voltaje, lo cual provoca que no siempre se introduzca la misma cantidad de muestra al capilar, resultando en un tipo de inyección demasiado imprecisa. Se estudio otro tipo de preconcentración en línea, la cual fue inyección por agrupamiento de iones.

3.8. Inyección por agrupamiento de iones (stacking)

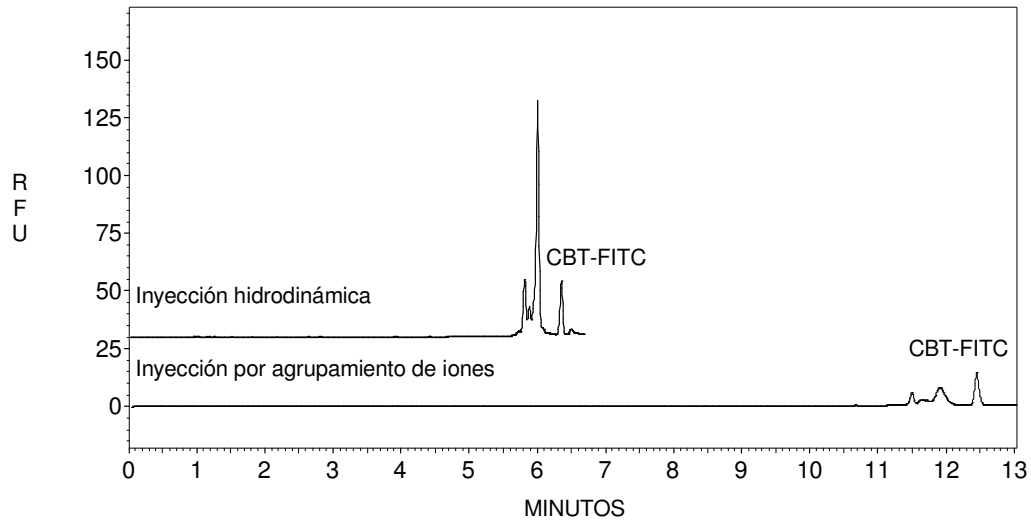
Este tipo de inyección de la muestra consiste en agrupar los iones de la muestra en una parte del capilar para posteriormente hacerlos pasar a través del capilar, con este tipo de inyección se obtienen picos mas grandes que inyectando la muestra hidrodinamicamente, a la misma concentración del analito. Este tipo de inyección necesita que el buffer de la muestra se encuentre 10 % menos concentrado que el buffer de corrida.

3.8.1. Condiciones del equipo

Inicialmente se lavó el capilar con buffer mezcla de boratos 70 mM, pH 9.0, durante 5 minutos. La muestra se introdujo al equipo a 2 psi, por 20 segundos, se aplicaron 30 kV de voltaje con polaridad reversa durante 1.17 minutos para concentrar los iones en un solo lado del capilar y posteriormente se aplicaron 30 kV de voltaje con polaridad normal durante 11 minutos para llevar a cabo la separación. Este experimento se realizó utilizando el mismo capilar.

Se realizó una dilución de la muestra 1:1 con agua para disminuir la concentración del buffer de carbonatos, ya que para llevar a cabo este tipo de inyección se necesita que la muestra se encuentre 10 veces menos concentrada que el buffer de corrida. Posteriormente se prepararon todas las soluciones en buffer de carbonatos 10 mM, sin tener problemas en la derivatización.

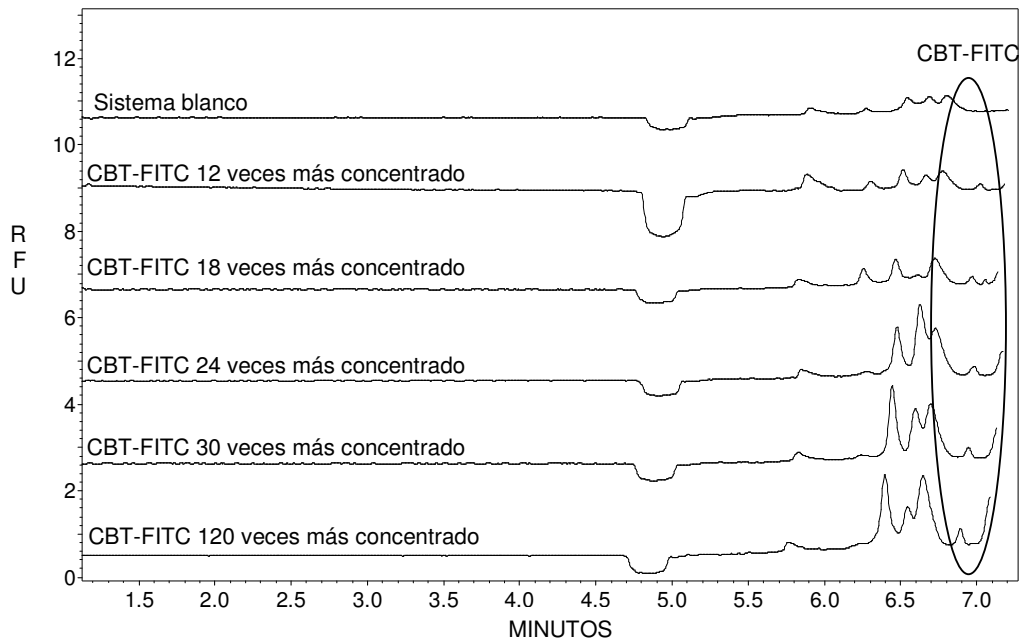
En el electroferograma de la gráfica 3.10 se puede observar que el pico del CBT se resuelve mejor con la inyección por agrupamiento de iones ($R_s = 1.67$) que con la inyección hidrodinámica ($R_s = 1.56$), pero se tiene una importante disminución en la eficiencia (18934). Por lo que se continuó trabajando con inyección hidrodinámica.



Gráfica 3.10. Electroferograma comparando inyección hidrodinámica y por agrupamiento de iones.

3.9. Efecto de la concentración del colorante en el aumento del derivado

Para aumentar la respuesta del derivado se decidió evaluar la concentración del colorante (FITC), aumentando la concentración de 12 a 18, 24, 30 y 120 veces con respecto a la concentración del CBT. En el electroferograma de la gráfica 3.11 se observa que la respuesta del derivado con FITC 18, 24 y 30 veces más concentrado, no aumenta significativamente con respecto a las condiciones iniciales (12 veces mas concentrado), al medir la respuesta con el derivado que utiliza el FITC 120 veces más concentrado se tiene un aumento del doble en la respuesta del derivado inicial.



Gráfica 3.11. Electroferograma a diferentes concentraciones del colorante (FITC).

3.10 Condiciones finales del método

Después de analizar las diferentes condiciones de este experimento, las condiciones finales son las siguientes:

Buffer de mezcla de boratos, preparado con ácido bórico y tetraborato de sodio de concentración 70mM, pH 9.0, con un capilar de 66.0 cm de longitud total (55.0 cm de longitud efectiva). Las muestras se introdujeron al equipo por inyección hidrodinámica aplicando 5 psi de presión por 5 segundos, lavando 5 minutos con buffer de corrida entre cada corrida, y finalmente la separación se llevó a cabo a 25 kV a temperatura de 25 °C. Los estándares de CBT y el colorante se prepararon en buffer de carbonatos 10mM.

Con estas condiciones se evaluaron algunos parámetros de validación.

3.11. Evaluación de algunos parámetros de validación

3.11.1 Repetibilidad del sistema del equipo

Con los parámetros antes desarrollados se evaluó la repetibilidad de la señal, introduciendo 10 veces el derivado y analizando estadísticamente las áreas y los tiempos de migración. Se obtuvo un coeficiente de variación de 1.54% para las áreas y de 0.27% para los tiempos de migración, por lo tanto este método es repetible ya que los resultados obtenidos se encuentran dentro de los límites marcados en la literatura. En la tabla 3.3 se muestran los resultados obtenidos con cada corrida en el equipo.

Tabla 3.2. Resultados estadísticos de la evaluación de reproducibilidad del sistema

CORRIDA	TM	ÁREA
1	6.37	6174570
2	6.36	6136905
3	6.36	5923542
4	6.35	5969909
5	6.34	5933305
6	6.32	6006673
7	6.32	5954073
8	6.35	5929856
9	6.33	5966657
PROM. =	6.34	5999498.89
S =	0.02	92601.75
CV =	0.27%	1.54%

3.11.2. Precisión del sistema

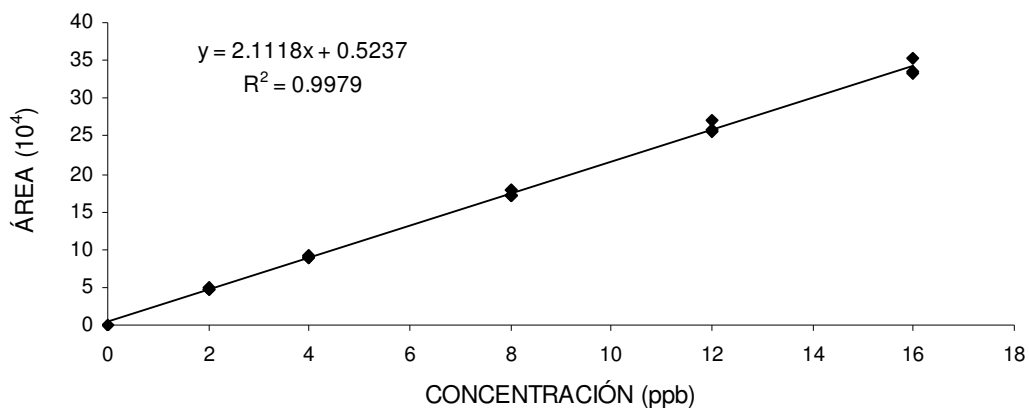
Para evaluar este parámetro se analizó un sextuplicado de soluciones derivatizadas de concentración 4 ppb, preparadas por dilución de una solución stock de concentración 20 ppb, los datos obtenidos se trataron estadísticamente. Se obtuvieron coeficientes de variación de 1.45 % para las áreas y de 0.34 % para los tiempos de migración, con esto se puede corroborar que el sistema es preciso.

Tabla 3.3. Resultados estadísticos de la evaluación de precisión del sistema

SISTEMA	TM	ÁREA
1	6.43	102583
2	6.43	100944
3	6.44	102816
4	6.43	104480
5	6.48	104734
6	6.42	104516
PROM. =	6.44	103345.5
S =	0.02	1497.60
CV =	0.34%	1.45%

3.11.3. Linealidad del sistema

CURVA DE CALIBRACIÓN



Gráfica 3.12. Curva de calibración

Se prepararon por triplicado 5 niveles de concentración (2 -16 ppb), para la curva de calibración, cada sistema se analizó en el equipo. En la gráfica 3.12 se observa que la curva es lineal, con un coeficiente de determinación (r^2) de 0.9979.

3.11.4. Límite de detección teórico

El límite de detección teórico se determinó en base a la curva de calibración. Con las ecuaciones proporcionadas por la Guía de Validación de Métodos Analíticos del C.N.Q.F.B. El límite de detección calculado es de 0.39 ppb para el derivado, por lo que se alcanzan a determinar los límites propuestos por el Consejo de las Comunidades Europeas (1 ppb)^[31].

3.12. Aplicaciones del Método Desarrollado

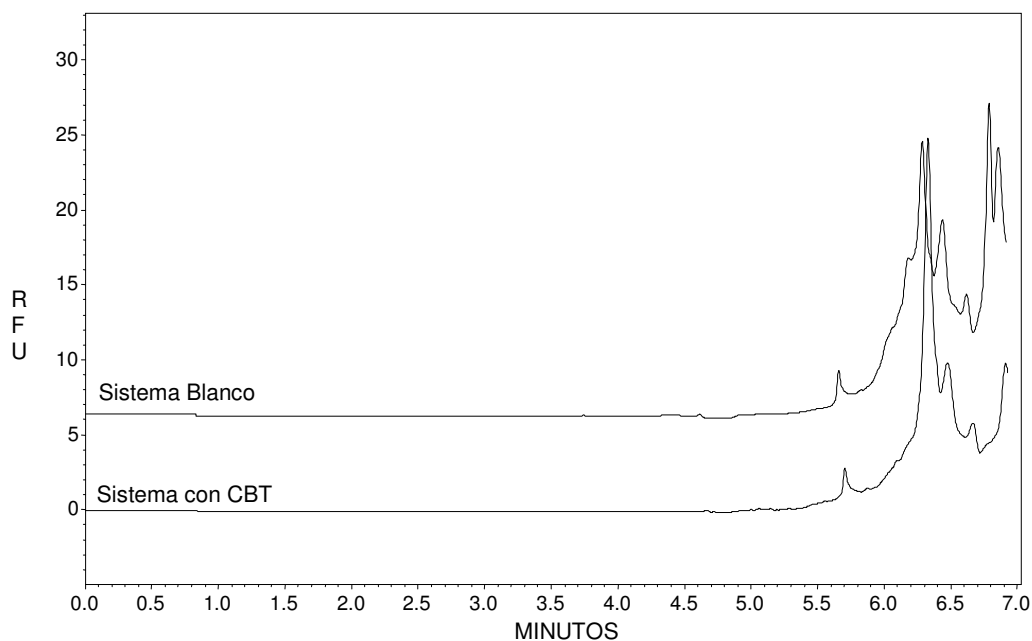
3.12.1. Monitoreo de Clenbuterol en orina bovina

Debido a que no es posible la inyección directa de muestras en orina cargadas con CBT por el gran número de señales, se decidió realizar un pretratamiento a las muestras con la finalidad de obtener una señal del CBT sin interferencias de la matriz de orina.

Los métodos para el pretratamiento de la muestra que fueron estudiados y se describirán en subsecuentes apartados son: extracción líquido-líquido y extracción en fase sólida.

3.12.1.1. Extracción líquido-líquido de Clenbuterol en orina bovina

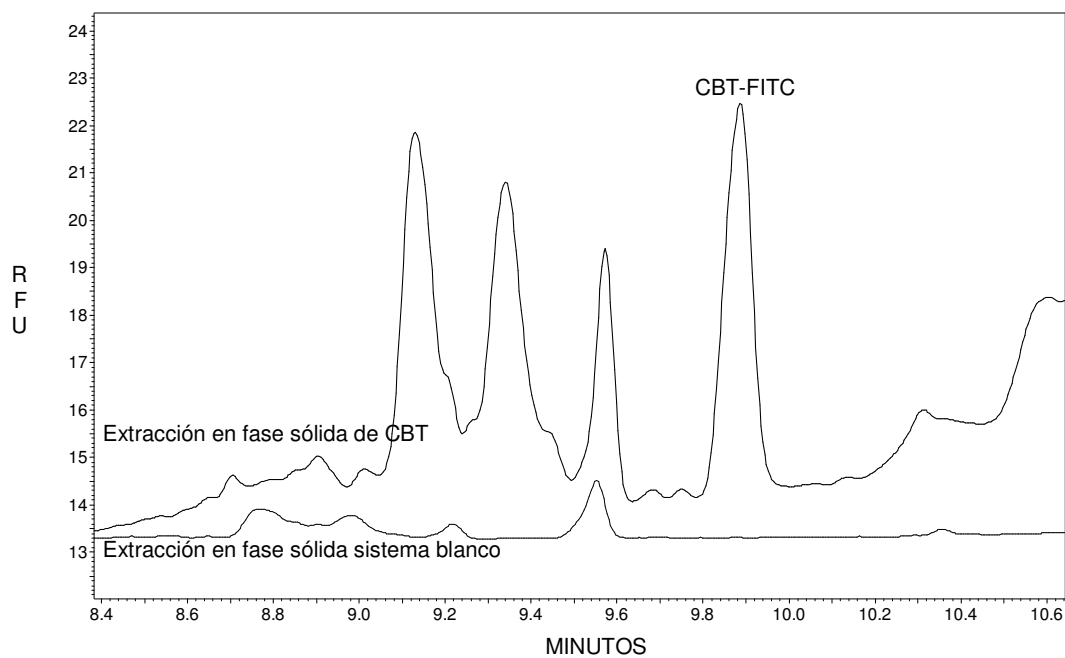
Se trabajó con placebos cargados. Inicialmente se filtró la orina bovina y se fortificó con CBT, posteriormente la extracción líquido-líquido se llevó a cabo adicionando 10 mL de cloroformo a 10 mL de orina fortificada, se realizó una extracción. Con las condiciones antes mencionadas se midió la respuesta del CBT extraído de la orina. Como se observa en el electroferograma de la gráfica 3.13, se tienen aún varias interferencias con el pico del derivado, esta extracción se repitió varias veces para eliminar interferencias de la muestra, pero en todas las ocasiones que se realizó la extracción siempre aparecieron las mismas interferencias, por lo que se decidió probar otro método de pretratamiento.



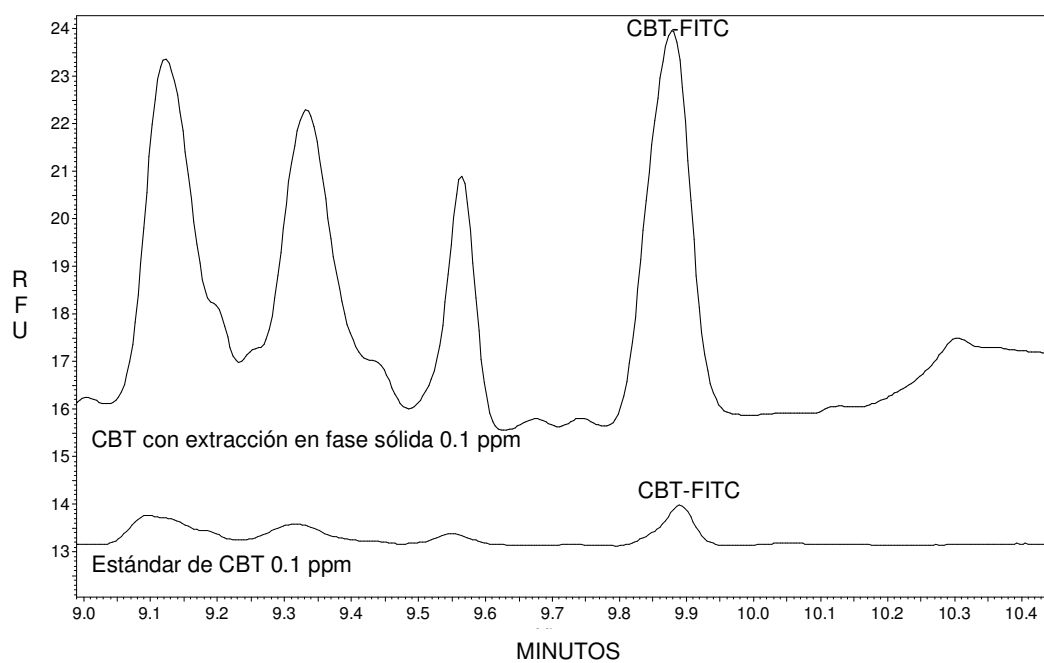
Gráfica 3.13. Electroferograma con extracción líquido-líquido.

3.12.1.2. Extracción en fase sólida

Se realizó extracción en fase sólida, siguiendo la metodología planteada en el capítulo 2, sección 2.3. Este tipo de extracción se lleva a cabo con unos cartuchos selectivos para la retención de CBT^[32]. Como se observa en el electroferograma de la gráfica 3.14 se obtiene una muy buena separación del CBT con respecto a otros picos. En el electroferograma de la gráfica 3.15 se hace una comparación al extraer el CBT por extracción en fase sólida y el estándar de CBT ambos a 0.1 ppm, como se observa en la gráfica se tiene un aumento del pico del CBT de casi 6 veces.



Gráfica 3.14. Electroferograma con extracción en fase sólida.



Gráfica 3.15. Comparación entre el electroferograma de extracción en fase sólida y el estándar de CBT, ambos 0.1 ppm.

Con este tipo de extracción se evaluó la precisión del método.

3.12.1.3. Precisión del Método de Extracción en Fase Sólida

Para evaluar este parámetro se analizaron un sextuplicado de soluciones placebo derivatizadas de concentración 0.1 ppm, preparadas por dilución de una solución stock de concentración 1 ppm, los datos obtenidos se trataron estadísticamente. Se obtuvieron coeficientes de variación de 19.51% para las áreas y de 1.77% para los tiempos.

Tabla 3.4. *Resultados estadísticos de la evaluación de precisión del sistema*

SISTEMA	TM	ÁREA
1	9.45	3720901
2	9.18	5127590
3	9.25	4733121
4	9.35	5811543
5	9.16	3427198
6	9.17	5732904
PROM. =	9.31	4723531.71
S =	0.16	921654.10
CV =	1.77%	19.51%

Como se puede observar en los resultados de la tabla 3.5 el método es demasiado impreciso, por lo que una opción es adicionar un estándar interno para mejorar la precisión del método.

3.12.1.4. Estándar interno

Para disminuir los coeficientes de variación se probaron diversos reactivos para ser utilizados como estándar interno, estos reactivos se seleccionaron en base a los grupos amino que presentan, lo cual los hace viables a ser derivatizados. Todos los reactivos probados presentaron algún problema al realizar su medición. En la tabla 3.6 se muestran los diversos problemas que presentaron los reactivos.

Tabla 3.5. Problemas de los reactivos probados.

REACTIVO	PROBLEMA
Acetaminofen	No es soluble en buffer de carbonatos
1-4 diamino butano	No se derivatiza o se confunden con los picos debidos al derivatizante.
Fenilefrina	No se derivatiza o se confunden con los picos debidos al derivatizante.
Pseudoefedrina	No se derivatiza o se confunden con los picos debidos al derivatizante.
Amoxicilina	No se derivatiza o se confunden con los picos debidos al derivatizante.
Ampicilina	No se derivatiza o se confunden con los picos debidos al derivatizante.
Hidroxiclenbuterol	No se derivatiza o se confunden con los picos debidos al derivatizante.

Para lograr cuantificar el CBT con esta técnica será necesario buscar un estándar interno. Esto será realizado en otro proyecto.

Sin embargo es posible el monitoreo del CBT en muestras biológicas con fines de control de dopaje y de igual forma su cuantificación, aunque con un alto coeficiente de variación.

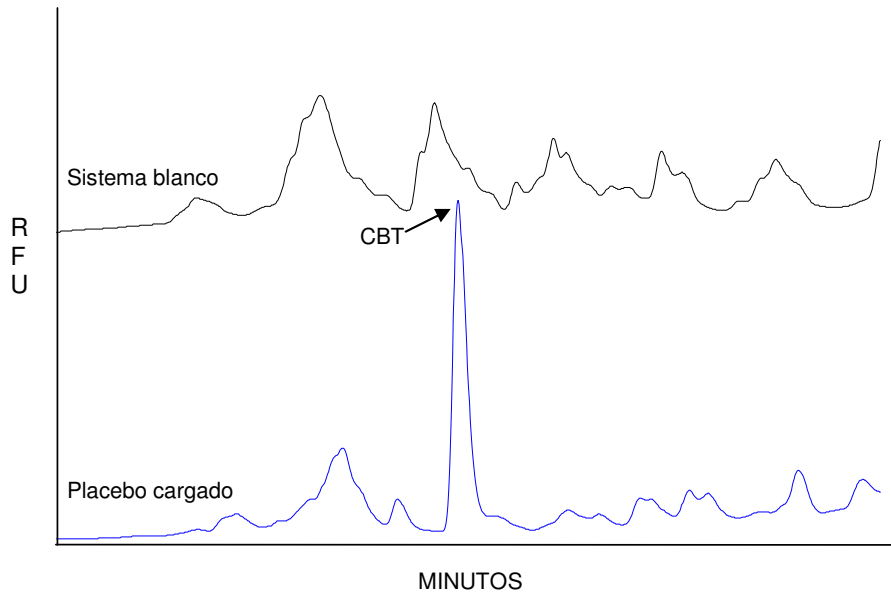
3.12.2. Monitoreo de Clenbuterol en pelo

En este apartado se aplicó a la detección de CBT en pelo humano como posible monitoreo en muestras de dopaje.

Se fortificó un placebo de pelo adicionando 500 μ L de una solución de CBT concentración 10 ppm, de igual forma se preparo un blanco adicionando en lugar de CBT buffer de carbonatos 10 mM.

Se realizó una digestión con NaOH 1 M, posteriormente se adicionó agua y se ajustó a pH de 7. Se realizó extracción líquido-líquido con metil terbutil éter, se evaporó el solvente con flujo de nitrógeno. Se resuspendió en 400 μ l de una solución de FITC. El blanco y la muestra se introdujeron al equipo con las condiciones antes planteadas. Como se muestra en el

electroferograma de la gráfica 3.16 se logró obtener el pico del CBT sin interferencias, aunque falta depurar la técnica de extracción para obtener un sistema blanco limpio.



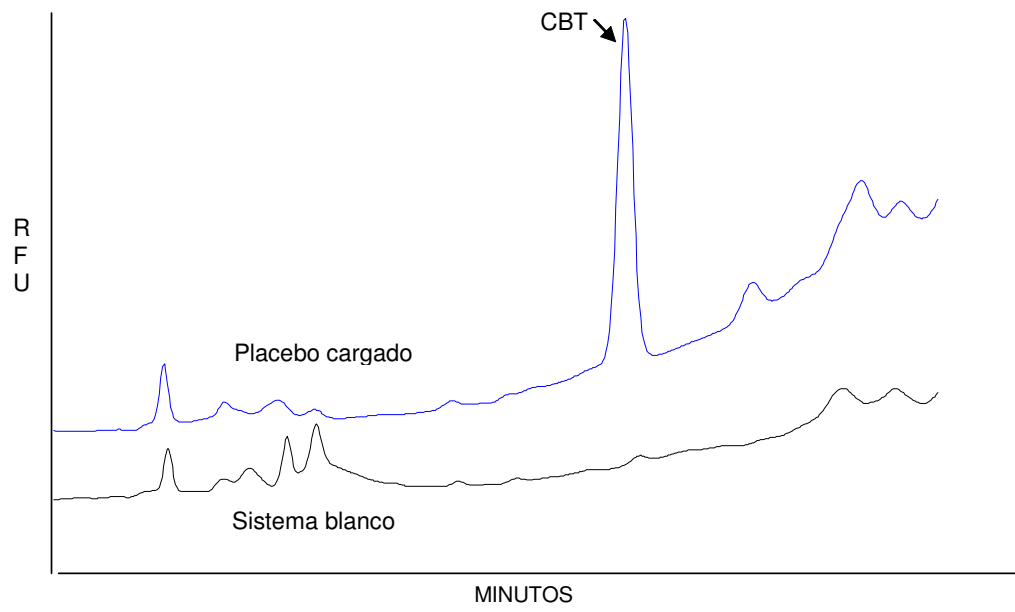
Gráfica 3.16. Electroferograma del blanco y la muestra de pelo cargada de CBT.

3.12.3. Detección de CBT en hígado bovino

Otra de las aplicaciones del método desarrollado fue en hígado bovino debido a que es la más utilizada para el monitoreo y confirmación de la administración de CBT al ganado bovino ya que es uno de los órganos en el que más se acumula.

La muestra de hígado se fortificó con CBT adicionando 1 ml de la solución de clenbuterol [10 ppm], se realizó una digestión ácida con 10 mL de HCl 1 M para disgregar el tejido. Posteriormente se ajustó a pH 7 y se realizó una extracción líquido-líquido con cloroformo. El solvente se evaporó con flujo de nitrógeno, se resuspendió en 400 μ l de una solución de FITC. La muestra y el blanco se introdujeron al equipo con el método antes desarrollado.

Como se muestra en la figura 3.17 se tiene una muy buena señal del CBT sin interferencias debidas a la matriz de hígado bovino.



Gráfica 3.17. Electroferograma del blanco y la muestra de hígado cargada de CBT.

3.13. Resultados generales de los parámetros de validación evaluados

Tabla 3.6. Resultados de los parámetros de validación del sistema y del método desarrollado

PRUEBA	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	VALOR OBTENIDO
Reproducibilidad del sistema	$CV \leq 2\%$ para la respuesta analítica.	1.54 %
Precisión del sistema	$CV \leq 3\%$ para métodos biológicos	1.45 %
Linealidad del sistema	<i>Cantidad adicionada contra cantidad recuperada:</i> $r^2 \geq 0.98$	0.9979
Límite de detección	-----	0.39 ppb
Precisión del método	$CV \leq 3\%$ para métodos biológicos	19.51

CONCLUSIONES

- Se desarrolló un método para cuantificar trazas de CBT en orina bovina, mediante Electroforesis Capilar de Zona acoplada a un Detector de Fluorescencia Inducida por Láser, utilizando la Extracción en Fase Sólida como pretratamiento de la muestra.
- Los parámetros de validación evaluados se encontraron dentro de los límites permitidos, por lo tanto, el sistema es confiable, para ser empleado en el laboratorio. Sin embargo, sólo se evaluó la precisión del método en orina bovina, por lo que, en estudios posteriores deberán evaluarse los parámetros restantes de la validación en el correspondiente fluido biológico.
- Se desarrolló la técnica de preparación para el CBT por Extracción en Fase Sólida, siendo esta metodología muy efectiva en la eliminación de las interferencias de la matriz de orina bovina.
- Se aplicó exitosamente el método desarrollado al análisis de CBT en muestras de pelo, orina e hígado, probando con esto, su utilidad para el monitoreo en pruebas de dopaje y/o uso ilícito en engorda de ganado.

■ Reconocen autoridades incapacidad para controlar el uso de clenbuterol en ganado

Alerta por carne contaminada en Zacatecas

sanos, etc, 17 de mayo. Las autoridades estatales de salud declararon alerta sanitaria por la venta y consumo de carne contaminada con clenbuterol proveniente de Aguascalientes, la cual se vende principalmente en los municipios de Lorena y Villa García, donde se han reportado 46 casos de intoxicación.

De 2004 a la fecha los Servicios de Salud de Zacatecas han registrado 160 casos de personas intoxicadas por consumir carne con clenbuterol y es el primer trimestre se han detectado dos incidentes, informó Alfredo Carrillo Ortiz, titular del departamento de control sanitario.

El médico explicó que el clenbuterol es una sustancia ilegal empleada por ganaderos para la engorda de reses y cerdos, que se concentra en el hígado, los riñones y los intestinos de los animales.

Las personas que consumen carne contaminada sufren aumento del ritmo cardíaco, dolor de cabeza, aumento de la temperatura corporal y náuseas.

El clenbuterol reduce la grasa e incrementa la masa muscular de los animales, "es decir, si un animal tarda un año en aumentar 20 kilos, el clenbuterol hace que en un mes suba ese peso", explicó.

Las autoridades no han podido controlar el uso del clenbuterol, que entra en forma ilícita a México, subrayó.

Carrillo Ortiz informó que los servicios de salud del estado han atendido a personas enfermas por consumir carne contaminada en los municipios de Fresnillo, Zacatecas, Tránsito, Francisco R. Murguía, Nochistlán, Teul de González Ortega, Villa García y Lorena.

Añadió que las autoridades de salud realizan comités sanitarios en los lugares donde se ha detectado la carne contaminada para que la población evite su consumo.

DE LA REDACCIÓN

“Alerta por carne contaminada en Zacatecas”. La Jornada, 18 de Abril del 2006.

Cita PGR a líder de ganaderos Indagan uso de clenbuterol para engordar reses

II A raíz de denuncias interpuestas por la Secretaría de Salud de Querétaro

Juan José Arreola
CORRESPONSAL

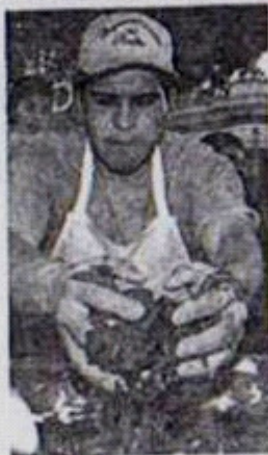
QUERÉTARO, Qro.— La Procuraduría General de la República (PGR) citará al diputado federal Francisco Domínguez Servien para que de manera oficial aporte información en torno a la presunta producción y distribución en Querétaro de la sustancia prohibida clenbuterol, empleada para engordar artificialmente al ganado.

El delegado de la Procuraduría General de la República en Querétaro, Álvaro de la Peña Angulo, confirmó que se investiga el caso referido, a raíz de las denuncias interpuestas por la Secretaría de Salud de Querétaro.

El diputado federal y también presidente de la Unión Ganadera Regional (UGR) en Querétaro, Francisco Domínguez Servien, aseguró en conferencia a la prensa que en la entidad había, por lo menos, una decena de distribuidores de la sustancia clenbuterol.

Igualmente Domínguez Servien afirmó que en el estado de Querétaro había específicamente una persona que elaboraba el citado anabólico.

Y aun cuando cuenta con toda esta información, el diputado federal aceptó que no había procedido a presentar denuncia formal por tal hecho.



EFFECTOS El anabólico aumenta el crecimiento de los músculos

Sin embargo, aseguró que la PGR debería de investigar el caso aun cuando no exista denuncia.

Quiénes consumen carne engordada con clenbuterol pueden manifestar contracciones musculares, palpitaciones, nerviosismo, dolores de cabeza, dolores articulares, mareos, insomnio, vómito, fiebre y náuseas.

El anabólico también tiene la capacidad de aumentar el crecimiento de los músculos y de reducir el tejido

adiposo, causado por la estimulación de adipocitos triciglicéridos y un inhibidor de síntesis de los ácidos grasos.

A fines de agosto del 2000, elementos de la Procuraduría General de la República (PGR) intervinieron las instalaciones de la cooperativa La Montañesa, de donde decomisaron varios costales de clenbuterol.

Álvaro de la Peña Angulo aseguró que tanto a la autoridad federal como a la estatal, la ley les facilita a intervenir en este caso de producción y comercialización de la referida sustancia prohibida.

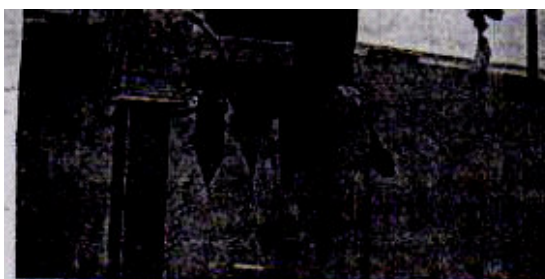
Cuestionado en torno a las declaraciones del diputado federal, Francisco Domínguez, el delegado de la PGR dijo desconocer qué había dicho, pero adelantó que "seguramente lo va a hacer en su momento porque creo que tiene información; lo hará en su momento ante la autoridad correspondiente, ya sea la del estado o la federal".

El delegado de la PGR hizo un llamado al diputado federal del PAN: "Mucho le agradeceríamos al diputado que por responsabilidad institucional dé a conocer esos datos".

Por ahora, explicó, se realizan las indagaciones correspondientes a las denuncias presentadas por la Secretaría de Salud, que por ser un mismo delito, se integran en una sola investigación previa.

"En su momento y si se lo determina el agente del Ministerio Público de la Federación, por su puesto que tendrá que ser llamado a dar a conocer hechos fácticos" puntualizó.

"Indagan uso de clenbuterol para engordar reses". El Universal, 16 de Noviembre del 2006.



GARANTÍA La utilización del anabólico hace que la carne tenga buena textura y el animal muestre buen rendimiento, aseguran

Ganaderos admiten uso de clenbuterol

II Utilizan anabólico prohibido para la engorda de su ganado, en Querétaro

Juan José Arreola
CORRESPONSAL

EZEQUIEL MONTES, Qro.— Ganaderos del municipio queretano de Ezequiel Montes, aceptaron públicamente que emplean clenbuterol para la engorda de su ganado, un anabólico prohibido para tal fin, pues causa daño a las personas que consumen esa carne.

En una carta enviada a algunos medios de comunicación en el estado de Querétaro, productores agrupados en la Unión Ganadera local aseguran que emplean dicha sustancia prohibida para engordar el ganado, ya que solamente así se garantiza que la carne tenga buena textura y el animal muestre un buen rendimiento en canal.

El argumento central de los engordadores de ganado, sin embargo, es el económico, pues aseguran en el escrito que "si no se suministra el rendimiento en canal es muy bajo, tanto así que no sería rentable ni para el engordador, ni para el introductor y tampoco para el tabijero".

Establecen que la dosis que se le suministra al ganado es de dos gramos a lo largo de todo el proceso (100 días); es decir, 20 miligramos de la sustancia al día, pero especifican que la mayoría de los ganaderos le dan un periodo de retiro antes del sacrificio para que elimine cualquier residuo de Clenbuterol.

Por lo anteriormente referido,

aseguran ganaderos de Ezequiel Montes que el debate sobre el clenbuterol nada tiene que ver con asuntos de la salud pública, sino con razones económicas.

De acuerdo a estadísticas de la Unión Ganadera Regional que preside Francisco Domínguez Servién, 80% de la carne de res en canal que se produce en Querétaro se comercializa en el Distrito Federal.

Uso y comercialización

En la carta de referencia también dan a conocer la procedencia del clenbuterol; dicen que les es suministrado principalmente desde los estados de Veracruz y Jalisco, aunque también se comercializa desde Tepic, en la ciudad de México.

En consecuencia, descartan que en el estado de Querétaro haya producción del mismo, que tiene un costo de 24 mil pesos por kilo, cantidad que rinde para 500 toneladas de alimento terminado.

Y si una tonelada de alimento alcanza para dar de comer en un día a 100 toros.

Los productores afirman que por el "desconocimiento" de todos estos elementos, aunado a los comentarios que hicieron desde la semana pasada el diputado federal, Francisco Domínguez Servién, "se ha afectado la industria cárnica del estado, teniendo como consecuencia una merma en la economía de todos los municipios productores de carne."

"Ganaderos admiten uso del clenbuterol". El Universal, 27 de Noviembre del 2006.

ANEXO 2.

CONCEPTOS DE VALIDACIÓN

2.1. Concepto de validación

Proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada.

2.2. Parámetros de validación

2.2.1. Adecuabilidad del sistema.- Verificación de que el sistema (instrumento, analista, equipo, sustancia de referencia, entre otros) opera en base a Criterios preestablecidos, que permitan asegurar la confiabilidad de los resultados de un método analítico.

Metodología.- Inyectar por quintuplicado la solución de adecuabilidad. Reportar la respuesta del analito, calcular el CV y para cada inyección informar cuando proceda:

factor capacidad (K').

resolución (si procede, R).

retención relativa (si procede, Rr).

factor de coleo (T).

número de platos teóricos (N).

Criterios de Aceptación.-

$CV \leq 2\%$ para la respuesta analítica.

Valores superiores deben ser justificados.

Para cada inyección se recomienda:

$$K' > 2$$

$$R < 2$$

$$T < 2$$

La evaluación de la adecuabilidad del sistema se recomienda para todos los métodos analíticos, ya que permite verificar que el sistema de medición funciona apropiadamente, independientemente de las condiciones ambientales. Es conveniente que antes de llevar a cabo la validación del método analítico, se establezcan los criterios apropiados para la operación del sistema de medición, para ser evaluados en la validación y verificados de manera rutinaria al emplear el método analítico. Por ejemplo, en el caso de métodos volumétricos, el volumen de la titulación de blancos y/o de un volumen específico de la solución de referencia; en el caso de métodos fotométricos la lectura de soluciones blanco; entre otros.

2.2.2. Precisión.- Grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto o referencia.

2.2.2.1. Precisión del sistema.

Metodología.- Un analista debe preparar por lo menos un sextuplicado de soluciones a la concentración del analito que represente la concentración de la solución de referencia utilizada, o en ciertos casos, la concentración que represente el 100% de la muestra procesada para su medición; preparadas por dilución o por pesadas independientes. Medir la respuesta analítica bajo las mismas condiciones.

Calcular, S y CV de la respuesta analítica.

Para los sistemas biológicos, se deben cumplir los Criterios de validez inherentes al diseño del bioensayo.

Criterios de aceptación:

CV \leq 1.5% para métodos físico - químicos,

CV \leq 3% para métodos biológicos.

Valores superiores deben ser justificados.

Cualquier otro Criterios de aceptación, debe ser justificado.

2.2.2.2. Precisión del método (Precisión Intermedia o Tolerancia interdía /analista).

Metodología.- Analizar por triplicado una muestra homogénea del producto que tenga un nivel cercano o igual al 100 % (en el caso de contenido/ potencia/ valoración) o una muestra homogénea cuyo contenido esté incluido en el intervalo lineal de concentración de linealidad de método (para el caso de impurezas), en dos días diferentes y por dos analistas diferentes. Utilizar de preferencia la misma sustancia de referencia y los mismos instrumentos y/o equipos. Reportar el contenido / potencia / valoración del analito de todas las muestras.

Calcular la media aritmética (\bar{y}), desviación estándar (S) y coeficiente de variación (CV) del contenido / potencia / valoración, empleando todos los resultados obtenidos.

Criterios de Aceptación.-

CV \leq 2% para métodos cromatográficos y volumétricos.

CV \leq 3% para métodos químicos o espectrofotométricos.

CV \leq 5% para métodos biológicos.

2.2.3. Linealidad.- Habilidad para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática definida, son proporcionales a la concentración del analito, dentro de un intervalo determinado.

2.2.3.1 Linealidad del Sistema.

Metodología.- Un analista debe preparar por lo menos por triplicado 5 niveles de concentración (intervalo) de la solución de referencia ya sea por dilución, a partir de una misma solución concentrada) o por pesadas independientes (cuando no sea posible prepararlas por dilución). La concentración central debe ser igual a la que se prepara la solución de referencia en el método o en ciertos casos, la concentración que represente el 100% en la muestra procesada para su medición. El intervalo debe incluir la especificación para el caso de aquellos métodos utilizados para contenido / potencia / valoración. Medir la respuesta analítica bajo las mismas condiciones de medición, reportar la relación concentración contra respuesta analítica. Calcular el valor de la

pendiente (b_1), la ordenada en el origen (b_0), el coeficiente de determinación (r^2) y el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$). El intervalo está en función del propósito del método, y por lo general se expresa como % de la concentración de la solución de referencia o en función del contenido del analito en la muestra procesada para su medición.

Para contenido / potencia / valoración se sugiere un mínimo de 20%. Para contenido / valoración de impurezas desde un nivel apropiado hasta un 20% por arriba de la especificación.

Para métodos indicadores de estabilidad desde un nivel apropiado hasta un 120%.

Es crítico que el intervalo no excluya valores de concentración que potencialmente puedan dar lugar al contenido del analito en la muestra.

Criterios de Aceptación:

$$r^2 \geq 0.98$$

$IC(\beta_1)$, no debe incluir el cero.

Es conveniente trazar la gráfica la concentración (x) contra la respuesta analítica (y), e incluir en ella la ecuación, la línea de ajuste y el coeficiente de determinación.

Metodología: Partiendo de la experiencia en el análisis de la muestra, se deben establecer las posibles sustancias interferentes, y adicionar cantidades conocidas de éstas, solas o combinadas a la muestra y evaluar su respuesta al método, bajo las mismas condiciones de análisis.

Para métodos de identificación: Se deben seleccionar sustancias que potencialmente interfieran en la determinación con base en la estructura molecular del analito, precursores, sustancias relacionadas, vías degradativas, entre otros.

Para métodos de contenido / potencia / valoración: Se deben analizar placebos del producto, como lo indica el método, muestras de producto, y cuando proceda:

- sustancias relacionadas;
- precursores;

-homólogos;

y una mezcla del producto con ellos o cualquiera de ellos.

Para métodos de contenido / valoración de impurezas: Si se dispone de las impurezas se deben adicionar éstas al analito y/o a la muestra analítica en niveles que incluya la especificación. Analizar como lo indica el método. Cuando no se dispone de éstas, la muestra que contiene el analito debe someterse a condiciones que generen su inestabilidad química (luz, calor, humedad, hidrólisis ácido-básica y oxidación) y aplicar el método a la muestra resultante.

Para métodos de límite de impurezas: Proceder a *analizar* muestras individuales de la impureza (orgánicas, inorgánicas o solventes residuales), el producto (de *pureza* aceptable) y la mezcla de estos, como lo indica el método.

Para métodos indicadores de estabilidad: En caso de contar con los productos de degradación, preparar muestras con placebo adicionado de estos, el placebo adicionado de analito, el placebo adicionado de analito y de productos de degradación y analizar con el método.

Si no se cuenta con los posibles productos de degradación se pueden emplear, dependiendo de la naturaleza química del analito y si es posible, las siguientes condiciones para favorecer la inestabilidad del analito en la muestra:

1. Someter el analito, el placebo y la muestra en un horno a 70° -120° C ó a 20° C por debajo del punto de fusión del analito de 2 a 4 semanas.
2. Exponer el analito, placebo y muestra a luz UV, fluorescente y/o humedad relativa, por un tiempo apropiado.
3. Hacer soluciones del analito, ajustando el pH de 1 a 2 y/o de 10 a 12 y someterlas a 60° C - 80° C por un tiempo apropiado.
4. Para formas farmacéuticas líquidas o semisólidas, adicionar peróxido de hidrógeno para favorecer oxidación del analito.

Estos estudios no se deben de llevar a cabo para analitos que según la bibliografía, tengan propiedades reactivas que puedan dar lugar a

condiciones inseguras al someterlas muestras a las condiciones antes mencionadas.

El tiempo y las condiciones se seleccionan con el fin de degradar al analito a niveles de un 15 a 30%.

En el caso de métodos no selectivos, como por ejemplo los métodos que utilizan sistemas de medición volumétricos, la especificidad para los componentes de una muestra, es sustentada con los resultados de exactitud y linealidad del método, si el método cumple con los Criterios de aceptación.

Cuando haya duda en la demostración de la especificidad de un método analítico, se sugiere que sea investigada por otra metodología de soporte.

Criterios de Aceptación:

La respuesta del método únicamente debe ser debida al analito.

2.2.3.1. Linealidad del Método

Metodología.

A) Se conocen los componentes de la muestra y es posible preparar un placebo analítico.

Un analista debe preparar el placebo analítico con el tipo de componentes que generalmente están presentes en la muestra. A la cantidad de placebo analítico equivalente a una muestra analítica por triplicado, adicionarle la cantidad de analito (puede ser una sustancia de referencia secundaria) correspondiente al 100% de éste en la muestra. Seleccionar al menos dos niveles, superior e inferior de la cantidad del analito (intervalo) y preparar el placebo adicionado al menos por triplicado a cada nivel, manteniendo constante la cantidad de placebo analítico en los tres niveles. Los placebos adicionados deben ser analizados por un mismo analista bajo las mismas condiciones, utilizando como referencia, la sustancia empleada en la adición al placebo analítico. Determinar la cantidad recuperada del analito

B) No se conocen los componentes de la muestra.

Un analista debe analizar la muestra con el método, para determinar el contenido del analito. El mismo analista debe preparar por lo menos 3

muestras adicionadas, por ejemplo utilizando la mitad de la muestra analítica que originalmente requiere el método y adicionar el analito (puede ser una sustancia de referencia secundaria) hasta completar lo que represente el 100% de éste en la muestra. Seleccionar al menos dos niveles, superior e inferior de la cantidad del analito (intervalo) y preparar la muestra adicionada al menos por triplicado a cada nivel, manteniendo constante la cantidad de muestra en los tres niveles. Las muestras adicionadas deben ser analizadas por un mismo analista bajo las mismas condiciones utilizando como referencia la sustancia empleada en la adición de la muestra. Determinar la cantidad recuperada del analito.

Cuando no sea posible adicionar de manera directa el analito a la muestra, la adición puede ser llevada a cabo en alguna etapa del método. Se recomienda que la adición se lleve a cabo en las primeras etapas del método, para poder asegurar que las etapas posteriores, no den lugar a resultados incorrectos. Por ejemplo, si una muestra se debe extraer, filtrar y diluir, es conveniente que la adición se lleve a cabo antes de extraer; ya que si existiera algún problema con la extracción o con la filtración, y el analito se adiciona a la muestra o placebo analítico hasta antes de diluir, puede dar lugar a resultados incorrectos.

El intervalo de la concentración del analito adicionado, depende del propósito del método y debe incluir la especificación. La siguiente tabla sugiere intervalos para el estudio de linealidad, en la cual la especificación se maneja como porcentaje, como por ejemplo el 100% puede representar 100 mg/ g de muestra, 10 ppm, 5 mg/mL, etc.

Reportar la relación cantidad adicionada contra cantidad recuperada. Utilizando el método de estimación por mínimos cuadrados, calcular el valor de la pendiente (b_1), la ordenada en el origen (b_0), el coeficiente de determinación (r^2), el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$), el intervalo de confianza para la ordenada al origen ($IC(\beta_0)$) y el coeficiente de variación de regresión ($CV_{y/x}$).

Calcular el porcentaje de recobro de cada placebo adicionado o muestra adicionada, al obtener el cociente de la Cantidad recuperada respecto de la cantidad adicionada expresada en porcentaje. Calcular el promedio aritmético (\bar{y}), la desviación estándar (S), el coeficiente de variación (CV) y el intervalo de confianza para la media poblacional IC(β) del porcentaje de recobro.

Criterios de Aceptación:

Cantidad adicionada contra cantidad recuperada:

$$r^2 \geq 0.98$$

El IC(β_1) debe incluir la unidad.

El IC(β_0) debe incluir el cero.

El CV $_{y/x}$ del porcentaje de recobro,

no debe ser mayor de 2% si el método es cromatográfico,

no mayor de 2% si el método es volumétrico,

no mayor de 3% si es químico o espectrofotométrico,

no mayor del 5% si es microbiológico

no mayor a una magnitud preestablecida, acorde a la especificación del analito en la muestra.

Porcentaje de recobro:

El IC(β) debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo:

98 -102% si el método es cromatográfico.

98 -102% si el método es volumétrico,

97 -103% si el método es químico o espectrofotométrico,

95 - 105% si el método es microbiológico.

El CV del porcentaje de recobro:

no debe ser mayor de 2% si el método es cromatográfico,

no mayor de 2% si el método es volumétrico,

no mayor de 3% si es químico o espectrofotométrico

no mayor del 5% si es microbiológico

no mayor a una magnitud preestablecida, acorde a la especificación del analito en la muestra.

Cualquier otro Criterios de aceptación, debe ser justificado.

Es conveniente trazar la gráfica de la cantidad adicionada (x) contra la cantidad recuperada (y), e incluir la ecuación, su línea y el coeficiente de determinación.

2.2.4. Exactitud y Repetibilidad del Método.- Concordancia entre un valor obtenido empleando el método y el valor de referencia.

Metodología.

A) Se conocen los componentes de la muestra y es posible preparar un placebo analítico.

Un analista debe preparar el placebo analítico con el tipo de componentes que generalmente están presentes en la muestra. A la cantidad de placebo analítico equivalente a una muestra analítica por sextuplicado, adicionarle la cantidad de analito (puede ser una sustancia de referencia secundaria) correspondiente al 100% de este en la muestra. Los placebos adicionados deben ser analizados por un mismo analista bajo las mismas condiciones, utilizando como referencia, la sustancia empleada en la adición al placebo analítico. Determinar la cantidad recuperada del analito.

B) No se conocen los componentes de la muestra.

Un analista debe analizar la muestra con el método, para determinar el contenido del analito. El mismo analista debe preparar por lo menos 6 muestras adicionadas del analito, por ejemplo utilizando la mitad de la muestra analítica que originalmente requiere el método y adicionar el analito (puede ser una sustancia de referencia secundaria) hasta completar lo que represente el 100% de éste en la muestra. Las muestras adicionadas deben ser analizadas por un mismo analista bajo las mismas condiciones utilizando como referencia la sustancia empleada en la adición de la muestra. Determinar la cantidad recuperada del analito.

Cuando no sea posible adicionar de manera directa el analito a la muestra, la adición puede ser llevada a cabo en alguna etapa del método. Se recomienda que la adición se lleve a cabo en las primeras etapas, para poder asegurar que las etapas posteriores no den lugar a resultados incorrectos. Por ejemplo, si una muestra se debe extraer, filtrar y diluir, es conveniente que la adición se lleve a cabo antes de extraer, ya que si existiera algún problema con la extracción o con la filtración, y el analito se adiciona al placebo analítico o la muestra hasta antes de diluir, puede dar lugar a resultados incorrectos.

Calcular el porcentaje de recobro de cada placebo analítico o muestra adicionada, al obtener el cociente de la cantidad recuperada respecto de la cantidad adicionada expresada en porcentaje.

Calcular el promedio aritmético (\bar{y}), la desviación estándar (S), el coeficiente de variación (CV) y el intervalo de confianza para la media poblacional IC(β) del porcentaje de recobro.

Criterios de Aceptación:

El IC (β) debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo:

98 -102% si el método es cromatográfico,

98 - 102% si el método es volumétrico,

97 -103% si el método es químico o espectrofotométrico,

95 -105% si el método es microbiología),

El CV del porcentaje de recobro:

no debe ser mayor de 2% si el método es cromatográfico,

no mayor de 2% si el método es volumétrico,

no mayor de 3% si es químico o espectrofotométrico,

no mayor del 5% si es microbiológico,

no mayor a una magnitud preestablecida, acorde a la especificación del analito en la muestra.

Cualquier otro criterio de aceptación, debe ser justificado.

2.2.4. Límite de Detección.- Concentración mínima del analito de una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.

Para la estimación del límite de detección se sugieren los siguientes procedimientos:

LD con base en señal de Ruido.

Metodología:

Este procedimiento aplica a métodos que utilizan instrumentos para medir la respuesta analítica y que presentan una señal de ruido basal. Un analista debe determinar la respuesta de muestras blanco (reactivos, placebos analíticos, etc., según proceda) y la respuesta de muestras analíticas (analito, placebos adicionados, según proceda) en un intervalo de concentraciones del analito que incluya la especificación de la prueba de impurezas límite. Determinar aquella cantidad del analito que genere una respuesta con respecto a la muestra blanco en una proporción de por lo menos de 3 a 1, lo que corresponde a la concentración asociada al límite de detección. Este procedimiento se utiliza para verificar el límite de detección estimado por otros procedimientos.

Criterios de Aceptación:

El LD debe ser menor a la especificación de la prueba de impurezas límite

LD con base en curva de calibración v desviación estándar de los blancos.

Metodología:

Este procedimiento aplica tanto a métodos instrumentales como a no instrumentales. Un analista debe preparar por lo menos 3 concentraciones de la sustancia de interés (analito, placebos adicionados, etc.; según proceda) a valores menores o que incluya la especificación de la prueba de impurezas límite; ya sea por dilución o por pesada independiente del analito. Simultáneamente, preparar por lo menos 5 blancos (reactivos, placebos analíticos, etc.; según proceda). Medir las respuestas analíticas. Para la curva de calibración, sin incluir los blancos, calcular el valor de la pendiente (b_1), el coeficiente de

determinación (r^2) y el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$). Para los blancos, calcular la desviación estándar (S_b) de los blancos. Calcular el límite de detección con la siguiente ecuación:

$$LD = \frac{3.3xS_b}{b_1}$$

El valor estimado LD debe ser verificado utilizando el procedimiento de la señal de ruido.

Criterios de Aceptación:

$$r^2 \geq 0.98$$

($IC(\beta_1)$), no debe incluir el cero.

El LD debe ser menor a la especificación de la prueba de impurezas límite.

Cualquier otro Criterios de aceptación, debe ser justificado.

LD con base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión.

Metodología:

Este procedimiento aplica tanto a métodos instrumentales como a no instrumentales. Un analista debe preparar por lo menos 3 concentraciones de la sustancia de interés (analito, placebos adicionados, etc.; según proceda) a valores menores o que incluya la especificación de la prueba de impurezas límite; ya sea por dilución o por pesada independiente del analito. Medir las respuestas analíticas. Calcular el valor de la pendiente (b_1), el coeficiente de determinación (r^2), la desviación estándar de regresión ($S_{y/x}$) y el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$). Calcular el límite de detección con la siguiente ecuación.

$$LD = \frac{3.3xS_{y/x}}{b_1}$$

El valor estimado LD debe ser verificado utilizando el procedimiento de la señal de ruido.

Criterios de Aceptación:

$$r^2 \geq 0.98$$

($IC(\beta_1)$), no debe incluir el cero.

El LD debe ser menor a la especificación de la prueba de impurezas límite.

Cualquier otro criterio de aceptación, debe ser justificado.

LD con base en la curva de calibración y la desviación estándar de la ordenada al origen.

Metodología:

Este procedimiento aplica tanto a métodos instrumentales como a no instrumentales. Un analista debe preparar por lo menos 3 concentraciones de la sustancia de interés (analito, placebos adicionados, etc.; según proceda) a valores menores o que incluya la especificación de la prueba de impurezas límite; ya sea por dilución o por pesada independiente del analito. Medir las respuestas analíticas. Calcular el valor de la pendiente (b_1), el coeficiente de determinación (r^2), la desviación estándar de la ordenada al origen (S_{b_0}) y el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$). Calcular el límite de detección con la siguiente ecuación:

$$LD = \frac{3.3 \times S_{b_0}}{b_1}$$

El valor estimado LD debe ser verificado utilizando el procedimiento de la señal de ruido.

Criterios de Aceptación:

$$r^2 \geq 0.98$$

($IC(\beta_1)$), no debe incluir el cero.

El LD debe ser menor a la especificación de la prueba de impurezas límite.

2.2.5. Límite de Cuantificación.- Concentración mínima del analito, que puede ser determinada con precisión y exactitud establecidas, bajo las condiciones de operación establecidas.

Para la estimación del límite de cuantificación se sugieren los siguientes procedimientos:

Señal de Ruido.

Metodología:

Este procedimiento aplica a métodos que utilizan un instrumento para medir la respuesta analítica y que presentan una señal de ruido basal. Un analista debe determinar la señal de muestras blanco (reactivos, placebos, etc., según proceda) y la señal analítica de muestras (analito, placebos adicionados, según proceda) a concentraciones conocidas del analito, inferiores o que incluya la especificación del contenido / valoración de la prueba de impurezas. Determinar aquella cantidad del analito cuya señal sea similar o mayor a la de la muestra blanco en una proporción de 10 a 1, lo que corresponde a la cantidad asociada al límite de cuantificación. Es necesario verificar que dicha cantidad corresponda al límite de cuantificación, evaluando la exactitud y repetibilidad del valor estimado.

Criterios de Aceptación:

El LC debe ser menor a la especificación del contenido / valoración de la prueba de impurezas.

LC con base en la curva de calibración y la desviación estándar de los blancos.

Metodología: Este procedimiento aplica tanto a métodos instrumentales como a no instrumentales. Un analista debe preparar por lo menos 3 concentraciones de la sustancia de interés (analito, placebos adicionados, etc., según proceda) a valores menores o que incluya la especificación de contenido / valoración de la prueba de impurezas, ya sea por dilución o por pesada independiente del analito. Simultáneamente, preparar por lo menos 5 blancos (reactivos, placebos, etc., según proceda). Medir las respuestas analíticas. Calcular el valor de la pendiente (b_1), el coeficiente de determinación (r^2) y el intervalo de confianza para la pendiente $IC(\beta_1)$. Para los blancos, calcular la desviación estándar de los blancos. Calcular el límite de cuantificación con la siguiente ecuación:

$$LC = \frac{10xS_b}{b_1}$$

Evaluar la exactitud y repetibilidad del valor estimado del límite de cuantificación.

Criterios de Aceptación:

$$r^2 \geq 0.98$$

IC(β_1), no debe incluir el cero.

El LC debe ser menor a la especificación del contenido / valoración de la prueba de impurezas

Cualquier otro Criterios de aceptación, debe ser justificado.

LC con base en la curva de calibración basado en la desviación estándar de regresión.

Metodología:

Este procedimiento aplica tanto a métodos instrumentales como a no instrumentales. Un analista debe preparar por lo menos 3 concentraciones de la sustancia de interés (analito, placebos adicionados, etc., según proceda) a valores menores o que incluya la especificación de contenido / valoración de la prueba de impurezas, ya sea por dilución o por pesada independiente del analito. Medir las respuestas analíticas. Calcular el valor de la pendiente (b_1), el coeficiente de determinación (r^2), la desviación estándar de regresión ($S_{y/x}$) y el intervalo de confianza para la pendiente (IC(β_1)). Calcular el límite de cuantificación con la siguiente ecuación:

Evaluar la exactitud y repetibilidad del valor estimado del límite de cuantificación.

Criterios de Aceptación:

$$r^2 \geq 0.98$$

IC(β_1), no debe incluir el cero.

El LC debe ser menor a la especificación del contenido / valoración de la prueba de impurezas.

LC con base en la curva de calibración y la desviación estándar de la ordenada al origen.

Metodología:

Esté procedimiento aplica tanto a métodos instrumentales como a no instrumentales. Un analista debe preparar por lo menos 3 concentraciones de la sustancia de interés (analito, placebos

adicionados, etc., según proceda) a valores menores o que incluya la especificación de contenido / valoración de la prueba de impurezas, ya sea por dilución o por pesada independiente del analito. Medir las respuestas analíticas. Calcular el valor de la pendiente (b_1), el coeficiente de determinación (r^2), la desviación estándar de la ordenada al origen (S_{b_0}) y el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$). Calcular el límite de cuantificación con la siguiente ecuación:

Evaluar la exactitud y repetibilidad del valor estimado de! límite de cuantificación.

Criterios de Aceptación:

$$r^2 \geq 0.98$$

$IC(\beta_1)$, no debe incluir el cero.

El LC debe ser menor a la especificación del contenido / valoración de la prueba de impurezas (Guía de Validación, CNQFB).

ANEXO 3.

CALCULO DEL LÍMITE DE DETECCIÓN BASADO EN LA CURVA DE CALIBRACIÓN.

Símbolos

b_0 = ordenada al origen

b_1 = pendiente

n = número de mediciones = 16

S_{b_0} = desviación estándar de la ordenada al origen

$S_{y/x}$ = desviación estándar de regresión

LD = límite de detección

Fórmulas

$$LD = \frac{3.3 \times S_{b_0}}{b_1}$$

$$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$$

$$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

$$S_{b_0} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(\bar{x})^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n - 2}}$$

Cálculos

Tabla 1. Cálculo de las sumatorias, cuadrados y multiplicación.

Número de muestra	x Conc [ppb]	y Área (x10 ⁴)	xy	y ²	x ²
1	0	0	0	0	0
2	2	49548	99096	2455004304	4
3	2	46109	92218	2126039881	4
4	2	48114	96228	2314956996	4
5	4	91508	366032	8373714064	16
6	4	90125	360500	8122515625	16
7	4	90108	360432	8119451664	16
8	8	178124	1424992	31728159376	64
9	8	172253	1378024	29671096009	64
10	8	171643	1373144	29461319449	64
11	12	256085	3073020	65579527225	144
12	12	258955	3107460	67057692025	144
13	12	270342	3244104	73084796964	144
14	16	352356	5637696	1.24155E+11	256
15	16	336623	5385968	1.13315E+11	256
16	16	332771	5324336	1.10737E+11	256
Sumatoria	126	2744664	31323250	6.76301E+11	1452
		Media aritmética	7.875		

$$b_1 = \frac{16(31323250) - (126 \times 2744667)}{16(1452) - (126)^2} = 21117.99$$

$$b_o = \frac{2744664 - (21117.99 \times 126)}{16} = 5237.32$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{6.7630E+11 - (21119.99 \times 31323250) - (5237.32 \times 2744664)}{16 - 2}} = 5279.67$$

$$S_{b_o} = 5279.67 \sqrt{\frac{1}{16} + \frac{62.0156}{1452 - \frac{15876}{16}}} = 2345.68$$

$$LD = \frac{3.3 \times 2345.68}{21117.99} = 0.36 \text{ ppb}$$

ANEXO 4.

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ϵ	constante dieléctrica del medio
μ_{eo}	coeficiente del flujo electroosmótico
A	absorbancia
a	absortividad molar
ANTS	9-aminoftaleno-1,4,6 trisulfonato
APTS	9-aminopireno-1,4,6 trisulfonato
AU	unidades de absorbancia
b_0/b	ordenada al origen
b_1/m	pendiente
CBQCA	3-(4-carboxibenzoil)-quinolona-2-carboxialdehído
CBT	Clenbuterol
CBT-FITC	complejo de clenbuterol con el Isotiocianato de fluoresceína
CCM	concentración crítica micelar
CCME	Cromatografía Capilar Micelar Electrocinética
C-PAGE	Electroforesis Capilar en Gel de Poliacrilamida
CV	coeficiente de variación
DAD	detector de arreglo de diodos
ECG	Electroforesis Capilar en Gel
ECIE	enfocamiento capilar isoeléctrico
ECZ	Electroforesis Capilar de Zona
FEO	flujo electroosmótico
FITC	isotiocianato de fluoresceína
$h\nu_{EM}$	energía de emisión
$h\nu_{EX}$	energía de excitación
HCl	ácido clorhídrico
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
I	interferencia
IAF	5-iodo-acetomidofluoresceína

IC(β_0)	intervalo de confianza para la ordenada al origen
IC(β_1)	intervalo de confianza para la pendiente
I_{in}	intensidad de la luz de entrada
I_{out}	intensidad de la luz de salida
ITFC	Isotacoforesis Capilar
K'	factor de capacidad
kV	kilovolts
LC	límite de cuantificación
LD	límite de detección
LIF/FIL	fluorescencia inducida por láser
M	concentración molar
MAPS	(metiacriloxiloxipropil) trimetoxysilan
mM	concentración milimolar
N	eficiencia
N	número de platos teóricos
nA	nanoemperes
NA	número de agregación
NaOH	hidróxido de sodio
NBD-F	4-fluoro-7-nitrobenceno-2-oxa-1,3-diazol
NDA	naftaleno 2,3-dicarboxialdehído
OPA	ortoftaldehído
pA	picoamperes
PAD	detector de arreglo de fotodiodos
pH	potencial hidrógeno
ppb	partes por billón
ppm	partes por millón
psi	medida de presión
R	resolución
r^2	coeficiente de determinación
RFU	unidades de fluorescencia
Rr	retención relativa
Rs	resolución

S	desviación estándar
S ₀	estado basal
S ₁	estado excitado relajado
S ₁ '	estado excitado
STD	estándar
T	factor de coleo
t	tiempo
T	transmitancia
TM	tiempo de migración
UV	rayos ultravioleta
V _{eo}	velocidad lineal del flujo electroosmótico
y	media arimética
ζ	potencial zeta
η	viscosidad
λ	longitud de onda
μA	micro amperes

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. "Crecen casos de intoxicación por res contaminada". El Universal, 20 de Noviembre del 2005.
2. "Alerta por carne contaminada en Zacatecas". La Jornada, 18 de Abril del 2006.
3. "Indagan uso de clenbuterol para engordar reses". El Universal, 16 de Noviembre del 2006.
4. "Ganaderos admiten uso del clenbuterol". El Universal, 27 de Noviembre del 2006.
5. "Prohíben la venta de hígado ante riesgos por clenbuterol". El Grafico, 23 de Febrero del 2007.
6. Norma Oficial Mexicana de Emergencia 015-ZOO-2002.
7. Maryadele, J.; Smith, A. y Heckelman, P. The Index merck. Décimo tercera ed. Edit. Merck and Co., E.U.A. (2001) 409-410.
8. Botsoglou, N. y Fletouris, D. Drug Residue in Foods. Edit. Dekker, New York, E.U.A. (2001) 214-219, 278-279, 1080-1081.
9. Posyniak, A.; Zmudzki, J. y Niedzielska, J. Screening procedures for clenbuterol residue determination in bovine urine and liver matrices using enzyme-linked immunosorbent assay and liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 483 (2003) 61-67.
10. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. 52ava ed. Edit. Thomson, México (2006) 2570.
11. Brambilla, G.; Cenci, T.; Franconi, F.; Galarini, R. y Macrì, A. Clinical and pharmacological profile in a clenbuterol epidemic poisoning of contaminated beef meat in Italy. *Toxicology Letters*, 114 (2000) 47-53.
12. Soporano, S.; Grasso, L.; Esposito, M. y Olivero, G. Clenbuterol residues in non-liver containing meat as a cause of collective food poisoning. *Veterinarian Human Toxicology*, 40 (1998) 141-143.
13. Sears, M. Adverse effects of beta-agonists. *Journal of Allergy Clinical Immunology*, 110 (2002) 322.

14. Courtheryn, D.; Le Bizec, B.; Brambilla, G. y De Brabander, F. Recent developments in the use and abuse of growth promoters. *Anal. Chim. Acta*, 473 (2002) 71-82.
15. Kootstra, P.; Kuijpers, C.; Wubs, K. y van Doorn, D. The analysis of beta agonists in bovine muscle using molecular imprinted polymers with ion trap LCMS screening. *Anal. Chim. Acta*, 529 (2005) 75-81.
16. Blanca, J.; Muñoz, P.; Morgado, M.; Méndez N. Determination of clenbuterol, ractopamine and zilpaterol in pig liver and urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 529 (2005) 199-205.
17. Machnik, M.; Geyer, H.; Horning, S.; Breidbach, A.; Delahaut, P. y Schänzer, W. Long-term detection of clenbuterol in human scalp hair by gas chromatography-high-resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 723 (1999) 147-155.
18. Ramos, F.; Santos, C.; Silva, A. y Noronha, M. Beta2-Adrenergic agonist residues: simultaneous methyl- and butylboronic derivatization for confirmatory analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatog. B*, 716 (1998) 366-370.
19. Ortiz, J.; Alcocer, V. y Castellanos, A. Determinación de clenbuterol por el método de gases/masas y su cuantificación en bovinos sacrificados en dos rastros. *Téc. Pecu Méx.*, 43 (2005) 57-67.
20. Keskin, S.; Ozer, D.; Temizer, A. Gas chromatography mass spectrometric analysis of clenbuterol from urine. *J. of Pharm. and Biomedical Anal.*, 18 (1998) 639-644.
21. Smyth, W.; Harland, G.; McClean, S.; McGrath, G. y Oxspring, D. Effect of on-capillary large volume sample stacking on limits of detection in the capillary zone electrophoretic determination of selected drugs, dyes and metal chelates. *J. Chromatog. A*, 772 (1997) 161-169.
22. Gausepohl, C. y Blaschke, G. Stereoselective determination of clenbuterol in human urine by capillary electrophoresis. *J. Chromatog. B*, 713 (1998) 443-446.
23. Brunis, C.; Jaronimus-Strating, C.; Ensing, K. y van Dongen, W. On-line coupling of solid-phase extraction with mass spectrometry for the analysis

-
-
- of biological samples I. determination of clenbuterol in urine. *J. Chromatog. A*, 863 (1999) 115-122.
24. Ramos, F.; Cristino, A. y Carrola, P. Clenbuterol food poisoning diagnosis by gas chromatography-mass spectrometric serum analysis, *Anal. Chim. Acta*, 483 (2003) 207-213.
25. Berggren, C.; Bayouth, S.; Sherrington, D. Use of molecularly imprinted solid phase extraction for the selective clean up of clenbuterol from claf urine, *J. Chromatog. A*, 889 (2000) 105-110.
26. García, I.; Sarabia, L.; Cruz, M. y Aldama, J. Three way models and detección capability of a gas chromatography-mass spectrometry method for the determination of clenbuterol in several biological matrices, *Anal. Chi. Acta*, 515 (2004) 55-63.
27. Cristino, A.; Ramos, F. y Norohha, M. Control of the illegal use of clenbuterol in bovine production. *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 32 (2003) 311-316.
28. Heiger, N. High performance capillary electrophoresis. Tercera ed. Edit. HP Co., Francia (1997) 13-15, 36, 42.
29. Baker, D. Capillary Electrophoresis. Edit. John Wiley & sons, Inc., E.U.A. (1995) 1-16, 19-20, 23, 44-50, 53-55, 74, 80, 84, 94, 100-115, 122-132.
30. Foret, F.; Bocek, T. y Krivánková, L. Capillary Zone Electrophoresis. Edit. VCH, Alemania (1993) 135-140.
31. Haugland, R. Handbook of Fluorescent Probes and Research Products. Novena ed. Edit. Molecular Probes Inc., E.U.A. (2002) 1-3.
32. Reglamento (CE) No. 2391/2000 de la Comisión de las Comunidades Europeas, 27 de Octubre del 2000.
33. MIP Technologies, MIP4SPE Application note: A1001.