



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**DETERMINACIÓN DE CLENBUTEROL EN HÍGADO DE BOVINO
UTILIZANDO TÉCNICAS DE MICROEXTRACCIÓN Y CROMATOGRFÍA
DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC-MS)**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA:

LUIS ÁNGEL MARBÁN ESCAMILLA



MÉXICO, D.F.

2014



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Saldívar y Osorio Liliana Virginia Raquel

VOCAL: Profesor: Rojo Callejas Francisco

SECRETARIO: Profesor: Elizalde Torres Josefina

1er. SUPLENTE: Profesor: Peña Álvarez Araceli Patricia

2° SUPLENTE: Profesor: García Ramírez Gloria

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 102, División de estudios de Posgrado, Facultad de Química, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

M. en C. Francisco Rojo Callejas

SUSTENTANTE:

Luis Ángel Marbán Escamilla



ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	I
1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
1.1 Introducción	1
1.2 Objetivo general	3
1.3 Objetivos particulares.....	3
2. ANTECEDENTES	4
2.1 La carne de bovino.....	4
2.2 El hígado	6
2.3 Abastecimiento en México	7
2.4 Agentes promotores del crecimiento	9
2.5 Clenbuterol.....	10
2.5.1 Aplicaciones.....	11
2.5.2 Casos positivos en México	13
2.5.3 Efectos a la salud.....	15
2.5.4 Legislación	16
2.6 Preparación de muestra	20
2.7 Microextracción en fase sólida	22
2.8 Microextracción en fase líquida utilizando fibra hueca	26
2.9 Derivatización.....	30
2.10 Cromatografía de gases.....	33
2.11 Espectrometría de masas	36
3. METODOLOGÍA.....	39
3.1 Equipo y material	39
3.2 Reactivos	40
3.3 Muestras	40
3.4 Preparación de las disoluciones.....	41
3.5 Preparación del blanco de hígado enriquecido	41
3.6 Preparación de hígado de referencia con 2 µg/L	41



3.7 Preparación de las muestras de hígado enriquecidas	41
3.8 Tratamiento de las muestras de hígado	41
3.9 Extracción por SPME	42
3.10 Extracción y derivatización por HF-LPME en un paso	42
3.11 Extracción por HF-LPME seguida de la derivatización.	42
3.12 GC-MS	43
3.13 Recobro y comparación de las técnicas.....	44
3.14 Linealidad.....	45
3.15 Precisión	45
3.16 Límite de detección	45
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
4.1 Identificación del clenbuterol y del clenbuterol-TMS	46
4.2 Extracción y derivatización por SPME	49
4.3 Extracción y derivatización por HF-LPME en un paso	51
4.4 Extracción por HF-LPME seguida de la derivatización	55
4.5 Recobro y comparación de las técnicas.....	59
4.6 Efecto del pH.....	60
4.7 Linealidad.....	61
4.8 Límite de detección	63
4.9 Muestras de mercados y enriquecidas.....	64
4.10 Costos.....	65
5. CONCLUSIONES.....	66
6. PERSPECTIVAS.....	68
7. BIBLIOGRAFÍA	69
8. ANEXO 1.....	76
9. ANEXO 2.....	91

**ABREVIATURAS**

μL: Microlitro

μm: Micrómetro

ADI: Ingesta diaria admisible

ANOVA: Análisis de varianza

BIP: purificador integrado

BSA: Bistrimetilsililacetamida

BSTFA: Bistrimetilsililtrifluoroacetamida

CAR/PDMS: Carboxen/ Polidimetilsiloxano

CENAM: Centro Nacional de Metrología

cm: Centímetro

COFEPRIS: Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios

COMECARNE: Consejo Mexicano de la carne

CTM: Confederación de Trabajadores de México

CV: Coeficiente de variación

CW/DVB: Carbowax/Divinilbenceno

DVB/CAR/PDMS: Divinilbenceno/ Carboxen/ Polidimetilsiloxano

ECD: Detector de captura de electrones

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

DLLME: Microextracción líquido-líquido dispersiva

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación



FEP: Propileno etileno fluorados

FID: Detector de ionización de llama

FIFA: Federación Internacional de Fútbol Asociación

FPD: Detector de fotometría de llama

g: gramo

GC: Cromatografía de gases

GC-MS: Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

HF-LPME: Microextracción en fase líquida con fibra hueca

HMDS: Hexametildisilazano

HPLC: Cromatografía de alta resolución

HS-SPME: Microextracción en fase sólida en el vapor sobrenadante

in: pulgadas

kg: Kilogramo

LLE: Extracción líquido-líquido

LPME: Microextracción en fase líquida

m: Metro

M: Molar

mg: Miligramo

min: Minuto

mL: Mililitro

mm: Milímetro



MLB: Grandes Ligas de Béisbol

MRL: Límite máximo de residuos

MS: Espectrometría de masas

MTBSTFA: N-metil-N-t-butildimetilsililtrifluoroacetamida

MXN: Peso mexicano

NIST: Instituto Nacional de Estándares y Tecnología

NOEL: Nivel al que no se observa efecto

NPD: Detector termoiónico

OMS: Organización Mundial de la Salud

oz: Onzas

PA: Poliacrilato

PDMS: Polidimetilsiloxano

PDMS/DVB: Polidimetilsiloxano/ Divinilbenceno

PEG: Polietilenglicol

pH: Potencial de hidrógeno

PID: Detector de fotoionización

PTFE: Politetrafluoroetileno

rpm: Revoluciones por minuto

s: Segundos

SAGARPA: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación



SBME: Microextracción por barra solvente

SBSE: Extracción por sorción con barra de agitación

SDME: Microextracción por gota colgante

SENASICA: Secretaría Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria

SPE: Extracción en fase sólida

SFODME: Microextracción por gota flotante solidificada

SIM: Modo del ion selectivo

SPME: Microextracción en fase sólida

SSA: Secretaria de Salud

TBS: t-butildimetilsilil

TCD: Detector de conductividad térmica

TMCS: Trimetilclorosilano

TMS: Trimetilsilil

TMSI: Trimetilsililimidazola

tr: Tiempo de retención

ua: Unidades de área

USADA: Agencia de Antidopaje de Estados Unidos

V: Volts

WADA: Agencia Mundial Antidopaje

z: carga



1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1 Introducción

El uso de promotores de crecimiento en la producción pecuaria genera beneficios económicos y se ha convertido en una herramienta complementaria para producir carne. No obstante, algunas sustancias llegan a ocasionar problemas a la salud de los consumidores, por ejemplo el clenbuterol.¹

Al clenbuterol {1-(4-amino-3,5-dicloro- α -[[1,1-dimetiletil] amino]-metil] bencenometanol)}, un fármaco β -agonista del grupo de los b-adrenérgicos, se le considera un potente broncodilatador, anabólico y agente lipolítico, es decir, reduce la grasa y fomenta la producción de proteína. Esto se debe a que los β -agonistas incrementan el flujo sanguíneo a ciertas regiones del cuerpo logrando hipertrofia y neoformación muscular.²

En el ámbito internacional está prohibido su uso como promotor del crecimiento en animales de abasto, ya que la ingesta produce efectos que resultan peligrosos para el ser humano, porque estimula el sistema cardiovascular, provocando adormecimiento de manos, temblores musculares, dolor de cabeza y dolor muscular.³

A pesar de los esfuerzos realizados en México por la Secretaría de Salud (SSA) y la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), se siguen presentando casos de contaminación. Del año 2002 al 2012, se han notificado 2,581 casos de intoxicación; presentados mayoritariamente en los estados de Jalisco, el Distrito Federal, Guanajuato, Zacatecas, Michoacán y Querétaro, que en total suman un 85.6%⁴. En el año 2011, surgió uno de los hechos más conocidos de contaminación de clenbuterol, en el que cinco jugadores de la Selección Mexicana de fútbol soccer fueron dados de baja por dar positivos en la prueba para dicha sustancia. Recientemente las autoridades han realizado el cierre de algunos rastros.



En el año 2002, ya que se presentaron varios sucesos de productos contaminados con clenbuterol, se publicó la Norma Oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-015-ZOO-2002, en donde se mencionan los tres métodos analíticos para realizar la identificación de clenbuterol: ensayo inmunoenzimático (ELISA, por sus siglas en inglés), cromatografía de gases (GC, por sus siglas en inglés) y cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) ⁵. Otro método empleado para la determinación es el de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS, por sus siglas en inglés), el cual es recomendado por ser un método cuantitativo confiable.

La detección de clenbuterol por cromatografía de gases ha demostrado ser sensible y selectiva, pero el método se ve limitado por la etapa de extracción. El empleo de nuevas técnicas de extracción – como la microextracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés) y la microextracción en fase líquida utilizando fibra hueca (HF-LPME, por sus siglas en inglés) – prometen mejoras sustanciales.

La SPME tiene la ventaja de que la extracción es libre de disolventes; además la concentración y la introducción son en un solo paso, lo cual ha reducido el tiempo de preparación y el aumento de la sensibilidad. Todo ello ha originado cada vez mejores resultados sobre otros métodos de extracción. Por otro lado la HF-LPME tiene la ventaja de reducir al mínimo el uso de disolvente orgánico, la protección del mismo debido a la fibra. Asimismo, las características estructurales de la fibra disminuyen la posibilidad de contaminación de la muestra y da la posibilidad de que se puedan analizar matrices complejas. Se optimizarán ambas técnicas con la finalidad de obtener valores altos de enriquecimiento con buenas reproducibilidades.



1.2 Objetivo general

Diseñar una metodología para determinar la concentración de clenbuterol en hígado de bovino empleando técnicas de microextracción y GC-MS.

1.3 Objetivos particulares

Realizar un método para analizar clenbuterol en GC-MS.

Optimizar las técnicas SPME y HF-LPME con la finalidad de obtener niveles altos de recobro con buenas reproducibilidades.

Precisar las variables que más afectan en la determinación de clenbuterol mediante SPME y HF-LPME.

Mediante un análisis estadístico comparar las técnicas SPME y HF-LPME y elegir la más favorable para la determinación de clenbuterol en hígado de bovino.



2. ANTECEDENTES

2.1 La carne de bovino

Desde del inicio de la humanidad el hombre ha consumido carne y para obtenerla se ha valido de la cacería y más tarde de la ganadería.

La Norma Oficial Mexicana NOM-194-SSA1-2004. “Productos y servicios. Especificaciones sanitarias en los establecimientos al sacrificio y faenado de animales para abasto, almacenamiento, transporte y expendio. Especificaciones sanitarias de productos” ⁶, define a la carne como la estructura muscular estriada esquelética, acompañada o no de tejido conectivo, hueso y grasa, además de fibras nerviosas, vasos linfáticos y sanguíneos; proveniente de los animales para abasto, que no ha sido sometida a ningún proceso que modifique de modo irreversible sus características sensoriales y fisicoquímicas; se incluyen las refrigeradas o congeladas.

Aminoácido	Necesidades diarias (g)	Vacuno (g _{aminoácido} /100g _{carne})	Gramos de carne necesarios al día
Fenilalanina	2.2	0.72	306
Isoleucina	1.4	0.92	152
Leucina	2.2	1.43	154
Lisina	1.6	1.53	105
Metionina	2.2	0.43	512
Treonina	1.0	0.77	130
Triptófano	0.5	0.20	250
Valina	1.6	0.97	165

Tabla 1. Aminoácidos esenciales de las proteínas de la carne (g/100 g de carne semimagra).



La carne desde la perspectiva bromatológica es el resultado de la transformación que experimenta el tejido muscular del animal a través de una serie de procesos fisicoquímicos y bioquímicos, que se llevan a cabo por al sacrificio del animal.

La carne tiene la ventaja de ofrecer gran cantidad de nutrientes, destacando las proteínas, ya que éstas resultan superiores a las de otros alimentos y resultan de digestibilidad aceptable, además su contenido en aminoácidos le proporciona un alto valor biológico, cercano a las proteínas del huevo.

El contenido de grasa en la carne tiene gran relevancia ya que contribuye con ácidos grasos esenciales y sirve como vehículo de vitaminas liposolubles, especialmente la vitamina A.⁷

	Ácidos grasos	Fórmula	Pecho	Espalda	Lomo	Pierna	Hígado
Saturados	Mirístico	C 14:0	3.2	3.5	3.3	2.9	< 1
	Palmítico	C 16:0	22.4	27.7	25.8	23.2	12.7
	Esteárico	C 18:0	7.4	10.6	10.0	6.9	33.9
Insaturados	Palmitoleico	C 16:1	10.3	7.4	7.9	9.8	1.0
	Oleico	C 18:1	44.8	41.0	42.9	46.5	14.0
	Linoleico	C 18:2	2.6	2.3	2.4	2.2	11.2
	Linolénico	C 18:3	2.5	1.7	1.8	1.9	-
	Araquidónico	C 20:4	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	7.3
Relación Saturados/Insaturados			0.55	0.80	0.71	0.55	1.46

Tabla 2. Composición en ácidos grasos de los triglicéridos de carne e hígado de bovino.⁷

La carne contiene sustancias minerales como el hierro y el fósforo que son de gran importancia para la nutrición humana y aunque no es una buena fuente también aporta cinc, potasio, magnesio, sodio y selenio. De gran importancia es el alto

contenido en vitaminas del complejo B, ya que aporta aproximadamente el 69% de los requerimientos de vitamina B12.^{8,9}

2.2 El hígado

Después de la carne el hígado representa un producto de gran relevancia, ya que es el más estimado de los despojos. El hígado es una víscera voluminosa, sin lobulación perceptible, de color chocolate o violáceo, pesa de cinco a seis kilos y es muy rico en vitamina A, hierro, lecitina y grasa fosfórica. Por esta riqueza en grasa y la abundancia de ácidos nucleicos, el hígado es un alimento rico en fósforo orgánico, de fácil digestión, muy recomendado para los convalecientes y los anémicos.^{10,11}

Comparando a las proteínas de la carne con las del hígado, las del hígado superan a las de la carne en fenilalanina, leucina y valina, aunque son inferiores en isoleucina, lisina y metionina. Las diferencias más sobresalientes entre las grasas de la carne y del hígado radican en que el hígado tiene una mayor cantidad de ácido araquidónico, posiblemente por la mayor presencia de fosfolípidos, a pesar de ello la carne tiene mayor cantidad de grasas insaturadas principalmente las provenientes de la pierna y el pecho.

Otros componentes del hígado son el glucógeno y vitaminas del complejo B como riboflavina, niacina, ácido nicotínico y ácido fólico.⁷

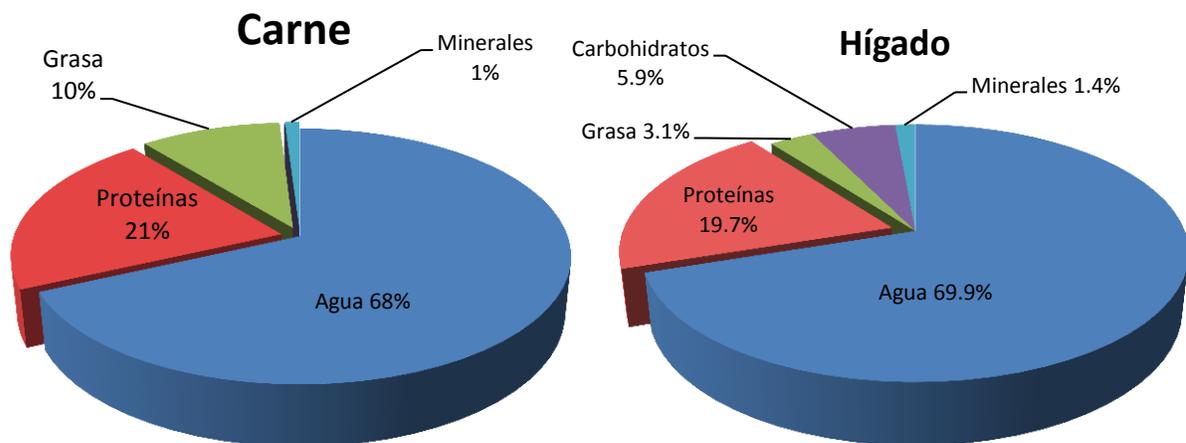


Figura 1. Composición de la lomo y del hígado de bovino.⁷

2.3 Abastecimiento en México

Conforme al paso de los años las técnicas de abastecimiento y de matanza han sufrido varios cambios. Antiguamente la biodiversidad era mayor y la cacería de cualquier especie era primordial para alimentarse. Actualmente hay ciertas especies para el consumo humano y su domesticación ha permitido la conservación y el almacenamiento.

La organización actual en el comercio de la carne tiene sus orígenes en las costumbres y la legislación romana. Para el siglo XIX, en España el año 1840, los veterinarios Antonio Santos y don Francisco Huertas realizaron la primera inspección veterinaria de alimentos para el consumo humano en el matadero de Madrid.¹⁰

En la actualidad en México el consumo de productos cárnicos es principalmente de origen vacuno, porcino y avícola. Para el caso de los productos pesqueros, los que se consumen en mayor cantidad son el atún, la mojarra y la sardina.

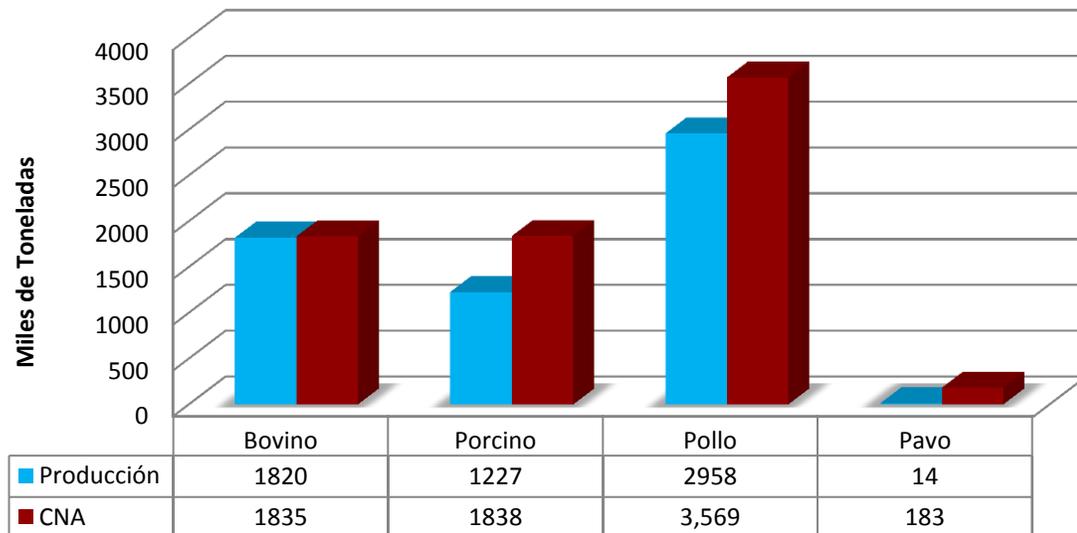


Figura 2. Producción y Consumo Nacional Aparente (CNA) de carne en México en el 2012.¹²

Los principales países productores de carne de bovino en el año 2012 fueron Estados Unidos, Brasil y la Unión Europea, México aportó el 3% de la producción mundial con 1 millón 820 mil toneladas de carne, siendo los estados de Veracruz, Jalisco y Chiapas los de mayor producción.

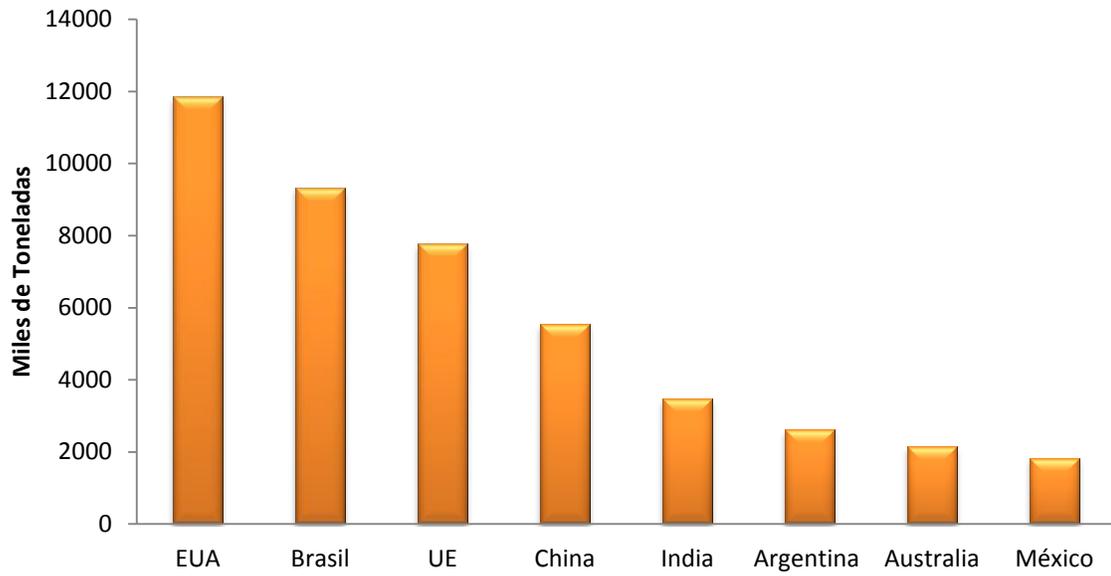


Figura 3. Producción de carne de bovino en diferentes países en el año 2012.¹²

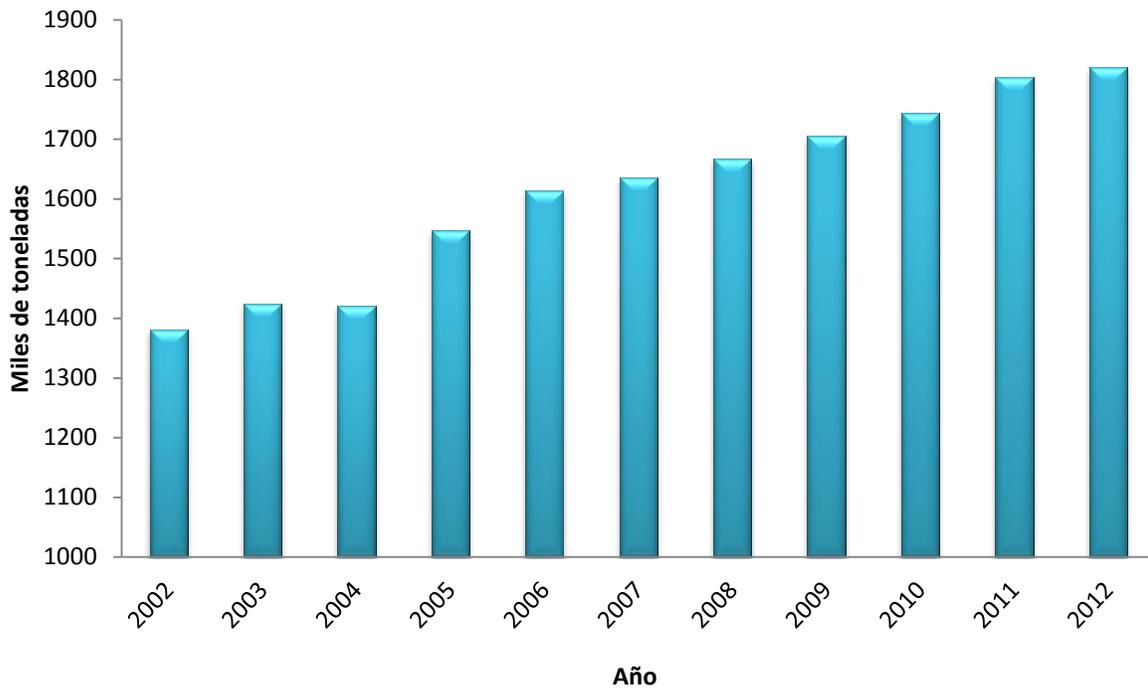


Figura 4. Volumen de producción de carne en canal de bovino en México.¹³



En la República Mexicana en el año 2012 la carne de bovino que se disponía para consumo fue de 1 millón 835 mil toneladas (Consumo Nacional Aparente), y de acuerdo a la tendencia del crecimiento población se puede decir que la disponibilidad per cápita fue de 16 kg/habitante/año.

Especie	Disponibilidad per cápita en el año 2012
Bovino	16
Pavo	1.6
Pollo	31
Porcino	16
Total	64.6



Tabla 3. Disponibilidad per cápita de carne en México en el año 2012. ^{12,14}

En México la forma en que se comercializa el hígado es crudo, aunque en otros países se puede llegar a vender como salchicha y puddings.

2.4 Agentes promotores del crecimiento

Los agentes promotores del crecimiento son aditivos que se usan cotidianamente en la industria cárnica, esto se debe al aumento en la producción de carne que genera beneficios económicos para aquellos que los utilizan. Existen diferentes tipos de promotores del crecimiento, por un lado están los esteroides anabólicos sintéticos por ejemplo la testosterona, el estradiol, el acetato de trembolona y el zeranol, aunque estas dos últimas actúan reduciendo el intercambio proteico en vez de incrementar la síntesis proteica.

Otra forma es realizar inyecciones de hormona del crecimiento también conocida como somatotropina bovina, la cual reduce la grasa y aumenta el desarrollo



muscular. Al emplearla se han mostrado incrementos en la velocidad de crecimiento del tejido magro y reducciones de la deposición de grasa de hasta 20%.

También existen los agonistas β -adrenérgicos, los cuales tienen una estructura similar a las catecolaminas, como la adrenalina (epinefrina) y la noradrenalina (norepinefrina), que son compuestos que existen de manera natural en los animales. Entre los agonistas β -adrenérgicos más comunes están el clenbuterol, el cimaterol, el salbutamol y la ractopamina. Se les conoce como agonistas β -adrenérgicos porque actúan sobre las células a través de receptores β que se encuentran en la membrana celular. Existen dos tipos de receptores, los β_1 que son característicos de musculatura cardíaca e intestinal, y los β_2 que son los característicos de la musculatura bronquial e uterina, aunque los receptores β_1 y β_2 aparecen en numerosos tejidos incluyendo la musculatura esquelética y la grasa. Los agonistas β -adrenérgicos de interés en la ganadería afectan principalmente a los receptores β_2 aunque en ocasiones llegan a presentar alguna actividad entre los β_1 .

Los agonistas β -adrenérgicos reducen la cantidad de grasa en el cuerpo e incrementan el anabolismo de las proteínas logrando con esto el desarrollo muscular. Los efectos que pueden causar su uso es carne más oscura, menos brillante y más dura tras el cocinado. Además, al disminuir la grasa intramuscular provoca que otras características sensoriales de la carne se vean afectadas.

El color oscuro es producido por la reducción de los niveles de glucógeno muscular al sacrificio, lo que provoca un pH más alto en la carne. La dureza puede ser el resultado de una menor actividad post mortem de los sistemas proteolíticos.

2.5 Clenbuterol

El clenbuterol es un polvo microcristalino incoloro y se encuentra comúnmente como clorhidrato de clenbuterol, su fórmula molecular es $C_{12}H_{18}OCl_2$, tiene un punto de fusión de 174 °C. Su nombre químico es {1-(4-amino-3,5-dicloro- α -[[1,1-dimetiletil] amino]-metil] bencenometanol} y es un fármaco β_2 -agonista que pertenece al grupo de los β -adrenérgicos². Los β -agonistas son fenetanolaminas que están constituidas por diferentes sustituyentes en el anillo aromático y en el grupo amino terminal¹⁵. En



el caso del clenbuterol se tiene como sustituyentes dos cloros y una amina primaria en el anillo aromático y un terbutilo en el grupo amino terminal.

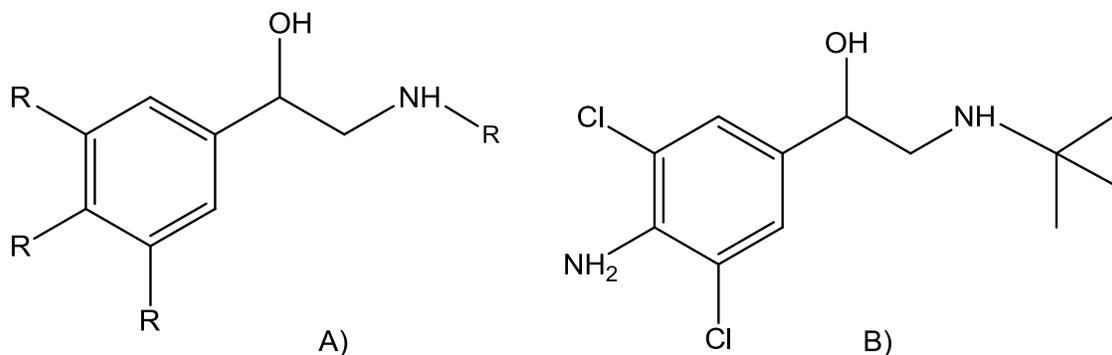


Figura 5. A) Estructura de las fenetanolaminas B) Estructura del clenbuterol.

Al clenbuterol se le considera un potente broncodilatador, y se le denomina agente de reparto, ya que actúa como anabólico y agente lipolítico en varias especies, es decir, fomenta la producción de proteína y reduce la grasa.

En el ámbito internacional está prohibido su consumo como promotor de crecimiento. Sin embargo, y como consecuencia de que se obtienen importantes ganancias en el rendimiento de la canal, se sabe de su uso clandestino en el ganado de engorda y otras especies.

2.5.1 Aplicaciones

El clenbuterol en bovinos se emplea como broncodilatador y promotor de crecimiento en dosis de 0.8 µg/kg, pero es común que se administren dosis de cinco a diez veces más a la señalada, con la creencia de que se aumentará el efecto, lo que es erróneo ya que el comportamiento del cociente (rendimiento de la canal/ dosis clenbuterol) no es lineal y por el contrario se afecta la salud del animal.³

También se suele utilizar en vacas para retrasar el parto, y así realizarlo a una hora adecuada, con asistencia profesional. Se llegan a utilizar dosis de 0.4 mg por vía oral o parenteral en la primera fase del parto, pudiéndose repetir cada 6 horas hasta un máximo de 3 ocasiones.¹⁶



Otra forma en que se emplea es en pollos de engorda en dosis de 1 mg/kg de alimento, produce una ganancia de peso variable de 10-14 g/ ave al final del ciclo y una eficiencia alimenticia de 1.03 (kilogramos ganados/ kg de alimento consumido) y aumento de proteína en un 1.02%. Se ha usado en pollos de engorda a razón de 0.25 mg/kg de alimento y los resultados a los 15 y 35 días revelan un incremento en el peso del 3.6% y disminución en el consumo de alimento en un 0.4%, en comparación con el grupo control e incluso al compararlos con un grupo tratado con virginiamicina a razón de 10 mg/kg de alimento.³

En otros casos se puede llegar a utilizar en caballos como broncodilatador en dosis que van de 0.8 a 32 µg/kg cada 12 horas.

En humanos se usa el clenbuterol como promotor del crecimiento principalmente por algunos deportistas y fisicoculturistas. También se utiliza combinado con el clorhidrato de ambroxol, como broncodilatador mucolítico con acción expectorante, en enfermedades como el asma bronquial, bronquitis asmátiforme, bronquitis aguda, bronquitis crónica y bronquitis espasmódica.

Los nombres comerciales en México son:

Nombre comercial	Sustancia activa	Presentación	Contenido de Clenbuterol
BROGAL®	Clorhidrato de ambroxol y	Solución: Frasco con 120 mL	100 µg/100 mL
COMPOSITUM	clorhidrato de clenbuterol	Solución (gotas pediátricas): Frasco con 20 mL	500 µg/100 mL
BROXOL® PLUS	Clorhidrato de ambroxol y clorhidrato de clenbuterol	Solución: Frasco con 120 mL Solución (gotas pediátricas): Frasco con 20 mL	100 µg/100 mL 500 µg/100 mL



MUCOVIBROL C®	Clorhidrato de ambroxol y	Solución: Frasco con 120 mL	100 µg/100 mL
	clorhidrato de clenbuterol	Solución (gotas pediátricas): Frasco con 20 mL	500 µg/100 mL
OXOLVAN C	Clorhidrato de ambroxol y	Solución: Frasco con 120 mL	100 µg/100 mL
	clorhidrato de clenbuterol	Solución (gotas pediátricas): Frasco con 20 mL	500 µg/100 mL

Tabla 4. Medicamentos comercializados en México que contienen clenbuterol.¹⁷

Después de la administración del medicamento su efecto comienza de los 5 a los 20 minutos, con una duración de acción de hasta 14 horas. El 87% del Clenbuterol es eliminado de forma inalterada después de las 168 horas de haber sido ingerido, siendo su mayor vía de eliminación la vía urinaria.

La dosis diaria total recomendada para niños mayores de 12 años y adultos es de 40 µg/día, y para niños es de 1.2 µg por kg de peso corporal, con un intervalo que va de 0.8 a 1.5 µg por kg de peso corporal.

Los residuos hepáticos en humanos permanecen en µg/kg después de 16 a 39 días y en ng/kg hasta los 56 días después de terminado el tratamiento.

2.5.2 Casos positivos en México

A pesar de los esfuerzos realizados por las autoridades aún se sigue utilizando el clenbuterol en México, ya que en el 2011 en un examen antidopaje previo a la Copa de Oro de futbol soccer, cinco jugadores de la selección mexicana dieron positivo por clenbuterol, fueron separados del equipo y no participaron en dicha competición.¹⁸



Más tarde no se les sancionó debido a que la Federación Internacional de Fútbol Asociación (FIFA, por sus siglas en inglés) presentó ante la Agencia Mundial Antidopaje (WADA, por sus siglas en inglés) un estudio realizado en la Copa Mundial Sub-17 llevado en México en el cual se demuestra que la carne se encuentra contaminada por clenbuterol.^{19, 20}

Otro caso de un deportista mexicano es el del boxeador Erik Morales “El terrible” que dio positivo en el examen antidopaje en octubre del 2012 y fue suspendido por la Agencia de Antidopaje de Estados Unidos (USADA, por sus siglas en inglés) durante dos años, aunque esta suspensión no lo afectó ya que la USADA no rige a los organismos profesionales del boxeo.²¹

En otros países también se han presentado casos en deportistas por dar positivos en el control antidopaje por clenbuterol, por ejemplo en Estados Unidos en las Grandes Ligas de Béisbol (MLB, por siglas en inglés) en el 2012 se le encontró al jugador Guillermo Mota. Otro caso fue el del ciclista español Alberto Contador en el tour de Francia del 2010.^{22, 23}

En el 2012 la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) cerró algunos rastros por encontrar carne con clenbuterol en estados como son: Guanajuato, Estado de México, Hidalgo, Guerrero, Jalisco, Morelos, Nayarit, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, Veracruz y Yucatán.²⁴

La mayoría de las intoxicaciones alimentarias por clenbuterol se dan por la ingesta de hígado de bovino, con un periodo de incubación que se encuentra entre los treinta minutos a las seis horas.

En la figura 7 se muestra el número de intoxicaciones anuales reportadas en México, como ya se mencionó, suman un total de 2581 casos distribuidos principalmente entre el Distrito Federal, Guanajuato, Jalisco, Michoacán, Querétaro y Zacatecas.

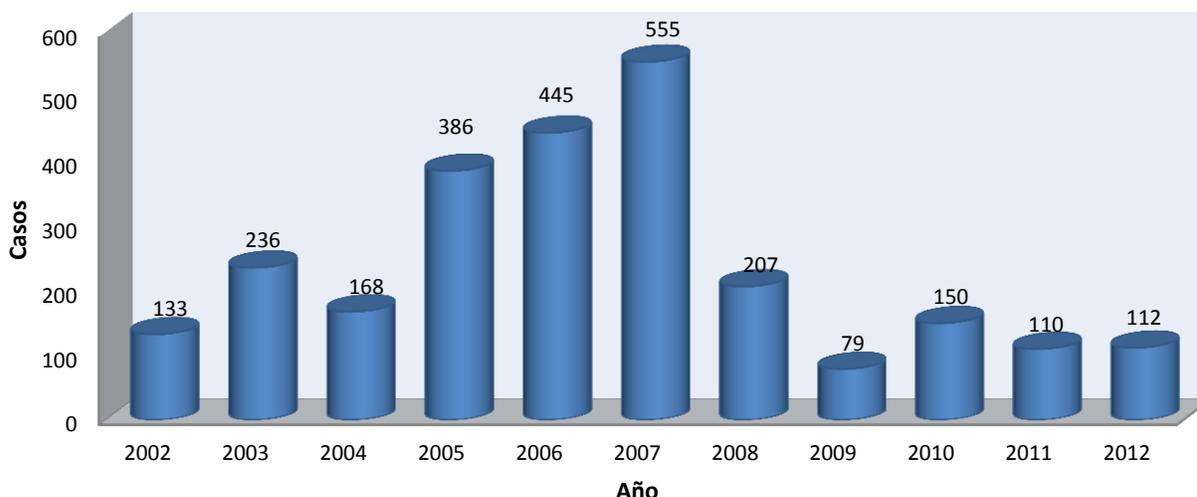


Figura 7. Casos de intoxicaciones alimentarias por clenbuterol en la República Mexicana.⁴

2.5.3 Efectos a la salud

Las personas que consumen productos cárnicos contaminados con clenbuterol pueden presentar diversos problemas de salud como adormecimiento de manos, dolor de cabeza, dolor muscular, nerviosismo, taquicardia y temblor muscular.³ También se ha observado que una sobredosis ocasionada por medicamentos, puede provocar los siguientes síntomas:

Efectos	Síntomas
Cardiovasculares	Arritmia, isquemia del miocardio, hipertensión e hipotensión.
Gastrointestinales	Náuseas
Metabolismo y nutrición	Hipocaliemia, hiperglucemia
Musculoesqueléticos, del tejido conjuntivo y óseo	Espasmo muscular, mialgia, tremor
Psiquiátricos	Nerviosismo e inquietud
Sistema Inmune	Hipersensibilidad
Sistema Nervioso	Mareo, cefalea y temblores
Otros	Rubor facial

Tabla 5. Problemas a la salud ocasionados por el clenbuterol.¹⁷



Sabiendo esto, se debe evaluar el uso del clenbuterol en personas que padezcan diabetes mellitus mal controlada, infarto al miocardio reciente, trastornos cardiacos, trastornos vasculares, feocromocitoma, hipertiroidismo, también en mujeres embarazadas, principalmente cuando se encuentren previas al parto, debido al efecto inhibitorio de la sustancia sobre las contracciones.

Asimismo se debe considerar su empleo cuando se prescriba para mujeres que se encuentren amamantando, ya que se ha demostrado que el clenbuterol es excretado por la leche materna. A pesar de lo antes mencionado no existe registro de muertes humanas debido al consumo de productos cárnicos con clenbuterol o por sobredosis.

2.5.4 Legislación

Debido al uso indebido del clenbuterol para el año 2000, la SAGARPA publica la Norma Oficial Mexicana NOM-061-ZOO-1999 “Especificaciones zoosanitarias de los productos alimenticios para consumo animal” ²⁵, la cual señala la restricción del empleo del clenbuterol en los productos alimenticios destinados para el consumo de animales debido a los riesgos zoosanitarios y de salud pública.

Más tarde la problemática del uso indebido del clenbuterol se intensificó y para el 1º de marzo del 2002 se publica en el Diario Oficial de la Federación la Norma Oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-015-ZOO-2002 “Especificaciones técnicas para el control del uso de beta-agonistas en los animales” ⁵, en la cual se prohíbe la producción, manufactura, fabricación, elaboración, preparación, acondicionamiento, transportación, tráfico, comercialización, importación, suministro y/o utilización de clenbuterol como ingrediente activo, aditivo alimenticio y/o medicamento en formulación de productos alimenticios destinados para consumo y uso en animales.

Ya para el 2004 se publica la Norma Oficial Mexicana NOM-194-SSA1-2004, “Productos y servicios. Especificaciones sanitarias en los establecimientos dedicados al sacrificio y faenado de animales para abasto, almacenamiento, transporte y expendio. Especificaciones sanitarias de productos” ⁶, en donde en el



apartado 6 de especificaciones se menciona que los productos de ganado bovino deben estar libres de clenbuterol.

También de acuerdo a los artículos 172, 173, 174 de la Ley Federal de Sanidad Animal ²⁶ se considera como delito alimentar animales con clenbuterol. Además en los artículos 11 y 68 del Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios ²⁷ se especifica que la carne que se comercializa debe estar libre de cualquier sustancia que genere un riesgo a la salud del consumidor.

Para llegar al valor de la ingesta diaria admisible (ADI, por sus siglas en inglés) del clenbuterol, previamente se determinó el denominado nivel con el que no se observa efecto (NOEL, por sus siglas en inglés) del compuesto en 2.4 µg por día para una persona de 60 kg. El valor de la ADI por seguridad se reduce a 250 ng/día (aproximadamente diez veces menos); esto es, 4.1 ng/kg/día, considerando una persona de 60 kg.³

De acuerdo a la Comisión del Codex Alimentarius para el clenbuterol el límite máximo de residuos (LMR) en los alimentos de origen bovino es el siguiente:

Tejido	LMR (µg/kg)	Notas
Músculo	0.2	Debido a la posibilidad del uso indebido de este medicamento, sólo se recomienda los LMR cuando estén relacionados con el uso terapéutico aprobado en ámbito nacional, tal como la tocólisis o como una terapia complementaria en las enfermedades respiratorias
Hígado	0.6	
Riñón	0.6	
Grasa	0.2	
Leche (µg/L)	0.05	

Tabla 6. Límites Máximos de Residuos para Medicamentos Veterinarios en los Alimentos.²⁸



Con la finalidad de vigilar el uso ilegal del clenbuterol se han desarrollado métodos analíticos utilizando muestras de hígado, globo ocular, músculo, orina, riñón, pelo y plasma. Siendo el hígado y el ojo los que presentan mayor concentración.

Los métodos analíticos oficiales señalados en la NOM-EM-015-ZOO-2002 ⁵, para la detección de la sustancia son:

- ✓ Cromatografía de gases
- ✓ Cromatografía de líquidos de alta resolución
- ✓ Ensayo inmunoenzimático

Para asegurar la presencia o ausencia de clenbuterol en animales, productos y subproductos, la SAGARPA cuenta con 11 laboratorios certificados, los análisis que se realizan son por ELISA y son los siguientes:

Nombre del laboratorio	Estado	Área de autorización
Centro de Control Agroindustrial.	Distrito Federal	Suero, hígado, riñón, músculo
Biofleming Laboratorios	Estado de México	Hígado, riñón y músculo
Laboratorio Regional de Patología de el Salto, Jalisco.	Jalisco	Suero, orina, hígado, riñón, músculo y retina
Laboratorio Central Regional de Monterrey	Nuevo León	Suero, orina, hígado, riñón, músculo y alimento
Laboratorio Centro de Salud Animal de Cholula	Puebla	Orina, suero y globo ocular



Laboratorio de Patología Animal	Querétaro	Hígado
Laboratorio de Residuos Tóxicos (Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.)	Sonora	Suero
Laboratorio Sidiagen, S.C.	Tamaulipas	Hígado, riñón y músculo
Laboratorio Análisis de Productos Agropecuarios del Noreste	Tamaulipas	Suero, orina, hígado, riñón, músculo y alimento
Laboratorio Centro Internacional de Servicios Pecuarios	Tamaulipas	Hígado, músculo y riñón
Laboratorio Central Regional de Mérida, Yucatán "MVZ. Arturo Medina Figueras"	Yucatán	Suero, orina, hígado, riñón y músculo

Tabla 7. Laboratorios autorizados por SAGARPA para realizar pruebas de ELISA.

Con la finalidad de desalentar el uso del clenbuterol SAGARPA a través de la Secretaría Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), lleva a cabo el programa Proveedor Confiable (Libre de Clenbuterol), en cual se realizan 4 muestreos en un periodo de 1 año, con intervalos de 3 meses. Al verificar que su ganado está libre de clenbuterol, al productor se le otorgara una constancia, la cual indica que es un Proveedor Confiable (Libre de Clenbuterol).



Los laboratorios con los que cuenta la SAGARPA a nivel nacional son 11, en los cuales se realizan análisis para detección de clenbuterol de las muestras obtenidas en el Programa de Proveedor Confiable.²⁹

2.6 Preparación de muestra

Frecuentemente los analitos de interés se encuentran en una matriz compleja, la cual no es adecuada para el método de ensayo seleccionado, por lo cual es necesario realizar un tratamiento con la finalidad de transformar o transferir los analitos a una forma más conveniente para su análisis.

La preparación de muestra es el proceso de transformación de una matriz en una forma adecuada para ser analizada. Este proceso puede incluir la extracción de un analito de una matriz compleja, la preconcentración suficiente para ser medida, la eliminación o enmascaramiento de especies interferentes, o la transformación química del analito.

De acuerdo al estado físico en que se encuentre la matriz se le da un tratamiento en específico. Para las que se encuentran en estado sólido los principales tratamientos son los que se muestran en la Figura 8.



Figura 8. Mecanismo de cambio de una matriz de estado sólido a otro.



Para muestras que son difíciles de disolverse se emplean condiciones más vigorosas como el proceso de digestión, que consiste en disolver el sólido con la ayuda de un ácido, una base, un agente oxidante o enzimas.

En ocasiones, cuando se analizan trazas o se requiere minimizar las interferencias es necesario transferir los analitos a otra matriz. Los métodos de extracción permiten la separación química mediante la transferencia de los analitos a una fase (sólida, líquida o gaseosa) que pueda separarse físicamente de la muestra original.

La extracción líquido-líquido (LLE, por sus siglas en inglés) es un método estándar y común que utiliza disolventes para cambiar la matriz que rodea al o los analitos en disolución, siendo los dos líquidos inmiscibles entre sí, generalmente uno es una fase acuosa y el otro un disolvente orgánico.

Conforme al paso de los años el uso de disolventes orgánicos se ha reducido y por lo tanto la extracción líquido-líquido en algunos casos ha sido sustituida por la extracción líquido-sólido o mejor conocida como extracción en fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés), la cual consiste en hacer pasar la solución sobre una fase sólida (cartuchos, membranas o discos de extracción) que adsorbe a los analitos de una manera específica, posteriormente son desplazadas con la ayuda de un disolvente³⁰. Tanto la LLE y la SPE además de ser técnicas de extracción también son de concentración ya que el volumen final en donde se encuentra el analito es menor.

El clenbuterol típicamente se ha extraído por LLE³¹ o por SPE³² pero presentan grandes desventajas. Cuando se realiza por LLE los tiempos de extracción son largos, además de utilizar grandes cantidades de los disolventes, los cuales son tóxicos y causan problema al ambiente, además de ser costosos. Cuando se elige la SPE se requiere menos disolvente, pero presenta el inconveniente de que es necesario evaporar este para concentrar el clenbuterol.³³

Actualmente tanto la LLE como la SPE han sido miniaturizadas con la finalidad de facilitar su automatización, además de hacerlas más rápidas, con mayores



rendimientos y amigables con el ambiente. La SPE ha evolucionado a la microextracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés) y la extracción por sorción con barra de agitación o también llamada stir-bar (SBSE, por sus siglas en inglés). Mientras LLE ha evolucionado a la microextracción en fase líquida (LPME, por sus siglas en inglés) la cual tienen sus variantes como la microextracción por gota colgante (SDME, por sus siglas en inglés), la microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME, por sus siglas en inglés), la microextracción por gota flotante solidificada (SFODME, por sus siglas en inglés), la microextracción por barra solvente (SBME, por sus siglas en inglés) y la microextracción en fase líquida por fibra hueca (HF-LPME, por sus siglas en inglés). Tanto la SPME^{33, 34} y la HF-LPME³⁵ se han aplicado para la detección de clenbuterol pero únicamente en muestras de orina y no con tejidos.

2.7 Microextracción en fase sólida

La microextracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés) es un método sencillo de extracción de líquidos, aire, o incluso lodos, sin usar disolventes. Además SPME es un método de extracción muy eficiente ya que integra el muestreo, el aislamiento y el enriquecimiento en un solo paso.³⁶

Actualmente la SPME ha tomado gran relevancia debido a la simplicidad de su operación, a su posible automatización y a no requerir instrumentación muy compleja o de alto costo. Todo esto aunado a que se pueden realizar análisis *in situ* o *in vivo*, además de ser una técnica que se puede acoplar a GC o a HPLC.³⁷

El proceso de SPME consta principalmente de dos etapas: la primera es la partición de los analitos entre el recubrimiento de la fibra y la matriz de la muestra y la segunda es la desorción de los analitos concentrados en el recubrimiento de la fibra hacia el instrumento de análisis. La técnica fue introducida por Arthur y Pawliszyn a inicios de los años 90 y el primer dispositivo comercial para realizar SPME fue desarrollado por Supelco en 1993, además de producir nuevos recubrimientos de fibra basados en la combinación de fases.³⁸

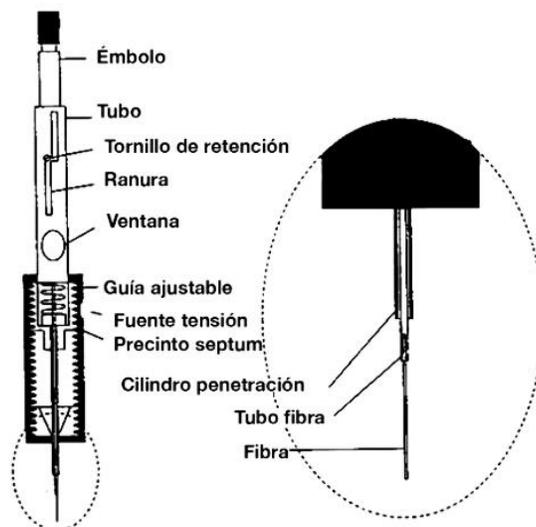


Figura 9. Esquema del dispositivo para realizar SPME.³⁸

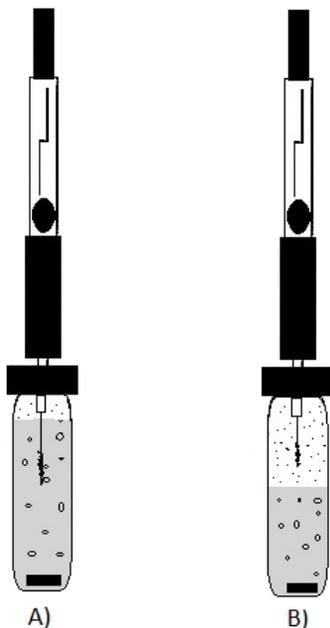
El elemento de mayor importancia en SPME es la fibra, la cual es de sílice fundida recubierta de una película de 10 a 100 μm , de la fase aceptora. La fibra está incorporada a la base de una jeringa con una aguja metálica fija. La fibra puede emerger de la aguja o quedar protegida en su interior.

Recubrimiento de la fibra	Tipo	pH	Polaridad	Ejemplos de analitos
Polidimetilsiloxano (PDMS) 7 μm	Absorbente	2-11	No polar	Compuestos de alto peso molecular (PM= 125-600)
PDMS 30 μm	Absorbente	2-11	No polar	Compuestos semivolátiles (PM= 80-500)
PDMS 100 μm	Absorbente	2-10	No polar	Compuestos volátiles (PM= 60-275)
Polidimetilsiloxano/Divinilbenceno (PDMS/DVB) 65 μm	Adsorbente	2-11	Bipolar	Compuestos volátiles, aminas y nitroaromáticos (PM= 50-300)



Carboxen/Polidimetilsiloxano (CAR/PDMS) 75 y 85 µm	Adsorbente	2-11	Bipolar	Gases y compuestos de bajo peso molecular (PM= 30-225)
Divinilbenceno/Carboxen/ Polidimetilsiloxano(DVB/CAR/PDMS) 50 y 30 µm	Adsorbente	2-11	Bipolar	Compuestos volátiles y semivolátiles del sabor, y trazas (PM= 40-275)
Poliacrilato (PA) 85 µm	Absorbente	2-11	Polar	Compuestos semivolátiles (PM= 80-300)
Polietilenglicol (PEG) 60 µm Carbowax/Divinilbenceno (CW/DVB) 70 µm	Absorbente	2-9	Polar	Alcoholes y otros compuestos polares (PM= 40-275)

Tabla 8. Recubrimientos de las fibras SPME y principales usos.^{37, 39}



Modo de muestreo	Propiedades del analito	Matrices
Directo	Baja y media volatilidad	Muestras gaseosas y líquidas(simples)
Headspace	Alta y media volatilidad	Muestras líquidas (complejas) y sólidas
Protección con membrana	Baja volatilidad	Muestras complejas

Figura 10. A) SPME por inmersión. B) SPME por headspace. Tabla 9. Diferentes muestreos de acuerdo a al tipo de matriz.³⁸

Existen principalmente dos formas de exponer la fibra a la disolución, la SPME directa, en donde se sumerge la fibra directamente a la disolución de la muestra y la otra es por headspace (HS-SPME, por sus siglas en inglés), en donde se expone la fibra en el espacio libre sobre la disolución de la muestra. Generalmente la extracción se realiza agitando la muestra a una cierta temperatura durante un tiempo determinado, logrando al final extraer una fracción del analito presente en la disolución de la muestra. En caso de que la muestra a analizar sea demasiado sucia o compleja y además que los analitos de interés tengan baja volatilidad, se opta por realizar SPME directa pero protegiendo la fibra con una membrana.

Al finalizar la extracción del analito se retira la fibra y se introduce dentro del inyector caliente de un cromatógrafo de gases, en cuyo interior el analito se desorbe térmicamente de la fibra y se introduce a la columna cromatográfica sin división durante un tiempo fijo, en donde se concentra (focaliza) el analito en la cabeza de la columna.⁴⁰

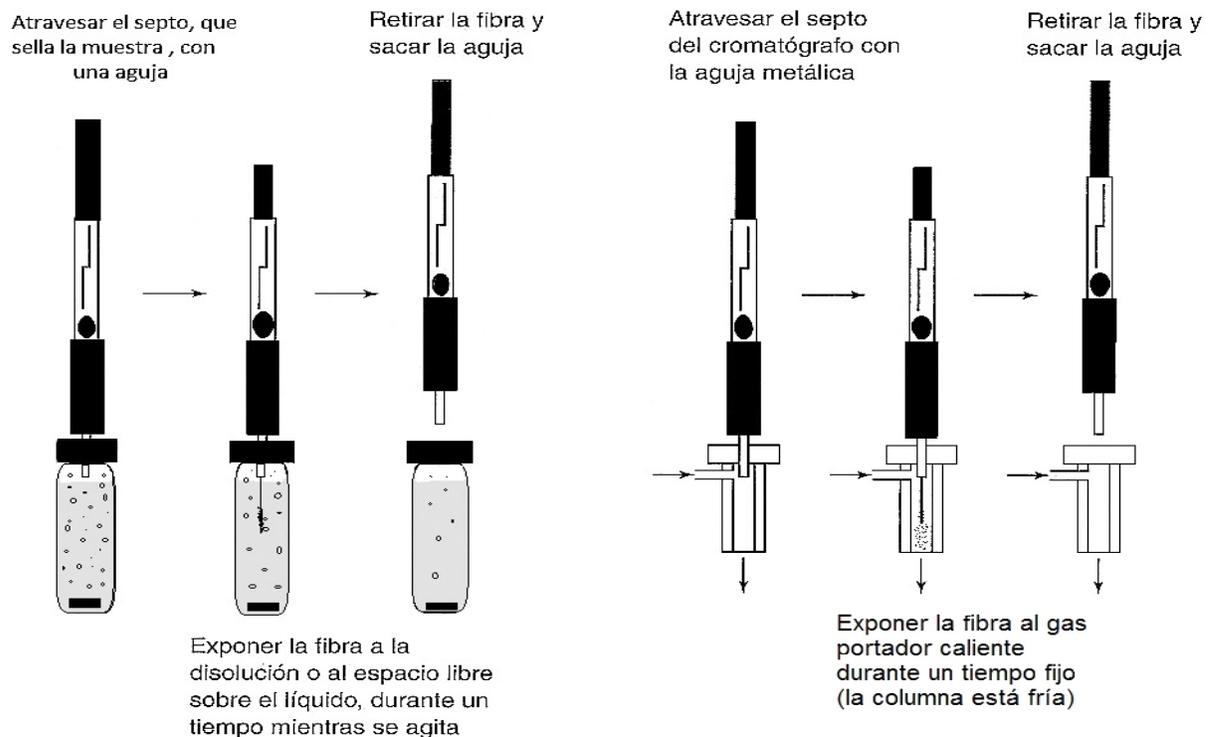


Figura 11. Toma de muestra mediante SPME y desorción del analito de la fibra para su introducción a un cromatógrafo de gases.³⁹



Al realizar una microextracción, la cantidad de analito absorbido por el recubrimiento de la fibra se puede calcular de acuerdo a la ecuación 1.1 sin importar si se realiza por headspace o directamente en la muestra, con la condición de que se mantenga constante el volumen del recubrimiento de la fibra, del headspace y de la muestra.

$$n = \frac{K_{fs}V_f C_0 V_s}{K_{fs}V_f + K_{hs}V_h + V_s} \dots\dots\dots(1.1)$$

Donde n es la cantidad de analito extraído, V_f es el volumen del recubrimiento de la fibra, V_s es el volumen de la disolución de la que se extrae, V_h es el volumen del headspace de la muestra y C_0 es la concentración inicial ($\mu\text{g/ml}$) de la disolución. K_{fs} es el coeficiente de reparto del soluto entre el recubrimiento de la fibra y la disolución: $K_{fs} = C_f/C_s$, donde C_f es la concentración del soluto en el recubrimiento de la fibra y C_s la concentración de la disolución. K_{hs} es el coeficiente de reparto del soluto entre el headspace y la disolución: $K_{hs} = C_h/C_s$, donde C_h es la concentración del soluto en el headspace y C_s la concentración de la disolución.

Cuando se quiere calcular la cantidad de analito absorbido en una fibra y el vial de la muestra está totalmente lleno de muestra (sin headspace), el término K_{hs} del denominador, que está relacionado con el headspace, puede ser eliminado, obteniendo así la ecuación 1.2.³⁸

$$n = \frac{K_{fs}V_f C_0 V_s}{K_{fs}V_f + V_s} \dots\dots\dots(1.2)$$

Para hacer un análisis cuantitativo se construye una curva de calibración haciendo extracciones de disoluciones conocidas. En microextracción en fase sólida también son útiles el estándar interno y la adición patrón.⁴⁰

2.8 Microextracción en fase líquida utilizando fibra hueca

En los últimos años ha ido en aumento el interés de ir miniaturizando las determinaciones analíticas, entre las que han sido modificadas se encuentra la LLE, para dar lugar a la LPME a mediados de la década de los 90. La primera modalidad en aparecer de la LPME fue la SDME en el año de 1996 por Jeannot y Cantwell⁴¹, y la modalidad HF-LPME en el año de 1999 por Pedersen-Bjergaard y Rasmussen.⁴²



La SDME, es una técnica que consta de una gota (1-10 μL) de disolvente orgánico (fase aceptora o receptora) suspendida desde el extremo de la aguja de una microjeringa, la cual es colocada en una solución acuosa (fase donadora) en agitación a una temperatura y durante un tiempo determinado ⁴³. La técnica es sencilla, barata, rápida y utiliza muy poco disolvente, pero llega a presentar algunos inconvenientes, principalmente cuando se realizan análisis a velocidades de agitación elevadas y cuando la matriz es muy viscosa o su tamaño de partícula es grande, ya que puede disolver o desprender la gota del disolvente orgánico de la punta de la aguja, perdiendo así sensibilidad y precisión en el análisis.⁴⁴

Para evitarse las desventajas de la SDME surgió la HF-LPME. El principio de la técnica es extraer los analitos de una muestra acuosa a través de una fina capa de un disolvente orgánico inmovilizado dentro de los poros de la fibra hueca, y una solución aceptora dentro del lumen de la fibra. Después de alcanzar el equilibrio la fase aceptora se retira con la microjeringa para finalmente ser inyectada en el instrumento para su análisis.

Las fibras huecas están elaboradas de materiales reciclables como el polipropileno, polietersulfona y poliéster. Éstas se utilizan una sola ocasión garantizando que en cada determinación se usará una nueva, lo cual no significa un elevado costo debido a que las fibras son baratas. La fibra también nos ayuda a la limpieza simultánea a la extracción primordialmente cuando se analizan matrices muy complejas.

El disolvente orgánico que se utilizará tanto en los poros como en la fibra hueca debe cumplir varios requisitos. Uno es que tiene que ser inmovilizado con facilidad tanto en los poros como en la fibra y no debe disolverse en la muestra acuosa. Otra característica es que el disolvente no tiene que volatilizarse, además el analito debe solubilizarse fácilmente para ser transferido a la fase aceptora.⁴⁵

En los últimos años se han utilizado como fase aceptora a los líquidos iónicos. La ventaja que presentan es de extraer analitos polares además de llegar a presentar selectividad por diversos compuestos.⁴⁶



Existen dos formas de configurar la técnica de HF-LPME: varilla y “U”. En la configuración de varilla la microjeringa se utiliza para inyectar y recoger la fase aceptora, y en la de “U” se utilizan dos microjeringas que están conectadas a la fibra, en donde comúnmente una de las jeringas se utiliza para introducir la fase aceptora y la otra para recogerla.⁴⁷

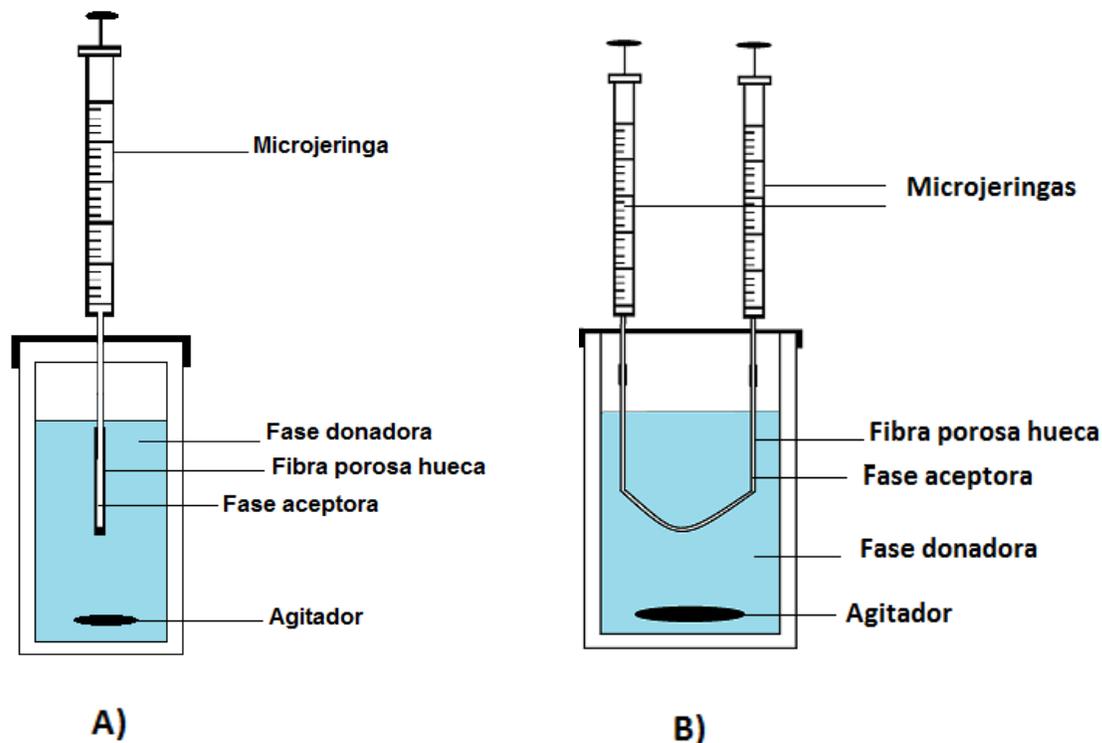


Figura 12. A) HF-LPME en forma de varilla. B) HF-LPME en forma de U.

Otra manera de configurar la técnica de HF-LPME es de acuerdo a los analitos que se desean extraer de la matriz. Para compuestos moderadamente o altamente hidrófobos o que contengan grupos ionizables ácidos o básicos se utiliza el modo de dos fases. El modo de dos fases consta de extraer el analito de una muestra acuosa a través de disolvente orgánico inmiscible en agua que se encuentra tanto en los poros como en lumen de la fibra hueca. Este modo de extracción está definido por una constante de distribución $K_{org/d}$, la cual depende del cociente de la concentración del analito X en la fase orgánica entre la concentración en la fase donadora (d) en condiciones de equilibrio, que puede representarse mediante ³⁵.



$$K = |X_{org}|/|X_d| \dots\dots (1.3)$$

El modo de tres fases es utilizado para extraer analitos hidrofílicos, en este modo el compuesto es extraído de una muestra acuosa a través de un disolvente orgánico inmisible en agua que se encuentra inmovilizado en los poros de la fibra, para pasar finalmente por difusión a una solución acuosa que se encuentra en el lumen de la fibra hueca. El disolvente orgánico en el modo de tres fases sirve como barrera para que no se mezclen la fase acuosa donadora y la fase acuosa aceptora. El equilibrio del analito X en modo de tres fases puede representarse como:



De manera general la relación de distribución $K_{a/d}$ del analito entre la fase donadora y aceptora puede escribirse como la ecuación 1.4, la cual depende de dos constantes de equilibrio, la primera $K_{org/d}$ que es la distribución del analito entre la fase orgánica y fase acuosa donadora, y la segunda $K_{a/org}$ que es la distribución del analito entre la fase acuosa aceptora y la fase orgánica.⁴⁷

$$K_{a/d} = (K_{org/d}) (K_{a/org}) = |X_a|/|X_d| \dots\dots\dots (1.4)$$

Las ventajas que presenta la HF-LPME con respecto a la SDME es que gracias a la fibra hueca, la fase aceptora está protegida tanto de las velocidades de agitación elevadas como de interferencias de matriz. También mejora la sensibilidad debido a que el área de contacto de la fase aceptora es mayor, debido a que se distribuye a través del hueco de la fibra. La naturaleza desechable de la fibra elimina totalmente la posibilidad de contaminación de las muestras, lo que asegura reproducibilidad.⁴⁴

Mediante HF-LPME se pueden realizar análisis de compuestos poco volátiles o semivolátiles como los β -agonistas, además de que la HF-LPME puede ser fácilmente acoplada con GC-MS después de que los compuestos son derivatizados.



2.9 Derivatización

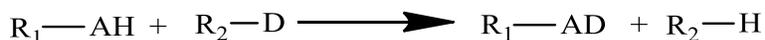
La GC y GC-MS son métodos analíticos muy utilizados debido a su resolución, sensibilidad y selectividad. Cuando se analizan compuestos polares semivolátiles o incluso no volátiles, pueden llegar a interactuar con los sitios activos de la columna originando problemas en la separación como son picos coleados. Para evitar estas dificultades los analitos tienen que ser derivatizados antes de ser inyectados al cromatógrafo de gases.

La derivatización es un procedimiento en el cual se modifica químicamente el analito con la finalidad de mejorar su separación y su estabilidad térmica o para detectarlo con mayor facilidad.

Las reacciones de derivatización más comunes en análisis por GC son sililación, acilación y alquilación. Este tipo de reacciones sustituyen los grupos químicos que ocasionan presión de vapor baja (punto de ebullición alto) para producir compuestos que se vaporicen más fácilmente. También se utilizan para obtener grupos químicos que produzcan respuestas más fuertes en el detector del instrumento.

Este tipo de reacciones son selectivas, ya que producen análogos específicos dando como resultado menores interferencias durante la cuantificación, lo cual significa una gran ventaja cuando se analizan matrices muy complejas.³⁸

Generalmente la reacción de derivatización implica la sustitución de un hidrógeno activo (en grupos -OH, -COOH, =NH, -NH₂ y -SH) de los compuestos a ser derivatizados por un grupo funcional del reactivo derivatizante. Estos grupos funcionales imparten características deseadas para eliminar efectos adversos de los hidrógenos activos polares. La reacción de derivatización ocurre de la siguiente forma:



Donde A puede ser oxígeno, azufre, nitrógeno o compuestos similares, mientras que D es el grupo funcional del agente derivatizante.

La sililación es el método de derivatización más frecuente para analizar β 2-agonistas en GC ya que hace que los productos de la reacción sean muy volátiles ⁴⁸. La sililación se lleva a cabo por la sustitución de un hidrógeno activo por un grupo alquilsililo, siendo el trimetilsilil (TMS) y el t-butildimetilsilil (TBS) los sililos más utilizados.

Los reactivos derivatizantes más usados para realizar la sililación incluyen al Hexametildisilazano (HMDS), el Trimetilclorosilano (TMCS), Trimetilsililimidazola (TMSI), Bistrimetilsililacetamida (BSA), Bistrimetilsililtrifluoroacetamida (BSTFA) y N-metil-N-t-butildimetilsililtrifluoroacetamida (MTBSTFA).

Al elegir el reactivo derivatizante se tienen que tomar varias consideraciones como que el reactivo debe producir reacciones con alto rendimiento y reproducibles, el producto derivatizado debe ser estable y además las condiciones de la reacción deben de ser lo más simple posibles y con el menor número de etapas.⁴⁹

Por lo general, los analitos producto de la derivatización se convierten ya sea en compuestos volátiles que pueden ser analizados por GC con detectores sensibles como (FID, ECD, MS) o en compuestos fluorescentes que pueden ser analizados por HPLC acoplado a un detector de fluorescencia.⁵⁰

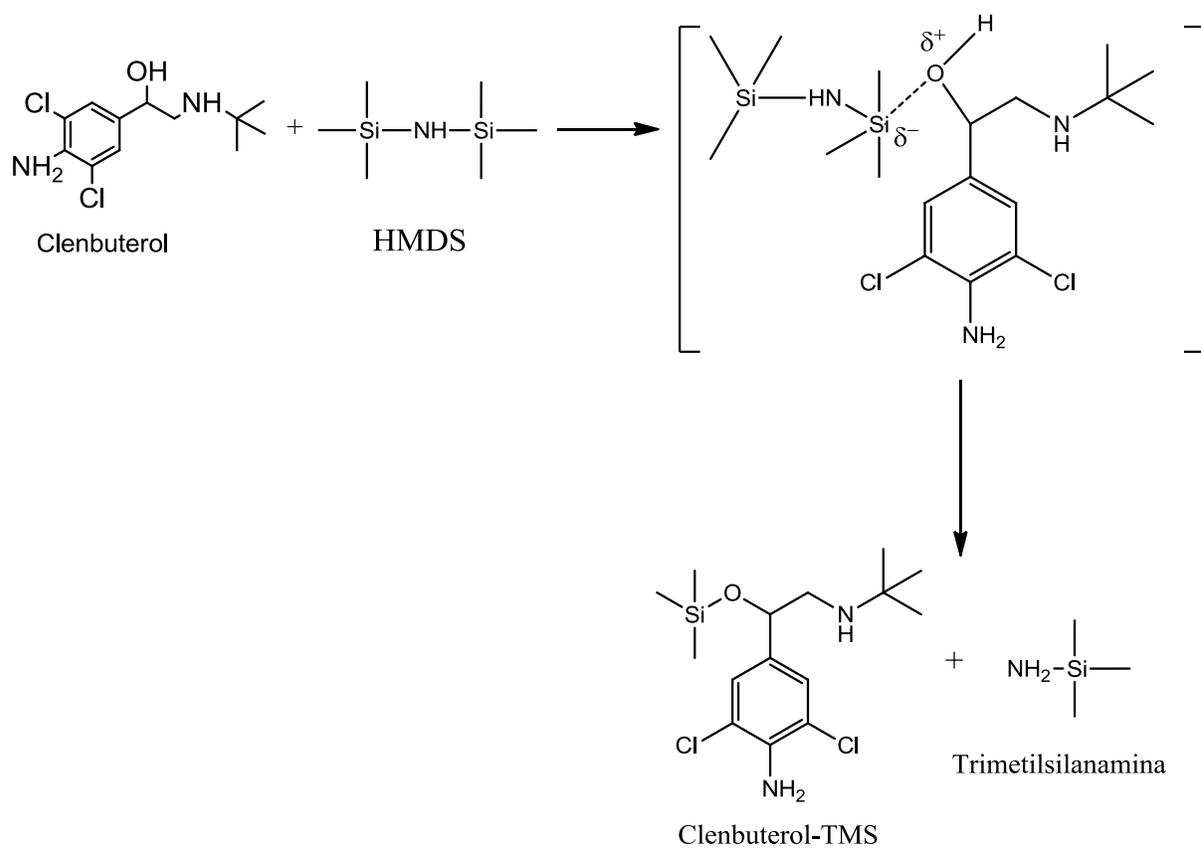


Figura 13. Reacción de sililación entre el clenbuterol y el HMDS.

En CG las reacciones de derivatización se clasifican principalmente en tres modos: *pre-column*, *post-column* y *on-column*. El modo *pre-column* se realiza antes de entrar a la columna, el *post-column* después de entrar a la columna y el *on-column* inyectando la muestra y el derivatizante directo al cromatógrafo. La derivatización *pre-column* es el modo de derivatización más común y se puede realizar de tres formas, antes de la extracción (*pre-extraction*), después de la extracción (*post-extraction*) y durante la extracción (*in situ*).⁵¹

El realizar una derivatización antes o durante la SPME o HF-LPME puede mejorar la sensibilidad y la selectividad en la extracción y la detección, pero si se realiza después de la extracción únicamente se beneficiará la detección en GC, ya que mejora comportamiento cromatográfico del analito.³⁸



2.10 Cromatografía de gases

La cromatografía es una de las principales técnicas de separación, la cual es utilizada para separar componentes individuales de mezclas complejas. El principio de la cromatografía es la separación física de las sustancias por su partición entre una fase móvil y una fase estacionaria, siendo estas fases inmiscibles entre sí.⁵²

Los métodos cromatográficos más sobresalientes son la cromatografía de gases (GC, por sus siglas en inglés), la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) y la cromatografía en capa fina (TLC, por sus siglas en inglés).

La cromatografía de gases puede clasificarse de acuerdo a la naturaleza de su fase estacionaria, existe la cromatografía gas-líquido (GLC, por sus siglas en inglés) y la cromatografía gas-sólido (GSC, por sus siglas en inglés).

En la GLC la separación se logra por una participación entre las fases gaseosas móvil y un líquido estacionario que se mantiene sobre un soporte sólido o sobre las paredes de la columna. En la GSC la separación se realiza utilizando un material sólido inmóvil absorbente y una fase móvil gaseosa.

El desarrollo que ha tenido la cromatografía de gases se debe a las ventajas que presenta, como sensibilidad, versatilidad, rapidez en el análisis y alto nivel de automatización.

La cromatografía de gases comenzó a utilizarse a principios de los años 40 en el análisis de las fracciones ligeras de las refinerías de petróleo. Actualmente se emplea para determinar tanto cualitativamente como cuantitativamente sustancias en análisis de aguas, de suelos y de aire, además en la industria alimentaria fundamentalmente en la de los sabores.

Un cromatógrafo de gases está constituido por cinco partes fundamentales:

1. Suministro de gas portador con reguladores de presión y medidores de flujo.
2. Sistema de inyección.



3. Columna cromatográfica y horno.
4. Detector y amplificadores electrónicos.
5. Graficador y otros aditamentos para la presentación de datos.

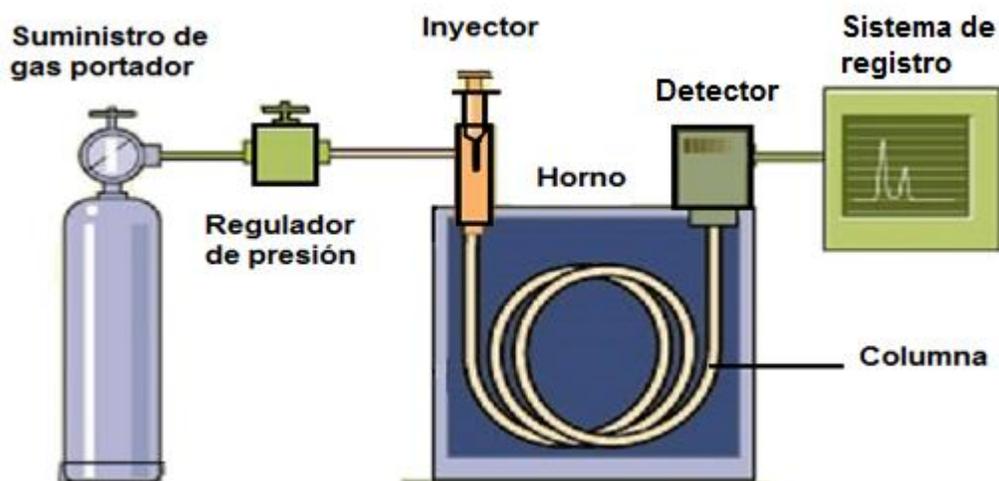


Figura 14. Cromatógrafo de gases⁵³

El gas portador (He o H_2) se encuentra almacenado en un tanque a alta presión que se conecta al sistema a través de un regulador de presión. La muestra en estado líquido o gaseoso se inyecta a través de una septa (disco de goma de silicón) al inyector caliente, en donde se evapora la muestra rápidamente y se mezcla con el gas portador caliente, para después entrar a la columna. El vapor es arrastrado por el gas portador a través de la columna que debe estar suficientemente caliente a fin de que los analitos alcancen su presión de vapor suficiente para que eluyan en un tiempo razonable hasta que llegan a un detector, cuya respuesta aparece en la pantalla de un ordenador o en un registrador.^{30, 40}

Para las columnas capilares comúnmente se utilizan inyectores que pueden funcionar de dos modos con o sin división (split o splitless), esto con la finalidad de que no se llegue a saturar la columna con la muestra. Cuando la concentración de los analitos que nos interesan constituyen $> 0.1\%$ de la muestra se prefiere una inyección con división, ya que únicamente se introduce a la columna del 0.2 al 2%



de la muestra. Pero cuando se necesitan analizar trazas de analitos (menos de 0.01% de muestra) se opta por una inyección sin división, en donde aproximadamente el 80% de la muestra pasa a la columna.

Una de las consideraciones más importantes al realizar la GC es la fase estacionaria que se elige, ya que los tiempos de retención relativos de los solutos polares y no polares dependen de la polaridad de la fase estacionaria.

Otro factor que hay que tomar en cuenta en GC es la programación de la rampa de temperatura durante la separación, ya que de ésta dependerá el aumento de la presión de vapor de los solutos y los equilibrios de distribución de los analitos entre el gas de arrastre y la fase estacionaria, así como la rapidez con que se establecen los equilibrios.³⁰

Al finalizar la separación de los compuestos a través de la columna cromatográfica, hay un detector, el cual reconoce el paso de las sustancias que son eluidas por el gas vehículo conforme salen columna. Existen diferentes tipos de detectores, los universales que son sensibles a la mayoría de los compuestos eluidos y los específicos que son sensibles a un tipo de moléculas.

Entre los detectores específicos se encuentran el detector termoiónico (NPD, por sus siglas en inglés) que es muy sensible a los compuestos nitrogenados o fosforados, el detector de captura de electrones (ECD, por sus siglas en inglés) que es muy sensible a derivados halogenados de compuestos orgánicos, el detector de fotometría de llama (FPD, por sus siglas en inglés) que es muy apto para hidrocarburos que contienen derivados de azufre y fósforo.⁵⁴

Entre los detectores universales están el detector de conductividad térmica (TCD, por sus siglas en inglés), detector de ionización de llama (FID, por sus siglas en inglés) que es universal para compuestos orgánicos, el detector de fotoionización (PID, por sus siglas en inglés) que puede ser universal o puede tener una cierta selectividad debida a la identidad del gas en la lámpara.



También dentro de los detectores universales está el espectrómetro de infrarrojo con transformada de Fourier y el espectrómetro de masas, este último siendo el detector universal más sofisticado para cromatografía de gases. En ambos casos se puede identificar un pico comparando su espectro con los de una librería de espectros guardados en el ordenador.

2.11 Espectrometría de masas

La espectrometría de masas (MS, por sus siglas en inglés) es un método de análisis que se emplea para medir la masa de los iones y su abundancia en fase gaseosa, lo que permite recabar información sobre la naturaleza, la composición y la estructura de los analitos de una muestra.³⁰

Un espectrómetro de masas está conformado principalmente por tres partes: la fuente de masas, el analizador de masas y el transductor o detector.

Para realizar la determinación de masas se efectúa lo siguiente:

1. Ionización: la especie estudiada es vaporizada y ionizada en la fuente del equipo. En este estado, todo el compuesto formado por moléculas produce una mezcla estadística de iones de fragmentación.
2. Aceleración: posteriormente, los iones son extraídos de la fuente, focalizados y acelerados por las lentes electrónicas para incrementar su energía cinética.
3. Separación: los iones son “filtrados” siguiendo su relación masa/carga (m/z) por el analizador.
4. Detección: después de la separación los iones terminan su recorrido chocando con un detector que amplifica la muy débil corriente eléctrica inicialmente originada.
5. Obtención del espectro de masas: obtenido por tratamiento de la señal enviada por el detector.⁵⁴

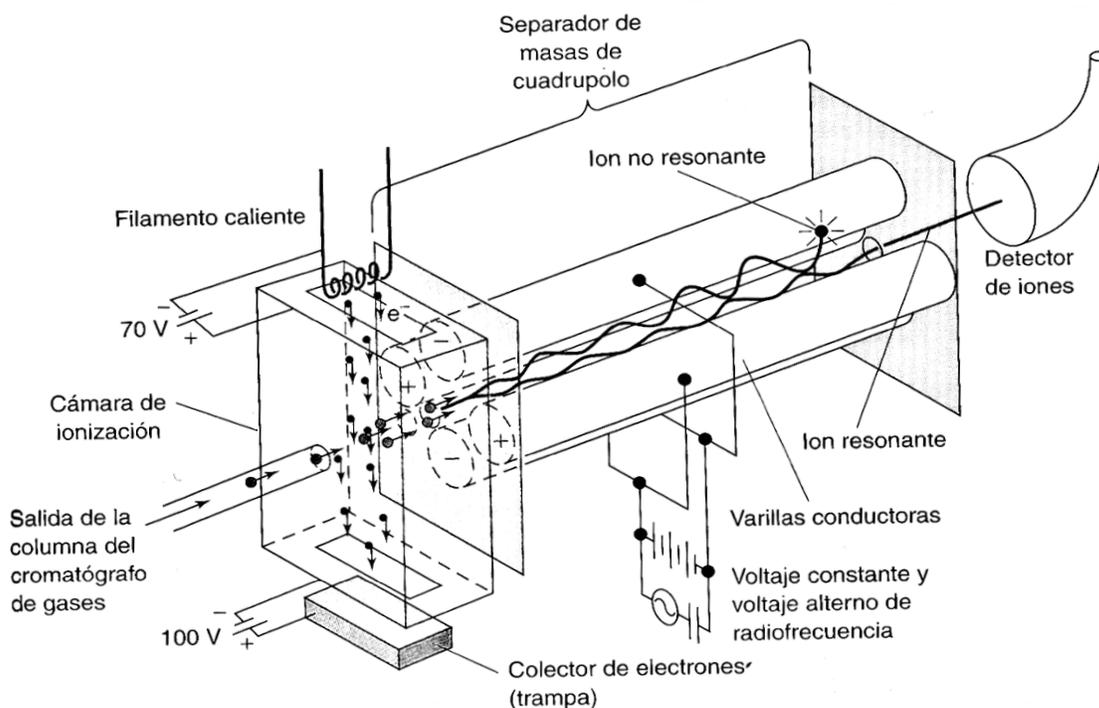


Figura 15. Espectrómetro de masas de cuadrupolo.⁴⁰

Los espectrómetros de masas de cuadrupolo de transmisión por lo general están conectados a una columna de cromatografía de gases, que registra los espectros de cada uno de los componentes a medida que se eluyen de la columna. Las especies que salen de la columna pasan a través de la línea de transferencia caliente hacia la fuente de ionización electrónica, que se mantiene con un vacío de $\sim 10^{-9}$ bar usando una bomba turbo molecular de gran velocidad, o de difusión de aceite. El potencial usual de operación de la fuente de ionización es de 70eV, que es la suficiente energía para ionizar y provocar la fragmentación de las moléculas de la muestra. Los iones se aceleran sometiéndolos a un potencial de 5-15V antes de entrar en el analizador de cuadrupolo.

El cuadrupolo consta de cuatro varillas paralelas a las que se aplica un voltaje constante y un voltaje oscilante de radiofrecuencia. El campo eléctrico desvía los iones en trayectorias complejas, a medida que pasan de la cámara de ionización al detector, permitiendo que sólo lleguen al detector aquellos que tienen relación m/z determinada. Los demás iones (iones no resonantes) chocan con las varillas y se



pierden antes de llegar al detector. Variando rápidamente el voltaje aplicado, se puede seleccionar los iones de diferentes masas que llegan al detector. Los cuadrupolos de transmisión pueden registrar de 2 a 8 espectros por segundo, cubriendo un intervalo de m/z de hasta 4000 uma.⁴⁰



3. METODOLOGÍA

3.1 Equipo y material

- Cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 Serie II Plus acoplado a un espectro de masas cuadrupolar Agilent 5973N.
- Columna Thermo TR-5MS (20 m X 0.18 mm ID X 0.18 μ m de película), 5% fenil polisilfenileno-siloxano.
- Baño de ultrasonido Sper Scientific.
- Centrífuga Hettich Lab Technology EBA 20.
- Balanza analítica, Ohaus® AP250D.
- Repetidora eppendorf Multipette® plus.
- Puntas para repetidora Eppendor combitips advanced® de 50, 10 y 1 mL.
- Micropipeta de 10-1000 μ L Hamilton.
- Micropipeta de 1-100 μ L Hamilton.
- Vortex IKA® “lab dancer”.
- Parrilla magnética Barnstead Thermolyne® modelo super-nuova.
- Fibras para SPME de PDMS/DVB Sigma-Aldrich®.
- Fibras huecas Accurel PP Q3/2 de polipropileno, espesor de pared de 200 μ m, 0.2 μ m de tamaño de poro y diámetro interno de 600 μ m, Membrana® (Wuppertal, Alemania).
- Tubo capilar de FEP, 0.030x1/16 in, Upchurch Scientific®.
- Soporte de la fibra para inyección manual (Supelco, Bellefonte, P.A., USA).
- Pipetas Pasteur.
- Barras magnéticas triangulares Spinvane Spinbar®.
- Material de vidrio: Probetas de 50 mL, pipetas volumétricas de 5 y 10 mL, matraces aforados de 10, 50, 100 mL, vasos de precipitados de 50 y 100 mL. Matraces kitsatos de 250 mL, tubos de ensaye con tapón de 16X100 .
- Viales de microextracción de 0.3 y 5 mL, Supelco.
- Portafiltro con soporte de vidrio sinterizado Millipore®.



- Filtro de membrana Mitex, PTFE, hidrófoba de 5 μm , diámetro 47 mm, Millipore®.
- Jeringa de 10 μL , Hamilton Gastight®.
- Viales de 15, 7 y 2 mL con tapón.
- Botellas ámbar con tapón de rosca de 4 oz.
- Hilo de algodón blanco.
- Tijeras.
- Tapones de hule.

3.2 Reactivos

- Clorhidrato de clenbuterol de alta pureza (por GC).
- Helio, grado BIP (pureza >99.99999%), INFRA®.
- Tolueno grado analítico, Merck.
- Hexametildisilazano (HMDS) $\geq 99.0\%$, Sigma-Aldrich®.
- Metanol grado pesticida, Tecsiquim.
- Agua desionizada ultrapura (Barnstead).
- Acido perclórico 70% Merck.
- Hidróxido de Sodio 99.3%, J.T. Baker®.

3.3 Muestras

- Hígado del mercado Mercalli Siglo XXI ubicado entre la calle Rosa María Sequeira y Mariquita Sánchez, colonia CTM Culhuacán, Delegación Coyoacán, México D.F.
- Hígado del mercado Guadalupe ubicado entre la Calle del Fresno, Oyamel y Tlalnepantla, colonia Valle de los Reyes Acaquilpan, municipio la Paz, Estado de México.
- Material de referencia: Hígado con 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y blanco proveniente del CENAM.



3.4 Preparación de las disoluciones

A partir de una solución madre de clenbuterol a 1000 mg/L en metanol se prepararon las diferentes soluciones de trabajo en agua desionizada ultrapura con intervalo de concentraciones de 100 mg/L hasta 100 ng/L.

Las soluciones de 100, 10 y 1 mg/L se prepararon a partir de la solución madre de 1000 mg/L, las soluciones de 100, 10, 5 y 1 $\mu\text{g/L}$ se prepararon a partir de la solución de trabajo de 1 mg/L y la solución de 100 ng/L se preparó a partir de la solución de trabajo de 1 $\mu\text{g/L}$.

3.5 Preparación del blanco de hígado enriquecido

El hígado blanco de referencia liofilizado se reconstituyó con agua para obtener 1.4 g de muestra, luego se adicionó con una solución de clenbuterol a 100 $\mu\text{g/L}$ para obtener una concentración final en la muestra de 10 $\mu\text{g/kg}$.

3.6 Preparación de hígado de referencia con 2 $\mu\text{g/L}$

El hígado de referencia que tenía una concentración de 2 $\mu\text{g/L}$ de clenbuterol se reconstituyó con agua para obtener 1.4 g de muestra de hígado.

3.7 Preparación de las muestras de hígado enriquecidas

Se pesaron aproximadamente de 200 a 300 g de hígado que se adquirió en dos distintos mercados, se homogeneizó en una licuadora y para finalizar se enriqueció el extracto con una solución de trabajo de 1 mg/L para aumentar la concentración de la muestra en 10 $\mu\text{g/kg}$.

3.8 Tratamiento de las muestras de hígado

Para el tratamiento de las muestras de hígado se tomó como base el trabajo desarrollado por Guy, Savoy y Stadler⁵⁵ y por Posyniak, Zmudzki y Niedzielska.⁵⁶ A 1.4 g de muestra de hígado se le agregaron 3.5 mL de HClO_4 a una concentración 0.4 M, luego se colocaron en un baño de ultrasonido durante 5 min. Después se agitaron en vortex por 10 min. Una vez terminado, se centrifugaron a 4811 rpm (2225g) durante 15 min. El sobrenadante se pasó a través de un papel filtro de 5 μm .



Se realizó un segundo tratamiento al extracto de hígado para obtener el doble de volumen de sobrenadante. Para finalizar, el filtrado se ajustó a un pH aproximado de 10 con NaOH.

3.9 Extracción por SPME

En un vial se colocaron 2 mL de una solución de 100 mg/L de clenbuterol en un baño de aceite a (80, 90 y 100) °C, con agitación a (300, 600 y 900) rpm. La fibra SPME se colocó 1 cm arriba de la muestra. Se extrajo durante (20, 30 y 40) min.

Posteriormente, para formar el derivado, se añadieron 100 µL de HMDS a un vial en baño María a (60, 70 y 80) °C, se introdujo la fibra al vial durante (3, 5 y 7) min. Finalmente se introdujo la fibra al inyector durante (2, 4 y 6) min. Entre cada análisis se realizó la limpieza de la fibra, dejándola durante 4 min en el inyector.

3.10 Extracción y derivatización por HF-LPME en un paso

Al inicio se introdujeron sobre la aguja 4.5 cm de tubo FEP como guía, luego la fibra hueca se cortó a 1.9 cm y con la jeringa se tomaron 5 µL de mezcla de fase aceptora HMDS/tolueno (1:1, v/v). Después se sujetó la fibra a la aguja de la jeringa con un hilo e inmediatamente se sumergió durante 30 segundos en tolueno o en una mezcla HMDS/tolueno (1:1, v/v).

Para continuar se colocaron 5 mL de solución de trabajo en un vial de extracción y luego se introdujo la fibra dentro del vial durante (5, 10, 15 y 20) min a (25, 35 y 40) °C y una velocidad de agitación de (300, 450, 600, 750, 900 y 1200) rpm. Transcurrido el tiempo se retrajo el embolo de la jeringa para recuperar el extracto de la fibra. Para finalizar se tomaron (1, 2 y 4) µL del extracto y se inyectó en el cromatógrafo.

3.11 Extracción por HF-LPME seguida de la derivatización.

Inicialmente se introdujo sobre la aguja 4.5 cm de tubo FEP como guía, después se tomaron con jeringa 5 µL de tolueno y se colocó la fibra hueca, sujetándola con hilo. Posteriormente se sumergió la fibra durante 30 segundos en tolueno y luego se



introdujo dentro del vial con 5 mL de solución de trabajo durante (10,15 y 20) min a (25, 30 y 40)°C a una velocidad de agitación de (300, 600 900 y 1200) rpm. Enseguida se retrajo el émbolo de la jeringa recuperando el extracto.

Para la derivatización se colocó el extracto en un vial cónico de 0.3 mL, luego se evaporó a sequedad con Nitrógeno durante 3 minutos, una vez seco se añadieron 5 µL de HMDS y se agitó con ultrasonido durante 20 s. Posteriormente se calentó a (60, 70, 80 y 90) °C durante (10, 20 y 30) minutos y después se dejó enfriar en un baño de agua durante 5 minutos. Para finalizar se tomó (1, 2 y 4) µL del derivado y se inyectó en el cromatógrafo.

3.12 GC-MS

El análisis se realizó por medio de un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 Serie II Plus acoplado a un espectro de masas cuadrupolar Agilent 5973N. El inyector era un split-splitless y la columna Thermo TR-5MS (20 m X 0.18mm ID X0.18 µm de película), 5% fenil polisilfenileno-siloxano.



Figura 16. Cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 Serie II Plus acoplado a un espectro de masas cuadrupolar Agilent 5973N.



Las condiciones de operación del cromatógrafo fueron: temperatura del inyector 300°C, inyección splitless, 1µL. Temperatura de la columna inicial 70°C, rampa de temperatura 15°C/min hasta 300°C y tiempo final 5. Se utilizó Helio como gas portador a un flujo 0.5 mL/min.

Línea de transferencia a 300°C. En el espectrómetro de masas se utilizó la ionización electrónica (EI, por sus siglas en inglés) a 70 eV, la cámara de ionización se mantuvo a una temperatura de 230 °C y el cuadrupolo a 150°C.

Primero se realizó un barrido (SCAN) con un intervalo de 50-400 m/z para identificar el clenbuterol, después se derivatizó el clenbuterol y se realizó un análisis en modo SCAN para identificar el clenbuterol-TMS, después se corroboró por medio de un monitoreo selectivo de iones (SIM, por sus siglas en inglés) del ion característico del clenbuterol y del derivatizado siendo 86 m/z para ambos.

3.13 Recobro y comparación de las técnicas

Después de conocer las condiciones óptimas de cada una de las técnicas se realizó la comparación entre ellas mediante el recobro y la precisión.

Para determinar el recobro se secaron con flujo de nitrógeno 250 µL de una solución de 5 mg/L de clenbuterol, se derivatizaron con 5 µL de HMDS y se inyectó 1 µL para su análisis por GC-MS. Después se realizó el ajuste en el área como si se hubiera inyectado toda la solución y se extrapoló para conocer el área de cada una de las técnicas de microextracción como si se hubiera realizado un recobro del 100%. Para finalizar se calculó el porcentaje de recobro real de cada una de las técnicas comparando la cantidad de moles extraídos contra los que se hubieran extraído si se tuviera un recobro al 100%. El ejemplo del cálculo se encuentra en el Anexo 1.

Para el cálculo de la precisión se realizó mediante el CV mediante la ecuación del Anexo 2.



3.14 Linealidad

Intervalo Lineal

A partir de la solución madre de clenbuterol de 1000 mg/L en metanol se prepararon disoluciones en agua desionizada ultrapura en el intervalo de 100 ng/L a 100 mg/L. Las disoluciones se sometieron a la extracción por HF-LPME en un paso y después se analizaron por GC-MS.

Intervalo de trabajo

La linealidad del método también fue evaluada a bajas concentraciones, por tal motivo a partir de una solución de 1 mg/L en agua ultrapura se realizó una curva de calibración de 2 a 20 µg/L.

3.15 Precisión

La precisión de cada una de las técnicas de extracción y la implementación de HF-LPME en un paso con muestras de hígado se determinó por medio de la repetibilidad calculando el coeficiente de variación porcentual (%CV). El cálculo del %CV se realizó de acuerdo a las ecuaciones del Anexo 2.

3.16 Límite de detección

Para calcular el límite de detección (LD) se analizaron 7 muestras de clenbuterol a una concentración de 1 µg/L y se calculó el límite utilizando la ecuación del Anexo 2.



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Identificación del clenbuterol y del clenbuterol-TMS

Inicialmente se buscaron las condiciones óptimas para el análisis cromatográfico de clenbuterol, se inyectó al cromatógrafo una concentración de 1mg/mL en modo SCAN, obteniéndose el cromatograma de la figura 17, con su respectivo espectro de masas (figura 18), este último siendo comparado con un espectro de masas de referencia de la biblioteca NIST, (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología, por sus siglas en inglés) (figura 19), los cuales tenían similitud del 98%.

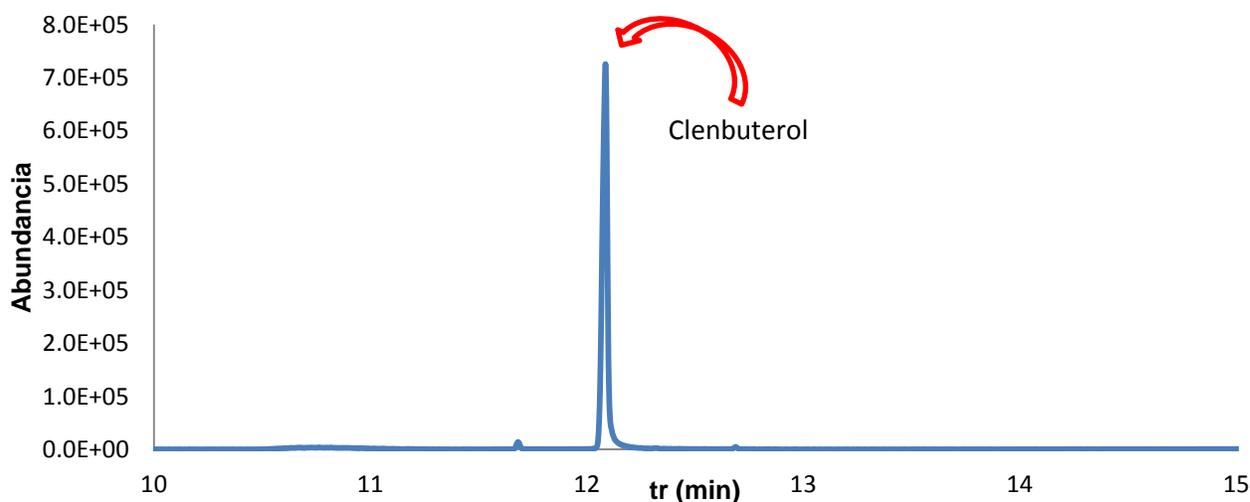


Figura 17. Cromatograma del clenbuterol modo SCAN.

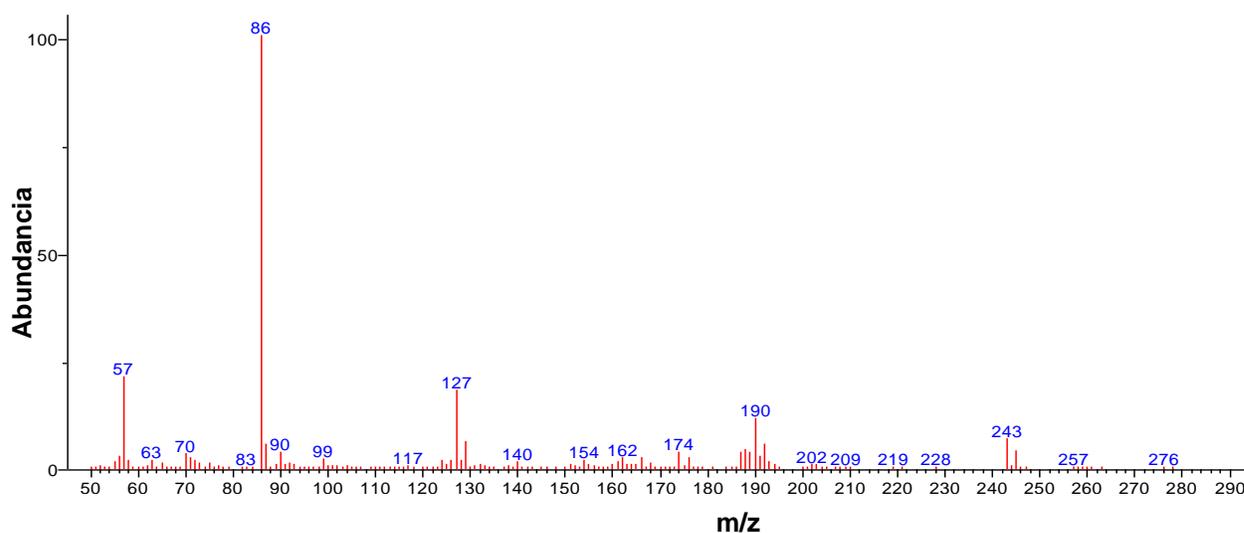


Figura 18. Espectro de masas del clenbuterol obtenido experimentalmente.

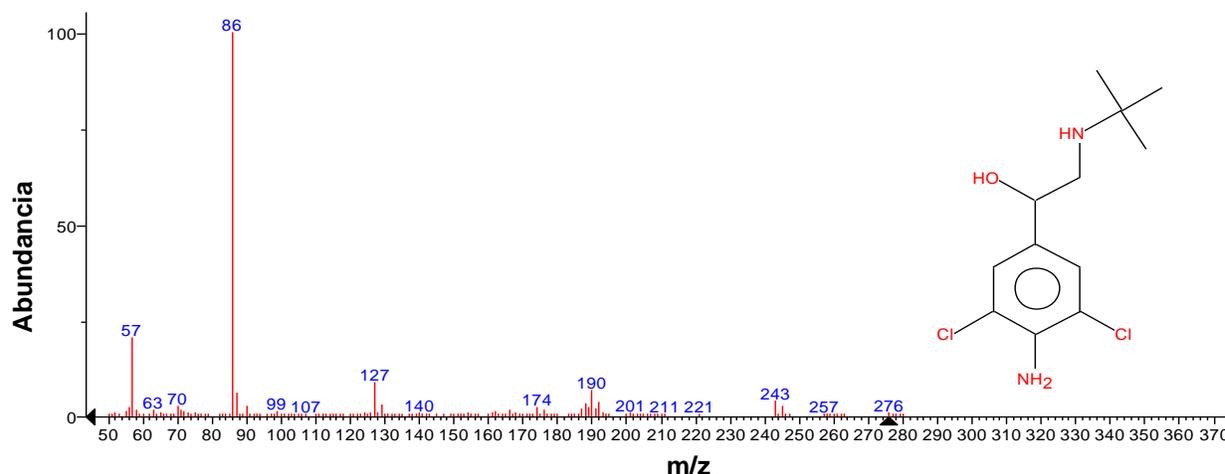


Figura 19. Espectro de masas del clenbuterol de la biblioteca NIST.

Debido a que el pico cromatográfico del clenbuterol estaba coaleado, se realizó la extracción y derivatización de una solución de clenbuterol a 100 mg/L, empleando como derivatizante HMDS. Se obtuvo el cromatograma de la figura 20 y su respectivo espectro de masas (figura 21). En el cromatograma se observa el tiempo de retención del clenbuterol-TMS a 11.2 min y el espectro de masas experimental se comparó con el espectro de masas de la biblioteca NIST (figura 22) con una similitud del 98%.

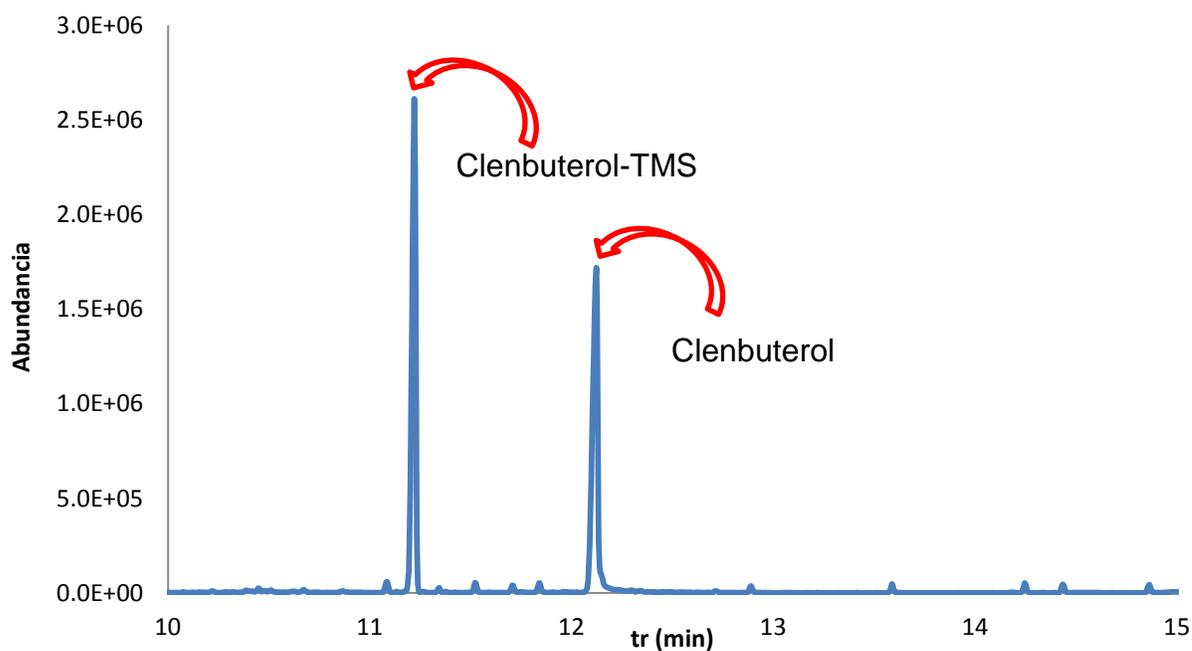


Figura 20. Cromatograma del clenbuterol-TMS modo SCAN.

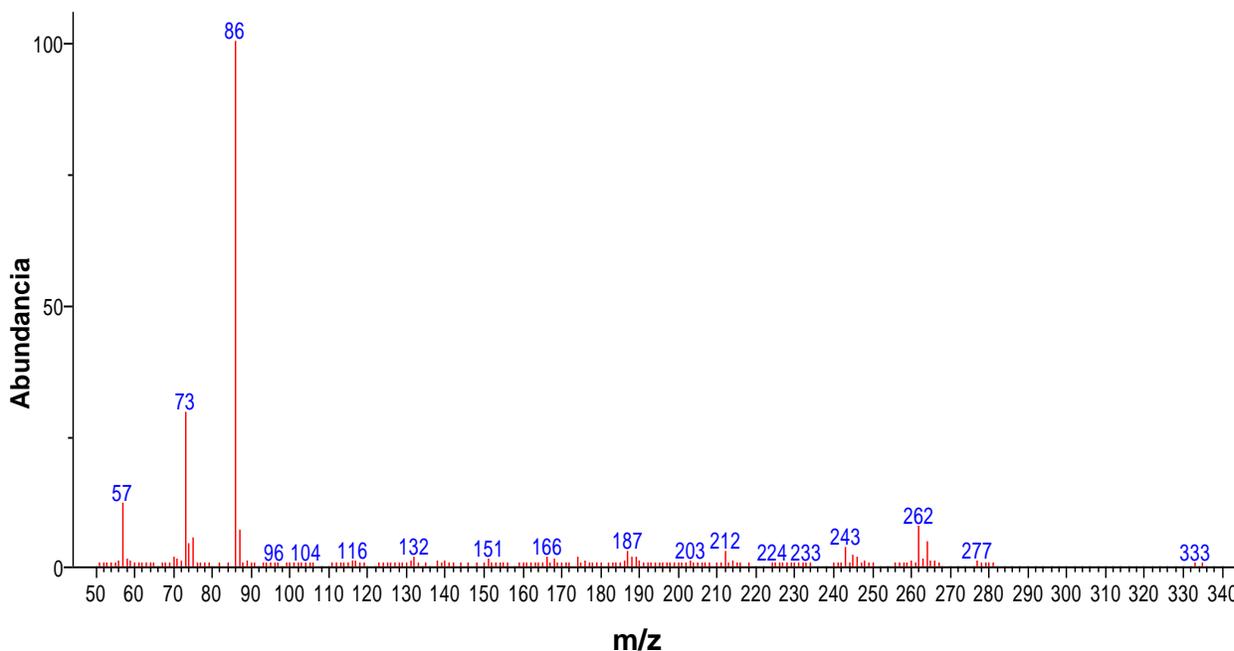


Figura 21. Espectro de masas del clenbuterol-TMS obtenido experimentalmente.

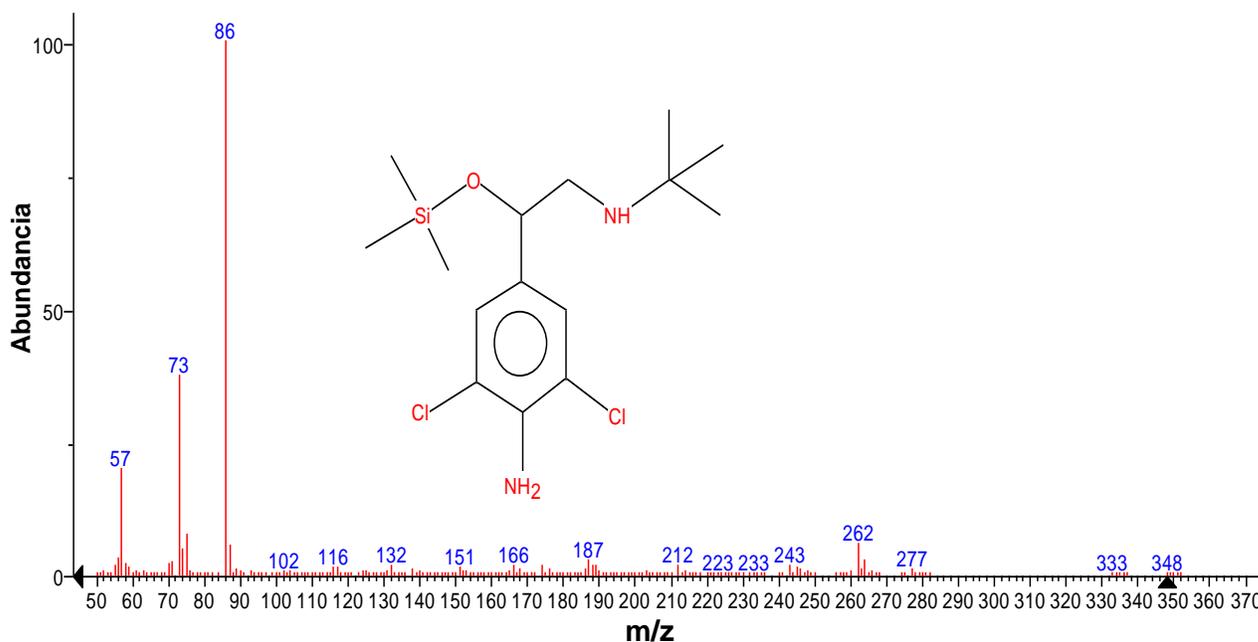


Figura 22. Espectro de masas del clenbuterol-TMS de la biblioteca NIST.

Fue necesario realizar la derivatización con HMDS con el propósito de evitar interacciones del grupo $-OH$ del clenbuterol con la fase estacionaria de la columna. Esto permitió obtener picos cromatográficos mejor definidos, que se traduce en cuantificaciones más precisas.



Una vez encontrado el método óptimo y los tiempo de retención de clenbuterol, se corroboró mediante un análisis cromatográfico en modo SIM, ya que este tipo de análisis es más selectivo y sensible, se utilizó el ion 86 m/z que es característico tanto del clenbuterol como del clenbuterol-TMS.

4.2 Extracción y derivatización por SPME

Se buscaron los parámetros óptimos para realizar la extracción y derivatización mediante la técnica SPME. Las condiciones que se cambiaron inicialmente fueron la temperatura y la velocidad de la agitación, encontrando que la temperatura de 90°C y velocidad de 600 rpm son las óptimas para la extracción. Se tomó la decisión debido a los resultados que se presentan en la figura 23 y 24, en las cuales se observa que a estas condiciones se obtiene un pico cromatográfico con mayor área y con menor coeficiente de variación (%CV). Debido a que a 90°C la presión del vapor del clenbuterol en el vial es adecuada para que no existan fugas, sin embargo a 100°C la presión de vapor es elevada, lo que provoca que se fugue parte del compuesto por el orificio donde entra la fibra PDMS/DVB. Para la temperatura de 80°C, la presión de vapor del compuesto es baja lo que ocasiona que se extraiga menor cantidad.

Para la velocidad de agitación se puede mencionar que a 600 rpm se extrae más cuantitativamente, ya que de manera general la agitación acelera la transferencia de los analitos hacia el polímero de la fibra. Por lo cual a 300 rpm es menor la transferencia y con 900 rpm la agitación es muy rápida, provocando falta de reproducibilidad y de precisión en los resultados.

La siguiente variable que se determinó fue el tiempo de extracción, manteniendo constante la temperatura y la velocidad de agitación. De acuerdo a los resultados en la tabla el tiempo en cual se obtuvo una mayor área y con menor variación fue a 30 min, ya que es el adecuado para que ocurra el equilibrio entre el medio y la fibra. A los 20 min se puede decir que aún no se ha alcanzado el equilibrio y por tal motivo se extrae menor cantidad.



Ya encontradas las condiciones de la extracción se prosiguió a encontrar los parámetros de la derivatización. Primero se comenzó con la temperatura, en donde se encontró que la energía óptima de activación de la reacción de sililación ocurre a los 80°C, lo cual explica por qué a los 60°C y 70°C la reacción ocurrió más lentamente.

Después se hicieron pruebas para fijar el tiempo que duraría la derivatización, siendo el óptimo 3 min, esto se debe a que a un tiempo mayor el HMDS en lugar de reaccionar con el clenbuterol comienza a interactuar con la fibra y tiende al equilibrio con la misma, lo cual provoca que el clenbuterol sea desplazado y el derivatizante sea adsorbido.

Para finalizar se determinó el tiempo de desorción en el inyector del cromatógrafo, siendo 2 min el óptimo, esto se debe a que a un mayor tiempo se acorta la vida media del recubrimiento del polímero de la fibra, lo cual es provocado por una parte, por someter a la fibra a la temperatura del inyector, además del tratamiento previo que se le da durante la SPME.

De manera significativa se presentan los resultados (figura 23) de los parámetros que más afectaron la SPME que fueron la temperatura y la velocidad de la agitación, manteniendo las demás condiciones fijas. Se realizó el experimento por triplicado para observar su reproducibilidad.

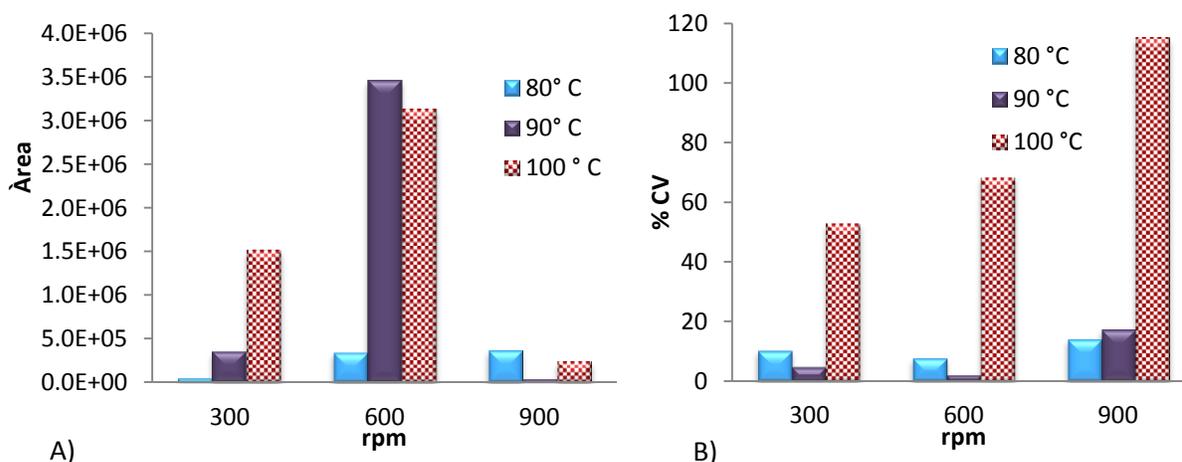


Figura 23. A) Efecto de la temperatura y velocidad de agitación en la extracción por SPME. B) Coeficiente de variación porcentual.



Las condiciones óptimas para realizar la SPME son:

Etapa	Variables	SPME
Extracción	Fibra	PDMS/DVB
	Solución de trabajo (mL)	2
	Velocidad de agitación (rpm)	600
	Temperatura (°C)	90
	Tiempo (min)	30
Derivatización	Derivatizante HMDS (μL)	100
	Temperatura (°C)	80
	Tiempo (min)	3
Desorción	Tiempo (min)	2

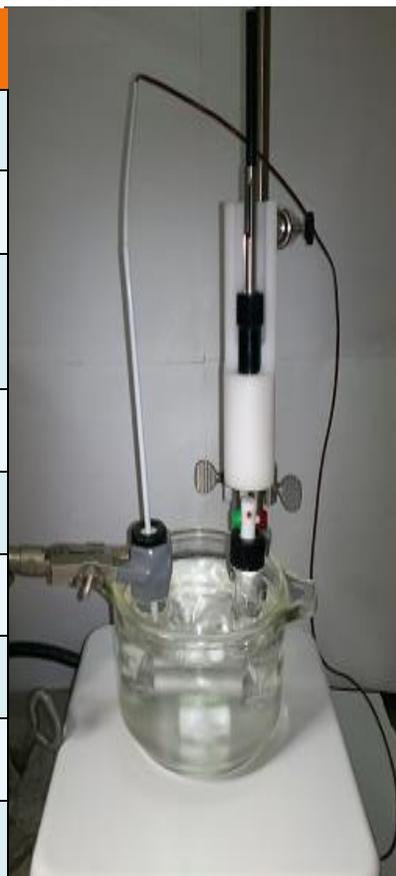


Tabla 10. Condiciones óptimas para extracción SPME.

Figura 24. SPME.

4.3 Extracción y derivatización por HF-LPME en un paso

Ya encontradas las variables para realizar la SPME, se continuó con la determinación de las condiciones óptimas para la técnica HF-LPME. Se inició con la extracción y la derivatización por HF-LPME en un paso.

Se analizó inicialmente la velocidad de agitación, los resultados se muestran en la figura 25. Para conocer si hay diferencias significativas se realizó una ANOVA (tabla 24), dando como resultado que no existen diferencias significativas. Se optó por realizar la extracción a una velocidad de 900 rpm ya que se recupera una mayor cantidad de clenbuterol debido a que a esta velocidad de agitación hay una mayor difusión del analito hacia la fase aceptora con un % CV aceptable. A pesar de que a 1200 rpm la difusión del clenbuterol a la fase aceptora es mayor, no se eligió porque se perdía parte de la fase aceptora, lo cual se debe a que a esta velocidad se



forman pequeñas burbujas que se adhieren a la superficie de la fibra hueca, lo que provoca que se evapore parte de la mezcla de HDMS/Tolueno (1:1, v/v).

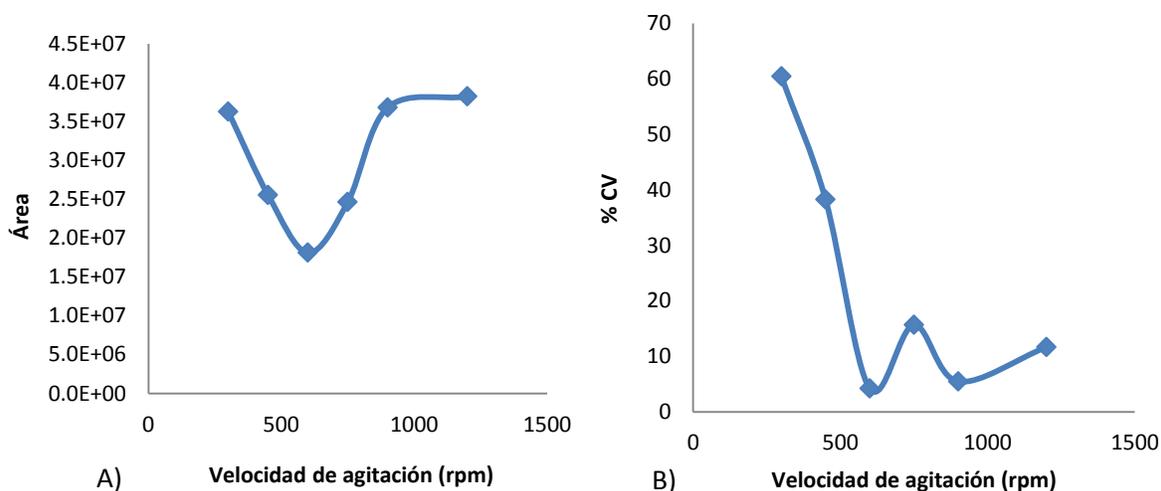


Figura 25 A) HF-LPME en un paso a diferentes velocidades de agitación. B) Coeficiente de variación porcentual.

En la figura 26 se muestra el efecto de la temperatura. Con la ayuda de la ANOVA (tabla 26) se observa que no existe una diferencia significativa, es decir, la extracción y la derivatización del clenbuterol no se ven considerablemente afectadas por la temperatura. Se tomó la decisión de ocupar la temperatura ambiente para realizar el experimento ya que se obtiene un mayor recobro y un %CV menor que con las otras temperaturas, además de ahorrarse el tiempo que tarda el baño en llegar a la temperatura deseada.

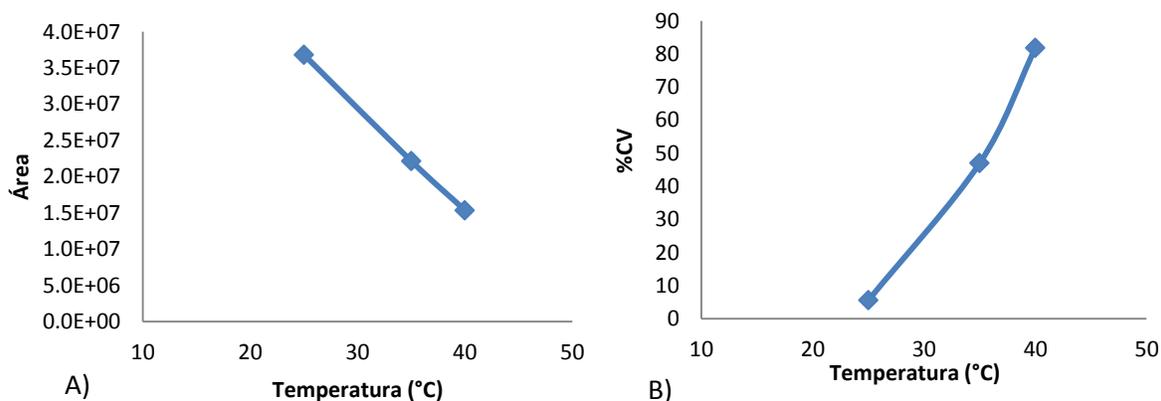


Figura 26. A) HF-LPME en un paso a diferentes temperaturas. B) Coeficiente de variación porcentual.



La figura 27 muestra el efecto del tiempo de reacción. El tiempo ideal es a 10 minutos, se consigue un mayor recobro con menor variación. También, se realizó una ANOVA (tabla 28) en la que se observa que existen diferencias significativas debido al tiempo de extracción. A los 5 min se obtiene un menor recobro, ya que el tiempo es insuficiente para que se establezca el equilibrio de la transferencia del analito hacia la fase aceptora. En cambio, a 15 y 20 minutos el recobro obtenido es menor y menos preciso que a 10 minutos, porque se comienza a perder parte de la fase extractante.

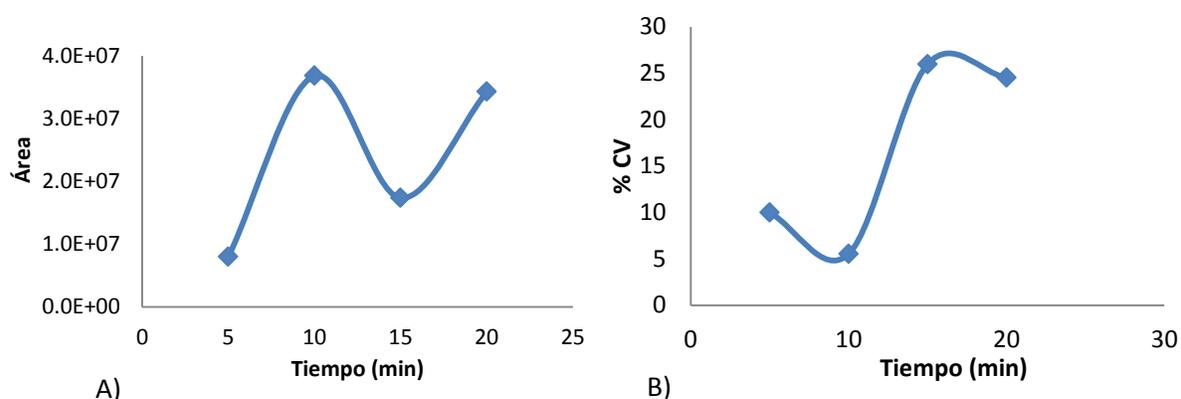


Figura 27. A) HF-LPME en un paso a diferentes tiempos. B) Coeficiente de variación porcentual.

Para finalizar se determinó el volumen de inyección. Inyectando 2 μL se tiene menor variación y un recobro aceptable. Con 1 μL los resultados no son homogéneos porque durante la extracción una parte de la fase aceptora quedaba dentro de la aguja de la jeringa y no interaccionaba con la muestra. Tampoco se eligieron 4 μL porque aunque se sabía que la cantidad inyectada de clenbuterol era mayor, los resultados obtenidos tenían una menor precisión.

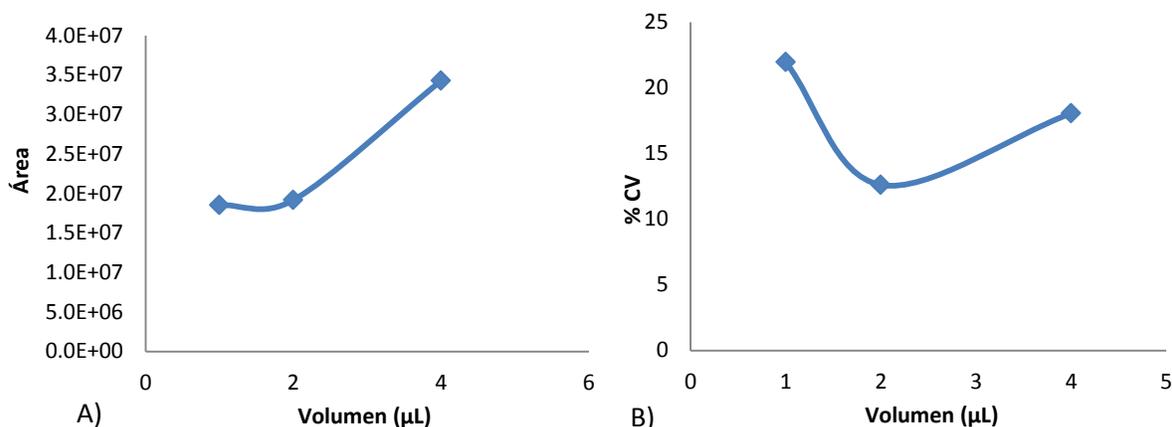


Figura 28. A) HF-LPME en un paso inyectando diferentes volúmenes al cromatógrafo de gases. B) Coeficiente de variación porcentual.

A manera de resumen se presentan todas las condiciones óptimas para realizar la HF-LPME en un paso.

Etapa	Variables	HF-LPME 1 paso
Extracción y derivatización simultanea	Fibra	Polipropileno
	Muestra (mL)	5
	Fase humectante de la fibra	5 HMDS/Tolueno
	Extractante (μL)	5 HMDS/Tolueno
	Velocidad de agitación (rpm)	900
	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Ambiente
	Tiempo (min)	10
Inyección	Volumen (μL)	2



Tabla 11. Condiciones óptimas para HF-LPME en un paso.

Figura 29. HF-LPME 1 paso.



4.4 Extracción por HF-LPME seguida de la derivatización

En la figura 30 se muestra el efecto de la velocidad de agitación durante la microextracción, el análisis por ANOVA de la tabla 32 de muestra que la velocidad de agitación influye de manera significativa. Se optó por trabajar a 600 rpm, a esta velocidad se obtuvo un recobro aceptable y un %CV menor que en las otras velocidades. Aunque a 300 rpm la transferencia del clenbuterol hacia la fase aceptora era mayor, los resultados no eran homogéneos. Por otro lado, a 900 rpm se obtuvo un recobro algo similar que a 600 rpm pero con resultados más heterogéneos, lo cual se debe a que la velocidad de agitación es intensa lo que provoca la pérdida de una parte de la fase aceptora ya que se evapora debido a la formación de burbujas en la muestra. Esta misma razón es a 1200 rpm pero aquí la pérdida del tolueno es mayor, lo que provoca que los resultados tengan gran variación y un recobro pobre.

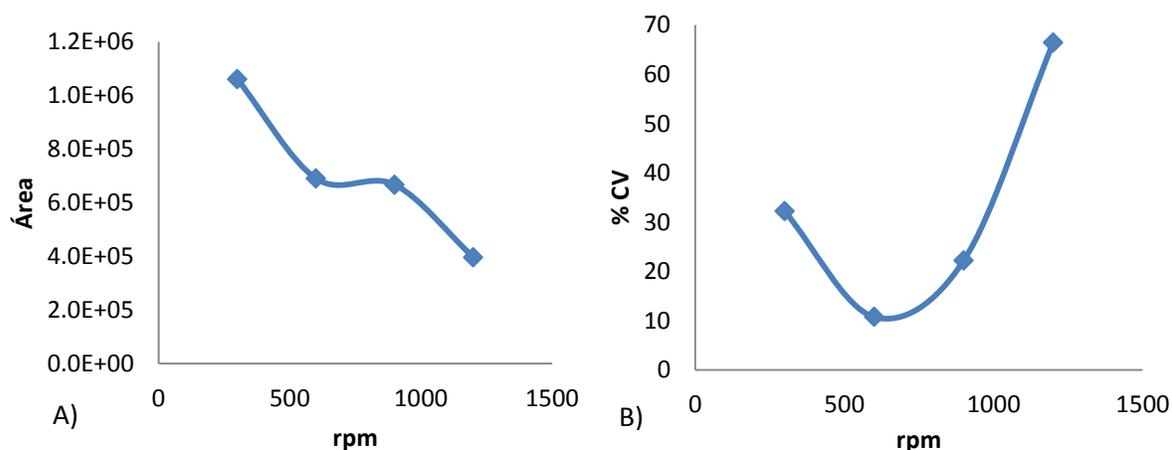


Figura 30. HF-LPME en dos pasos a diferentes velocidades de agitación. B) Coeficiente de variación porcentual.

La figura 31 muestra el efecto de la temperatura, con la ayuda de la ANOVA (tabla 34) se puede concluir que no hay efectos significativos, se optó por trabajar a 30°C, ya que se tiene una menor variación, los resultados son más homogéneos.

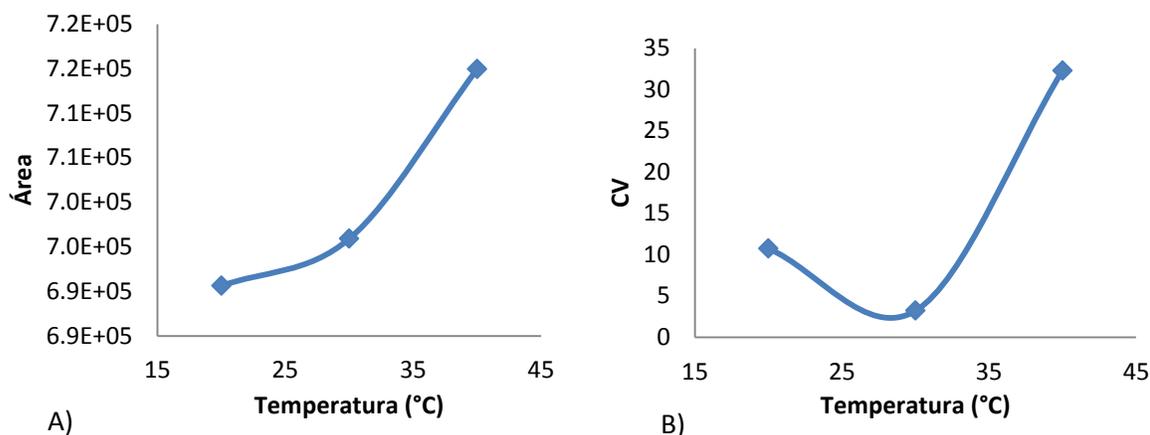


Figura 31. A) HF-LPME en dos pasos a diferentes temperaturas. B) Coeficiente de variación porcentual.

La figura 32 ilustra el efecto del tiempo de reacción. El análisis de varianza de la tabla 36 muestra que no hay diferencias, por lo cual se tomó la decisión de elegir 10 minutos pues se obtiene un mayor recobro con un % CV menor, además de que el tiempo del análisis es corto.

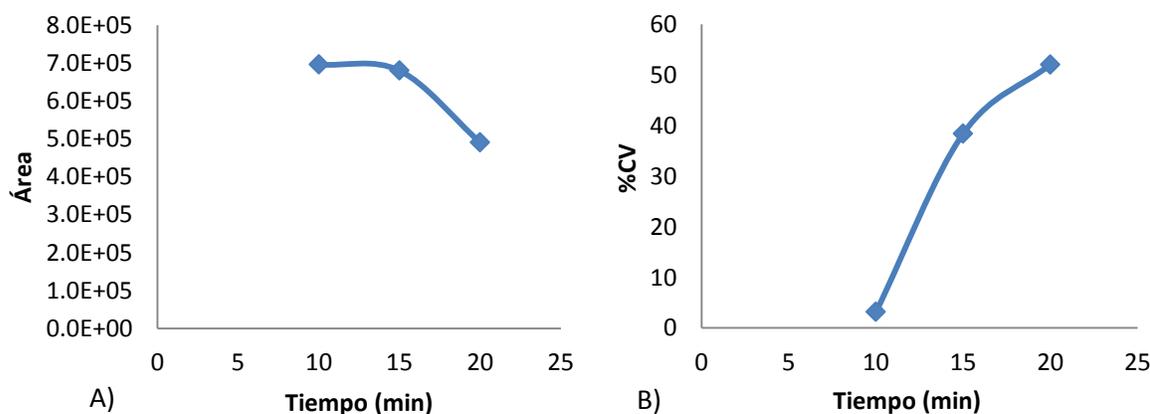


Figura 32. A) HF-LPME en dos pasos a diferentes tiempos. B) Coeficiente de variación porcentual.

Para continuar se determinaron las condiciones para la derivatización. Se comenzó con la temperatura y los resultados se muestran en la figura 33. De acuerdo al ANOVA (tabla 38) se puede concluir que existen diferencias significativas a las temperaturas estudiadas. La energía óptima de activación de la reacción para realizar la derivatización es a la temperatura de 70°C ya que se obtiene un recobro mayor con una mejor precisión que en las demás temperaturas.

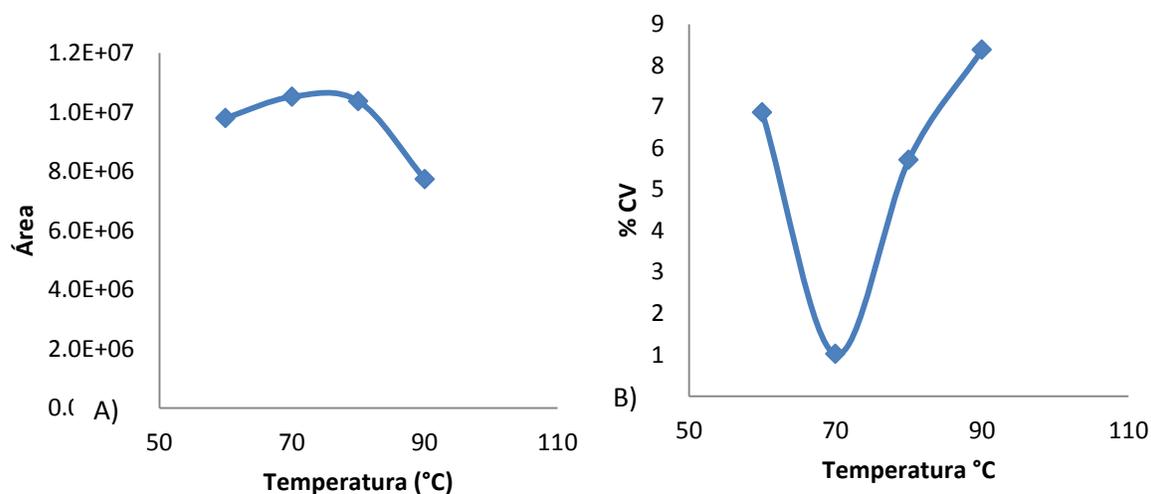


Figura 33. A) HF-LPME en dos pasos a diferentes temperaturas de derivatización. B) Coeficiente de variación porcentual.

La figura 34 muestra la influencia del tiempo de derivatización, siendo el mejor 20 minutos. Realizando el análisis de ANOVA (tabla 40) se puede concluir que existen diferencias significativas a los diferentes tiempos analizados. No se optó por 10 min ya que no es el tiempo suficiente para que reaccione la mayoría del clenbuterol con el HMDS, por otro lado a 30 min es un tiempo excesivo que ocasiona que se pierda parte de la fase aceptora.

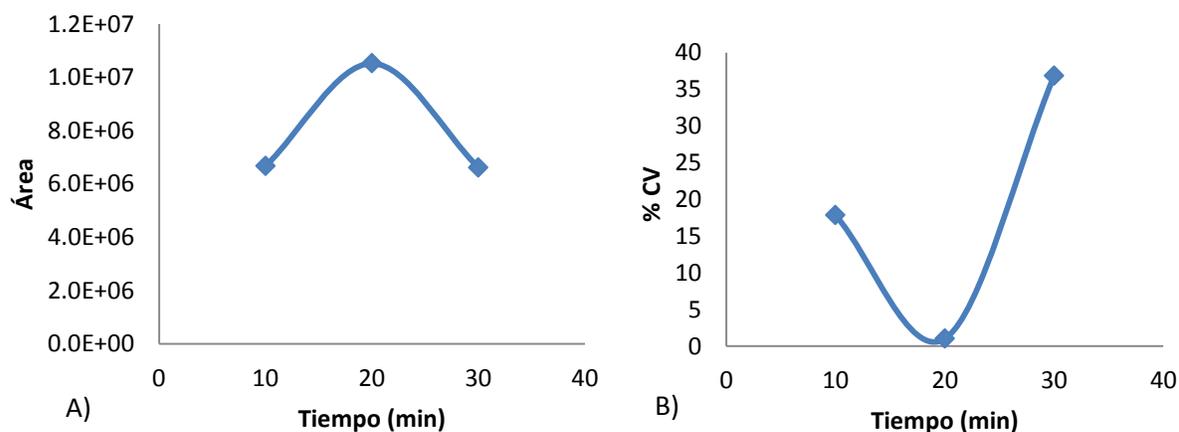


Figura 34. A) HF-LPME en dos pasos a diferentes tiempos de derivatización. B) Coeficiente de variación porcentual.

Después se determinó el volumen que será analizado por GC-MS, de acuerdo a los resultados de la figura 35 y en el ANOVA (tabla 42) no existen diferencias significativas a diferentes cantidades de volumen inyectado. Conociendo la



deducción se optó por inyectar 1 μL ya que se obtiene mejor precisión que a un volumen de 2 μL y a 4 μL .

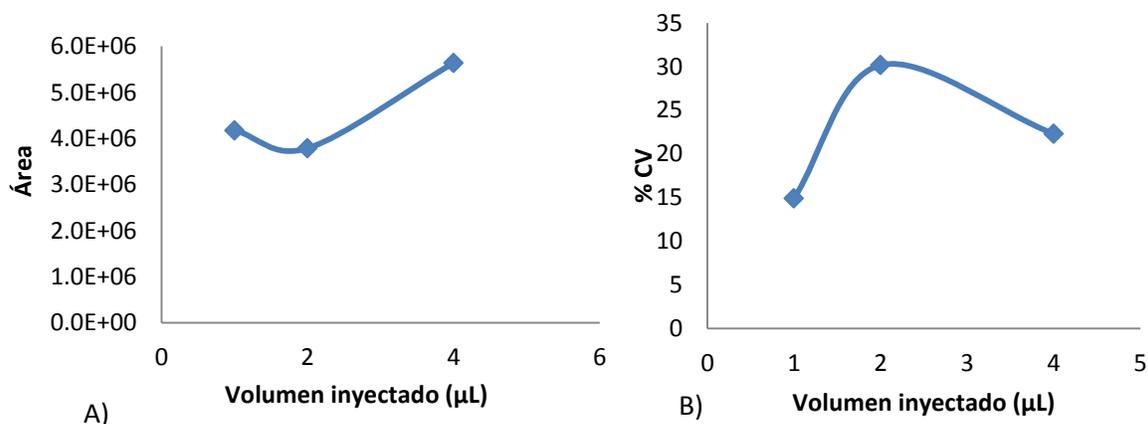


Figura 35.A) HF-LPME en dos pasos inyectando diferentes volúmenes al cromatógrafo de gases. B) Coeficiente de variación porcentual.

De manera resumida se presentan en la tabla 13 las condiciones adecuadas para realizar la HF-LPME en dos pasos.

Etapa	Variables	HF-LPME 2 pasos
Extracción	Fibra	Polipropileno
	Solución de trabajo (mL)	5
	Extractante (μL)	5 de tolueno
	Velocidad de agitación (rpm)	600
	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	30
	Tiempo (min)	10

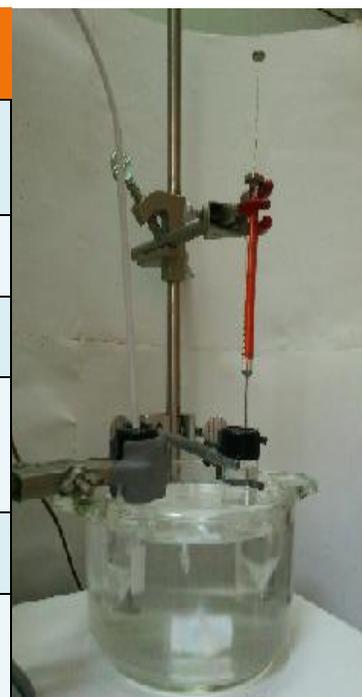


Tabla 12. Condiciones óptimas para extracción HF-LPME en dos pasos.

Figura 36. HF-LPME 2 pasos.



Etapa	Variables	HF-LPME en dos pasos
Derivatización	Derivatizante HMDS (μL)	5
	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	70
	Tiempo (min)	20
Inyección	Volumen (μL)	1

Tabla 13. Condiciones óptimas de derivatización para HF-LPME en dos pasos.

4.5 Recobro y comparación de las técnicas

Se analizaron 3 muestras por GC-MS de 5 mg/L de clenbuterol, las que representaron el 100% de recobro en cada técnica. Los cálculos se realizaron como se muestra en el Anexo 1.

Técnica	Área promedio (ua)	% Recobro relativo	% Recobro total
SPME	332817	0.02	0.02
HF-LPME un paso	19163831	0.41	1.04
HF-LPME dos pasos	4173735	0.09	0.45

Tabla 14. % de recobro relativo y total en las 3 técnicas.

Una vez ya analizadas las técnicas SPME, HF-LPME un paso y HF-LPME dos pasos, el mejor método para realizar la extracción del clenbuterol es la HF-LPME en un paso. Con ella se obtiene un recobro total 58 veces mayor respecto a SPME y del doble con respecto a HF-LPME en dos pasos, además HF-LPME en un paso es la técnica que presentó mayor precisión, con un %CV de 13. Analizando el porcentaje de recobro total, la extracción HF-LPME es la técnica con mayor recobro, pero este es muy bajo, lo cual nos recuerda que las técnicas de microextracción no son exhaustivas y se basan en un equilibrio.

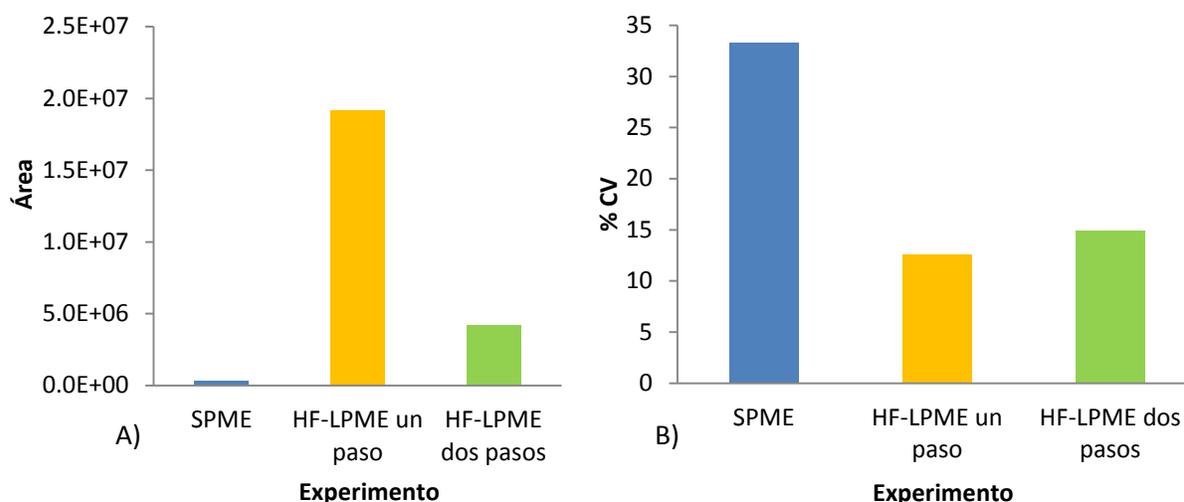


Figura 37. A) Comparación del recobro relativo de las 3 técnicas de extracción. B) %CV.

4.6 Efecto del pH

Una vez determinada la técnica por la cual se realizaría la extracción, se analizó el pH al cual se tenía que trabajar cuando se realizara con hígado de bovino. De acuerdo a los resultados de la figura 39 y la ANOVA (tabla 48) existen diferencias significativas de acuerdo al pH que se utiliza. El pH que se eligió fue de 10 ya que en este valor el equilibrio de disociación se desplaza hacia productos predominando el clenbuterol sin ionizar, el cual es más fácil que se desplace hacia la fase aceptora, además de que a este pH los resultados eran más precisos y con un recobro aceptable.

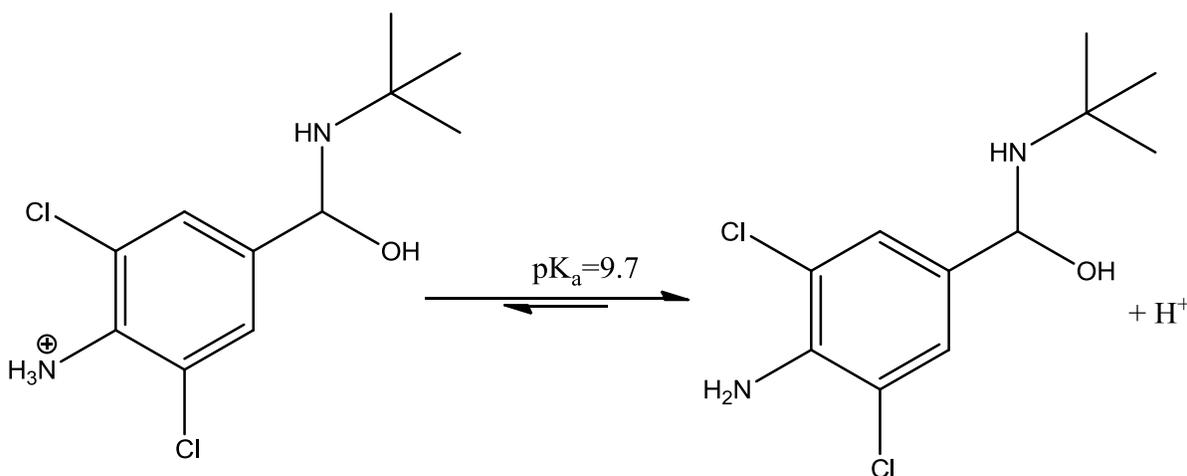


Figura 38. Disociación del clenbuterol a pH de 10.

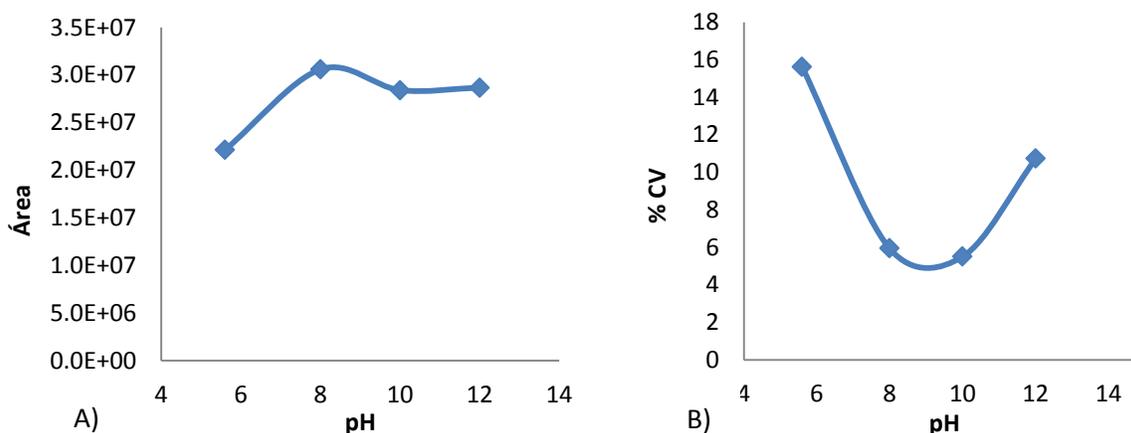


Figura 39. A) HF-LPME en un paso a diferentes valores de pH. B) Coeficiente de variación porcentual.

4.7 Linealidad

Intervalo Lineal

Se determinó la linealidad en un intervalo amplio de concentraciones de 100 ng/L a 100 mg/L. Como se cubren tres órdenes de magnitud, se manejó una escala bilogarítmica, de acuerdo a las ecuaciones del Anexo 2. En la figura 40 se observa que el método tiene un comportamiento lineal, con un coeficiente de correlación de 0.998.

Concentración (mg/L)	Área (ua)	log Concentración	log Área
0.0001	2289	-4	3.36
0.001	8749	-3	3.94
0.01	54229	-2	4.73
0.1	195288	-1	5.29
1	1017829	0	6.01
10	5648296	1	6.75
100	17147573	2	7.23

Tabla 15. Linealidad del método a diferentes concentraciones.

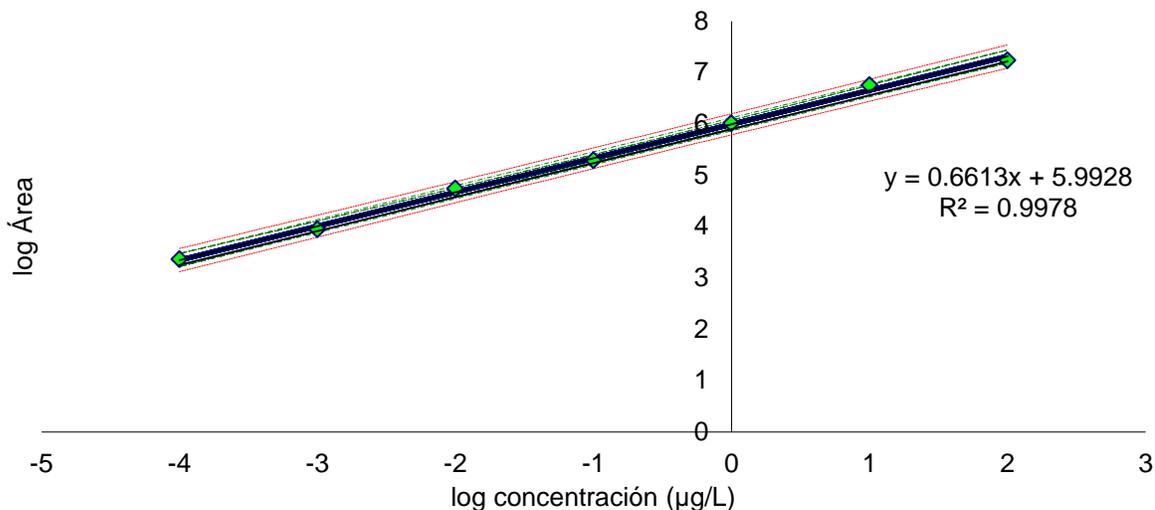


Figura 40. Curva de calibración de 100 mg/L a 100 ng/L.

Intervalo de trabajo

También se evaluó la linealidad del método a bajas concentraciones de clenbuterol, el intervalo que se utilizó fue de 2 a 20 µg/L, ya que dentro de este intervalo se encuentra el LMR y las concentraciones que comúnmente presentan las muestras de hígado contaminadas. Los resultados se muestran en la Figura 41, en donde vemos que el método tiene un comportamiento lineal.

Concentración (µg/L)	Área del pico (ua)
0	2201
4	12007
6	13766
8	20666
10	23778
18	42850
20	45644

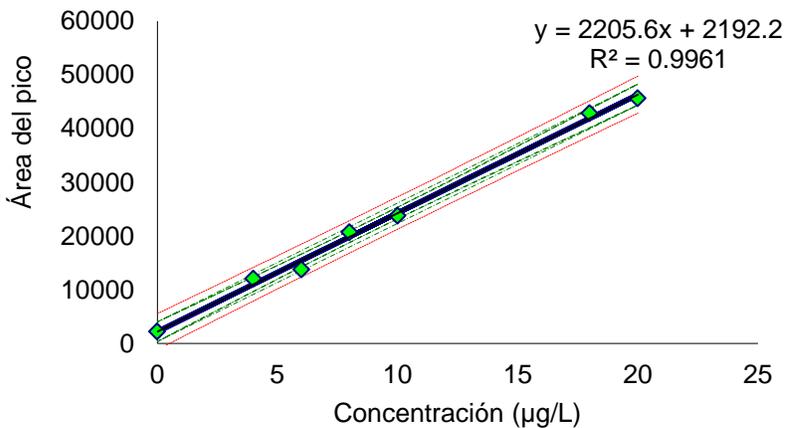


Figura 41. Curva de calibración a concentraciones bajas de 0 a 20 µg/L.



4.8 Límite de detección

Para calcular el límite de detección se realizaron 7 mediciones de una muestra de 1 µg/L de clenbuterol.

Muestra 1 µg/L	Área del pico (ua)
Muestra 1	8884
Muestra 2	5548
Muestra 3	4061
Muestra 4	5283
Muestra 5	5006
Muestra 6	6272
Muestra 7	7138
Promedio	6027
DS	1589
% CV	26

Tabla 16. Límite de detección.

$$LD = 2(1.94) \frac{1589}{\sqrt{7}} = 2330.2$$

Para conocer la concentración que corresponde el área en el LD se interpoló el área en la ecuación de la curva de calibración y se obtuvo una concentración de 63 ng/L. El procedimiento para hacer el cálculo se encuentra en el Anexo 1. Al presentar la técnica un LD bajo es de gran utilidad, ya que se pueden analizar muestras de hígado que contengan clenbuterol en el orden de µg o ng por kg de muestra y así verificar que cumplan el LMR y con la normatividad.



4.9 Muestras de mercados y enriquecidas

Para conocer si el hígado que se comercializa en algunos mercados públicos se encuentra contaminado con clenbuterol se tomaron muestras de los mercados Independencia y Guadalupe y se enriquecieron con 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de clenbuterol. Los resultados se muestran en la tabla 17.

Se encontró que el hígado del mercado Independencia tenía una concentración de 85 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y el hígado del mercado Guadalupe tenía 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, lo cual indica que se encuentran fuera de LMR que es de 0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de acuerdo al Codex Alimentarius. Estos niveles representarían un consumo puntual promedio (considerando un filete de 150 g) de aproximadamente 12.8 μg de clenbuterol, cinco veces superior a los 2.4 μg al día que daría como límite el NOEL para una persona de 60 kg y cincuenta veces superior al ADI.

	Mercado Independencia	Mercado Guadalupe
Promedio (ua)	44180	28490
DS	1714	4113
% CV	4	14
Concentración calculada con la curva de calibración	4.74 $\mu\text{g}/\text{L}$	0.35 $\mu\text{g}/\text{L}$
Concentración inicial en las muestras	85 $\mu\text{g}/\text{kg}$	50 $\mu\text{g}/\text{kg}$

Tabla 17. Muestras de mercado enriquecidas.

También se analizaron dos muestras del CENAM, un blanco enriquecido con 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y un hígado con una concentración de 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Los resultados se encuentran en la tabla 18, en donde se observa que la muestra que contiene 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ obtiene experimentalmente una concentración muy similar a la esperada teóricamente. En cambio, la concentración del blanco enriquecido es del doble, esto



se debe principalmente a errores sistemáticos. El cálculo de la concentración que se espera viene incluido en el Anexo 1.

	Blanco enriquecido con 10 µg/kg	Muestra con 2 µg/kg
Promedio (ua)	12652	2954
DS	1955	660
% CV	15	22
Concentración de la muestra	23.5 µg/kg	2 µg/kg

Tabla 18. Muestras del CENAM.

4.10 Costos

De manera adicional se realizó una estimación del costo de los insumos para realizar el análisis por diferentes técnicas, sin incluir los gastos indirectos ni la mano de obra directa, que son cercanos a los 20 pesos/muestra. Los resultados se encuentran en la tabla 19, la HF-LPME es la técnica más barata y específicamente la que se realiza en un paso, esto se debe a que se utiliza menor cantidad de HMDS.

Experimento	Costo por muestra (MXN)
SPME	\$41.97
HF-LPME un paso	\$1.44
HF-LPME dos pasos	\$0.34
SPE	\$25.09

Tabla 19. Costos del análisis de una muestra por diferentes técnicas.



5. CONCLUSIONES

La SPME y la HF-LPME son técnicas que permiten la extracción del clenbuterol para ser analizado cualitativamente y cuantitativamente mediante CG-MS. Es necesario realizar la formación del derivado, para evitar que el clenbuterol interaccione con la columna y se obtengan picos simétricos, bien definidos.

La HF-LPME presenta algunas ventajas: En cada análisis se utiliza una fibra hueca nueva, lo que garantiza la ausencia de contaminación cruzada o efectos de matriz. Es menos costosa que la SPME. Es amigable con el ambiente, ya que utiliza muy pequeñas cantidades de disolvente.

El inconveniente de la técnica es que si al introducir la fase aceptora al hueco de la fibra hay presencia de burbujas puede ocasionar que al terminar la extracción y retirar la fase aceptora se recupere menor cantidad, obteniendo al final resultados con poca precisión.

La SPME tiene la ventaja de que la microextracción es la más amigable con el ambiente, al no utilizarse disolventes. Además, al menos en principio, la fibra puede ser reutilizada hasta 50 a 60 veces. La desventaja que presenta es que el costo de análisis por muestra es más elevado que por HF-LPME, además de que la fibra puede ir disminuyendo su capacidad de extracción ya con el transcurso de las extracciones la fibra se desgasta.

Al comparar las 3 técnicas optimizadas se optó por la HF-LPME un paso, al ser la que presenta mayor recobro total y mejor precisión. Las técnicas de microextracción utilizadas no son técnicas de extracción exhaustivas, ya que los recobros tanto parcial como total en cada una de ellas son muy bajos. El límite de detección de la técnica es 63 ng/L y se pueden analizar muestras con baja concentración, lo cual es de gran utilidad, ya que se puede utilizar la metodología para analizar muestras de hígado en México y así verificar que cumplan el LMR.

Las muestras de dos diferentes mercados al presentar clenbuterol hacen evidente que se necesita un monitoreo mucho más amplio, fuera de los alcances en tiempo y



presupuesto de este trabajo y un control mucho más estricto de los productores y del contrabando de este producto.

En conclusión, la extracción de clenbuterol por HF-LPME en un paso es la más sencilla y barata, siempre que se consideren los insumos y se cuente en el laboratorio con un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas.

Los resultados obtenidos muestran un camino adecuado para la identificación de clenbuterol en muestras biológicas, mucho más confiable que el actual con cartuchos de inmunoseparación.



6. PERSPECTIVAS

Realizar una curva de calibración con hígado enriquecido con clenbuterol para así obtener mayor precisión en las mediciones.

Elaborar una curva de calibración con muestras de hígado añadiendo un estándar interno para evitar efecto de matriz.

Optimizar la técnica de HF-LPME en un paso para otro tipo de matrices de bovino, por ejemplo orina o pelo, con la finalidad de prevenir que se sacrifiquen aquellos que tengan rastros de clenbuterol.

Optimizar la técnica de HF-LPME para alimentos balanceados que se sospeche que puedan contener alguna sustancia que ponga en riesgo la salud del animal o del humano.

Se optimizará la técnica de SPME con otro lote de fibras y se hará la prueba con otros derivatizantes buscando alargar la vida media de la fibra.

Las técnicas SPME y HF-LPME acopladas a GC-MS pueden ser utilizadas para el análisis de otro tipo de contaminantes en alimentos, por ejemplo organofosforados u organoclorados en frutas y vegetales. Cuando se logre optimizarlas serán de gran importancia ya que se le garantizará al consumidor que está adquiriendo productos libres de sustancias nocivas y de buena calidad para su consumo.



7. BIBLIOGRAFÍA

1. Jiménez, A., Ramos, J. & Sumano, H. Vigilancia sanitaria en el uso ilícito del clenbuterol y su coordinación intersectorial en dos entidades de México. *Rev. Vet. México* **01**, 11–25 (2011).
2. Ortiz, J. C., Alcocer, V. M. & Castellanos, A. F. Determinación de clenbuterol por el método de gases / masas y su cuantificación en bovinos sacrificados en dos rastros. *Técnica Pecu. en México* **43**, 57–67 (2005).
3. Sumano López, H. & Ocampo Cabrerros, L. *Farmacología Veterinaria*. 380–382 (McGraw-Hill Interamericana Editores, 2006).
4. Secretaría de Salud. DIRECCIÓN GENERAL DE EPIDEMIOLOGÍA. Sistema Único de información para la Vigilancia Epidemiológica. Distribución de los casos nuevos de enfermedades por fuente de notificación Estados Unidos Mexicanos, 2000-2013. Dirección electrónica: <<http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>> [Consultado en junio 2, 2014].
5. SAGARPA. *Norma Oficial Mexicana NOM-EM-015-ZOO-2002. Especificaciones técnicas para el control de uso de β -agonistas en los animales*. (2002).
6. Secretaría de Salud. *NORMA Oficial Mexicana NOM-194-SSA1-2004, Productos y servicios . Especificaciones sanitarias en los establecimientos dedicados al sacrificio y faenado de animales para abasto , almacenamiento , transporte y expendio . Especificaciones sanitarias de prod.* (2004).
7. Astiasaran Anchia, I. & Martinez Hernandez, J. A. *Alimentos: composicion y propiedades*. 11–28 (Editorial Mc Graw-Hill Interamericana, 2000).
8. Eduardo Mendoza Martínez, M. de la C. C. C. *Bromatología: composición y propiedades de los alimentos*. 143–161 (McGraw-Hill Interamericana, 2010).



9. Niinivaara, F. P., Antila, P. & Traducido por Romero Muñoz de Arenilla, J. *El valor nutritivo de la carne*. 157–182 (Editorial Acribia, 1973).
10. Sanz, C. *Enciclopedia de la carne*. 1086 (Editorial Espasa Calpe, 1967).
11. Bender, A. E. *Diccionario de nutrición y tecnología de los alimentos*. 341 (Acribia, 1994).
12. Foreign Agricultural Service/USDA. *Livestock and Poultry: World Markets and Trade*. (2013).
13. Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP)/SAGARPA. Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta (SIACON). (2013).
14. Instituto Nacional de Estadística y Geografía e Informática (INEGI). *Censo de Población y Vivienda*. (2010).
15. Blanca, J. *et al.* Determination of clenbuterol, ractopamine and zilpaterol in liver and urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **529**, 199–205 (2005).
16. Sumano López, H. *Farmacología clínica en bovinos*. 306 (Trillas, 1996).
17. *Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. PLM*. (Intersistemas Editores, 2013).
18. Blumrosen Juárez, D. Salen 5 del Tri por dopaje. Dirección electrónica: <<http://www.eluniversal.com.mx/deportes/126783.html>> [Consultado en junio 19, 2013].
19. Morales, A. Detectan clenbuterol en Mundial Sub-17. Dirección electrónica: <<http://www.eluniversal.com.mx/notas/801732.html>> [Consultado en enero 22, 2012].



20. WADA. WADA withdraws CAS appeal in case of Mexican footballers. Dirección electrónica: <<http://www.wada-ama.org/en/Media-Center/Archives/Articles/WADA-withdraws-CAS-appeal-in-case-of-Mexican-footballers/>> [Consultado en enero 22, 2012].
21. Rodríguez, A. Castiga USADA dos años a “Terrible” por clenbuterol. Dirección electrónica: <<http://www.eluniversal.com.mx/deportes/143738.html>> [Consultado en agosto 15, 2013].
22. Fernández, F. Las etapas del calvario de Contador. (2012). Dirección electrónica: <<http://www.rtve.es/deportes/20110726/etapas-del-calvario-contador/398660.shtml>> [Consultado en mayo 21, 2013.]
23. WADA. WADA statement on Contador decision from CAS. (2012). Dirección electrónica: <<http://www.wada-ama.org/en/Media-Center/Archives/Articles/WADA-statement-on-Contador-decision-from-CAS/>> [Consultado en mayo 21, 2013].
24. Admin. COFEPRIS suspende rastros por uso de clenbuterol. (2012). Dirección electrónica: <<http://ongs.com.mx/2012/03/cofepris-suspende-rastros-por-uso-de-clenbuterol/>> [Consultado en junio 19, 2013].
25. SAGARPA. Norma Oficial Mexicana NOM-061-ZOO-1999, Especificaciones zoosanitarias de los productos alimenticios para consumo animal. (2000).
26. Congreso General de los Estados Unidos Mexicanos. *Ley Federal de Sanidad Animal*. (2007).
27. Zedillo, E. *Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios*. (1999).
28. FAO/OMS Codex Alimentarius. Límites Máximos de Residuos para Medicamentos Veterinarios en los Alimentos. 9 (2012).



29. SENASICA & SAGARPA. Guía de Operación para el Programa de Proveedor Confiable (Libre de Clenbuterol). (2009).
30. Rubinson, J. F. & Rubinson, K. A. *Química Analítica Contemporanea*. 434–441 (Prentice Hall, 2000).
31. Keskin, S., Ozer, D. & Temizer, a. Gas chromatography-mass spectrometric analysis of clenbuterol from urine. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **18**, 639–44 (1998).
32. Koole, a, Bosman, J., Franke, J. P. & de Zeeuw, R. a. Multiresidue analysis of beta2-agonist in human and calf urine using multimodal solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* **726**, 149–56 (1999).
33. Aresta, a, Calvano, C. D., Palmisano, F. & Zambonin, C. G. Determination of clenbuterol in human urine and serum by solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **47**, 641–5 (2008).
34. Melwanki, M. B., Hsu, W.-H. & Huang, S.-D. Determination of clenbuterol in urine using headspace solid phase microextraction or liquid–liquid–liquid microextraction. *Anal. Chim. Acta* **552**, 67–75 (2005).
35. Liu, W., Zhang, L., Wei, Z., Chen, S. & Chen, G. Analysis of beta-agonists and beta-blockers in urine using hollow fibre-protected liquid-phase microextraction with in situ derivatization followed by gas chromatography/mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1216**, 5340–6 (2009).
36. Yang, M. J. & Pawliszyn, J. Solid Phase Microextraction. *Anal. Chem.* **66**, 844–853 (1994).
37. Spietelun, A., Pilarczyk, M., Kloskowski, A. & Namieśnik, J. Polyethylene glycol-coated solid-phase microextraction fibres for the extraction of polar analytes--a review. *Talanta* **87**, 1–7 (2011).



38. Pawliszyn, J. *Solid Phase Microextraction Theory and practice*. 247 (Wiley-VCH, 1997).
39. Supelco Chromatography Products catalog. *Solid Phase Microextraction Fiber Assemblies*.
40. Harris, D. C. *Análisis químico cuantitativo*. 744 (Editorial Reverté, S.A., 2007).
41. Jeannot, M. a & Cantwell, F. F. Solvent microextraction into a single drop. *Anal. Chem.* **68**, 2236–40 (1996).
42. Pedersen-Bjergaard, S. & Rasmussen, K. E. Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* **71**, 2650–6 (1999).
43. Jeannot, M. a. & Cantwell, F. F. Mass Transfer Characteristics of Solvent Extraction into a Single Drop at the Tip of a Syringe Needle. *Anal. Chem.* **69**, 235–239 (1997).
44. Payán, M. R., López, M. A. B., Fernández-Torres, R., Navarro, M. V. & Mochón, M. C. Hollow fiber-based liquid-phase microextraction (HF-LPME) of ibuprofen followed by FIA-chemiluminescence determination using the acidic permanganate-sulfite system. *Talanta* **79**, 911–5 (2009).
45. Zhao, L., Majors, R. & Kee Lee, H. The Use of Hollow Fibers in Liquid-Phase Microextraction. *LCGC North Am.* (2010).
46. Tao, Y. *et al.* Hollow fiber supported ionic liquid membrane microextraction for determination of sulfonamides in environmental water samples by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **1216**, 6259–66 (2009).
47. Psillakis, E. & Kalogerakis, N. Developments in liquid-phase microextraction. *TrAC Trends Anal. Chem.* **22**, 565–574 (2003).



48. Cristino, A., Ramos, F. & da Silveira, M. I. N. Control of the illegal use of clenbuterol in bovine production. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **32**, 311–316 (2003).
49. Orata, F. *Derivatization Reactions and Reagents for Gas Chromatography Analysis*. (2007).
50. Nuhu, A. a, Basheer, C. & Saad, B. Liquid-phase and dispersive liquid-liquid microextraction techniques with derivatization: recent applications in bioanalysis. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **879**, 1180–8 (2011).
51. Lin, H. *et al.* Development of solvent micro-extraction combined with derivatization. *J. Chromatogr. A* **1296**, 235–42 (2013).
52. Kellner, R. A. & Widmer, M. *Analytical Chemistry*. 524–558 (Wiley-VCH, 2004).
53. Snow, N. Introduction to capillary GC injection techniques. Dirección electrónica: <<http://www.chromedia.org/chromedia?waxtra>> [Consultado en abril 25, 2013].
54. Rouessac, F. & Rouessac, A. *Análisis químico, métodos y técnicas instrumentales modernas: teoría y ejercicios resueltos*. 419 (McGraw-Hill Interamericana, 2003).
55. Guy, P. a, Savoy, M. C. & Stadler, R. H. Quantitative analysis of clenbuterol in meat products using liquid chromatography-electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* **736**, 209–19 (1999).
56. Posyniak, A., Zmudzki, J. & Niedzielska, J. Screening procedures for clenbuterol residue determination in bovine urine and liver matrices using enzyme-linked immunosorbent assay and liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta* **483**, 61–67 (2003).



57. Walpore, R. E., Myers, R. H. & Myers, S. L. *Probabilidad y estadística para ingenieros*. 464–470 (1999).
58. Miller, J. N. & Miller, J. C. *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*. 23 (2002).
59. Cui, S. *et al.* The mass transfer dynamics of hollow fiber liquid-phase microextraction and its application for rapid analysis of biological samples. *J. Chromatogr. A* **1266**, 10–6 (2012).
60. International Organization for Standardization. *ISO 5725-1:1994/Cor 1:1998 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 1: General principles and definitions*. (1998).
61. International Organization for Standardization. *ISO 3534-1 Statistics - Vocabulary and symbols. Part 1: General statistical terms and terms used in probability*. (2006).



8. ANEXO 1

Extracción y derivatización por SPME

		Área del pico de clenbuterol sililado (ua)		
		300 rpm	600 rpm	900 rpm
Temperatura	80 ° C	47178	339542	366022
	90 ° C	360519	3460823	45203
	100 ° C	1522067	3139600	248364

Tabla 20. Efecto de la velocidad de agitación y temperatura en la extracción por SPME.

		%CV		
		300	600	900
Temperatura	80 ° C	10	8	14
	90 ° C	5	2	17
	100 ° C	53	68	115

Tabla 21. Efecto de la velocidad de la velocidad de agitación y temperatura en el coeficiente de variación durante la extracción por SPME.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Muestra	9.3559E+12	2	4.6779E+12	7.85260559	0.00353329	3.55455715
Columnas	2.2053E+13	2	1.1026E+13	18.5094577	4.2938E-05	3.55455715
Interacción	1.2111E+13	4	3.0277E+12	5.08239967	0.00641333	2.92774417
Dentro del grupo	1.0723E+13	18	5.9572E+11			
Total	5.4242E+13	26				

Tabla 22. ANOVA de SPME con diferente velocidad de agitación y temperatura.



Extracción y derivatización por HF-LPME en un paso

Velocidad de agitación

	rpm					
	300	450	600	750	900	1200
Área promedio (ua)	36263360	25542188	18126619	24652017	36795547	38208365
DS	21911653	9780814	764705	3863159	2028901	4467385
% CV	60	38	4	16	6	12

Tabla 23. Efecto de la velocidad de agitación en la extracción por HF-LPME en un paso.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1.0266E+15	5	2.0532E+14	2.00197387	0.15060791	3.10587524
Dentro de los grupos	1.2307E+15	12	1.0256E+14			
Total	2.2574E+15	17				

Tabla 24. ANOVA de HF-LPME en un paso a diferentes velocidades de agitación.

Temperatura

	Temperatura(°C)		
	Ambiente	35	40
Área promedio (ua)	36795547	22121829	15343161
DS	2028901	10394981	12547902
% CV	6	47	82

Tabla 25. Efecto de la temperatura en la extracción por HF-LPME en un paso.



Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	7.2147E+14	2	3.607E+14	4.0138047	0.07825332	5.143252
Dentro de los grupos	5.3924E+14	6	8.9874E+13			
Total	1.2607E+15	8				

Tabla 26. ANOVA de HF-LPME en un paso a diferentes temperaturas.

Tiempo

	Tiempo (min)			
	5	10	15	20
Área promedio (ua)	7977536	36795547	17365919	34262496
DS	796593	2028901	4507512	8404539
% CV	10	6	26	25

Tabla 27. Efecto del tiempo en la extracción por HF-LPME en un paso.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1.7092E+15	3	5.6973E+14	23.8121411	0.00024273	4.06618055
Dentro de los grupos	1.9141E+14	8	2.3926E+13			
Total	1.9006E+15	11				

Tabla 28. ANOVA de HF-LPME en un paso a diferentes tiempos de extracción.



Volumen inyectado

Volumen inyectado (μL)			
	1	2	4
Área promedio (ua)	18535642	19163831	34272751
DS	4070047	2416760	6191334
% CV	22	13	18

Tabla 29. Efecto del volumen inyectado por HF-LPME en un paso.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	4.7633E+14	2	2.381E+14	11.763453	0.0083907	5.14325
Dentro de los grupos	1.2148E+14	6	2.0246E+13			
Total	5.9781E+14	8				

Tabla 30. ANOVA de HF-LPME en un paso a diferentes volúmenes inyectados al cromatógrafo de gases.

Extracción por HF-LPME seguida de la derivatización

Velocidad de agitación

rpm				
	300	600	900	1200
Área promedio (ua)	1060899	690615	667024	396462
DS	341546	74215	148059	263299
% CV	32	11	22	66

Tabla 31. Efecto de la velocidad de agitación en la extracción por HF-LPME en dos pasos.



Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	6.7051E+11	3	2.235E+11	4.18918667	0.04670272	4.06618055
Dentro de los grupos	4.2682E+11	8	5.3352E+10			
Total	1.0973E+12	11				

Tabla 32. ANOVA de la HF-LPME en dos pasos a diferentes velocidades de agitación.

Temperatura

TEMPERATURA			
	Ambiente	30 °C	40 °C
Área promedio (ua)	690615	695919	664525
DS	74215	22267	246756
% CV	11	3	37

Tabla 33. Efecto de la temperatura en la extracción por HF-LPME en dos pasos.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	981963526.9	2	490981763.4	0.024845788	0.975560143	5.14325285
Dentro de los grupos	1.18567E+11	6	19761166595			
Total	1.19549E+11	8				

Tabla 34. ANOVA de la HF-LPME en dos pasos a diferentes temperaturas.



Tiempo

TIEMPO			
	10	15	20
Área promedio (ua)	695919	679839	490394
DS	22267	261108	255239
% CV	3	38	52

Tabla 35. Efecto del tiempo en la extracción por HF-LPME en dos pasos.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	7.8388E+10	2	3.9194E+10	0.87866157	0.46271982	5.14325285
Dentro de los grupos	2.6764E+11	6	4.4607E+10			
Total	3.4603E+11	8				

Tabla 36. ANOVA de la HF-LPME en dos pasos a diferentes tiempos.

Temperatura de derivatización

Temperatura de derivatización (°C)				
	60	70	80	90
Área promedio (ua)	9802999	10519811	10369851	7733396
DS	672717	107084	592607	647743
% CV	7	1	6	8

Tabla 37. Efecto de la temperatura de derivatización en la extracción por HF-LPME en dos pasos.



Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1.489E+13	3	4.964E+12	16.080665	0.00094831	4.0661805
Dentro de los grupos	2.469E+12	8	3.0869E+11			
Total	1.736E+13	11				

Tabla 38. ANOVA de la HF-LPME en dos pasos a diferentes temperaturas de derivatización.

Tiempo de la derivatización

Tiempo de derivatización (min)			
	10	20	30
Área promedio (ua)	6671400	10519811	6615361
DS	1190321	107084	2437793
% CV	18	1	37

Tabla 39. Efecto del tiempo de derivatización en la extracción por HF-LPME en dos pasos.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	3.006E+13	2	1.503E+13	6.1166981	0.03563289	5.143252
Dentro de los grupos	1.474E+13	6	2.457E+12			
Total	4.48E+13	8				

Tabla 40. ANOVA de la HF-LPME en dos pasos a diferentes tiempos de derivatización.



Volumen inyectado

Volumen inyectado (μL)			
	1	2	4
Área promedio (ua)	4173735	3787565	5639085
DS	621185	1142530	1256990
% CV	15	30	22

Tabla 41. Efecto del volumen inyectado por HF-LPME en dos pasos.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	5.725E+12	2	2.862E+12	2.6248990	0.15171188	5.1432529
Dentro de los grupos	6.543E+12	6	1.090E+12			
Total	1.227E+13	8				

Tabla 42. ANOVA de HF-LPME en dos pasos a diferentes volúmenes inyectados al cromatógrafo de gases.

Recobro y comparación de las técnicas de extracción

	Técnica		
	SPME	HF-LPME un paso	HF-LPME dos pasos
Área promedio (ua)	332817	19163831	4173735
DS	110647	2416760	621185
% CV	33	13	15
% Recobro	0.02	1	0.5

Tabla 43. Comparación de las técnicas de extracción.



Cálculo del recobro

Para determinar el recobro relativo de cada técnica se analizaron 3 muestras de 250 μL por GC-MS a una concentración de 5 mg/L de clenbuterol.

Muestra	Área del pico (ua)
Muestra 1	2572106
Muestra 2	2143913
Muestra 3	2243038
Promedio	2319685
DS	224151
%CV	10

Tabla 44. Análisis de muestras a 5 mg/L en GC-MS.

Una vez analizado se determinó el área del pico y se calculó el área correspondiente de los moles totales que había en el volumen previo a ser analizados por GC-MS.

$$0.25 \text{ mL} \left(\frac{5 \text{ mg}}{1000 \text{ mL de solución}} \right) \left(\frac{1 \text{ mmol}}{277 \text{ mg}} \right) \left(\frac{1 \text{ mol}}{1000 \text{ mmol}} \right) = 4.51 \times 10^{-9} \text{ moles}$$

Sabiendo que se inyectó 1 μL al cromatógrafo pero que el volumen previo eran 5 μL de HMDS.

$$5 \mu\text{L} \frac{2319685 \text{ ua}}{1 \mu\text{L}} = 11598427 \text{ ua}$$

Es decir que 4.51×10^{-9} moles de Clenbuterol corresponden a un área de 11598427 ua

Para continuar se calcularon los moles iniciales que habían en cada muestra en las diferentes técnicas, la concentración de cada una de ellas es de 100 mg/L de clenbuterol.

En SPME:

$$2 \text{ mL} \left(\frac{100 \text{ mg}}{1000 \text{ mL}} \right) \left(\frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} \right) \left(\frac{1 \text{ mol}}{277 \text{ g}} \right) = 7.22 \times 10^{-7} \text{ moles}$$



En HF-LPME en uno y dos pasos:

$$5 \text{ mL} \left(\frac{100 \text{ mg}}{1000 \text{ mL}} \right) \left(\frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} \right) \left(\frac{1 \text{ mol}}{277 \text{ g}} \right) = 1.8 \times 10^{-6} \text{ moles}$$

Una vez obtenidos los moles totales iniciales se calculó el área a la que corresponderían los moles.

En SPME:

$$7.22 \times 10^{-7} \text{ moles} \left(\frac{11598427 \text{ ua}}{4.51 \times 10^{-9} \text{ moles}} \right) = 1856777005 \text{ ua}$$

En HF-LPME:

$$1.8 \times 10^{-6} \text{ moles} \left(\frac{11598427 \text{ ua}}{4.51 \times 10^{-9} \text{ moles}} \right) = 4629083947 \text{ ua}$$

Después se retomó el promedio del área obtenida al desarrollar cada una de las técnicas con las muestras de 100 mg/L, de tal manera de conocer los moles que se recobraron en cada técnica.

En SPME:

$$332817 \text{ ua} \left(\frac{7.22 \times 10^{-7} \text{ moles}}{1856777005 \text{ ua}} \right) = 1.29 \times 10^{-10} \text{ moles}$$

En HF-LPME un paso:

$$19163831 \text{ ua} \left(\frac{1.81 \times 10^{-6} \text{ moles}}{464629083947 \text{ ua}} \right) = 7.5 \times 10^{-9} \text{ moles}$$

Para finalizar se calculó el porcentaje de recobro de cada técnica.

En SPME:

$$1.29 \times 10^{-10} \text{ moles} \left(\frac{100\%}{7.22 \times 10^{-7} \text{ moles}} \right) = 0.02\%$$

En HF-LPME un paso:

$$7.5 \times 10^{-9} \text{ moles} \left(\frac{100\%}{1.8 \times 10^{-6} \text{ moles}} \right) = 0.41\%$$



Para obtener el % recobro total se realizó un ajuste al promedio del área obtenida en cada una técnicas con las muestras de 100 mg/L con respecto al volumen previo a ser analizado por GC-MS.

HF-LPME un paso:

$$19163831 \text{ ua} \left(\frac{5 \mu\text{L}}{2 \mu\text{L}} \right) = 47909577 \text{ ua}$$

Después se calculó el número de moles que equivale al área corregida.

En HF-LPME un paso:

$$47909577 \text{ ua} \left(\frac{1.8 \times 10^{-6} \text{ moles}}{4629083947 \text{ ua}} \right) = 1.86 \times 10^{-8} \text{ moles}$$

Para finalizar se calculó el porcentaje de recobro de cada técnica.

En HF-LPME un paso:

$$1.86 \times 10^{-8} \text{ moles} \left(\frac{100\%}{1.8 \times 10^{-6} \text{ moles}} \right) = 1.04\%$$

Técnica	Área promedio (ua)	Volumen inicial	Volumen Inyectado	Moles de clenbuterol	% Recobro relativo	% Recobro total
SPME	332817	Toda la fibra	Toda la fibra	1.29415E-10	0.02	0.02
HF-LPME un paso	19163831	5 μL	2 μL	7.45178E-09	0.41	1.04
HF-LPME dos pasos	4173735	5 μL	1 μL	1.62294E-09	0.09	0.45

Tabla 45. % de recobro relativo y total en las diferentes técnicas de microextracción.



pH

pH				
	5.6	8	10	12
Área Promedio (ua)	22131278	30592934	28411727	28678936
DS	3457427	1816348	1565712	3075362
% CV	16	6	6	11

Tabla 46. Efecto del pH por HF-LPME en un paso.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1.2181E+14	3	4.0602E+13	5.97918332	0.01931879	4.06618055
Dentro de los grupos	5.4324E+13	8	6.7906E+12			
Total	1.7613E+14	11				

Tabla 47. ANOVA de HF-LPME en un paso a diferentes valores de pH.

Gráfico de residuos

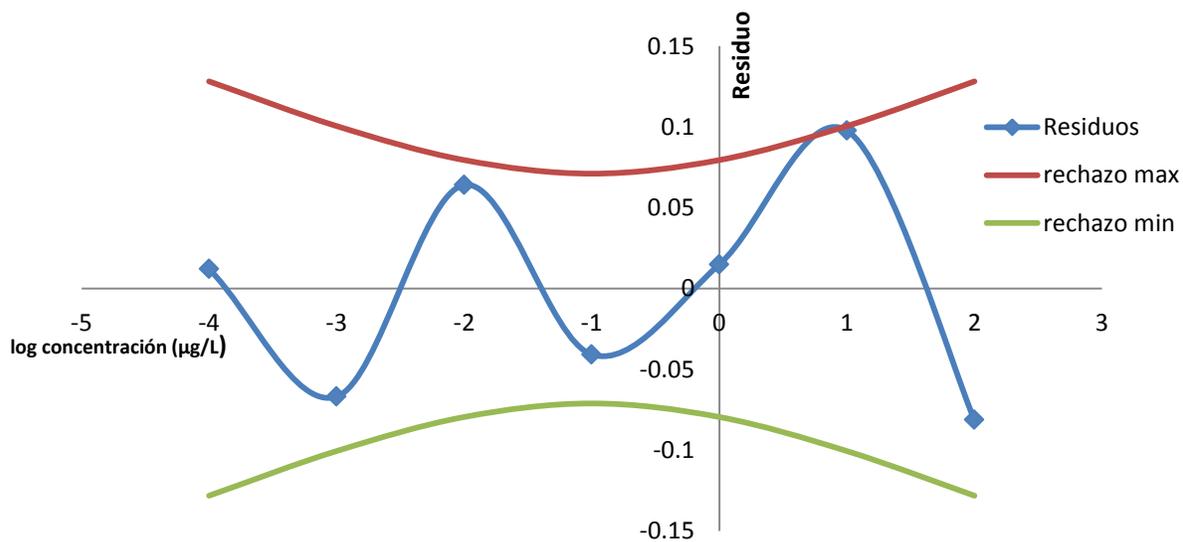




Figura 42. Gráfico de residuos de la linealidad del método.

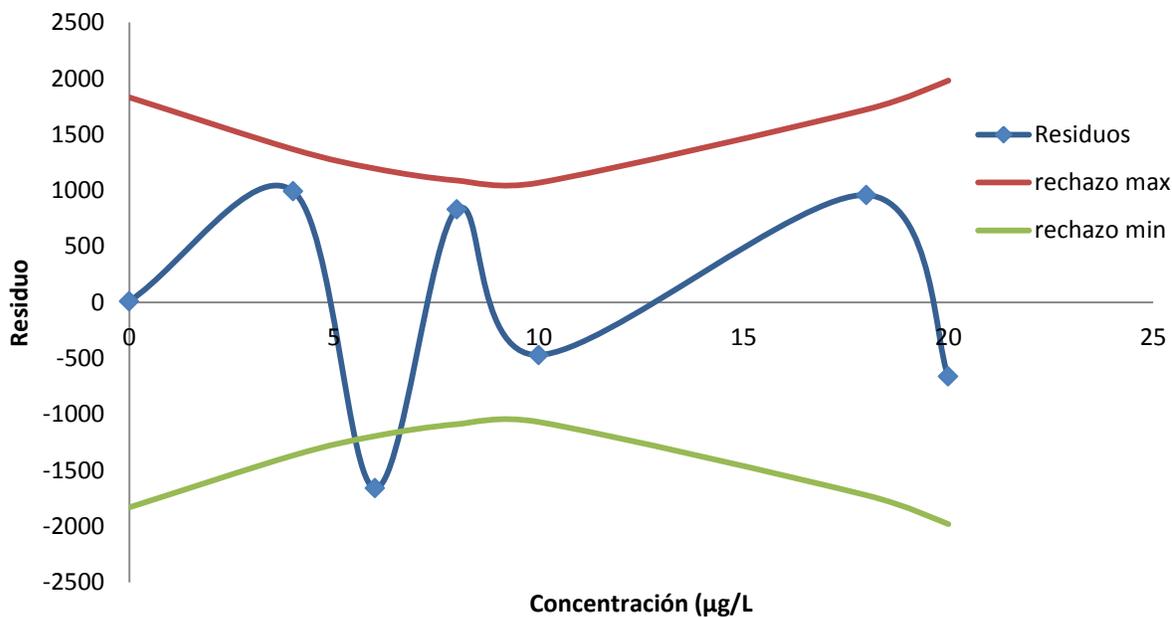


Figura 43. Gráfico de residuos de la curva de calibración.

Límite de detección

$$LD = 2(1.94) \frac{1589}{\sqrt{7}} = 2330.3 \text{ ua}$$

Ecuación lineal de la curva de calibración: $y = 2205.6x + 2192.2$

$$[\text{Clenbuterol}] = \frac{\text{Área del pico} - 2192.2}{2205.6}$$

$$[\text{Clenbuterol}] = \frac{2330.3 - 2192.2}{2205.6} = 0.063 \mu\text{g/L}$$

$$[\text{Clenbuterol}] = 63 \text{ ng/L}$$



Hígado blanco enriquecido con 10 µg/kg

Considerando que la concentración obtenida de la ecuación de la recta se encontraban en un volumen total de 7 mL de HClO₄.

$$7 \text{ mL} \frac{4.7 \text{ µg}}{1000 \text{ mL}} = 0.03 \text{ µg de clenbuterol}$$

Y se pesaron inicialmente 1.4 g de hígado.

$$\frac{0.03 \text{ µg de clenbuterol}}{1.4 \times 10^{-3} \text{ kg de hígado}} = 23.5 \text{ µg/kg}$$

Hígado con 2 µg/kg

Considerando que la concentración de la muestra obtenida de la ecuación de la recta se encontraban en un volumen total de 7 mL de HClO₄.

$$7 \text{ mL} \frac{0.4 \text{ µg}}{1000 \text{ mL}} = 2.8 \times 10^{-3} \text{ µg de clenbuterol}$$

Y se pesaron inicialmente 1.4 g de hígado.

$$\frac{2.8 \times 10^{-3} \text{ µg de clenbuterol}}{1.4 \times 10^{-3} \text{ kg de hígado}} = 2 \text{ µg/kg}$$

Hígado del mercado con 10 µg/kg

Como ejemplo se anexa el cálculo de la concentración real en la muestra de hígado proveniente del mercado Independencia, la cual fue enriquecida con 10 µg/kg de clenbuterol:

Primero se conoció la cantidad de clenbuterol adicionada en 1.4 g de hígado

$$1.4 \text{ g de hígado} \left(\frac{10 \text{ µg de clenbuterol}}{1000 \text{ g de hígado}} \right) = 0.014 \text{ µg de clenbuterol}$$

La cual se encontraba en un volumen total de 7 mL de HClO₄.

$$\frac{0.014 \text{ µg}}{7 \text{ mL}} = 2 \times 10^{-3} \text{ µg/mL} = 2 \text{ µg/L}$$



A la concentración de la muestra obtenida de la ecuación de la recta se le resta la concentración adicionada que fue de 2 µg/L.

$$19 \mu\text{g/L} - 2 \mu\text{g/L} = 17 \mu\text{g/L}$$

Considerando que se encontraba en un volumen total de 7 mL de HClO₄.

$$7 \text{ mL} \frac{17 \mu\text{g}}{1000 \text{ mL}} = 0.119 \mu\text{g de clenbuterol}$$

Y se pesaron inicialmente 1.4 g de hígado.

$$\frac{0.119 \mu\text{g de clenbuterol}}{1.4 \times 10^{-3} \text{ kg de hígado}} = 85 \mu\text{g/kg}$$

Si una persona comiera un filete de 150 g, la cantidad de clenbuterol que consumiría sería:

$$150 \text{ g de hígado} \frac{85 \mu\text{g de clenbuterol}}{1000 \text{ g de hígado}} = 12.8 \mu\text{g de clenbuterol}$$



9. ANEXO 2

Media⁵⁷

La media aritmética es el valor promedio de “n” medidas y se obtiene por:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

En donde “n” es el número de datos experimentales.

Desviación estándar⁵⁷

La variabilidad se calculó por medio de la desviación estándar de “n” medidas viene dada por:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

En donde “n” es el número de datos experimentales.

Coeficiente de variación porcentual⁵⁸

El %CV es una medida de la variabilidad se calcula de la siguiente manera:

$$\%CV = 100 * \frac{s}{\bar{x}}$$

Donde “s” es la desviación estándar y \bar{x} es la media aritmética (promedio).

El %CV también es conocido como la desviación estándar relativa (DER) y es un ejemplo de error relativo. Este tipo de errores se utilizan con frecuencia para comparar las precisiones de los resultados y son importantes en los cálculos de la propagación de errores.



Límite de detección ⁵⁹⁻⁶¹

El límite de detección (LD) de un analito es aquella concentración que proporciona una señal en el instrumento (y), la cual es diferente de la señal del blanco o ruido de fondo.

Para calcular el LD se utilizó la siguiente ecuación:

$$LD = 2t_{\alpha}^{n-1} \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Donde n es el número de datos experimentales, s es la desviación estándar y t es la variable de la distribución de t de student con un riesgo α y n-1 grados de libertad.

Análisis de varianza ⁵⁷

El ANOVA es una técnica estadística que se utiliza para separar y estimar las diferentes causas de variación. En este caso más específico se utilizó para separar la variación debido al error aleatorio de cualquier otra variación que sea provocada al cambiar un parámetro. De esta manera se puede contrastar si al alterar un parámetro en la técnica de microextracción provoca que existan diferencias significativas entre los valores medios obtenidos.

Para realizar la prueba de hipótesis se utilizó el análisis de varianza siendo

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_k$$

H_1 : Al menos dos de las medias no son iguales

Utilizando un riesgo $\alpha = 0.05$



Los cálculos para realizar el análisis de varianza se resumen en el siguiente cuadro:

Tratamiento	1	2	...	i	
	Y_{11}	Y_{21}	...	Y_{i1}	
	Y_{12}	Y_{22}	...	Y_{i2}	
	\vdots	\vdots		\vdots	
	Y_{1n}	Y_{2n}	...	Y_{in}	
Total	$Y_{1.}$	$Y_{2.}$...	$Y_{i.}$	$Y_{..}$
Media	$\bar{y}_{1.}$	$\bar{y}_{2.}$		$\bar{y}_{i.}$	$\bar{y}_{..}$

Tabla 48. Muestras con diferentes tratamientos.

Donde $Y_{i.}$ es el total de todas las observaciones en la muestra del i-ésimo tratamiento, $\bar{y}_{i.}$ es la media de todas las observaciones en la muestra del i-ésimo tratamiento, $Y_{..}$ es la suma de todas las $Y_{i.}$ y $\bar{y}_{..}$ es la media de la suma de todas las $\bar{y}_{i.}$

$$\text{Suma total de cuadrados} = \text{SST} = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^n (y_{ij} - \bar{y}_{..})^2$$

$$\text{Suma de cuadrados de tratamientos} = \text{SSA} = n \sum_{i=1}^k (\bar{y}_{i.} - \bar{y}_{..})^2$$

$$\text{Suma de cuadrados del error} = \text{SSE} = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^n (y_{ij} - \bar{y}_{i.})^2$$

Siendo y_{ij} la j-ésima observación del i-ésimo tratamiento.



Origen de la variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F calculada	Probabilidad	Valor crítico para F
Tratamientos	SSA	k-1	$s_1^2 = \frac{SSA}{k-1}$	$\frac{s_1^2}{s^2}$	0.05	F de tablas
Error	SSE	N-k	$s^2 = \frac{SSE}{N-k}$			
Total	SST	N-1				

Tabla 49. Forma de realizar ANOVA.

Donde k es el número de tratamientos y N es el número total de observaciones en todos los tratamientos.

La probabilidad es el riesgo de rechazar la hipótesis nula (H_0)

Si el valor F calculado experimentalmente es mayor que el valor de F crítico de tablas se rechaza H_0 . Si el valor de F calculado experimentalmente es menor que el valor de F crítico de tablas se acepta H_0 .

Linealidad ⁵⁸

Este tipo de análisis se asume que existe una relación lineal entre la señal analítica (y) y la concentración (x) y se realiza cuando se está buscando calcular la mejor línea recta posible que minimice las desviaciones en dirección y la línea recta debe pasar por el centro de gravedad de los puntos (\bar{x}, \bar{y}) . Los puntos individuales sobre la línea se denotan como (x_1, y_1) que corresponde a la lectura del blanco, y (x_2, y_2) , (x_3, y_3) ... (x_i, y_i) ... (x_n, y_n) de las "n" muestras a diferentes concentraciones. La recta de mínimos cuadrados viene dada por:

$$\text{Pendiente de la recta de mínimos cuadrados: } m = \frac{\sum_i [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}$$

Ordenada en el origen de la recta de mínimos cuadrados $b = \bar{y} - m\bar{x}$