



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

“Impacto de la ingestión de clenbuterol sobre indicadores metabólicos y de estrés oxidativo”

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS
PRESENTA:

MARIANA DOLORES HERNÁNDEZ

TUTOR PRINCIPAL:

DRA. RAQUEL LÓPEZ ARELLANO
(FES-CUAUTITLÁN-UNAM)

COMITÉ TUTORAL:

DR. BENJAMÍN VELASCO BEJARANO
(FES-CUAUTITLÁN-UNAM)

DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE
(BIOMÉDICAS-UNAM)

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, JUNIO, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

AGRADECIMIENTOS

Mis agradecimientos sinceros a cada una de las personas que me apoyaron en este trabajo, a todos los que menciono a continuación y a los que olvide nombrar.

A la Dra. Raquel López Arellano por su conocimiento, paciencia, confianza y el apoyo que me ha brindado durante toda mi formación profesional.

A mi familia por su amor y su apoyo incondicional en esta etapa de mi vida.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, al Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal.

A la Dra. María Eugenia Gonsebatt y Dr. Benjamín por sus comentarios en cada evaluación tutorial.

A todos mis amigos, compañeros y profesores que conforman el laboratorio LEDEFAR, por sus asesorías, apoyo y los momentos que hicieron ameno este tiempo (Adriana, Claudia, Bruno, Daniel, Víctor Hugo, Hugo, Miriam, Gabriela, DARR. Juan José, Q.F.B. Martha, Q.F.B. José Antonio Garduño).

A M en C. Adriana Morales por su conocimiento, amistad y apoyo para la realización de este trabajo.

A la Dra. Alma Villaseñor por su conocimiento, asesoría, amistad y su apoyo incondicional en cada etapa.

A la M en C. Sofía Piña por todo su apoyo durante el trabajo y por su incondicional amistad.

A la Dra. Coral y a todo el laboratorio que conforma el CEMBIO por todo lo brindado durante mi estancia.

A la Dra. Patricia Ramírez y Dr. Roberto Díaz por su apoyo para la realización del proyecto, a los integrantes del laboratorio 9 (Sofía, Joséelo y Rodrigo).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de doctorado No. 401939 otorgada para la realización de este.

A la Dra. Evangelina Camacho Fría y al Q. Jahir, por la capacitación brindada en la CONADE.

Al M en C. Crisóforo Mercado por todas las facilidades brindadas en el Bioterio.

Al Ing. Juan Carlos y Hugo Cortes por la asesoría brindada en el UPLC-MS/MS.

Al QFB. Alejandro Alcántara por la asesoría brindada.

A los miembros del jurado por sus valiosas aportaciones durante la revisión de este trabajo (Dra. María Eugenia Arellano, Dr. Efrén, Dra. Dinorah, Dra. María Eugenia Gonsebatt, Dra. Raquel López).

RESUMEN

Este trabajo describe el desarrollo y la validación de una metodología analítica para la determinación de los enantiómeros de Clenbuterol en un modelo animal, su objetivo principal es establecer si existen diferencias en la proporción enantiomérica y de metabolitos de clenbuterol en orina que permitan discriminar la ingesta no intencional de una con fines de dopaje, utilizando las técnicas de extracción líquido-líquido y la cromatografía líquida de ultra eficiencia acoplada a un detector de espectrometría de masas-masas. El clenbuterol es conocido por mejorar la resistencia en competencia y el crecimiento muscular en los atletas. Aunque es un medicamento prohibido, bien regulado en México y únicamente autorizado con fines terapéuticos, su uso por parte de la producción pecuaria está ampliamente difundido para inducir el crecimiento de su ganado. Los estudios anteriores sugieren que la relación enantiomérica de clenbuterol puede ser diferente según la fuente de ingesta. Sin embargo, aún no se ha explorado la relación enantiomérica a lo largo de un ciclo de dopaje o una ingesta continua de carne contaminada. En esta primera aproximación, el objetivo fue el desarrollo y la validación de un método sensible y rápido para la determinación de enantiómeros de S- (+) y R- (-) de clenbuterol para su uso en un estudio controlado en ratas alimentadas durante una semana con carne contaminada de clenbuterol y en una simulación de un ciclo de dopaje. Los enantiómeros se midieron utilizando cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con un analizador de triple cuadrupolo (LC-TQ-MS) y se separaron en una columna Chiralpak AGP. El método fue completamente validado siguiendo la VICH (Conferencia Internacional Veterinaria sobre pautas de armonización) y fue lineal en el rango de 12.5-800 pg/mL con un coeficiente de correlación de ≥ 0.98 para cada enantiómero, y con un límite de cuantificación y detección (LOQ y LOD) de 12.5 pg/mL y 6.5 pg/mL, respectivamente, para ambos enantiómeros. La aplicación de este método señaló el cambio de la relación enantiomérica en la orina de ratas durante los primeros cinco días del ciclo de dopaje ($p < 0.001$) (R/S=0.67-0.89) en comparación con el grupo alimentado con carne contaminada (R/S=(0.97-1.22)). Estos resultados son de importancia en futuros estudios de dopaje. Así, mismo, se identificaron 5 metabolitos de clenbuterol y un posible indicador de daño celular en el que existieron diferencias significativas entre los grupos.

ABSTRACT

This work describes the development and validation of an analytical methodology for the determination of the enantiomers of Clenbuterol in an animal model, its main objective is to establish if there are differences in the enantiomeric ratio and of urinary clenbuterol metabolites that allow to discriminate the intake not intentional one for doping purposes, using liquid-liquid extraction techniques and ultra-efficient liquid chromatography coupled to a mass-mass spectrometry detector. Clenbuterol is known to improve competition resistance and muscular growth in athletes. Although it is a prohibited drug, well-regulated in Mexico and only authorized for therapeutic purposes, its use by livestock production is widely spread to induce the growth of its livestock. Previous studies suggest that enantiomeric relationship of clenbuterol may be different according to the intake source. However, the enantiomeric relationship throughout a doping cycle or a continuous intake of contaminated meat has not yet been explored. In this first approximation, our aim was the development and validation of a sensitive and rapid method for the determination of S- (+) and R- (–) clenbuterol enantiomers to be used in a controlled study in rats fed for one week with contaminated meat or simulating a doping cycle. Enantiomers were measured using liquid chromatography coupled to mass spectrometry with a triple quadrupole analyzer (LC-TQ-MS) and were separated on an AGP Chiralpak column. The method was fully validated following the VICH (Veterinary International Conference on Harmonization guidelines) and was linear in the range of 12.5-800 pg/mL with a correlation coefficient of ≥ 0.98 for each enantiomer, and with a limit of quantitation and detection (LOQ and LOD) of 12.5 pg/mL and 6.5 pg/mL, respectively, for both enantiomers. The application of this method indicated the change of the enantiomeric ratio in the urine of rats during the first five days of the doping cycle ($p < 0.001$) (R/S = 0.67-0.89) compared to the group fed contaminated meat (R/S = 0.97-1.22). These results are of importance in future doping studies, and 5 metabolites of clenbuterol were identified and a possible indicator of cell damage in which there were significant differences between the groups.

Keywords: Clenbuterol, doping, enantiomers, LC-MS/MS, SRM.

INDICE

Resumen.....	3
Abstract	4
Indice.....	5
Indice de figuras.....	8
Indice de tablas.....	10
Abreviaturas	11
I. INTRODUCCIÓN	12
II. MARCO TEÓRICO.....	14
II.I. Clembuterol.....	21
2.1.1. Regulación de Clembuterol en México	21
2.1.2. Propiedades fisicoquímicas del Clembuterol	23
2.1.3. Mecanismos de acción de los β -agonistas en el metabolismo.....	23
II.II. Farmacocinética	24
2.2.1. Absorción y Distribución	24
2.2.2. Metabolismo.....	24
2.2.3. Biotransformación.....	25
2.2.4. Excreción.....	29
2.2.5. Comportamiento farmacocinético de los enantiómeros de Clembuterol	30
II. III. Teorías que explican el comportamiento de Clembuterol	33
II.IV. Efectos secundarios del clembuterol	34
II.IV.I. Estrés oxidativo.....	35
II.IV. II. Isoprostanos	36
II.IV.II.I. Niveles de isoprostanos después de hacer ejercicio	37
II.V. Interacción de Clembuterol y ejercicio.....	39
II.V.I. Dopaje de Clembuterol y estrés oxidativo en caballos.....	40
II.VI. Estabilidad de los residuos de Clembuterol en carne, orina e hígado.	41
III. JUSTIFICACIÓN	42

IV. HIPÓTESIS.....	42
V. OBJETIVO GENERAL	43
5.1. Objetivos particulares.....	43
VI. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	44
6.1. Materiales y equipos.....	44
6.1.1. Disolventes y reactivos.....	44
6.1.2. Sistema cromatográfico para determinación de Enantiómeros de Clembuterol.....	44
6.1.3. Sistema cromatográfico para identificación de Metabolitos de Clembuterol.....	45
6.1.4. Otros equipos y accesorios utilizados.	45
6.2. Localización.....	46
6.3. Unidades Experimentales.....	46
6.4. Tratamiento	46
6.5. Ubicación de la unidad experimental	47
6.6. Alimentación.....	47
6.7. Toma de muestra.....	48
6.8. Elaboración de bolos.....	48
6.8.1. Pretratamiento de bolos que contienen (Veltipulmin®) y carne contaminada con clembuterol.	48
VI.IX. I. Desarrollo y validación de un método analítico para cuantificar enantiómeros y mezcla racémica de clembuterol en orina de rata.	49
6.9.1.1. Preparación de la curva de calibración de mezcla racémica de clembuterol.....	49
6.9.1.2. Procedimiento de extracción de Clembuterol en orina de rata.....	49
6.9.1.3. Validación del método analítico según VICH GL49	49
6.9.1.3.1. Linealidad del sistema.....	50
6.9.1.3.2. Selectividad y efecto matriz	50
6.9.1.3.3. Linealidad del método.....	50
6.9.1.3.4. Precisión y exactitud del método.....	50
6.9.1.3.5. Límite de detección y cuantificación.....	50
6.9.1.3.6. Estabilidad de la muestra.....	51
VI.X.I. Desarrollo de un método analítico para identificar metabolitos de Clembuterol en orina de rata. ...	51

6.10.1.1. Soluciones de estándares.....	51
6.10.1.2. Muestras de orina.....	51
6.10.1.3. Muestras de carne de bovino.....	52
VI.XI.I. Indicadores de estrés oxidativo y daño celular.....	52
6.11.1.1. Cuantificación de isoprostanos (8-iso-PGF ₂ α) en plasma de rata.....	52
6.11.1.2. Determinación de proteínas totales en órganos de rata.....	53
6.11.1.3. Determinación de glutatión total (GSH-GSSG).....	53
6.11.1.4. Determinación de transaminasas hepáticas en plasma de rata.....	53
6.11.1.5. Determinación de GPx y GR.....	54
6.12. Diseño Experimental.....	54
6.13. Modelo Estadístico.....	54
6.14. Análisis estadístico para determinación de enantiómeros.....	54
6.14.1. Análisis estadístico para identificación de metabolitos.....	55
6.14.2. Análisis estadístico para correlación de isoprostanos.....	55
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	56
7.1.1. Desarrollo del método de validación para la determinación de enantiómeros de Clenbuterol.....	56
7.1.2. Validación del método.....	60
7.1.3. Aplicación del método.....	65
7.2.1. Desarrollo de método para identificación de metabolitos de Clenbuterol.....	70
7.2.2. Aplicación del método para identificación de metabolitos de Clenbuterol.....	79
7.3.1. Determinación de indicadores de estrés oxidativo y daño celular.....	82
VIII. CONCLUSIONES.....	94
IX. PERSPECTIVAS.....	95
X. REFERENCIAS.....	96
XI. ANEXOS.....	104
XII. ARTÍCULO.....	105

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Perfil metabólico de Clembuterol en ratas.....	26
Figura 2. Vía bioquímica propuesta que conduce a la formación gástrico ex vivo de los compuestos M2 M1. (Gianfranco et al., 2007).....	28
Figura 3. Propuesta de estructuras de metabolitos identificados en orina de rata.....	29
Figura 4. Estructura química del ácido araquidónico y el regio isomero 4 F2-Isop	37
Figura 5. Espectro del ion producto del clembuterol racémico (277 <i>m/z</i>)	56
Figura 6. Influencia del pH en el tiempo de retención y resolución de los enantiómeros de clembuterol S -(+) y R-(- (-)).	57
Figura 7(a-c). Cromatogramas SRM extraídos de la transición de clembuterol 277.10 → 202.9 <i>m/z</i> para la comparación de columnas.	58
Figura 8. Comparación de los recobros promedio y coeficientes de variación en muestras de orina de rata, fortificadas con clembuterol (100 pg/mL).....	59
Figura 9. Curvas de calibración de estándar de mezcla racémica (Clembuterol total), enantiómero S-(+) y R-(-) en formiato de amonio pH=4.5.	61
Figura 10. Curvas de calibración de estándar de mezcla racémica (Clembuterol total), enantiómero S-(+) y R-(-) en orina de rata	62
Figura 11(a-h). Cromatogramas SRM extraídos de la transición 277.10 → 202.9 <i>m/z</i> para estándar y muestras de orina de rata fortificadas con Clembuterol.	66
Figura 12.(a-e). Cromatogramas SRM extraídos de la transición 277.10 → 202.9 <i>m/z</i> para muestras de carne, bolos y orina de rata al tercer día de dopaje.	67
Figura 13. Concentraciones de enantiómeros S- (+) y R-(−) de clembuterol (ng/mL) en orina de rata durante un ciclo de dopaje (barras rojas) y consumo continuo de carne (barras azules.).	68
Figura 14. Relación R/S de enantiómeros de clembuterol en orina de rata durante un ciclo de dopaje.	69
Figura 15.(a-c) Resultados de Clen-M1 (conjugación de sulfato).	72
Figura 16.(a-c) Resultados de Clen-M2 (hidroxilación).....	73
Figura 17.(a-c) Resultados de Clen-M3 (conjugación con ácido glucurónico)..	74
Figura 18. (a-c). Resultados de Clen-M4 (Oxidación).....	75
Figura 19. (a-c) Resultados de Clen-M5 (oxidación del grupo amina).....	76
Figura 20. Resultados de estándar de Clembuterol	77
Figura 21. Metabolitos de Clembuterol en fase I y II.	78
Figura 22. Datos después de mediciones repetidas de ANOVA de una vía	80

Figura 23. Correlación de tratamiento con indicadores de daño celular	83
Figura 24. Comportamiento de γ -GT por tratamiento en ratas macho	83
Figura 25. Gráfico de medias de γ -GT entre un nivel de tratamiento	84
Figura 26. Correlación de GPT con Indicadores de Daño Celular.....	84
Figura 27. Fotos de pulmón de ratas macho tratadas con clenbuterol (Ventipulmin®)	85
Figura 28. Correlación de GPx con Indicadores de Daño Celular	85
Figura 29. Comportamiento de GPx por tratamiento en ratas macho	85
Figura 30. Correlación de GR con Indicadores de Daño Celular.....	86
Figura 31. Correlación de Hígado (GSH) con Indicadores de Daño Celular	86
Figura 32. Correlación de 8-iso-PGF2 α con Indicadores de Daño Celular.....	86
Figura 33. Correlación de LDH con Indicadores de Daño Celular	87
Figura 34. Correlación de Plasma (GSH) con Indicadores de Daño Celular	87
Figura 35. Correlación de Pulmón (GSH) con Indicadores de Daño Celular	87
Figura 36. Correlación de Riñón (GSH) con Indicadores de Daño Celular	88
Figura 37. Comportamiento de GSH por tratamiento en ratas macho	88
Figura 38. Correlación de Tratamiento con Indicadores de Daño Celular.....	89
Figura 39. Correlación de γ -GT con Indicadores de Daño Celular.....	89
Figura 40. Cantidad de isoprostanos (8-iso-PGF2 α) según tratamiento	89
Figura 41. Gráfico de medias de la cantidad de isoprostanos (8-iso-PGF2 α) según el tratamiento.....	90
Figura 42. Contenido de glutatión en corazón de ratas alimentadas con Clenbuterol	90
Figura 43. Contenido de glutatión en pulmón de ratas alimentadas con Clenbuterol.....	91
Figura 44. Contenido de glutatión en el riñón de ratas alimentadas con Clenbuterol.....	91
Figura 45. Contenido de glutatión en bazo de ratas alimentadas con Clenbuterol.	92
Figura 46. Contenido de glutatión en hígado de ratas alimentadas con Clenbuterol.	92
Figura 47. Niveles de glutatión en plasma de los diferentes grupos	93

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resultados 2012 reportados por el laboratorio nacional de prevención y control de dopaje	19
Tabla 2. Recopilación de detalles específicos de hallazgos analíticos adversos en relación con las ciudades anfitrionas(Thevis, Geyer, et al., 2013).....	19
Tabla 3. Resultados de algunos atletas que dieron positivo en la prueba de dopaje en orden cronológico.	20
Tabla 4. Propiedades fisicoquímicas del Clenbuterol	23
Tabla 5. Metabolitos en orina de rata de clenbuterol, utilizando cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas de tiempo de vuelo (Domínguez-Romero et al., 2013).	29
Tabla 6. Excreción de Clenbuterol en diferentes especies (Sumano et al., 2004).....	30
Tabla 7. Excreción de ¹⁴ C-Clenbuterol después de administrar por vía oral	30
Tabla 8. Parámetros farmacocinéticos de los enantiómeros de clenbuterol después de ser administrado por I.V. y I.D. de 2 mg/kg (rac) clenbuterol a ratas	32
Tabla 9. Concentración promedio de clenbuterol en tejidos (Kp) de R-(-) Clenbuterol y S-(+) Clenbuterol después de 36 h de administrar por vía intravenosa el (rac) clenbuterol.....	32
Tabla 10. Composición estereoquímica (Media ± SD) de Estereoisómeros de Clenbuterol en tejidos de cerdos, después de administrar HCl Clenbuterol durante 7 días consecutivos y sacrificados con los plazos de espera de 0, 3, 7 o días de retiro ^a . (Smith, 2000)	33
Tabla 11. Parámetros optimizados de MS para los enantiómeros de clenbuterol.	57
Tabla 12. Principales parámetros de validación del método.	63
Tabla 13. Estabilidad de R-(-) y S-(+) enantiómeros de clenbuterol después de la preparación de la muestra (n= 3).	64
Tabla 14. Determinación de enantiómeros de clenbuterol en la carne contaminada, en el fármaco utilizado y después de la granulación de ambas muestras.....	65
Tabla 15. Transiciones SRM dinámicas para Clen y Clen-metabolitos	71
Tabla 16. Correlaciones de indicadores de estrés oxidativo, daño celular y tratamiento.	82

ABREVIATURAS

ABC	Área bajo la curva
ACN	Acetonitrilo
AF	Ácido fórmico
VICH	Armonización internacional veterinaria
R	Coefficiente de correlación
R ²	Coefficiente de determinación
Log P	Coefficiente de partición
pka	Constante de acidez
C.V.	Coefficiente de variación
[]	Concentración
CVMP	Comité para medicamentos de uso veterinario
UPLC-MS/MS	Cromatografía líquida de ultra eficiencia acoplada a un detector de espectrometría de masas-masas
Desv.std	Desviación estándar
ROS	Especies reactivas de oxígeno
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
ESI (+)	Ionización por electrospray en modo positivo
FA	Formiato de amonio.
µg	Microgramo
mM	Milimolar
mg	Miligramo
µl	Microlitro
ng	Nanogramo
nm	Nanómetros
LDH	Lactato Deshidrogenasa
LQ	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección
%	Porcentaje
m/z	Relación masa/carga
T ^{1/2}	Tiempo de vida media
T max	Tiempo máximo
Vd	Volumen de distribución
v/v	Volumen/Volumen

I. INTRODUCCIÓN

El uso de clenbuterol se propaga ampliamente entre los atletas para mejorar la resistencia de la competencia y el crecimiento muscular su uso se ha convertido en un problema no sólo de salud pública sino también de tipo económico y ético. Aunque es ilegal y reprobable, ya que es una forma de hacer trampa en los deportes, el clenbuterol es altamente promocionado por los sitios web de culturismo como un estándar de oro para perder peso y ganar tejido muscular. El clenbuterol se puede adquirir fácilmente a través de sitios web en línea o en el mercado negro, además de consumirse sin saber a través de la carne que se vende en el mercado (Prezelj et al., 2003). Este último hecho ha creado una gran controversia entre los atletas y la ley que arroja dudas sobre si la presencia de clenbuterol en la orina de los atletas provino de la ingesta directa con fines de dopaje o por medio del consumo de carne, argumentando la presencia de residuos (Parr et al., 2017; Thevis et al., 2013). Lo que resulta en una afectación directa al ganadero y a todos los miembros de la cadena de producción de los alimentos de origen cárnico, a las exportaciones y económicamente al comercio mexicano ya que genera desconfianza de la inocuidad de la carne comercializada de México al mundo.

En este sentido, existe una necesidad urgente de realizar una prueba precisa que, además de proporcionar la cantidad, discrimine la fuente del clenbuterol que se encuentra en la orina de un atleta. Ya en 2011, la Agencia Mundial Antidopaje (WADA) emitió advertencias específicas sobre este problema, donde se sabe que la prevalencia de la contaminación de la carne por el clenbuterol es alta (Wada-ama.org, 2011). Como ejemplo de su uso en ovejas y vacas, se ha informado que el clenbuterol puede aumentar su masa muscular entre un 8% y un 40% (Johnson et al., 2014; Malucelli et al., 1994; Miller et al., 1988; Schiavetta et al., 1990). Además, el clenbuterol se elimina fácil y rápidamente del animal y se vuelve indetectable después de un pequeño período de retiro, lo que finalmente resulta en un beneficio sustancial para los ganaderos sin trazabilidad (Dimeo, 2018; Wood et al., 2010). El uso de clenbuterol es autorizado exclusivamente con fines terapéuticos como en el caso de vacas para efecto tocolítico o como broncodilatador en caballos, su uso en animales destinados al consumo humano es ilegal, acuerdo NOM-064-ZOO-2000, publicada en el DOF 5 de marzo del 2012. Existe el programa de productor confiable para aquellos productores que quieren exportar sus productos cárnicos y el

programa Nacional de Residuos Tóxicos Peligrosos que contemple esa molécula a nivel de rastros tipo Inspección Federal (TIF). Sin embargo, podrían no quedar sujetos a vigilancia sanitaria algunos expendios de productos cárnicos no establecidos, como los situados en tianguis y mercados sobre ruedas, cuyo giro comercial se permite o prohíbe de acuerdo con las disposiciones legales de cada entidad o la matanza clandestina y sus nulas prácticas sanitarias por lo que hay que considerarlo (Diario Oficial, 1951; Jiménez et al., 2011).

De acuerdo al Artículo 221 BIS-A del Código Penal, se impondrá de tres a diez años de prisión y de cien a quinientos días multa: (Ref. P. O. No. 15, 14-III-08), a quien posea, transporte, traslade, almacene, distribuya o comercie Clembuterol o lo suministre a animales de consumo humano, sin contar con el soporte técnico correspondiente para su empleo industrial, nutricional o farmacéutico en animales de consumo humano.

El Clembuterol es una molécula que presenta enantiómeros R(-) y S(+) 50:50 y que se comercializa como mezcla racémica. En publicaciones recientes, se ha sugerido que la relación enantiomérica puede cambiar si el clembuterol se consume a través de carne contaminada o por administración oral (Guddat et al., 2012; Thevis et al., 2013). Después de una administración oral del fármaco, el clembuterol tiene una proporción igual de enantiómeros 1:1; sin embargo, en carne, los artículos han reportado diferencias en la relación enantiomérica hasta 3:1 (R(-): S(+)) (Guddat et al., 2012; Thevis et al., 2013). En otro estudio, Z. L. Wang demostró que el agotamiento es significativamente diferente para cada enantiómero en cerdos, vacas y corderos; específicamente en el caso de los porcinos, hay una acumulación de S - (+) clembuterol en el músculo y el hígado (Thevis et al., 2013). Además, se ha informado que el R- (-) clembuterol se acumula en los músculos de la carne de res y cordero (Wang et al., 2016). En consecuencia, una hipótesis es que los enantiómeros de clembuterol en la orina humana pueden diferir dependiendo del tipo de carne ingerida. Sin embargo, hasta la fecha esta hipótesis no ha sido probada. En un estudio reciente, la administración de una dosis única de clembuterol a través de o carne contaminada en humanos no mostró diferencias en la relación enantiomérica de clembuterol, ya que todas las fuentes de clembuterol contenían la misma proporción (1:1) de enantiómeros (Parr et al., 2017).

Sin embargo, aún no se ha explorado la relación enantiomérica a lo largo de un ciclo de dopaje o una ingesta continua de carne contaminada. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el impacto de la ingesta de clenbuterol midiendo sus enantiómeros en la orina de tres grupos de animales: ratas en un ciclo de dopaje, ratas alimentadas continuamente con carne contaminada y ratas alimentadas normalmente sin clenbuterol durante 7 días, para establecer posibles diferencias entre un ciclo de dopaje y la ingesta continua de carne contaminada. Para perseguir este propósito, se desarrolló y validó una metodología analítica siguiendo las directrices de la VICH (Steering et al., 2016).

II. MARCO TEÓRICO

En todos los países la calidad y la inocuidad de los alimentos es de gran relevancia debido a que es obligatorio satisfacer las necesidades de una población que está en constante cambio y crecimiento. Ante esta situación, es necesario presentar al consumidor productos de mayor calidad y de menor costo, para ello se han presentado diferentes tecnologías y métodos para lograrlo en el menor tiempo posible, entre estos se encuentra la adición de sustancias, tales como: probióticos, hormonas, modificadores metabólicos, clenbuterol entre otros.

El clenbuterol es autorizado para su uso clínico en medicina veterinaria como broncodilatador en bovinos, equinos y animales de compañía, o como un tocolítico en vacas con un límite máximo de residuos (LMR) de 0.5 µg/kg de hígado / riñón y 0,1 µg/kg para el músculo o 0.05 µg/L para la leche (Ramos et al., 2003; Serratos et al., 2006), es un medicamento que se usa en la farmacopea humana como potente broncodilatador en el asma bronquial a dosis de 10 a 40 mg, que se expende libremente en las boticas como salbutamol para enfermos que lo requieren, bajo prescripción médica. Sin embargo, los β-agonistas adrenérgicos (βAA) se han utilizado en la producción animal, incluidos los rumiantes, propiciando una mayor eficiencia de uso del alimento, la cual se manifiesta en mejores características de la canal, así como en la composición química de la carne.

En México está prohibido el uso de clenbuterol desde el 2000 con la Norma emergente: NOM-EM 015-ZOO-2002, Norma Oficial Mexicana de Emergencia. Especificaciones técnicas para el control del uso de Beta-agonistas en los animales, publicada en el DOF 1 de marzo de 2002. A

partir del año 2002, se fortaleció la vigilancia epidemiológica de la intoxicación alimentaria por clenbuterol, el promedio anual de casos notificados en los últimos cinco años es de 220 casos. En el año 2007, se notificaron 110 casos, con una tasa de incidencia de 0.10 casos por 100,000 habitantes; lo anterior representó una reducción en la incidencia de los casos del 81% (Epidemiología, 2012).

En México en el 2013 se llevó a cabo una inspección específica de un centro de distribución para este β -agonista, que implica el análisis de un total de 78 muestras de hígado de bovino. De todas las muestras examinadas, el 62% de ellos tenían concentraciones superiores al límite máximo de residuos de 0,6 ng/g establecido por la agencia de alimentos del departamento de agricultura de las Naciones Unidas para clenbuterol (Morales et al., 2013). En 2014 la Secretaría de Salud a través de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) informó que luego de realizar en el presente año 37 verificaciones de rastros se llevaron a cabo 10 suspensiones donde se detectó presencia de clenbuterol o malas prácticas higiénicas, los rastros clausurados, se ubican en los estados de Guanajuato, Jalisco, Morelos, Nayarit, Tlaxcala, Puebla, Querétaro y Aguascalientes, tras detectarse clenbuterol en la orina, sangre o músculo de las reses (Productora Nacional de Biológicos Veterinarios, 2014). Actualmente Sedrae investiga a granja de Aguascalientes por probable uso de clenbuterol (Productora Nacional de Biológicos Veterinarios, 2019).

El problema potencial en salud pública se debe posiblemente a una cuestión de concentraciones del clenbuterol en los alimentos ingeridos y no a una toxicidad genómica acumulable o de otra de las índoles ya referidas (Sumano et al., 2002). Un estudio en pollos de engorde, alimentados con una dieta que contenía 1 ppm de clenbuterol durante 2 semanas mostró que el contenido de clenbuterol disminuyó rápidamente en el músculo y ya no era detectable 24 h después de la interrupción del tratamiento (Malucelli et al., 1994). Además, estudios previos han demostrado que los músculos de los animales tratados con dosis diez veces mayor a las terapéuticas durante 15 días puede no ser muy tóxico para los consumidores 5 días después de retirar el tratamiento y que las muestras de músculo parecen ser una matriz inadecuada para el control de los abusos debido a su bajo contenido y la rápida eliminación de clenbuterol (Sauer et al., 1995).

Sauer et al administró clenbuterol por vía oral a diez veces la dosis terapéutica (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso cada 12 h durante 21 días) en becerros Holstein-Friesian y se determinaron las principales variables farmacocinéticas y el patrón de eliminación de los residuos en los órganos y tejidos habituales. Las concentraciones del clenbuterol fueron más elevadas en el hígado. Sin embargo, las concentraciones en la coroides/retina fueron diez veces mayores que en el hígado en todos los tiempos después de terminado el tratamiento. La melanina es el componente ocular responsable de la fijación del clenbuterol (Howells et al., 1994).

En otro estudio se determinó el nivel de residuos de clenbuterol en el tejido muscular de cerdos después de la administración repetida de una dosis de 20 mg/kg, la determinación fue por ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) como método de cribado y la espectrometría de masas en tándem de cromatografía líquida (LC-MS/MS) como método de confirmación. La administración de clenbuterol como promotor del crecimiento en la producción de cerdos podría dar lugar a residuos en la carne para el consumo humano hasta 7 días después de la interrupción del tratamiento (Pleadin et al., 2010). En contraste, la acumulación de clenbuterol en los tejidos comestibles de la especie porcina se encontró que era en mayor proporción hacia S-(+), es decir, en períodos más largos S- (+) de clenbuterol se enriquece en los tejidos mientras que el R-(-) se agota (Smith, 2014; Smith, 2000).

En consecuencia, los enantiómeros de clenbuterol son eliminados por vía renal y pueden diferir en la orina humana en función de la composición administrada (Thevis et al., 2013). El estereoisómero S-(+) fue el estereoisómero de clenbuterol predominante presente en los tejidos comestibles de los cerdos sacrificados después de los períodos de suspensión de 0, 3 y 7 días, con una relación (+)/(-) isómero de aproximadamente 3:1. La prevalencia del estereoisómero S-(+) en los tejidos comestibles de los cerdos en todos los períodos de abstinencia sugiere que los procesos estereoselectivos están ocurriendo durante la absorción, distribución, metabolismo, y/o la excreción de clenbuterol. El efecto de la dosis de clenbuterol en su composición estereoquímica en los tejidos comestibles es desconocida, pero será un área de investigación adicional (Smith, 2000).

Más recientemente, Guddat et al. publicó los resultados de análisis de muestras de orina proporcionadas por 28 voluntarios después de haber viajado a China (Guddat et al., 2012). El

clenbuterol se detectó en el 79% de las muestras analizadas con niveles de concentración entre 1 y 50.5 pg/mL. Los autores remarcan la posibilidad de un problema general de contaminación de alimentos en China, que podría dar lugar a riesgos de dopaje involuntario para los atletas en el deporte.

En Chipre se realizó un estudio clínico que incluía 18 voluntarios, después de una ingestión oral de una sola dosis de clenbuterol en yogures enriquecidos con jarabe Spiropent® (frasco de 100 mL, Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co KG, Ingelheim am Rhein, Alemania) que contiene 5mg/mL de clorhidrato de clenbuterol, se recolectaron muestras de orina in situ. (Nicoli et al., 2013). Los perfiles farmacocinéticos urinarios mostraron que los niveles máximos de clenbuterol en la orina aparecieron aproximadamente 4 h. después de la administración ($T_{máx}$). Los valores máximos de excreción durante este período de tiempo fueron de aproximadamente 1.2 ± 0.3 ng de clenbuterol/mg de creatinina (1.2 ± 0.4 ng/mL) después de una sola dosis de 10 mg, mientras que los niveles traza (aprox. 5 pg/mL) de este compuesto se encontraron en las muestras hasta 6 días (140 h) después de la administración.

Asimismo, en el ámbito deportivo el uso de clenbuterol con fines de dopaje ha generado casos en deportistas. El 19 de agosto el deportista Alberto Contador recibió el resultado positivo (50 pg/mL) de la prueba de orina para (World Anti-Doping Agency) debido a su efecto anabolizante. Ante la imposibilidad en su defensa de demostrar la contaminación cárnica, fue sancionado económicamente y penalizado dos años fuera de competición, siendo desprovisto del título (Elisa Bazo Santos, Miguel Cantalejo Díaz, Israel Chicaiza Portilla & Nogueira, 2013).

Taylor Findlay fue sancionado en febrero de 2016. El 1 de mayo, el Centro Canadiense de Ética en los Deportes (CCES) divulgó públicamente la decisión de sancionar al levantador de pesas durante cuatro años. Findlay, que trabaja tiempo completo en una clínica veterinaria, contó en su audiencia que comió carne de caballo en un restaurante francés antes de que su muestra fuera recolectada fuera de competición (Cumming & Manager, 2017). El análisis encontró una presencia de clenbuterol a un nivel aproximado de 0,15 ng/mL; que, según la decisión escrita, es compatible con el consumo de carne contaminada en México y China.

Se han registrado más de 250 casos de dopaje con clenbuterol. El fisiculturismo es el deporte con la mayoría de los casos (61) seguidos por el atletismo (46) y el ciclismo (26). Hasta ahora, se han registrado 24 levantadores de pesas que dieron positivo. República Checa es el país con más casos (32) seguido de China (21) y Australia (17). Hasta ahora se han registrado siete atletas de Canadá que dieron positivo por clenbuterol, 155 atletas han sido sancionados durante dos años, mientras que 36 han sido suspendidos por cuatro años (Ltd. & Drive, 2017). Cuatro han recibido una advertencia pública y hasta el momento seis atletas han recibido una suspensión de por vida.

Cabe resaltar que en 2017 los deportistas continúan dando positivo a clenbuterol y muchos de estos justifican con el consumo de carne contaminada con clenbuterol.

El centro de investigación para la prevención del dopaje perteneciente a la Universidad de Colonia (Alemania) realizó un estudio de orina a 28 voluntarios no deportistas que habían viajado a diferentes zonas de China o que eran residentes, de estos voluntarios 22 fueron positivos en clenbuterol y sólo 6 negativos (de los cuales uno era vegetariano y no comía carne).

En 2011 la Asociación Nacional Antidopaje Alemana, advirtió a los deportistas de su país, que consumir carne contaminada en México podría causarles problemas en las pruebas clínicas y les recomendó ser muy cuidadosos en sus viajes a este país. La carne en México contiene una mayor concentración de clenbuterol que en China, indicó la asociación, luego de que dos viajeros dieron positivo al regresar de este país a Alemania (Thevis et al., 2013; WADA, 2011).

En la tabla 1 se observan los resultados 2012 reportados por el Laboratorio Nacional de Prevención y Control de Dopaje, sin embargo, en este reporte, no deben ser confundidos con sanciones impuestas a violación de las reglas antidopaje. Aunque los reglamentos de la Agencia Mundial Antidopaje (WADA) generalmente siguen el principio de responsabilidad objetiva (es decir, se establece una violación de dopaje cuando la muestra de un atleta es encontrado positivo por una sustancia prohibida o de sus metabolitos, independientemente de una inadvertida o administración intencional), es de suma importancia para explotar todos los medios científicos válidos para proteger al atleta inocente de las sanciones.

Tabla 1. Resultados 2012 reportados por el laboratorio nacional de prevención y control de dopaje

Organización antidopaje/Federación Nacional	Ma	Raa**	Sustancias detectadas
Federación Mexicana de Karate y Artes Marciales Afines A. C.	47	1	<i>Clembuterol</i>
Federación Mexicana de Fútbol Asociación A. C.	120	3	<i>Clembuterol</i>
Federación Mexicana de Asociaciones de Atletismo A. C.	183	11	Boldenona, <i>Clembuterol</i> , Dexametasona, Metilhexamina,
Federación Mexicana de Baloncesto A. C.	41	13	<i>Clembuterol</i>
Federación Mexicana de Boxeo de Aficionados A. C.	56	2	Clorotiazida, <i>Clembuterol</i>
Federación Mexicana de Ciclismo A. C.	181	15	Boldenona, <i>Clembuterol</i> , Hidroclorotiazida, Estanozolol Metilhexamina
Federación Mexicana de Deportes sobre Sillas de Ruedas A. C.	87	6	Clortalidona, <i>Clembuterol</i> , Dexametasona
Federación Mexicana de Gimnasia A. C.	54	2	<i>Clembuterol</i>
Federación Mexicana de Handball A. C.	27	1	<i>Clembuterol</i>
Federación Mexicana de Judo A. C.	60	4	<i>Clembuterol</i> , Metilhexamina
Federación Mexicana de Levantamiento de Pesas A. C.	186	13	<i>Clembuterol</i> , Epimetendiol, Metiltestosterone M-2, Metilhexamina,
Federación Mexicana de Natación A. C.	159	3	<i>Clembuterol</i> , THC-COOH
Federación Mexicana de Pentatlón Moderno A. C.	26	2	<i>Clembuterol</i>
Federación Mexicana de Tae Kwon Do A.C.	45	3	<i>Clembuterol</i>
Federación de Squash de México A. C.	6	1	<i>Clembuterol</i>
Federación Mexicana de Fútbol Americano A. C.	111	11	19-Norandrosterone, 19-Noretiocholanolone, <i>Clembuterol</i> , Clortalidona, Oxandrolona
Liga Mexicana de Béisbol	374	16,	19-Norandrosterone, 19-Noretiocholanolone, <i>Clembuterol</i> , THC-COOH

** Los resultados analíticos adversos (**Raa**), **Ma** = Muestras analizadas

En la tabla 2 se observa un comparativo de la cantidad promedio de clembuterol encontrada en atletas en diferentes ciudades, se observa que Querétaro contiene el valor más alto (5 hallazgos entre 209 y 1556 pg/mL), Monterrey (4 hallazgos entre 389 y 1500 pg/mL), y Guadalajara (1 hallazgo a 265 pg/mL), mientras que las muestras recogidas en Torreón no superaron los niveles superiores a 18 pg/mL.

Tabla 2. Recopilación de detalles específicos de hallazgos analíticos adversos en relación con las ciudades anfitrionas (Thevis, Geyer, et al., 2013)

Ciudad de competición	Muestras recolectadas (n)	Clembuterol encontrado [n (%)]	Promedio conc. (pg/ml)	Mediana (pg/mL)	Min (pg/mL)	Max (pg/mL)
Guadalajara	32	24(75)	54.5	22.2	2.4	265.3
Ciudad de México	8	5(63)	89.6	96.3	4.4	163.6
Monterrey	32	16(50)	307.5	39.9	1.3	1500
Morelia	32	16(50)	21.3	15.7	1.3	73.0
Pachuca	36	11(31)	29.6	19.3	1.3	159.6
Querétaro	36	32(89)	123.2	54.8	2.1	1556
Torreón	32	5(16)	7.5	5.1	1.8	17.7

En la tabla 3 se observa el resumen antidoping IFBB, 2014, 2015 y 2016, en el Campeonato Mundial Juniors y Másters 2014 Morelia, México - 2 al 6 de octubre de 2014 (IFBB, 2017).

Tabla 3. Resultados de algunos atletas que dieron positivo en la prueba de dopaje en orden cronológico.

ATLETA	PAÍS	SUBSTANCIA(S)	COMENTARIOS
ALENA PROKOFEVA	Federación Rusa	Clorotiazida, Hidroclorotiazida, Triamtereno y Clembuterol	La atleta fue suspendida por 3 años, desde el 5 de octubre de 2014 hasta 4 de octubre de 2017.
VIACHESLAV FEDORENKO	Federación de Ucrania.	Stanozolol y metabolitos, Canrenona, Clembuterol y metabolito de la Boldenona	El atleta fue suspendido por 3 años, desde el 5 de octubre de 2014 hasta el 4 de octubre de 2017.
JOSEF AHMAD	Federación Sueca	Stanozolol y metabolitos, Clorotiazida y metabolitos, Epiritrenbolona, Metaterolita de Mesterolona, Metenolona, Clembuterol , Furosemida y Amilorida	El atleta fue suspendido por 3 años, desde el 5 de octubre de 2014 hasta el 4 de octubre de 2017.
JOSÉ REARTES	Federación Argentina	Canrenona, hidroclorotiazida, Clembuterol y metabolito de estanozolol	El atleta fue suspendido por 3 años, desde el 15 de noviembre de 2014 hasta el 14 de noviembre de 2017.
MOHAMED ZAKAREYA	Federación de Egipto	Canrenona, anastrozole, Clembuterol , metabolito de la trenbolona, metabolito de la drostanolona y Metabolito de Stanozolol	El atleta fue suspendido por 3 años, desde el 15 de noviembre de 2014 hasta el 14 de noviembre, 2017.
TIM BUDESHEIM	Federación Alemana	Triamtereno, hidroclorotiazida, Clembuterol , metabolito de la trenbolona, metabolito de metandienona y drostanolona	Fue suspendido por 3 años, desde el 15 de noviembre de 2014 hasta el 14 de noviembre de 2017.
DINESH KAMBLE	Federación india	Furosemida, Clembuterol , metabolito de la trenbolona, metabolito de la drostanolona y metabolito del estanozolol	El atleta fue suspendido por 3 años, del 15 de noviembre de 2014 al 14 de noviembre de 2017.
ARTEM PYARI	Federación Rusa	Clembuterol , Furosemida, Oxandrolona y metabolito, Stanozolol y Metabolitos de Stanozolol.	El atleta fue suspendido por 3 años, desde el 15 de diciembre de 2014 hasta el 14 de diciembre de 2017.
CARLOS MARVILLIA	Federación Brasileña	Clembuterol , oxandrolona y metabolito, Stanozolol y Stanozolol metabolitos	El atleta fue suspendido por 3 años, desde el 19 de enero de 2015 hasta el 18 de enero de 2018.
WILMER SARMIENTO	Honduras	Clembuterol , Mesterolona, Boldenona, Boldiona, Estanozolol, Hidroclorotiazida, Furosemida.	El atleta fue suspendido por 4 años, desde el 06 de diciembre de 2014 hasta el 06 de diciembre de 2018.
CAROLINA SOLANO	República Dominicana	Canrenone. Clembuterol . Methyltestosterona metabolites, Metabolitos de Stanozolol.	La atleta fue suspendida por 4 años, desde el 29 de septiembre de 2015 hasta el 29 de septiembre de 2019.
EVANDRE CHIRINO	Antillas Holandesas	Triamterene, Hidrichlorothiazide and metabolites. Clembuterol , Oxandrolone metabolites, Metabolitos de Stanozolol.	El atleta fue suspendido por 4 años, desde el 29 de septiembre de 2015 hasta el 29 de septiembre de 2019.
MARIE BOUCHALOVÁ	República Checa.	Oxandrolon, Clembuterol , amilorid, metenolon, hidroclorotiazida y tamoxifeno.	El período de descalificación comienza el 12 de mayo de 2016 (fecha de la notificación del Comité Checo Antidopaje sobre la infracción de las normas antidopaje) y termina el 11 de mayo de 2020
RADEK JURÁŇ	República Checa.	Drostanolon, Clembuterol y marihuana.	El período de inhabilitación comienza el 12 de mayo de 2016 y termina el 11 de mayo.
ISRAEL GÓMEZ	España	Clembuterol	El atleta fue suspendido por cuatro años, desde el 18 de junio de 2016 hasta el 17 de junio de 2020.

ATLETA	PAÍS	SUBSTANCIA(S)	COMENTARIOS
CARLOS MAURICIO GÓMEZ SALAS	Colombia	<i>Clembuterol</i> , Oxandrolona PC y su metabolito Epioxandrolona, 3-OH Stanozolol y 16-OH Stanozolol metabolitos de Stanozolol;	El atleta fue suspendido por 04 (cuatro) años, desde el 12 de septiembre de 2016 hasta el 11 de septiembre de 2020.
GRISSEL RODRÍGUEZ AYALA	El Salvador	<i>Clembuterol</i> , Estanozolol, Pregnanediol.	El atleta fue suspendido por cuatro años, desde el 18 de junio de 2016 hasta el 17 de junio de 2020.
ARTEM PYARI	Federación Rusa	<i>Clembuterol</i> , Furosemida, Oxandrolona y metabolito, Stanozolol y Stanozolol metabolito	El atleta fue suspendido por 3 años, desde el 15 de diciembre de 2014 hasta el 14 de diciembre de 2017.
MIGUEL ANTONIO RAMÍREZ HERRERA	Chile	<i>Clembuterol</i> , 19-norandrosterona, 3-OHStanozolol y 16-OH Stanozolol metabolitos de Stanozolol, Epi-trembolona -metabolito de trembolona, Canrenone - metabolito de Espironolactona, Anastrazol y Letrozol	El atleta fue suspendido por 04 (cuatro) años, desde el 12 de septiembre de 2016 hasta el 11 de septiembre de 2020.
RICARDO ERNESTO BASANTES MURILLO	Ecuador	<i>Clembuterol</i> , 2 α -metil-5 α -androstano-3 α -ol-17-ona, metabolito de Drostanolone, 3-OH Stanozolol y 16-OHStanozolol metabolitos de Stanozolol, Anastrazol, Canrenone, metabolito de Espironolactona	El atleta fue suspendido por 04 (cuatro) años, desde el 12 de septiembre de 2016 hasta el 11 de septiembre de 2020.
FÉLIX ARNALDO	Aruba	Metabolitos de Boldenona, Metabolitos de Stanozolol, Furosemida, Triamtereno, Hydrochlorothiazide y Matabolita (cloramifenamida), Anastrazol, <i>Clembuterol</i> .	El atleta Felix Arnaldo está suspendido por cuatro años, a partir del 02 de octubre 2016 del 02 de octubre de 2020 inclusive.
RANDY SANTOS SORAINE	República dominicana	Mesterolone matabolita, furosemida, Hydrochlorothiazide y matabolita (cloramifenamida), <i>Clembuterol</i> .	El atleta fue suspendido por cuatro años, desde el 02 de octubre de 2016 el 2 de octubre de 2020.

III. CLEMBUTEROL

2.1.1. Regulación de Clembuterol en México

En el punto 6.10.5 de la NOM-194-SSA1-2004 se indica que los productos de ganado bovino deberán estar libres de clembuterol, y el cumplimiento de esta disposición corresponde a la COFEPRIS (que ejerce las atribuciones de regulación, control y fomento sanitarios) y a los gobiernos de las entidades federativas. De esta forma, se evalúan las condiciones sanitarias de los establecimientos y se toman muestras de alimentos para su análisis, con el objeto de proporcionar evidencia en el cumplimiento de las especificaciones sanitarias conforme a la ley, o en su defecto, dar los elementos para proceder a las medidas de seguridad, como la incautación del producto contaminado o sospechoso hasta la suspensión de actividades del establecimiento. Actualmente una muestra negativa se considera a partir de residuos por debajo de 2000 ppt y no por la ausencia del residuo en el producto. (FAO, 2005; COFEPRIS, 2006; Jiménez et al.,2011)

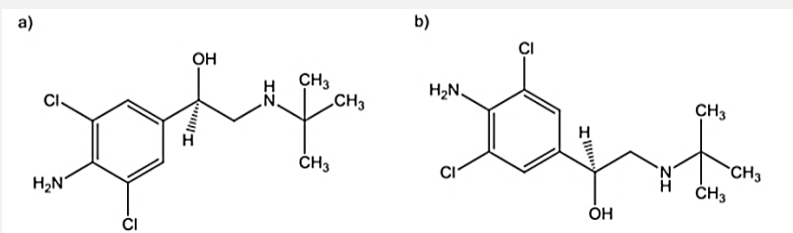
En el año 2000 se emitió la norma oficial mexicana NOM-061-ZOO-1999, denominada: Especificaciones zoosanitarias de los productos alimenticios para consumo animal, en la cual queda explícitamente prohibido el uso de Clembuterol, así como de todos aquellos ingredientes y/o aditivos alimenticios que comprobadamente puedan ser nocivos para la salud pública o representen riesgo zoosanitario, y que no cuenten con el soporte técnico correspondiente para su empleo en la nutrición de los animales (Fernandez, 2012).

Aunado a ello también se encuentra la NOM-EM-015-2002 mencionando que queda prohibida la Producción, Manufactura, Fabricación, Elaboración, Preparación, Acondicionamiento, Transportación, Tráfico, Comercialización, Suministro y Utilización de los Principios Activos (β -agonistas) destinados para consumo y uso en animales (quedando comprendido el clembuterol); así mismo la NOM-064- ZOO-2000, marca los lineamientos para la clasificación y prescripción de productos farmacéuticos veterinarios por el nivel de riesgo de sus Ingredientes activos.

En atención a esta problemática, la SAGARPA realiza la verificación en establecimientos TIF para detección de clembuterol (SAGARPA, 2007), además, ha desarrollado estrategias para fomentar el no uso del clembuterol, como el “Manual de buenas prácticas de producción en la engorda de ganado bovino en confinamiento” (SAGARPA, 2009; Jiménez et al., 2011) y con el programa de “Proveedor Confiable”, Libre de Clembuterol, mediante la puesta en marcha del Acuerdo entre el SENASICA y los Rastros Tipo Inspección Federal, lo que significa que dichas plantas de procesamiento de ganado únicamente pueden recibir el que provenga de explotaciones inscritas en el Programa de Proveedor Confiable, esto garantizará que los productos cárnicos que se comercialicen provenientes de la red de Plantas TIF, se encuentren libres de dicha sustancia. La COFEPRIS continúa vigilando, junto con SAGARPA y las 32 entidades federativas, la matanza de reses en los rastros municipales y tipo TIF, ya que el uso de clembuterol en la engorda de ganado está prohibido por la legislación de sanidad animal y representa un riesgo para la salud humana. El uso del clembuterol en la alimentación de los animales está tipificado como delito en el Título Décimo Cap. IV, artículos 172, 173 y 174 de la Ley Federal de Sanidad Animal, el cual especifica sancionar con prisión y multa (Diario Oficial,2007; Jiménez et al., 2011).

2.1.2. Propiedades fisicoquímicas del Clembuterol

Tabla 4. Propiedades fisicoquímicas del clembuterol

Propiedad	Características
(a) R-(-)-Clembuterol (activo de receptor β_2 adrenérgico)	
b) S-(+)-Clembuterol (inactivo de receptor adrenérgico)	
Aspecto	Polvo microcristalino incoloro o ligeramente amarillo.
Solubilidad	En metanol y etanol, moderadamente soluble en cloroformo e insoluble en benceno
pKa	8.5, 10
Punto de fusión	170-176° C
Ion precursor/Ion producto en ESI +	277→203 m/z

2.1.3. Mecanismos de acción de los β -agonistas en el metabolismo

En el tejido adiposo los β -agonistas aumentan marcadamente el metabolismo degradativo de los lípidos en el adipocito, por lo tanto, impiden y reducen la deposición de grasa (Mersmann 1998; Castellanos et al., 2006).

Por lo tanto, un aumento en el catabolismo (lipólisis) y una reducción en el anabolismo (lipogénesis) de los lípidos en el adipocito, conducirá a una hipertrofia reducida del adipocito y en consecuencia a una reducción del depósito de grasa en la canal (Y et al., 2000; Kuiper et al., 1998).

En el tejido muscular los β -agonistas aumentan la perfusión sanguínea hacia el músculo, así como una mayor disponibilidad de energía y aminoácidos, en consecuencia, aumenta la síntesis y retención de proteína que favorece la hipertrofia muscular, principalmente de los músculos del cuarto trasero del animal (Liang et al., 2000; Castellanos et al., 2006).

II.II. Farmacocinética

2.2.1. Absorción y Distribución

En los animales de laboratorio y en los seres humanos que fueron tratados con clenbuterol, mostraron un pico máximo de concentración de clenbuterol 2-4 h después de la administración, con una vida media plasmática que varió entre 16 y 105 h (Heitzman, 1996; FAO/OMS, 1998), sin embargo, algunas investigaciones coinciden que la absorción en rumiantes es más lenta ya que el pico máximo de concentración se presentó 2 a 12 h después de la administración (Heitzman, 1996).

El clenbuterol tiene una biodisponibilidad del 70-80% tras administrarse por vía oral. Los efectos aparecen al cabo de 30 minutos, siendo máxima a las 2 h. El clenbuterol se une intensamente a los tejidos, liberándose muy lentamente, lo que hace que presente unos efectos anabolizantes más importantes. En un estudio, se indica que el clenbuterol se distribuye rápidamente en el músculo y la relación de distribución de sangre-musculo es del 20% (Chang et al., 2009).

2.2.2. Metabolismo

La estereoselectividad en el metabolismo de xenobióticos quirales está muy bien documentada, tiene capacidad discriminadora entre enantiómeros y afecta tanto a transformaciones no sintéticas (fase I) como a sintéticas (fase II). Las transformaciones metabólicas que se pueden realizar sobre:

- 1) Una sustancia inicialmente quiral.
- 2) Una sustancia proquiral, dando como resultado un derivado quiral que puede ser objeto de posterior transformación estereoselectiva.
- 3) Un producto con un centro quiral, pero en el que, en su transformación, se crea un nuevo centro de asimetría dando lugar a un diastereoisómero que experimentará posteriores biotransformaciones.

El metabolismo de clenbuterol se estudió con más detalle en el perro y se determinó el perfil metabólico en la orina (Schmid et al., 1986). Los autores concluyeron que la biotransformación del clenbuterol es lenta (en relación con otros β -agonistas), ya que no hay puntos de acceso directo para las enzimas, la monoamino oxidasa y transferasa catecol-O-metilo, o para la conjugación sulfato eficiente. Los principales metabolitos se forman por la oxidación a lo largo de la cadena de lado largo en la posición 1 del anillo, mientras que el resto 2-amino-3,5-dicloro permanece intacta.

El perfil metabólico visto en el ganado es cualitativamente similar a la observada en animales de laboratorio y en seres humanos. El Clenbuterol representa el 60-86% y 22-53% de la radiactividad total en plasma (Schmid, 1987) y orina (Hawkins et al., 1985) respectivamente. Otros metabolitos cuantificados en la orina incluyen N-AB 930 (ca. 3%), N-AB 931 (R-CHO) (2-4%), N-AB 933 (6-40%) y NA1141 (3-34%). (Hawkins et al., 1985; Hawkins et al., 1993).

La diferencia en el proceso de glucuronidación entre microsomas de hígado humano y el perro es dramática: la cantidad de metabolitos de glucurónidos fue 30 veces más grande con el perro comparado con el humano. Esto es de cierto interés, porque los perros a menudo se utilizan en pruebas toxicológicas de medicamentos que están destinados a los seres humanos. Las diferencias entre especies en el metabolismo se deben considerar en el diseño de experimentos toxicológicos, y también en la práctica de la medicina veterinaria, donde se utiliza el clenbuterol como broncodilatador (Alonen et al., 2009)

2.2.3. Biotransformación

El clenbuterol constituye un miembro de las denominadas fenetanolaminas, medicamentos que, como grupo, requieren la presencia de un anillo aromático con un grupo hidroxilo en la posición β del grupo alifático para mostrar actividad. Cuando los O-H son sustituidos por un halógeno como en el caso del clenbuterol (cloro), se evita la biotransformación por las enzimas COMT a nivel tisular y se hace lenta la biotransformación hepática.

Al mismo tiempo, la presencia del cloro en el clenbuterol lo hace más liposoluble que sus análogos y, por ende, tiende a difundir más profundamente en los tejidos y la grasa animal (Sumano, 2002).

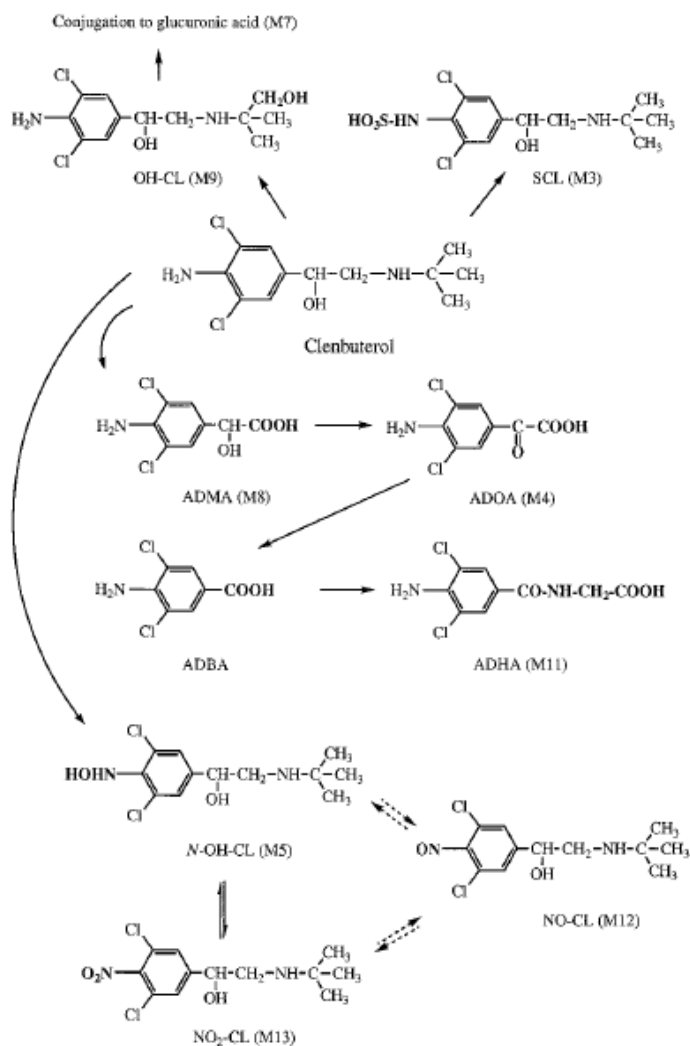


Figura 1. Perfil metabólico de Clenbuterol en ratas.

La biotransformación del clenbuterol difiere entre especies, por lo que se han identificado diferentes metabolitos, sin embargo, el principal componente identificado en estas especies ha sido el clenbuterol no metabolizado, seguido de los óxidos y conjugados con otras estructuras (Heitzman, 1996; Soma et al., 2004).

(Zalko et al.,1997) sugieren que el clenbuterol n-hidroxiarilamina y n-nitroso, encontrados en la orina de ratas, son inestables y podrían transformarse de nuevo en clenbuterol bajo ciertas condiciones (Figura 1). No obstante (Smith, 1998) menciona que los conjugados de ácidos glucorónicos pueden ser susceptibles a la hidrólisis (ya sea enzimática o ácida) y que la reabsorción del componente inicial podría ocurrir subsecuente a la hidrólisis en el intestino, en consecuencia si los conjugados de clenbuterol presentes en tejidos comestibles están sujetos a la circulación enterohepática, entonces los análisis que miden el clenbuterol, no toman en consideración los metabolitos podrían tener una estimación equivocada del potencial toxicológico del compuesto en el tejido contaminado (Fernandez, 2012).

En un estudio, se evaluó la posibilidad de que el clenbuterol podría someterse a una transformación biológica, en presencia de nitritos salivales, a pH gástrico (<3). Para ello se extrajeron muestras salivales de seres humanos antes y después de la comida, lo que representa el diferente contenido de nitrito fisiológica (40 y 400 μmolL^{-1}).

En condiciones pre-comida, un compuesto 4-nitro mono fue identificado como metabolito principal, mientras que bajo condición después de la comida un segundo metabolito, mostro una completa de-cloración, junto con la probable presencia de tres grupos nitro en el anillo aromático (Gianfranco et al., 2007).

En la figura 2 se observan los espectros de masas del clenbuterol y de los productos M1 y M2 con su estructura química propuesta de los metabolitos identificados en presencia de nitritos salivales, a pH gástrico. Asimismo, en la figura 2 se observa una posible vía bioquímica que conduce a la formación gástrico *ex vivo* de los compuestos M2 y M1.

Estos resultados preliminares podrían constituir un indicador para profundizar en la evaluación de algunos residuos de medicamentos veterinarios en productos comestibles de gran demanda, donde la nitración de las reacciones digestivas no puede ser excluida. En el caso del clenbuterol, la implicación de los radicales libres relacionados con el nitrógeno, al menos en la formación del compuesto M2, podría conducir a la formación de los residuos fijos de posible relevancia farmacológica y toxicológica (Gianfranco et al., 2007).

En un estudio en ratas se realizó la identificación y confirmación de clenbuterol por LC-TOF-MS (Domínguez-Romero et al., 2013). Se identificaron cinco metabolitos urinarios de clenbuterol tabla 5, estos incluyen la conjugación con sulfato (CL-M1) y ácido glucurónico (CL-M3), la hidroxilación de clenbuterol (CL-M2), la escisión oxidativa de la cadena lateral (CL-M4), y la oxidación del grupo amina en el anillo aromático (CL-M5).

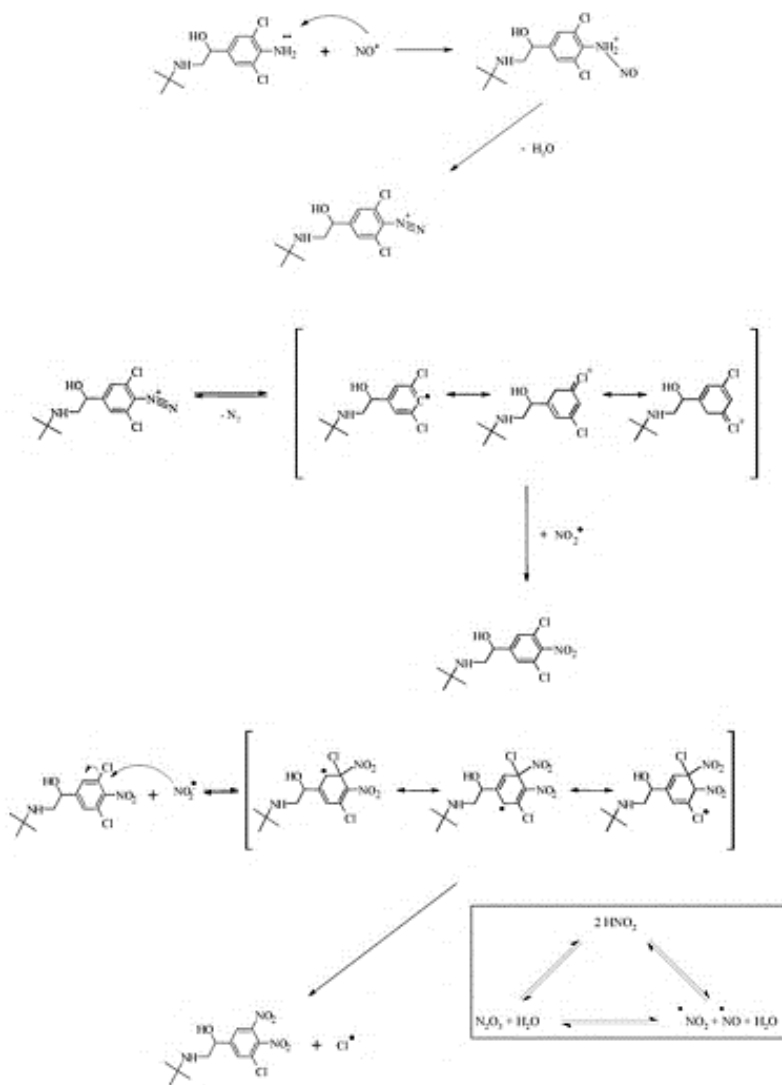


Figura 2. Vía bioquímica propuesta que conduce a la formación gástrico ex vivo de los compuestos M2 y M1 y: En el cuadro cuadrado, posibles radicales libres relacionados con el nitrógeno implicado en la reacción. (Gianfranco et al., 2007)

De acuerdo con las intensidades relativas de los metabolitos detectados, el metabolito más abundante es CL-M2 (hidroxilamina-clenbuterol) seguido por CL-M1 (Sulfato conjugado). Los

metabolitos detectados no eran particularmente relevantes en términos de relación intensidad en comparación con la intensidad del clenbuterol, estos se observan en la figura 3. Estos tres metabolitos fueron detectados en la orina después de 48 h (Domínguez-Romero et al., 2013).

Tabla 5. Metabolitos en orina de rata de clenbuterol, utilizando cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas de tiempo de vuelo (Domínguez-Romero et al., 2013).

Metabolito	Tiempo de retención (min)	Experimental m/z	Teórica m/z	Fórmula propuesta (M)
Clenbuterol	8.14	277.0874	277.0869	C ₁₂ H ₁₈ Cl ₂ N ₂ O
CL-M1	2.26	357.0436	357.0437	C ₁₂ H ₁₈ Cl ₂ N ₂ O ₄ S
CL-M2	3.76	293.0817	293.0818	C ₁₂ H ₁₈ Cl ₂ N ₂ O ₂
CL-M3	7.75	453.1184	453.1190	C ₁₈ H ₂₆ Cl ₂ N ₂ O ₇
CL-M4	8.84	262.9983	262.9985	C ₉ H ₈ Cl ₂ N ₂ O ₃
CL-M5	9.64	307.0612	307.0611	C ₁₂ H ₁₆ Cl ₂ N ₂ O ₃

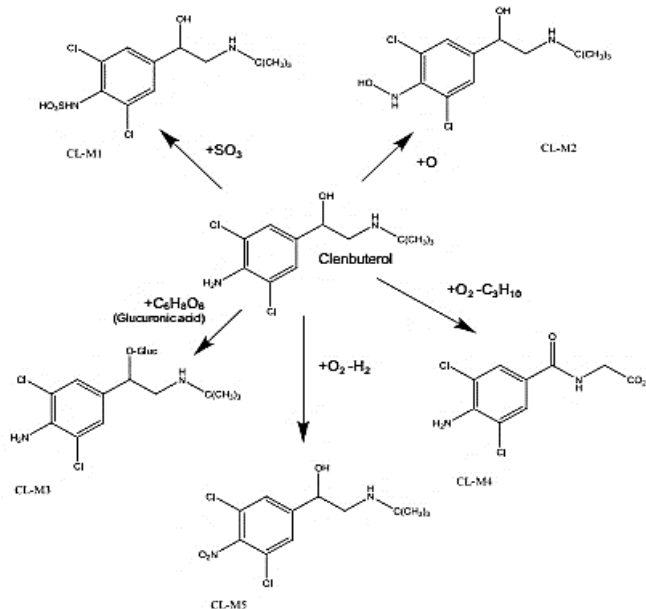


Figura 3. Propuesta de estructuras de metabolitos identificados en orina de rata.

2.2.4. Excreción

El clenbuterol se elimina fundamentalmente por orina (30%). Su semivida de eliminación es de 25-35 h. En la tabla 6 y 7 se observan los tiempos de eliminación de clenbuterol en diferentes especies.

Tabla 6. Excreción de Clembuterol en diferentes especies (Sumano et al., 2004).

<i>Clembuterol</i>						
<i>Especie</i>	<i>Dosis</i>	<i>Vía</i>	<i>Tiempo (h)</i>	<i>Excreción (h)</i>	<i>% de absorción</i>	<i>Referencia</i>
Bovino	3 mg/Kg	Oral	48	Orina	76	Smith y Poulson
Perro	2.5 mg/Kg	Oral	72	Orina	74	(Dänicke, 2002; V.A., 1976; V.A., 1976)
Humano	20 µg	Oral	96	Orina	80	(Dänicke, 2002; V.A., 1976; V.A., 1976)
Conejo	2.5 mg/Kg	Oral	96	Orina	92	(Dänicke, 2002; V.A., 1976; V.A., 1976)
Rata	2.0 mg/Kg	Oral	72	Heces	19	(Kopitar VZ, 1976)
Rata	2.0 mg/Kg	Oral	72	Orina	67	(Kopitar VZ, 1976)

Cuando la excreción se produce exclusivamente por un proceso pasivo, como puede ser por filtración glomerular, la única diferencia entre la excreción de uno y otro enantiómero es la que se deriva de la fracción que circula libre, ya que la filtración no discrimina entre enantiómeros. No es así cuando la excreción se produce por mecanismos más específicos, como puede ser el transporte activo, en cuyo caso el aclaramiento renal es estereoselectivo.

Tabla 7. Excreción de ¹⁴C-Clembuterol después de administrar por vía oral

<i>Especie</i>	<i>Período de tiempo después de la dosis (h)</i>	<i>% Dosis en orina</i>	<i>% Dosis en heces</i>	<i>Referencia</i>
Rata	0-72	62.5	20.8	(Z., 1970)
Conejo	0-72	88.5	8.9	(Zimmer, 1971)
	0-96	92	0.2-5	(Zimmer, n.d.-b)
Perro	0-96	85-87	3.5-9	(Zimmer, n.d.-a)
	0-96	74	3.7	(Zimmer, n.d.-b)
Caballo	0-336	75-91	6-15	(Johnston, A.M., Dunsire, 1993)
Mandril	0-120	62*	16	(Johnston, A.M., Jenner, 1976)

*Incluye lavados jaula, pero no escombros en jaula.

2.2.5. Comportamiento farmacocinético de los enantiómeros de Clembuterol

Muchos fármacos todavía se formulan como mezclas racémicas, aunque los enantiómeros pueden diferir en su farmacocinética y sus propiedades farmacodinámicas. Recientemente, la histamina antagonista H1 levocetirizina y la eszopiclona inductor del sueño han sido aprobado por la FDA para su uso como ópticamente activo (Smith, 2014).

En un estudio se examinó la enantioselectividad después de la administración del racemato de clembuterol en ratas. Las concentraciones de los enantiómeros de clembuterol en plasma, orina y bilis se determinaron mediante un ensayo de LC-MS/MS con una columna Chirobiotic T. Los perfiles farmacocinéticos de los enantiómeros de clembuterol después de la administración

intravenosa y intraduodenal de clenbuterol racemato (2 mg/kg) en ratas fueron significativamente diferentes.

El volumen de distribución de R-(-) -clenbuterol (9,17 L/ kg) fue significativamente mayor que S-(+) clenbuterol (4,14 L/kg). El aclaramiento total de R-(-) clenbuterol (13.5 mL/min/kg) fue significativamente mayor que S-(+) enantiómero (11,5 mL/min/kg). Un estudio de absorción in situ en asas yeyunales no mostró ninguna diferencia en la cantidad residual entre el R- (-) y S- (+) enantiómeros.

La eliminación urinaria fue la misma para los dos enantiómeros, pero la excreción biliar de R-(-) clenbuterol fue mayor que S-(+) enantiómero. Las fracciones de libre (no-protein-bound) R-(-) y S-(+) clenbuterol en plasma de rata fueron 48.8% y 33.1%, respectivamente. Estos resultados indican que hay diferencias en la distribución y excreción de los enantiómeros del clenbuterol, y esto puede ser predominantemente debido a la proteína enantioselectiva vinculante (Ahmad, 2007).

En este estudio, se encontró que V_{dss} , Cl_{tot} y MRT fueron significativamente diferentes (2.2 veces, 1.2 veces y 1.9 veces, respectivamente) para los dos enantiómeros de clenbuterol en ratas. También hubo una diferencia en la proteína de unión entre los enantiómeros (1.5 veces). Estos resultados se observan en las tablas 8 y 9.

La proteína de unión enantioselectiva de clenbuterol podría explicar la enantioselectividad de sistema de aclareamiento, pero no fue suficiente para explicar la diferencia en V_{dss} de los enantiómeros. Dado que eliminación biliar de clenbuterol y la rápida absorción después la administración intraduodenal, la existencia de circulación enterohepática parece probable.

Muy recientemente, la enantioselectividad en unión a proteínas séricas de un β_1 -bloqueantes con β_3 propiedad agonista, nebivolol, se ha informado por (Sanaee et al., 2013)

Tabla 8. Parámetros farmacocinéticos de los enantiómeros de clenbuterol después de ser administrado por I.V. y I.D. de 2 mg/kg (rac) Clenbuterol a ratas

	(R-(-) Clenbuterol	S -(+) Clenbuterol
I.V.		
AUC _{0→∞} (µg/mL h)	1.25±0.18	1.51±0.35
MRT (h)	11.2±2.0	6.0±0.7*
t _{1/2} (h)	19.1±5.5	14.1±5.1*
CL _{tot} (mL/min/kg)	13.5±1.8	11.5±2.7*
Vd _{ss} (L/kg)	9.17±2.76	4.14±1.00*
I.D.		
AUC _{0→∞} (µg/mL h)	1.15±0.42	1.52±0.46*
MRT (h)	11.1±2.1	7.1±0.7*
t _{1/2} (h)	12.9±4.9	5.4±1.0*
F (%)	92.0±3.6	101.0±30.2
CL _{tot} (mL/min/kg)	15.6±0.8	11.7±3.5*
Vd _{ss} (L/kg)	10.3±2.9	5.0±1.5*

Análisis de clenbuterol en plasma después de una administración

I.V. administración de (rac) clenbuterol (2 mg/kg) a ratas (298±27 g, n=4)

I.D. administración de (rac) clenbuterol (2 mg/kg) a ratas (235±29 g, n=5)

*Diferencia significativa entre (-)-R-Clenbuterol y (+) -S-Clenbuterol a p<0.05; student t-test.

AUC_{0→∞}, área bajo la curva de cero a infinito; MRT, Tiempo medio de residencia; t_{1/2}, tiempo de vida media; CL_{tot}, Aclaramiento total; Vd_{ss}, volumen de distribución.

Tabla 9. Concentración promedio de clenbuterol en tejidos (Kp) de R-(-) Clenbuterol y S-(+) Clenbuterol después de 36 h de administrar por vía intravenosa el (rac) clenbuterol.

Tejido	R-(-)Clenbuterol	S -(+) Clenbuterol
	Kp(Kp,f)	Kp(Kp,f)
Pulmón	2.63±1.04 (5.01±1.97)	9.75±4.69* (28.7±13.8*)
Hígado	5.28±2.19 (10.0±4.2)	24.9±5.8* (73.1±17.1*)
Riñón	1.99±0.65 (3.79±1.24)	11.8±3.0* (34.8±8.9*)
Músculo	0.58±0.28 (1.10±0.54)	1.91±0.60*(5.61±1.75*)

(rac) clenbuterol (2 mg/kg) después de administrar por vía intravenosa a ratas. Después de 36 h las ratas fueron decapitadas. Se determinó el contenido en plasma y tejidos de R-(-)Clenbuterol y S-(+)Clenbuterol.

El tratamiento con clenbuterol mejora la capacidad funcional muscular, mediante el aumento de la fuerza muscular. Sin embargo, datos obtenidos indican que R-(-) clenbuterol es responsable del aumento de la fuerza muscular, mientras que S-(+) clenbuterol reduce la densidad ósea. Debido a que el aclaramiento de S-(+) es más pequeño, y su distribución tisular es más grande que la de R-(-)clenbuterol, los efectos adversos de S-(+)clenbuterol no puede ser ignorados. Por lo tanto, sería preferible que los productos farmacéuticos sólo contengan R-(-) clenbuterol (Ahmad, 2007).

En la tabla 10 se muestra la composición estereoquímica de clenbuterol en tejidos de cerdos alimentados con 1 ppm de clenbuterol HCl durante 7 días consecutivos y sacrificados con

períodos de abstinencia de 0, 3 o 7 días (Smith, 2000). El estereoisómero S-(+)-Clembuterol fue el predominante en el hígado, pulmón, riñón y músculo esquelético en cada tiempo de espera. El grado en que el estereoisómero S-(+) superó el estereoisómero R-(-) varió en relación al tiempo de retiro. Sin embargo la composición de los estereoisómeros de clembuterol para todos los tejidos en los días 3 y 7 fue constante (Smith, 2000).

Tabla 10. Composición estereoquímica (Media \pm SD) de Estereoisómeros de Clembuterol en tejidos de cerdos, después de administrar HCl Clembuterol durante 7 días consecutivos y sacrificados con los plazos de espera de 0, 3, 7 o días de retiro^a. (Smith, 2000)

Tiempo de retiro (Días)	Tejido	Sexo	Racemato de clembuterol ^b (ppb)	S-(+)	R-(-)	S-(+), ppb	R-(-), ppb
0	Hígado	Macho	122.4 \pm 25.9	68.2 \pm 2.3	31.8 \pm 2.3	83.7 \pm 19.3	38.8 \pm 8.5
		Hembra	115.1 \pm 38.4	68.3 \pm 1.9	31.8 \pm 1.9	78.9 \pm 34.5	36.2 \pm 14.0
	Riñón	Macho	77.4 \pm 14.5	56.6 \pm 1.2	43.4 \pm 1.2	43.9 \pm 8.3	33.5 \pm 5.0
		Hembra	64.8 \pm 3.0	58.1 \pm 0.2	41.9 \pm 0.2	37.7 \pm 2.5	27.2 \pm 1.7
	Pulmón	Macho	186.8 \pm 39.1	56.2 \pm 1.5	43.8 \pm 1.4	105.3 \pm 31.9	81.3 \pm 22.0
		Hembra	186.1 \pm 30.6	56.4 \pm 0.3	43.7 \pm 0.3	104.8 \pm 19.2	81.3 \pm 16.0
Músculo esquelético	Macho	20.5 \pm 3.6	55.2 \pm 2.0	44.8 \pm 2.0	11.4 \pm 2.2	9.2 \pm 1.2	
	Hembra	19.4 \pm 1.1	54.6 \pm 0.5	45.4 \pm 0.5	10.6 \pm 0.7	8.8 \pm 0.6	
3	Hígado	Macho	12.9 \pm 3.9	83.5 \pm 3.0	16.5 \pm 3.0	10.8 \pm 3.3	2.1 \pm 0.3
		Hembra	14.4 \pm 1.3	83.2 \pm 2.7	16.9 \pm 2.8	12.0 \pm 1.4	2.4 \pm 0.2
	Riñón	Macho	3.3 \pm 1.1	83.7 \pm 1.3	16.3 \pm 1.3	2.8 \pm 0.8	0.5 \pm 0.2
		Hembra	3.2 \pm 0.9	81.7 \pm 4.4	18.3 \pm 4.3	2.7 \pm 0.6	0.6 \pm 0.1
	Pulmón	Macho	8.9 \pm 5.6	84.2 \pm 1.5	15.8 \pm 1.5	7.5 \pm 4.3	1.4 \pm 0.7
		Hembra	8.9 \pm 1.4	82.7 \pm 6.3	17.4 \pm 6.2	7.2 \pm 1.5	1.5 \pm 0.3
Hígado	Macho	2.5 \pm 0.8	74.6 \pm 2.1	25.5 \pm 2.1	1.8 \pm 0.2	0.6 \pm 0.2	
	Hembra	2.1 \pm 0.4	71.7 \pm 2.7	28.3 \pm 2.7	1.5 \pm 0.3	0.6 \pm 0.1	
7	Riñón	Macho	0.4 \pm 0.1	Nt ^c	Nt	Nt	Nt
		Hembra	0.3 \pm 0.02	Nt	Nt	Nt	Nt
	Pulmón	Macho	1.5 \pm 0.5	77.6 \pm 2.3	22.5 \pm 2.3	1.0 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1
		Hembra	1.0 \pm 0.4	74.7 \pm 0.5	25.3 \pm 0.5	0.7 \pm 0.2	0.3 \pm 0.1

^a Valores promedio de tres animales dentro de cada período de sexo y tiempo de retiro. ^b Datos de Smith (2000). ^c No se ha probado.

II. III. TEORÍAS QUE EXPLICAN EL COMPORTAMIENTO DE CLEMBUTEROL

- Existen diferencias evidentes en la farmacocinética y farmacodinamia entre los enantiómeros del clembuterol (Morgan, 1990). En esto caso, los futuros estudios sobre la influencia de la quiralidad en las propiedades farmacológicas y farmacocinéticas del clembuterol serían de ayuda para dilucidar dichos mecanismos (G Brambilla et al., 2000). Los enantiómeros pueden presentar entre ellos diferencias en su comportamiento farmacocinético, en el ámbito de absorción, distribución, metabolismo y excreción.

2. Existe información de la farmacocinética y la farmacodinamia de clenbuterol como fármaco original, sin embargo se desconoce este proceso tras consumir clenbuterol en la carne. Por ejemplo, la biodisponibilidad y los efectos biológicos de las sustancias endógenas (por ejemplo, hormonas) sufre profundas diferencias, dependiendo de la forma farmacéutica en la que se consumen, es decir, si se consumen como fármaco o como residuos en los alimentos (Palazzesi et al., 1995).
3. A dosis más altas que pueden haber sido ingeridos por algunos pacientes (hasta 300 mg) clenbuterol, convirtieron su cinética en no lineal debido a la saturación de las vías de biotransformación. Esto llevaría a un aumento de la excreción urinaria, pero sin cambios en la vía en la que fue consumido el clenbuterol.

II.IV. EFECTOS SECUNDARIOS DEL CLENBUTEROL

Un descubrimiento aún más impactante de la utilización ilegal de clenbuterol en el ganado es que los fármacos β - agonistas podría dar lugar a un aumento significativo de los parámetros de la coagulación, que a su vez sugieren interferencia en el proceso de coagulación. Por lo tanto, el ganado tratado con Clenbuterol tiene un mayor riesgo de hemorragias en desarrollo durante el trauma.(Animal Agriculture's, 2005; Wood et al., 2010).

(Kitaura et al.,2002) reportó que el clenbuterol inhibe el crecimiento longitudinal del hueso, así como el contenido mineral óseo (BMC) y el área en ratas macho jóvenes. Los autores especularon que la reducción mediada por clenbuterol en el crecimiento óseo puede ser debido al cierre epifisario más rápido o acelerada calcificación de la epífisis.

El clenbuterol no tuvo efecto sobre la osteocalcina, pero aumentó la desoxipiridinolina urinaria. El clenbuterol disminuye la densidad mineral ósea y aumenta la resorción ósea independiente del nivel de ejercicio al que sea sometido el sujeto (Cavalié et al., 2002).

Es importante señalar que solamente en el caso del clenbuterol se han documentado los siguientes efectos derivados de la ingesta del fármaco incluido en productos de origen animal: adormecimiento de las manos, temblores musculares, nerviosismo, dolor de cabeza y dolores

musculares y estrés oxidativo. Se documenta también en forma transitoria elevación del K sérico, hipoglucemia y acidosis láctica. La duración media del cuadro es de 40 horas (Garzón et al., 2016).

Únicamente representa un peligro para la salud pública en términos de la estimulación cardiovascular que se deriva de la ingestión de productos cárnicos provenientes de animales tratados con clenbuterol y en los que no se observó un retiro de rastro de cuatro semanas (Sumano et al., 2002).

II.IV.I. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo ha sido clásicamente definido como el desequilibrio entre los mecanismos fisiológicos responsables de la producción y la neutralización de compuestos reactivos capaces de causar un daño molecular oxidativo (Fernández, 2009). Más recientemente Jones (DP., 2006) definió el estrés oxidativo como “el desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes, en favor de los primeros, que conduce a una ruptura del control y señalización fisiológica que normalmente ejerce el sistema redox, conduciendo a un daño molecular”.

Además, las características del propio ejercicio (por ejemplo la intensidad, la duración, el tipo de contracción muscular), así como las condiciones ambientales en las que se entrena (dieta, temperatura, presión de oxígeno, etc.) podrían potenciar la actividad de estas fuentes de generación de ROS y determinar un fallo o insuficiencia de los mecanismos capaces de contrarrestar su formación, conduciendo a un daño molecular y estrés oxidativo (Fernández, 2009).

El tipo de ejercicio físico, con mayor o menor componente de contracción excéntrica capaz de dañar el músculo (Michalis & Athanasios, 2008), así como la intensidad y duración del esfuerzo y el grado de entrenamiento de los sujetos son las principales variables que determinan la sobreproducción de ROS en individuos sanos y enfermos sometidos a protocolos agudos de esfuerzo (Bloomer, 2008).

Tras una sesión aguda de ejercicio físico capaz de provocar estrés oxidativo se observan diferentes respuestas en los marcadores de daño molecular y de defensa antioxidante, analizadas tanto en muestras de sangre como en tejidos.

En cualquier caso, parece haber suficiente evidencia para sostener que los ejercicios anaeróbicos podrían en ciertas circunstancias provocar un mayor daño oxidativo de los lípidos que los ejercicios aeróbicos.(HM et al., 2000; Marzatico et al.,1997).

II.IV. II. Isoprostanos

En los estudios realizados por Morrow y otros se demostró que una novedosa familia de isómeros tipo prostaglandinas se formaron como resultado de la oxidación por radicales libres sobre el ácido araquidónico esterificado a fosfolípidos en las membranas celulares, llamado isoprostanos (Morrow et al., 1990).

Los isoprostanos se producen *in vivo* principalmente por la peroxidación inducida por radicales libres de ácido araquidónico esterificado en la posición sn-2 de los fosfolípidos. Después de su formación, los isoprostanos son liberados de la membrana de fosfolípidos por la acción de fosfolipasas y se excretan en la orina donde son muy estables y pueden ser medidos de forma no invasiva (Comporti et al., 2008).

La determinación de F2-IsoPs puede proporcionar un marcador fiable de la peroxidación de lípidos *in vivo*. En primer lugar, son compuestos estables y específicos de la peroxidación lipídica inducida por los radicales libres. El nivel de un abundante estereoisómero Isop, 15-F2T-Isop, en la sangre o en la orina es ampliamente considerado como el marcador " estándar de oro "para la evaluación del estrés oxidativo (Rao et al., 2010).

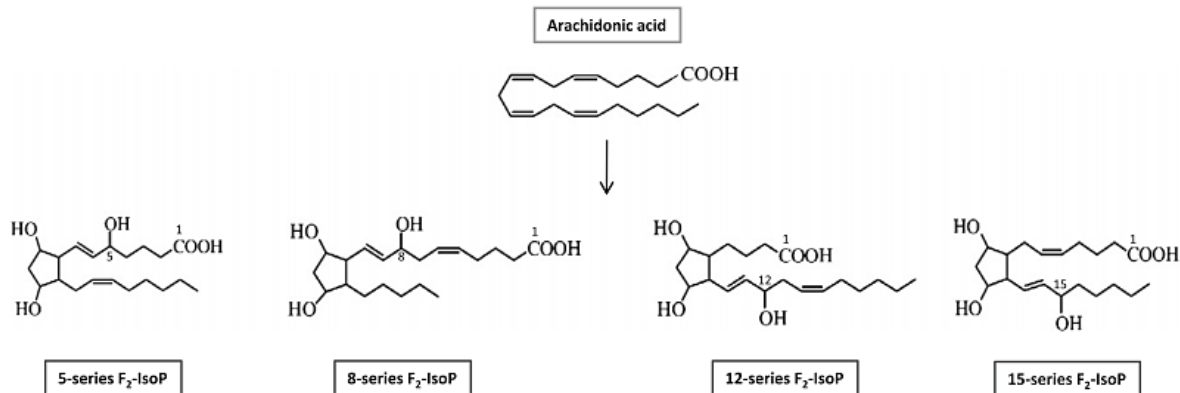


Figura 4. Estructura química del ácido araquidónico y el regio isomero 4 F2-Isop

Este proceso es resultado de un pentadienilo deslocalizado radical de carbono-centrados. Posteriormente, se inserta una molécula de oxígeno y se forma un radical peroxilo. Estos radicales peroxilo sufren más ciclaciones, seguidas por la adición de otra molécula de oxígeno para producir bicíclico moléculas endoperóxido (Milne, Yin, & Morrow, 2008). Los intermedios que se reducen a F2-Isop o reordenan para formar E2- prostaglandina y D2-regioisómero. Cuatro regioisómeros F2-Isop diferentes (5, 8, 12 y 15 de la serie regioisómeros - dependiendo en el átomo de carbono al que el hidroxilo alílico se adjunta) pueden ser generados, cada uno de los regioisómeros teóricamente compuesta de 8 diastereómeros racémicos (es decir, 16 estereoisómeros;) (Figura 4). El más estudiado de la Isop es una de la serie 15 Isop llama "15 - F2t-Isop "(debido esencialmente a su comercial generalizado disponibilidad). Considerando que existen teóricamente 3 Isop clases (es decir, F2-Isop, D2-Isop y E2-Isop; cada clase comprende 4 series y cada serie comprende 16 estereoisómeros, que suma en total $3 \times 4 \times 16 = 192$ isómeros.

II.IV.II.I. Niveles de isoprostanos después de hacer ejercicio

Tanto la práctica de actividad física aguda como la práctica regular influyen sobre la producción de radicales libres, la actividad de los sistemas antioxidantes y modifican la susceptibilidad de las LDL a la oxidación (Arquer et al., 2010).

La vida media de los radicales libres es muy corta, y por lo tanto su cuantificación directa no es posible, por este motivo se utilizan marcadores indirectos de sus efectos.

Durante la práctica de una actividad física se produce un aumento del consumo de oxígeno que se traduce en una mayor formación de radicales libres. Este aumento puede ser tan importante que sobrepase la acción de los sistemas antioxidantes, produciéndose un aumento de los procesos de oxidación, entre ellos de la oxidación lipídica (Davies et al., 1982).

Otro dato que se desprende de estudios anteriores es que en animales o personas entrenadas el aumento observado es menor que en las sedentarias (Kanter et al., 1993; Viinika et al., 1984) sugiriendo la existencia de un efecto protector de la práctica regular de actividad física.

Una cuestión clave en el análisis de Isop es determinar qué Isop se debe medir, entre los 192 Isop diferente que podría generarse a partir del ácido araquidónico. Otros isómeros F2-ISOP, tales como 5-F2T-ISOP y 5-F2c- ISOP, son aproximadamente 4-20 veces más abundantes en la orina de 15-F2T-ISOP (Lawson et al., 1998; Li et al., 1999). También es posible que la determinación de más de un isómero puede proporcionar una visión más integrada de la peroxidación lipídica.

A juzgar por los estudios que midieron los niveles de F2-Isop inmediatamente después del ejercicio y al menos una hora después (es decir, 1 h - 5 días) parece que los niveles de F2-ISOP vuelven a los valores de referencia en menos de 1 h después del cese del ejercicio.

El efecto del ejercicio agudo sobre los niveles de F2-Isop en plasma es generalmente de corta duración. Esto es apoyado por la corta vida media de 15- F2T-Isop en plasma, que sabe que la vida media en conejos es de 4 minutos (Basu, 1998) y 16 minutos en ratas (Carbon et al., 1992). Sin lugar a duda es necesario obtener datos cinéticos similares para los seres humanos.

El estrés oxidativo puede ocurrir en individuos adaptados o no al ejercicio, lo que los hace susceptibles de presentar daño en sus sistemas enzimáticos, así como en sus lípidos y receptores de membrana, e incluso en su ADN (Leeuwenburgh, 2001; Oostenburg et al., 1997).

Ahora bien, las acciones de los ROS y de los RNS pueden ocurrir al finalizar la sesión de ejercicio u horas después. La información disponible asocia el ejercicio con la producción de ROS y RNS, a través de tres evidencias relacionadas entre sí:

1. La producción de radicales libres en músculo, hígado, corazón y sangre.

2. El aumento en los biomarcadores de daño oxidativo, como carbonilos proteicos y sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (Sen et al., 1997), así como elevación en los niveles de pentano exhalado, lo que es un posible producto del daño oxidativo de los lípidos (Dillard et al., 1978).

3. La disminución en los niveles de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos de corazón, sangre (Viguie et al., 1993), cerebro y músculo.

(Nieman et al., 2004) determinó la respuesta de los niveles de F2-ISO después de una carrera de triatlón una duración aproximada de 12 h, la recolección de muestras de orina se realizó poco después del ejercicio en un intervalo de 12 a 24 h después de la carrera. Los niveles de F2-Isop aumentaron en un 89% a los 5-10 minutos después de la carrera y en un 107% a 1,5 h post-carrera. Al parecer, no hubo tiempo suficiente para que los ISOP se acumularan en la orina durante las 12 h de la carrera.

Por el contrario, (McAnulty et al., 2007) reportaron una tendencia de aumento de los niveles de F2-Isop en el plasma pero sin cambios en la orina recogida 5- 15 minutos después de realizar un ultramaratón de 160 km de aproximadamente 26 h.

Sin duda, se necesita más investigación para confirmar si el ejercicio agudo es capaz de aumentar los niveles de F2- Isop en la orina.

La concentración de ácido araquidónico en los lípidos totales en plasma es de aproximadamente 90 µg/mL mientras que la concentración libre de F2-ISOP en plasma es de aproximadamente 0,08 ng/mL (Seet et al., 2010).

II.V. INTERACCIÓN DE CLEMBUTEROL Y EJERCICIO

En un estudio se administró 1,6 mg/kg de peso corporal (BW) de clenbuterol a ratas y se mantuvo en actividad física en una cinta de correr durante 8 semanas, sin embargo los resultados no fueron significativamente diferentes de un grupo de ratas a las que sólo se les administró clenbuterol (Ingalls et al., 1996; Kearns et al., 2009). Aunque la proteína BW y el músculo aumento significativamente en los grupos de tratamiento en comparación con los controles de clenbuterol y con el grupo que sólo realizó actividad física, no hubo diferencias en la cantidad de proteína total o proteína miofibrilar cuando se expresaron los datos por gramo de peso muscular.

II.V.I. Dopaje de Clembuterol y estrés oxidativo en caballos

En mayo del 2011 dos caballos de carreras que obtuvieron el primero y segundo lugar en la competencia mexicana de hípica Handicap de las Américas, dieron positivo en una prueba antidoping de clembuterol.

Del mismo modo que en humanos, se han suscitado problemas de uso indiscriminado de clembuterol con fines de dopaje en caballos de deporte con la finalidad de aumentar el rendimiento pulmonar, al igual que en los humanos el estrés oxidativo es uno de los efectos secundarios por la ingesta de clembuterol.

En los caballos, el estrés oxidativo pulmonar se produce en la inflamación de las vías respiratorias inferiores (Mills et al., 1996) . El estrés oxidativo sistémico ha demostrado ser aumentado por el ejercicio y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). En un estudio se determinaron los niveles de isoprostanos después de administrar clembuterol a caballos y basándose en los resultados se estableció que los isoprostanos parecen ser liberados y metabolizados rápidamente en el pulmón, 1 h después del ejercicio se encuentra niveles mayores de estos, contrariamente a las observaciones en el plasma (Kirschvink et al., 1999).

El grado de integración metabólica va a depender del tipo de ejercicio al que está sometido el animal. Los caballos que corren distancias no superiores a los 1000 metros utilizan un 60 % de energía producida anaeróbicamente y un 40 % producida en forma aeróbica, mientras que, a medida que la distancia aumenta (como en las carreras clásicas con distancias superiores a los 1.600 metros), aproximadamente el 80 % de la energía utilizada es generada por la vía aeróbica y solo un 20 % proviene del metabolismo anaeróbico.

Estos porcentajes indican que en ejercicios de máxima intensidad la fibra muscular puede tardar hasta un minuto en alcanzar la máxima producción de energía por la vía aeróbica. Para caballos que compiten en carreras de enduro, donde se corren distancias de hasta 160 kilómetros en un día a una velocidad que promedia generalmente los 16-18 Km/h, dependiendo de la superficie del terreno, la energía utilizada es generada aeróbicamente en un porcentaje superior al 94 %. En otras palabras, puede decirse que los ejercicios que no generan una frecuencia cardiaca superior a los 150 o 160 latidos por minuto, usan la vía aeróbica como generadora de energía. Esto se debe a

que la vía oxidativa puede generar energía suficiente por unidad de tiempo como para satisfacer esa demanda energética de la fibra muscular (Mart, 2008).

II.VI. ESTABILIDAD DE LOS RESIDUOS DE CLEMBUTEROL EN CARNE, ORINA E HÍGADO.

El efecto de la cocción sobre la estabilidad térmica de clenbuterol fue investigado (Rose, M.D., Shearer, G., 1995). El clenbuterol fue estable en agua hirviendo a 100 °C. En aceite de cocina a 260 °C se observaron pérdidas, lo que indica una vida media de aproximadamente 5 min. Se estudió el efecto de una serie de procesos de cocción (ebullición, tostado, freír, microondas) sobre residuos de clenbuterol en tejidos fortificados. No se observó ningún cambio neto en la cantidad de clenbuterol en cualquiera de los procesos de cocción investigados a excepción de freír usando condiciones extremas. Los resultados de esta investigación muestran que los datos obtenidos de las mediciones sobre el tejido crudo son aplicables para su uso en las estimaciones de exposición de los consumidores y los cálculos de la ingestión dietética.

En otro estudio se evaluó la estabilidad del clenbuterol en muestras de (hígado y orina de bovino) en 4, -20 y -60 °C en función del tiempo. El análisis de clenbuterol en función del tiempo fue realizado por cromatografía-espectrometría de masas de gases (GC-MS) con un seguimiento de iones seleccionados (SIM). El Clenbuterol en muestras de orina e hígado fue estable hasta 20 semanas a -20°C y -60 °C después de ser sometido al proceso de congelación y descongelación por 6 veces. A 4 °C el clenbuterol es estable por lo menos hasta 12 semanas en la orina y hasta 20 semanas en el hígado (Pinheiro et al., 2009).

III. JUSTIFICACIÓN

El clenbuterol es considerado como peligroso para el humano en su ingesta a través del consumo de carne de bovino o cerdo que ha fortalecido su masa muscular con ese producto, su uso es ilegal y reprobable. Si bien, los datos analíticos pueden demostrar de forma inequívoca la administración ilegal de clenbuterol en el ganado doméstico (es decir, lo que demuestra que el fármaco se proporcionó a los animales destinados al consumo humano), un resultado analítico adverso por clenbuterol en una muestra de control de dopaje representa un problema complejo, ya que podría resultar del mal uso deliberado de clenbuterol (con el objetivo de potenciación ilícita del rendimiento) o la posible ingestión de alimentos contaminados (Parr et al., 2008; Geyer et al., 2008). La prueba de dopaje actual se limita a medir la cantidad de clenbuterol en la orina sin establecer la fuente de esta.

El estudio de la relación enantiomérica y la recolección de matrices alternativas tales como plasma y marcadores de estrés oxidativo, podría representar la información complementaria a la matriz de orina. Por lo tanto, un enfoque de múltiples parámetros usando un tratamiento más sofisticado de datos (por ejemplo, la correlación entre las concentraciones de orina y marcadores de estrés oxidativo), así como el conocimiento profundo de las fases I y II del metabolismo del clenbuterol sería de gran interés para documentar adecuadamente e interpretar cada caso de mal uso en pruebas de dopaje.

IV. HIPÓTESIS

Existe una diferencia significativa en la relación enantiomérica y de marcadores de estrés oxidativo en la ingesta no intencional a través de productos comestibles de origen animal o una con fines de dopaje.

V. OBJETIVO GENERAL

Determinar en un modelo animal si existen diferencias en la proporción enantiomérica y de metabolitos de clenbuterol en orina que permitan discriminar la ingesta no intencional de una con fines de dopaje.

5.1. OBJETIVOS PARTICULARES

- Realizar una investigación documental para conocer las propiedades del principio activo y así establecer las condiciones del tratamiento de muestras biológicas.
- Desarrollar y validar el método analítico para cuantificar clenbuterol en orina de rata mediante cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas. (UPLC-MS/MS).
- Determinar residuos de clenbuterol en productos comestibles de origen animal (carne de res magra, molida, con alto y bajo contenido de grasa) distribuidos en la zona metropolitana de México.
- Definir un diseño experimental para estudiar el impacto de la ingestión de clenbuterol sobre la relación enantiomérica e indicadores metabólicos en orina que permitan discriminar la ingesta no intencional de una con fines de dopaje.
- Desarrollar el método analítico para identificar metabolitos de clenbuterol en orina utilizando Q-TOF/MS.
- Determinar indicadores de estrés oxidativo (8-iso-PGF₂α) y daño celular (GSH, GPT, GPx, GR, LDH, γ-GT) en plasma y tejidos de rata para correlacionar con el tratamiento en los diferentes grupos.

VI. DESARROLLO EXPERIMENTAL

6.1. MATERIALES Y EQUIPOS

6.1.1. Disolventes y reactivos

- Disolventes grado HPLC (J.T. Baker, MA, EE. UU.): Metanol, Acetonitrilo, 2-Propanol
- Ácido Fórmico 88% J.T. Baker
- Formiato de amonio grado reactivo (AF; 99%) de Sigma Aldrich (St. Louis, USA).
- Hidróxido de potasio grado reactivo J.T. Baker (MA, EUA).
- Agua Millie-Q de un sistema Millipore (18.2 MΩcm, Millipore, Billerica, MA, EE. UU.).
- Estándar de racemato de Clenbuterol (95%) se adquirió de Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Alemania).
- Estándar de enantiómeros S-(+) y R-(-) de Clenbuterol se obtuvieron de Toronto Research Chemicals (North York, Canadá).

6.1.2. Sistema cromatográfico para determinación de Enantiómeros de Clenbuterol

Todos los análisis se llevaron a cabo en un sistema ACQUITY UPLC (Waters Corp., Milford, MA, EE. UU.) Acoplado a una fuente de electrospray y un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Xevo (TQ-MS; Waters Corp., Milford, MA, EE. UU.). Los enantiómeros R (-) y S (+) clenbuterol se separaron en una columna AGP Chiralpak (100 mm x 4 mm, 5 μm) a 25 °C. La fase móvil consistió en (A) solución acuosa con AF, 10 mM, pH = 4.5 y (B) ACN en una proporción de 97: 3. La velocidad de flujo fue de 1,0 mL/min, el tiempo total de análisis fue de 6,5 minutos y un volumen de inyección de 30 μl.

El sistema MS se operó en modo de ionización por electrospray positiva (ESI +) utilizando (SRM). Los parámetros de MS se establecieron de la siguiente manera: se utilizó nitrógeno como el gas de desolvatación en un caudal de 1000 L/h y una temperatura de 600 °C, el voltaje del capilar y del cono fueron de 0.5 kV y 24 V, respectivamente.

6.1.3. Sistema cromatográfico para identificación de Metabolitos de Clembuterol

Cada análisis se realizó utilizando un sistema de cromatografía líquida (LC 1260 Infinity II, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.) Que consiste en un desgasificador, una bomba binaria (1260 Infinity, Agilent Technologies) y un inyector automático acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (6470 QQQ-MS, Agilent Technologies). Los metabolitos del clembuterol se separaron en una columna analítica Zorbax XDB-C8 de fase inversa (4,6 mm x 150 mm, tamaño de partícula de 5,0 μm ; Agilent Technologies, CA, EE. UU.) a 25 ° C durante el análisis. El sistema se hizo funcionar con una velocidad de flujo de 1,0 mL/min con disolvente A (ácido fórmico al 0,1%) y disolvente B (acetonitrilo). El gradiente cromatográfico comenzó a B al 10% (0-1 min), a B al 10% (1-5 min) y luego aumentó de B al 10% (5–8 min), mantenido a B al 100% (8–12 min.), y regresó al 10% B (12-15 min) para el reequilibrio del sistema, lo que lleva un tiempo total de ejecución de 15 minutos de tiempo de análisis.

El sistema MS se operó en modo de ionización por electrospray positiva (ESI +) utilizando (SRM). Los parámetros de MS fueron: tensión capilar, 4000 V; temperatura del gas, 250 ° C; flujo de gas de secado, 9 L/min; nebulizador, 40 psi; y voltaje de la boquilla, 0 V. Los parámetros MS-QqQ fueron los siguientes: fragmentador, 116 V; tiempo de permanencia, 20 ms; y voltaje del acelerador celular, 7 V. Las transiciones de cuantificación de m/z se obtuvieron utilizando un software optimizador (Agilent Technologies). estos fueron: Clen-M1, 357.05 \rightarrow 70 m/z ; Clen-M2, 293.08 \rightarrow 90.9 m/z ; Clen-M3, 453.12 \rightarrow 99.9 m/z ; Clen-M4, 263 \rightarrow 119 m/z ; Clen-M5 307.06 \rightarrow 23.1 m/z ; y Clen, 277.09 \rightarrow 202.08 m/z . Además, como carecemos de estándares comerciales, se seleccionó una transición de identificación para cada metabolito con el fin de aumentar la identidad de confianza de los metabolitos. Las muestras se mantuvieron a 4 °C en el inyector automático, el volumen de inyección fue de 20 μL y se analizaron al azar.

6.1.4. Otros equipos y accesorios utilizados.

- Baño de ultrasonido para desgasificación de soluciones, fase móvil y pretratamiento de muestras, marca Elma, modelo Elmasonic S 40 H.
- Micropipeta de volumen variable 5-50 μL Finn timer, marca Lab systems.

- Micropipeta de volumen variable 100-1000 μL , marca Science med.
- Micropipeta de volumen variable 20-200 μl Finnpiquette, modelo 4027, marca Labsystems.
- Microbalanza analítica Mettler Toledo, OH, EUA.

6.2. Localización

El desarrollo del proyecto de investigación se realizó en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria en el Laboratorio 5 de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico (LEDEFAR) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 4. La identificación de metabolitos se realizó en el Centro de Excelencia en Metabolómica y Bioanálisis (CEMPIO), España.

El proyecto está soportado financieramente por: CONACYT-COMECYT (EDOMEX-2011-c02-176190). El título del proyecto COMECYT es: Establecimiento de un centro para estudios de intercambiabilidad de medicamentos de uso veterinario.

6.3. Unidades Experimentales

El modelo animal se realizó con ratas wistar macho y hembra adultas (250-300 g) en la Unidad de Aislamiento Animal del Centro de Investigación Multidisciplinario de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FESC C4).

Los procedimientos y el manejo de los animales siguieron las directrices mexicanas sobre el uso y cuidado de animales para investigación (CICUAE-FESC C15_10) y fueron aprobados por el Comité Institucional de Ética de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

6.4. Tratamiento

Las unidades experimentales se agruparon en 3 grupos experimentales:

- **Grupo medicamento:** se administró por vía oral dos bolos por día que contenían Ventipulmin® durante 7 días.

- **Grupo Carne:** se administró por vía oral dos bolos por día que contenían Carne contaminada con Clembuterol durante 7 días.
- **Grupo Control:** Se administro por vía oral bolos que no contenían Clembuterol.

6.5. Ubicación de la unidad experimental

Cada unidad experimental se pesó y se colocó en una jaula metabólica individual durante 24 horas antes del tratamiento en condiciones estándar de luz y temperatura (a $22 \pm 1^\circ \text{C}$, con un fotoperiodo de luz-oscuridad de 12: 12 h) y se permitió el acceso *ad libitum* a alimentos y agua al grupo control.

6.6. Alimentación

Teniendo en cuenta que, en promedio, una rata come 15-30 g de pellets por día, los animales ($n = 18$) se dividieron en tres grupos; el primer grupo fue alimentado con clembuterol puro proveniente de una forma farmacéutica "grupo de medicamento". El medicamento seleccionado fue Ventipulmin®, este es un broncodilatador común empleado con fines veterinarios (Kearns et al., 2009; Willson, 2009; Wood et al., 2010). Siguiendo diferentes blogs de atletismo y musculación, en los que indican que la administración regular de clembuterol en ciclos tiene forma piramidal durante 1 a 2 semanas (Daubert et al., 2007; Kierzkowska et al., 2005), se administraron 4 dosis de clembuterol. De esta manera, las ratas imitarían un ciclo de dopaje, en el cual un atleta usualmente consume cantidades crecientes de clembuterol para luego disminuir gradualmente. Teniendo en cuenta que un atleta con un peso promedio de 65.2 kg consume 60 μg de clembuterol, se establecieron 0.276 μg de clembuterol como la dosis inicial para una rata con un peso promedio de 300 g (Daubert et al., 2007; Kierzkowska et al., 2005). Asimismo, en promedio, una rata come 15-30 g de gránulos por día, se administraron dos bolos/ día cada uno con un peso de 10 g. El ciclo de dopaje duró 7 días, y las dosis de clembuterol por día fueron: 0.276, 0.414, 0.552, 0.690, 0.552, 0.414 y 0.276 μg .

El segundo grupo fue alimentado con bolos que contenían carne contaminada con clembuterol "grupo de carne". La carne adulterada se obtuvo de diferentes mercados donde se compró y

analizó la carne previamente. El tercer grupo de ratas se alimentó con bolos sin clenbuterol y se usó como "grupo de control".

6.7. Toma de muestra

Las muestras de orina se recogieron cada día utilizando tubos cónicos de 50 mL y luego se transfirieron a tubos de 2 mL. Las muestras se centrifugaron (3500 rpm, 10 minutos, 4 °C) y el sobrenadante se almacenó y se mantuvo a -20 ° C hasta el análisis.

6.8. Elaboración de bolos

Con respecto a los bolos de carne, la carne se cocinó y se secó en una estufa a 40 ° C. La carne seca se pulverizó y se mezcló con el polvo de los pellets pulverizados con los que son alimentados de manera habitual (Laboratory Roent Diet 5001) en una proporción de carne: polvo de 1:3, lo que llevó a una cantidad total de 5 g de carne por día para cada animal. La cantidad de carne por día se estimó en función de los requerimientos de proteínas para ratas (Ribeiro et al., 2010; Tirapegui et al., 2012). Además, las concentraciones enantioméricas de clenbuterol en la carne se determinaron antes y después de ser comprimidas. Los bolos de carne y fármaco se produjeron en una tableteadora excéntrica, modelo Korsch EK-1 (Berlín) utilizando 13 KN/m² de presión de compresión.

6.8.1. Pretratamiento de bolos que contienen (Veltipulmin®) y carne contaminada con clenbuterol.

Los bolos con las cuatro dosis (0.276, 0.414, 0.552, 0.690 µg de clenbuterol) se extrajeron con el siguiente procedimiento. Para determinar el contenido de clenbuterol en los bolos, se pesaron cinco de ellos y se determinó el peso medio. Se pulverizaron y se colocaron 100 mg del polvo en un tubo de 2 mL que contenía 900 µl de una mezcla de ZnSO₄ 40% y NaOH 1N 1:1. Se incubaron en un baño de ultrasonidos durante 15 min a 40 °C. Posteriormente, el pH se ajustó a 8 con NaOH 5M., la solución se centrifugó (13752 x g, 10 min a 4 ° C). El sobrenadante se limpió utilizando OASIS MCX como se describe en el pretratamiento de muestras de carne de bovino.

El eluato se recogió en un vial de UPLC-MS/MS y se evaporó, finalmente, 250 μl de FA Se añadió un formiato de $\text{pH} = 4,5$ a cada muestra y se mezcló vigorosamente con vórtex durante 1 minuto. Luego se inyectaron 30 μL en el sistema UPLC-MS/MS.

VI.IX. I. Desarrollo y validación de un método analítico para cuantificar enantiómeros y mezcla racémica de clenbuterol en orina de rata.

6.9.1.1. Preparación de la curva de calibración de mezcla racémica de clenbuterol.

Soluciones de estándares. Las soluciones stock se prepararon usando metanol como disolvente de disolución. El estándar de clenbuterol racémico que contiene enantiómeros S-(+) y R-(-) se preparó en un rango de 0,025 a 1,6 ng/mL para la curva de calibración.

6.9.1.2. Procedimiento de extracción de Clenbuterol en orina de rata.

Las muestras se descongelaron en hielo y se homogeneizaron utilizando vórtex. De cada uno, se tomaron 100 μL y se colocaron en un tubo de 2 mL, seguido de la adición de 10 μL de KOH 2,5 M, y se mezclaron durante 30 segundos. La extracción líquido-líquido se realizó con 1 mL de hexano y se agitó vigorosamente durante 60 segundos. Las muestras extraídas se centrifugaron (15000 rpm, 10 min, 10 $^{\circ}\text{C}$) y luego se transfirieron 250 μL de la capa orgánica a un tubo limpio de 15 mL. La capa orgánica se evaporó a sequedad a 30 $^{\circ}\text{C}$ y se reconstituyó con 250 μl de FA 10 mM, $\text{pH} = 4.5$.

6.9.1.3. Validación del método analítico según VICH GL 49

La validación del método analítico se realizó de acuerdo con la directriz VICH GL49 (R). Esta guía aborda específicamente la validación de los métodos de residuos de medicamentos veterinarios, con énfasis en la selectividad, linealidad, recuperación, precisión, precisión, límite de cuantificación (LOQ), detección (LOD) y estabilidad de la muestra después de la preparación.

6.9.1.3.1. Linealidad del sistema

Estándares de curva de calibración que consisten en un conjunto de 7 concentraciones. Estos se prepararon disolviendo clenbuterol racémico en metanol para obtener un rango de concentración de 0.025 a 1.6 ng/mL.

6.9.1.3.2. Selectividad y efecto matriz

Se evaluó comparando los cromatogramas de seis orinas diferentes obtenidas de seis ratas diferentes para asegurar que no hubiera picos de interferencia en el tiempo de retención de los enantiómeros de clenbuterol.

6.9.1.3.3. Linealidad del método

Muestras de orina fortificadas con mezcla racémica de Clenbuterol. Se utilizó un grupo de orina de rata sin clenbuterol almacenada a -20 °C hasta la validación. El clenbuterol racémico que contiene enantiómeros S (+) y R (-) se añadió a la muestra común a diferentes concentraciones en el mismo rango de la curva de calibración estándar (0.025-1.6 ng/mL). Posteriormente, las muestras fortificadas fueron tratadas como se describió anteriormente.

6.9.1.3.4. Precisión y exactitud del método

La precisión dentro y entre corrida se determinaron mediante el análisis de siete niveles de concentración (0.025, 0.050, 0.100, 0.200, 0.400, 0.800 y 1.6 ng / ml) por triplicado en tres días diferentes.

6.9.1.3.5. Límite de detección y cuantificación.

LOQ se estimó por sextuplicado utilizando el punto más bajo en la curva de calibración (0.025 ng/mL). Con respecto al LOD, se prepararon soluciones de 0,0025 a 0,025 ng/mL, la estimación del LOD fue el promedio de 3 veces la relación señal/ruido (S/N) de las soluciones.

6.9.1.3.6. Estabilidad de la muestra

La estabilidad del clenbuterol racémico que contiene enantiómeros S-(+) y R(-) se evaluó analizando tres réplicas de orina enriquecida con 0.100, 0.200 y 0.400 ng/mL, bajo dos condiciones: (1) almacenamiento a corto plazo durante 1 semana a -80°C , y (2) tres ciclos de congelación-descongelación. Las concentraciones obtenidas se compararon con soluciones recién preparadas.

VI.X.I. Desarrollo de un método analítico para identificar metabolitos de Clenbuterol en orina de rata.

6.10.1.1. Soluciones de estándares.

Las soluciones stock se prepararon mediante diluciones de las soluciones estándar intermedias (0.05 ng/mL, 0.2, 0.8, 3.2, 12.8 ng/mL) utilizando metanol. La curva de calibración se preparó disolviendo clenbuterol racémico en metanol para obtener un rango de concentración de 0.025 a 6.4 ng/mL.

6.10.1.2. Muestras de orina.

Las muestras se descongelaron en hielo y se homogeneizaron. De cada una, se tomaron 250 μL y se colocaron en un tubo de 2 mL, seguido de la adición de 250 μL de agua, y se homogeneizaron durante 60 segundos. Posteriormente, se realizó una microextracción en fase sólida (SPE) a la solución en una placa Oasis® MCX $\mu\text{Elution}$ de 96 pocillos. Primero se activaron los cartuchos con 500 μL de metanol y luego se acondicionaron con 500 μL de agua seguido de 500 μL de formiato de amonio 10 mM (FA). Después, se cargaron 500 μL de la muestra y los pocillos se lavaron con 500 μL de 10 mM FA, las muestras se eluyeron con 500 μL de una mezcla de hidróxido de amonio al 5% (NH_4OH) y metanol (4:96). El eluato se recogió en un vial de LC-MS y se evaporó hasta sequedad utilizando un SpeedVac. Finalmente, se agregaron 50 μL de metanol a cada muestra y se agitaron vigorosamente durante 10 minutos. Luego, los viales se agitaron y fueron incubados en un baño de ultrasonido durante 15 minutos, finalmente se inyectaron 20 μL en el sistema UPLC-MS/MS.

6.10.1.3. Muestras de carne de bovino.

Todas las muestras se almacenaron a -80°C el día del análisis se descongelaron en hielo; a 100 mg de carne molida* se agregaron 300 μL de metanol; luego, las muestras se homogeneizaron utilizando perlas de metal de tamaño de partícula de 2 mm con un homogeneizador (TissueLyserLT, Qiagen, Alemania) en dos ciclos, cada ciclo con una duración de 30 min, entre cada ciclo se colocaron en hielo. Las muestras extraídas se centrifugaron (14.000 g, 4°C , 15 min) y el sobrenadante se pasó a través de una columna de extracción en fase sólida Supelco HybridSPE®-Phospholipid (Supelco, PA, EE. UU.). El eluato se recogió en un vial de LC y se evaporó hasta sequedad usando un SpeedVac. Finalmente, se agregaron 50 μL de metanol a cada muestra y se mezclaron vigorosamente con vórtex durante 10 min. Luego se mezclaron los viales y se incubaron en un baño de ultrasonidos durante 15 minutos.

*Esta carne fue previamente analizada y se confirmó presencia de residuos de Clembuterol.

VI.XI.I. Indicadores de estrés oxidativo y daño celular.

6.11.1.1. Cuantificación de isoprostanos (8-iso-PGF₂ α) en plasma de rata.

Se utilizó la metodología desarrollada y validada por (Rodríguez Patiño et al., 2018).

Plasma. Alícuotas de 500 μL de plasma de rata fueron trasferidos a tubos de 2 mL y se adiciono 100 μL de estándar interno y 500 μL de KOH 15%. Los viales se homogenizaron y fueron incubados en un baño de ultrasonido durante 30 min 40°C . Posteriormente fueron enfriados a temperatura ambiente, se adicionaron 225 μL de ácido fórmico 6 M, se homogenizaron y se centrifugaron a 15 000 rpm 10 min 4°C . A los sobrenadantes se aplicó una microextracción en fase sólida, empleando una placa de extracción Oasis® MAX UElution de 96 pozos, acondicionados previamente con 500 μL de metanol y con 500 μL de ácido fórmico 20 mM, después se cargó la muestra 350 μL . Los pozos fueron lavados con 300 μL de NH_4OH 2%, las muestras fueron eluidas con 50 μL de una mezcla de ácido fórmico 5% en ACN: Isopropanol 40:60, diluyéndose con 150 μL de agua Milli-Q; las alícuotas de 30 μL fueron inyectadas al sistema UPLC-MS/MS.

La separación de isoprostanos (8-iso-PGF₂α) se realizó con ácido fórmico y acetonitrilo a una velocidad de flujo de 0.3 mL/min, 30 µL de volumen de inyección y una columna ACQUITY BEH UPLC® C18 1.7 µm.

6.11.1.2. Determinación de proteínas totales en órganos de rata.

Se tomaron muestras de cada órgano y fueron colocadas en tubos de 2 mL con buffer de lisis (EDTA, PMSF, Triton X), se homogeneizaron y después se sonicaron con tres pulsos de 10 segundos y una amplitud de 67 hertz. Las muestras fueron centrifugadas y el sobrenadante se transfirió a tubos de 2 mL en donde se separaron alícuotas para determinación de proteínas y otra para glutatión total. Las proteínas totales fueron determinadas espectrofotométricamente a 595 nm con el reactivo de Bradford (Bio-Rad).

6.11.1.3. Determinación de glutatión total (GSH-GSSG).

Los niveles totales de glutatión fueron determinados utilizando el reactivo de Ellman en el cual, el GSH es oxidado por el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) los sobrenadantes de paso anterior fueron tratados con ácido sulfosalicilico 5% durante 15 minutos a 4°C posteriormente las muestras fueron centrifugadas y el sobrenadante se hizo reaccionar con DTNB y la respuesta se determinó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 412 nm.

6.11.1.4. Determinación de transaminasas hepáticas en plasma de rata

Se determinaron los niveles de las enzimas asociadas al daño hepático γ -Glutamyl Transpeptidasa (γ -GT) y Lactato Deshidrogenasa (LDH) en plasma, inmediatamente después del sacrificio se obtuvo sangre mediante punción cardiaca, la cual se centrifugo para separar el plasma del paquete celular, el plasma fue dividido en alícuotas y conservado a -20 °C. Los niveles de cada enzima fueron determinados con los reactivos de kit respectivamente (Spinreact S.A) de acuerdo a las instrucciones del fabricante con las respectivas modificaciones las lecturas fueron realizadas en el lector de placas Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer Termofisher Scientific a 412 nm para γ -GT y 450 nm para LDH.

6.11.1.5. Determinación de GPx y GR

La actividad de las enzimas antioxidantes Glutación Peroxidasa (GPx) y Glutación Reductasa (GR) fueron determinadas en el plasma de las ratas, las muestras de plasma fueron diluidas en el buffer de reacción de cada enzima previo a su medición el procedimiento se llevó a cabo de acuerdo a las instrucciones del manual del fabricante con ligeras modificaciones CGP1 y GRSA respectivamente (Sima-Aldrich; S.L., USA). Las lecturas fueron realizadas en el lector de placas Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer Termofisher Scientific a 340 nm.

6.12. Diseño Experimental

Se utilizó un diseño al azar para asignar los tratamientos a los sujetos de experimentación. Se realizaron comparación de medias en cada tratamiento para determinar si existía diferencia significativa. La variable independiente fue el tiempo de muestreo. Las variables dependientes fueron la cantidad (ng/mL) de cada enantiómero de clenbuterol S -(+) y R -(-).

6.13. Modelo Estadístico

Para probar las diferencias, se aplicó una prueba ANOVA de una vía con medidas repetidas a cada día del estudio.

6.14. Análisis estadístico para determinación de enantiómeros

El control del sistema y el análisis de datos se adquirieron y procesaron con MassLynx V4.1 (SCN 843 Copyright 2011, Waters Inc). Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa estadístico IBM SPSS Statistics para Windows, versión 20.0. (IBM Corp. Lanzado en 2011. Armonk, NY: IBM Corp.), y los gráficos se obtuvieron utilizando GraphPad Prism versión 7.00 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California, EE. UU., www.graphpad.com).

6.14.1. Análisis estadístico para identificación de metabolitos

Los datos sin procesar se reprocesaron utilizando el software de la estación de trabajo MassHunter. Las áreas de los picos se obtuvieron utilizando el software de análisis cuantitativo QQQ (Agilent Technologies®, versión B.08.00). El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el software IBM SPSS Statistics Versión 20 (IBM corp.). Los datos se analizaron utilizando ANOVA de una vía con prueba de medidas repetidas. Los gráficos se representaron utilizando el software GraphPad Prism 7 (software GraphPad)

6.14.2. Análisis estadístico para correlación de isoprostanos.

Los datos se analizaron empleando el programa Statgraphics Centurion XV versión 15.2.05 (2007). Se analizó la correlación de los indicadores de daño celular entre la concentración de los isoprostanos (8-iso-PGF₂α). Para buscar una posible correlación dependiente del tratamiento. Para establecer diferencias significativas entre los tratamientos se realizó prueba ANOVA.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1.1. Desarrollo del método de validación para la determinación de enantiómeros de Clenbuterol.

La identificación de las formas de clenbuterol (S-(+) y R-(-)) se realizó utilizando dos transiciones (m/z 277.10 \rightarrow 202.9 y m/z 277.10 \rightarrow 132.02). Sin embargo, a partir de estos, se usó el más abundante para la cuantificación (m/z 277.10 \rightarrow 202.9) a lo largo de la aplicación, mientras que la transición menos abundante (m/z 277.10 \rightarrow 132.02) se empleó para identificar.

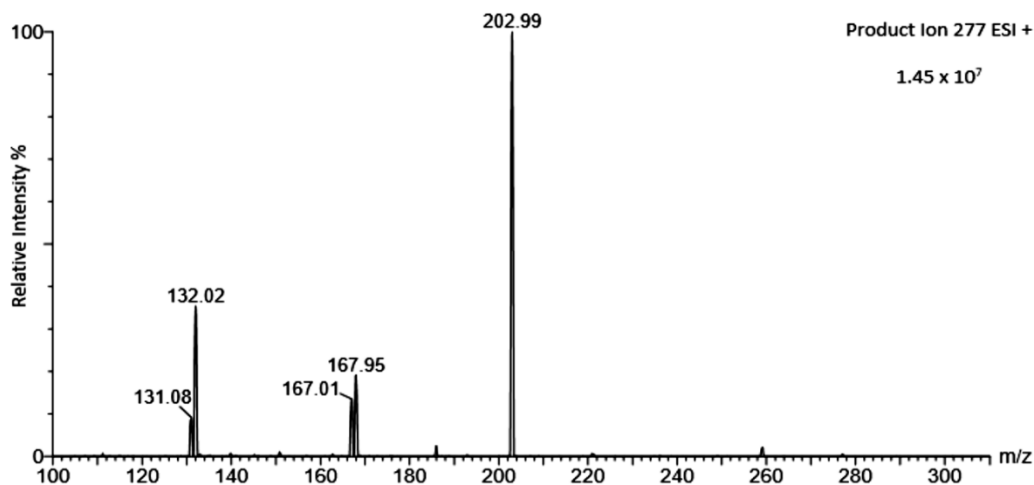


Figura 5. Espectro del ion producto del clenbuterol racémico (277 m/z) usando UPLC - ESI (+) - TQ-MS.

NOTA: Espectro del ion producto con 16 eV de energía de colisión. La concentración de clenbuterol racémico fue de 100 ng/mL. La Figura 5 muestra el espectro de fragmentación del clenbuterol racémico utilizando UPLC-ESI (+) -TQ-MS. Las transiciones más abundantes (ión precursor/ión producto) para los enantiómeros de clenbuterol R-(-) y S-(+) se seleccionaron utilizando el estándar racémico, lo que dio como resultado 277.10 \rightarrow 202.95 m/z . Cada transición se optimizó ajustando los voltajes del capilar, del cono y la energía de colisión, estos resultados se observan en la tabla 11.

Tabla 11. Parámetros optimizados de MS para los enantiómeros de clenbuterol.

Enantiómeros de Clenbuterol	Ion precursor (m/z)	Ion producto (m/z)	Energía de colisión (eV)	Voltaje del cono (V)	Tiempo de retención (min)	Transiciones usadas para
S- (+)	277.10	202.91	16	22	2.5	Cuantificar
R- (-)	277.10	202.91	11	15	3.5	Cuantificar
S- (+)	277.10	132.02	16	22	2.5	Identificar
R- (-)	277.10	132.02	11	15	3.5	Identificar

Para obtener la mejor resolución cromatográfica de los enantiómeros y mantener la sensibilidad y un tiempo de corrida aceptable, se modificó el pH y la fuerza iónica de la fase móvil acuosa. Ambos parámetros estaban altamente asociados con la adición de un modificador (FA) a la fase móvil a diferentes concentraciones (Hermansson, 1983). La separación cromatográfica se optimizó con diferentes disolventes en diversos porcentajes (ACN, MeOH y 2-PrOH) y concentraciones variables de FA entre 5 y 10 mM, en un rango de pH de 4.5 a 7, observando los mayores cambios con el cambio del pH. Los enantiómeros de clenbuterol se separaron en cuatro valores de pH diferentes; 4.5, 5.0, 6.0 y 7. Los resultados se muestran en la Figura 6, que muestra la relación entre la resolución de los enantiómeros S- (+) y R-(-), el tiempo de retención y el pH de la fase móvil. Como se observó, el tiempo de retención y la resolución (R_s) disminuyeron con el pH. Aunque la resolución más alta obtenida ($R_s= 2.56$ min) se encontró a pH 7, para optimizar el tiempo de ejecución se seleccionó, el pH 4.5.

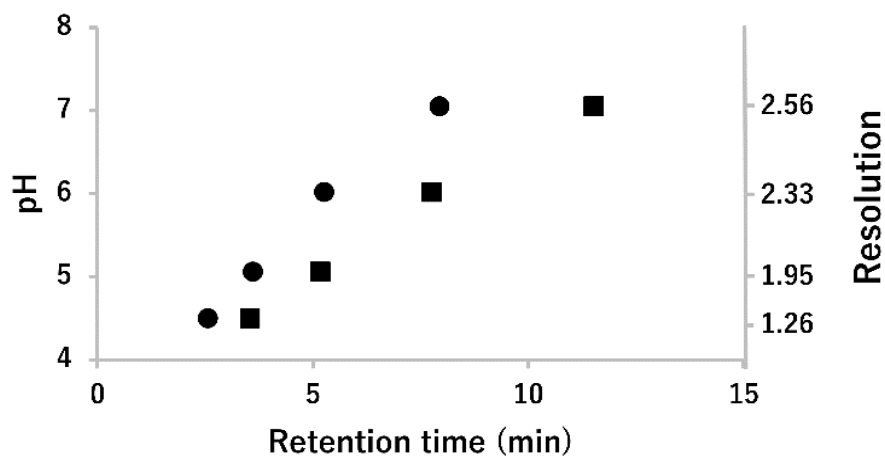


Figura 6. Influencia del pH en el tiempo de retención y resolución de los enantiómeros de clenbuterol S-(+)(●) y R-(-) (■).

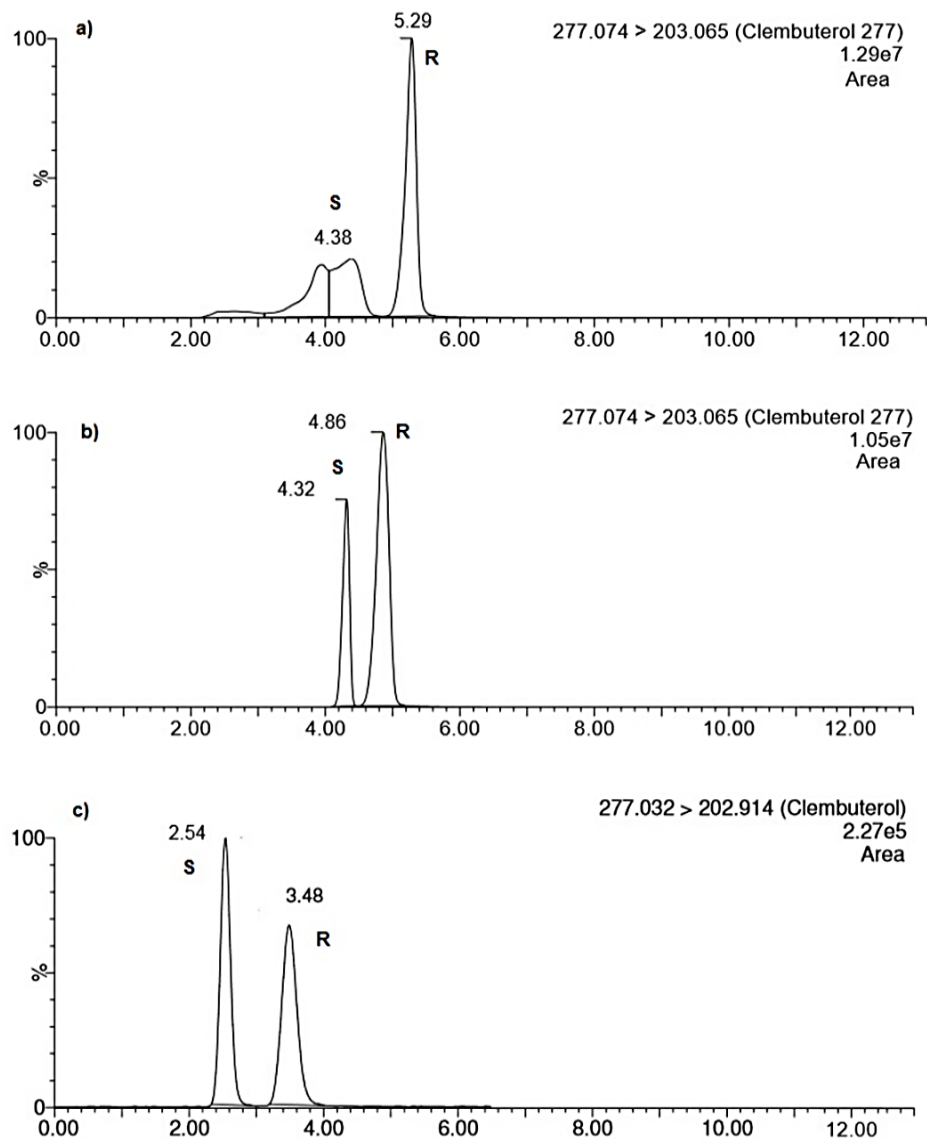


Figura 7(a-c). Cromatogramas SRM extraídos de la transición de clembuterol 277.10 \rightarrow 202.9 m/z para la comparación de columnas: a) y b) Luna 5u celulosa-2 columna a 90:10 y 85:15 c) AGP Chiralpak Columna en 97: 3.

Además, como una alternativa para la separación de enantiómeros, se utilizó la columna Luna 5u celulosa-2 en las mismas condiciones que la columna quiral AGP. Esta columna es conocida por la separación de enantiómeros y mezclas racémicas de todos los tipos de compuestos. El resultado con la columna Luna 5u celulosa-2 (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m; Phenomenex) se presenta en la figura 7. Esta columna mostró mayor respuesta en comparación con la columna quiral AGP, con una resolución de $R_s=1.5$ de los enantiómeros; sin embargo, debido a su forma de pico asimétrica para el enantiómero S-(+), este método se

descartó. En resumen, las condiciones finales para el método analítico fueron: columna quiral AGP con una fase móvil acuosa que contenía FA 10 mM a pH = 4.5 y ACN (97: 3).

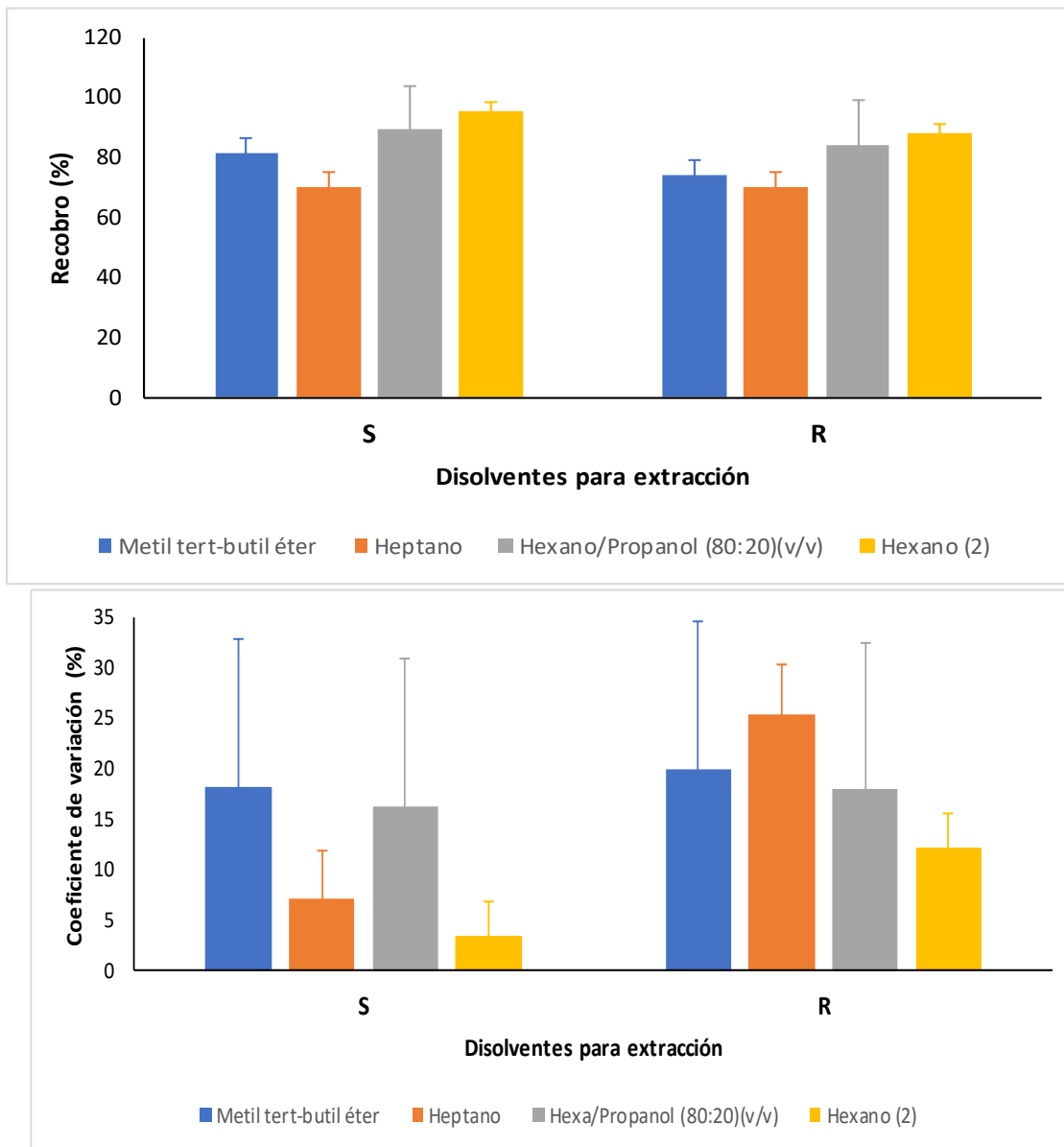


Figura 8. Comparación de los recobros promedio y coeficientes de variación obtenidos con los diferentes disolventes en muestras de orina de rata, fortificadas con clenbuterol (100 pg/mL).

El pretratamiento de la muestra de orina se optimizó con diferentes disolventes; heptano, hexano con doble extracción, metil-tert-butiléter y mezcla de hexano y propanol 80:20 (v/v), se lograron mejores recobros empleando hexano, los coeficientes de variación fueron menores en ambos enantiómeros S-(+) y R-(-) como se observa en la (figura 8). Por lo tanto, se decidió utilizar el disolvente hexano para el pretratamiento de muestras de orina de rata, descartando otro tipo de extracción que elevara el costo como extracción en fase sólida.

7.1.2. Validación del método

Una vez que se desarrolló el método, se procedió a validar siguiendo los parámetros establecidos por la Guía VICH GL49 (R)(FDA Guidance, 1995; R, 2015). La especificidad del método se evaluó mediante la comparación de los cromatogramas de los enantiómeros de clenbuterol en los extremos del rango de la curva de calibración con la orina de rata del grupo de control (Figura 11), donde no se observó interferencia en el tiempo de retención de los enantiómeros S-(+) y R(-).

Los parámetros de validación se resumen en la Tabla 12. La linealidad del método se obtuvo con coeficientes de correlación de 0.9854 y 0.9883 para el enantiómero S-(+) y R(-), respectivamente (Figura 9 y 10). En cuanto a la exactitud, todas las recuperaciones estuvieron dentro del rango de porcentaje de recobro (84.7% a 100.4%) según lo establecido en la guía. Además, los valores de precisión dentro y entre corrida de enantiómero S-(+) fueron de 5.6 a 11.6% y de 6.4 a 10.5%, respectivamente.

Del mismo modo, para el enantiómero R(-) mostró un coeficiente de variación de 6.3 a 15.9% y de 4.91 a 11.9%. El LOQ de la mezcla racémica de clenbuterol se estimó como el punto más bajo en la calibración que fue de 0.0125 ng/mL y el LOD se estimó en 0.006 ng/mL para cada enantiómero.

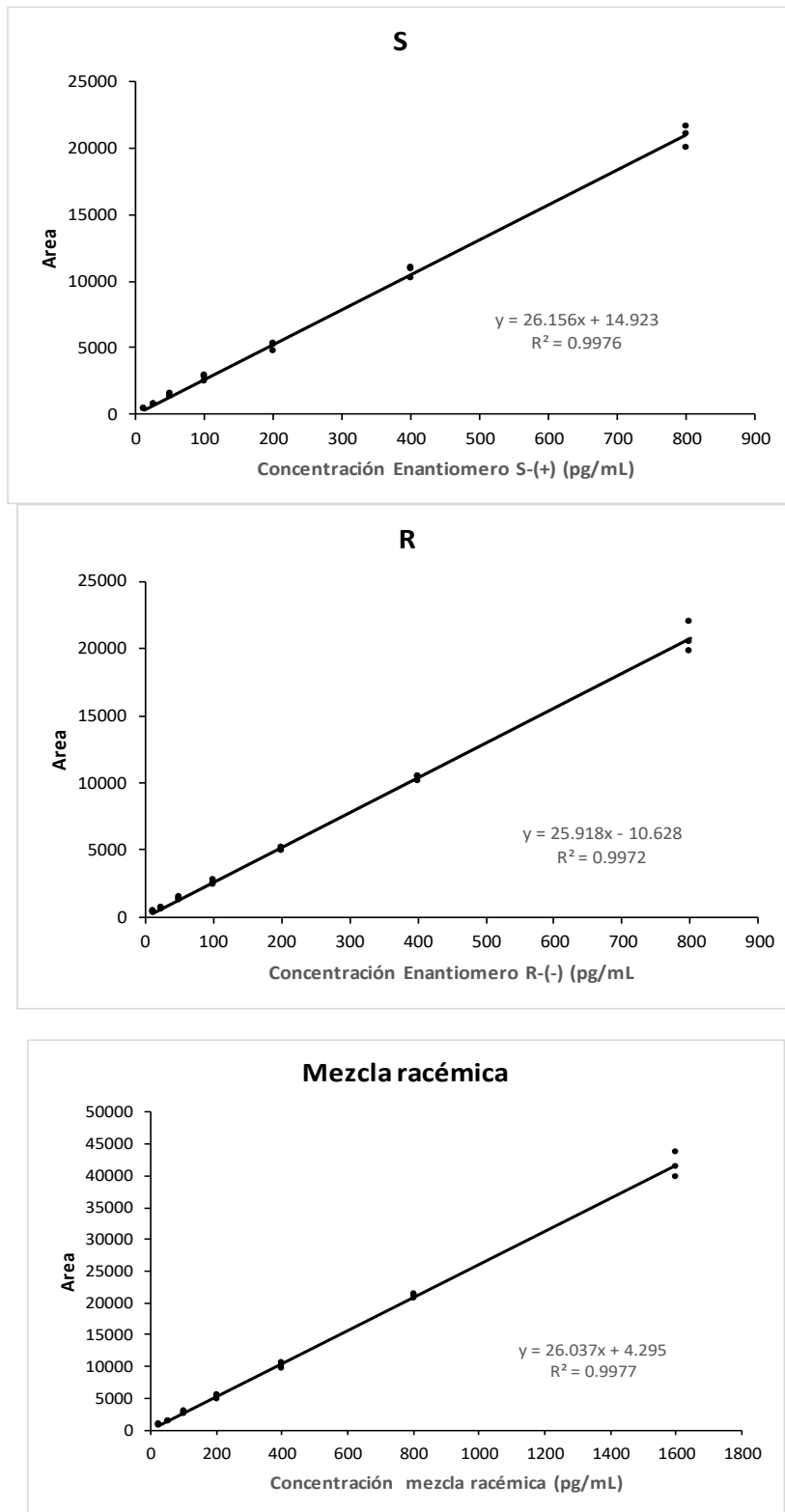


Figura 9. Curvas de calibración de estándar de mezcla racémica (Clembuterol total), enantiómero S-(+) y R-(-) en formiato de amonio pH=4.5.

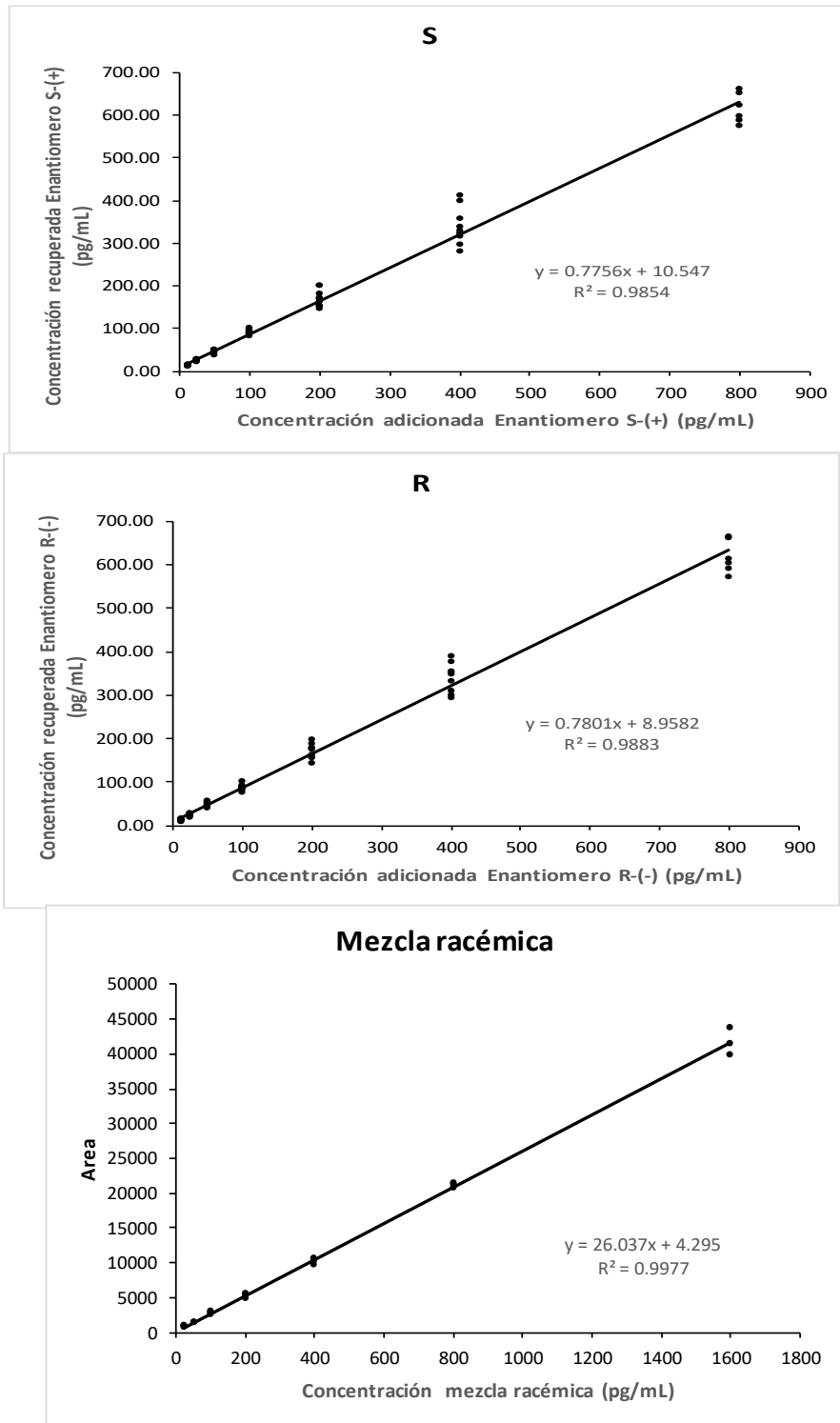


Figura 10. Curvas de calibración de estándar de mezcla racémica (Clembuterol total), enantiómero S-(+) y R-(-) en orina de rata

Tabla 12. Principales parámetros de validación del método.

1. LINEALIDAD (n= 21)								
		Intercepto ± I.C.		Pendiente ± I.C.		r²	Rango (pg/mL)	
<i>Estándares</i>	Clembuterol Total	4.29		26.037		0.9977	25 – 1600	
	S-(+) Clenbuterol	14.92		26.156		0.9975	12.5 – 800	
	R-(-) Clenbuterol	- 10.62		25.918		0.9972	12.5 – 800	
		Intercepto ± I.C.		Pendiente ± I.C.		r²	Rango (pg/mL)	
<i>Muestras</i>	Clembuterol Total	19.505		0.7778		0.9872	25 – 1600	
	S-(+) Clenbuterol	10.547		0.7726		0.9851	12.5 – 800	
	R-(-) Clenbuterol	8.958		0.7801		0.9883	12.5 – 800	
2. EXACTITUD (n=9)								
	(ng/mL)	0.025	0.05	0.1	0.2	0.4	0.8	1.6
<i>Clembuterol total</i>	Recobro (%) ± I.C.	99.6	97.5	91.5	89.2	85.3	84.7	87.1
	(ng/mL)	0.0125	0.025	0.5	0.1	0.2	0.4	0.8
<i>S-(+) Clenbuterol</i>	Recobro (%) ± I.C.	103.3	100.4	91.5	90.8	85.4	84.7	86.9
<i>R-(-) Clenbuterol</i>	Recobro (%) ± I.C.	95.8	94.7	91.4	87.5	85.1	84.7	87.3
3. PRECISIÓN (n=9)								
INTRA- CORRIDA								
<i>Concentración adi.</i>								
	(ng/mL)	0.025	0.05	0.1	0.2	0.4	0.8	1.6
<i>Clembuterol total</i>	Mean (ng/mL)	0.025	0.049	0.092	0.178	0.341	0.678	1.234
	R.S.D. (%)	7.91	9.26	9.64	7.06	10.63	11.19	5.35
	Incer. relativa	1.101	0.562	0.299	0.155	0.081	0.041	0.022
<i>Concentración adi.</i>								
	(ng/mL)	0.0125	0.025	0.5	0.1	0.2	0.4	0.8
<i>S-(+) Clenbuterol</i>	Mean (ng/mL)	0.013	0.025	0.046	0.091	0.171	0.339	0.616
	R.S.D. (%)	8.7	9.8	9.5	6.6	11.6	12.9	5.6
	Incer. relativa	1.096	0.570	0.310	0.157	0.083	0.042	0.023
<i>R-(-) Clenbuterol</i>								
	(ng/mL)	0.012	0.024	0.046	0.088	0.170	0.339	0.618
	Mean (ng/mL)	0.012	0.024	0.046	0.088	0.170	0.339	0.618
	R.S.D. (%)	15.9	11.2	13.1	8.6	10.1	9.8	6.3
	Incer. relativa	1.273	0.636	0.332	0.174	0.090	0.045	0.025
ENTRE CORRIDA								
<i>Concentración adi.</i>								
	(ng/mL)	0.025	0.05	0.1	0.2	0.4	0.8	1.6
<i>Clembuterol total</i>	Mean (ng/mL)	0.025	0.049	0.092	0.178	0.341	0.678	1.234
	R.S.D. (%)	4.81	9.18	6.92	7.24	6.43	7.04	5.35
	Incer. relativa	1.101	0.562	0.299	0.155	0.081	0.041	0.022
<i>Concentración adi.</i>								
	(ng/mL)	0.0125	0.025	0.5	0.1	0.2	0.4	0.8
<i>S-(+) Clenbuterol</i>	Mean (ng/mL)	0.013	0.025	0.046	0.091	0.171	0.339	0.616
	R.S.D. (%)	8.6	10.5	8.0	6.6	9.5	7.2	6.4
	Incer. relativa	1.096	0.570	0.310	0.157	0.083	0.042	0.023
<i>R-(-) Clenbuterol</i>								
	(ng/mL)	0.012	0.024	0.046	0.088	0.170	0.339	0.618
	Mean (ng/mL)	0.012	0.024	0.046	0.088	0.170	0.339	0.618
	R.S.D. (%)	7.1	10.1	11.9	8.6	6.4	4.9	6.8
	Incer. relativa	1.273	0.636	0.332	0.174	0.090	0.045	0.025
4. LOQ								
	Recobro (%)	R.S.D. (%)		Conc. (ng/mL)				
<i>Clembuterol total</i>	80.34	12.78		0.025				
<i>S-(+) Clenbuterol</i>	86.9	16.68		0.0125				
<i>R-(-) Clenbuterol</i>	73.79	11.06		0.0125				

I.C.; Intervalos de confianza; Incertidumbre estándar relativa combinada.

Además, se evaluó la estabilidad de los estándares y de muestras fortificadas con orina de rata y mezcla racémica de clenbuterol en dos condiciones; después de 7 días de almacenamiento a -80°C y 3 ciclos de congelación-descongelación (Tabla 13).

Como se observa en la Tabla 13, una semana de almacenamiento mostró un impacto importante en la determinación del enantiómero en muestras y estándares, lo que llevó a encontrar recuperaciones bajas como el 63.5% y el 65.9% de los enantiómeros S-(+) y R-(−) en las muestras., respectivamente, al nivel de 0.2 ng/mL. Por otro lado, los 3 ciclos de congelación y descongelación casi no tuvieron impacto en las recuperaciones, obteniendo un 92.3% y un 91.9% de recuperación de enantiómeros S- (+) y R- (−) en muestras.

Tabla 13. Estabilidad de R-(−) y S-(+) enantiómeros de clenbuterol después de la preparación de la muestra (n= 3).

Enantio meros	S-(+) Clenbuterol				R-(−) Clenbuterol					
	Recobro []	(ng/mL)		(%)	(ng/mL)		(%)			
	Estándar	Muestras fortificadas	Estándar	Muestras fortificadas	Estándar	Muestras fortificadas	Estándar	Muestras fortificadas	Estándar	Muestras fortificadas
Condiciones ambientales -80 °C (1 Semana)	0.1	0.097 ± 0.01	0.079 ± 0.01	97.45 ± 9.46	79.38 ± 7.81	0.083 ± 0.00	0.079 ± 0.01	82.97 ± 0.01	79.62 ± 8.01	79.62 ± 8.01
	0.2	0.149 ± 0.01	0.127 ± 0.01	74.86 ± 6.73	63.54 ± 7.19	0.134 ± 0.01	0.131 ± 0.01	67.46 ± 0.01	65.90 ± 6.76	65.90 ± 6.76
	0.4	0.350 ± 0.04	0.290 ± 0.04	87.69 ± 10.29	72.53 ± 10.57	0.329 ± 0.04	0.296 ± 0.01	82.49 ± 0.01	74.23 ± 9.26	74.23 ± 9.26
3 ciclos de descongelación- congelación	0.1	0.100 ± 0.00	0.098 ± 0.01	100.23 ± 5.60	98.37 ± 10.11	0.097 ± 0.00	0.093 ± 0.01	97.59 ± 4.6	93.75 ± 12.06	93.75 ± 12.06
	0.2	0.193 ± 0.02	0.185 ± 0.02	96.67 ± 7.60	92.99 ± 9.66	0.186 ± 0.02	0.183 ± 0.01	93.45 ± 11.90	91.98 ± 9.70	91.98 ± 9.70
	0.4	0.392 ± 0.01	0.376 ± 0.01	98.19 ± 2.73	94.08 ± 2.82	0.387 ± 0.01	0.379 ± 0.01	96.81 ± 1.84	94.91 ± 2.55	94.91 ± 2.55

Los resultados de la validación demostraron la eficacia del método, la preparación de la muestra y la determinación de los enantiómeros de clenbuterol S-(+) y R-(−) en la orina de ratas. Ya existen algunas metodologías publicadas para determinar los enantiómeros de clenbuterol; sin embargo, para la mayoría de ellos, el tiempo total de análisis varía de 24 a 30 minutos (Hefnawy et al., 2013; Mostafa et al., 2009; Velasco-Bejarano et al., 2017), cuatro veces más que el método actual, que tiene un tiempo de 6.5 minutos. Comparando la resolución del método con metodologías reportadas, mostró un valor más alto de 1.2 en comparación con el valor de 1.0 reportado por Velasco Bejarano (Velasco-Bejarano et al., 2017).

Además, la sensibilidad del presente método para cada enantiómero incluyó el LOQ más bajo informado de 0.0125 ng/mL en comparación con los métodos anteriores (Hefnawy et al., 2013; Mostafa et al., 2009; Velasco-Bejarano et al., 2017) (0.025 ng/mL, 50 ng/mL y 2.5 µg/mL). Finalmente, este trabajo evaluó el efecto de los ciclos de congelación y descongelación y la estabilidad a corto plazo a -80 ° C después de que se fortificaron muestras de orina de rata con mezcla racémica.

7.1.3. Aplicación del método.

La caracterización y cuantificación de los enantiómeros de clenbuterol en el fármaco (Ventipulmin®) y en la carne, antes y después de la elaboración de los bolos, se realizaron antes de comenzar el estudio con los animales (Tabla 14). Los cromatogramas de estos resultados se muestran en la Figura 12, donde se observa que la proporción de enantiómeros S-(+) y R-(–) era 1, independientemente del tipo de muestra (carne o fármaco), estos resultados coinciden con lo reportado por (Wang et al., 2016). Además, se observó que el proceso de compresión no afectó la cantidad y la proporción de los enantiómeros que continuaron siendo 1. Teniendo en cuenta estos resultados, se procedió a la administración de clenbuterol a los animales, en la forma de imitar un ciclo de dopaje o por el consumo de carne contaminada y un grupo de control alimentado normalmente sin clenbuterol.

Tabla 14. Determinación de enantiómeros de clenbuterol en la carne contaminada, en el fármaco utilizado y después de la granulación de ambas muestras.

Muestra	Concentración teórica (µg)	S (+) (ng/g)	R (-) (ng/g)	Clenbuterol total (ng/g)	Total clenbuterol (µg/portion*)
		Promedio ± SD (n = 3)	Promedio ± SD (n = 3)	Promedio ± SD (n = 3)	
Bolos con ventipulmin	Dose 1: 0.276	6.71±0.96	7.34±0.70	14.04±0.83	0.280
	Dose 2: 0.414	10.98±1.97	11.54±2.17	22.52±2.07	0.450
	Dose 3: 0.552	14.34±3.07	15.44±3.08	29.77±3.07	0.595
	Dose 4: 0.690	22.45±1.76	23.82±1.65	46.26±1.70	0.925
Bolos con carne contaminada	---	12.49±2.04	14.79±2.62	27.28±2.33	0.545
Carne contaminada	---	11.02±1.73	14.94±2.07	25.96±1.90	---

* La porción de comida fue de 2 bolos por día, cada uno con un peso de 10 g.

La orina de cada rata se recolectó al día siguiente después de la ingestión de clenbuterol (medicamento o carne) durante los 7 días. Aunque para algunas ratas no fue posible recolectar orina, todas las muestras se analizaron utilizando el método validado. Se encontró que la sensibilidad y especificidad del método fueron suficientes para determinar con precisión los enantiómeros [S-(+) y R(-)] de clenbuterol, ya que las concentraciones estaban por encima del LOD para los grupos de carne y medicamento. La cuantificación de los enantiómeros se puede encontrar en la Figura 13. En las muestras de orina del grupo control no se encontró ninguna señal.

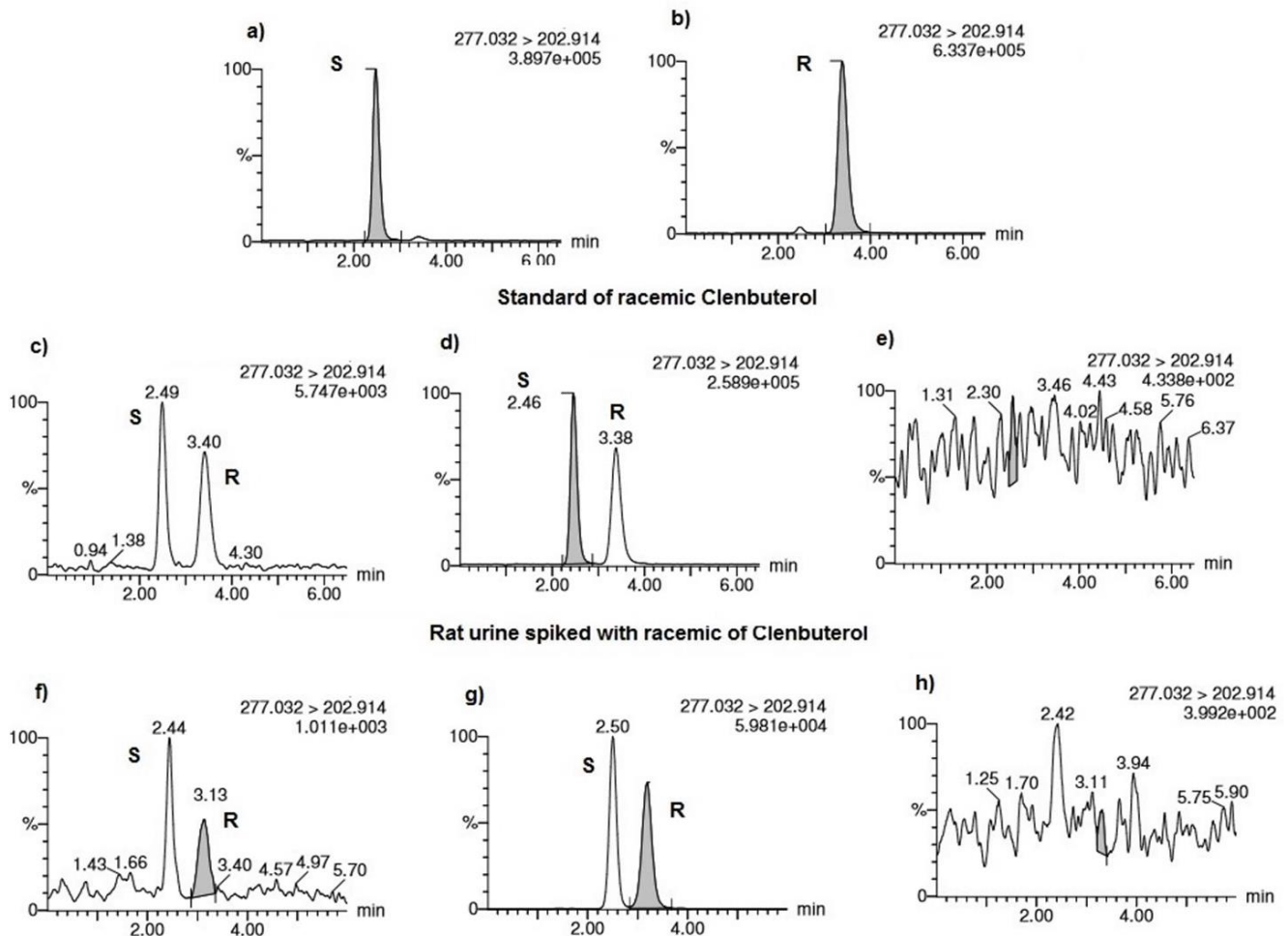


Figura 11(a-h). Cromatogramas SRM extraídos de la transición 277.10 → 202.9 m/z para a) Estándar de S-(+) enantiómero de clenbuterol; b) Estándar del enantiómero R(-) clenbuterol; c) y d) Estándar de clenbuterol racémico en los puntos más bajos y más altos de la curva de calibración (0.025 ng/mL y 1.6 ng/mL); e) Blanco de la fase móvil; f) y g), Muestras de orina de rata fortificadas con punto más bajo y más alto de la curva de calibración (0.025 ng/mL y 1.6 ng/mL); h) Blanco de muestra de orina de rata.

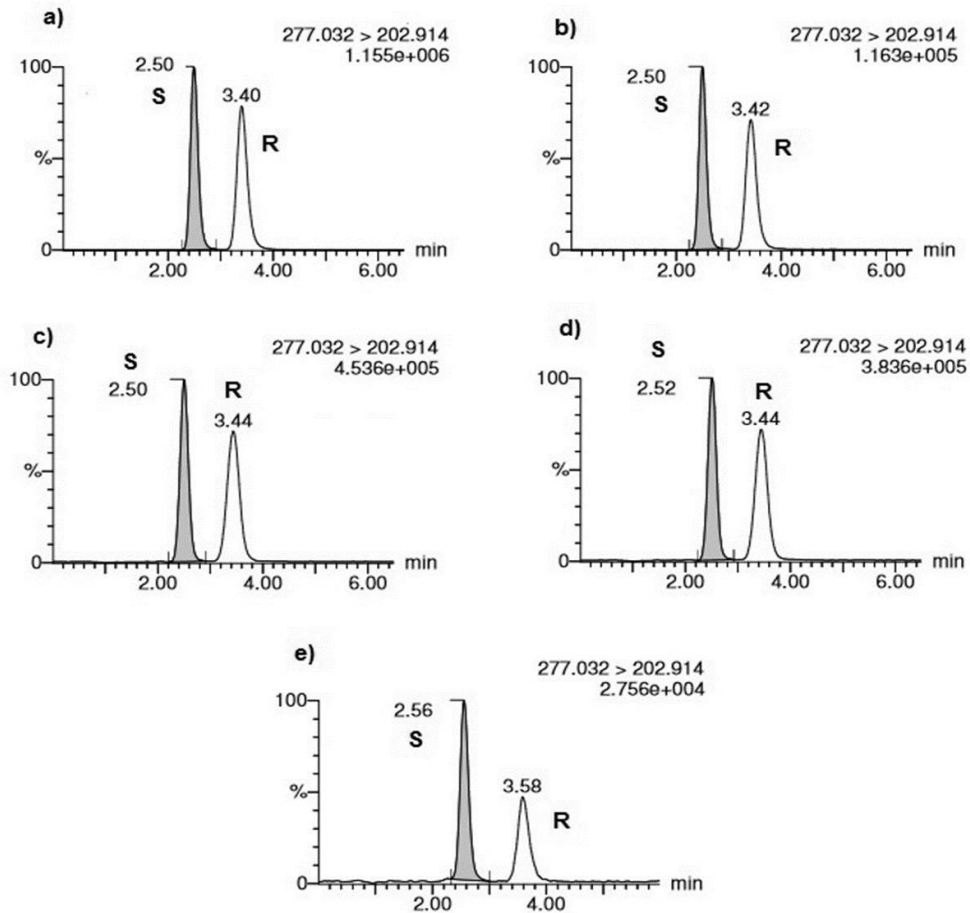


Figura 12.(a-e). Cromatogramas SRM extraídos de la transición $277.10 \rightarrow 202.9$ m/z para a) Muestra de carne contaminada con clenbuterol; (b) Muestra de medicamento que contiene Clenbuterol; (c) Muestra de bolo con carne que contiene clenbuterol; (d) Bolo con granulado que contiene clenbuterol (Ventipulmin®); (e) Muestra de orina de rata al tercer día de dopaje con clenbuterol S-(+) 0.195 ng/mL y R-(-) 0.126 ng/mL.

En la figura 13 se puede observar que el grupo de medicamento siguió una distribución gaussiana. Así, en el primer día, se estimaron 0.2 y 0.15 ng/mL para los enantiómeros S-(+) y R-(-), respectivamente, y estos aumentaron hasta 0.5 y 0.4 ng/mL en el día 4 del ciclo de dopaje, igualando la mayor concentración de clenbuterol. Por otro lado, la concentración de enantiómeros S-(+) y R-(-) de la carne fue similar durante los primeros 6 días, con una tendencia a disminuir en el día 7.

Para establecer diferencias significativas entre grupos, se aplicó una prueba ANOVA de una vía con medidas repetidas a cada día del estudio (Figura 13). Como era de esperar, se observaron diferencias entre las formas en que se administró clenbuterol. Se encontraron cantidades mayores de enantiómeros

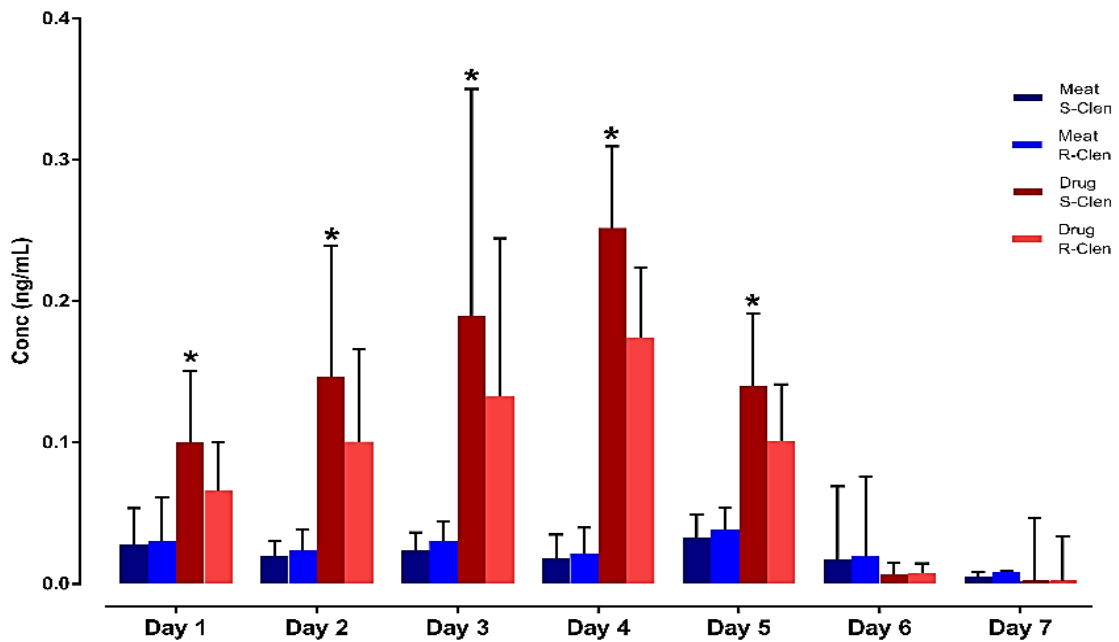


Figura 13. Concentraciones de enantiómeros S- (+) y R-(-) de clenbuterol (ng/mL) en orina de rata durante un ciclo de dopaje (barras rojas) y consumo continuo de carne (barras azules).

NOTA: Datos después de ANOVA de una vía con medidas repetidas. Las barras son medias +/- Intervalo de confianza al 95%. El * significa diferencia significativa entre enantiómeros; R-(-) y S-(+) ($p < 0.05$).

S-(+) y R-(-) (150% y 130%, respectivamente) en el grupo medicamento en comparación con el grupo de la carne. Es importante destacar que se encontraron diferencias significativas entre los enantiómeros S-(+) y R-(-) entre el 1 y el 5º día del ciclo de dopaje, observando una mayor cantidad de la forma S- (+) sobre el enantiómero R- (-).

Además, la relación de los dos enantiómeros se calculó como R/S. Esto se comparó utilizando la prueba ANOVA de una vía de medidas repetidas (Figura 14). Los promedios de la relación R/S por día variaron para el "grupo de medicamento" de 0.67-0.89, mientras que de 0.97-1.22

para el "grupo de carne". Este rango de "grupo de carne" que incluía 1, indicó que las proporciones de cada enantiómero eran iguales (50:50).

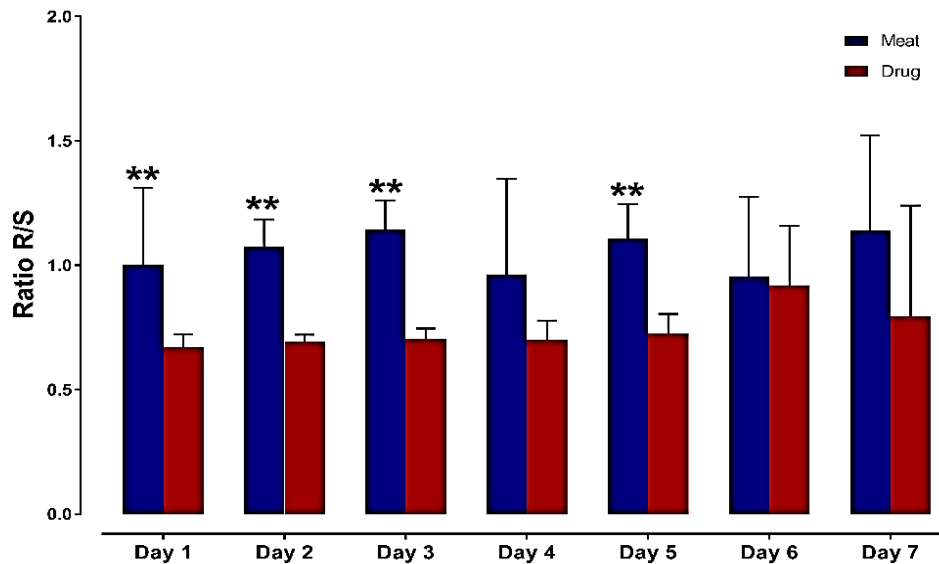


Figura 14. Relación R/S de enantiómeros de clenbuterol en orina de rata durante un ciclo de dopaje (barras rojas) y consumo continuo de carne (barras azules).

NOTA: Los datos después de medidas repetidas ANOVA de una vía. Las barras son medias +/- intervalo de confianza (95%). El ** significa diferencia significativa entre “grupo de medicamento” en rojo y “grupo de carne” en azul ($p < 0,001$).

La diferencia en la relación enantiomérica del grupo de medicamento podría explicarse por la actividad biológica de los enantiómeros. Se ha descrito que los β -agonistas con estructuras quirales tienen un metabolismo diferente, siendo los enantiómeros R(-) más activos que la forma S(+), lo que sugiere que el S-(+) clenbuterol se metaboliza y excreta menos (Kitaura, Suzuki, & Kraemer, 2015). Es posible que el metabolismo de los medicamentos dependa del tiempo y de la concentración, y desaparezca en los últimos días (6 y 7 días) cuando la concentración de clenbuterol es baja. En un trabajo anterior, la farmacocinética de los enantiómeros de clenbuterol en ratas después de I.V. de 2 mg/kg de clenbuterol racémico mostró una mayor concentración de enantiómero S-(+) en plasma a las 24 horas, lo que sugiere una distribución y excreción de los enantiómeros significativamente diferente (Ahmad, 2007).

Sin embargo, en un estudio reciente (Parr et al., 2017) estableció que en humanos después de una dosis única de clenbuterol, ya sea de una preparación farmacéutica o de carne que contiene clenbuterol (carne de res o hígado) no existe diferencia en la relación enantiomérica. A pesar de que los datos no son comparables con los resultados humanos y el diseño experimental fue diferente, nuestro diseño experimental es un estudio piloto que pretende representar la realidad de los ciclos de dopaje a los que están expuestos los atletas y el efecto de un consumo constante de carne contaminada. Se necesitan estudios adicionales de la farmacocinética en humanos y estudios en varias dosis y en tiempos tanto en sangre como en orina para validar estos resultados.

7.2.1. Desarrollo de método para identificación de metabolitos de Clenbuterol.

Hasta la fecha, se ha descrito e identificado un total de 5 metabolitos de Clenbuterol en orina de rata después de una dosis única de Clenbuterol (Domínguez-Romero et al., 2013), sin embargo, no existe un método para la determinación de estos. Por lo tanto, para nuestro propósito, LC-QqQ-MS fue la primera opción a seleccionar, ya que esta técnica se caracteriza por una alta selectividad y especificidad mediante el uso de SRM, donde se pueden seleccionar pares de iones precursores/iones producto. Las condiciones cromatográficas iniciales fueron adaptadas.

(Domínguez-Romero et al., 2013). Teniendo en cuenta que no hay estándares comerciales disponibles, las transiciones se obtuvieron utilizando orina de ratas alimentadas con Clenbuterol en la dosis más alta del ciclo de dopaje. Para cada metabolito Clenbuterol, se seleccionó un par de transiciones utilizando el software optimizador de Agilent (Tabla 15). A partir de estas transiciones, se seleccionó el más abundante para la integración del pico denominado "transición cuantificadora", mientras que el izquierdo se usó como "transición identificadora" para obtener la confirmación del metabolito Clenbuterol.

Los espectros de fragmentación de cada metabolito de Clenbuterol se explicaron claramente siguiendo el documento de (Domínguez-Romero et al., 2013). El Clen-M1, el producto de la conjugación de sulfato (Figura 15), mostró dos fragmentos específicos: m/z 84.0 del grupo sulfato y m/z 70.0 de la formación de pirrolidina. Con respecto al Clen-M2, se observó

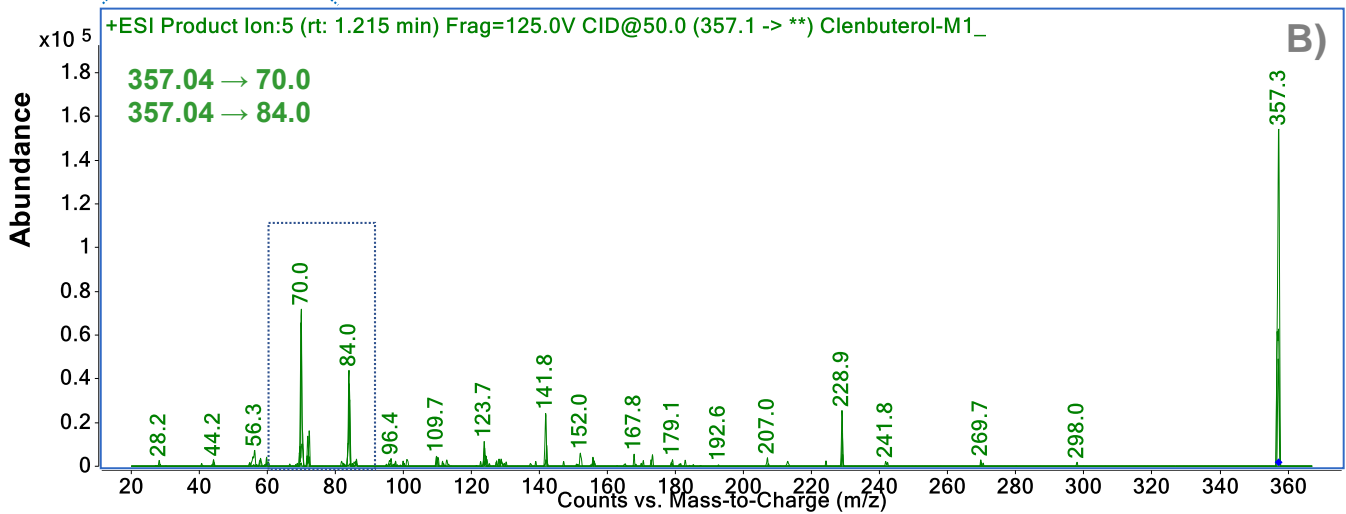
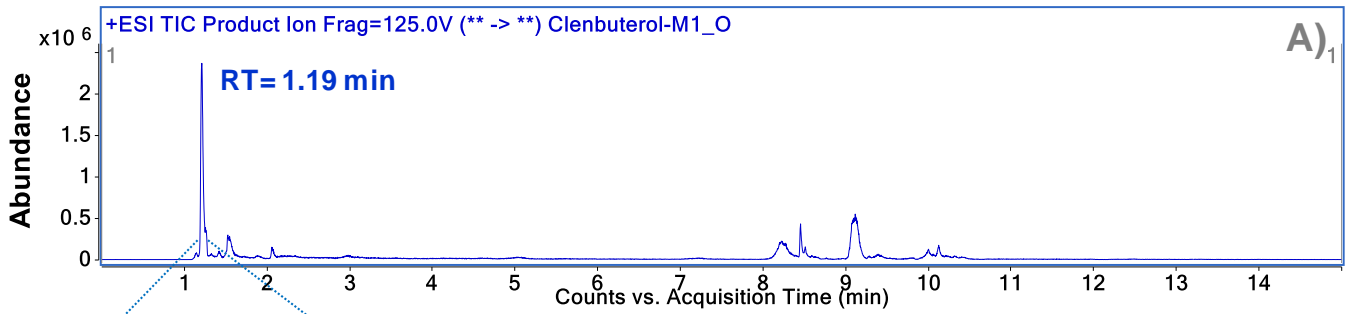
nuevamente la formación de m/z 70.0, junto con m/z 91.0 correspondiente a la anilina después de una reacción de radicales libres (Figura 16). Además, el metabolito glucurónico Clen-M3 mostró una escisión inductiva simple que dio como resultado la pérdida de una molécula de agua que dio como resultado m/z 435.0 y el fragmento de la cadena alifática de Clenbuterol que muestra m/z 100.1 (Figura 17). El Clen-M4 también mostró la formación de pirrolidina m/z 70.0 y el fragmento m/z 120.1 de la cadena alifática de Clenbuterol después de la oxidación (Figura 18). Además, Clen-M5 mostró una fragmentación muy baja; sin embargo, el informe del optimizador mostró una única transición m/z 59.0 de la oxi-amina (Figura 19).

Finalmente, se obtuvo el espectro de fragmentación del estándar de Clenbuterol (Figura 20). Los fragmentos típicos m/z 202.9 y m/z 259.0 correspondieron a la pérdida de la cadena alifática y la pérdida de una molécula de agua debido a una simple escisión inductiva, respectivamente. Los tiempos de retención de Clenbuterol y Clenbuterol-metabolitos fueron cercanos al trabajo anterior (Domínguez-Romero et al., 2013), las pequeñas diferencias se deben a las características de la columna cromatográfica.

Tabla 15. Transiciones SRM dinámicas para Clen y Clen-metabolitos

Tipo*	Compuesto	Ion precursor	Ion producto	Voltage de fragmentador (V)	Energía de colisión (V)	RT ^{&} (min)
Cuantificador	Clen-M1	357.05	70.00	125	49	1.19
	Clen-M2	293.08	90.90	145	33	5.75
	Clen-M3	453.12	99.90	165	41	8.39
	Clen-M4	263.00	119.90	90	25	8.29
	Clen-M5	307.06	307.06	215	25	9.96
	Clenbuterol	277.09	202.80	95	17	1.19
Identificador	Clen-M1	357.05	84.00	125	37	1.19
	Clen-M2	293.08	70.00	145	50	5.75
	Clen-M3	453.12	435.20	165	25	8.39
	Clen-M4	263.00	70.00	90	45	8.29
	Clen-M5	307.06	59.00	170	37	

NOTA: * Tipo de transición, Cuantificador significa la transición utilizada para el cálculo del área, Identificador significa la transición utilizada para la identificación; & RT, tiempo de retención; Tiempo de espera, fue de 200 para todas las transiciones.



M1-Sulfate conjugation of Clen

Metabolite 1

m/z = 357.1

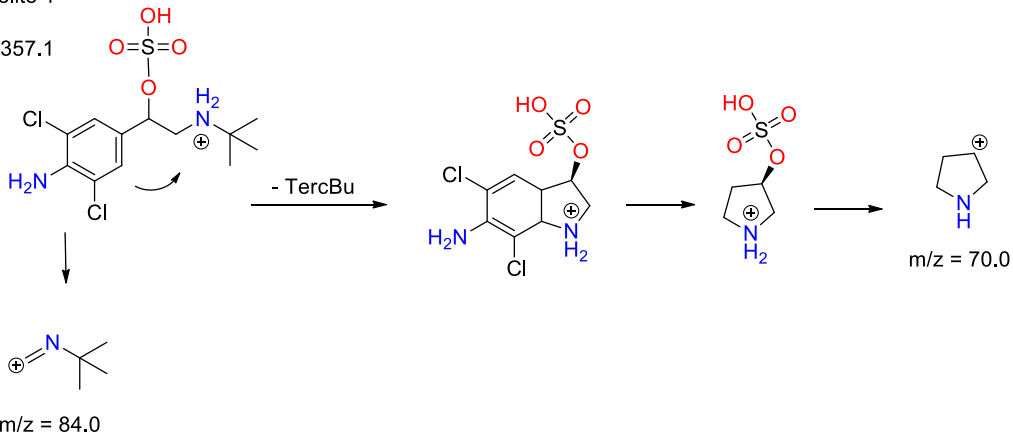


Figura 15.(a-c) Resultados del "Optimizer" de Clen-M1 (conjugación de sulfato). a) Cromatograma de iones del producto; b) Espectro de fragmentación; c) Mecanismo de fragmentación

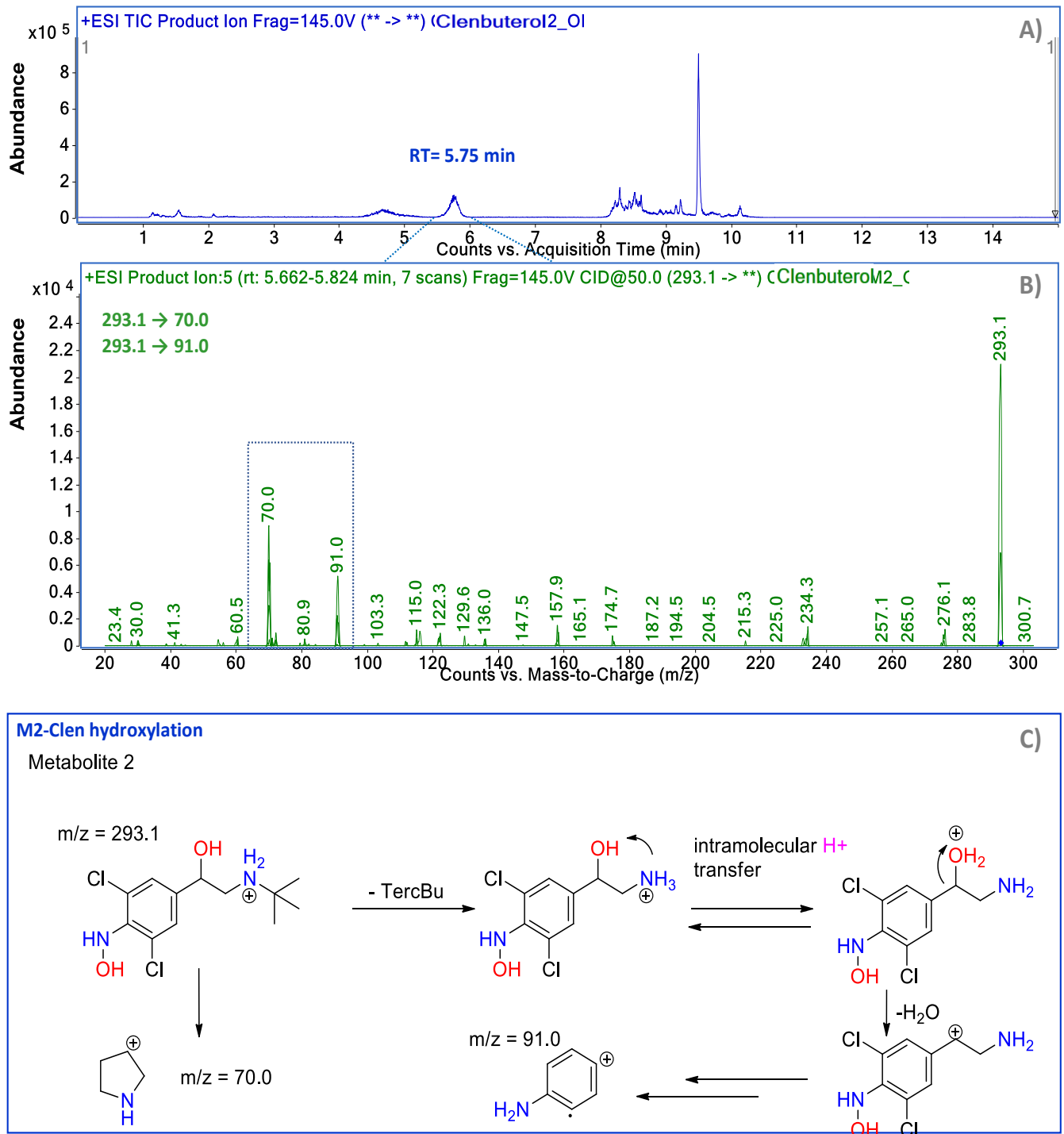


Figura 16.(a-c) Resultados del "Optimizer" de Clen-M2 (hidroxilación). a) Cromatograma de iones del producto; b) Espectro de fragmentación; c) Mecanismo de fragmentación.

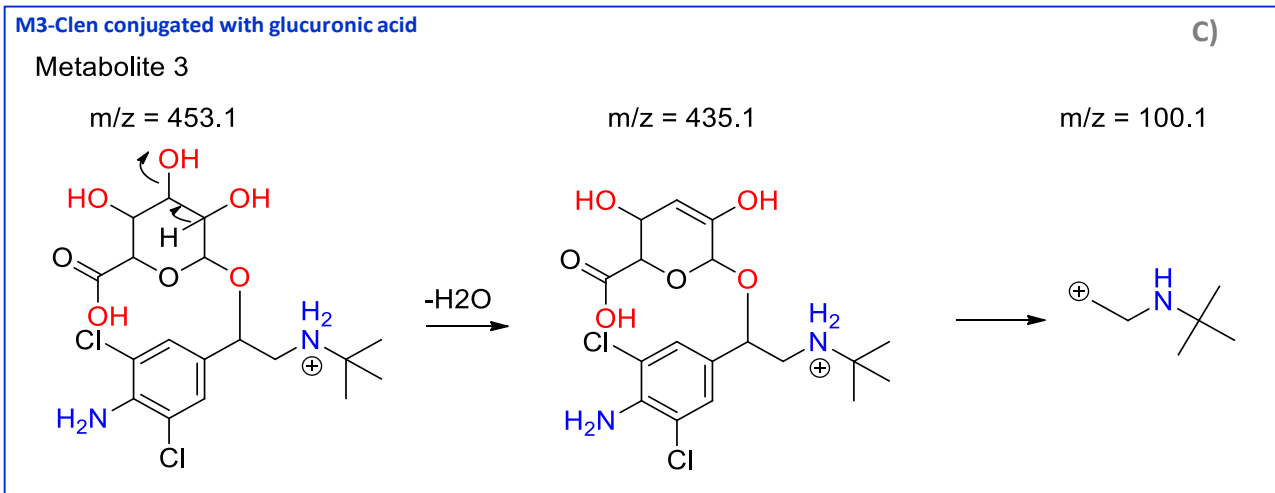
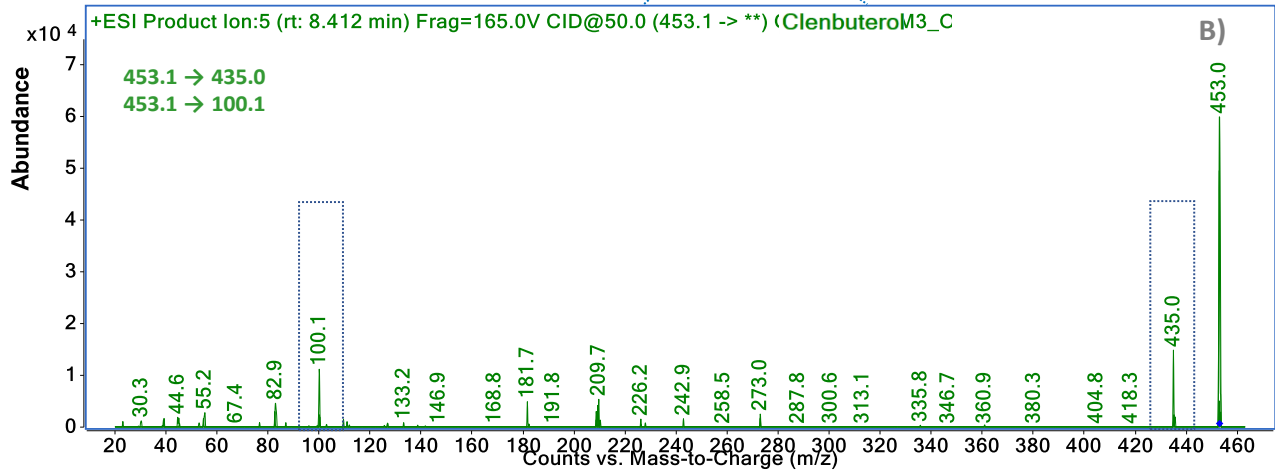
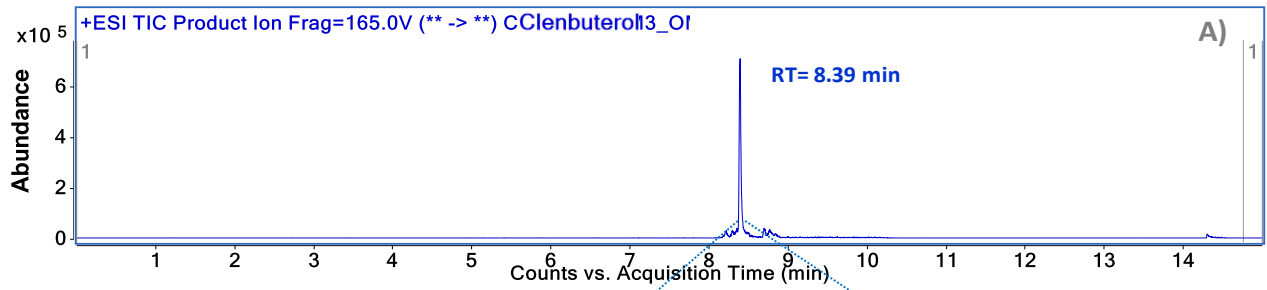


Figura 17.(a-c) Resultados del "Optimizer" de Clen-M3 (conjugación con ácido glucurónico). a) Cromatograma de iones del producto; b) Espectro de fragmentación; c) Mecanismo de fragmentación.

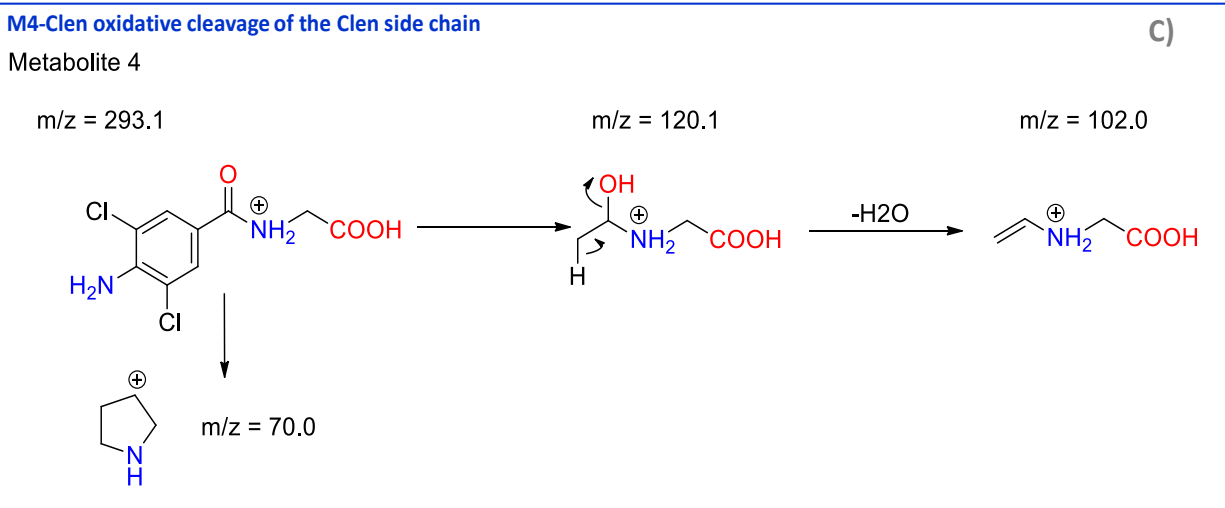
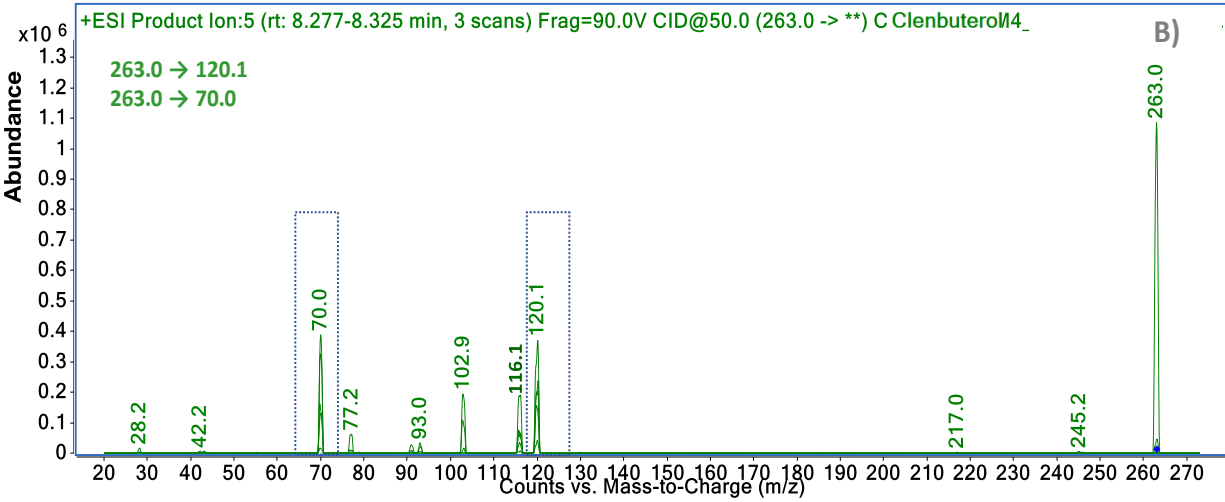
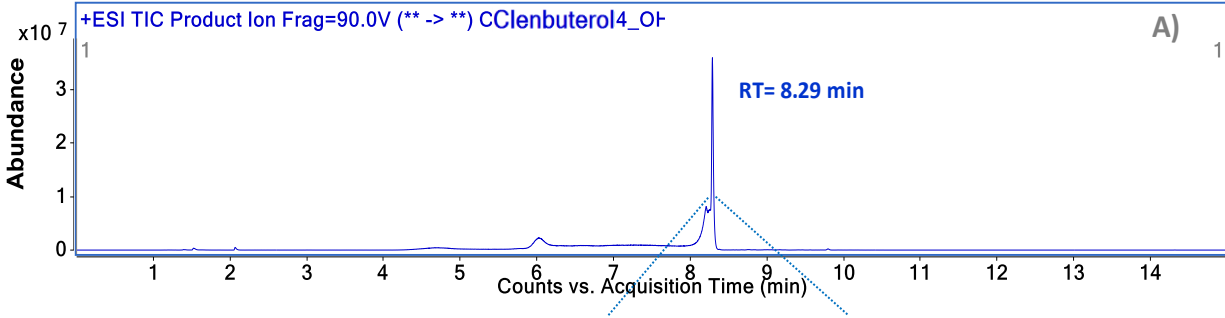
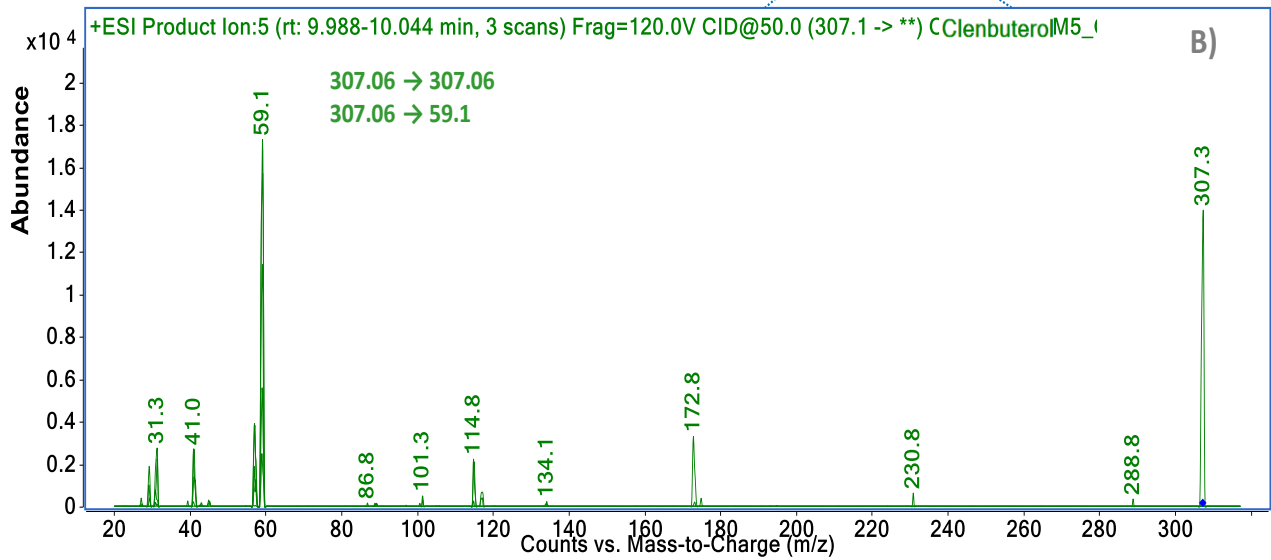
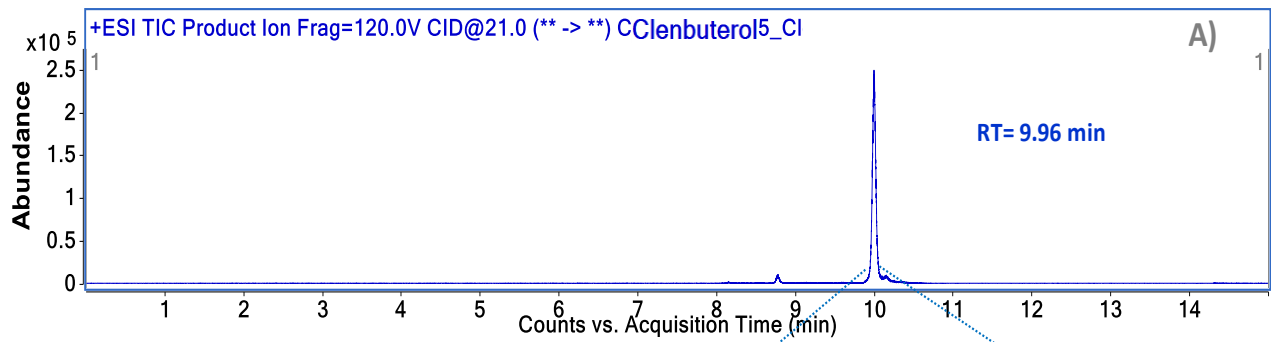


Figura 18. (a-c). Resultados del "Optimizer" de Clen-M4 (Oxidación). a) Cromatograma de iones del producto; b) Espectro de fragmentación; c) Mecanismo de fragmentación.



M5-Clen oxidation of the amine group in the aromatic ring

Metabolite 5

m/z = 307.1

m/z = 59.1

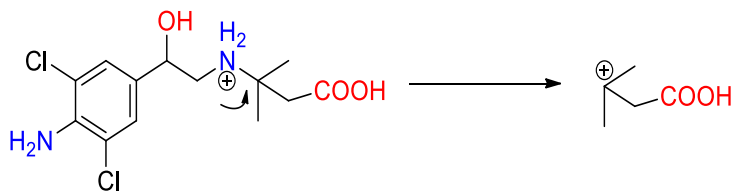


Figura 19. (a-c) Resultados del "Optimizer" de Clen-M5 (oxidación del grupo amina). a) Cromatograma de iones del producto; b) Espectro de fragmentación; c) Mecanismo de fragmentación.

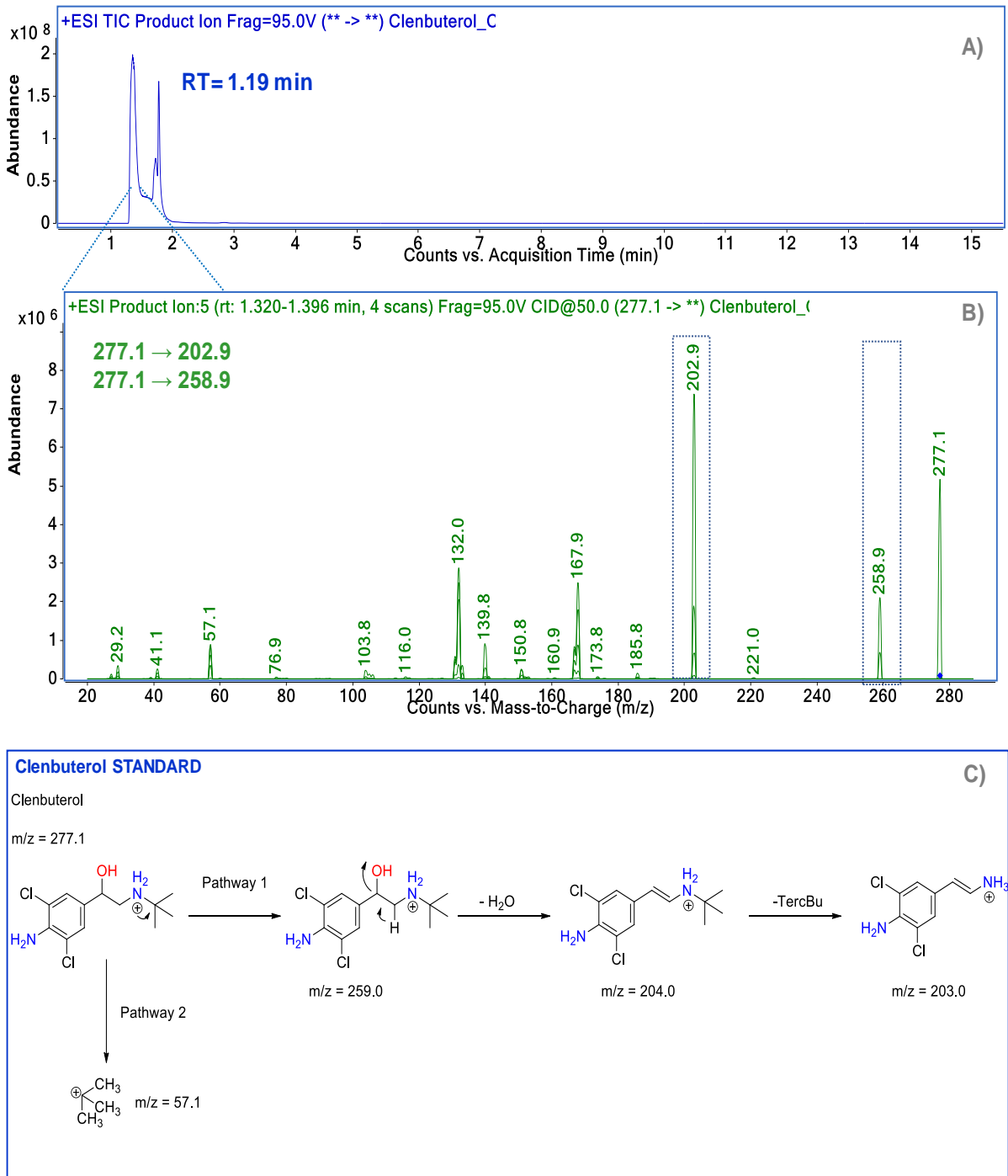


Figura 20. Resultados del “Optimizer” de estándar de Clenbuterol. A) Cromatograma de iones del producto; B) Espectro de fragmentación; C) Mecanismo de fragmentación.

7.2.2. Aplicación del método para identificación de metabolitos de Clembuterol.

Una vez establecidas las condiciones analíticas, se midieron las muestras. Teniendo en cuenta que para algunas ratas no fue posible recolectar orina, se aplicó una prueba de ANOVA de una vía con medidas repetidas a cada día del estudio para buscar diferencias estadísticas que pudieran discriminar el origen de los metabolitos de Clembuterol en la orina (Figura 22). En la figura 22 observamos que Clen-M5 y Clen-M3 son los metabolitos con la mayor respuesta analítica en la orina. Estos correspondieron al metabolito después de la oxidación del grupo amina en el anillo aromático y el metabolito con la conjugación glucurónica, respectivamente. Además, se encontraron diferencias estadísticas en Clen-M5 de la ingesta de medicamentos en comparación con la ingesta de carne a los días 1 y 7. El metabolito Clen-M4 se encontró significativo en los días 1 y 6 entre el consumo de medicamento y la carne contaminada con clembuterol. Finalmente, las diferencias en Clembuterol después del consumo de medicamento y carne se encontraron en el día 4, estos resultados sugieren un uso potencial de estos metabolitos como biomarcadores para distinguir entre el dopaje y la ingesta de carne, eventualmente esto podría aplicarse a muestras de orina humana.

Estos cambios pueden explicarse por el hecho de que la estereoselectividad en el metabolismo de los xenobióticos quirales es bien conocida, diferentes mecanismos enzimáticos pueden discriminar entre enantiómeros y afectar las reacciones de la fase I y la fase II en el metabolismo del hígado (Nguyen et al., 2006; Shen et al., 2013). Hay muchas formas que involucran interacciones bioquímicas; estos pueden ser a través de la sustancia quiral original, una sustancia proquiral capaz de cambiar o crear un derivado quiral y someterse a otra transformación quiral (Lu, 2007). Un producto con un centro quiral puede transformarse en un nuevo centro asimétrico dado un producto diastereoisómeros que posteriormente tiene biotransformación (Alonen et al., 2009; Lu, 2007; Shen et al., 2013).

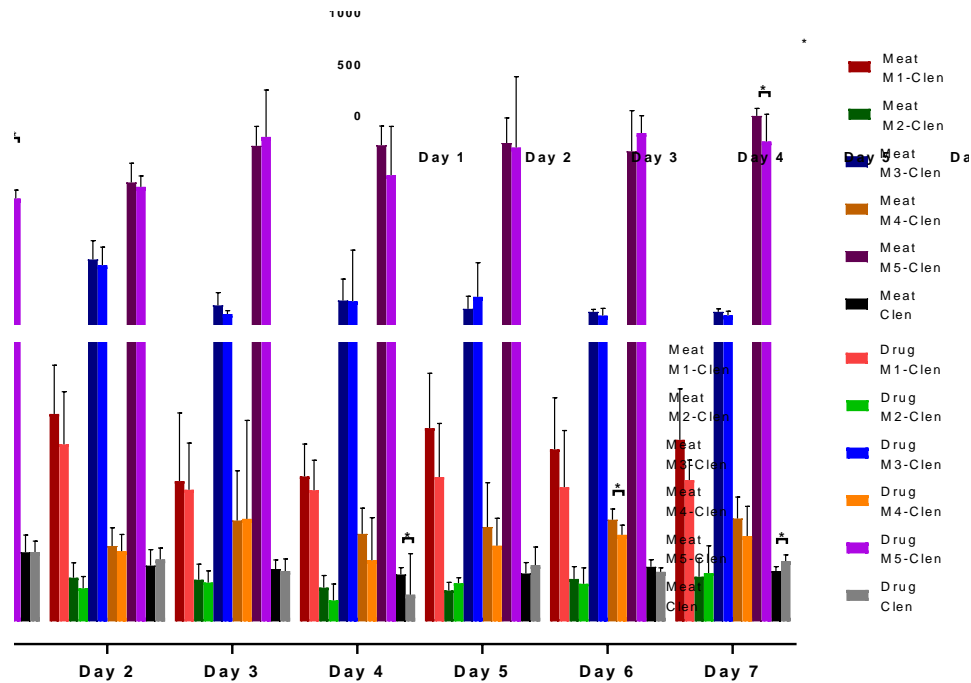


Figura 22. Datos después de mediciones repetidas de ANOVA de una vía

Algunos agonistas β -adrenérgicos como el salbutamol contienen un centro quiral y se utilizan en la práctica clínica como una mezcla de racematos de igual proporción de enantiómeros, la interacción de los enantiómeros con las biomoléculas como las enzimas no se diferencia hasta que se metabolizan; la identificación puede aparecer en el momento de la unión o de la catálisis, lo que proporciona distintas reactividades para ambos enantiómeros; algunos pueden ser similares con el clenbuterol debido a que comparte propiedades fisicoquímicas con el salbutamol (Lu, 2007).

Se encontró CLEN-M4 más arriba en el grupo de la carne; esta diferencia podría explicarse debido a la creencia enantioselectiva; los fármacos quirales como el clenbuterol tienen un metabolismo estereoselectivo, siendo un enantiómero más activo que el otro, en el caso de los agonistas β , los isómeros R-(-) son más activos biológicamente y el objetivo de la oxidación de los citocromos (Hermansson, 1983; Nguyen et al., 2006; Shen et al., 2013) las enzimas responsables de la mayoría de las reacciones del metabolismo xenobiótico son proteínas que

comparten un grupo hemo en la región catalítica, muestran muchos sitios polimórficos que varían entre individuos y presentan características particulares que discriminan la biotransformación de los enantiómeros (Lu, 2007; Marzo & Heftmann, 2002). Clen-M5 fue el metabolito más abundante en la orina.

En previos se encontró que el metabolito más abundante después de la exposición a una dosis única fue el Clen-M2 (Domínguez-Romero et al., 2013; Shen et al., 2013; Zalko et al., 1998), pero en nuestro caso Clen-M5 fue el más abundante, este metabolito puede formarse fácilmente por la oxidación a partir de Clen-M2 que se forma a través de la vía de N-hidroxilación no saturada con altas cantidades de clenbuterol en comparación con otras vías metabólicas (Domínguez-Romero et al., 2013; Shen et al., 2013; Zalko et al., 1998), demostró que la N-oxidación (Clen-M5) se encuentra inmediatamente después la recolección de orina esta puede verse afectada por las condiciones de elución, el tipo de columna y el pH de la fase móvil, ya que Clen-M5 se retiene en las columnas C8 (Domínguez-Romero et al., 2013; Shen et al., 2013; Zalko et al., 1998) y podría formarse por el proceso (Domínguez-Romero et al., 2013; Shen et al., 2013; Zalko et al., 1998).

En otros estudios se ha encontrado que en administraciones intramusculares prologadas de Clenbuterol en ratas aumentaron la tasa de glucuronidación de p-nitrofenol (Nebbia et al 1991), pero no tuvieron efectos aparentes sobre las biotransformaciones oxidativas o su conjugación con glutatión. En cuanto a los pollos, un pequeño aumento en la concentración de citocromo P-450 se reportó en pollos de engorde alimentados con una dieta que contiene 0-33 ppm de clenbuterol por dos semanas (Takahashi et al 1993).

En el día 7 el clenbuterol total, es mayor en el grupo de medicamento con respecto al grupo de la carne, incluso cuando la carne contiene más clenbuterol, aumentamos gradualmente la dosis de clenbuterol durante los días de tratamiento, por lo que esto puede favorecer al clenbuterol en un proceso de bioacumulación, se sabe que esta molécula es altamente residual (Jecfa, 2014) y se acumula en muchos tejidos como el hígado, riñón, ojo, pulmones y músculo (G Brambilla et al., 2000), el clenbuterol también permanece en el cuerpo y es susceptible de recirculación hepática y metabolismo. Se necesitan más experimentos para

validar estos resultados. Sin embargo, estos metabolitos como biomarcadores permiten discriminar en este modelo animal entre el dopaje y la ingesta de carne.

7.3.1. Determinación de indicadores de estrés oxidativo y daño celular

Uno de los objetivos del presente trabajo fue encontrar marcadores de estrés oxidativo o daño celular que permitieran discriminar el origen de Clembuterol en plasma o tejidos. Para ello se determinaron varios indicadores. Como primer paso se realizó un análisis multivariado (correlación) de los indicadores de estrés oxidativo y daño celular con el tratamiento. Los resultados se pueden observar en la tabla 16.

Tabla 16- Correlaciones de indicadores de estrés oxidativo, daño celular y tratamiento.

	Bazo	Corazón	GPT	GPx	GR	Hígado	8-iso-pgf2a	LDH	Plasma	Pulmón (gsh)	Riñón (gsh)	Tratamiento	Gg_gt
Bazo (GSH)		-0.0999	-0.1247	-0.1421	0.4135	-0.2183	0.1386	-0.1511	0.049	0.1649	0.1522	-0.0552	0.0298
		0.6422	0.5616	0.5076	0.0446	0.3054	0.5182	0.4809	0.8203	0.4412	0.4777	0.798	0.89
Corazón (GSH)	-0.0999		0.1076	-0.0497	-0.1677	0.1051	-0.0796	-0.069	-0.094	-0.1042	-0.0883	0.2219	0.0897
	0.6422		0.6167	0.8178	0.4334	0.625	0.7116	0.7485	0.6622	0.6281	0.6815	0.2974	0.6767
GPT	-0.1247	0.1076		0.045	-0.172	0.3182	0.043	-0.3723	-0.1601	0.2529	0.2943	-0.2291	-0.2177
	0.5616	0.6167		0.8348	0.4216	0.1297	0.8418	0.0732	0.455	0.2332	0.1627	0.2816	0.3068
GPX	-0.1421	-0.0497	0.045		-0.3033	-0.3237	0.1362	0.0431	0.2637	-0.2034	-0.3412	-0.5182	-0.0832
	0.5076	0.8178	0.8348		0.1497	0.1228	0.5258	0.8413	0.2131	0.3405	0.1027	0.0095	0.6991
GR	0.4135	-0.1677	-0.172	-0.3033		0.1533	0.0438	-0.2437	0.0593	-0.2146	0.4639	-0.0647	-0.3334
	0.0446	0.4334	0.4216	0.1497		0.4744	0.8391	0.2511	0.7831	0.314	0.0224	0.7639	0.1114
Hígado (GSH)	-0.2183	0.1051	0.3182	-0.3237	0.1533		-0.2659	0.0135	-0.0248	0.077	0.4387	0.2549	0.0095
	0.3054	0.625	0.1297	0.1228	0.4744		0.2091	0.95	0.9085	0.7207	0.032	0.2293	0.965
8-ISO-PGF2a (pg/mL)	0.1386	-0.0796	0.043	0.1362	0.0438	-0.2659		-0.2943	0.0513	0.0211	-0.2156	0.0345	-0.1185
	0.5182	0.7116	0.8418	0.5258	0.8391	0.2091		0.1628	0.812	0.9221	0.3117	0.8728	0.5813
LDH	-0.1511	-0.069	-0.3723	0.0431	-0.2437	0.0135	-0.2943		-0.2903	-0.1721	-0.1819	0.1618	0.4611
	0.4809	0.7485	0.0732	0.8413	0.2511	0.95	0.1628		0.1688	0.4213	0.395	0.45	0.0233
Plasma (GSH)	0.049	-0.094	-0.1601	0.2637	0.0593	-0.0248	0.0513	-0.2903		-0.1707	-0.1221	-0.3329	-0.2717
	0.8203	0.6622	0.455	0.2131	0.7831	0.9085	0.812	0.1688		0.4251	0.5697	0.1119	0.199
Pulmón (GSH)	0.1649	-0.1042	0.2529	-0.2034	-0.2146	0.077	0.0211	-0.1721	-0.1707		0.4805	0.3155	0.3442
	0.4412	0.6281	0.2332	0.3405	0.314	0.7207	0.9221	0.4213	0.4251		0.0175	0.1332	0.0996
Riñón (GSH)	0.1522	-0.0883	0.2943	-0.3412	0.4639	0.4387	-0.2156	-0.1819	-0.1221	0.4805		0.2419	0.0723
	0.4777	0.6815	0.1627	0.1027	0.0224	0.032	0.3117	0.395	0.5697	0.0175		0.2547	0.737
Tratamiento	-0.0552	0.2219	-0.2291	-0.5182	-0.0647	0.2549	0.0345	0.1618	-0.3329	0.3155	0.2419		0.5517
	0.798	0.2974	0.2816	0.0095	0.7639	0.2293	0.8728	0.45	0.1119	0.1332	0.2547		0.0052
g_GT	0.0298	0.0897	-0.2177	-0.0832	-0.3334	0.0095	-0.1185	0.4611	-0.2717	0.3442	0.0723	0.5517	
	0.89	0.6767	0.3068	0.6991	0.1114	0.965	0.5813	0.0233	0.199	0.0996	0.737	0.0052	

Correlación, Valor-P.

En la tabla 16 se muestra las correlaciones momento producto de Pearson, entre cada par de variables. El rango de estos coeficientes de correlación va de -1 a +1, miden la fuerza de la relación lineal entre las variables. El segundo número en cada bloque de la tabla es un valor-P que prueba la significancia estadística de las correlaciones estimadas. Valores-P abajo de 0.05 indican correlaciones significativamente diferentes de cero, con un nivel de confianza del

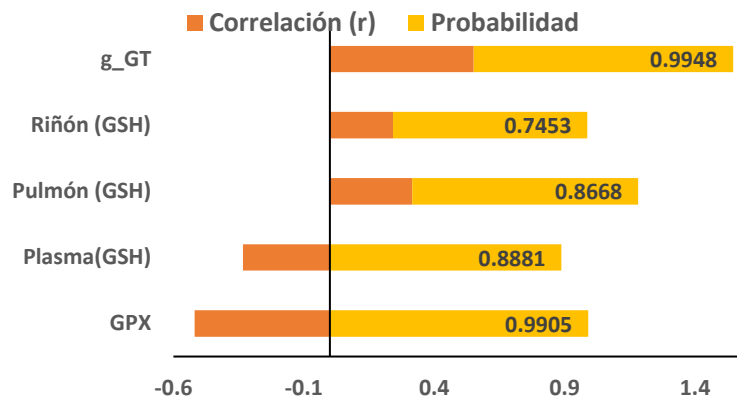


Figura 23. Correlación de tratamiento con indicadores de daño celular

95.0%. Los siguientes pares de variables tienen valores-P por debajo de 0.05: Bazo (GSH) y GR, GPx y Tratamiento, GR y Riñón (GSH), Hígado (GSH) y Riñón (GSH), LDH y γ _GT, Pulmón (GSH) y Riñón (GSH), Tratamiento y γ _GT.

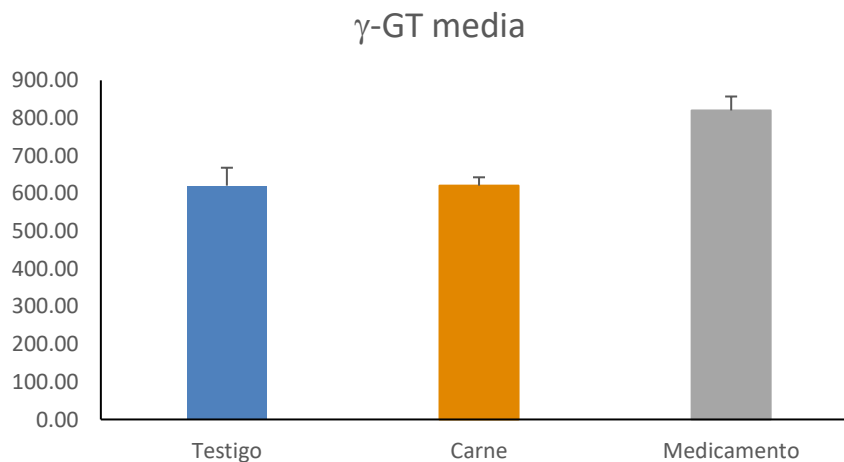


Figura 24. Comportamiento de γ -GT por tratamiento en ratas macho

En la figura 23 se observa la correlación y el nivel de probabilidad de los indicadores con el tratamiento. Se encontró una diferencia significativa con 5 indicadores, sin embargo, γ -GT presento una correlación positiva y una probabilidad mayor. Posteriormente se realizó un estudio ANOVA Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de γ -GT entre un nivel de Tratamiento y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

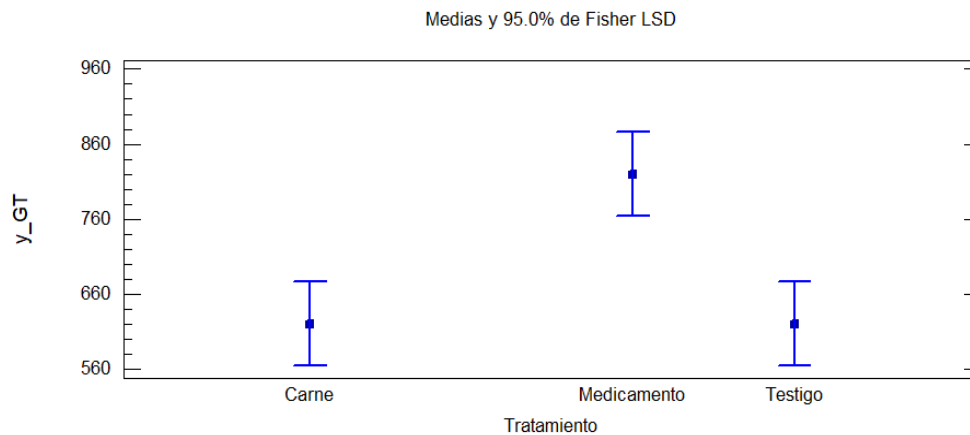


Figura 25. Gráfico de medias de γ -GT entre un nivel de tratamiento

La administración oral prolongada de clenbuterol a pollos de engorde hembra deprime selectivamente el metabolismo hepático in vitro de ciertos sustratos (Nebbia, Dacasto, Ceppa, & Roncada, 1996). La gamma-glutamilttransferasa (γ -GT) es un biomarcador de la enfermedad hepática y el estrés oxidativo.

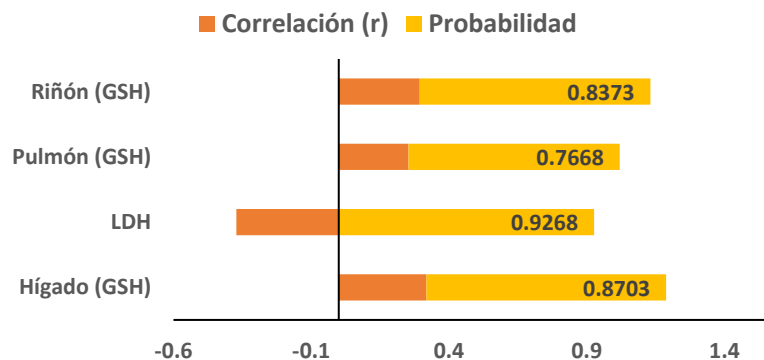


Figura 26. Correlación de GPT con Indicadores de Daño Celular

En la figura 26 se observa que existe un valor de correlación y probabilidad elevado con GPT y LDH

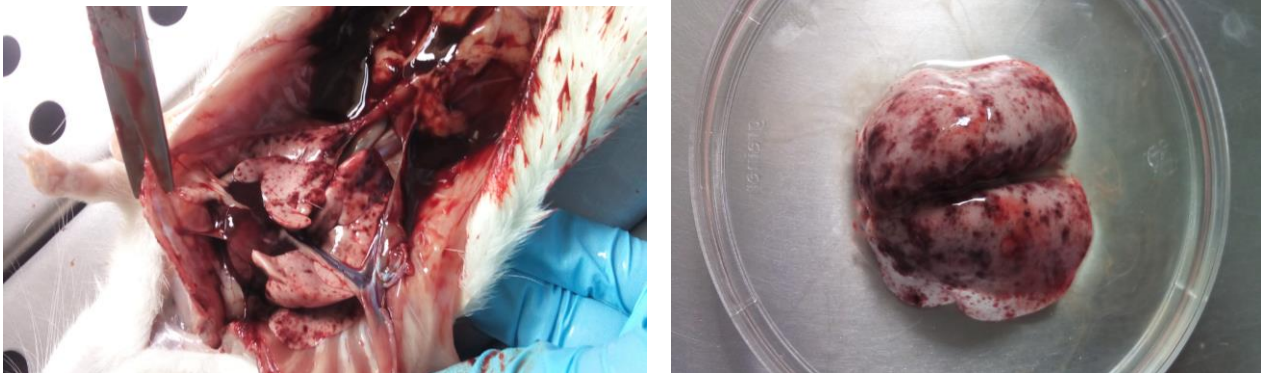


Figura 27. Fotos de pulmón de ratas macho tratadas con clenbuterol (Ventipulmin®) después de 7 días

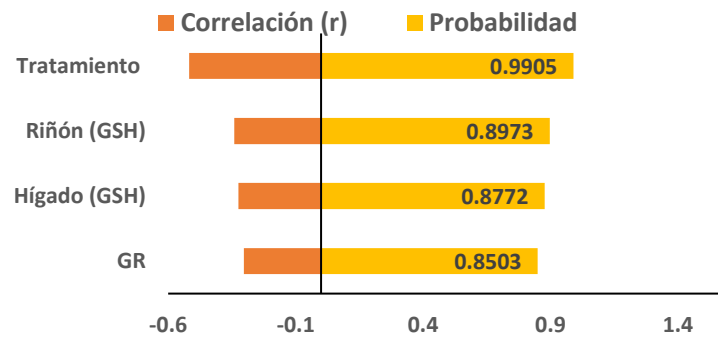


Figura 28. Correlación de GPx con Indicadores de Daño Celular

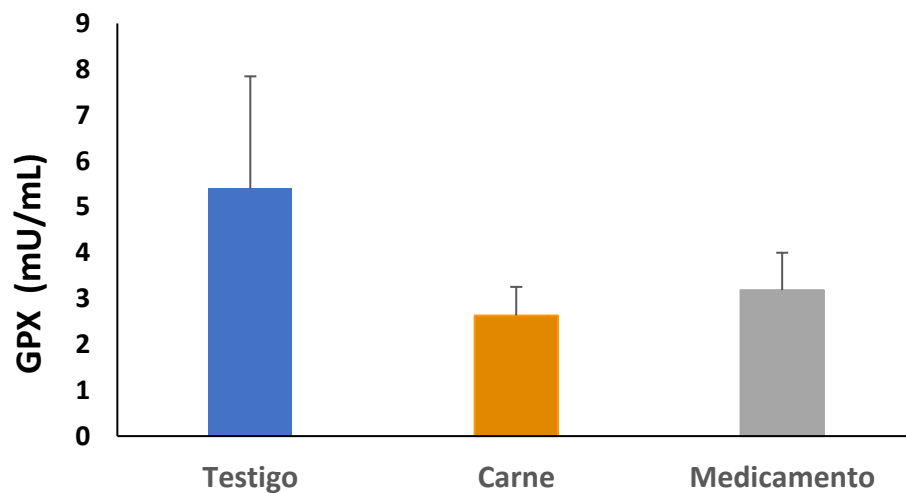


Figura 29. Comportamiento de GPx por tratamiento en ratas macho

En la figura 29 se observa que el tratamiento y GPx no presentan diferencia significativa entre grupos.

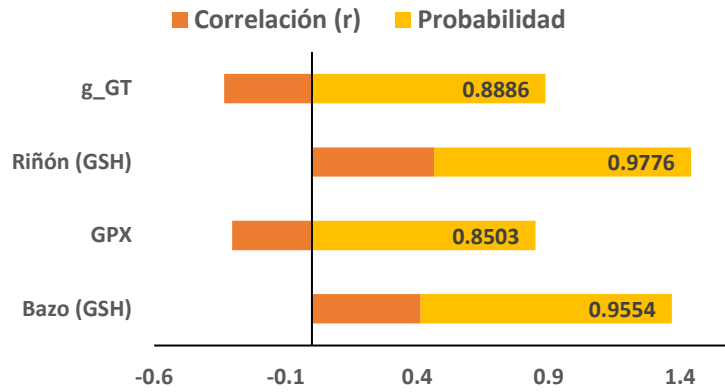


Figura 30. Correlación de GR con Indicadores de Daño Celular

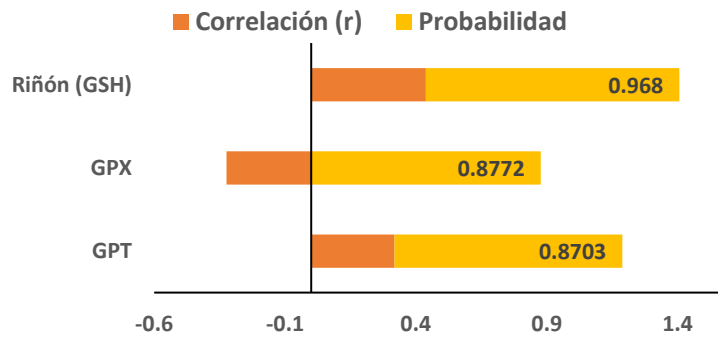


Figura 31. Correlación de Hígado (GSH) con Indicadores de Daño Celular

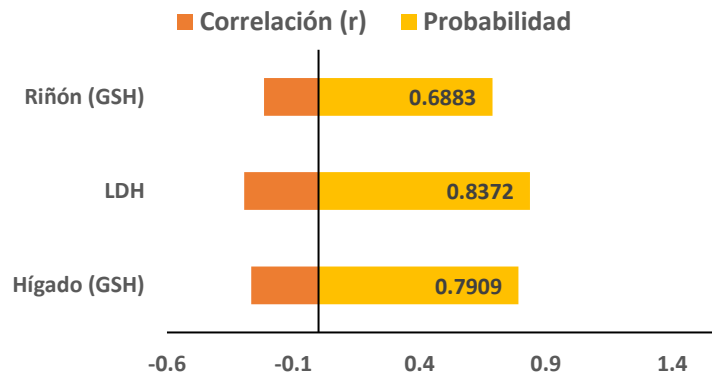


Figura 32. Correlación de 8-iso-PGF2a con Indicadores de Daño Celular

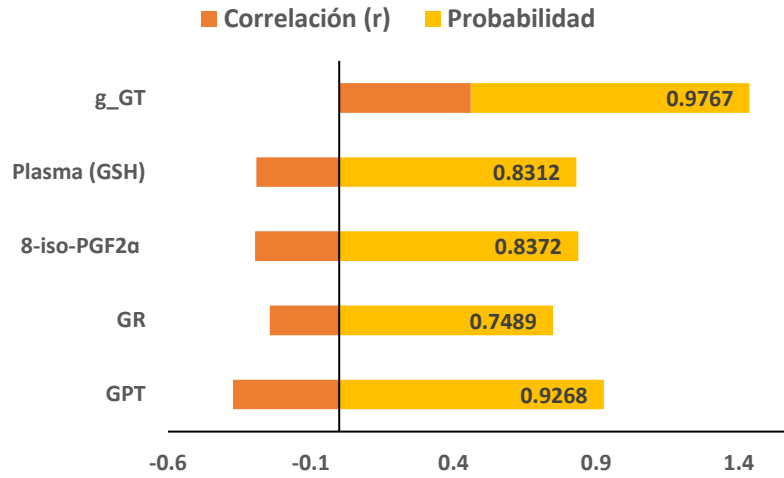


Figura 33. Correlación de LDH con Indicadores de Daño Celular

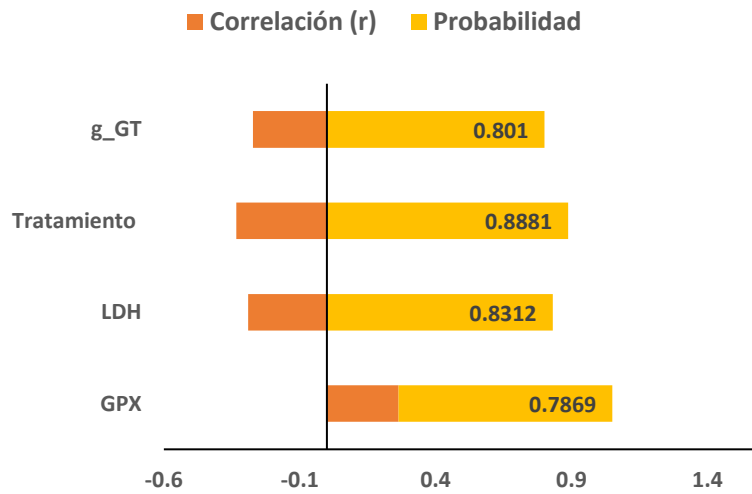


Figura 34. Correlación de Plasma (GSH) con Indicadores de Daño Celular

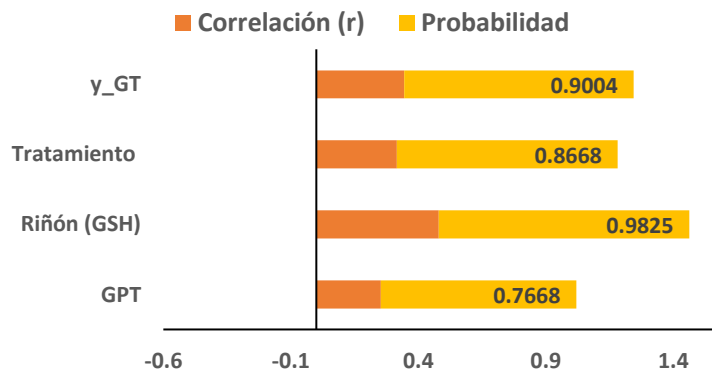


Figura 35. Correlación de Pulmón (GSH) con Indicadores de Daño Celular

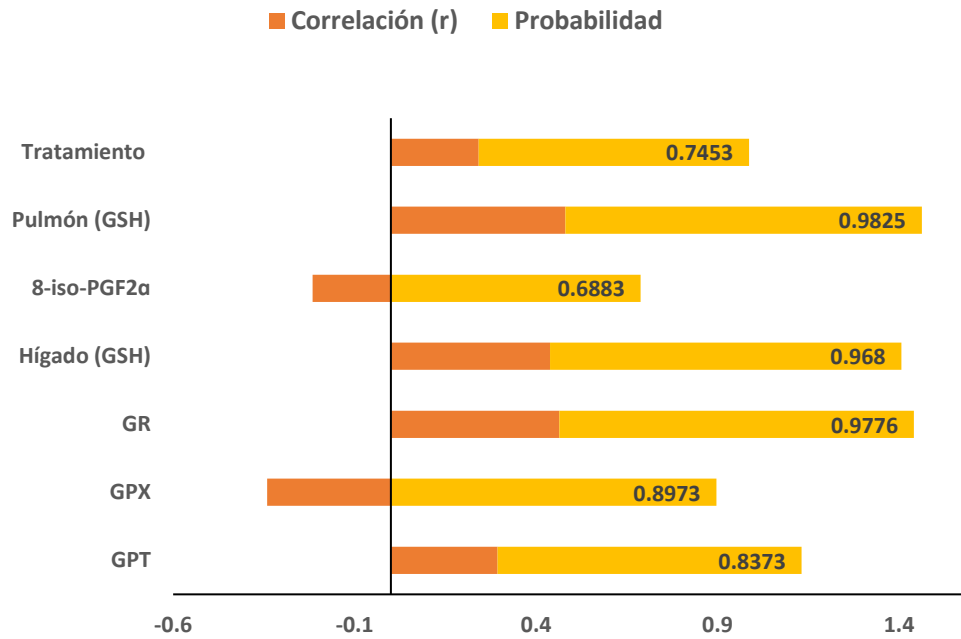


Figura 36. Correlación de Riñón (GSH) con Indicadores de Daño Celular

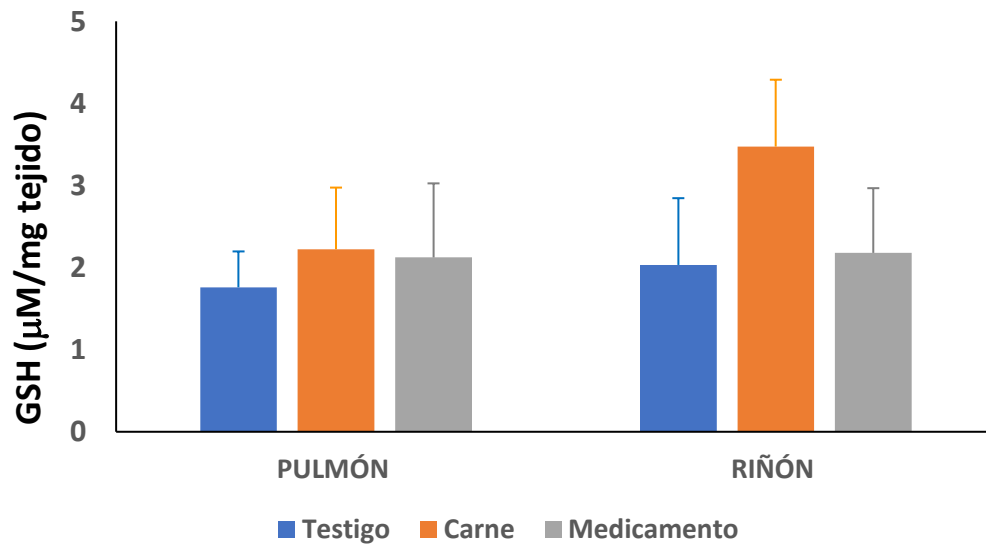


Figura 37. Comportamiento de GSH por tratamiento en ratas macho

En la figura 37 se observa que no existe diferencia significativa entre GSH ($\mu\text{M}/\text{mg}$ tejido) de pulmón y riñón en ratas macho.

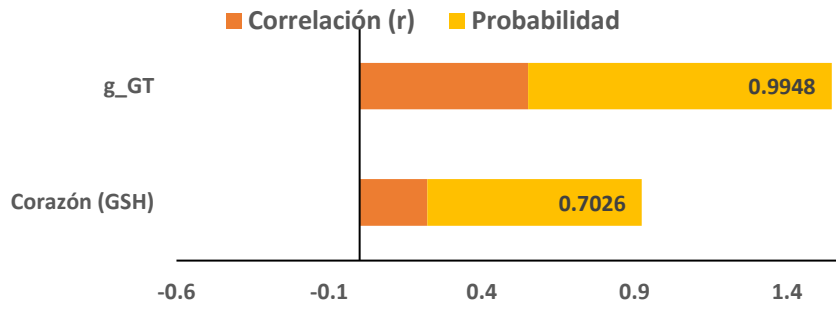


Figura 38. Correlación de Tratamiento con Indicadores de Daño Celular

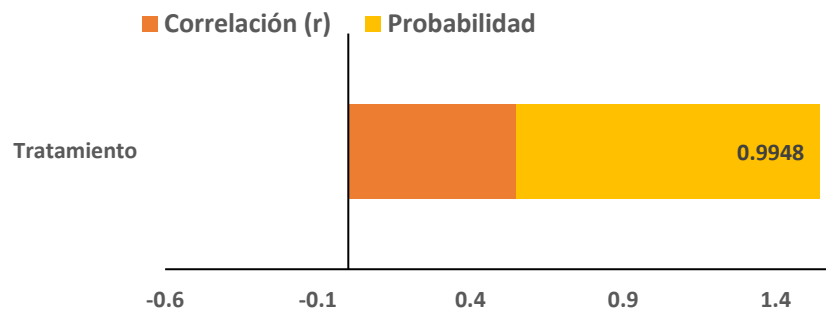


Figura 39. Correlación de γ -GT con Indicadores de Daño Celular

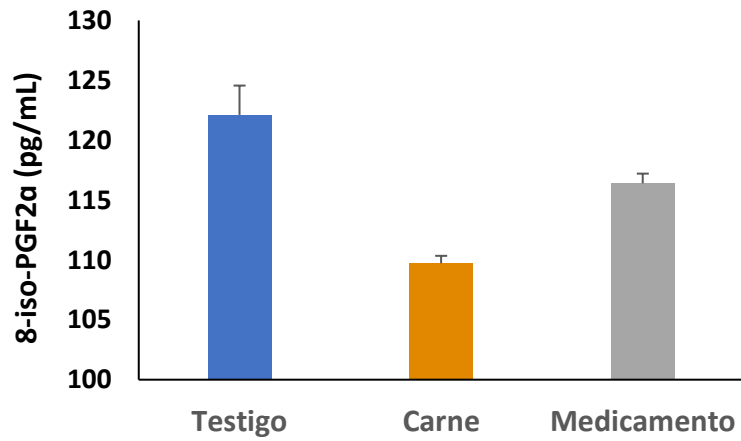


Figura 40. Cantidad de isoprostanos (8-iso-PGF2a) según tratamiento

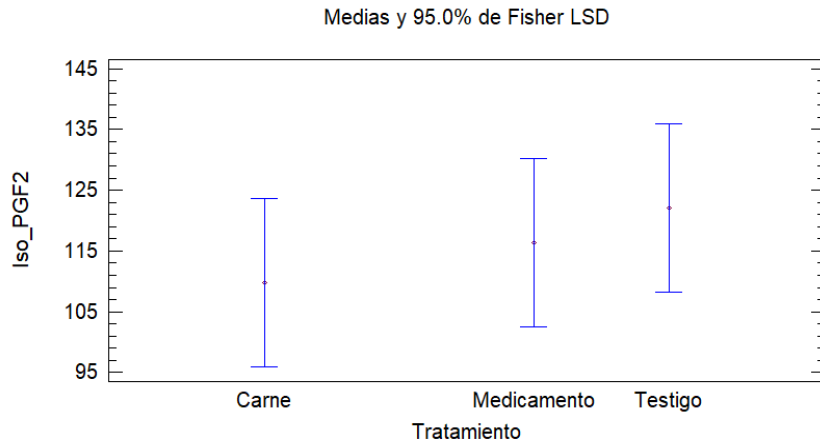


Figura 41. Gráfico de medias de la cantidad de isoprostanos (8-iso-PGF2a) según el tratamiento.

Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Iso_PGF2 entre un nivel de Tratamiento y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

Se realizó un análisis mediante ANOVA para comparar la concentración GSH en diferentes tejidos en ratas wistar macho y hembra.

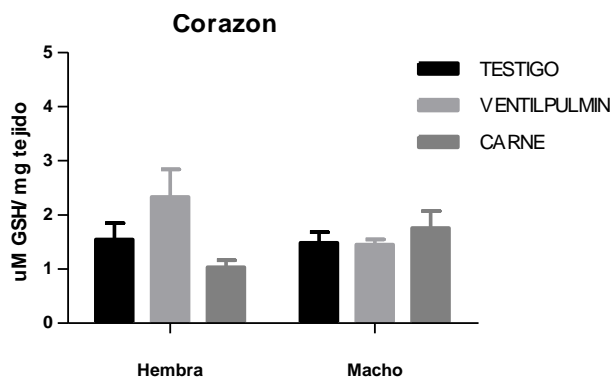


Figura 42. Contenido de glutatión en corazón de ratas alimentadas con Clembuterol, las barras muestran el promedio y la desviación estándar de cada grupo n=6, se realizó el análisis mediante ANOVA de dos vías y el contraste de medias mediante la prueba de bondad y ajuste Bonferroni.

Los resultados de este análisis muestran que el efecto del tratamiento es decir el consumo de clembuterol no tiene el mismo efecto en hembras como en machos $p=0.0302$, sin embargo, el

consumo de clenbuterol no afecta significativamente el contenido de GSH en el corazón $p=0.2143$ de mismo modo el género no influye en el contenido de GSH $p=0.7683$.

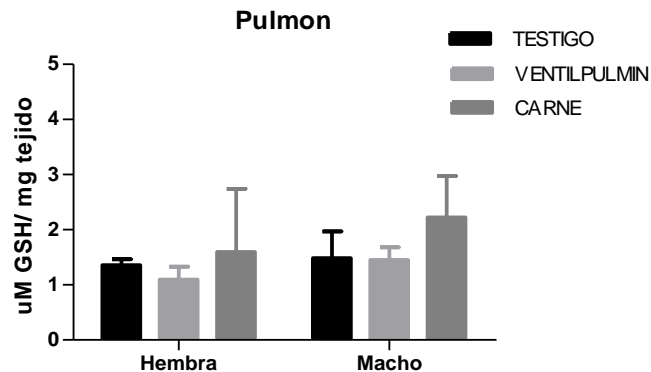


Figura 43. Contenido de glutatión en pulmón de ratas alimentadas con Clembuterol, las barras muestran el promedio y la desviación estándar de cada grupo $n=6$ el análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de dos vías y el contraste de medias mediante la prueba de Bondad y ajuste Bonferroni

No se encontró efecto de interacción entre el tratamiento y el género $p=0.6444$, también se encontró un efecto poco significativo entre el efecto del tratamiento y la cantidad de glutatión $p=0.0540$ del mismo modo se encontró poca relación entre la cantidad de glutatión y el género $p=0.0981$.

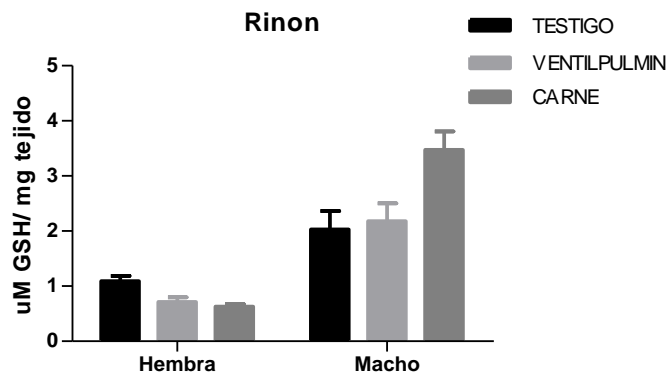


Figura 44. Contenido de glutatión en el riñón de ratas alimentadas con Clembuterol, las barras representan la media y la desviación estándar de cada grupo $n=6$, el análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de dos vías y el contraste de medias para determinar la interacción, se realizó mediante la prueba de bondad y ajuste Bonferroni.

Los resultados de este análisis muestran un efecto muy significativo entre el tratamiento es decir la alimentación y el género $p=0.0017$ afectando la alimentación la cantidad de glutatión $p=0.0437$, para este órgano en particular y este experimento el género afecta significativamente la cantidad de glutatión $p < 0.0001$.

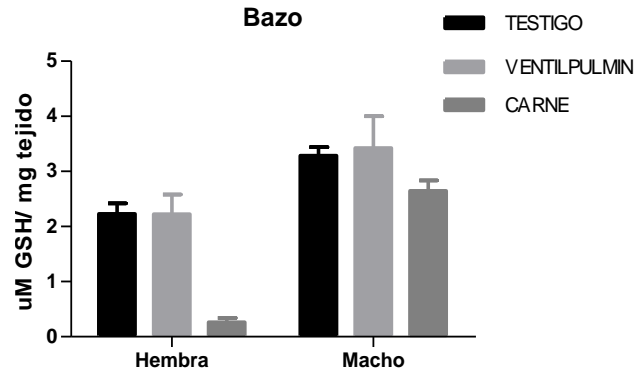


Figura 45. Contenido de glutatión en bazo de ratas alimentadas con Clembuterol, las barras representan la media y la desviación estándar de cada grupo $n=6$, el análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de dos vías y el contraste de medias con la prueba de Bonferroni.

Los resultados de este análisis muestran que el tratamiento afecta del mismo modo a hembras como a machos $p=0.0963$, sin embargo, se observa que el tratamiento afecta significativamente los niveles de glutatión para ambos géneros $p=0.0002$, siendo el género un factor que influye significativamente en el contenido de glutatión en bazo $p<0.0001$.

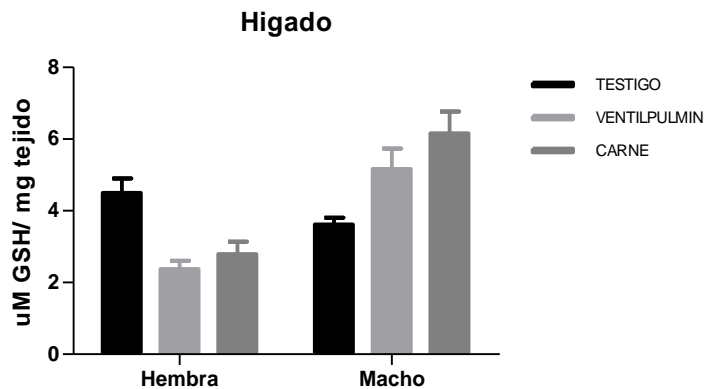


Figura 46. Contenido de glutatión en hígado de ratas alimentadas con bolos de Clembuterol, las barras representan la media y la desviación estándar de cada grupo $n=6$, el análisis estadístico se realizó mediante el ANOVA de dos vías y el contraste de medias con la prueba de Bonferroni.

Los resultados de este análisis indican que el tratamiento afecta de manera diferente en el contenido de glutatión en hígado para cada género $p=<0.001$, es decir la cantidad de glutatión es mayor en hembras. Sin embargo, no se observa un efecto significativo $p=0.2493$ entre el tratamiento y el contenido de glutatión en el hígado.

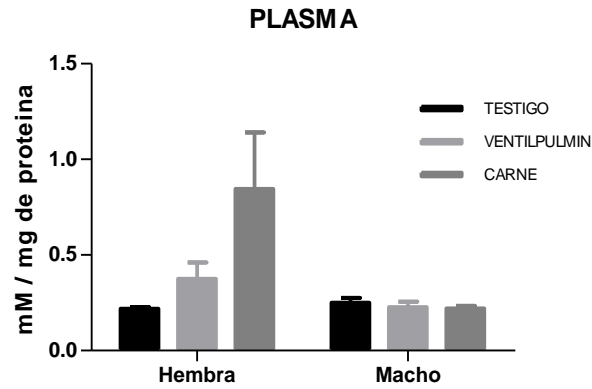


Figura 47. Niveles de glutatión en plasma de los diferentes grupos de animales alimentados con clenbuterol n=6, el análisis de varianza y el contraste de medias

La figura 47 nos indica que el tratamiento afecta de modo diferente a hembras y machos $p=0.0218$, el cual influye en los niveles de glutatión en plasma $p=0.0352$, en donde el género juega un papel significativo en los niveles de glutatión $p=0.0120$.

VIII. CONCLUSIONES

- El método desarrollado y validado para determinar enantiómeros de Clenbuterol S-(+) y R-(-) es rápido y simple, el rango comprende el límite establecido por WADA. Es lineal en un rango de 0.025- 1.6 ng/mL de la mezcla racémica de Clenbuterol. El tiempo de corrida es de 6.5 minutos. La metodología fue validada según los parámetros establecidos por la VICH GL49 (R). El método fue utilizado para analizar diferentes tipos de muestras (medicamento, carne y orina) que contenían clenbuterol. Esta metodología fue implementada para evaluar los enantiómeros de Clenbuterol en orina durante un ciclo de dopaje y una ingesta constante de carne contaminada con Clenbuterol. Los resultados indican diferencias significativas en la orina entre los enantiómeros de clenbuterol en los primeros cinco días del ciclo de dopaje en ratas. La aplicación desarrollada aquí podría ser de ayuda para las organizaciones antidopaje y los atletas con hallazgos analíticos adversos (AAF) asociados con clenbuterol.
- Se demostró diferencia significativa en la relación enantiomérica (R/S). Corroborando que cuando el enantiómero R-(-) está presente en mayor cantidad, con respecto al enantiómero S-(+) la proporción es mayor, indicando una ingesta no intencional por carne y cuando es una relación inversa indica una ingesta con fines de dopaje.
- Se desarrolló una metodología analítica para identificar los metabolitos del clenbuterol en la orina de rata y se encontraron cinco metabolitos informados anteriormente, las diferencias se encontraron en M4, M5 y clenbuterol total entre el grupo de carne y el grupo de medicamento. M4 y M5 fueron mayores en el grupo de carne y el clenbuterol total fue mayor en el grupo de medicamentos como una perspectiva del estudio sugerimos una mayor cuantificación con un estándar de cada metabolito para establecer perfiles cuantitativos y asociar estos metabolitos con otros procesos bioquímicos.
- Se buscó una correlación de indicadores de estrés oxidativo e indicadores de daño celular, las diferencias significativas se encontraron con γ -GT, es un indicador celular que se correlaciona con el tratamiento y presenta diferencia significativa entre grupos.



Además, que existe un efecto significativo según el género en el contenido de glutatión en hígado.

IX. PERSPECTIVAS

- Realizar el estudio en la especie humana simulando los ciclos de dopaje y la ingesta constante de carne contaminada con clenbuterol.
- Implementar la metodología en dosis múltiples de clenbuterol.
- Desarrollo y validación de enantiómeros de clenbuterol en muestras de sangre.
- Realizar la farmacocinética de los enantiómeros de clenbuterol en los seres humanos después de ingerir carne contaminada de clenbuterol y un ciclo de dopaje.
- Analizar el contenido de isoprostanos en plasma, considerando el tiempo de vida media.

X. REFERENCIAS

- Ahmad, A.M. (2007). Recent advances in pharmacokinetic modeling. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 28 (October 2013), 135–143. <https://doi.org/10.1002/bdd>.
- Alessio, H.M., Hagerman, A.E., Fulkerson, B.K., Ambrose, J., Rice, R.E. (2000). Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. *Med Sci Sports Exerc.*, 32, 1576–1581.
- Alonen, A., Gartman, M., Aitio, O., Finel, M., Yli-Kauhaluoma, J., & Kostianen, R. (2009). Synthesis, structure characterization, and enzyme screening of clenbuterol glucuronides. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 37, 581–587. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2009.05.003>
- Animal Agriculture's future through biotechnology, part 3: Metabolic modifiers for use in animal production. (2005). *Agricultural Science and Technology*, 3(Issue Paper council for).
- Arquer, A., Elosua, R., & Marrugat, J. (2010). Actividad física y estrés oxidativo. *Apunts Medicina de l'Esport*, 45(165), 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.apunts.2009.12.002>.
- Basu, S. (1998). Metabolism of 8-iso-prostaglandin F(2-alfa). *FEBS Letters*, 428, 32–36. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00481-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00481-5).
- Brambilla, G., Cenci, T., Franconi, F., Galarini, R., Macrì, a, Rondoni, F, Loizzo. (2000). Clinical and pharmacological profile in a clenbuterol epidemic poisoning of contaminated beef meat in Italy. *Toxicology Letters*, 114(1–3), 47–53. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10713468>.
- Brambilla, G., Di Bez, S., Pietraforte, D., Minetti, M., Campanella, L., & Loizzo, A. (2007). Ex vivo formation of gastric metabolites of clenbuterol: preliminary characterisation of their chemical structure. *Analytica Chimica Acta*, 586(1–2), 426–431. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.07.061>.
- Bazo-Santos, E., Díaz, M., Chicaiza, I., & Nogueira, Á.G.R. (2013). Dopaje con clenbuterol: ¿es posible la contaminación con carne en el “Caso del ciclista Alberto Contador”.
- Bloomer ,R.J. (2008). Effect of exercise on oxidative stress biomarkers. *Adv Clin Chem.*, 46, 1–50.
- Carbon, F., Hepatotoxicity, T., Morrow, J. D., Awad, J. A., Kato, T., Takahashi, K., Burk, R.F. (1992). Formation of Novel Non-cyclooxygenase-derived Prostanoids, 90(December), 2502–2507.
- Castellanos, R.A., & Betancur. (2006). Empleo del zilpaterol en novillos con alimentación intensiva en Yucatán, México. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal.*, 14, Núm 2.
- Cavalié, H., Lac, G., Lebecque, P., Chanteranne, B., Davicco, M.J., & Barlet, J.P. (2002). Influence of clenbuterol on bone metabolism in exercised or sedentary rats. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 93, 2034–2037. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00472.2002>.
- Chang, J. C., Lee, W. C., Wu, Y. T., & Tsai, T. H. (2009). Distribution of blood-muscle for clenbuterol in rat using microdialysis. *International Journal of Pharmaceutics*, 372, 91–96. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.01.015>.
- Comporti, M., Signorini, C., Arezzini, B., Vecchio, D., Monaco, B., & Gardi, C. (2008). F2-isoprostanés are not just markers of oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*, 44(3), 247–256. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.10.004>.
- Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios y Dirección General de Promoción de la Salud. Evaluación de riesgos de los rastros y mataderos municipales. México DF: Secretaría de Salud, 2006; 1-62.
- Cristino, A., Ramos, F., & Da Silveira, M.I.N. (2003). Control of the illegal use of clenbuterol in bovine production. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 32(2), 311–316. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(03\)00073-6](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(03)00073-6).
- Cumming, M., & Manager, C. C. (2017). Weightlifting Athlete Suspended for the Presence of Clenbuterol.

- Dänicke, S. (2002). *Farm animal metabolism and nutrition. Animal Feed Science and Technology* (Vol. 88). [https://doi.org/10.1016/s0377-8401\(00\)00222-4](https://doi.org/10.1016/s0377-8401(00)00222-4).
- Daubert, G. P., Mabasa, V.H., Leung, V. W. Y., & Aaron, C. (2007). Acute clenbuterol overdose resulting in supraventricular tachycardia and atrial fibrillation. *Journal of Medical Toxicology: Official Journal of the American College of Medical Toxicology*, 3(2), 56–60. <https://doi.org/10.1007/BF03160909>.
- Davies, K. J., Quintanilha, a T., Brooks, G. a, & Packer, L. (1982). Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 107(4), 1198–1205. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6291524>.
- Dillard, C., Litov, R., Savin, W., et al. (1978). Effect of exercise, vitamin E and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. *J Appl Physiol*, 45, 927–932.
- Dimeo, P., M.V. (2018). *The Anti-Doping Crisis in Sport: Causes, Consequences, Solutions*. 1st ed. Oxon, UK: Routledge (pp. 98–115).
- Diario Oficial de la Federación Ley Federal de Sanidad Animal. México DF: SAGARPA. 18 de Junio de 1993. Última modificación: 25 de julio de 2007 [Citado: 2009 noviembre 16] Disponible en: <http://www.ordenjuridico.gob.mx/Federal/Combo/L-120.pdf>.
- Diario Oficial de la Federación. Reglamento de Mercados para el Distrito Federal. México DF: Gobierno del DF. 1 de junio de 1951.
- Domínguez-Romero, J.C., García-Reyes, J.F., Martínez-Romero, R., Martínez-Lara, E., Del Moral-Leal, M. L., & Molina Díaz, A. (2013). Detection of main urinary metabolites of β 2-agonists clenbuterol, salbutamol and terbutaline by liquid chromatography high resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 923–924, 128–135. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.02.008>.
- DP., J. (2006). Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.*, 8, 1865–1879.
- FDA Guidance. (1995). *Guidelines Validation of Analytical Procedures*.
- Fernandez, E.O. (2012). *Residuos de clenbuterol en tejidos comestibles de bovino*. Universidad Autonoma de Chapingo.
- Garzón, Ernesto et.al. (2016). El clenbuterol y sus riesgos en el deporte. *Bol Clin Hosp Infant Edo Son*, 33, 5.
- Geyer, H., Parr, M. K., Koehler, K., Mareck, U., Sch, W., & Thevis, M. (2008). Nutritional supplements cross-contaminated and faked Contaminated and faked with, (June), 892–902. <https://doi.org/10.1002/jms>.
- Guddat, S., Fußhöller, G., Geyer, H., Thomas, A., Braun, H., Haenelt, N., Schwenke, A., Klose, C., Thevis, M., S. W. (2012). Clenbuterol - regional food contamination a possible source for inadvertent doping in sports. *Drug Test Anal.*, (6), 534–538.
- Hawkins, D.R., Cheng, K.N., Major, R. . (1993). Validation of a GC-MS method for the measurement of 14C-Clenbuterol in calf liver and measurement of samples from calves administered with 14C-Clenbuterol. (Study No. BOI/140) BOI 142/921659 - U-Venti 126, Plani 78-. *Submitted to FAO by Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Germany*.
- Hawkins, D.R., Elsom, L.F., de-Salis, C.M., Morris, G.R., Roberts, N.L., Cameron, D.M., Offer, J., Fish, C. (1985). The disposition of the combination product 14-C-N-AB 365 CL Trimethoprim/Sulfadiazine in calves - U-Venti 70, Plani 42, Venti TMP/S 8-. *Submitted to FAO by Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Germany*.
- Hefnawy, M.M., Al-Shehri, M., Sultan, M., & Mostafa, G. A. E. (2013). Enantiomeric resolution and determination of clenbuterol by hplc technique in plasma and pharmaceutical formulations using polysaccharide chiral stationary phase and uv detection. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 8(4), 1781–1790.
- Hermansson, J. (1983). Direct liquid chromatographic resolution of racemic drugs using α 1-acid glycoprotein as the chiral

- stationary phase. *Journal of Chromatography*, 269, 71–80.
- Howells, L., Godfrey, M., S.M. (1994). Melanine as an absor- bent for drug residues. *Analyst* 1994;119:2691-2693., (119), 2691–2693.
- IFBB Resumen antidoping, 2014, 2015 y 2016, en el Campeonato Mundial Juniors y Másters 2014 Morelia, México - 2 al 6 de octubre de 2014. <http://www.ifbb-tahiti.com/medias/files/copia-de-ifbb-antidoping-summary-19-07-2017.pdf>. Fecha de publicación 19 de septiembre 2017.
- Ingalls, C.P., Barnes, W.S., & Smith, S.B. (1996). Interaction between clenbuterol and run training: effects on exercise performance and MLC isoform content. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 80, 795–801.
- J.M. Fernández. (2009). Estrés oxidativo inducido por el ejercicio. *Revista Andaluza de Medicina Del Deporte*, 2, 93–97.
- Jecfa. (2014). *Residue evaluation of certain veterinary drugs. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*. Retrieved from www.fao.org/3/a-i3745e.pdf.
- Jiménez Servín de la Mora, L.A., Ramos, J.G., Sumano, L.H., Fragoso, S.H.(2011).Vigilancia sanitaria en el uso ilícito del clenbuterol y su coordinación intersectorial en dos entidades de México Vet. Méx., 42 (1).
- Johnson, B. J., Smith, S. B., & Chung, K. Y. (2014). Historical overview of the effect of β -adrenergic agonists on beef cattle production. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 27(5), 757–766. <https://doi.org/10.5713/ajas.2012.12524>.
- Johnston, A.M., Dunsire, J. P. (1993). Plasma kinetics, metabolism, excretion and residue kinetics of N-AB 365 CL following multiple oral administration to the horse. IRI Project No. 150797, IRI Report No. 8346 - U-Venti 127, Venti TMP/S 104. *Submitted to FAO by Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Germany*.
- Johnston, A.M., Jenner, W. N. (1976). Study of the metabolism of ¹⁴C-labelled N-AB 365 in the male baboon Project No. 102214 - U76-0165 -. *Submitted to FAO by Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Germany*.
- Kanter, M.M, Nolte, L.A., H. J. (1993). Effects of an antioxidant vitamine mixture on lipid peroxidation at rest and postexercise. *J Appl Physiol.*, 74, 965–969.
- Kearns, C. F., & McKeever, K. H. (2009). Clenbuterol and the horse revisited. *Veterinary Journal (London, England : 1997)*, 182(3), 384–391. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.08.021>
- Kierzkowska, B., Stanczyk, J., & Kasprzak, J. D. (2005). Myocardial infarction in a 17-year-old body builder using clenbuterol. *Circ J*, 69(9), 1144–1146. <https://doi.org/http://doi.org/10.1253/circj.69.1144>
- Kirschvink, N., Art, T., Smltth, N., & Lekeuxt, P. (1999). Effect of exercise and COPD crisis on isoprostane concentration in plasma and bronchoalveolar lavage fluid in horses, 30, 88–91.
- Kitaura, T., Suzuki, S., & Kraemer, W. J. (2015). Effects of clenbuterol enantiomers on growth of young male rats. *The Journal of Physical Fitness and Sports Medicine*, 4(5), 369–376. <https://doi.org/10.7600/jpfsm.4.369>.
- Kopitar, V.Z., Zi, A. (1976). Pharmakokinetik und Metabolitenmuster von Clenbuterol bei der Ratte. *Arzneim Forsch*, 26, 1435–1441.
- Kuiper, H. A. . M. Y. N. M. M. H. D., & Roos, F. R. V. S. and A. H. (1998). “Illegal Use Beta-Adrenergic Agonist”., *Journal Animal Science.*, 76.
- Lawson, J.A, Li, H., Rokach, J., Adiyaman, M., Hwang, S., Khanapure, S. P., & Fitzgerald, G. A. (1998). Identification of Two Major F 2 Isoprostanes , 8 , 12-Iso- and 5- epi -8 , 12-Iso-isoprostane F 2-VI in Human Urine , 273(45), 29295–29301.
- Leeuwenburgh C, H. J. (2001). Oxidative stress and antioxidants in exercise. *Curr Med Chem* 2001; 8: 829-838., 8, 829–838.
- Li, H., Lawson, J. A., Reilly, M., Adiyaman, M., Hwang, S., Rokach, J., & Fitzgerald, G. A. (1999). Quantitative high performance liquid chromatography Tandem mass spectrometric analysis of the four classes of F 2 -isoprostanes in human urine, 96(23), 13381–13386.

- Li, Y. Z., B. T. C. L. and J. A. M. (2000). Effects of a Beta-Adrenergic Agonist (L-644,969) on Performance and Carcass Traits of Growing Lambs in a Cold Environment”, Canadian. *Journal of Animal Science.*, 80, Núm.4.
- Liang, W., C. A. Bidwell, P. R. Collodi, and S. E. M. (2000). Expression of the porcine β 2-adrenergic receptor in Chinese hamster ovary cells. *J. Anim. Sci.*, 78, 2329–2335.
- Ltd., A., & Drive. (2017). Canadian Sport Sanction Registry. A. Anti-Doping Rule Violations under the Canadian Anti-Doping Program.
- Lu, H. (2007). Stereoselectivity in drug metabolism. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 3, 149–158. <https://doi.org/10.1517/17425255.3.2.149>.
- Malucelli, A., Ellendorff, F., & Meyer, H.H. (1994). Tissue distribution and residues of clenbuterol, salbutamol, and terbutaline in tissues of treated broiler chickens. *Journal of Animal Science*, 72(6), 1555–1560. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8071181>.
- Mart, F. (2008). Revista Brasileira de Zootecnia Entrenamiento y Adaptación Muscular . Sustratos y Vías Metabólicas.
- Marzatico, F., Pansarasa, O., Bertorelli, L., Somenzini, L., D.V.G. (1997). Blood free radical antioxidant enzymes and lipid peroxides following long-distance and lactacidemic performances in highly trained aerobic and sprint athletes. *J Sports Med Phys Fitness.*, 37, 235–239.
- Marzo, A., & Heftmann, E. (2002). Enantioselective analytical methods in pharmacokinetics with specific reference to genetic polymorphic metabolism. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 54(1–3), 57–70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12543491>.
- McAnulty, S.R., Owens, J.T., McAnulty, L.S., Nieman, D.C., Morrow, J.D., Dumke, C.L., & Milne, G. L. (2007). Ibuprofen use during extreme exercise: Effects on oxidative stress and PGE2. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 39, 1075–1079. <https://doi.org/10.1249/mss.0b13e31804a8611>.
- Mersmann, H.J. (1998). Beta-Adrenergic Receptor Modulation of Adipocyte Metabolism and Growth. *Journal Animal Science*, 80:(E.Supp.
- Mersmann, H.J. (2002). “Overview of the Effects of β -Adrenergic Receptor Agonists on Animal Growth Including Mechanisms of Action”. *Journal Animal Science.*, 76.
- Michalis, G., & Athanasios, Z. (2008). The Effect of Muscle-Damaging Exercise on Blood and Skeletal Muscle ..., 38(7), 579–606.
- Miller, M.F., Garcia, D.K., Coleman, M.E., Ekeren, P.A., Lunt, D.K., Wagner, K.A., Prochnor, M., Welsh, T.H., Jr, S.S. (1988). Adipose tissue, longissimus muscle and anterior pituitary growth and function in clenbuterol-fed heifers. *J Anim Sci.*, 66, 12–20.
- Mills, P.C., Roberts, C.A. and Smith, N.C. (1996). Effects of ozone and airway inflammation on glutathione status and iron homeostasis in the lungs of horses. *Am. J. Vet.*, (51), 1359–1363.
- Mills, P.C., Smith, N.C., Casas, I., Harris, P., Harris, R.C. and Marlin, D. J. (1996). Effects of exercise intensity and environmental stress on indices of oxidative stress and iron homeostasis during exercise in the horse. *EUK J. Appl. Physiol.*, 74, 60–66.
- Milne, G.L., Yin, H., & Morrow, J.D. (2008). Human biochemistry of the isoprostane pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 283(23), 15533–15537. <https://doi.org/10.1074/jbc.R700047200>.
- Morales-Trejo, F., León, S. V., Escobar-Medina, A., & Gutiérrez-Tolentino, R. (2013). Application of high-performance liquid chromatography–UV detection to quantification of clenbuterol in bovine liver samples. *Journal of Food and Drug Analysis*, 21(4), 414–420. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2013.09.009>.
- Morrow, J. D., Hill, K.E., Burk, R.F., Nammour, T.M., Badr, K.F., & Roberts, L. J. (1990). A series of prostaglandin F2-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proceedings*

- Mostafa, G.A., Hefnawy, M.M., E-M. A. (2009). Separation and determination of clenbuterol by HPLC using a vancomycin chiral stationary phase. *JAAC Int.*, 92(3), 824–9.
- Nebbia, C., Dacasto, M., Ceppa, L., & Roncada, P. (1996). Changes in the activities of hepatic xenobiotic metabolising enzymes after the administration of clenbuterol to female broilers. *Research in Veterinary Science*, 60(1), 33–36. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(96\)90127-7](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(96)90127-7).
- Nguyen, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2006). Chiral drugs: an overview. *International Journal of Biomedical Science : IJBS*, 2(2), 85–100.
- Nicoli, R., Petrou, M., Badoud, F., Dvorak, J., Saugy, M., & Baume, N. (2013). Quantification of clenbuterol at trace level in human urine by ultra-high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography. A*, 1292, 142–150. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.12.008>.
- Nieman, D.C., Henson, D.A., McAnulty, S.R., McAnulty, L.S., Morrow, J. D., Ahmed, A., & Heward, C. B. (2004). Vitamin E and immunity after the Kona Triathlon World Championship. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 36, 1328–1335. <https://doi.org/10.1249/01.MSS.0000135778.57355.CA>.
- Oostenburg, G., Mensink, R., Hardemen, M., et al. (1997). Exercise performance red blood cell deformability and lipid peroxidation: effects of fish oil and vitamin E. *J Appl Physiol*, 83, 746–752.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación y Organización Mundial de la Salud. Sistemas Nacionales para la Inocuidad de los Alimentos en México. Análisis de la Situación. Conferencia Regional FAO/OMS sobre Inocuidad de los Alimentos para las Américas y el Caribe; 2005 diciembre 6-9; San José, Costa Rica: Preparado por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), dependiente de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos de Argentina, 2005: 1-6.
- Parr, M.K., Blokland, M.H., Liebetrau, F., Schmidt, A. H., Meijer, T., Stanic, M., Sterk, S. S. (2017). Distinction of clenbuterol intake from drug or contaminated food of animal origin in a controlled administration trial—the potential of enantiomeric separation for doping control analysis. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 34(4), 525–535. <https://doi.org/10.1080/19440049.2016.1242169>.
- Parr, M. K., Koehler, K., Geyer, H., Guddat, S., & Schänzer, W. (2008). Clenbuterol marketed as dietary supplement, 300, 298–300. <https://doi.org/10.1002/bmc>.
- Pinheiro, I., Jesuino, B., Barbosa, J., Ferreira, H., Ramos, F., Matos, J., & da Silveira, M. I. N. (2009). Clenbuterol storage stability in the bovine urine and liver samples used for European official control in the azores islands (portugal). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(3), 910–914. <https://doi.org/10.1021/jf802995e>.
- Pleadin, J., Vulić, A., Persi, N., & Vahcić, N. (2010). Clenbuterol residues in pig muscle after repeat administration in a growth-promoting dose. *Meat Science*, 86(3), 733–737. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.06.013>.
- Prezelj, A., Obreza, A., & Pecar, S. (2003). Abuse of Clenbuterol and its Detection. *Current Medicinal Chemistry*, 10, 281–290. <https://doi.org/10.2174/0929867033368330>.
- Productora Nacional de Biológicos Veterinarios. <https://www.gob.mx/salud/prensa/cofepris-suspension-10-rastros-donde-se-detecto-presencia-de-clembuterol-o-malas-practicas-higienicas-en-2014> Fecha de publicación 27 de diciembre de 2014.
- Productora Nacional de Biológicos Veterinarios. <https://www.gob.mx/pronabive/prensa/sedrae-investiga-a-granja-de-aguas-calientes-por-probable-uso-de-clembuterol> Fecha de publicación 21 de marzo de 2019.
- R, V. G. L. (2015). *Guidance for Industry Studies to Evaluate the Metabolism and Residue Kinetics of Veterinary Drugs in Food-Producing Animals : Validation of Analytical Methods Used in Residue Depletion Studies*.

- Rao, M.U., Subramanyam, N.M., William, A.P., N. L. P. (2010). *Free Radicals and antioxidant protocols* (Segunda). Human Press.
- Ribeiro, S. M.L., Rogero, M. M., Bacurau, R.F.P., Campos, P.L. de, Luz, S. dos S., Lancha Jr, A. H., & Tirapegui, J. (2010). Effects of Different Levels of Protein Intake and Physical Training on Growth and Nutritional Status of Young Rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 56(3), 177–184. <https://doi.org/10.3177/jnsv.56.177>.
- Rodríguez Patiño, G., Castillo Rodríguez, M. A., Ramírez Bribiesca, J. E., Ramírez Noguera, P., Gonsebatt Bonaparte, M. E., & López-Arellano, R. (2018). Development of a method for the determination of 8-iso-PGF₂α in sheep and goat plasma using solid-phase microextraction and ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 32(19), 1675–1682. <https://doi.org/10.1002/rcm.8224>.
- Rose, M.D., Shearer, G., F. W. H. H. (1995). The effect of cooking on veterinary drug residues in food: clenbuterol. *Food Addit Contain*, 12, 67–76.
- Guddat, G. Fussholler, H. Geyer, A. Thomas, H. Braun, N. Haenelt, A. Schwenke, C. Klose, M. Thevis, W. S. (2012). Clenbuterol - regional food contamination a possible source for inadvertent doping in sports. *Drug Test. Anal*, 4, 534–538.
- Salud, S. de, Salud, S. de P. y P. de la, & Epidemiología, D. G. de. (2012). *Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de la Intoxicación Alimentaria asociada al consumo de carne contaminada por Clenbuterol*.
- Sanaee F, Valente, N.D., Lanchote, V.L., Jamali, F. Pharmacokinetics of nebivolol in the rat: low oral absorption, loss in the gut and systemic stereoselectivity. *Biopharm Drug Dispos*. 2013 Sep;34(6):312-20. doi: 10.1002/bdd.1847. Epub 2013 Jun 15.
- Sauer, M.J., Pickett, R.J.H., Limer, S., & Dixon, S. N. (1995). Distribution and elimination of clenbuterol in tissues and fluids of calves following prolonged oral administration at a growth-promoting dose. *Journal of Veterinary Pharmacology & Therapeutics*, (18), 81–86.
- Schiavetta, A.M., Miller, M.F., Lunt, D.K., Davis, S.K., S. S. (1990). Adipose tissue cellularity and muscle growth in young steers fed the beta-adrenergic agonist clenbuterol for 50 days and after 78 days of withdrawal. *J Anim Sci.*, 68, 3614–3623.
- Schmid, J., Prox, A. (1986). Isolation and structural elucidation of NAB 365-CL metabolites from the dog urine - U86-0932 - . Submitted to FAO by Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Germany.
- Schmid, J., B. A. (1987). Quantitative determination of Clenbuterol in tissues by automated gas chromatography/mass spectrometry ADME 65/87 - U-Venti 85, Plani 51, Venti TMP/S 66 - U87-0984 -. Submitted to FAO by Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Germany.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Programa mexicano de monitoreo y control de residuos tóxicos y contaminantes en alimentos de origen animal 2007 y resultados del 2006. México DF: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), 2007.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, pesca y alimentación. Manual de buenas prácticas de producción en la engorda de ganado bovino en confinamiento. 2ª ed. México DF: Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA); Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), 2009.
- Seet, R.C.S., Lee, C.Y.J., Lim, E.C.H., Tan, J.J.H., Quek, A.M.L., Chong, W.L., Halliwell, B. (2010). Oxidative damage in Parkinson disease: Measurement using accurate biomarkers. *Free Radical Biology and Medicine*, 48(4), 560–566. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.11.026>.

- Sen, C., Atalay, M., Agren, J., et al. exercise. (1997). Fish oil and vitamin E supplementation in oxidative stress at rest and after physical exercise. *J Appl Physiol*, 83, 189–195.
- Serratos, J., Blass, A., Rigau, B., Mongrell, B., & Rigau, T. (2006). Residues from veterinary medicinal products, growth promoters and performance enhancers in food-producing animals: a European Union perspective promoters, performance enhancers and veterinary medicinal products: the legal framework, 25(2), 637–653.
- Shen, Q., Wang, L., Zhou, H., Jiang, H., Yu, L., & Zeng, S. (2013). Stereoselective binding of chiral drugs to plasma proteins. *Acta Pharmacologica Sinica*, 34(8), 998–1006. <https://doi.org/10.1038/aps.2013.78>.
- Smith, D. J. (2000). Stereochemical Composition of Clenbuterol Residues in Edible, 6036–6043.
- Smith, D. J. (2014). Total radioactive residues and clenbuterol residues in swine after dietary administration of [¹⁴C] clenbuterol for seven days and preslaughter withdrawal periods of zero, three, or seven days. D J Smith The online version of this article, along with, 2903–2912.
- Steering, V., Adoption, C., & Date, C. (2016). *VICH topic GL49: Studies to evaluate the metabolism and residues kinetics of veterinary drugs in human food-producing animals: validation of analytical methods used in residue depletion studies* (Vol. 44).
- Sumano, H., Ocampo, L., Gutierrez, L. (2002). Artículos de revisión Clenbuterol y otros β-agonistas, ¿Una opción para la producción pecuaria o un riesgo para la salud pública? *Vet.Méx.*, 33(2), 137–159.
- Sumano, H., Ocampo, C.L., G.O. (2002). Clenbuterol y otros b-agonistas, ¿una opción para la producción pecuaria o un riesgo para la salud pública? *Vet.Méx.*, 33.
- Takahashi, K., Akiba, Y. & Horiguchi, M. (1993) Effects of a beta-adrenergic agonist (clenbuterol) on performance, carcass composition, hepatic microsomal mixed function oxidase and antibody production in female broilers treated with or without corticosterone. *British Poultry Science* 34, 167-175
- Thevis, M., Geyer, L., Geyer, H., Guddat, S., Dvorak, J., Butch, A., Schänzer, W. (2013). Adverse analytical findings with clenbuterol among U-17 soccer players attributed to food contamination issues. *Drug Testing and Analysis*, 5(February), 372–376. <https://doi.org/10.1002/dta.1471>.
- Thevis, M., Thomas, A., Beuck, S., Butch, A., Dvorak, J., & Schänzer, W. (2013). Does the analysis of the enantiomeric composition of clenbuterol in human urine enable the differentiation of illicit clenbuterol administration from food contamination in sports drug testing? *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM*, 27(4), 507–512. <https://doi.org/10.1002/rcm.6485>
- Tirapegui, J., Ribeiro, S. M. L., Pires, I. S. de O., & Rogero, M. M. (2012). Effects of two different levels of dietary protein on body composition and protein nutritional status of growing rats. *Nutrients*, 4(9), 1328–1337. <https://doi.org/10.3390/nu4091328>.
- V.A., Z. (1976). Pharmakokinetik und Metabolitenmuster von clenbuterol beim koninchen und beim hund. *Arzneim Forsch*, 12, 1442–1445.
- VA., Z. (1976). Ein Malapplikation und Metabolitenmuster von clenbuterol beim Menschen. *Arzneim Forsch*, 12, 1445–1450.
- Velasco-Bejarano, B., Bautista, J., Noguez, M. O., Camacho, E., Rodríguez, M. E., & Rodríguez, L. (2017). Resolution of R-(-) and S-(+) enantiomers of clenbuterol in pharmaceutical preparations and black-market products using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Drug Testing and Analysis*, 9(11–12), 1738–1743. <https://doi.org/10.1002/dta.2294>.
- Viguie, C. A., Frei, B., Shigenaga, M. K., Ames, B. N., Packer, L., & Brooks, G. a. (1993). Antioxidant status and indexes of oxidative stress during consecutive days of exercise. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 75, 566–

- Viinikka L, Vaoni J, Y.O. (1984). Lipid peroxides prostacyclin, and thromboxane A2 in runners during acute exercise. *Med Sci Sports Exerc.*, 16, 275–277.
- Wada-ama.org. (2011). World Anti-Doping Agency (ADAMS) 2011. <https://www.wada-ama.org/en/media/news/2011-11/athletes-must-show-caution-due-to-contaminated-meat-0>.
- Wang, Z. L., Zhang, J. L., Zhang, Y. N., & Zhao, Y. (2016). Mass spectrometric analysis of residual clenbuterol enantiomers in swine, beef and lamb meat by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical Methods*, 8(20), 4127–4133. <https://doi.org/10.1039/c6ay00606j>.
- Willson, C. (2009). Clenbuterol. *XPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, (1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.63663-3>.
- Wood, A. A., Foo, T. K., Ahmad, M., Ph, D., & Wood, S. A. (2010). *Clenbuterol : Effects and Usage in Livestock and Show Animals*. Retrieved from <https://doi.org/doi:10.7282/T3G73BNN>.
- Z., K. (1970). Pharmacokinetic investigations with [14C]-N-AB 365 CL in rats (ADME I B) - U69-0109 -. *Submitted to FAO by Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Germany*.
- Zalko, D., Debrauwer, L., Bories, G., & Tulliez, J. (1998). Metabolism of clenbuterol in rats. *Drug Metabolism and Disposition*, 26(9), 891–899.
- Zimmer, A. (1974a). Comparison of the pharmacokinetic profile in the dog with single and repeated dosage (ADME I D) - U73-0161 -. *Submitted to FAO by Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Germany*.
- Zimmer, A. (1974b). Pharmacokinetics and metabolite pattern in the rabbit and dog (ADME II)-U74-0116 -. *Submitted to FAO by Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Germany*.
- Zimmer, A. (1974c). Metabolism and species comparison in the rat, rabbit and dog (ADME IV) - U71-0091 -. *Submitted to FAO by Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Germany*.

XI. ANEXOS

Parámetros y criterios del proceso de validación de un método bioanalítico.

PRUEBA	VICH GL49 GUIDELINES FOR THE VALIDATION OF ANALYTICAL METHODS USED IN RESIDUE DEPLETION STUDIES(R, 2015)
SELECTIVIDAD	<p style="text-align: center;">Condiciones de prueba</p> <p>Respuesta del analito en la matriz de blanco o matriz en blanco fortificado con SE debe ser $\leq 20\%$ de la respuesta media analito Estándares de calibración LLOQ</p>
EXACTITUD	<p>Concentración de analito/Rango aceptable para exactitud $< 1 \mu\text{g/Kg}/-50\% \text{ a } +20\%$ $\geq 1 \mu\text{g/Kg} < 10 \mu\text{g/Kg}/-40\% \text{ a } +20\%$ $\geq 10 \mu\text{g/Kg} < 100 \mu\text{g/Kg}/-30\% \text{ a } +10\%$ $\geq 100 \mu\text{g/Kg}/-20\% \text{ a } +10\%$ *$\mu\text{g/Kg}=\text{ng/g}=\text{ppb}$</p>
PRECISIÓN (REPETIBILIDAD)	<p>Concentración de analito/Con una serie/Con varias series $< 1 \mu\text{g/Kg}/30\%/45\%$ $\geq 1 \mu\text{g/Kg} < 10\mu\text{g/Kg}/25\%/32\%$ $\geq 10 \mu\text{g/Kg} < 100 \mu\text{g/Kg}/15\%/23\%$ $\geq 100 \mu\text{g/Kg}/10\%/16\%$</p>
PRECISIÓN (REPRODUCIBILIDAD)	
LINEALIDAD	<p style="text-align: center;">Mínimo de 5 niveles estándar de calibración</p>
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	<p style="text-align: center;">Sustentar científicamente el criterio empleado para establecerlo</p>
LÍMITE DE DETECCIÓN ESTABILIDAD	<p style="text-align: center;">Sustentar científicamente el criterio empleado para establecerlo</p> <p>Ciclos de congelación. Someter la muestra a 3 ciclos de congelación antes de analizar las muestras.</p> <p>Corto plazo. Mantener bajo las condiciones y durante el tiempo que se almacenaran las muestras en el estudio. (4°C, -20°C, ó -70°C) en periodos (por ejemplo, inicialmente, 1 semana, 1 mes, 3 meses)</p>

XII. ARTÍCULO

Evaluation of R- (-) and S- (+) Clenbuterol Enantiomers during a Doping cycle or Continuous Ingestion of Contaminated Meat using Chiral Liquid Chromatography by LC-TQ-MS

Drug Testing and Analysis, Wiley.

Cita:

Dolores Hernández, M, Villaseñor, A, Piña Olmos, S, et al. Evaluation of R- (-) and S- (+) Clenbuterol Enantiomers during a Doping cycle or Continuous Ingestion of Contaminated Meat using Chiral Liquid Chromatography by LC-TQ-MS. Drug Test Anal. 2019. <https://doi.org/10.1002/dta.2612>

Bejarano Benjamín Velasco (Orcid ID: 0000-0002-2934-8698)

López-Arellano Raquel (Orcid ID: 0000-0002-2050-6119)

Evaluation of R- (-) and S- (+) Clenbuterol Enantiomers during a Doping cycle or Continuous Ingestion of Contaminated Meat using Chiral Liquid Chromatography by LC-TQ-MS

Mariana Dolores Hernández¹, Alma Villaseñor², Sofía Piña Olmos³, Crisóforo Mercado Márquez⁴, Benjamín Velasco Bejarano⁵, María Eugenia Gonsebatt Bonaparte⁶ and Raquel López-Arellano^{1*}

1. Laboratory of Pharmaceutical Development Tests, Multidisciplinary Research Unit, Faculty of Higher Education Cuautitlán, National Autonomous University of Mexico, Carr. Cuautitlán-Teoloyucan Km 2.5, San Sebastian Xhala, 54714 Cuautitlán Izcalli, Mexico state.
2. Institute of Applied Molecular Medicine, Faculty of Medicine, San Pablo CEU University, Madrid, Spain.
3. Laboratory of Cellular Toxicology, Multidisciplinary Research Unit, National Autonomous University of Mexico, Carr. Cuautitlán-Teoloyucan Km 2.5, San Sebastian Xhala, 54714 Cuautitlán Izcalli, Mexico state.
4. Multidisciplinary Research Unit, National Autonomous University of Mexico, Carr. Cuautitlán-Teoloyucan Km 2.5, San Sebastian Xhala, 54714 Cuautitlán Izcalli, Mexico State.
5. Department of Chemical Sciences, Section of Organic Chemistry, National Autonomous University of Mexico; Av. May 1 S/N, Col. Sta. María las Torres, Cuautitlán Izcalli, State of Mexico, Mexico, C.P. 54740.

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: 10.1002/dta.2612

6. Genomic Medicine and Environmental Toxicology Research, Biomedical Institute, National Autonomous University of Mexico, University Exterior Circuit, Coyoacán, Mexico City, Mexico CP 04510.

***Address for correspondence**

Prof. Raquel López-Arellano

Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico (LEDEFAR), Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México. Estado de México, CP.54714, México. Tel: +52 55 56231999 Ext. 39415. e-mail: lopezar@unam.mx

ABSTRACT

Clenbuterol is known to improve competition resistance and muscular growth in athletes. Although it is an illegal drug, its use by farmers is widely spread to induce growth of their cattle. Thus, when clenbuterol is found in the urine of an athlete, there is doubt whether it was consumed with doping purposes or if it is due to the consumption of meat from a clenbuterol-fed animal. Previous studies suggest that enantiomeric relationship of clenbuterol may be different according to the intake source. However, the enantiomeric relationship throughout a doping cycle or a continuous intake of contaminated meat has not yet been explored. In this first approximation, our aim was the development and validation of a sensitive and rapid method for the determination of S- (+) and R- (–) clenbuterol enantiomers to be used in a controlled study in rats fed for one week with contaminated meat or simulating a doping cycle. Enantiomers were measured using liquid chromatography coupled to mass spectrometry with a triple quadrupole analyzer (LC-TQ-MS) and were separated on an AGP Chiralpak column. The method was fully validated following the VICH (Veterinary International Conference on Harmonization guidelines) and was linear in the range of 12.5-800 pg/mL with a correlation coefficient of ≥ 0.98 for each enantiomer, and with a limit of quantitation and detection (LOQ and LOD) of 12.5 pg/mL and 6.5 pg/mL, respectively, for both enantiomers. The application of this method pointed out the shift of the enantiomeric relationship in urine from rats during the first five days of the doping cycle compared to those fed with contaminated meat. This finding can be of substantial importance in further doping studies.

Keywords: Clenbuterol, doping, enantiomers, LC-MS/MS, SRM.

1. Introduction

The use of clenbuterol is widely spread among athletes to improve competition resistance and muscular growth. Although it is illegal and reprehensible, as it is a way to cheat in sports, clenbuterol is highly promoted by bodybuilding websites as a gold standard to lose weight and gain muscle tissue. Moreover, clenbuterol can be easily acquired through online websites or the black market, as well as being consumed without knowing through the meat sold in the market¹. The latter fact has created a big controversy between athletes and the law that casts doubt on whether the presence of clenbuterol in the urine of athletes came from direct intake for doping purposes or through meat consumption arguing the presence of residues²⁻⁴. In this sense, there is an urgent need to have an accurate test that could, besides providing the quantity, discriminate the source of the clenbuterol found in the urine of an athlete.

Furthermore, in countries such as China and Mexico, the use of clenbuterol to feed cattle is a common practice, ingrained in farmers⁵. As far back as 2011, the World Anti-Doping Agency (WADA) issued specific warnings about this problem, where the prevalence of meat contamination by clenbuterol was known to be high⁶. As an example of its use in sheep and cows, it has been reported that clenbuterol is able to increase their muscle mass between 8% and 40%⁷⁻¹⁰. Moreover, clenbuterol is easily and quickly eliminated from the animal and it becomes undetectable after a small withdrawal period, resulting ultimately in a substantial profit for livestock farmers without traceability^{11,12}. Although the employment of clenbuterol was initially for veterinary purposes, as a bronchodilator for asthma, its use in animals is also illegal. However, presently there is no strict regulation that forces the livestock industry to do

routine tests measuring clenbuterol in meat before being sold to the supermarket for human consumption.

Clenbuterol is a molecule which presents R-(−) and S-(+) enantiomers (Figure 1). In recent publications, it has been suggested that the enantiomeric relationship may change if clenbuterol was consumed through contaminated meat or by oral administration^{4,5}. In oral administrations, clenbuterol has an equal proportion of enantiomers 1:1; however, in meat, articles have reported differences in the enantiomeric ratio up to 3:1 (R-(−): S-(+))^{2,13}. In another study, Z. L. Wang showed that the depletion is significantly different for each enantiomer in pigs, cattle and lambs; specifically in case of porcine, there is an accumulation of S-(+) clenbuterol in muscle and liver⁴. In addition, it has been reported that R-(−) clenbuterol is accumulated in beef and lamb muscles¹⁴. Consequently, one hypothesis is that clenbuterol enantiomers in human urine may differ depending on the type of ingested meat. However, to date this hypothesis has not been proved. In a recent study, the administration of a single dose of clenbuterol through drug or contaminated meat in humans showed not differences in the enantiomeric relationship of clenbuterol, as all the sources of clenbuterol contained the same proportion (1:1) of enantiomers³.

However, the enantiomeric relationship throughout a doping cycle or a continuous intake of contaminated meat has not yet been explored. Therefore, the aim of this study was to evaluate the impact of the clenbuterol intake by measuring its enantiomers in urine from three groups of animals: rats on a doping cycle, rats fed continuously with contaminated meat, and rats fed normally without clenbuterol for 7 days, in order to shed some light on the differences between a doping cycle and the continuous intake of contaminated meat. To pursue this purpose, an analytical methodology was developed and validated following the VICH (Veterinary International Conference on Harmonization) guidelines¹⁵.

2. Materials and methods

2.1 Chemical and Reagents

Racemic clenbuterol (95%), containing 50:50 of S- (+) and R- (−) forms, was purchased from Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany). Purified enantiomers; S- (+) and R- (−) clenbuterol were obtained from Toronto Research chemicals (North York, Canada) and were used only for identification purposes. Solvents: methanol (MeOH), acetonitrile (ACN) and propanol (2-PrOH) were obtained from J.T. Baker (MA, USA) and were HPLC grade, formic

acid (FA) and ammonium formate (amm. formate; 99% mass spectrometry grade) were from Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Chemicals such as potassium hydroxide (KOH) were analytical grade and were obtained from J.T. Baker (MA, USA). Ultrapure water used to prepare all solutions was obtained “in-house” from a Millipore system (18.2 MΩcm, Millipore, Billerica, MA, USA).

2.2 Analytical equipment

All analyses were carried out on an ACQUITY UPLC System (Waters Corp., Milford, MA, USA) coupled to an electrospray source and a triple-quadrupole mass spectrometer Xevo (TQ-MS; Waters Corp., Milford, MA, USA). Enantiomers R(-) and S(+) clenbuterol were separated on AGP Chiralpak Column (100 mm × 4 mm, 5 μm) maintained at 25 °C. The mobile phases consisted of (A) aqueous solution with amm. formate, 10 mM, pH=4.5 and (B) ACN in an initial proportion of 97:3. The flow rate was 1.0 mL/min, the total running time was 6.5 minutes with an injection volume of 30 μL.

The MS system was operated in positive electrospray ionization mode (ESI+) using Selected Reaction Monitoring (SRM). The MS parameters were established as follows: nitrogen was used as the desolvation gas in a flow rate of 1000 L/h and a temperature of 600 °C, capillary and cone voltages were 0.5 kV and 24 V, respectively.

2.3 Experimental animal model

Considering that the administration of clenbuterol to humans is prohibited in Mexico, and even more with the aim of simulate a doping cycle, a rat model was used as an approximation. The animal model was carried out using male adult wistar rats (250-300 g) at the Animal Isolation Unit of the multidisciplinary research facility of the University Faculty (FESC C4, Mexico). Each animal was weighed and placed in an individual metabolic cage for 24 hours prior to treatment under standard conditions of light and temperature (at 22 ± 1 °C, with a 12:12h light-dark photoperiod) and allowed *ad libitum* access to water.

Animals (n= 18) were divided in three groups; the first group was fed with clenbuterol coming from a pharmaceutical form. This group was named “drug group”. The drug selected was Ventipulmin® (Boehringer Ingelheim)^{11,16-18}, a controlled drug used as a bronchodilator in veterinary. Following different athletics and bodybuilding blogs, in which they indicate that the regular administration of clenbuterol in cycles is pyramid-shaped for 1-2 weeks^{19,20},

clenbuterol was pelleted in different concentrations. In this way, the rats would mimic a doping cycle in humans, in which an athlete usually consumes increasing amounts of clenbuterol to later reduce gradually in equal amounts. Considering that 60 µg of clenbuterol are initially administrated to athletes with an average weight of 65.2 Kg, 0.276 µg of clenbuterol were established as the initial dose for a rat with an average weight of 300 g^{19,20}. Considering that on average a rat eats 15-30 g of pellets per day, we pelleted each clenbuterol dose in two pellets of 10 g assuring in this way a total consumption of the pellets. The doping cycle lasted 7 days, and the clenbuterol doses per day were: 0.276, 0.414, 0.552, 0.690, 0.552, 0.414 and 0.276 µg. The second group was fed with two pellets of 10 g everyday containing contaminated meat. This group was called “meat group”. The adulterated meat was obtained from different local markets where meat was bought and analyzed. Regarding the meat-pellets, meat was cooked and dried on a stove at 40 °C. The dried meat was pulverized and mixed with the powder of normal pellets (Laboratory Rodent Diet 5001) in a meat: powder proportion of 1:3, thus leading to a total amount of 5 g of meat per day for each animal. The amount of meat per day was estimated based on the protein requirements for rats^{21,22} and contained 0.54 µg of clenbuterol. Therefore, this amount matched with the dose on day 3 from the group of rats at the doping cycle (0.59 µg/day). Additionally, the enantiomeric concentrations of clenbuterol in meat were determined before and after being pelleted. The meat- and drug-pellets were produced on an Eccentric tablet press, model Korsch EK-1 (Berlin) using 13 kN/m² of compression pressure. The third group of rats were fed normal intact pellets *ad libitum* without clenbuterol and were used as “control group”.

Urine samples were collected each day using 50 mL conic tubes and then transferred to 2 mL tubes. Samples were centrifuged (10 minutes at 1123 ×g, 4 °C) and supernatant was stored and kept at -20 °C until the day of analysis. The procedures and animal handling followed the Mexican guidelines on the use of animals for research (CICUAE-FESC C15_10) and were approved by the Institutional Committee for Ethics.

2.4 Standards and Sample preparation

Standards solutions. Stock solutions were prepared using methanol as the dissolution solvent. The racemic clenbuterol standard containing S-(+) and R-(−) enantiomers was prepared in a range of 25–1600 pg/mL for the calibration curve, leading to a concentration range of 12.5–800 pg/mL for each enantiomer.

Urine samples. Samples were thawed on ice and homogenized using vortex. From each one, 100 μL were taken and placed into a 2 mL tube, followed by the addition of 10 μL of KOH 2.5 M, and mixed for 30 seconds. Liquid-liquid extraction using hexane was performed adding 1 mL of solvent and shaking vigorously for 60 seconds. Extracted samples were centrifuged (10 minutes at $9168 \times g$, 10°C), and then 250 μL from the lower organic layer were transferred to a 15 mL clean tube. The organic layer was evaporated to dryness at 30°C and was reconstituted with 250 μL of mobile phase (water with amm. formate 10 mM, $\text{pH}=4.5$). A detailed scheme of sample preparation is shown in Figure 1-supplementary information (SI).

Spiked urine samples. A pool of rat urine without clenbuterol stored at -20°C until validation was used. The racemic clenbuterol containing S-(+) and R-(−) enantiomers was spiked to the sample pool at different concentrations in the same range of the racemic calibration curve (25-1600 pg/mL). Afterwards, spiked samples were treated as previously described.

Meat and Drug samples. Regarding the enantiomeric determination of clenbuterol in the drug, meat and after pelleting both, a complete description of sample preparation can be found in Part 1-SI.

2.5 Method validation

The identification of clenbuterol (S-(+) and R-(−) forms) was performed using two transitions (m/z 277.10 \rightarrow 202.9 and m/z 277.10 \rightarrow 132.02). However, from these, the most abundant was used for quantification (m/z 277.10 \rightarrow 202.9) throughout the application while the less abundant transition (m/z 277.10 \rightarrow 132.02) was employed to assess the identification using it only as a qualifier peak.

Validation of the analytical method was performed according to the VICH GL49(R) guide¹⁵. This guidance specifically addresses the validation of veterinary drug residue methods^{15,23,24}, with emphasis on selectivity, linearity, recovery, precision, sensitivity, accuracy, limit of quantification (LOQ), detection (LOD) and stability of the sample after preparation. Selectivity was evaluated by comparing chromatograms of six different urines obtained from six different rats to ensure that no interfering peaks were present at the retention time of enantiomers of clenbuterol. Calibration curve standards consisted in a set of 7 concentrations of each enantiomer from clenbuterol in a concentration range of 12.5– 800 pg/mL . The within- and between-run precision and accuracy were determined by analyzing seven levels of concentration (25, 50, 100, 200, 400, 800, and 1600 pg/mL) by triplicate on three different

days. LOQ was estimated by sextuple using the lowest point on the calibration curve (12.5 pg/mL). Regarding the LOD, solutions of 2.5 to 25 pg/mL were prepared; the estimation of LOD was the average of 3 times the signal-to-noise (S/N) ratio of the solutions.

Stability of racemic clenbuterol containing S-(+) and R-(−) enantiomers was assessed by analyzing three replicates of urine spiked with racemic clenbuterol at 100, 200 and 400 pg/mL, under two conditions: (1) short-term storage for 1 week at −80 °C, and (2) three freeze–thaw cycles. The concentrations obtained were compared with freshly prepared solutions.

2.6. Software and data analysis

System control and data analysis were acquired and processed with MassLynx V4.1 (SCN 843 Copyright 2011, Waters Inc). All statistical analyses were performed using the statistical program IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. (IBM Corp. Released 2011. Armonk, NY: IBM Corp.), and graphs were obtained using GraphPad Prism version 7.00 for Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com).

3. Results and Discussion

Doping is a controversial topic, where the honesty of athletes is subjected to test. However, when clenbuterol is detected in urine, there is currently no way to accurately estimate whether clenbuterol comes from doping or it is the result of eating contaminated meat. In recent studies, it has been suggested that the pharmacokinetics of clenbuterol are different for each enantiomer depending on their origin (meat or drug)^{2,4,5,25}. However, to our knowledge, the long-term variations in the ratio of the enantiomers in these two conditions remain unclear. On the other hand, WADA through the analytical parameter “Minimum Required Performance Levels (MRPL)” had established 2 ng/mL as the threshold for clenbuterol in urine. This means that above this threshold the presence of clenbuterol is positive and athletes are classified as Adverse Analytical Findings (AAF)²⁵. However, according to the latest Technical Document TD2018MRPL²⁵ from WADA, this limit is now adjusted down to 200 pg/mL of total clenbuterol [S-(+) and R-(−)] in human urine. In this context, considering all these factors, the aim of this article was, on one hand, to develop a sensitive method for the separation of S-(+) and R-(−) clenbuterol enantiomers within a total concentration range of 25 pg/mL to 1600 pg/mL, thus including the new limit of 200 pg/mL, and on the other hand, to evaluate the effect of a doping cycle or a continuous consumption of contaminated meat.

3.1 Method development

For the method development, we obtained the fragmentation spectrum of racemic clenbuterol using UPLC-ESI (+)-TQ-MS (Figure 2), where the most abundant transitions (precursor ion/product ion pair) for R(-) and S(+) clenbuterol enantiomers were selected (m/z 277.10→202.9 and m/z 277.10→132.02). Each transition was optimized adjusting the capillary and cone voltages and collision energy, these can be seen in Table 1.

To obtain the best chromatographic resolution of the enantiomers while maintaining sensitivity and an acceptable running time; pH and ionic strength of the aqueous mobile phase were tested. Both parameters were highly associated with the addition of a modifier such as amm. formate to the mobile phase at different concentrations²⁶. Chromatographic separation was tested with different solvents at diverse percentages (ACN, MeOH and 2-PrOH), and varying concentrations of amm. formate within 5–10 mM, in a pH range from 4.5 to 7, observing the biggest changes with the change of the pH. This working pH range (4.5-7), produced a net negative charge on the AGP from the chiral column ensuring the retention of positively-charged groups such as the amines from clenbuterol. The enantiomers of clenbuterol were separated in four different pH values; 4.5, 5.0, 6.0 and 7.0. The results are shown in Figure 3, which shows the relationship between the resolution of S- (+) and R- (-) enantiomers, the retention time and the pH of the mobile phase. As observed, the retention time and the resolution (R_s) decreased with the pH. Although the highest resolution obtained (R_s = 2.56) was found at pH 7, the final pH value was set to 4.5, assuring a shorter total running time of the assay.

In addition, as an alternative for the separation of enantiomers, Luna 5u cellulose-2 column was tested in the same conditions as the AGP chiral column. This column is known for the separation of enantiomers and racemic mixtures of all types of compounds. The outcome using Luna 5u cellulose-2 column (250 mm x 4.6 mm, 5 μ m; Phenomenex) is presented in Figure 2-SI. This column showed greater response compared to the AGP chiral column, with a value of R_s = 1.5 between of the enantiomers; however, due to its asymmetric peak shape for the enantiomer S- (+) this method was discarded.

To sum up, the final conditions for the analytical method were: chiral column AGP with an aqueous mobile phase containing amm. formate 10 mM at pH=4.5 and mixed with ACN (97:3).

3.2 Validation

Once the method was developed, we proceeded to validate it following the VICH GL49(R) guide¹⁵. Specificity of the method was assessed by the comparison of the chromatograms from the clenbuterol enantiomers at the extremes of the calibration curve range against one urine from the control group (Figure 4), where no interference was observed in the retention time for S- (+) and R- (–) enantiomers.

Validation parameters are summarized in Table 2. Linearity of method was obtained with correlation coefficients of 0.9854 and 0.9883 for the enantiomers S- (+) and R- (–), respectively. Regarding accuracy, all the recoveries were within the limits (84.7% to 100.4%) as established in the guide. Moreover, the within and between precision values for the S-(+) enantiomer were 5.6 – 11.6% and 6.4–10.5%, respectively. Likewise, R-(–) enantiomer showed 6.3–15.9% and 4.91–11.9% for within and between precision. The LOQ of racemic clenbuterol was estimated as the lowest point on the calibration which was 12.5 pg/mL and the LOD was estimated at 6 pg/mL for each enantiomer.

Additionally, the stability of standards and spiked samples after sample extraction was tested in two conditions; after 7 days of storage at –80 °C and 3 freeze–thaw cycles (Table 3). As observed in Table 3, one week of storage showed an important impact in the enantiomer determination in sample and standards, leading to find the lowest recoveries, namely 63.5% and 65.9% for S-(+) and R-(–) enantiomers in samples, respectively. This surprising outcome could be explained by the possibility that the extraction conditions (pH, dissolvent, ion strength) are not the most suitable for clenbuterol in a long-termed storage. This means that once the samples are extracted, these should be analyzed on the instrument. On the other hand, the 3 freeze–thaw cycles had almost no impact in the recoveries, obtaining 92.3% and 91.9% of recovery from S- (+) and R- (–) enantiomers in samples.

The results from the validation demonstrated the efficiency of the sample preparation method and subsequent mass spectrometric determination of S- (+) and R- (–) clenbuterol enantiomers in rat urine.

There are already a few published methodologies to determine clenbuterol enantiomers; however, for most of them the total running analysis time ranged from 24 to 30 minutes²⁷⁻²⁹, almost four times more than the present method which last 6.5 minutes. Comparing resolution, our method showed a higher value of $R_s=1.26$ compared to the $R_s=1.0$ value reported by

Velasco Bejarano ²⁷. Furthermore, the sensitivity of the present method for each enantiomer included the lowest LOQ reported (12.5 pg/mL) compared to previous methods ²⁷⁻²⁹ (0.025 ng/mL, 50 ng/mL and 2.5 µg/mL). Finally, this work evaluates the effect of thaw-freezing cycles and short-term stability at -80°C after the sample is prepared, which previous studies have not evaluated.

3.3 Application of the method in the experimental animal model

The characterization and quantitation of clenbuterol enantiomers in the drug (Ventipulmin ®) and in meat, before and after pelleting, were performed before starting the study with the animals (Table 1-SI). Chromatograms of these results are shown at Figure 5, where we observed that the ratio of S-(+) and R-(−) enantiomers was 1, regardless of the type of sample (meat or drug). This is in contrast of what has been previously reported in the case of meat ¹⁵, but it could be explained by the fact that this meat was obtained from the market without knowing specifically the part of the animal it came from. Moreover, we observed that the process of pelleting did not affect the amount and the ratio of the enantiomers which continued to be 1. Taking these results in mind, we proceeded to the administration of clenbuterol to the animals in three groups: mimicking a doping cycle (“drug group”), consumption of contaminated meat (“meat group”) and a “control group” fed normally without clenbuterol.

The urine from each rat was collected the following day after the ingestion of clenbuterol (drug or meat) or control diet during the 7 days of the study. Although for some rats we were unable to collect urine on some days, available samples were analyzed using the validated method. The sensitivity and specificity of the assay were found to be enough to accurately measure the enantiomers [S- (+) and R- (−)] from clenbuterol, as their concentrations were above the LOD for the experimental groups. The quantitation of the enantiomers can be found in Figure 6. We did not find any signal in the urine samples from the control group. We observed for the drug group that the mean concentration of clenbuterol followed a Gaussian distribution. Thus, at the first day, 0.2 and 0.15 ng/mL were estimated for the S-(+) and R-(−) enantiomers, respectively, and these increased up to 0.5 and 0.4 ng/mL at day 4 of the doping cycle, matching the highest concentration of clenbuterol. On the other hand, the concentration of S-(+) and R-(−) enantiomers from meat (containing initially 0.54 µg/day) was similar throughout the first 6 days showing in urine an average of 0.04 ng/mL, and with a trend of decreasing at day 7.

In order to test differences, a one-way ANOVA with repeated measures test was applied to each day of the study (Figure 6). As expected, differences between the route clenbuterol was

administrated were observed. First, we found higher amounts of S-(+) and R-(−) enantiomers (150% and 130%, respectively) in the drug group compared to the meat group. Importantly, we found significant differences between S- (+) and R- (−) enantiomers during the five first days of the doping cycle, observing higher amounts of the S- (+) form than the enantiomer R- (−).

Moreover, the ratios of the two enantiomers were calculated as R/S. These were compared using one-way ANOVA test (Figure 7). We observed that the averages of R/S ratio ranged for the “drug group” from 0.67 to 0.89, while this range was 0.97-1.22 for the “meat group”. The fact that the range of this “meat group” included 1 indicated that the proportions of each enantiomer were equal (50:50).

The difference in the enantiomeric relationship of the drug group could be explained by the biological activity of the enantiomers. It has been described that β -agonists with chiral structures have different metabolism, being R-(−) enantiomers more active than S-(+) forms, which suggests that S-(+) clenbuterol is less metabolized and excreted³⁰. It is possible that the drug metabolism is time- and concentration-dependent, leading to its disappearance in the last days (6 and 7 days) when the concentration of clenbuterol is low. In a previous work, the pharmacokinetics of clenbuterol enantiomers in rats after *i.v.* administration of 2 mg/Kg of racemic clenbuterol showed higher concentration of S-(+) enantiomer in plasma at 24 hrs., suggesting significantly different distribution and excretion of the enantiomers³¹.

However, in a recent study by Parr MC et al.³ a single dose of clenbuterol, either from a pharmaceutical preparation, or from meat containing clenbuterol (beef or liver) was studied in humans. Despite our data is not comparable to human results and the experimental design is different, this article is a pilot study which pretends to imitate the reality of doping cycles to which athletes are exposed and the effect of a constant consumption of contaminated meat. Further studies of pharmacokinetics in humans and studies at various doses and times in both blood and urine are needed to validate these results.

4 Conclusions

To sum up, this article shows a rapid and simple method for the determination of clenbuterol enantiomers; S-(+) and R-(−), in a total concentration range for clenbuterol from 25 to 1600 pg/mL (including the new MRPL parameter established by the WADA) in a total running time of 6.5 min. The methodology has been fully validated for specificity, linearity, precision, LOQ

and LOD according to the VICH guidelines for bioanalytical methods. Moreover, the analytical method has been used in the analysis of different types of samples, namely, drug, meat and urine containing clenbuterol. We have applied this methodology for the evaluation of clenbuterol enantiomers in rat urine during a doping cycle or a continued ingestion of contaminated meat. Our results indicate significant differences between clenbuterol enantiomers in urine in the first five days of the doping cycle in rats. The application developed here might be of help for the anti-doping organizations and athletes with positive AAF results associated with clenbuterol. However, further studies are needed in humans to determine the effect in clenbuterol enantiomers in a long-term consumption and source.

5 Conflict of interest statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

6 Acknowledgements

We would like to thank the financial support PAPIIT IN218115 project of DGAPA-UNAM - National Autonomous University of Mexico and CONACYT doctoral fellowship number 401939. Authors also acknowledge Tomás Barker-Tejeda, for his asserted comments and MSc Hugo Cuatecontzin for the design and preparation of the pellets with clenbuterol.

7 References

1. Prezelj A, Obreza A, Pecar S. Abuse of clenbuterol and its detection. *Curr Med Chem.* 2003;10(4):281-290.
2. Thevis M, Geyer L, Geyer H, et al. Adverse analytical findings with clenbuterol among U-17 soccer players attributed to food contamination issues. *Drug Test Anal.* 2013;5(5):372-376.
3. Parr MK, Blokland MH, Liebetrau F, et al. Distinction of clenbuterol intake from drug or contaminated food of animal origin in a controlled administration trial - the potential of enantiomeric separation for doping control analysis. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 2017;34(4):525-535.

4. Thevis M, Thomas A, Beuck S, Butch A, Dvorak J, Schänzer W. Does the analysis of the enantiomeric composition of clenbuterol in human urine enable the differentiation of illicit clenbuterol administration from food contamination in sports drug testing? *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2013;27(4):507-512.
5. Guddat S, Fußhöller G, Geyer H, et al. Clenbuterol - regional food contamination a possible source for inadvertent doping in sports. *Drug Test Anal.* 2012;4(6):534-538.
6. World Anti-Doping Agency WADA. Athletes must show caution due to contaminated meat. 2011; <https://www.wada-ama.org/en/media/news/2011-11/athletes-must-show-caution-due-to-contaminated-meat-0>. Accessed 10th April 2019.
7. Malucelli A, Ellendorff F, Meyer HH. Tissue distribution and residues of clenbuterol, salbutamol, and terbutaline in tissues of treated broiler chickens. *J Anim Sci.* 1994;72(6):1555-1560.
8. Johnson BJ, Smith SB, Chung KY. Historical Overview of the Effect of β -Adrenergic Agonists on Beef Cattle Production. *Asian-Australas J Anim Sci.* 2014;27(5):757-766.
9. Miller MF, Garcia DK, Coleman ME, et al. Adipose tissue, longissimus muscle and anterior pituitary growth and function in clenbuterol-fed heifers. *J Anim Sci.* 1988;66(1):12-20.
10. Schiavetta AM, Miller MF, Lunt DK, Davis SK, Smith SB. Adipose tissue cellularity and muscle growth in young steers fed the beta-adrenergic agonist clenbuterol for 50 days and after 78 days of withdrawal. *J Anim Sci.* 1990;68(11):3614-3623.
11. Wood A, Foo TK, Ahmad M, Fagan JM. Clenbuterol : Effects and Usage in Livestock and Show Animals. 2010. <https://rucore.libraries.rutgers.edu/rutgers-lib/41218/PDF/1/play/>. Accessed 10th April 2019.
12. Dimeo P, Møller V. *The Anti-Doping Crisis in Sport: Causes, Consequences, Solutions.* 1st Edition ed. London, UK.: Routledge. Taylor & Francis Group; 2018.

13. Sterk SS, Liebetrau F, Meijer T, Schmidt AH, Blokland MH. *Funded Research Project. Clenbuterol in Meat: A Source for a Positive Doping Control? Search for Analytical Strategy to Distinguish Abuse from Meat Contamination*. 2015. https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/review_s_sterk_11a18ss_0.pdf. Accessed 10th April 2019.
14. Wang ZL, Zhang JL, Zhang YN, Zhao Y. Mass spectrometric analysis of residual clenbuterol enantiomers in swine, beef and lamb meat by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal Methods*. 2016;8(20):4127–4133.
15. VICH Steering Committee. VICH Topic GL49: Studies to Evaluate the Metabolism and Residues Kinetics of Veterinary Drugs in Human Food-Producing Animals: Validation of Analytical Methods Used in Residue Depletion Studies. EMA/CVMP/VICH/463202/2009. In: European Medicines Agency. Science Medicines Health.; 2016:1-20.
16. Willson C. Clenbuterol. In: *Reference Module in Biomedical Sciences*. NE, USA.: Elsevier; 2015:1–9.
17. Knych HK, Mitchell MM, Steinmetz SJ, McKemie DS. Detection, pharmacokinetics and cardiac effects following administration of clenbuterol to exercised horses. *Equine Vet J*. 2014;46(3):380-385.
18. Kearns CF, McKeever KH. Clenbuterol and the horse revisited. *Vet J*. 2009;182(3):384-391.
19. Daubert GP, Mabasa VH, Leung VW, Aaron C. Acute clenbuterol overdose resulting in supraventricular tachycardia and atrial fibrillation. *J Med Toxicol*. 2007;3(2):56-60.
20. Kierzkowska B, Stańczyk J, Kasprzak JD. Myocardial infarction in a 17-year-old body builder using clenbuterol. *Circ J*. 2005;69(9):1144-1146.

21. Ribeiro SM, Rogero MM, Bacurau RF, et al. Effects of different levels of protein intake and physical training on growth and nutritional status of young rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2010;56(3):177-184.
22. Tirapegui J, Ribeiro SM, Pires IS, Rogero MM. Effects of two different levels of dietary protein on body composition and protein nutritional status of growing rats. *Nutrients*. 2012;4(9):1328-1337.
23. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM). Bioanalytical Method Validation Guidance. 2018.:1-41. <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm070107.pdf>. Accessed 10th April 2019.
24. World Anti-Doping Agency WADA. Technical Document-TD2018MRPL. 2018:1-6. https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/td2018mrpl_v1_finaleng.pdf. Accessed 10th April 2019.
25. Ren Y, Yang J. Determination of Common Beta-Agonist Residues in Meat Products by UPLC-MS/MS. Application note. 2008:1-6. http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/2017nacrw_hird_beta-agonists.pdf. Accessed 10th April 2019.
26. Hermansson J. Direct liquid chromatographic resolution of racemic drugs using α 1-acid glycoprotein as the chiral stationary phase. *J. Chromatogr. A*. 1983;269:71 - 80.
27. Velasco-Bejarano B, Bautista J, Noguez MO, Camacho E, Rodríguez ME, Rodríguez L. Resolution of R-(-) and S-(+)- enantiomers of clenbuterol in pharmaceutical preparations and black-market products using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Drug Test Anal*. 2017;9(11-12):1738–1743.
28. Mostafa GA, Hefnawy MM, El-Majed A. Separation and determination of clenbuterol by HPLC using a vancomycin chiral stationary phase. *J AOAC Int*. 2009;92(3):824-829.

29. Hefnawy MM, Al-Shehri M, Sultan M, Mostafa GAE. Enantiomeric resolution and determination of clenbuterol by hplc technique in plasma and pharmaceutical formulations using polysaccharide chiral stationary phase and uv detection. *Dig J Nanomater Biostructures*,. 2013;8(4):1781–1790.
30. T. Kitaura SS, W. J., Kraemer. Effects of clenbuterol enantiomers on growth of young male rats. *J.Phys. Fit. Sport. Med.*2019; 4(5): 369–376.
31. Ahmad AM. Recent advances in pharmacokinetic modeling. *Biopharm Drug Dispos.* 2007;28(3):135–143.

Accepted Article

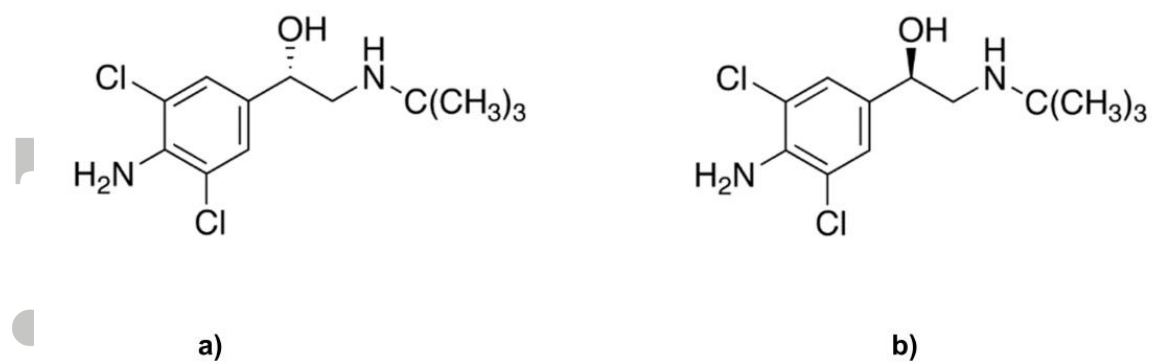


Figure 1. Chemical structure of the clenbuterol enantiomers a) S- (+) and b) R- (–)

Accepted Article

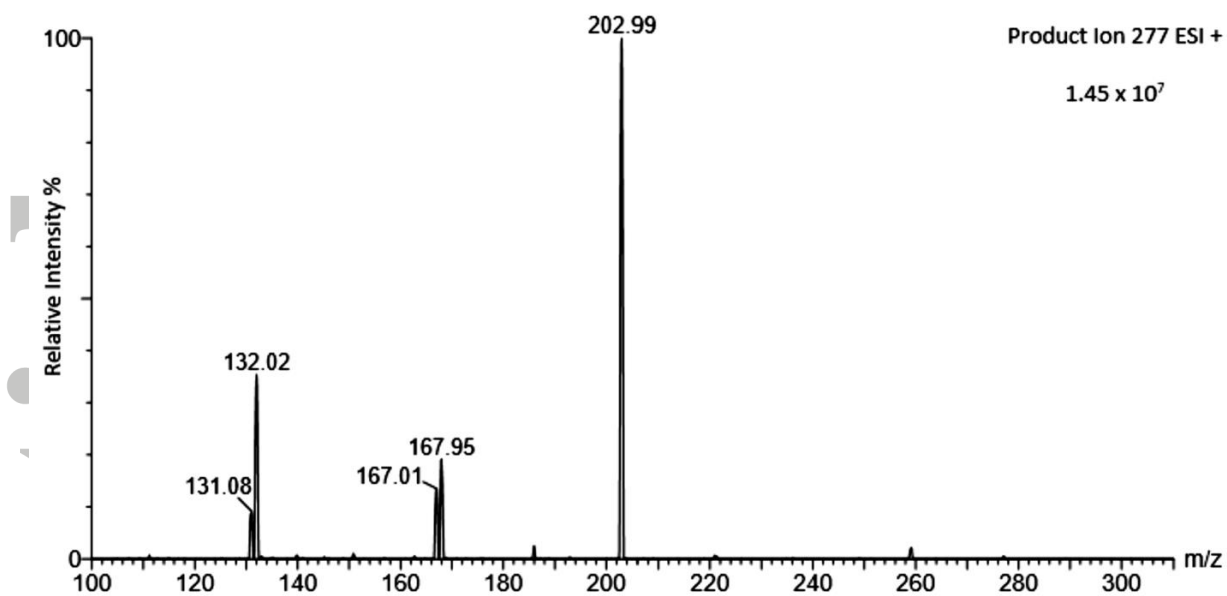


Figure 2. Product ion spectrum of racemic clenbuterol (m/z 277) using UPLC - ESI (+) - TQ-MS.

NOTE: Optimized Product Ion Spectrum at Collision Energy of 16 eV. The concentration of racemic clenbuterol was 100 ng/mL.

Accepted

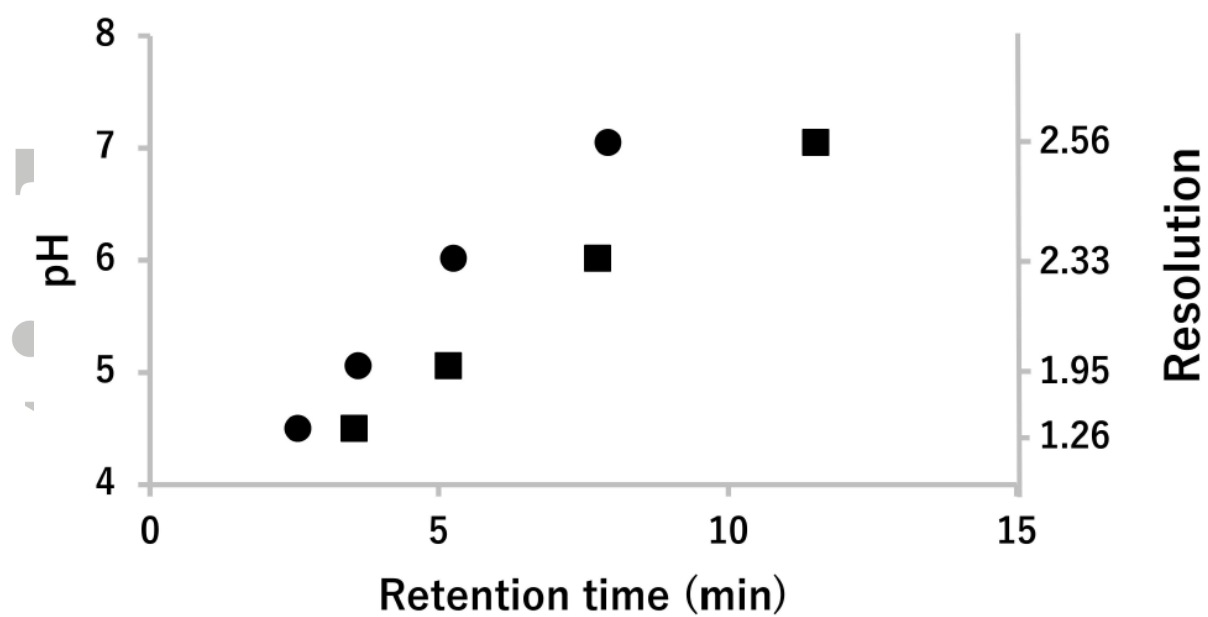


Figure 3. Influence of pH on the retention time and resolution of S- (+) and R- (–) clenbuterol enantiomers.

Accepted

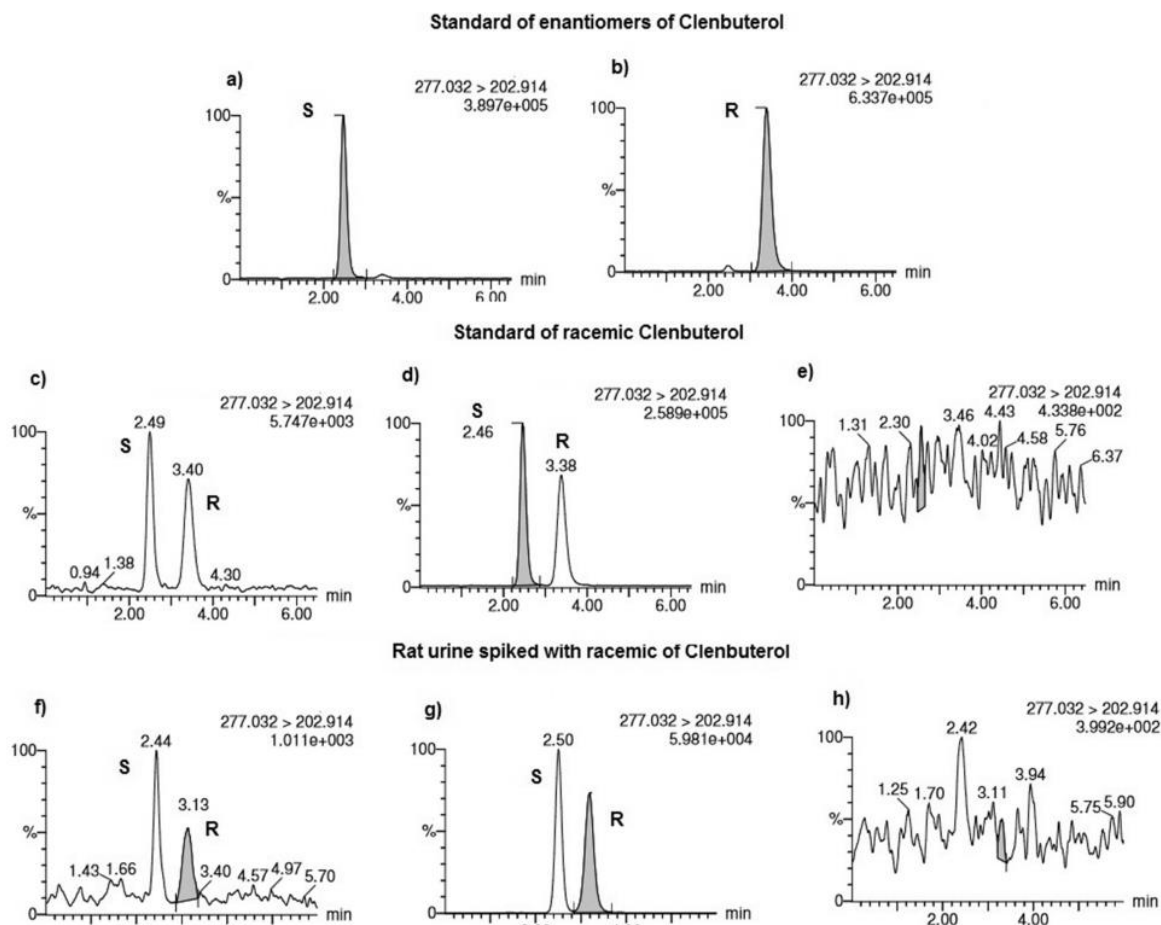


FIGURE 4

Figure 4. Extracted SRM chromatograms of the transition m/z 277.10→202.9 for a) the standard of S-(+) clenbuterol enantiomer; b) standard of R-(−) clenbuterol enantiomer; c) and d) standard of racemic clenbuterol at lowest and highest points of the calibration curve (0.025 ng/mL and 1.6 ng/mL), respectively; e) blank of mobile phase; f) and g), urine from rat spiked with lowest and highest points of the calibration curve (0.025 ng/mL and 1.6 ng/mL), respectively; h) blank of rat urine.

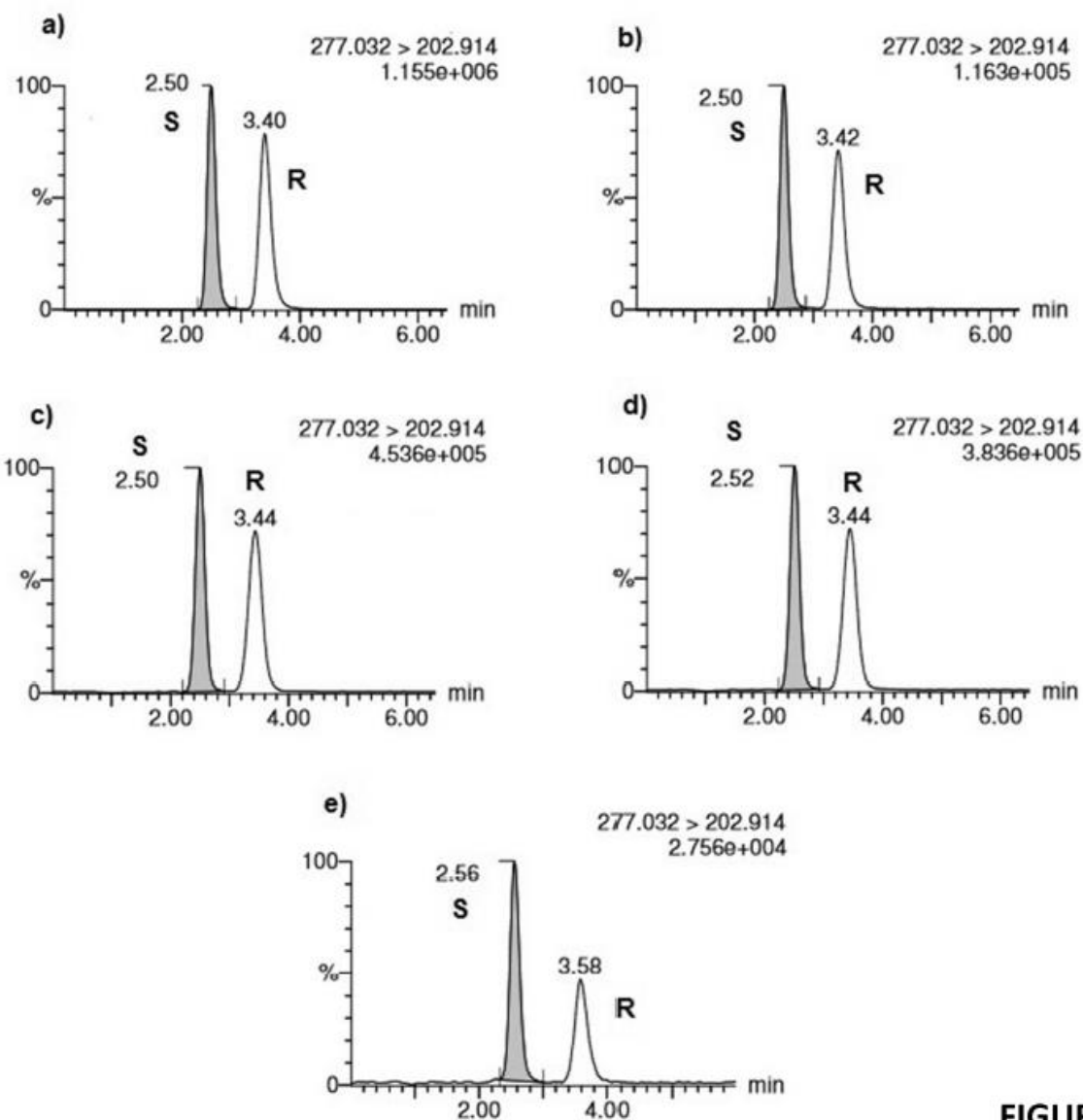


FIGURE 5

Figure 5. Extracted SRM chromatograms of the transition m/z 277.10→202.9 for a) meat contaminated with clenbuterol; (b) Clenbuterol medication; (c) pellet with meat containing clenbuterol; (d) pelleted with clenbuterol (Ventipulmin®); (e) urine from rat at the third day of doping with clenbuterol S-(+) 0.195 ng/mL and R(-) 0.126 ng/mL.

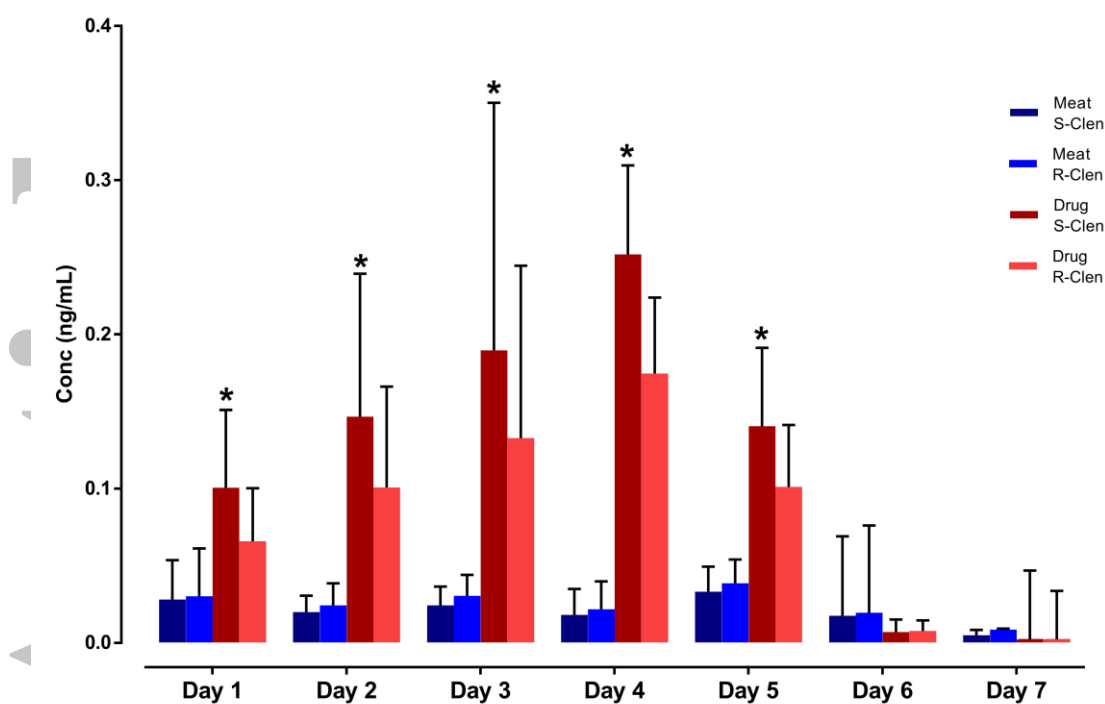


Figure 6. Concentrations of S- (+) and R- (–) enantiomers of clenbuterol (ng/mL) in rat urine during a doping cycle (red bars) and continuous meat consumption (blue bars).

NOTE: Data after one-way ANOVA with repeated measures. Bars are mean +/- Interval confidence at 95%. The * means significance between enantiomers; R-(–) and S-(+) ($p < 0.05$).

Accepted

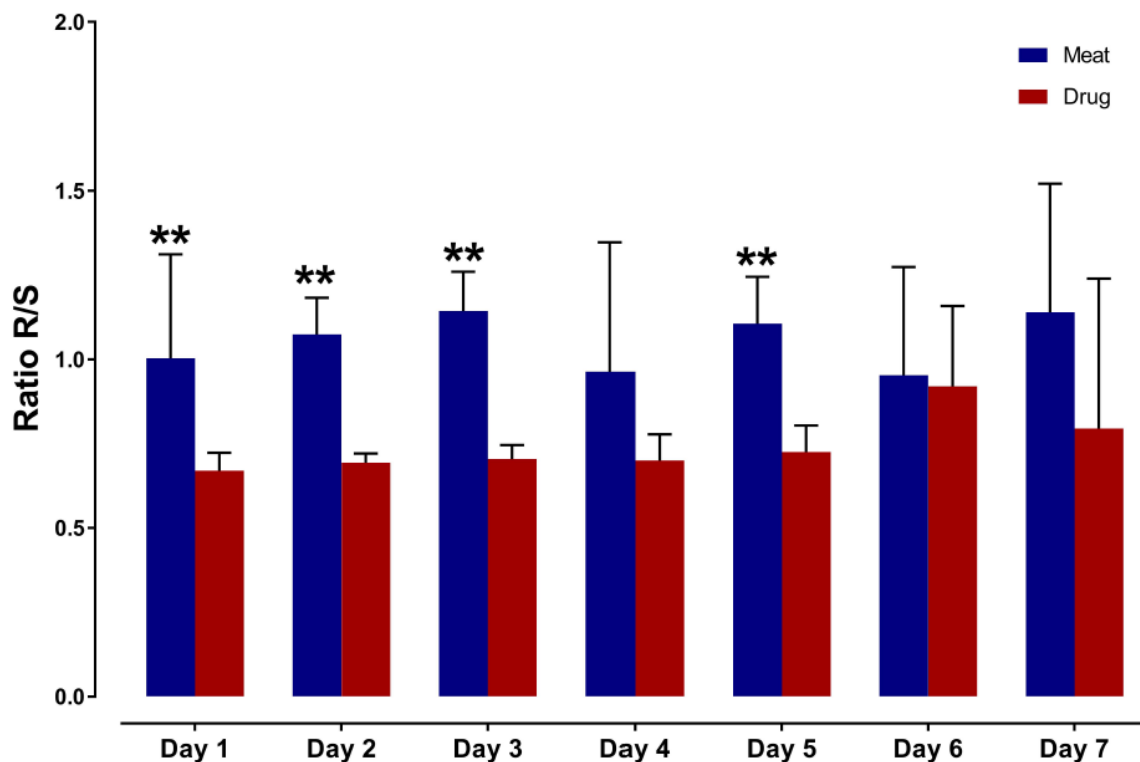


Figure 7. R/S ratio of clenbuterol enantiomers in rat urine during a doping cycle (red bars) and continuous meat consumption (blue bars).

NOTE: Data after one-way ANOVA. Bars are mean +/- Interval confidence (95%). The ** means significance between “drug group” in red and “meat group” in blue ($p < 0.001$).

Accepted

Table 1. Optimized MS parameters for the enantiomers of clenbuterol.

<i>Clenbuterol enantiomer</i>	<i>Precursor Ion (m/z)</i>	<i>Product Ion (m/z)</i>	<i>Collision Energy (eV)</i>	<i>Cone Voltage (V)</i>	<i>Retention time (min)</i>	<i>Transition used for</i>
S- (+)	277.10	202.91	16	22	2.5	Quantification
R- (-)	277.10	202.91	11	15	3.5	
S- (+)	277.10	132.02	16	22	2.5	Qualification
R- (-)	277.10	132.02	11	15	3.5	

Accepted Article

Table 2. Main validation parameters of the method.

1. Linearity (n=21)									
Standards		Intercept ± C.I.		Slope ± C.I.		r ²	Range (pg/mL)		
Clenbuterol Total		4.29		52074		0.9977	25 – 1600		
S- (+) Clenbuterol		14.92		26156		0.9975	12.5 – 800		
R- (-) Clenbuterol		- 10.62		25918		0.9972	12.5 – 800		
Samples		Intercept ± C.I.		Slope ± C.I.		r ²	Range (pg/mL)		
Clenbuterol Total		0.0195		0.7778		0.9872	25 – 1600		
S- (+) Clenbuterol		0.0105		0.7726		0.9851	12.5 – 800		
R- (-) Clenbuterol		0.009		0.7801		0.9883	12.5 – 800		
2. Accuracy (n=9)									
		(pg/mL)	25	50	100	200	400	800	1600
Clenbuterol Total	Recovery (%) ± C.I.		99.6	97.5	91.5	89.2	85.3	84.7	87.1
		(pg/mL)	12.5	25	50	100	200	400	800
S- (+) Clenbuterol	Recovery (%) ± C.I.		103.3	100.4	91.5	90.8	85.4	84.7	86.9
R- (-) Clenbuterol	Recovery (%) ± C.I.		95.8	94.7	91.4	87.5	85.1	84.7	87.3
3. Precision (n=9)									
Within-Run									
Added conc.		(pg/mL)	25	50	100	200	400	800	1600
Clenbuterol Total	Mean (pg/mL)		25	49	92	178	341	678	1234
	R.S.D. (%)		7.91	9.26	9.64	7.06	10.63	11.19	5.35
Added conc.		(pg/mL)	12.5	25	50	100	200	400	800
S- (+) Clenbuterol	Mean (pg/mL)		13	25	46	91	171	339	616
	R.S.D. (%)		8.7	9.8	9.5	6.6	11.6	12.9	5.6
R- (-) Clenbuterol	Mean (pg/mL)		12	24	46	88	170	339	618
	R.S.D. (%)		15.9	11.2	13.1	8.6	10.1	9.8	6.3
Between-Run									
Added conc.		(pg/mL)	25	50	100	200	400	800	1600
Clenbuterol Total	Mean (pg/mL)		25	49	92	178	341	678	1234
	R.S.D. (%)		4.81	9.18	6.92	7.24	6.43	7.04	5.35
Added conc.		(pg/mL)	12.5	25	50	100	200	400	800
S- (+) Clenbuterol	Mean (pg/mL)		13	25	46	91	171	339	616
	R.S.D. (%)		8.6	10.5	8.0	6.6	9.5	7.2	6.4
R- (-) Clenbuterol	Mean (pg/mL)		12.0	24	46	88	170	339	618
	R.S.D. (%)		7.1	10.1	11.9	8.6	6.4	4.9	6.8
4. LOQ									
		Recovery (%)	R.S.D. (%)			Conc. (pg/mL)			
Clenbuterol Total		80.34	12.78			25			
S- (+) Clenbuterol		86.9	16.68			12.5			
R- (-) Clenbuterol		73.79	11.06			12.5			

C.I.; confidence interval.

Table 3. Stability of R-(–) and S-(+) clenbuterol enantiomers after sample preparation (n= 3).

<i>Condition</i>	<i>Enantiomer Recovery</i> Concentration (pg/mL)	<i>S- (+) Clenbuterol</i>				<i>R- (–) Clenbuterol</i>			
		<i>(pg/mL)</i>		<i>(%)</i>		<i>(pg/mL)</i>		<i>(%)</i>	
		Standard	Spiked sample	Standard	Spiked sample	Standard	Spiked sample	Standard	Spiked sample
<i>-80 °C (1 Week)</i>	100	97 ± 0.01	79 ± 0.01	97.45 ± 9.46	79.38 ± 7.81	83 ± 0.00	79 ± 0.01	82.97 ± 0.01	79.62 ± 8.01
	200	149 ± 0.01	127 ± 0.01	74.86 ± 6.73	63.54 ± 7.19	134 ± 0.01	131 ± 0.01	67.46 ± 0.01	65.90 ± 6.76
	400	350 ± 0.04	290 ± 0.04	87.69 ± 10.29	72.53 ± 10.57	329 ± 0.04	296 ± 0.01	82.49 ± 0.01	74.23 ± 9.26
<i>3 Freeze / thaw cycles</i>	100	100 ± 0.00	98 ± 0.01	100.23 ± 5.60	98.37 ± 10.11	97 ± 0.00	93 ± 0.01	97.59 ± 4.6	93.75 ± 12.06
	200	193 ± 0.02	185 ± 0.02	96.67 ± 7.60	92.99 ± 9.66	186 ± 0.02	183 ± 0.01	93.45 ± 11.90	91.98 ± 9.70
	400	392 ± 0.01	376 ± 0.01	98.19 ± 2.73	94.08 ± 2.82	387 ± 0.01	379 ± 0.01	96.81 ± 1.84	94.91 ± 2.55