



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS POTENCIALES
METABOLITOS DEL CLEMBUTEROL, UNA ESTRATEGIA PARA
DISCRIMINAR DOPAJE NO INTENCIONAL.**

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Licenciado en Farmacia ANUAR GÓMEZ TAGLE GONZÁLEZ

**TUTOR: DR. BENJAMÍN VELASCO BEJARANO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, Octubre, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Para mis padres.

"Los científicos dicen que estamos hechos de átomos,
pero a mí un pajarito me contó que estamos hechos
de historias".

Eduardo Galeano.

Este trabajo de investigación se llevó a cabo en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, en la sección de Química Organica L-122 bajo la asesoría del Dr. Benjamín Velasco Bejarano dentro del proyecto DGAPA-UNAM PAPIIT IA209220.

Agradecimientos

- Al Dr. Benjamín Velasco Bejarano por sus atenciones e inigualable amistad.
- A mis sinodales por sus amables comentarios y tiempo prestado en la revisión de este trabajo.
- A CONACyT por la ayuda brindada. CVU: 744536
- A Alan Álvarez y Oscar Zuñiga mis amigos y compañeros de laboratorio por la ayuda prestada.
- Al apoyo técnico prestado por Eleazar Rojas y Alicia Soto del Centro de Excelencia de Agilent Technologies México.
- Al Dr. Pablo Arturo Martínez Soriano, del laboratorio de Química Medicinal FESC por la ayuda en la obtención de los espectros de Infrarrojo.
- A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser la sede de todo el conocimiento adquirido en estos años.

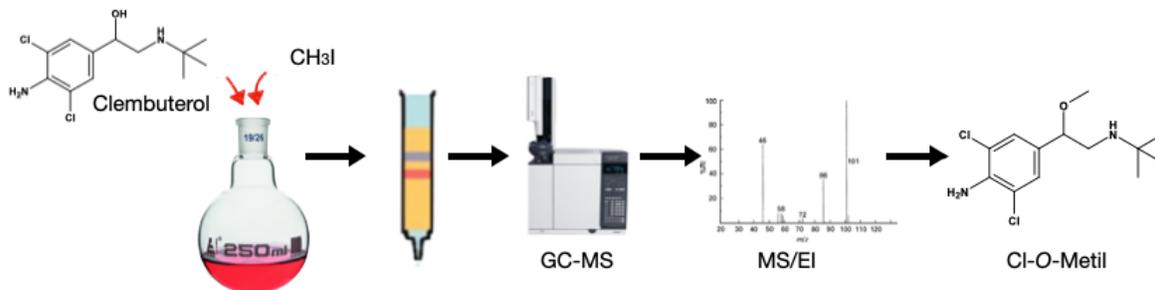
Índice

1. Resumen gráfico	7
2. Introducción	7
3. Generalidades	9
3.1 <i>Clembuterol</i>	9
3.1.1 Mecanismo de acción	9
3.2.2 Usos en el deporte	10
3.2 <i>Metabolismo</i>	10
3.3 <i>Metabolismo clembuterol</i>	10
3.3.1 Metabolismo de clembuterol en humanos	10
3.3.2 Metabolismo en animales	11
3.4 <i>Problemática de los residuos de agonista β-adrenérgicos en productos de origen animal.</i>	11
3.4.1 En el deporte	11
4. Hipótesis	13
5. Objetivos	13
5.1 <i>Objetivo general</i>	13
5.2 <i>Objetivos particulares</i>	13
6. Experimentación	14
6.1 <i>Equipos</i>	14
6.2 <i>Procedimientos experimentales</i>	14
6.2.1 Procedimientos generales	14
6.2.2 De la reacción de <i>O</i> -alquilación.	15
6.2.3 De la reacción de glucuronidación.	15
6.2.4 De la reacción de sulfatación.	15
6.2.5 De la oxidación de la amina aromática.	16
7. Resultados y Discusión	17
7.1 <i>De la reacción de <i>O</i>-alquilación.</i>	17
7.1.1 GC-MS	17
7.1.2 Espectroscopia de Infrarrojo	18
7.2 <i>De la reacción de Glucuronidación.</i>	19
7.2.1 HPLC-MS	19
7.2.2 Espectroscopia de Infrarrojo	22
7.3 <i>De la reacción de sulfatación.</i>	22
7.3.1 HPLC-MS	22
7.3.2 Espectroscopia de Infrarrojo	24
7.4 <i>De la oxidación de la amina aromática.</i>	25
7.4.1 GC-MS	25
7.4.2 Espectroscopia de Infrarrojo	28
8. Conclusiones	28
9. Prospectivas	28

Índice de figuras

<i>Figura 1.</i> Representación esquemática del mecanismo broncodilatador de los agonistas β -adrenérgicos. _____	9
<i>Figura 2.</i> Número de RAA a clenbuterol desde periodo 2003-2019 _____	12
<i>Figura 3.</i> Reacciones generales para la síntesis de los potenciales metabolitos del clenbuterol. _____	14
<i>Figura 4.</i> Estructura química del Cl-O-Metil _____	17
<i>Figura 5.</i> Espectro de masas adquirido por EI correspondiente al producto Cl-O-Metil _____	17
<i>Figura 6.</i> Patrón de fragmentación propuesto del Cl-O-Metil. _____	18
<i>Figura 7.</i> Espectro de absorción en el infrarrojo del producto Cl-O-Metil _____	19
<i>Figura 8.</i> Estructura química del Cl-Gluc _____	19
<i>Figura 9.</i> Espectro de masas adquirido por ESI correspondiente al producto Cl-Gluc _____	20
<i>Figura 10.</i> Patrón de fragmentación propuesto del Cl-Gluc _____	21
<i>Figura 11.</i> Espectro de absorción en el infrarrojo del producto Cl-Gluc _____	22
<i>Figura 12.</i> Estructura química del Cl-SO ₃ _____	22
<i>Figura 13.</i> Espectro de masas adquirido por ESI correspondiente al producto Cl-SO ₃ _____	23
<i>Figura 14.</i> Patrón de fragmentación propuesto del Cl-SO ₃ _____	24
<i>Figura 15.</i> Espectro de absorción en el infrarrojo del producto Cl-SO ₃ _____	25
<i>Figura 16.</i> Estructura química del Cl-NO ₂ _____	25
<i>Figura 17.</i> Espectro de masas adquirido por EI correspondiente al producto Cl-NO ₂ _____	26
<i>Figura 18.</i> Patrón de fragmentación propuesto de Cl-NO ₂ _____	27
<i>Figura 19.</i> Espectro de absorción en el infrarrojo del producto Cl-NO ₂ _____	28

1. Resumen gráfico



2. Introducción

El origen del deporte se remonta aproximadamente al año 776 a.C. en la antigua Grecia en donde celebraban una justa deportiva con una duración de seis días y constaba de pocas pruebas deportivas, aunque el término deporte no fue utilizado sino hasta el siglo XVIII.¹ Desde entonces, las actividades deportivas ya sea en su práctica individual o en equipo se han vuelto parte de nuestra cultura. Con ello los deportistas han tratado de incrementar sus capacidades físicas, lo que les permite abatir e imponer nuevos records o marcas en su especialidad. Ante este mayor grado de exigencia algunos han optado por la utilización de sustancias o métodos que mejoran su capacidad física, actividad prohibida llamada dopaje.²

El dopaje, por tanto, es la utilización de sustancias o métodos que han sido prohibidos en el deporte por diversas organizaciones, entre ellas la más importante: la Agencia Mundial Antidopaje (WADA-AMA). El dopaje carece de honestidad pues se obtienen victorias o triunfos utilizando métodos que no van de acuerdo con los reglamentos actuales, además, dichas sustancias ponen en riesgo la salud y la vida del deportista.³ La WADA-AMA ha clasificado dentro de la Lista de Sustancias y Métodos Prohibidos en el deporte al clenbuterol en el grupo S1, dado sus efectos ergogénicos (aumento de la potencia muscular), lipolíticos (perdida de grasa) y anabólicos (crecimiento muscular), por lo que se aumenta el rendimiento y la resistencia de una manera artificial.^{4,5,6,7}

Algunos autores han demostrado que el clenbuterol (**I**) puede entrar al organismo de un atleta a través de la ingesta de carne contaminada o de la ingesta intencional, lo que puede dar lugar a un resultado analítico adverso (RAA) al analizar una muestra biológica de un atleta. En los últimos años se han

¹ Ruiz, F. (2015). "Historia del deporte: del mundo antiguo a la edad moderna", *Revista Contribuciones a las Ciencias Sociales*, n. 27.. En línea: <http://www.eumed.net/rev/eccss/2015/01/deporte.html>

² World Antidoping Code- WADA-AMA. En línea https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2021_wada_code.pdf

³ Martínez-Vargas, Alfonso Zavaleta. (2017). Dopaje y control antidopaje en el deporte. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 83(4), 369-370. En línea http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810634X2017000400001&lng=es&tng=es.

⁴ Kim, H. K., Della-Fera, M. A., Hausman, D. B., Baile, C. A. (2010). Effect of clenbuterol on apoptosis, adipogenesis, and lipolysis in adipocytes. *Journal of physiology and biochemistry*, 66(3), 197-203.

⁵ Perry, H. (1993). Clenbuterol: a medal in tablet form?. *British journal of sports medicine*, 27(2), 141.

⁶ Choo, J. J., Horan, M. A., Little, R. A., Rothwell, N. J. (1992). Anabolic effects of clenbuterol on skeletal muscle are mediated by beta 2-adrenoceptor activation. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 263(1), E50-E56.

⁷ Prohibited List 2021-WADA-AMA. En línea https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2021list_en.pdf

tratado de desarrollar métodos de análisis que permitan discernir el origen de entrada de esta sustancia al organismo.^{8,9}

Según los reportes de la Agencia Mundial Antidopaje, el número de resultados analíticos adversos por clenbuterol se ha incrementado drásticamente y en particular en México. En el año 2011 un grupo de jugadores mexicanos de fútbol, fueron temporalmente retirados de la copa de oro celebrada en EUA (Estados Unidos de América), debido a la presencia de esta sustancia.^{10,11} A nivel mundial se han hecho grandes esfuerzos para poder tener una metodología que permita identificar una contaminación de una intención de dopaje.^{12,13,14} En este sentido se han desarrollado métodos para identificar los enantiómeros del clenbuterol como una medida de tamizaje enantiomérico entre humanos y bovinos, sin embargo, los resultados no han sido concluyentes. Existen reportes donde se han encontrado diferencias en orina de animales posterior a la ingesta de clenbuterol¹⁵ en donde el enantiómero *R* se observa en mayor proporción, pero este dato no es contundente dado que en otras especies esta relación se invierte o se pierde, con lo cual, en un caso legal ante el tribunal de arbitraje deportivo (TAS) esto es un caso perdido.

Una estrategia que se propone para coadyuvar en la resolución de esta problemática es el estudio del metabolismo del clenbuterol¹⁶; en vista de que los metabolitos del clenbuterol no están del todo identificados en humanos y en bovinos, sin embargo se han descrito vías metabólicas en animales que pueden biotransformar este fármaco,^{17,18} estas nuevas sustancias pueden servir como marcadores metabólicos para identificar la vía de entrada de esta sustancia al organismo, ya sea que fuese por la ingesta no intencional de alimentos contaminados.¹⁹

Por lo que en este trabajo se propone llevar a cabo la síntesis y caracterización estructural de los metabolitos del clenbuterol, los cuales servirán como material de referencia para una posterior identificación en orina de bovinos y humanos que han consumido clenbuterol, esta evidencia permitirá tener una posible rastreabilidad de este β_2 -agonista.

⁸ Geyer H, Schänzer W, Thevis M. (2014) Anabolic agents: recent strategies for their detection and protection from inadvertent doping. *British Journal of Sports Medicine*. (4)48, 820–826.

⁹ Barbosa, J., Cruz, C., Martins, J., Manuel Silva, J., Neves, C., Alves, C., Noronha Da Silveira, M. I. (2005). Food poisoning by clenbuterol in Portugal. *Food additives and Contaminants*, 22(6), 563-566.

¹⁰ 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(5), 372-376.

¹¹ Thevis, M., Schänzer, W. *Clenbuterol testing in doping control samples: drug abuse or food contamination?* <http://www.int.laborundmore.com/archive/884010/Clenbuterol-testing-in-doping-control-samples%3A-drug-abuse-or-food-contamination%3F.html>, consultado 14 mayo 2019

¹² 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 communication in Mass Spectrometry* 28:27(4):507-12. doi: 10.1002/rcm.6485.

¹³ Melwan M.B., Huang S.D., Fuh, M.R. (2007). Three-phase solvent bar microextraction and determination of trace amounts of clenbuterol in human urine by liquid chromatography and electrospray tandem mass spectrometry *Talanta* 72, 373-377

¹⁴ Aresta, A., Calvano C.D., Palmisano, F., Zambonin, C.G., (2008) Determination of clenbuterol in human urine and serum by solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 47, 641-645.

¹⁵ 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 & Contaminants: Part A*, 34(4), 525-535.

¹⁶ Phillip W. Chandra Prakash, Lawrence Gan. (2014). Handbook of metabolic pathways of xenobiotics. EUA. Wiley 1a ed, pp 1140-1143

¹⁷ Zalko D., Elizabeth P., Laurent D., Marie-Piere B., Jackes T. (1998). Metabolic fate of clenbuterol in calves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46, 1935-1943

¹⁸ Smith, D.J. (2000). 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. *Journal of animal science*, 78(11), 2903-2912.

¹⁹ Zalko, D., Elizabeth P., Laurent D., Marie-Piere B., Jackes T. (1997). Comparative metabolism of clenbuterol by rat and bovine liver microsomes and slices. *Drug Metabolism and Disposition* (26)1, 28-35.

3. Generalidades

3.1 Clembuterol

El clembuterol es una sustancia que pertenece al grupo de los agonistas β_2 adrenérgicos, utilizado en terapia humana y en veterinaria dadas sus propiedades como broncodilatador²⁰. En la actualidad y de manera ilícita, es utilizado en el ámbito del deporte como anabólico, por sus deseados efectos lipolíticos además de la generación de hipertrofia muscular sin los efectos androgénicos causados por hormonas.²¹

Además, su uso está prohibido para la producción de ganado debido a los beneficios obtenidos en el proceso de engorda, sin embargo, se requieren dosis altas, las cuales pueden representar un peligro para los consumidores de carne.^{22,23}

3.1.1 Mecanismo de acción

Los agonistas β adrenérgicos son moléculas que se unen a los receptores β -adrenérgicos, dando lugar al complejo agonista-receptor, que a su vez activa la proteína Gs. La subunidad α de la proteína Gs activa a la adenilato ciclasa, enzima encargada de la producción del monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), la cual es una de las principales moléculas de señalización intracelular. Esta molécula produce sus efectos al momento de unirse a la subunidad reguladora de la protein cinasa A, para liberar la subunidad catalítica encargada de la fosforilación de proteínas intracelulares.²⁴ **Figura 1**

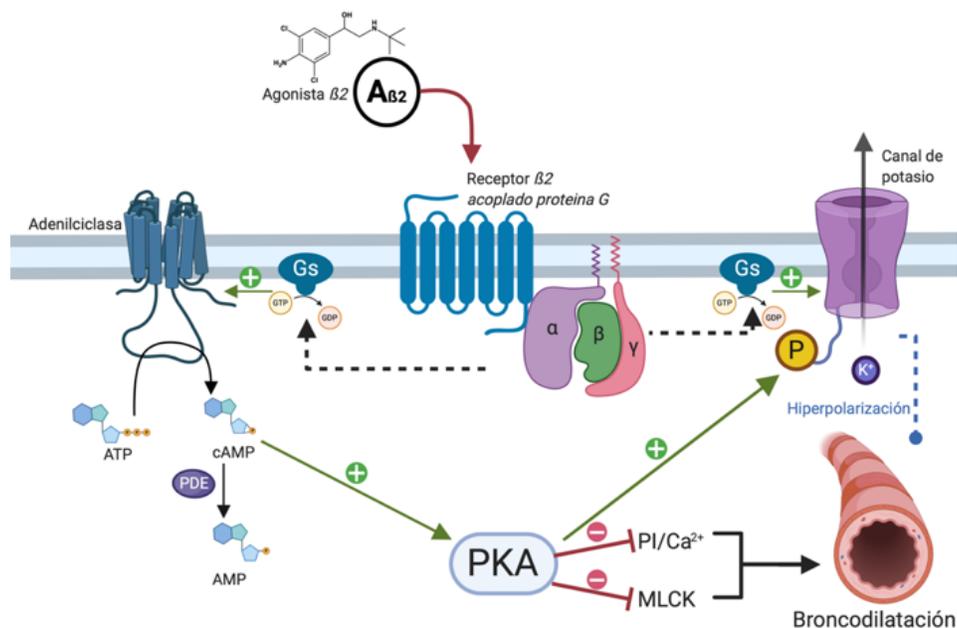


Figura 1. Representación esquemática del mecanismo broncodilatador de los agonistas β -adrenérgicos.

²⁰ Sumano, H., Ocampo, L., Gutiérrez, L. (2002). Clenbuterol y otros β -agonistas, ¿una opción para la producción pecuaria o un riesgo para la salud pública?. *Veterinaria México*, 33(2), 137-159.

²¹ Douillard, A. (2011). Skeletal and cardiac muscle ergogenics and side effects of clenbuterol treatment. *J. Sports Medicine and Doping Studies*, 5, 1.

²² Marbán-Arcos, E.S., López-Jiménez, F. A. (2011). Intoxicación alimentaria por clenbuterol. *Revista de Sanidad Militar*, 65(3), 121-124.

²³ Pena, B.S., Uribe, A., Córdova-Izquierdo, A., Michel, A.M. (2008). Clenbuterol residues in bovine feed and meat. *Research Journal of Biological Science*, 3, 1444-1445.

²⁴ Brunton, L.L., Lazo, J.S., Parker, K.L. (2007). *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Mc Graw Hill Interamericana.

3.2.2 Usos en el deporte

Debido a sus efectos anabólicos, ergogénicos y lipolíticos, el clenbuterol ha sido utilizado en el deporte como agente anabolizante por atletas y fisicoculturistas normalmente en dosis que oscilan entre los 5-20 mg al día.^{25,26} De acuerdo con la Lista de Sustancias y Métodos Prohibidos de la Agencia Mundial Antidopaje, los agonistas β_2 en general se encuentran prohibidos en deportes. Adicionalmente el clenbuterol es clasificado como agente anabólico del grupo S1.²⁷ Debido a su fácil adquisición por medios electrónicos, es difícil controlar la venta al público, además de que este fármaco se encuentra presente en diversas formulaciones de uso médico que no requieren de una receta médica para su venta.²⁸

3.2 Metabolismo

La capacidad del ser humano para la depuración de xenobioticos es un proceso natural el cual ocupa las mismas vías enzimáticas y sistemas transportadores que se utilizan normalmente para el metabolismo de los nutrimentos ingeridos en la dieta.

El ser humano tiene contacto con numerosas sustancias extrañas para el cuerpo o xenobioticos (sustancias ajenas al organismo) a través del contacto con el medio ambiente, así como por la dieta. Por fortuna los mamíferos, incluido el ser humano ha desarrollado un método para eliminar de manera rápida y eficaz estos xenobioticos y así, evitar algún daño.

3.3 Metabolismo clenbuterol

3.3.1 Metabolismo de clenbuterol en humanos

Existen pocos reportes referentes a estudios de metabolismo del clenbuterol en humanos, por lo que el conocimiento de sus metabolitos es muy limitado.^{29,30,31,32,33} Zimmer y colaboradores en 1976 reportan el hallazgo de 5 metabolitos en humanos del clenbuterol,³⁴ pero no describen sus estructuras. En 1985 Bres J. y colaboradores reportaron la presencia de 8 metabolitos menores de Fase I en un porcentaje menos al 6% de lo administrado, metabolitos que también indican están presentes en rata, perro y conejo, además, mencionan que en humano no hay presencia de metabolitos Fase II para el caso particular del clenbuterol.³⁵

²⁵ Pleadin, J., Vulić, A., Perši, N., Vahčić, N. (2010). Clenbuterol residues in pig muscle after repeat administration in a growth-promoting dose. *Meat science*, 86(3), 733-737.

²⁶ Meyer, H.H., Rinke, L.M. (1991). The pharmacokinetics and residues of clenbuterol in veal calves. *Journal of animal science*, 69(11), 4538-4544.

²⁷ Soberanes, K.M., Frías, E.C., Balandrán, L.R., Fermán, M.E.R., Méndez, N.M., Velasco-Bejarano, B. (2018). Sustancias dopantes y su incidencia: una visión retrospectiva del laboratorio nacional de prevención y control del dopaje de México. *adicciones*, 31(3), 201-211.

²⁸ 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.

²⁹ 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.

³⁰ Zalko, D., Debrauwer, L., Bories, G., Tulliez, J. (1997). Evidence for a new and major metabolic pathway of clenbuterol involving in vivo formation of an N-hydroxyarylamine. *Chemical research in toxicology*, 10(2), 197-204.

³¹ Li, G., Fu, Y., Han, X., Li, X., Li, C. (2016). Metabolomic investigation of porcine muscle and fatty tissue after Clenbuterol treatment using gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1456, 242-248.

³² Yamamoto, I., Iwata, K., Nakashima, M. (1985). Pharmacokinetics of plasma and urine clenbuterol in man, rat, and rabbit. *Journal of pharmacobio-dynamics*, 8(5), 385-391.

³³ Amendola, L., Colamonici, C., Rossi, F., Botrè, F. (2002). Determination of clenbuterol in human urine by GC-MS-MS-MS: confirmation analysis in antidoping control. *Journal of Chromatography B*, 773(1), 7-16.

³⁴ Zimmer, A. (1976). Einmalapplikation, Mehrfachapplikation, und Metabolitenmuster von Clenbuterol beim Menschen. *Arzneimittelforschung*

³⁵ Bres, J., Clauzel, A.M., Pistre, M.C., Rachmat, H., Bressolle, F. (1985). Metabolism of beta-adrenergic substances. Therapeutic implications. *Bulletin europeen de physiopathologie respiratoire*, 21(5), 19s-34s.

3.3.2 Metabolismo en animales

La biotransformación de clenbuterol en ratas, conejos y perros es compleja,³⁶ se han identificado cinco metabolitos urinarios en perros³⁷ y de ocho a trece en la rata.^{38,39} El clenbuterol inalterado es el principal compuesto que se encuentra en la orina de estas especies, además de una variedad de metabolitos oxidados y conjugados. De estos, el ácido-4-amino-3,5-dicloro-mandélico, ácido-3-amino-3,5-diclorobenzoico y ácido-4-amino-3,5-diclorohipúrico son los componentes principales.

En estudios en babuinos,⁴⁰ el fármaco original es el componente urinario principal, además, de un número limitado de metabolitos. En el ganado, el clenbuterol es el compuesto principal que se encuentra en la orina (28-52%) y en el hígado (50-80%) después de la administración. Así mismo, se encontraron pequeñas cantidades de ácido-4-amino-3,5-diclorobenzoico en orina e hígado y se detectó ácido 4-amino-3,5-diclorohipúrico en orina.¹⁵ En músculo, el componente principal fue el compuesto padre.⁴¹

En estudios en equinos⁴², el clenbuterol sin alterar fue el principal compuesto encontrado en orina (30-50%). También fue el componente principal en hígado, pulmón y riñón.^{43,44,45,46} Un estudio para examinar específicamente la naturaleza de los metabolitos en caballos confirmó clenbuterol como el componente principal, pero con una menor cantidad de un metabolito identificado como 1- (4-amino-3,5-diclorofenilo) -1,2-etanodiol.⁴⁷

3.4 Problemática de los residuos de agonista β -adrenérgicos en productos de origen animal.

3.4.1 En el deporte

Como ya se hizo mención, la WADA-AMA incluyó al clenbuterol en la Lista de Sustancias y Métodos Prohibidos en particular en el grupo S1. En este sentido el número de resultados adversos debidos al clenbuterol se ha incrementado con lo cual los atletas involucrados tienen que demostrar la vía de entrada de este β -agonista a su organismo. Esta problemática ha impactado enormemente en el desarrollo de eventos deportivos. El clenbuterol puede estar presente no solo en la carne de animales suplementados con esta sustancia sino que también puede estar presente en preparaciones farmacéuticas por lo que existen varias vías de entrada de esta sustancia.

³⁶ Zimmer, A. (1971). Metabolism and species comparison in the rat, rabbit and dog (ADME IV). Artículo no publicado. Enviado a OMS por Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim en Rhein, Alemania.

³⁷ Zimmer, A. (1974). Comparison of the pharmacokinetic profile in the dog with single and repeated dosage (ADME I D). Artículo no publicado No. U73-0161. Enviado a OMS por Boehringer Ingelheim GmbH, Ingelheim am Rhein, Germany.

³⁸ Kopitar, Z., Zimmer, A. (1976). Pharmacokinetics and metabolite pattern of clenbuterol in the rat. *Arzneimittel-forschung*, 26(7a), 1435-1441.

³⁹ Zalko, D., Debrauwer, L., Bories, G., Tulliez, J. (1998). Metabolism of clenbuterol in rats. *Drug metabolism and disposition*, 26(9), 891-899.

⁴⁰ *Clenbuterol*. [online] Disponible en: <<http://www.fao.org/3/w4601e/w4601e06.htm>> [Acceso 16 abril 2021].

⁴¹ Schmid, J. (1990). N-AB 365 CL in the cow's milk after oral and intramuscular administration. Unpublished report No. U90-0099. Enviado a OMS por Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim am Rhein, Germany.

⁴² Scarth, J.P., Teale, P., Kuuranne, T. (2011). Drug metabolism in the horse: a review. *Drug Testing and Analysis*, 3(1), 19-53.

⁴³ Zimmer, A. (1977). Preliminary investigations of pharmacokinetics in a horse. Unpublished report. Submitted to WHO by Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim am Rhein, Germany.

⁴⁴ Soma, L.R., Uboh, C.E., Guan, F., Moate, P., Luo, Y., Teleis, D., Tsang, D. S. (2004). Pharmacokinetics and disposition of clenbuterol in the horse. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 27(2), 71-77.

⁴⁵ Knych, H.K., Mitchell, M.M., Steinmetz, S.J., McKemie, D.S. (2014). Detection, pharmacokinetics and cardiac effects following administration of clenbuterol to exercised horses. *Equine veterinary journal*, 46(3), 380-385.

⁴⁶ Soma, L.R., Uboh, C.E., Guan, F., Luo, Y., Teleis, D., Runbo, L. Habecker, P. (2004). Tissue distribution of clenbuterol in the horse. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 27(2), 91-98.

⁴⁷ Hawkins, D.R., Elsom, L.F., Dighton, M.H. (1993). Investigation of the metabolic profiles in the livers of the horses following multiple oral administration. *Report No. BOL 149*, 931490.

De acuerdo a las estadísticas publicadas por la WADA-AMA desde el año 2003 hasta la fecha, se ha incrementado de manera continua el número de resultados analíticos adversos por la presencia de clenbuterol.

En la **figura 2**, se presenta una estadística respecto del número de RAA por clenbuterol,⁴⁸ reportados por los laboratorios antidopaje en el periodo 2003-2019.

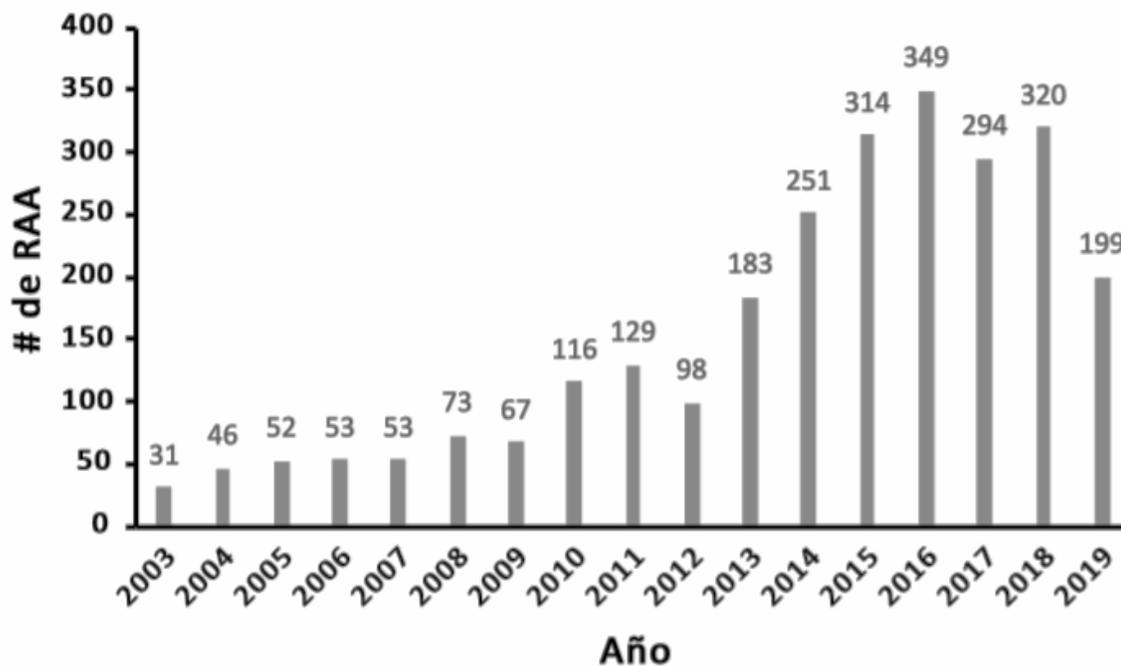


Figura 2. Número de RAA a clenbuterol desde periodo 2003-2019

⁴⁸ Wada-ama.org. (2019). 2019 Anti-Doping Testing Figures Samples Analyzed and Reported by Accredited Laboratories in ADAMS. [en línea] Disponible en: <https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2019_anti-doping_testing_figures_en.pdf> [Acceso 31 Julio 2021].

4. Hipótesis

Es bien conocido que entre humanos y bovinos existen distintos sistemas enzimáticos para la biotransformación de xenobióticos. El clenbuterol es un β_2 agonista, el cual ha sido empleado de manera ilícita para la producción de ganado dirigido al consumo humano. Esta situación ha acarreado un sin número de problemas de salud a la población y muy en particular en el ámbito deportivo, ya que un atleta que ha consumido carne contaminada con clenbuterol puede arrojar un resultado analítico adverso con el consiguiente daño a su carrera deportiva.

Hasta el momento, no existe ninguna estrategia analítica que permita con una alta confiabilidad determinar el origen de la presencia de clenbuterol en una muestra biológica de humanos, ya sea por que esta sustancia haya sido ingerida con fines de dopaje, o por el consumo de alguna forma farmacéutica que lo contiene o por la ingesta no intencional de carne contaminada con este β -agonista.

Por lo que, si se sintetizan y caracterizan una familia de potenciales metabolitos del clenbuterol Fase I y Fase II con la finalidad de ser empleados como material de referencia, será factible plantear la posible vía de entrada de esta sustancia al cuerpo humano y discriminar un dopaje intencional de uno no intencional.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

- Diseñar, sintetizar y caracterizar estructuralmente una serie de potenciales metabolitos de Fase I y II a partir del clenbuterol, los cuales pueden ser empleados como material de referencia para la discriminación de su origen metabólico.

5.2 Objetivos particulares

- Desarrollar una metodología de síntesis para la obtención de los siguientes metabolitos del clenbuterol: **(II)** Cl-O-Metil, **(III)** Cl-Gluc, **(IV)** Cl-SO₃, **(V)** Cl-NO₂. **(Figura 3)**
- Purificar y caracterizar los compuestos sintetizados mediante: Espectrometría de Masas (IE, HRMS, ESI) así como espectrofotometría de absorción de infrarrojo.
- Presentar los resultados obtenidos en un foro académico.

6. Experimentación

6.1 Equipos

El microondas químico utilizado fue un equipo CEM modelo Discover System. Los cromatogramas de líquidos y espectros de masas fueron adquiridos en un sistema Agilent Triple Cuadrupolo Ultivo acoplado a una fuente Agilent Jet Stream Technology Electrospray modo positivo. Los cromatogramas de gases y espectros de masas fueron adquiridos en un equipo CG-EM Agilent Technologies 3Q Modelo 7010B (IE) Los espectros de absorción en el infrarrojo fueron adquiridos en un equipo NICOLET iS10 Thermo Scientific adaptado con un accesorio Smart Orbit Thermo Scientific.

6.2 Procedimientos experimentales

6.2.1 Procedimientos generales

En la **figura 3** se presenta la estrategia metodológica general a seguir para la obtención de las moléculas de interés.

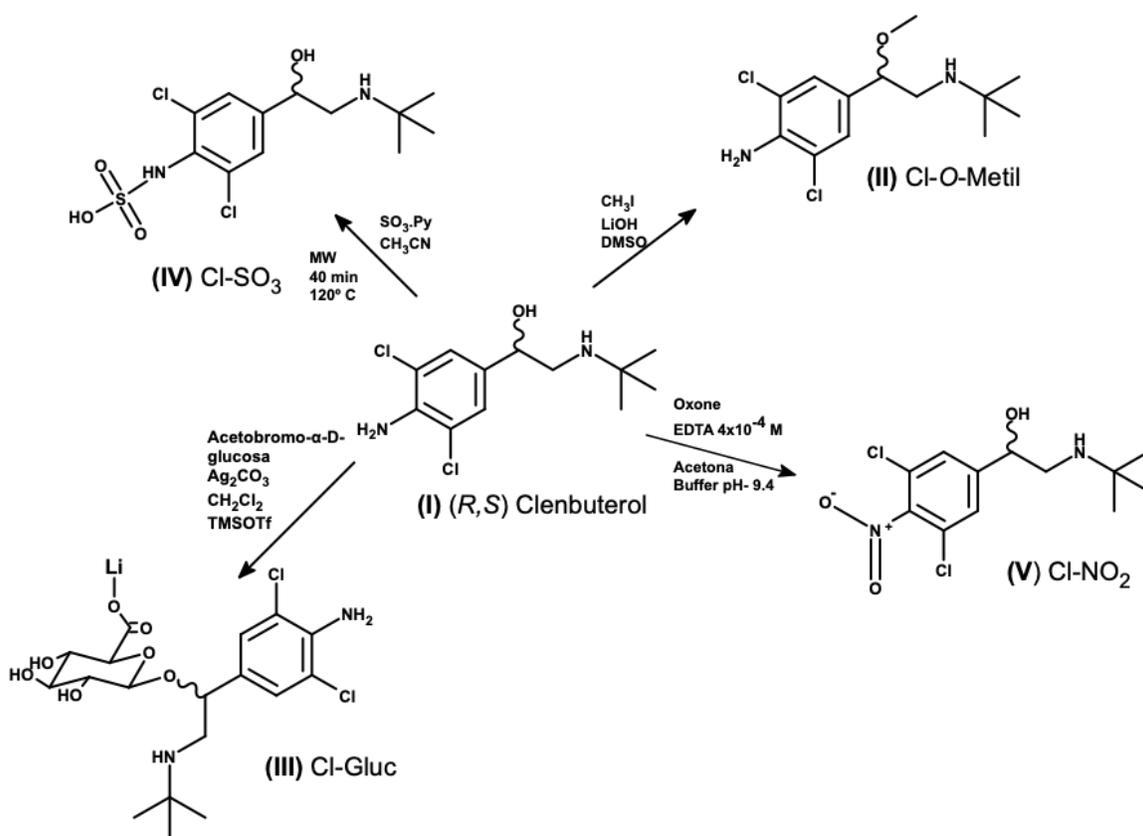


Figura 3. Reacciones generales para la síntesis de los potenciales metabolitos del clenbuterol.

6.2.2 De la reacción de *O*-alquilación.

Se pesaron por separado 200 mg de clenbuterol (1 eq) y 250 mg de LiOH, este último se disolvió en 10 mL de DMSO y se agitó durante 30 minutos a una velocidad alta, posteriormente se adicionaron 200 mg de clenbuterol y se agitaron durante 10 minutos. A la mezcla de reacción se le añadió gota a gota 4.4 eq de CH₃I y se dejó reaccionar durante 24 horas. Terminada la reacción se extrajo con acetato de etilo (3x10 mL). La fase orgánica se separó y se secó con Na₂SO₄ para dejarlo posteriormente a vacío hasta sequedad. La evaluación del avance de la reacción se llevó a cabo por *ccf* empleando una fase móvil de acetato de etilo-metanol en proporción 9:1 se empleó luz UV a 254nm como revelador. Finalmente se tomó una muestra del sólido para su análisis por GC/EM y el resto del sólido se purificó por medio de cromatografía en columna con silica gel (Merck® Kieselgel 60, tamaño partícula 0.063 nm) como fase sólida y una fase móvil de acetato etilo:metanol (9:1). Los productos obtenidos se emplearon para su caracterización espectroscópica por espectrometría de masas (MS) y espectroscopía de absorción en el infrarrojo (IR) por la técnica de ATR.

6.2.3 De la reacción de glucuronidación.

Se pesan por separado 200 mg de clenbuterol (1 eq), 1 eq de acetobromo- α -D-glucosa y 2 eq de Ag₂CO₃, los cuales se añadieron a un matraz de bola de 50 mL junto con 10 mL de Cl₂CH₂ y se agitaron por 10 minutos. La mezcla se enfría a 0° C y se añaden 0.2 eq de trimetilsililtrifluorometansulfonato (TMSOTf) y malla molecular (4 Å), la reacción se llevó a cabo en atmósfera de nitrógeno. Terminada la reacción se filtró a vacío con ayuda de un embudo Hirsch y Celita. La fase orgánica se lavó con agua helada y se secó con Na₂SO₄ anhidro, posteriormente se colocó a vacío para eliminar el solvente.

Después, se llevó a una hidrólisis básica empleando una solución metanólica de LiOH 1M durante 48 hrs. La evaluación del avance de la reacción se llevó a cabo por *ccf* empleando una fase móvil de acetato de etilo-metanol en proporción 8:2 para después ser revelada bajo una lámpara de luz UV de 254nm. Finalmente se tomó una muestra del sólido para su análisis por CG/EM y el resto del sólido, se purificó por medio de cromatografía en columna con silica gel (Merck® Kieselgel 60, tamaño partícula 0.063 nm), como fase sólida y una fase móvil de acetato etilo:metanol (7:3). Los productos obtenidos se emplearon para su caracterización espectroscópica por MS e IR por la técnica de ATR.

6.2.4 De la reacción de sulfatación.

Se pesaron por separado 200 mg de clenbuterol (1 eq) y 6 eq de un complejo de trióxido de azufre y piridina, ambos se colocaron en un matraz de bola de 50 mL y solubilizaron en 15 mL de CH₂Cl₂ anhidro, la mezcla se dejó en agitación hasta su total disolución, después se adicionó malla molecular 4Å. Finalmente la mezcla se colocó a reflujo con un microondas químico marca CEM Discover System a una temperatura de 120°C, una potencia de 120 W, por 40 minutos. Terminado el tiempo de irradiación, la mezcla se filtró, y el precipitado se

hidrolizó con 10 mL de una solución metanólica de NaOH al 5% durante 4 horas. Pasado el tiempo se diluyó con agua helada y se extrajo con cloroformo. La fase orgánica se separó y secó con Na₂SO₄ anhidro y se colocó a vacío para eliminar el solvente. La evaluación del avance de la reacción se llevó a cabo por *ccf* empleando una fase móvil de acetato de etilo-metanol en proporción 8:2 para después ser revelada bajo una lámpara de luz UV de 254 nm. Finalmente se tomó una muestra del sólido para su análisis por CG/EM, el resto del sólido, se purificó por medio de extracción en fase sólida. Los productos obtenidos se emplearon para su caracterización espectroscópica por MS e IR por la técnica de ATR.

6.2.5 De la oxidación de la amina aromática.

Se pesaron por separado en una balanza analítica 200mg (1 eq) de clenbuterol, y Oxone[®] (15 eq). En un vaso de precipitados de 50 mL se adicionaron 10 mL de EDTA 4x10⁻³ M, el Oxone[®] y se dejaron en agitación durante 15 minutos (solución 1). Los 200 mg de clenbuterol se disolvieron en 10 mL de acetona y toda vez disuelto se añadieron 5 mL de un buffer de carbonatos pH≈9.4 (solución 2). La disolución 2 se adicionó gota a gota en la disolución 1 y se colocó en agitación por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 2 mL de una disolución saturada de bisulfito de sodio y se llevo a cabo una extracción con acetato de etilo (3x10 mL). La fase orgánica se separó y se secó con Na₂SO₄ anhidro, posteriormente se colocó a vacío hasta sequedad. La evaluación del avance de la reacción se llevó a cabo por *ccf* empleando una fase móvil de acetato de etilo-metanol en proporción 9:1 para después ser revelada con una lámpara de luz UV de 254nm. Finalmente se tomó una muestra del sólido para su análisis por CG/EM, el resto del sólido se purificó por medio de cromatografía en columna con silica gel (Merck[®] Kieselgel 60, tamaño partícula 0.063 mm) como fase sólida y una fase móvil de cloroformo:acetato etilo (8:2). Los productos obtenidos se emplearon para su caracterización espectroscópica por MS e IR por la técnica de ATR.

7. Resultados y Discusión

7.1 De la reacción de *O*-alquilación.

7.1.1 GC-MS

De acuerdo con la metodología planteada y por medio de los datos espectroscópicos de GC-MS se obtuvo el producto de *O*-Metilación como una resina café $R_f = 0.71$ (Acetato Etilo:Metanol, 9:1). **Figura 4**

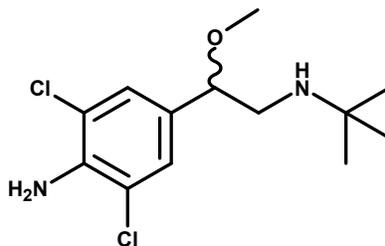


Figura 4. Estructura química del Cl-O-Metil

EL cromatograma de gases mostró un pico mayoritario, el cual después de su análisis fue asignado al producto de metilación del alcohol del clenbuterol, en donde al respecto se observa a un tiempo de retención de 20.17 minutos.

En la **Figura 5**, se presenta el espectro de masas adquirido por ionización electrónica obtenido en un equipo CG-EM Agilent Technologies 3Q Modelo 7010B (IE), en donde se observa un fragmento de m/z 290 el cual es consistente con el peso molecular de la molécula objetivo, así mismo se observan algunos fragmentos característicos de esta molécula.

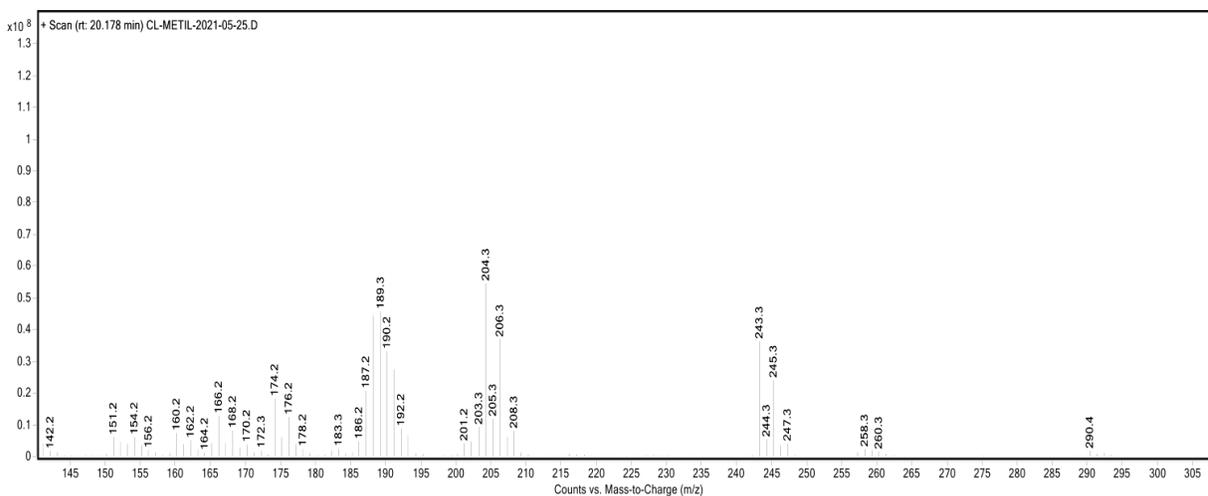


Figura 5. Espectro de masas adquirido por EI correspondiente al producto Cl-O-Metil

En base a los fragmentos observados en el espectro de masas de baja resolución fue posible plantear el siguiente patrón de fragmentación del (*R,S*)-1-(4-Amino-3,5-diclorofenil)-1-metoxi-2-terbutilaminoetano (Cl-Metil). **Figura 6**

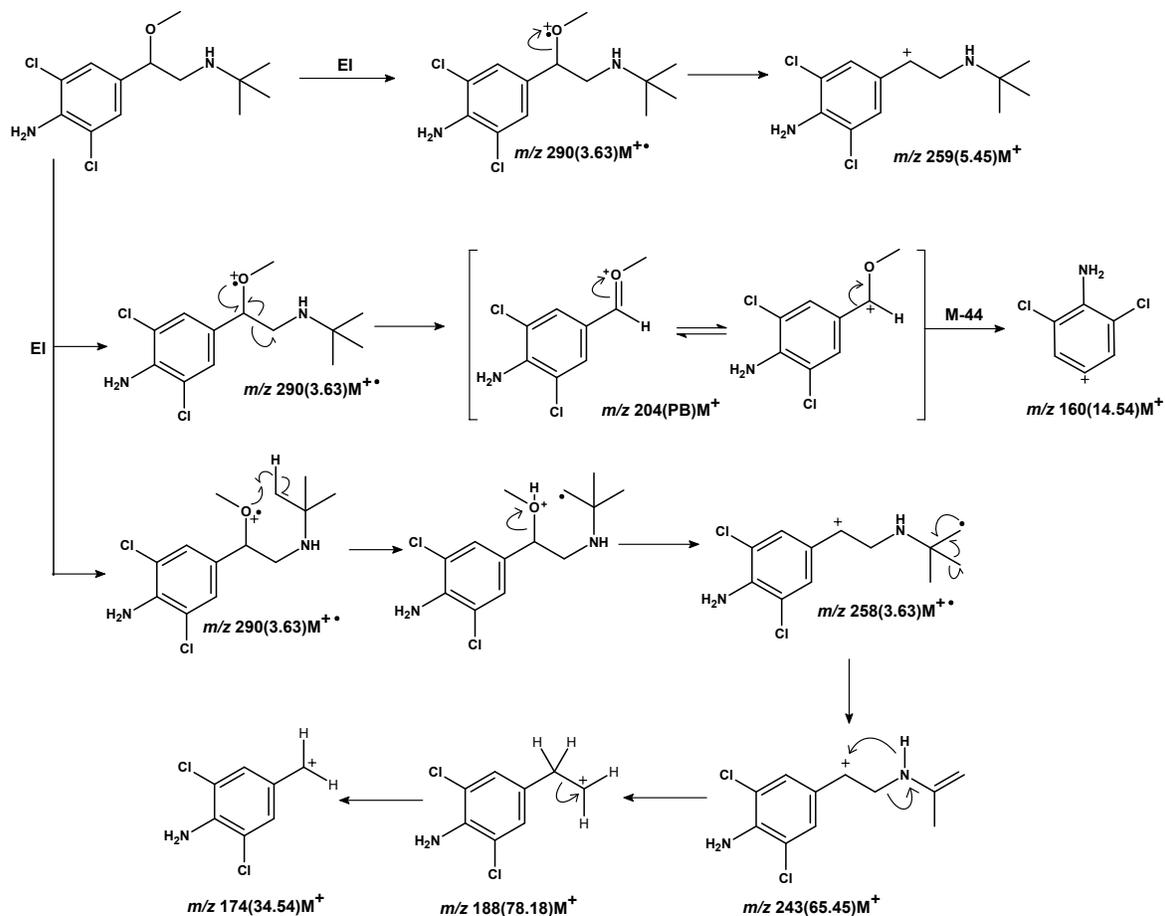


Figura 6. Patrón de fragmentación propuesto del Cl-O-Metil.

Cl-O-Metil.-EMIE(70eV) m/z (%ar)[A]: 290(3.63) $M^{+•}$, 259(5.45)[M-31] $^+$, 258(3.63)[M-32] $^{+•}$, 243(65.45)[M-47] $^+$, 204(PB)[M-86] $^+$, 188(78.18)[M-102] $^+$, 174(34.54)[M-116] $^+$.

7.1.2 Espectroscopia de Infrarrojo

El espectro de IR para la molécula Cl-O-Metil se obtuvo en un equipo ATR NICOLET iS10 Thermo Scientific adaptado con un accesorio Smart Orbit Thermo Scientific obteniendo las siguientes bandas representativas. **Figura 7**

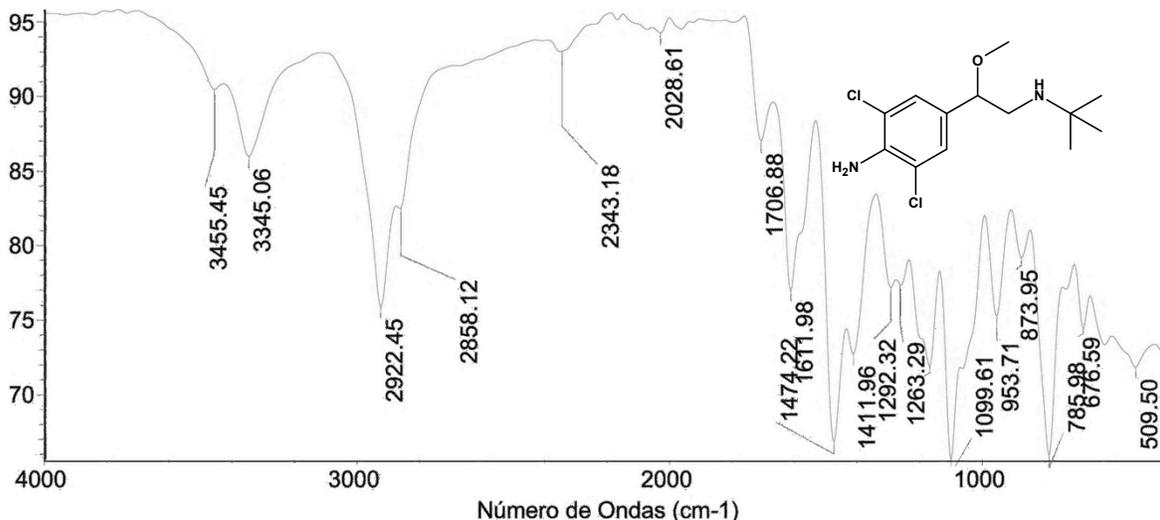


Figura 7. Espectro de absorción en el infrarrojo del producto Cl-O-Metil

Las bandas correspondientes al producto Cl-O-Metil fueron las siguientes:

IR(ATR) ν cm⁻¹: 3455 (simN-H), 3345(asim N-H), 2922 (asim O-CH₃), 2858 (sim O-CH₃), 1611(tijereteo Ar-NH₂), 1474 (Umbrella CH₃), 1292 (C-N), 1099(sim C-O-C), 953(asim C-O-C), 873 (1,3,4,5 oop), 785 (oop NH₂ y st C-Cl).

7.2 De la reacción de Glucuronidación.

7.2.1 HPLC-MS

De acuerdo con la metodología planteada y por medio de los datos espectroscópicos de HPLC-MS se obtuvo el producto de Glucuronidación como un polvo amarillo claro R_f=0.08 (acetato atilo:metanol, 9:1) Pf: No asignado por descomposición de la molécula. **Figura 8**

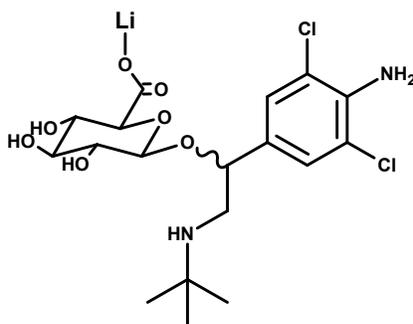


Figura 8. Estructura química del Cl-Gluc

El cromatograma de líquidos mostró un pico mayoritario, el cual después de su análisis por MS fue asignado al producto de glucuronidación del clenbuterol, en donde al respecto se observa en un tiempo de retención de 0.162 minutos.

Así mismo en la **Figura 9**, se presenta el espectro de masas adquirido por ESI en un equipo UHPLC- MS/MS Ultivo, acoplado a una fuente Agilent Jet Stream Technology Electrospray, en el espectro se observa un fragmento de $m/z=458$ el cual es consistente con el peso molecular de la molécula objetivo, así mismo se observan algunos fragmentos característicos de esta molécula.

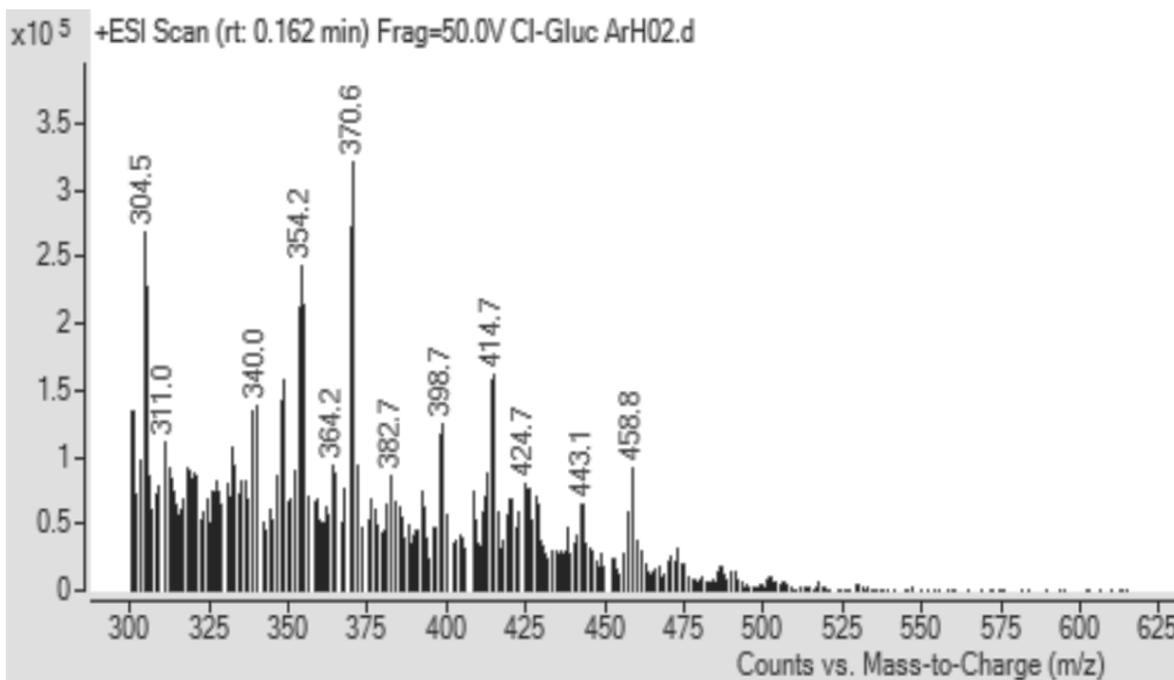


Figura 9. Espectro de masas adquirido por ESI correspondiente al producto Cl-Gluc

En base a los fragmentos observados en el espectro de masas de baja resolución, fue posible plantear el siguiente patrón de fragmentación del glucurónido del clenbuterol (Cl-Gluc). **Figura 10**

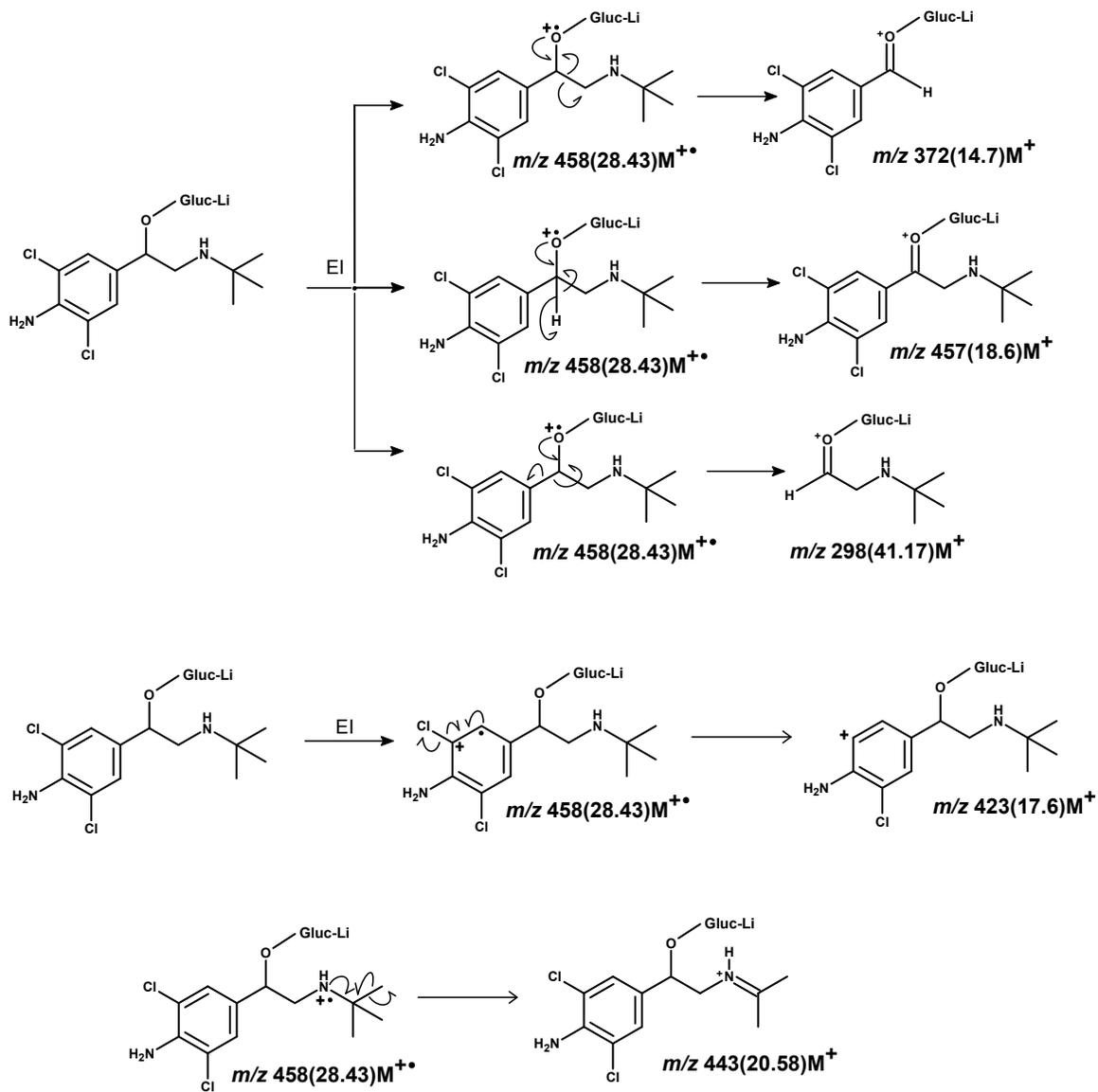


Figura 10. Patrón de fragmentación propuesto del Cl-Gluc

Cl-Gluc.-EMESI(1eV) m/z (%ar)[A]: 458(28.4) M^{++} , 457(18.6)[M-1] $^+$, 443(20.58)[M-15] $^+$, 423(17.6)[M-35] $^+$, 372(14.7)[M-86] $^+$, 298(41.17)[M-160] $^+$.

7.2.2 Espectroscopia de Infrarrojo

Para el caso del espectro de IR de la molécula Cl-Gluc se obtuvieron las siguientes bandas representativas. **Figura 11.**

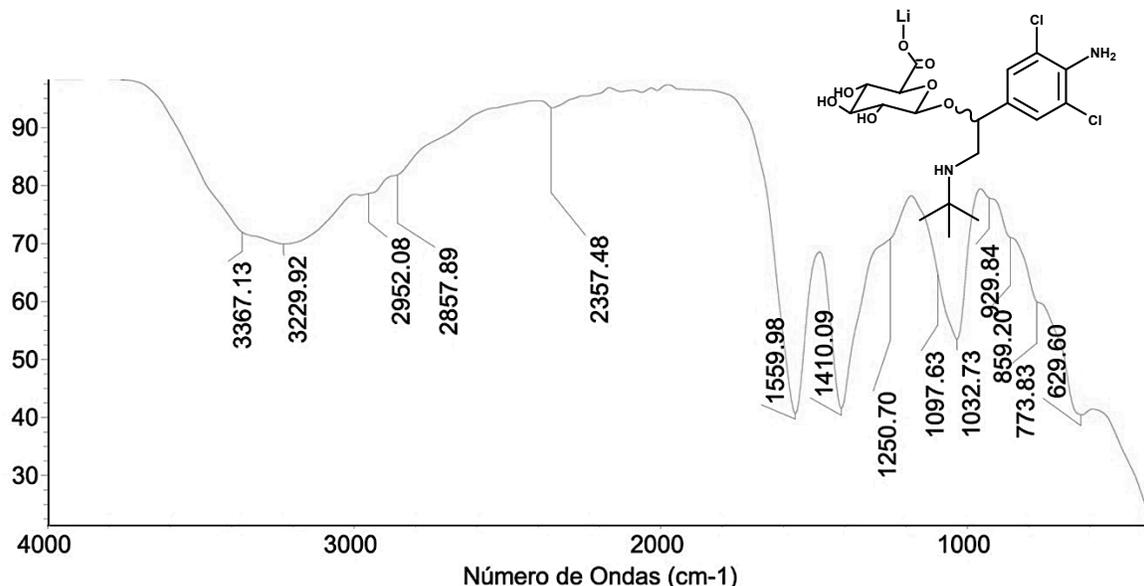


Figura 11. Espectro de absorción en el infrarrojo del producto Cl-Gluc

IR(ATR) ν cm^{-1} : 3367 (O-H), 3229 (N-H), 2952 (sim C-H), 2857 (asim C-H), 1559 (asim CO_2), 1410 (asim CO_2), 1032 (sim C-O-C), 1250 (C-N), 1097 (C-O), 1032 (asim C-O-C), 859 (C-Cl), 773 (oop N-H), 629 (C-O-H).

7.3 De la reacción de sulfatación.

7.3.1 HPLC-MS

De acuerdo con la metodología planteada y por medio de los datos espectroscópicos de UHPLC-MS se confirmó la obtención del producto sulfatado, el cual se presenta como un cristal amarillo amorfo $R_f=0.57$ (acetato etilo:metanol 8:2) PF- descompone a 255°C **Figura 12**

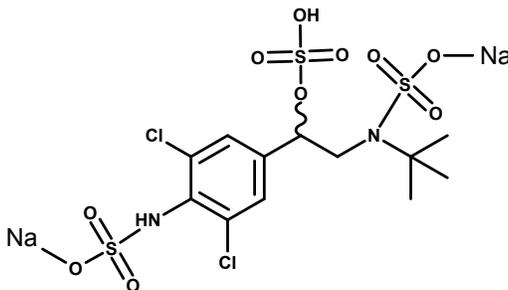


Figura 12. Estructura química del Cl-SO₃

El cromatograma de líquidos mostró un pico principal, el cual después de su análisis por MS fue asignado al producto de sulfatación del clenbuterol, en donde al respecto se observa tiempo de retención de 0.352 minutos.

Así mismo en la **Figura 13**, se presenta el espectro de masas adquirido por ionización electrónica obtenido en un equipo sistema UHPLC- MS/MS Ultivo , acoplado a una fuente Agilent Jet Stream Technology Electrospray para la obtención de la ionización de las moléculas en donde se observa un fragmento de m/z 560 el cual es consistente con el peso molecular de la molécula objetivo, así mismo se observan algunos fragmentos característicos de esta molécula.

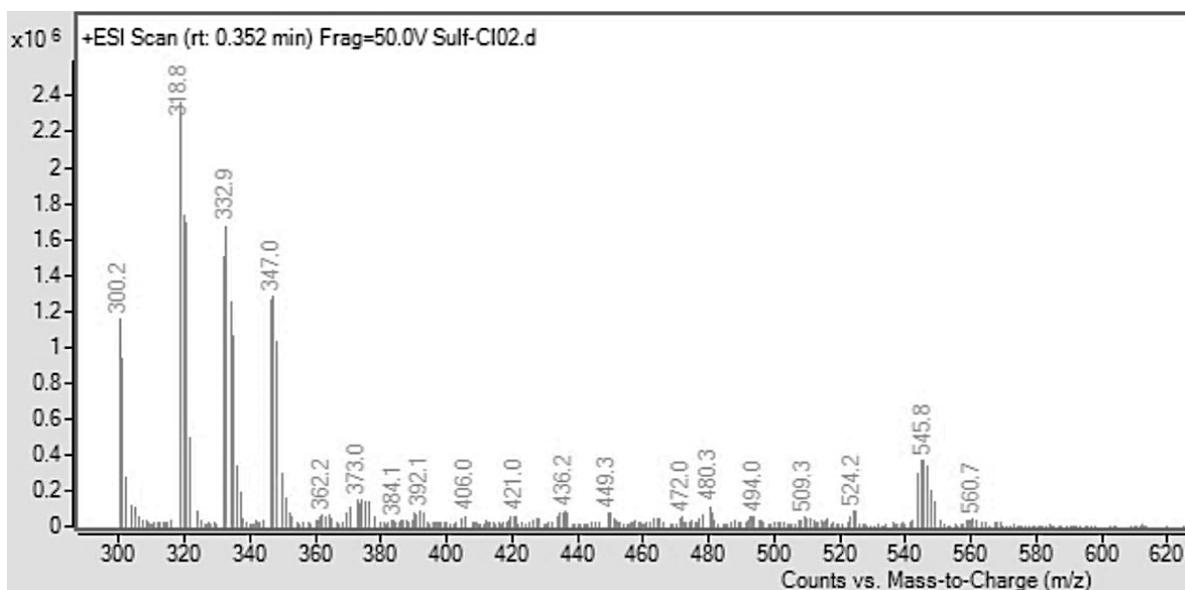


Figura 13. Espectro de masas adquirido por ESI correspondiente al producto Cl-SO₃

En base a los fragmentos observados en el espectro de masas, fue posible plantear el siguiente patrón de fragmentación del sulfato de clenbuterol. **Figura 14**

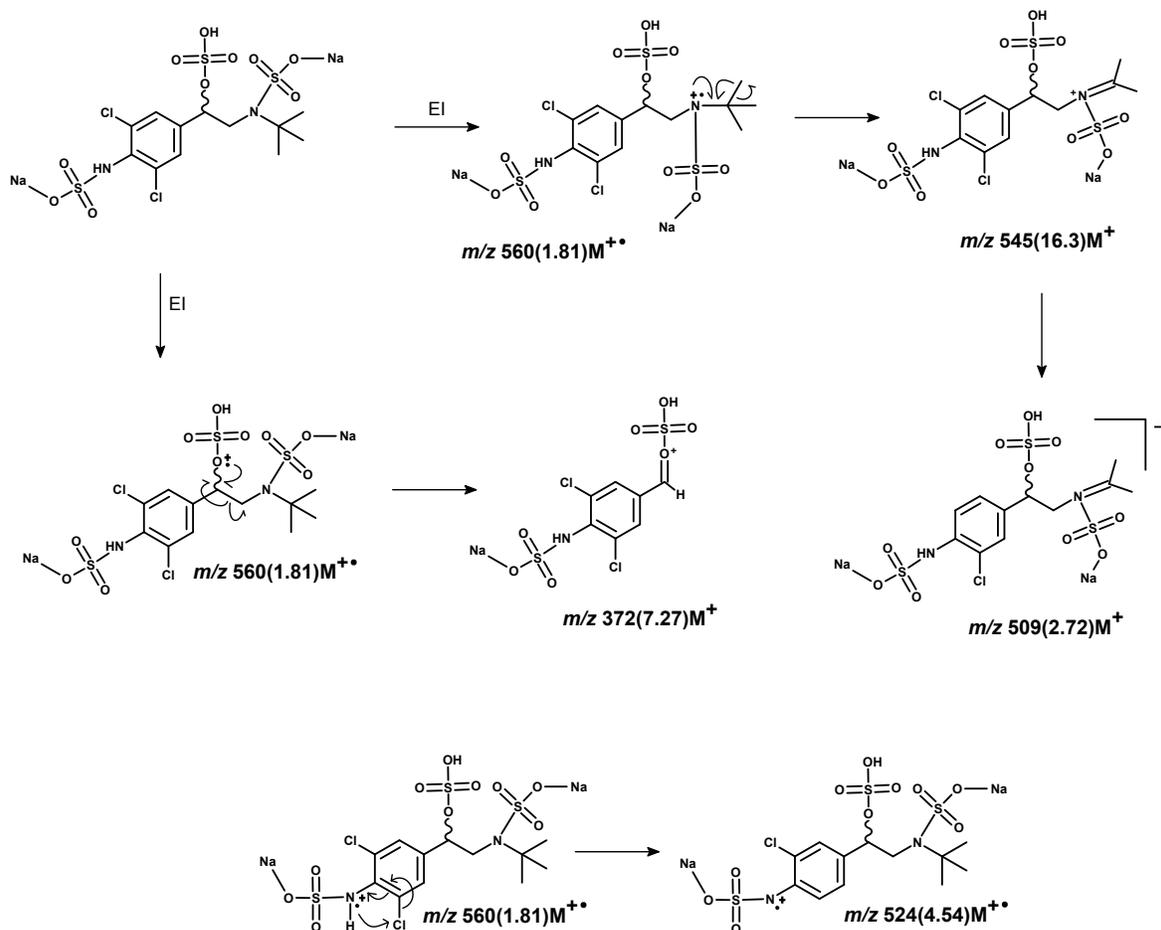


Figura 14. Patrón de fragmentación propuesto del Cl-SO₃

Cl-SO₃-EMESI(1eV)*m/z*(%ar)[A]: 560(1.81)M⁺, 545(16.3)[M-15]⁺, 524(4.54)[M-36]⁺, 509(2.72)[M-51]⁺, 372(7.27)[M-188]⁺.

7.3.2 Espectroscopia de Infrarrojo

El siguiente espectro de IR corresponde al compuesto Cl-SO₃, adicionalmente se muestran las bandas características de los grupos funcionales presentes en la estructura. **Figura 15**

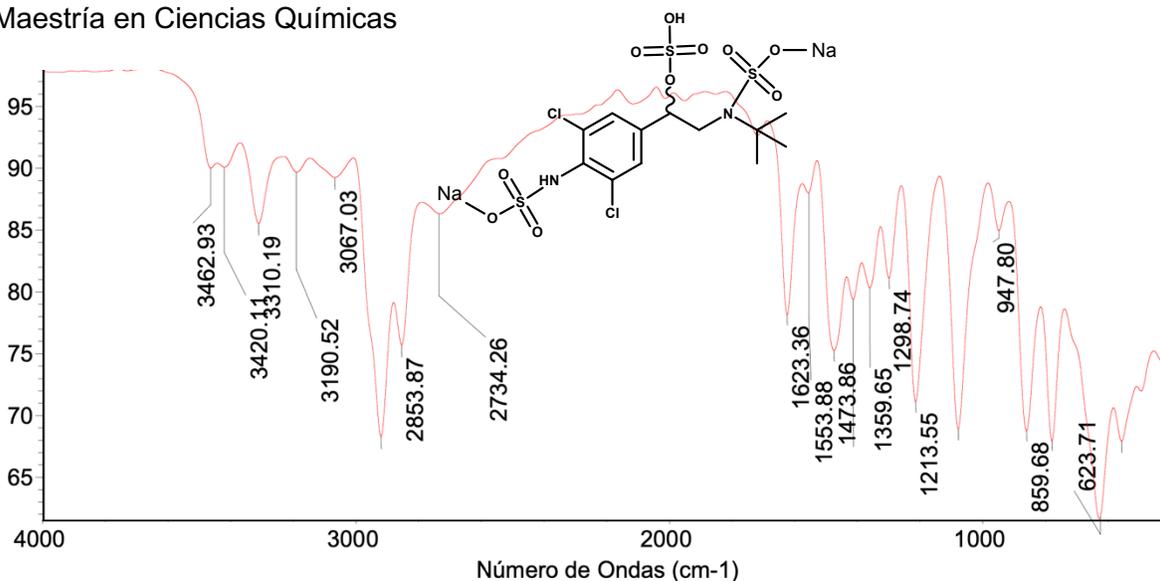


Figura 15. Espectro de absorción en el infrarrojo del producto Cl-SO₃

IR(ATR) ν cm⁻¹: 3462 (N-H_{arom}), 3190 (SO-H), 2919 (C-H), 2853 (C-H, NC-H), 2734 (S-OH_{hombro}), 1473 (CH₃_{umbrella}), 1298 (C-N-C), 1213 (sim SO₂), 1077 (asim SO₂), 859 (S-O), 778 (N-H_{wag}), 629 (SO₂ tijereteo).

7.4 De la oxidación de la amina aromática.

7.4.1 GC-MS

De acuerdo con la metodología planteada y los datos espectroscópicos que a continuación se presentan se planteó la estructura del compuesto el cual se presenta como un cristal naranja en forma de agujas $R_f=0.81$ (cloroformo) $P_f=240^\circ\text{C}$. **Figura 16**

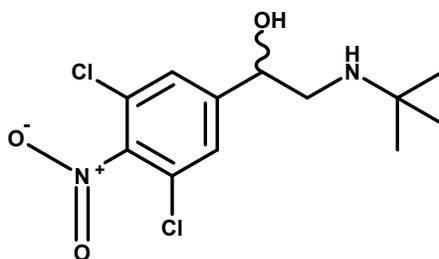


Figura 16. Estructura química del Cl-NO₂

El cromatograma de líquidos mostró un pico mayoritario, el cual después de su análisis por MS fue asignado al producto Cl-NO₂, en donde al respecto se observa en un tiempo de retención de 22.89 minutos.

Así mismo en la **Figura 17**, se presenta el espectro de masas de baja resolución adquirido por ionización electrónica para el compuesto objetivo. En este espectro se observa un fragmento de m/z 306 el cual es consistente con el peso molecular del compuesto Cl-NO₂

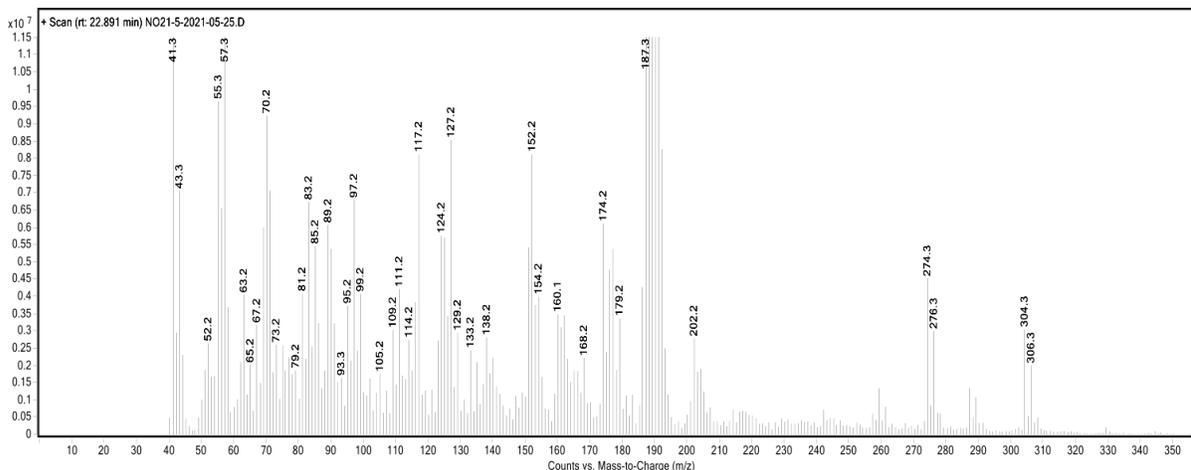


Figura 17. Espectro de masas adquirido por EI correspondiente al producto Cl-NO₂

En base a los fragmentos observados en el espectro de masas, fue posible plantear el siguiente patrón de fragmentación del (*R,S*)-1-(4-nitro-3,5-dicloro-fenil)-2-(*tert*-butilamino)etanol (Cl-NO₂). **Figura 18**

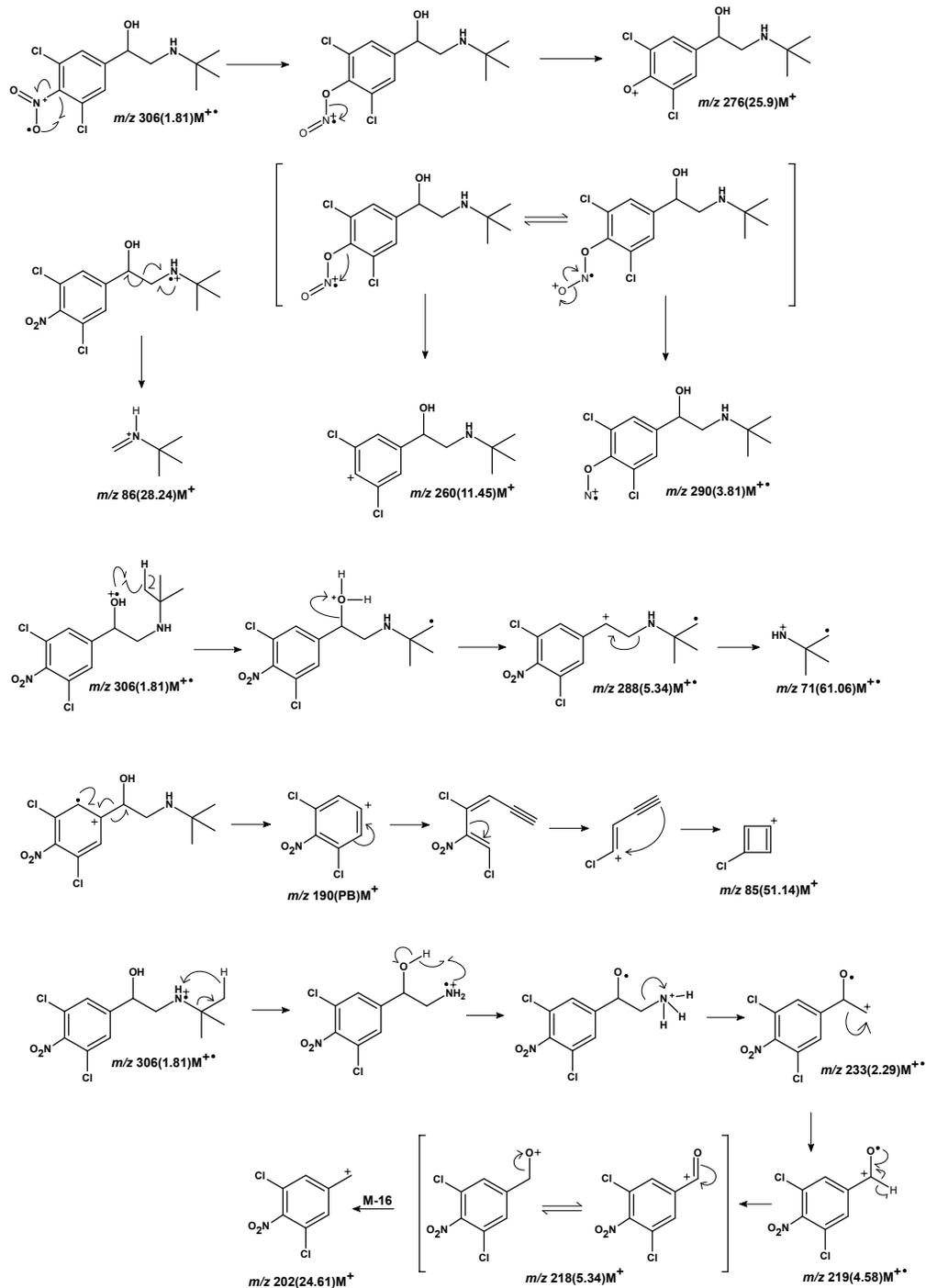


Figura 18. Patrón de fragmentación propuesto de Cl-NO₂

Cl-NO₂-EMIE(1eV) m/z (%ar)[A]: 306(1.81) $M^{+••}$, 290(3.81)[M-16] $^{+••}$, 288(5.34)[M-18] $^{+••}$, 276(25.9)[M-30] $^{+•}$, 260(11.45)[M-46] $^{+•}$, 233(2.29)[M-73] $^{+••}$, 219(4.58)[M-87] $^{+••}$, 218(5.34)[M-88] $^{+•}$, 202(24.61)[M-104] $^{+•}$, 190(PB)[M-116] $^{+•}$, 86(28.24)[M-220] $^{+•}$, 85(51.14)[M-221] $^{+•}$, 71(61.06)[M-235] $^{+••}$.

7.4.2 Espectroscopía de Infrarrojo

El espectro adquirido por ATR para el compuesto Cl-NO₂ se muestra a continuación. **Figura 19**

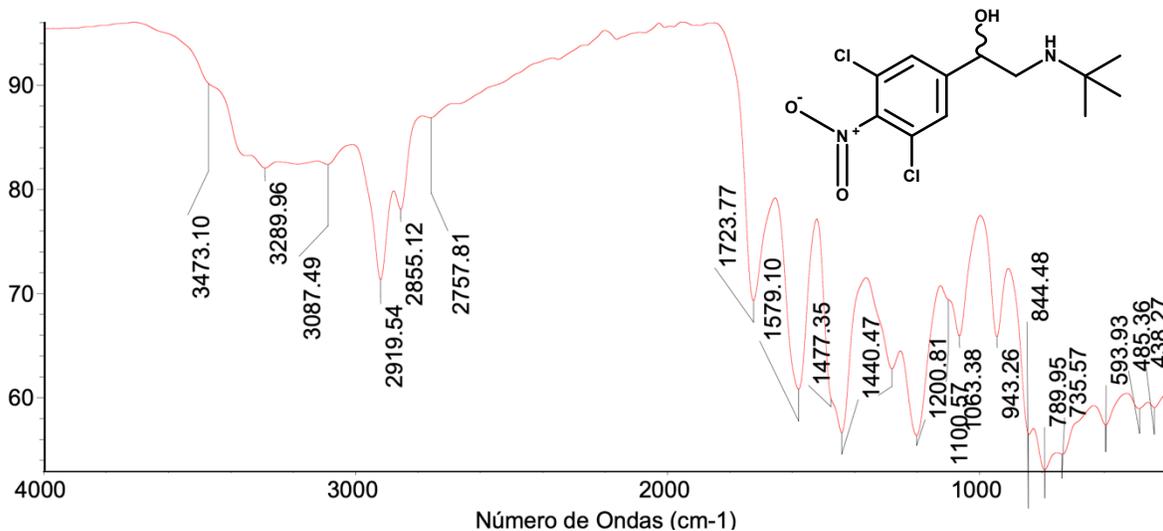


Figura 19. Espectro de absorción en el infrarrojo del producto Cl-NO₂

Las bandas correspondientes al producto a este compuesto fueron las siguientes:

IR(ATR) v cm⁻¹: 3473 (O-H), 3289 (N-H), 3087 (C_{sp2}-H), 2919 (asym C-H), 2855 (sym C-H), 1579 (asym NO₂), 1477 (umbrella C-H), 1279 (sym NO₂), 1200 (C_{sp3}-H), 1100 (C_{sp3}-OH 2°), 844 (Tijereteo NO₂), 789 (C-Cl), 735 (oop N-H wag), 593 (torsión C-OH).

8. Conclusiones

Se logró la síntesis, purificación y caracterización de los compuestos Cl-O-Metil, CL-Gluc, Cl-SO₃ y Cl-NO₂ a partir de clenbuterol. Cabe señalar que si bien el producto oxidado, sulfatado y glucuronado están descritos en la literatura, no se tiene una total caracterización estructural de ellos.

9. Prospectivas

En esta fase del proyecto se lograron obtener un conjunto de cuatro potenciales metabolitos a partir de clenbuterol hasta su caracterización estructural y química. Esto con la finalidad de contar con un material de referencia de consumo de β-agonistas.

En este sentido y en una siguiente fase se pretenden obtener algunos otros derivados que potencialmente se consideren como metabolitos.

Como ya se mencionó anteriormente, la problemática actual respecto a los casos de resultados analíticos adversos reportados por la WADA-AMA que dieron causa a este proyecto de investigación tienen su génesis en el poder identificar el origen exógeno del clenbuterol en una muestra biológica. Por lo que se plantea en una fase posterior el empleo de los productos obtenidos para ser utilizados como material de referencia en el análisis CL/MS/MS en muestras biológicas de orina y/o sangre obtenidas de humanos y bovinos para poder identificar en cual de estos se encuentra presentes y proponer una plausible explicación de la vía de ingreso de este β_2 -agonista.