



Universidad Nacional Autónoma de  
México

Facultad de Estudios Superiores  
Cuautitlán

Síntesis de Derivados Acetilados de  
Clenbuterol Mediante un Acercamiento a la  
Química Verde y su Caracterización  
Espectroscópica, Una Contribución al  
Esclarecimiento de Casos de Dopaje No  
Intencional.

Para obtener el título de:

LICENCIADO EN QUÍMICA INDUSTRIAL

PRESENTA:

OSCAR GARCÍA ZÚÑIGA

TUTOR:

Dr. Benjamín Velasco Bejarano.

Cuautitlán Izcalli, Estado de México Mayo, 2022



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

**ASUNTO: VOTO APROBATORIO**

**DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE**

**ATN: DRA. MARIA DEL CARMEN VALDERRAMA BRAVO  
Jefa del Departamento de Titulación  
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **Tesis y Examen Profesional**

**Síntesis de derivados acetilados de clenbuterol mediante un acercamiento a la química verde y su caracterización espectroscópica, una contribución al esclarecimiento de casos de dopaje no intencional.**

Que presenta el pasante: **Oscar García Zúñiga**

Con número de cuenta: **313102130** para obtener el título de: **Licenciado en Química Industrial**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

**ATENTAMENTE**

**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. 18 de marzo de 2022.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

|                      | NOMBRE                           | FIRMA |
|----------------------|----------------------------------|-------|
| <b>PRESIDENTE</b>    | Dr. Benjamín Velasco Bejarano    |       |
| <b>VOCAL</b>         | Dra. María Olivia Noguéz Córdova |       |
| <b>SECRETARIO</b>    | Dr. Fernando Ortega Jiménez      |       |
| <b>1er. SUPLENTE</b> | Dr. José de Jesús Olmos Espejel  |       |
| <b>2do. SUPLENTE</b> | Dra. Dolores Molina Jasso        |       |

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional

MCVB/cga\*



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

**ASUNTO: VOTO APROBATORIO**

**DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE**

**ATN: DRA. MARIA DEL CARMEN VALDERRAMA BRAVO  
Jefa del Departamento de Titulación  
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **Tesis y Examen Profesional**

**Síntesis de derivados acetilados de clenbuterol mediante un acercamiento a la química verde y su caracterización espectroscópica, una contribución al esclarecimiento de casos de dopaje no intencional.**

Que presenta el pasante: **Oscar García Zúñiga**

Con número de cuenta: **313102130** para obtener el título de: **Licenciado en Química Industrial**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

**ATENTAMENTE**

**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. 18 de marzo de 2022.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

|                      | NOMBRE                           | FIRMA   |
|----------------------|----------------------------------|---|
| <b>PRESIDENTE</b>    | Dr. Benjamín Velasco Bejarano    | _____   |
| <b>VOCAL</b>         | Dra. María Olivia Noguéz Córdova | _____  |
| <b>SECRETARIO</b>    | Dr. Fernando Ortega Jiménez      | _____   |
| <b>1er. SUPLENTE</b> | Dr. José de Jesús Olmos Espejel  | _____   |
| <b>2do. SUPLENTE</b> | Dra. Dolores Molina Jasso        | _____   |

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional

MCVB/cga\*



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

**ASUNTO: VOTO APROBATORIO**

**DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE**

**ATN: DRA. MARIA DEL CARMEN VALDERRAMA BRAVO  
Jefa del Departamento de Titulación  
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **Tesis y Examen Profesional**

**Síntesis de derivados acetilados de clenbuterol mediante un acercamiento a la química verde y su caracterización espectroscópica, una contribución al esclarecimiento de casos de dopaje no intencional.**

Que presenta el pasante: **Oscar García Zúñiga**

Con número de cuenta: **313102130** para obtener el título de: **Licenciado en Química Industrial**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

**ATENTAMENTE**

**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. 18 de marzo de 2022.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

|                      | NOMBRE                           | FIRMA   |
|----------------------|----------------------------------|---|
| <b>PRESIDENTE</b>    | Dr. Benjamín Velasco Bejarano    | _____   |
| <b>VOCAL</b>         | Dra. María Olivia Noguéz Córdova | _____   |
| <b>SECRETARIO</b>    | Dr. Fernando Ortega Jiménez      |  |
| <b>1er. SUPLENTE</b> | Dr. José de Jesús Olmos Espejel  | _____   |
| <b>2do. SUPLENTE</b> | Dra. Dolores Molina Jasso        | _____   |

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional

MCVB/cga\*



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

**ASUNTO: VOTO APROBATORIO**

**DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
PRESENTE**

**ATN: DRA. MARIA DEL CARMEN VALDERRAMA BRAVO  
Jefa del Departamento de Titulación  
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **Tesis y Examen Profesional**

**Síntesis de derivados acetilados de clenbuterol mediante un acercamiento a la química verde y su caracterización espectroscópica, una contribución al esclarecimiento de casos de dopaje no intencional.**

Que presenta el pasante: **Oscar García Zúñiga**

Con número de cuenta: **313102130** para obtener el título de: **Licenciado en Química Industrial**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

**ATENTAMENTE**

**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. 18 de marzo de 2022.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

|                      | NOMBRE                           | FIRMA |
|----------------------|----------------------------------|-------|
| <b>PRESIDENTE</b>    | Dr. Benjamín Velasco Bejarano    | _____ |
| <b>VOCAL</b>         | Dra. María Olivia Noguéz Córdova | _____ |
| <b>SECRETARIO</b>    | Dr. Fernando Ortega Jiménez      | _____ |
| <b>1er. SUPLENTE</b> | Dr. José de Jesús Olmos Espejel  |       |
| <b>2do. SUPLENTE</b> | Dra. Dolores Molina Jasso        | _____ |

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional

MCVB/cga\*



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: DRA. MARIA DEL CARMEN VALDERRAMA BRAVO  
Jefa del Departamento de Titulación  
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **Tesis y Examen Profesional**

**Síntesis de derivados acetilados de clenbuterol mediante un acercamiento a la química verde y su caracterización espectroscópica, una contribución al esclarecimiento de casos de dopaje no intencional.**

Que presenta el pasante: **Oscar García Zúñiga**

Con número de cuenta: 313102130 para obtener el título de: Licenciado en Química Industrial

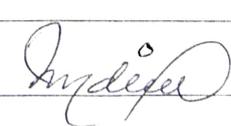
Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

**ATENTAMENTE**

**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. 18 de marzo de 2022.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

|                      | NOMBRE                                  | FIRMA   |
|----------------------|---|---|
| <b>PRESIDENTE</b>    | <u>Dr. Benjamín Velasco Bejarano</u>    | _____   |
| <b>VOCAL</b>         | <u>Dra. María Olivia Noguéz Córdova</u> | _____   |
| <b>SECRETARIO</b>    | <u>Dr. Fernando Ortega Jiménez</u>      | _____   |
| <b>1er. SUPLENTE</b> | <u>Dr. José de Jesús Olmos Espejel</u>  | _____   |
| <b>2do. SUPLENTE</b> | <u>Dra. Dolores Molina Jasso</u>        |  |

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional

MCVB/cga\*



*La química comienza en las estrellas. Las estrellas son la fuente de los elementos químicos, que son los componentes básicos de la materia.*

*-Peter Atkins.*



---

## Agradecimientos

Al Dr. Benjamín Velasco Bejarano, por la confianza y paciencia que me tuvo a lo largo de la realización del experimento, por los conocimientos y sabiduría que me transmitió y la motivación que siempre genero en mí, pero sobre todo por la amistad que generamos, mi eterna admiración.

A mis sinodales, excelentes profesionistas y académicos, ¡Muchas gracias!.

A mis amigos y compañeros de trabajo en el laboratorio de investigación de química orgánica L-122 de la FES-Cuautitlán campo 1, Anuar Gómez, Alan Álvarez y Pablo Mendoza, gracias por el conocimiento, la orientación y la ayuda a lo largo de la realización del experimento y por los ratos de risa, platica y salidas, los aprecio mucho.

A mis grandes amigos que a lo largo de la formación de químico industrial nos acompañamos, conocimos y formamos un vínculo Diana S.G., Oscar M., David B., Luisa V., Cesar A., Jonathan G., Valeria A., Gabriela P., y Mario R., y los que olvide mencionar al escribir esta tesis.



## Dedicatoria

### **A Dios**

Ya que gracias a él he logrado concluir mi carrera, y ha estado conmigo desde que tengo vida.

### **Mis padres Eliseo y Yolanda Adriana**

Amados padres, gracias por su amor, por su paciencia, por los consejos, el respeto y darme su bendición. Sin ustedes todo lo que estoy logrando en mi vida no lo hubiera podido realizar.

### **A mi hermano Héctor.**

Por tus palabras, por tu compañía, por ser mi amigo, La vida no sería igual sino contara contigo.

### **A mis abuelas, tí@s y prim@s**

Por el apoyo que siempre me brindaron día a día en el transcurso de cada año de mi formación escolar



El presente trabajo fue realizado en el laboratorio L-122 de la Sección de Química Orgánica de la Facultad de Estudios Cuautitlán, bajo la asesoría del Dr. Benjamín Velazco Bejarano.

Este proyecto fue apoyado económicamente por la DGAPA-UNAM mediante el **Proyecto PAPIIT IA209220**.



---

## INDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Agradecimientos</b> .....                   | <b>3</b>  |
| <b>Dedicatoria</b> .....                       | <b>4</b>  |
| <b>Tabla de abreviaturas y acrónimos</b> ..... | <b>8</b>  |
| <b>Índice de Imágenes</b> .....                | <b>9</b>  |
| <b>Introducción</b> .....                      | <b>11</b> |
| <b>Generalidades</b> .....                     | <b>23</b> |
| Xenobióticos.....                              | 23        |
| Depósitos de almacenamiento xenobióticos.....  | 24        |
| Metabolismo de xenobioticos.....               | 25        |
| Acetilación biológica .....                    | 30        |
| Clembuterol.....                               | 33        |
| Intoxicaciones por Clembuterol .....           | 37        |
| Clembuterol en México.....                     | 39        |
| Metabolismo del Clembuterol .....              | 40        |
| Marco legal del Clembuterol en México.....     | 42        |
| Química Verde.....                             | 43        |
| Fuentes alternativas de activación.....        | 47        |
| Irradiación infrarroja.....                    | 47        |
| Microondas.....                                | 52        |
| Ultrasonido.....                               | 54        |
| Métodos de síntesis biológicos .....           | 58        |
| Biocatálisis.....                              | 59        |
| Lipasas.....                                   | 62        |
| Lipasas en disolventes orgánicos.....          | 65        |
| Aplicaciones de las Lipasas.....               | 67        |
| Lipozyme® TL.....                              | 67        |



---

|  |            |
|--|------------|
| Novozym 435.....   | 69         |
| Métodos de síntesis electroquímicos.....   | 69         |
| Electrocatalisis.....  | 71         |
| Reacciones de Acetilación.....   | 73         |
| Acetilación de Aminas.....   | 75         |
| Acetilación de alcoholes .....   | 77         |
| <b>Hipótesis .....</b>   | <b>78</b>  |
| <b>Objetivos .....</b>   | <b>79</b>  |
| Objetivo general .....   | 79         |
| Objetivos particulares.....  | 79         |
| <b>Parte experimental .....</b>  | <b>80</b>  |
| Reactivos y materiales .....   | 80         |
| Equipos.....   | 81         |
| Procedimiento experimental .....   | 82         |
| Acetilación de Clembuterol usando Microondas .....                                 | 82         |
| Acetilación de Clembuterol mediante el empleo de Ultrasonido como activación ..... | 83         |
| Acetilación de Clembuterol mediante el empleo de energía Infrarroja.....           | 84         |
| Acetilación de Clembuterol mediante el empleo de Novozym 435.....                  | 85         |
| Acetilación de Clembuterol por medio de electrosíntesis.....                       | 86         |
| Acetilación del clembuterol mediante un método tradicional de reflujo. ....        | 88         |
| <b>Resultados y discusión .....</b>  | <b>90</b>  |
| <b>Conclusiones.....</b>   | <b>106</b> |
| <b>Apéndice espectroscópico .....</b>  | <b>107</b> |



---

## Tabla de abreviaturas y acrónimos

ccf Cromatografía de capa fina

CLB Clembuterol

2,4-DNFH 2,4-Dinitrofenilhidrazina

MSE Métodos de síntesis electroquímicos

CYP Enzimas de citocromo P450

WADA Acronimo en ingles de Word Antidopin Agency; Agencia Mundial Antidopaje (por sus siglas en inglés)

IAC Intoxicación alimentaria por Clembuterol

TBAB Bromuro de tetrabutilamonio

AcOEt Acetato de etilo

SOE Síntesis Orgánica Electroquímica

US Ultrasonido

CG Cromatografía de gases

EM Espectrometría de masas



---

## Índice de Imágenes

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1</b> Estructura química de los enantiómeros del Clembuterol.....   | 12 |
| <b>Figura 2</b> Estructura química de los derivados –O, -N acetilados del Clembuterol.....  | 16 |
| <b>Figura 3</b> Acetilación de Clembuterol por medio de reflujo.....  | 17 |
| <b>Figura 4</b> Reacción de acetilación de Clembuterol mediante el empleo de Microondas.....  | 17 |
| <b>Figura 5</b> Acetilación de Clembuterol mediante el empleo de energía infrarroja.....  | 18 |
| <b>Figura 6</b> Reacción de acetilación de Clembuterol mediante el empleo de ultrasonido.....   | 19 |
| <b>Figura 7</b> Reacción de acetilación de Clembuterol mediante el empleo de Novozym435.....  | 21 |
| <b>Figura 8</b> Reacción de acetilación de Clembuterol por medio de electrosíntesis.....  | 23 |
| <b>Figura 9</b> El espectro electromagnético.....   | 48 |
| <b>Figura 10</b> Modos de vibración en moléculas: flechas indican dirección y magnitud de movimientos; signos +,- indican movimientos hacia arriba y abajo perpendicular a la página..... | 52 |
| <b>Figura 11</b> Frecuencias de ultrasonido.....  | 56 |
| <b>Figura 12</b> Propagación de una formación líquida de burbujas por la cavitación y su destrucción.....   | 58 |
| <b>Figura 13</b> Reacción de activación por microondas en el equipo de microondas.....  | 83 |
| <b>Figura 14</b> Reacción activada por ultrasonido en la cuba ultrasónica.....  | 84 |
| <b>Figura 15.</b> Reacción activada mediante infrarrojo en el equipo infrarrojo.....  | 85 |



---

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 16</b> Reacción empleando Novozym 435.....                                  | 86 |
| <b>Figura 17</b> Reacción empleando electrosíntesis con electrodos de grafito.....    | 87 |
| <b>Figura 18</b> Reacción empleando energía térmica en un equipo de reflujo.<br>..... | 89 |
| <b>Figura 19</b> Productos de acetilación de Clembuterol.....                         | 91 |



---

## Introducción

En el trabajo de tesis que se presenta se utilizan las habilidades y conocimiento teóricos y prácticos adquiridos en la formación de Licenciado en Química Industrial en el área de química orgánica, para la síntesis y caracterización espectroscópica de derivados del clenbuterol según su metabolismo.

El clenbuterol (CLB), un agonista adrenérgico  $\beta_2$ , su uso como antiasmático en la terapéutica tanto de humana como veterinaria está permitido en varios países inclusive México, pero no para los animales de consumo humano, esta molécula se comercializa en su forma racémica, (Figura 1) aunque es bien conocido que el enantiómero R-(-) es el eutómero.<sup>1</sup> El CLB ha encontrado progresivamente un uso ilegal en todo el mundo como agente promotor del crecimiento, debido a su capacidad para provocar lipólisis y promover la hipertrofia muscular a través de estimulación de los correspondientes receptores tisulares, lo que conduce a la producción de carne magra, especialmente apreciada por los consumidores.<sup>2</sup>

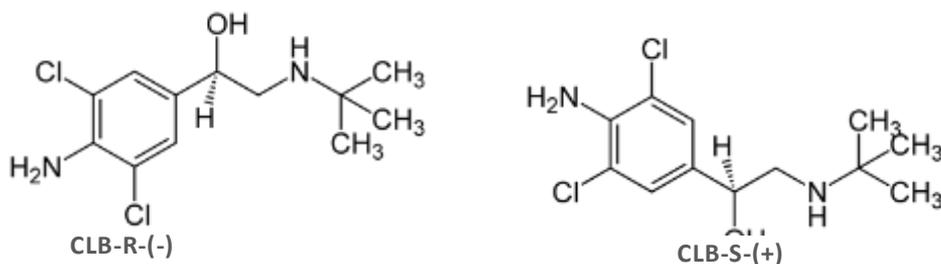
---

<sup>1</sup> 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, 1738-1743. DOI: <https://doi.org/10.1002/dta.2294>.

<sup>2</sup> Brambilla, G., di Bez, S., Pietraforte, D., Minetti, M., Campanella, L. and Loizzo, A., 2007. *Ex vivo formation of gastric metabolites of clenbuterol: Preliminary*



Cuando los animales consumen el clenbuterol como parte de su dieta, se ha observado que no se metaboliza completamente y puede acumularse en el tejido y el líquido de los animales. Después del uso de CLB para alimentar ganado, las personas que consumen estos productos sufrirán intoxicación alimentaria, incluidos temblores musculares, taquicardia, palpitaciones, mareos, graves o incluso la muerte. Debido a lo anterior, no está autorizado para su uso en China, Estados Unidos o la UE para animales destinados a la producción de alimentos. Sin embargo, hasta hace poco, hay informes de casos en que los consumidores han sufrido intoxicación alimentaria después de comer órganos de cerdo al considerar que contienen residuos de Clenbuterol.<sup>3</sup>



**Figura 1:** Estructura química de los enantiómeros del clenbuterol

*characterisation of their chemical structure. Analytica Chimica Acta*, 586(1-2), pp.426-431) .DOI: doi:10.1016/j.aca.2006.07.061

<sup>3</sup> Feng, F., Zheng, J., Qin, P., Han, T. and Zhao, D., 2017. A novel quartz crystal microbalance sensor array based on molecular imprinted polymers for simultaneous detection of clenbuterol and its metabolites. *Talanta* DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2017.02.001>



---

Se han informado varios brotes colectivos de intoxicación por alimentos desde principios de 1990 en los que se identificó el CLB como agente causante. Se han reportado brotes en Portugal, Hong Kong (República de China) y México. Representando una ingestión de 100 g de tejido comestible, a menudo las concentraciones de residuos de CLB estaban en el rango de 0,5 a 5 ng por gramo de tejido<sup>4</sup>

En México se ha incrementado el uso de este aditivo en forma impresionante, hasta un 100% de los animales utilizados para el consumo humano, ya que desde septiembre del 2006 se pierden en dos rastros municipales del estado de Puebla más de \$25 millones (\$2.0 Millones USD, aproximadamente) de pesos en decomisos de hígado de res. Por otro lado, en zonas de alta densidad ganadera, se utiliza el clenbuterol para incrementar la masa muscular de cerdos, bovinos y ovinos.<sup>5</sup>

En los últimos años, varios atletas de élite han usado CLB como una droga para mejorar el rendimiento, lo que llevó a su prohibición por

---

<sup>4</sup> Brambilla, G., di Bez, S., Pietraforte, D., Minetti, M., Campanella, L. and Loizzo, A., 2007. *Ex vivo formation of gastric metabolites of clenbuterol: Preliminary characterisation of their chemical structure. Analytica Chimica Acta*, 586(1-2), pp.426-431. DOI: doi:10.1016/j.aca.2006.07.061

<sup>5</sup> Caicedo Rivas R. E., M. Paz-Calderon Nieto, S. V. Badillo M. 2011 *Clenbuterol (β2-agonista adrenérgico), enmascara las patologías hepáticas en bovinos*. DOI:[http://www.uco.es/conbiand/aica/templatemo\\_110\\_lin\\_photo/articulos/2011/Caicedo2011\\_1\\_327\\_331.pdf](http://www.uco.es/conbiand/aica/templatemo_110_lin_photo/articulos/2011/Caicedo2011_1_327_331.pdf)



---

parte del Comité Olímpico Internacional y la Agencia Mundial Antidopaje.<sup>6</sup>

En consecuencia, existe una gran necesidad de desarrollar métodos analíticos robustos, que puedan detectar clenbuterol con rapidez en velocidad, alta sensibilidad y buena selectividad.<sup>7</sup> Los metabolitos son los productos finales de genes o proteínas al exponerse al CLB, por lo que el diagnóstico de la variación de metabolitos puede ser más preciso para rastrear varias enfermedades y fármacos.<sup>8</sup> Se han propuesto varios métodos analíticos para detectar y determinar metabolitos de clenbuterol, como técnicas inmunológicas de ELISA, cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas (GC-MS), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), y / o HPLC acoplado con espectrometría, ente otros.<sup>9</sup>

---

<sup>6</sup> World Anti-Doping Agency. WADA statement on clenbuterol 2011. <http://www.wada-ama.org/en/media-center/archives/articles/wadastatement-on-clenbuterol> (accessed Jun 2013)

<sup>7</sup> Feng, F., Zheng, J., Qin, P., Han, T. and Zhao, D., 2017. *A novel quartz crystal microbalance sensor array based on molecular imprinted polymers for simultaneous detection of clenbuterol and its metabolites*. *Talanta* DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2017.02.001>

<sup>8</sup> 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. doi:10.1016/j.chroma.2016.06.017

<sup>9</sup> Feng, F., Zheng, J., Qin, P., Han, T. and Zhao, D., 2017. *A novel quartz crystal microbalance sensor array based on molecular imprinted polymers for simultaneous detection of clenbuterol and its metabolites*. *Talanta* DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2017.02.001>



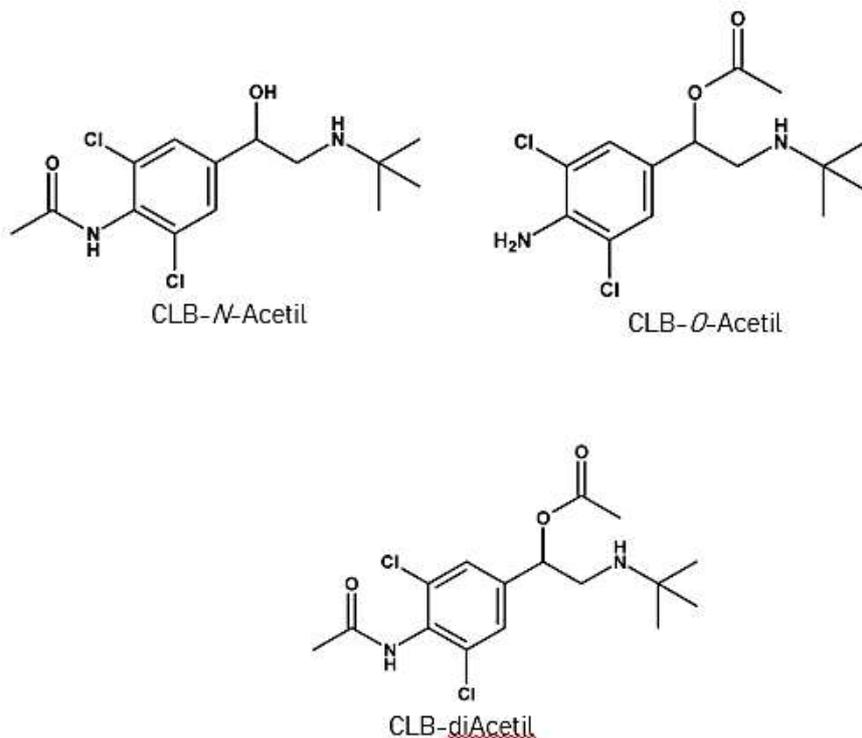
---

La ingesta de sustancias extrañas al cuerpo no esenciales ni nutritivas, como el caso del clenbuterol, causa una respuesta del organismo para hacer frente a este grupo de compuestos químicos conocido como xenobioticos.

Se identificó la acetilación biológica como una de las principales reacciones de conjugación en humanos y especies animales en respuesta de la presencia de xenobioticos para su metabolización y así el mantenimiento de la función fisiológica/ bioquímica normal y homeostasis.<sup>10</sup> Por lo que se pretende sintetizar los metabolitos del CLB acetilados como se muestran en la *figura 2*.

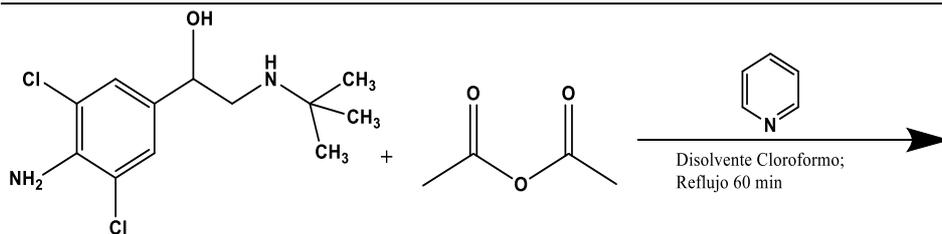
---

<sup>10</sup> Juchau, M. R., & Chen, H. 1998. *Developmental Enzymology. Handbook of Developmental Neurotoxicology*, 321–337. doi:10.1016/b978-012648860-9.50023-6



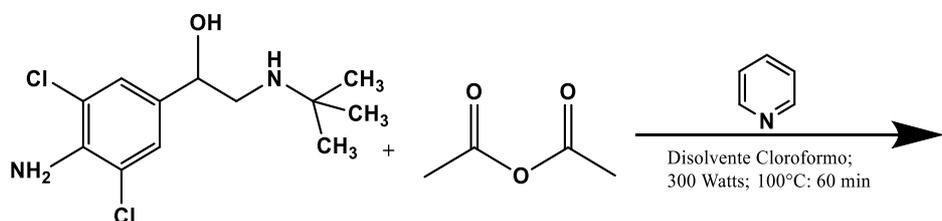
**Figura 2:** Estructura química de los derivados -*O*, -*N* acetilados del clenbuterol

Para la síntesis de los metabolitos acetilados del CLB se realiza primero un método tradicional de reflujo utilizando anhídrido acético y piridina anhidra como catalizador, como muestra la *figura 3*.



**Figura 3:** Acetilación de Clembuterol por medio de reflujo.

El experimento se realiza cumpliendo las condiciones de "Química verde", lo que significa que se utilizan y producen sustancias menos nocivas durante la síntesis. Además, el uso de enzimas es una gran ventaja en estas síntesis.<sup>11</sup> Por lo que se utilizó como energía de activación microondas. La síntesis por microondas representa un gran avance en la metodología de la química sintética.

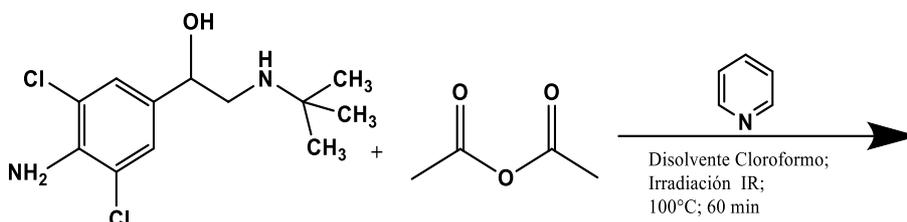


**Figura 4:** Reacción de acetilación de Clembuterol mediante el empleo de Microondas.

<sup>11</sup> Proniewiczza, E., Tąta, A., Starowicz, M., Wójcik, A., Pacek, J. and Molenda, M. 2021 . *Is the electrochemical or the "green chemistry" method the optimal method for the synthesis of ZnO nanoparticles for applications to biological material? Characterization and SERS on ZnO.* Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 609, p.125771. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.125771>



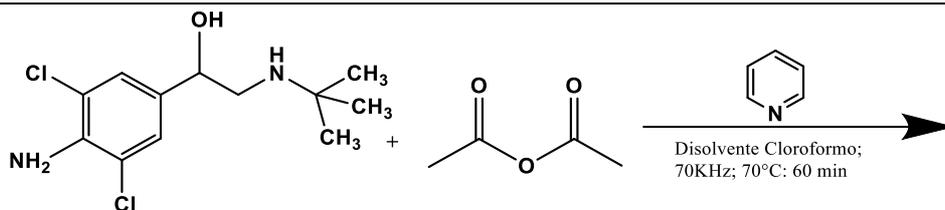
El infrarrojo tiene varias aplicaciones en química en síntesis de compuestos. Por lo que utilizamos esta fuente de energía para realizar la síntesis de los metabolitos del CLB.



**Figura 5:** Acetilación de clenbuterol mediante el empleo de energía infrarroja

El uso del ultrasonido en la química ofrece al químico que trabaja en la síntesis orgánica un método alternativo para la activación de reacciones químicas con amplias aplicaciones y usos, utilizando equipo relativamente barato o de costumbre muy baja y así mismo amigable con el ambiente.<sup>12</sup> En el experimento se utilizó la activación por ultrasonido para la obtención de metabolitos del CLB.

<sup>12</sup> Sonochemistry: The uses of ultrasound in chemistry, ed. T.J. Mason, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1990.



**Figura 6:** Reacción de acetilación de Clenbuterol mediante el empleo de ultrasonido

La biocatálisis ha atraído una gran atención por parte de los investigadores debido a su conformidad con el concepto de química verde y desarrollo sostenible, y cada vez se utiliza más en muchos campos como la alimentación, la medicina, la protección del medio ambiente, la energía, la síntesis orgánica y más.<sup>13</sup> Otro aspecto que puede solucionar la biocatálisis es la creciente preocupación de la sociedad por obtener procesos ecológicos que sustituyan a la síntesis química. La biocatálisis se considera ambientalmente atractiva, más rentable y, por lo tanto, más sostenible ya que:

1. El catalizador es biodegradable, no peligroso y no tóxico.
2. Se evita el uso de metales y los costos posteriores de eliminarlos de los productos finales.

<sup>13</sup> Yu, Y., Lu, W., Yang, Z., Wang, N. and Yu, X., 2021. *Combining photo-redox and enzyme catalysis for the synthesis of 4H-pyrimido[2,1-b] benzothiazole derivatives in one pot.* *Bioorganic Chemistry*, 107, p.104534. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104534>



3. Las reacciones enzimáticas se realizan normalmente en condiciones suaves.
4. Las reacciones biocatalíticas suelen generar menos residuos que las síntesis orgánicas convencionales

Una opción para acercar la biocatálisis a la viabilidad industrial es utilizar enzimas inmovilizadas. Su uso permite la reutilización del biocatalizador aumentando el rendimiento del biocatalizador y reduciendo los pasos de purificación.<sup>14</sup>

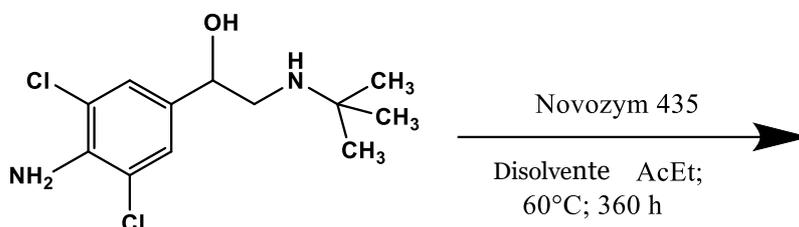
Para reducir el uso de sustancias peligrosas y la generación de contaminantes en la síntesis de metabolitos de CLB, utilizamos la catálisis enzimática (biocatálisis) como se muestra en la *figura 4*, usando lipasa de *Candida antarctica* disponibles en el mercado, Novozym 435, así realizamos un método clave para la implementación exitosa de la química verde debido a la alta eficiencia catalítica en condiciones suaves

---

<sup>14</sup> García-Bofill, M., Sutton, P. W., Straatman, H., Brummund, J., Schürmann, M., Guillén, M., & Álvaro, G. 2021. *Biocatalytic synthesis of vanillin by an immobilised eugenol oxidase: High biocatalyst yield by enzyme recycling*. *Applied Catalysis A: General*, 610, 117934. doi:10.1016/j.apcata.2020.117934



y la regioselectividad y estereoselectividad excepcionales de las enzimas.<sup>15</sup>



**Figura 7:** Reacción de acetilación de Clembuterol mediante el empleo de Novozym 435.

Por otro lado, los métodos de síntesis electroquímicos (MSE) siempre se han empleado como un procedimiento general y sostenible con los criterios de la química verde. Más importante aún, en comparación con los métodos redox tradicionales, los MSE presenta ventajas únicas:<sup>16</sup>

1. El uso de electrones como reactivos redox evita o reduce la utilización de reactivos químicos tradicionales, lo cual está en línea con el concepto de química ecológica.

<sup>15</sup> Xue, J., Wang, P., Kuang, J., & Zhu, Y. 2020. *Computational design of new enzymes for hydrolysis and synthesis of third-generation cephalosporin antibiotics*. *Enzyme and Microbial Technology*, 109649. doi:10.1016/j.enzmictec.2020.109649

<sup>16</sup> Li, H., Xue, Y.-F., Ge, Q., Liu, M., Cong, H., & Tao, Z. 2021. *Chiral electroorganic chemistry: An interdisciplinary research across electrocatalysis and asymmetric synthesis*. *Molecular Catalysis*, doi: doi.org/ 10.1016/j.mcat.2020. 111 296.

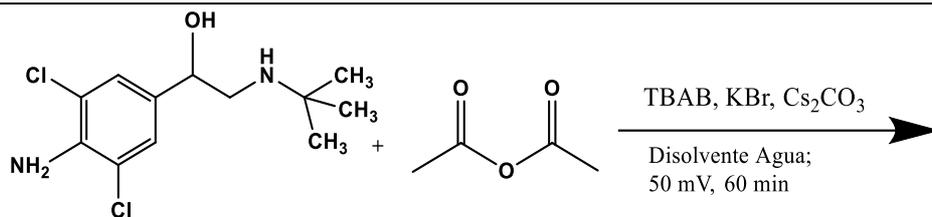


- 
2. La reacción se puede ajustar arbitrariamente mediante las aplicaciones de potencial y corriente para realizar el control de la selectividad de la reacción, la velocidad de reacción y el grado de conversión del sustrato.
  3. La polaridad de algunos grupos funcionales se invierte mediante la transferencia de electrones para lograr la selectividad de reacción, que no está disponible en los métodos tradicionales

Sin embargo, estas ventajas no se han traducido en un uso generalizado de la síntesis electroquímica y solo se han comercializado unos pocos procesos a escala de laboratorio. Una lista de compuestos orgánicos producidos por vía electroquímica y su proximidad a la aplicación industrial es indicativa del estado actual de la síntesis electroquímica.<sup>17</sup> Por todas las ventajas que proporcionan los MSE se realiza la transformación del clenbuterol, para obtener así los metabolitos acetilados. Como muestra la figura 5. La electrosíntesis de acetilación de CLB usando anhídrido acético como donante de grupo carbonilo.

---

<sup>17</sup> Botte, G. G. 2014. *Electrochemical Manufacturing in the Chemical Industry*. *Interface Magazine*, 23(3), 49–55. doi:10.1149/2.f04143if



**Figura 8:** Reacción de acetilación de Clenbuterol por medio de electrosíntesis.

Para la caracterización de los metabolitos se utiliza los datos obtenidos de espectroscopia infrarroja y espectrometría de masas.

## Generalidades

### Xenobióticos

Todos los días, el cuerpo debe defenderse de una gran cantidad de xenobióticos que se ingieren en la dieta, se inhalan o se absorben de otra manera.<sup>18</sup> Un xenobiótico se define como un producto químico que no es utilizado por el organismo de referencia como un químico nutritivo, no es esencial para el organismo para el mantenimiento de la función fisiológica/ bioquímica normal y homeostasis, y no constituye una parte de la matriz convencional de productos químicos sintetizados a partir de

<sup>18</sup> Kliewer, S., Goodwin, B. and Willson, T., 2002. *The Nuclear Pregnane X Receptor: A Key Regulator of Xenobiotic Metabolism*. *Endocrine Reviews*, 23(5), pp.687-702. DOI: [10.1210/er.2001-0038](https://doi.org/10.1210/er.2001-0038)



---

productos químicos nutrientes por el organismo en el metabolismo intermediario normal.<sup>19</sup>

### Sitios de almacenamiento xenobióticos

Los xenobióticos se pueden almacenar dentro de una variedad de diferentes órganos y tejidos del cuerpo. Dependiendo de las relaciones anatómicas y fisiológicas entre el sitio de almacenamiento y los órganos y tejidos blancos y diana para un tóxico específico, el almacenamiento de xenobióticos tóxicos puede funcionar como un mecanismo de protección o como un medio por el cual los efectos tóxicos de un xenobiótico se potencian. Un conocimiento de los sitios de almacenamiento de xenobióticos tóxicos puede proporcionar información adicional sobre circunstancias que se esperaría que exacerbaban una toxicosis particular, y puede indicar qué órganos o tejidos se espera que tengan las concentraciones más altas para el muestreo diagnóstico. Las proteínas plasmáticas representan un sitio de almacenamiento para muchos xenobióticos (por ejemplo, salicilatos, barbitúricos, glucósidos cardíacos) y componentes fisiológicos importantes, como las hormonas esteroides, vitaminas, y varios minerales esenciales. El desplazamiento de xenobióticos tóxicos de proteínas plasmáticas puede aumentar en gran medida la cantidad de

---

<sup>19</sup> Juchau, M. R., & Chen, H. 1998. *Developmental Enzymology. Handbook of Developmental Neurotoxicology*, 321–337. doi:10.1016/b978-012648860-9.50023-6



tóxicos libres que se pueden distribuir en órganos o tejidos blanco. Una amplia variedad de xenobióticos se acumulan en el hígado y los riñones, haciendo que estos órganos sean sitios ideales para la recolección de muestras postmortem en casos de sospecha de intoxicaciones. Algunos metales tóxicos, como el cadmio, se acumulan en el hígado y los riñones debido a las altas concentraciones endógenas y la inducción de metalotioneína en estos órganos. La grasa y el hueso son depósitos de almacenamiento para una variedad de diferentes xenobióticos, y el agotamiento rápido de las reservas de grasa corporal (pérdida de peso) o una mayor remodelación del hueso durante el crecimiento o el embarazo tienen el potencial de aumentar la exposición de órganos o tejidos diana a tóxicos previamente almacenados.<sup>20</sup>

### Metabolismo de Xenobioticos

Ya que se definieron a los xenobióticos como sustancias químicas a las que se expone un organismo que son extrínsecos al metabolismo normal de ese organismo. Sin metabolismo, muchos xenobióticos alcanzarían concentraciones tóxicas. La mayoría de la actividad metabólica dentro de la célula requiere energía, cofactores y enzimas para poder ocurrir. Las reacciones de biotransformación se dividen en reacciones de fase I y fase II, las cuales requieren de sistemas enzimáticos y transportadores. Los

---

<sup>20</sup> Evans, T. J. 2013. *Toxicokinetics and Toxicodynamics. Small Animal Toxicology*, 13–19. doi:10.1016/b978-1-4557-0717-1.00002-8



---

xenobióticos lipofílicos a menudo se metabolizan por primera vez por enzimas de fase I, que funcionan para hacer xenobióticos más polares y proporcionan sitios para reacciones de conjugación. Las enzimas de fase II son enzimas conjugadoras y pueden interactuar directamente con los xenobióticos, pero más comúnmente interactúan con metabolitos producidos por enzimas de fase I. A través del transporte pasivo y activo, estos metabolitos más polares se eliminan. La mayoría de los xenobióticos se eliminan a través de múltiples enzimas y vías. La relación entre las concentraciones químicas, la afinidad enzimática y cantidad de enzimas, y la disponibilidad del cofactor a menudo determinan el tipo de reacciones enzimáticas que predominan en los individuos.<sup>21</sup>

Las reacciones de conjugación son las más importantes en la biotransformación de fármacos. La razón principal es que los xenobióticos que ingresan al cuerpo suelen ser liposolubles y, por lo tanto, solo se excretan lentamente en la orina, la principal vía excretora en la mayoría de las especies. Solo después de la biotransformación en la que se ha añadido un resto hidrófilo, como el grupo sulfato o ácido glucurónico, la solubilidad en agua aumenta y la solubilidad en lípidos disminuye lo suficiente como para hacer posible la excreción urinaria. Por lo general, la mayor parte de la dosis de fármaco administrada se

---

<sup>21</sup> Croom, E. 2012. *Metabolism of Xenobiotics of Human Environments. Toxicology and Human Environments*, 31–88. doi:10.1016/b978-0-12-415813-9.00003-9



---

excreta como conjugados en la orina y la bilis. A menudo, la conjugación está precedida por reacciones metabólicas de fase I como la hidrólisis u oxidación. El sistema del citocromo P-450 juega un papel importante en este último. Sin embargo, para los compuestos que ya tienen un grupo disponible para la conjugación cuando ingresan al cuerpo, como el paracetamol (acetaminofén), la conjugación por sí sola suele ser el principal destino.

La mayoría de las conjugaciones se descubrieron en el siglo XIX, cuando se administraron varios compuestos a animales o voluntarios humanos y se analizaron los metabolitos en la orina. A pesar de la metodología analítica relativamente primitiva disponible en ese momento, se descubrieron la glucuronidación, sulfatación y formación de mercapturatos e hipuratos. Por supuesto, fue muy útil que los compuestos utilizados pudieran administrarse en gran velocidad para facilitar el análisis, que generalmente requería cristalización y análisis elemental. En la década de 1930 se inició una investigación más sistemática, en particular por R. T. Williams y sus colaboradores, cuando se investigó la biotransformación de series de compuestos relacionados. Se exploraron la dependencia de la dosis del metabolismo, la biotransformación en varias especies, los patrones de metabolitos para estructuras a veces muy complejas y vías excretoras; muchas de las "reglas" se descubrieron durante este tiempo. Hoy en día es factible



---

hacer ciertas predicciones del metabolismo de un nuevo compuesto basándose en su estructura química, las especies de prueba, así como el nivel de dosis y la vía de administración.<sup>22</sup>

La determinación de la actividad metabólica del citocromo P450 mediante marcadores selectivos, las enzimas del citocromo P450 (CYP) desempeña un papel fundamental en la fase I de la biotransformación xenobiótica. Se sabe la mayoría de las enzimas CYP son polimórficas, con muchas variantes alélicas. Como consecuencia del gran número de posibles combinaciones de alelos, se puede observar una amplia gama de actividad metabólica entre los pacientes de la población. La actividad de CYP individual también puede verse afectada por varios xenobióticos; la inducción o la inhibición de distintas isoenzimas de CYP pueden causar falla o toxicidad de la farmacoterapia. Debido a esto, en la práctica clínica es importante la predicción de la actividad metabólica.<sup>23</sup>

Las enzimas del citocromo P450 (CYP), que comprenden una gran familia de monooxigenasas que contienen un grupo hemo, representan un componente importante del mecanismo de defensa del cuerpo contra sustancias químicas extrañas. Aunque algunos CYP son altamente

---

<sup>22</sup> Mulder, G. J. (Ed.). (1990). *Conjugation reactions in drug metabolism: An integrated approach*. (pp. 162-190). Londres, Inglaterra: Taylor & Francis.

<sup>23</sup> Paxton J., (2012). TOPICS ON DRUGBMETABOLISM. (pp. 198-201). Rijeka, Croacia: InTech



---

selectivos en sus interacciones con sustratos, otros oxidan una amplia variedad de sustancias químicas, incluidos muchos xenobióticos. Una característica importante de la familia CYP es que la expresión de algunas isoformas, en particular los miembros de la subfamilia CYP1A, CYP2B, CYP3A y CYP4A, puede incrementarse drásticamente con la exposición a xenobióticos, proporcionando así un mecanismo regulador adaptativo que amplifica la respuesta fisiológica por el xenobiótico. Los miembros de la subfamilia CYP3A son los CYP más abundantes en el hígado y el intestino humanos y muestran una amplia especificidad de sustrato. La expresión de los miembros de la familia CYP3A puede ser fuertemente inducida por un conjunto estructuralmente diverso de sustancias químicas, muchas de las cuales son sustratos de CYP3A. La inducción de los niveles de CYP3A representa la base de las acciones de los esteroides anabólicos, que se informaron por primera vez hace más de 30 años por su capacidad para inducir la actividad de la monooxigenasa hepática y para conferir resistencia a sustancias tóxicas en roedores. Sin embargo, debido a que las isoformas de CYP3A están involucradas en el metabolismo de más del 50% de todos los medicamentos prescritos, la inducción de su expresión también representa una base para una clase común de interacciones fármaco-fármaco potencialmente mortales en las que un fármaco acelera el metabolismo del segundo. Por lo tanto, la elucidación de los mecanismos que subyacen a la expresión del gen



---

CYP3A son importantes para el desarrollo de medicamentos más seguros.<sup>24</sup>

### Acetilación biológica

Hacia fines del siglo pasado, los químicos fisiológicos descubrieron que las sustancias químicas que ingresan al cuerpo están sujetas a biotransformaciones definidas y generalmente se excretan en la orina como conjugados. Durante ese período, el químico orgánico alemán Rudolf Cohn (1893) identificó la acetilación biológica como una de las principales reacciones de conjugación de humanos y especies animales. La acetilación biológica en humanos y animales generalmente implica la transferencia enzimática del grupo acetilo desde la acetil coenzima A endógena (AcCoA) a moléculas que contienen una amina primaria, un grupo hidroxilo o sulfhidrilo. La acetilación del grupo de amina primaria de arilaminas e hidracinas es una ruta principal de biotransformación de estas sustancias. La acetilación de colina y de coenzima A son ejemplos singulares de sustancias endógenas que implican la transferencia de acetilo al grupo hidroxilo y al grupo sulfhidrilo respectivamente, pero la acetilación de esos grupos en sustancias químicas ambientales es mucho menos frecuente. Solo recientemente se ha demostrado que la

---

<sup>24</sup> Kliewer, S., Goodwin, B. and Willson, T., 2002. The Nuclear Pregnane X Receptor: A Key Regulator of Xenobiotic Metabolism. *Endocrine Reviews*, 23(5), pp.687-702. DOI: 10.1210/er.2001-0038



---

acetilación del grupo hidroxilo ocurre para ciertas aminas aromáticas N hidroxiladas carcinógenas, pero todavía parecen faltar ejemplos de acetilación del grupo sulfhidrilo de sustancias químicas ambientales. El hígado es un sitio importante de N-acetilación biológica. En el hígado se presenta la mayor parte de las reacciones de acetilación biológica.

Se sabe desde hace mucho tiempo que la biotransformación mediante N-acetilación altera la disposición y excreción de fármacos y no fármacos de arilamina e hidracina, y que afecta las respuestas de los individuos a esas sustancias. Más recientemente, se ha reconocido que la acetilación del N desempeña un papel modulador en la activación metabólica de aminas aromáticas mutagénicas y cancerígenas y de varios pirolizados de alimentos que se clasifican como cancerígenos, drogas y otros ambientales. Las sustancias químicas que no contienen una amina primaria pero que pueden transformarse a ese estado también pueden N-acetilarse, y la N-acetilación de neurotransmisores en la glándula pineal y de hormonas peptídicas de la pituitaria y el hipotálamo ha estimulado el interés en la acetilación como un proceso fisiológico regulador. Las reacciones enzimáticas de transferencia de acetilo distintas de la N-acetilación contribuyen a la citotoxicidad, mutagenicidad y carcinogenicidad de las aminas aromáticas y las hidracinas. En 1972 se observaron transferencias inter e intramoleculares dependientes del ácido arilhidroxámico,



---

respectivamente, del grupo acetilo desde el nitrógeno al oxígeno de las N-acetil-N-hidroxiarilaminas (ácidos arilhidroxámicos), la transferencia de N, O-acetilo, como vías para la formación de N-acetoxiarilaminas cancerígenas. Sin embargo, en los últimos diez años, varios investigadores en laboratorios de Japón y Estados Unidos han demostrado la existencia de transferencia de O-acetilo dependiente de acetil coenzima A como otra vía de formación de N-acetoxiarilaminas cancerígenas a partir de N-hidroxiarilaminas mutagénicas y cancerígenas.

La identificación de personas como acetiladores "rápidos" y "lentos" de aminas e hidrazina durante la década de 1950 y de muchas otras sustancias químicas desde entonces añadió otra dimensión importante a la biología de la acetilación. Las diferencias entre personas en la acetilación son atribuibles a dos alelos acetiladores principales en un único locus génico autosómico que se expresan en el hígado, la mucosa intestinal y otros tejidos.

El locus del gen acetilador confiere grandes diferencias estables en la capacidad de acetilación de los individuos en una etapa temprana de la vida, probablemente durante la infancia, y también influyen en las respuestas terapéuticas, toxicológicas y farmacológicas de los individuos a los fármacos y otras aminas e hidracinas aromáticas ambientales en un grado notable. Los estudios de epidemiología genética sugieren un papel



cada vez mayor del rasgo acetilador como determinante de susceptibilidad a los efectos tóxicos inducidos por fármacos, a cánceres inducidos por aminas aromáticas y a diversos trastornos humanos espontáneos

Las enzimas *N*-acetilantes y *O*-acetilantes se distribuyen en muchos tejidos de humanos y animales. En muchos estudios se han examinado las *N*-acetiltransferasas de tejidos de seres humanos, hámsteres, ratones, conejos y ratas. Extrahepáticamente, se han identificado *N*-acetiltransferasas en mucosa intestinal, colon, pulmón, timo, ovario, bazo, útero, glándula suprarrenal, leucocitos, riñón, médula ósea, glándula salival, páncreas, glándula pineal, eritrocitos y cerebro. La actividad también está presente en la mucosa de la vejiga urinaria, la placenta humana y piel, pero no se ha detectado en plasma, músculo esquelético y grasa.<sup>25</sup>

## Clembuterol

El clembuterol (CLB), es un agonista adrenérgico beta 2, que puede usarse para expandir los bronquios y el aborto espontáneo.<sup>26</sup> Se utilizó

---

<sup>25</sup> Mulder, G. J. (Ed.). 1990. *Conjugation reactions in drug metabolism: An integrated approach*. (pp. 162-190). Londres, Inglaterra: Taylor y Francis.

<sup>26</sup> Feng, F., Zheng, J., Qin, P., Han, T., & Zhao, D. 2017. A novel quartz crystal microbalance sensor array based on molecular imprinted polymers for simultaneous detection of clenbuterol and its metabolites. *Talanta*, 167, 94–102. doi:10.1016/j.talanta.2017.02.001



---

por primera vez como agente broncodilatador y tocolítico en el tratamiento clínico.<sup>27</sup>

El clenbuterol como es considerado un potente  $\beta$ -agonista-adrenérgico sintético, utilizado como broncodilatador en animales domésticos y humanos, durante afecciones pulmonares, sin embargo, en la actualidad es utilizado como anabólico, ya que aumenta la masa corporal a través de mecanismo de glucogenólisis, glucolisis, degrada la grasa y acumula nitrógenos, para formar aminoácidos y de allí formar estructuras celulares que darán origen al musculo esquelético; considerado como un verdadero repartidor de energía, sin embargo, los daños reales del mismo sobre las rutas metabólicas se desconoce.<sup>28</sup> Estudios anteriores demostraron que el agonista aumentó el nivel de expresión de alfa-actina en el músculo esquelético de los cerdos y disminuyó la degradación de proteínas en los músculos sartorio y pectoral de los pollos recién nacidos. El clenbuterol puede inhibir la atrofia del músculo masetero causada por la dexametasona a través de las vías IGFI, AKT y mTOR. También puede aliviar la atrofia muscular a través de sus efectos

---

<sup>27</sup> Ijiri, D., Ishitani, K., Shimamoto, S., Ishimaru, Y., Ohtsuka, A. 2014. *The effects of intraperitoneal clenbuterol injection on protein degradation and myostatin expression differ between the sartorius and pectoral muscles of neonatal chicks. General and Comparative Endocrinology*, 206, 111–117. doi:10.1016/j.ygcen.2014.07.023

<sup>28</sup> Caicedo Rivas R. E., M. Paz-Calderon Nieto, S. V. Badillo M. 2011 *Clenbuterol ( $\beta$ 2-agonista adrenérgico), enmascara las patologías hepáticas en bovinos*. DOI: [http://www.uco.es/conbiand/aica/templatemo\\_110\\_lin\\_photo/articulos/2011/Caicedo2011\\_1\\_327\\_331.pdf](http://www.uco.es/conbiand/aica/templatemo_110_lin_photo/articulos/2011/Caicedo2011_1_327_331.pdf)



---

sobre la vía ubiquitina-proteasoma en ratas. beta-agonistas podría inhibir la transcripción de KLF-15 y la actividad enzimática de la sintasa de ácidos grasos en aves.<sup>29</sup>

El clenbuterol, la terbutalina y el salbutamol son fármacos agonistas B2 incluidos en la lista de sustancias prohibidas de la Agencia Mundial Antidopaje (WADA) prohibidas dentro y fuera de competición ya que se ha utilizado en el deporte como agente anabólico debido a su estimulación del sistema nervioso central y como agente promotor del crecimiento, por lo que se incluye en el lista de sustancias prohibidas publicada por la Agencia Mundial Antidopaje<sup>30</sup>

El clenbuterol está registrado como agente broncoespasmolítico y se utiliza como agente tocolítico. Como es un reactivo anabólico, promueve el crecimiento muscular y altera la composición corporal en la dirección de aumentar la masa muscular y disminuir la grasa. Los recientes episodios de intoxicaciones colectivas en seres humanos causados por la presencia de residuos activos de CLB en la carne, y una serie de casos

---

<sup>29</sup> 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.* doi:10.1016/j.chroma.2016.06.017

<sup>30</sup> 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  $\beta$ 2-agonists clenbuterol, salbutamol and terbutaline by liquid chromatography high resolution mass spectrometry. Journal of Chromatography B, 923-924, 128–135.* doi:10.1016/j.jchromb.2013.02.008



importantes de dopaje relacionados nuevamente con clenbuterol, como ejemplo notificado antes y durante los Juegos Olímpicos de Barcelona 1992, son una fuerte evidencia de la propagación de ambos tipos del mal uso.

Debido a la alta potencia del clenbuterol, las concentraciones esperadas en los fluidos biológicos son muy bajas como consecuencia de las dosis muy pequeñas utilizadas. Después de dosis terapéuticas de 20 a 40 mg en humanos, los niveles máximos en orina están en el rango de 10 a 20 ng / mL y caen a 1 a 2 ng / ml después de 48 h

Se han descrito varios métodos para la detección de Clenbuterol y otro B-agonista en fluidos biológicos. Como procedimiento más general, Van Ginkel et al. describieron el análisis de cuatro B-agonistas por cromatografía de gases / espectrometría de masas (GC / MS) utilizando una columna de inmuno afinidad para purificar el extracto. El inmuno ensayo enzimático se ha utilizado solo en unos pocos casos; 4 determinaciones más frecuentes son obtenidas por cromatografía en capa fina, cromatografía líquida de alta resolución y cromatografía de gases.<sup>31</sup>

---

<sup>31</sup> Jeong A. L., Dong-seok L., Myungsoo K.; 1998 *Determination of Derivatized Clenbuterol by Use of Gas Chromatography and Tandem Mass Spectrometry on an Ion Trap using Negative Ion Chemical Ionization. rapid communications in mass spectrometry rapid Commun. Mass Spectrom. 12, 1366–1372 (1998) DOI: 10.1002/(SICI)1097-0231(19981015)12:19<1366::AID-RCM324>3.0.CO;2-I*



---

### Intoxicaciones por Clembuterol

Aunque el clenbuterol ha estado prohibido durante muchos años en la mayoría de los países, se han informado con frecuencia incidentes de intoxicación por CLB.

Cuando los animales ingieren el agente de redistribución de nutrientes CLB, no lo pueden metabolizar por completo y se puede acumular en el tejido y el líquido de los animales. Aunque el agonista tiene una función poderosa en la producción de más músculos esquelético, su residuo tiene un período de vida media prolongada de alrededor de 25 a 40 horas y una alta biodisponibilidad es dañino para los humanos.<sup>32</sup>

En la mayoría de los casos, las intoxicaciones alimentarias agudas surgen de forma inesperada y los trastornos orgánicos y funcionales que se presentan evolucionan rápidamente hacia formas graves que pueden provocar la muerte del paciente. Por esta razón, tanto el personal expuesto al riesgo, como el médico deben estar preparados para aplicar de forma correcta e inmediata los primeros auxilios y el tratamiento médico adecuado. El cuadro clínico observado en la mayoría de los casos estudiados de Intoxicación Alimentaria por clenbuterol (IAC) se presenta

---

<sup>32</sup> 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. doi:10.1016/j.chroma.2016.06.017*



---

posterior a la ingesta de un alimento implicado (principalmente hígado de bovino). Su inicio es brusco, después de un periodo de incubación de entre 30 minutos y seis horas.<sup>33</sup>

El cuadro clínico de toxicidad en humanos incluye efectos simpaticomiméticos como inquietud, taquicardia y taquiarritmias, alteraciones gastrointestinales y rabdomiólisis y alteraciones metabólicas como hiperglucemia e hipopotasemia. También ha habido informes de casos de isquemia del miocardio en personas por lo demás sanas y de dificultad respiratoria en adultos después de la insuflación nasal. Algunos casos reportados en la literatura han presentado arritmias con fibrilación auricular o hipertensión arterial.<sup>34</sup>

El clenbuterol tiene la propiedad de alterar la composición del cuerpo animal y disminuir el porcentaje de grasa lo que desde el punto de vista económico, resulta ser muy conveniente.<sup>35</sup>

---

<sup>33</sup> Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud de México. *Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de la Intoxicación Alimentaria asociada al consumo de carne contaminada por Clenbuterol*. Obtenido de: [https://salud.edomex.gob.mx/cevece/documentos/acerca\\_de/marco\\_j/manualesvep/Manual\\_Clenbuterol.pdf](https://salud.edomex.gob.mx/cevece/documentos/acerca_de/marco_j/manualesvep/Manual_Clenbuterol.pdf) el día 25 de Marzo de 2021.

<sup>34</sup> Brett, J., Dawson, A. H., Brown, J. A. 2014. *Clenbuterol toxicity: a NSW Poisons Information Centre experience*. *The Medical Journal of Australia*, 200(4), 219–221. doi:10.5694/mja13.10982

<sup>35</sup> Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud de México. *Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de la Intoxicación Alimentaria asociada al consumo de carne contaminada por Clenbuterol*. Obtenido de:



---

### Clembuterol en México

En México, el clembuterol (Novegam, Spiropent), está autorizado en humanos como broncodilatador para revertir el broncoespasmo de etiología asmática, bronquitis crónica y enfermedades obstructivas agudas y crónicas con componente broncoconstrictor. También es utilizado por los atletas, posterior al tratamiento esteroideo para reparar la fase catabólica y así obtener masa y máxima fuerza muscular. La sustancia está prohibida por la Secretaría de Agricultura, Ganadería Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), como promotor de crecimiento en alimento para animales según la NOM-061-ZOO-1999 Especificaciones Zoosanitarias de los Productos Alimenticios para Consumo Animal, publicada en el Diario Oficial de Federación del 10 de agosto de 1999 y que en el inciso 4.11 se refiere: “Queda prohibido el uso de los siguientes ingredientes activos y/o aditivos”

La Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos (FDA) no aprueba su uso en humanos (1° de enero de 2002); los efectos anabólicos del Clembuterol sobre la masa muscular y la grasa corporal han favorecido su uso ilegal en la alimentación animal. Causa regresión del tejido graso, aumento de la masa muscular y la ganancia de peso sobre todo en el ganado vacuno. El empleo de este medicamento con esta

---

[https://salud.edomex.gob.mx/cevece/documentos/acerca\\_de/marco\\_j/manualesvep/Manual\\_Clembuterol.pdf](https://salud.edomex.gob.mx/cevece/documentos/acerca_de/marco_j/manualesvep/Manual_Clembuterol.pdf) el día 25 de Marzo de 2021.



---

finalidad no está aprobado en Estados Unidos (Animal Medical Drug News Clarification Act AMDUCA). El 1° de marzo de 2002, se publicó la Norma Oficial Mexicana de emergencia denominada NOMEM-015 -ZOO-2002 para el control del uso de beta-análogos en los animales, en la que se especifica:

“Queda prohibida la producción, manufactura, fabricación, elaboración, preparación, acondicionamiento, transportación, tráfico, comercialización, importación, suministro y/o utilización de los siguientes principios activos, aditivos, alimenticios y/o medicamentos en formulación de productos alimenticios destinados para consumo y uso en animales, así como cualquiera de sus derivados, composiciones o mezclas en cualquier presentación, tales como: Bromobuterol, Carbuterol, Cimaterol, Cimbuterol, Clembuterol, Fenotero , Isoproterenol, Mabuterold, Mapentero, Orciprenaline, Pirbuterol, Ractopamine, Ritodrine, Salbutamol, Terbutaline, Zilpatero.<sup>36</sup>

#### Metabolismo del clembuterol

De acuerdo a su farmacocinética, tanto en el humano como en otras especies estudiadas, la absorción del CLB se da entre 15 y 45 minutos,

---

<sup>36</sup> Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud de México. *Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de la Intoxicación Alimentaria asociada al consumo de carne contaminada por Clembuterol*. Obtenido de: [https://salud.edomex.gob.mx/cevece/documentos/acerca\\_de/marco\\_j/manualesvep/Manual\\_Clembuterol.pdf](https://salud.edomex.gob.mx/cevece/documentos/acerca_de/marco_j/manualesvep/Manual_Clembuterol.pdf) el día 25 de Marzo de 2021.



---

los niveles plasmáticos máximos se alcanzan en dos horas, se distribuye en la mayoría de los tejidos incluyendo la placenta. Se elimina predominantemente por vía renal y tiene una vida media de tres a seis horas. Se elimina preferentemente como fármaco no metabolizado. El Clembuterol tiene una toxicidad aguda de moderada a alta. La DL50 es de 80-180 mg/kg. La administración de dosis mayores de 40 microgramos (mcg) desencadena la sintomatología, anteriormente mencionada.

El Clembuterol es metabolizado en el hígado y eliminado a través de la orina; por lo tanto, la concentración más alta se encuentra en ese órgano. Su tiempo de vida media es de 18 a 65 horas. La acumulación del CLB en el hígado depende de la dosificación y del tiempo. En el ganado, la concentración en el hígado llega al nivel máximo después de 15 días de medicación; en las primeras 48 horas después del tratamiento, la concentración disminuye en el hígado y en los riñones relativamente rápido, pero después de este tiempo, la degradación es más lenta.

Periodos de Tiempo de Eliminación del clembuterol en Tejidos y Fluidos Animales.<sup>37</sup>

---

<sup>37</sup> Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud de México. *Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de la Intoxicación Alimentaria asociada al consumo de carne contaminada por Clembuterol*. Obtenido de: [https://salud.edomex.gob.mx/cevece/documentos/acerca\\_de/marco\\_j/manualesvep/Manual\\_Clembuterol.pdf](https://salud.edomex.gob.mx/cevece/documentos/acerca_de/marco_j/manualesvep/Manual_Clembuterol.pdf) el día 25 de Marzo de 2021.



| <b>Tejido/fluido</b> | <b>Tiempo de eliminación</b> |
|----------------------|------------------------------|
| <b>Plasma</b>        | 2 días                       |
| <b>Orina</b>         | 3-5 días                     |
| <b>Hígado</b>        | 12-15 días                   |

### [Marco legal del Clenbuterol en México](#)

En México la Intoxicación Alimentaria por Clenbuterol es un padecimiento sujeto a vigilancia epidemiológica, de notificación obligatoria y semanal, según lo establecido en los artículos 3o. fracción XVI, 133, 134 fracción XIV, 135, 136 fracción II, 137, 138 y 139 de la Ley General de Salud; Art. 32 bis 2 del Decreto que reforma, adiciona y deroga diversas disposiciones del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud, lo establecido en el Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY- 13 Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica NOM-017-SSA2-2012, Para la vigilancia epidemiológica, la NOM-EM-015 -ZOO-2002, Para el control del uso de beta-análogos en



---

los animales y la NOM-061-ZOO-1999, Especificaciones Zoosanitarias de los Productos Alimenticios para Consumo Animal. <sup>38</sup>

### Química Verde

Como parte del desarrollo humano y de los estilos de vida de la población, se han generado una gran cantidad de bienes y servicios que elevan su calidad y cantidad de vida; si bien eso no es estrictamente cierto en algunas ocasiones, sobre todo cuando se considera el deterioro ambiental y el estrés que le produce a una persona el alcanzar un mayor nivel económico, para su bienestar y el de su familia. En relación directa con el desarrollo económico de las naciones se genera una gran cantidad de residuos o desechos, que mal tratados y/o por falta de reciclaje, provocan un sin fin de problemas que impactan a todos los seres vivientes del planeta: el cambio climático mundial y la extinción de especies animales y vegetales son claras manifestaciones del problema. Así que el reto global, como lo planteó la Comisión Mundial en Desarrollo y Medio Ambiente desde 1987, es pensar que tenemos un reto y un futuro común: ¡Hacer de nuestra tierra un solo mundo!<sup>39</sup>

---

<sup>38</sup> Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud de México. *Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de la Intoxicación Alimentaria asociada al consumo de carne contaminada por Clembuterol*. Obtenido de: [https://salud.edomex.gob.mx/cevece/documentos/acerca\\_de/marco\\_j/manualsv ep/Manual\\_Clembuterol.pdf](https://salud.edomex.gob.mx/cevece/documentos/acerca_de/marco_j/manualsv ep/Manual_Clembuterol.pdf) el día 25 de Marzo de 2021.

<sup>39</sup> UN documents, Our Common Future, From One Earth to One World, 2011. Consultado el 22 de Marzo de 2021 en la URL: [http:// www.un-documents.net/ocf-ov.htm](http://www.un-documents.net/ocf-ov.htm)



---

Al respecto, los químicos intentamos responder al reto haciendo química más directa, más eficiente y menos tóxica, tanto en nuestras actividades prácticas de docencia, como en nuestra investigación disciplinaria experimental. Así es como nace y se desarrolla la química verde, teniendo como estandarte los 12 postulados planteados por Anastas y Warner en 1998:<sup>40</sup>

1. Prevención: Es preferible evitar la producción de un residuo que tratar de limpiarlo una vez que se haya formado
2. Economía atómica: Los métodos de síntesis deberán diseñarse de manera que incorporen al máximo, en el producto final, todos los materiales usados durante el proceso, minimizando la formación de subproductos.
3. Uso de metodologías que generen productos menos peligrosos: Siempre que sea posible, los métodos de síntesis deberán diseñarse para utilizar y generar sustancias que tengan poca y ninguna toxicidad, tanto para el hombre como para el medio ambiente.
4. Generar productos eficaces pero no tóxicos: Los productos químicos deberán ser diseñados de tal manera para satisfacer su función y mantener la eficacia a la vez que reduzca su toxicidad.

---

<sup>40</sup> P. Anastas, J. Warner, 1998 Green Chemistry: Theory and Practice, Oxford University Press, Cambridge.



- 
5. Evitar o reducir el uso de sustancias auxiliares: Se impedirá, en lo posible, el uso de sustancias que no sean imprescindibles (disolventes, reactivos para llevar a cabo separaciones, etc.) y en el caso de que se utilicen que sea lo más inocuo posible.
  6. Incrementar la eficiencia en el consumo de la energía: Todas las necesidades energéticas requeridas en los procesos químicos deberán establecer el impacto ambiental y económico que representan, Se deberá minimizar el empleo de la energía y si es posible, todas las reacciones químicas deberán llevarse a cabo a temperatura y presión ambiente.
  7. Utilización de materias primas renovables: La materia prima ha de ser preferiblemente, renovable en vez de agotable, siempre que sea técnica y económicamente viable en lugar de agotable.
  8. Evitar la formación innecesaria de derivados: Se debe minimizar y en lo posible evitar la formación de derivados (grupos de bloqueo, de protección/desprotección, modificando temporal de procesos físicos/químicos), para no generar residuos.
  9. Emplear catalizadores: Se debe emplear de preferencia catalizadores (tan selectivos como sea posible) en lugar de reactivos estequiométricos, para minimizar la generación de residuos, ya que los primeros deben de ser utilizados en pequeñas cantidades y puedan ser reutilizados.



- 
10. Generar productos biodegradables: Los productos químicos se diseñarán de tal manera que al finalizar su función no persistan en el medio ambiente, sino que transformen en productos de degradación inocuos.
  11. Desarrollar metodologías analíticas para la monitorización en tiempo real: Las metodologías analíticas serán desarrolladas para permitir una monitorización y control en tiempo real del proceso, previo a la formación de sustancias peligrosas.
  12. Minimizar el potencial de accidentes químicos: Se elegirán las sustancias empleadas en los procesos químicos de forma que se minimice el riesgo de accidentes químicos, incluidas las emanaciones, explosiones e incendios.

No existe ninguna restricción sobre cuántas de estas características deba reunir un experimento para que sea considerado como “verde”; pero es obvio que entre mayor número de ellas contenga, más “verde” será la química que se haga. En contraste, podría ser controversial la creencia de que se está haciendo química verde por el solo hecho de reemplazar una fuente de energía calorífica por una fuente de microondas para llevar a cabo una reacción química a escala de laboratorio.<sup>41</sup>

---

<sup>41</sup> Arroyo-Carmona, R., Bernès, S., González-Vergara, E., Méndez-Rojas, M. and Pérez-Benítez, A., 2012. *Síntesis microquímica y microelectroquímica de acetato de cobre(II) a*



---

Gran parte de la investigación reciente en el campo de la química verde ha tratado de utilizar materias primas de fuentes renovables además de emplear catalizadores y solventes menos tóxicos y peligrosos.

Los 12 principios de la química verde enumeran puntos clave para ayudar a este desarrollo. Estos principios fueron introducidos en 1998 por Anastas y Warner y explorados más a fondo en 2010 por Anastas y Eghbali. Estas pautas están destinadas a ayudar a la industria a avanzar en una dirección respetuosa con el medio ambiente<sup>42</sup>

## Fuentes alternas de activación

### Irradiación infrarroja

#### Espectro electromagnético <sup>43</sup>

La radiación electromagnética es una de las muchas maneras en la que la energía viaja a través del espacio. El calor que genera una llama que arde, los rayos solares, la luz visible así como la energía que genera un aparato de microondas, son diferentes formas de radiación electromagnética. Mientras que estas formas de energía parecen no

---

*partir de vinagre: Un ejemplo de química verde.* DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0187-893X\(17\)30144-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0187-893X(17)30144-1)

<sup>42</sup> Hvidsten B. I., Machetti. M. J. 2020, Novozym® 435 as bio-catalyst in the synthesis of methyl laurate, Energy Conversion and Management. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecmx.2020.100061>

<sup>43</sup> Velázquez, A. Espectro Electromagnético. Obtenido de: [http://www.dcb.unam.mx/cerafin/bancorec/ejenlinea/3\\_Espectros\\_Planck.pdf](http://www.dcb.unam.mx/cerafin/bancorec/ejenlinea/3_Espectros_Planck.pdf) el día 16 de Abril de 2021



estar relacionadas una con otras, todas exhiben características de las ondas.

Podemos clasificar y ordenar las ondas electromagnéticas de acuerdo a sus diferentes longitudes de onda y frecuencia; a esta clasificación la llamamos “el espectro electromagnético”. La imagen muestra este espectro, que consiste de todas las clases de radiación electromagnética existentes en nuestro universo.

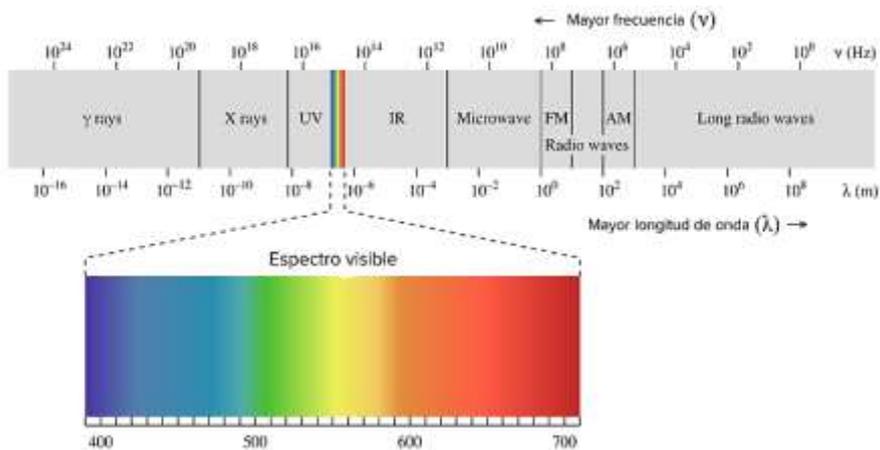


Figura 9: El espectro electromagnético.

Como se puede apreciar, el espectro visible (la luz que podemos ver con nuestros ojos), es tan solo una parte de las muy diversas clases de radiación que existen. A la derecha se encuentran las energías que son menores en frecuencia (y por lo tanto con mayor longitud de onda que la luz visible). Estas clases de energía incluyen a los rayos infrarrojos (IR) (Ondas de calor emitidas por los cuerpos térmicos), las microondas y las



---

ondas de radio. Estos tipos de radiación nos rodean constantemente y no son dañinas pues sus frecuencias son muy bajas.

Por otra parte, a la izquierda del espectro visible, encontramos los rayos ultravioletas (UV), Los rayos X y los rayos gamma. Estas clases de radiación son dañinas para los organismos vivos, pues sus frecuencias son extremadamente altas (contienen mucha energía).

### Infrarrojo

Los rayos IR fueron descubiertos en el año de 1800 por W Hershel, quien detecto en el espectro de la radiación solar un aumento importante de temperatura en la zona más allá del rojo, de la que no provenía ninguna luz visible.<sup>44</sup>

La radiación infrarroja (IR) es una radiación electromagnética cuya longitud de onda comprende desde los 760-780 nm, limitando con el color rojo en la zona visible del espectro, hasta los 10,000 o 15,000 nm limitando con las microondas, Sin embargo, para efectos prácticos, suelen dividirse en IR lejano (entre los 15,000 y 1,500 nm) e IR cercano (entre los 1.500 y los 760 nm).

Los IR se produce por los cuerpos calientes ya que se deben a cambios en los estados de energía de electrones orbitales en los átomos o en los estados vibracionales y rotacionales de los enlaces moleculares. Todos

---

<sup>44</sup> Educación: Sir Frederick William Herschel (1738-1822). 2021. Obtenido de URL [https://legacy.spitzer.caltech.edu/espanol/edu/herschel\\_bio.shtml](https://legacy.spitzer.caltech.edu/espanol/edu/herschel_bio.shtml)



---

los objetos a temperatura superior al cero absoluto ( $-273\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) emiten radiación IR. La cantidad y la longitud de onda de la radiación emitida dependen de la temperatura y la composición del objeto considerado.

El sol es la principal fuente natural de radiación IR; constituye el 59 % del espectro de emisión solar. Las fuentes artificiales de producción de IR son los emisores no luminosos (que emiten infrarrojos lejano) y las lámparas o emisores luminosos (infrarrojos cercano).

Los emisores no luminosos consisten en resistencias eléctricas dispuestas, generalmente, en espiral, sobre una superficie refractaria cerámica o, menos frecuentemente, en forma de varillas o barras de resistencia rodeadas de una superficie reflectante. Estas fuentes emiten gran cantidad de IR de onda larga, entre los 1,500 y los 12,500 nm, aunque también emiten cierta cantidad de IR cercano. Su radiación alcanza, como mucho, una profundidad de 2-3 cm bajo la piel. Estos reflectores de IR alcanzan su máxima potencia tras unos minutos de su conexión. Los emisores luminosos son lámparas especiales, constituidas por filamentos de tungsteno (en ocasiones, de carbono) dispuestos en una ampolla de cristal, que contiene un gas inerte a baja presión, con su reflector correspondiente para mejorar la direccionalidad del haz. Este filamento se calienta hasta temperaturas de  $1,900\text{ }^{\circ}\text{C}$  y emite gran cantidad de IR cercano (entre 760 y 1,500 nm) muy utilizado en química,



además de abundante luz visible. Su radiación alcanza unos niveles de profundidad entre 5 y 10 mm bajo la piel.<sup>45</sup>

### Aplicaciones en química

El infrarrojo tiene varias aplicaciones en química en síntesis de compuestos. La absorción de energía IR se limita a moléculas en las cuales existen pequeñas diferencias de energía entre sus distintos estados vibracionales y rotacionales, por lo que una molécula que experimente este tipo de radiación tendrá cambios en sus movimientos de rotación y de vibración.



**Figura 10.** Modos de vibración en moléculas: flechas indican dirección y magnitud de movimientos; signos +,- indican movimientos hacia arriba y abajo perpendicular a la página.



Al irradiar una molécula con energía infrarroja, esta absorbe radiación que a su vez provoca un movimiento vibratorio, la excitación prolongada de este tipo de radiación puede provocar la ruptura de enlaces químicos.<sup>46</sup>

#### Microondas.

En los últimos años, el calentamiento de las reacciones químicas mediante la energía de microondas ha sido un tema cada vez más popular en la comunidad científica. La síntesis por microondas representa un gran avance en la metodología de la química sintética. El calentamiento convencional, se conoce desde hace tiempo que es ineficiente y consume mucho tiempo, lo que lo hace limitado. La síntesis por microondas puede ser aplicada para algunas reacciones, creando reacciones más rápidas, mejorando los rendimientos y produciendo reacciones más limpias, mediante la reducción de reacciones secundarias no deseadas. Debido a que las microondas pueden transferir energía directamente a las especies reactivas, se denomina calentamiento molecular, que pueden promover las transformaciones que actualmente no son posibles con los métodos de calentamiento

---

<sup>46</sup> Smith, R.A.; Jones F.E.; Chasmar R.P.; (1968) *The detection and measurement of infrared radiation*. Claredon Press Oxford. Londres



---

convencional, como resultado los reactores de microondas se han convertido en una poderosa herramienta de síntesis. Todos los tipos de reacciones químicas térmicamente impulsadas pueden ser aceleradas por microondas: adiciones, cicloadiciones, sustituciones, eliminaciones, fragmentaciones, etc.<sup>47</sup>

La síntesis por microondas representa una técnica alternativa para proporcionar energía térmica a una reacción con ventajas interesantes como el ahorro de tiempo y energía, la generación de menos subproductos, la optimización de rendimientos, la obtención de productos en un menor número de pasos, sin contar que es una alternativa que apoya el desarrollo de nuevas líneas de investigación mediante la optimización de condiciones.

Esta forma de calentamiento utiliza la propiedad de algunas moléculas de transformar la energía electromagnética en calor, para entender un poco este fenómeno consideremos el efecto de una radiación electromagnética de alrededor de 900MHz, la cual provoca la rotación de los dipolos dentro del líquido lo que causa que las moléculas polares se alineen y luego relajen en el campo oscilante de la radiación electromagnética. Cuando la energía de la rotación de esos dipolos se disipa se produce el calentamiento del líquido, por eso, al producirse el

---

<sup>47</sup> Kappe O., Desai B. 2004 *Microwave-Assisted Synthesis Involving Immobilized Catalysts*. *PubMed*. DOI:[10.1007/b96876](https://doi.org/10.1007/b96876),



---

calentamiento en el interior del líquido y no transferirse desde el vaso es por lo que el líquido está a mayor temperatura que el recipiente.<sup>48</sup>

### **Aplicaciones:**

1. La digestión con microondas para el análisis elemental.
2. Síntesis de compuestos organometálicos y de coordinación
3. Síntesis de materiales cerámicos
4. Síntesis orgánica e inorgánica
5. Extracción asistida por microondas
6. Resorción de sólidos
7. Aplicaciones en catálisis

### **Ultrasonido**

El uso del ultrasonido en la química ofrece al químico que trabaja en la síntesis orgánica un método alternativo para la activación de reacciones químicas con amplias aplicaciones y usos, utilizando equipo relativamente barato o de costumbre muy bajo. La fuerza promotora del ultrasonido es la cavitación. Por lo que uno de los requisitos de este

---

<sup>48</sup> Síntesis asistida por Microondas – Centro Conjunto de Investigación De Química Sustentable CCIQS UAEM – UNAM obtenido del URL: [http://www.cciqs.uaemex.mx/index.php?option=com\\_content&view=article&id=85&Itemid=87](http://www.cciqs.uaemex.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=85&Itemid=87) el día 16 de Abril de 2021



---

método o técnica es que por lo menos una fase de la mezcla de reacción deberá ser un líquido.

Se conoce una amplia gama de aplicaciones y usos del ultrasonido en la química entre las que se incluyen además de la síntesis orgánica, la protección al medio ambiente (destrucción de contaminantes biológicos y químicos) y la ingeniería de procesos (extracción mejorada, cristalización, electro-plateado o electro depósitos metálicos y nuevos métodos de tecnología de polímeros ).<sup>49</sup>

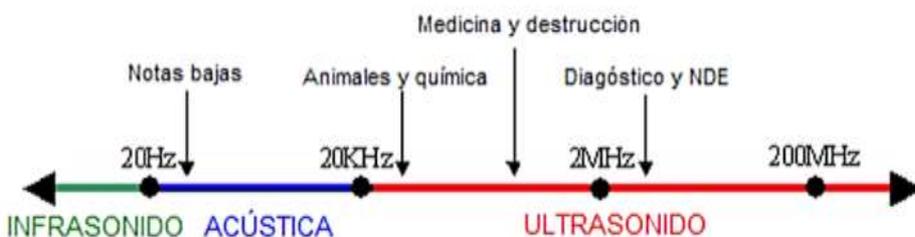
El ultrasonido se define como el sonido con una frecuencia más allá de la cual el oído humano no puede responder. La gama normal de audición se encuentra en los 16 hertzios y hasta los 18 kilociclos y en ultrasonido se considera generalmente de los 20 kilociclos hasta los 100 megaciclos. El US utiliza generalmente frecuencias entre los 20 y 40 kilociclos, por lo que esta es la zona de trabajo empleada en los equipos comunes de laboratorio. Así que el US es la onda material con una frecuencia superior a los 20000 Hz. Como muestra la figura 11 Más allá de este umbral es imperceptible para el oído humano. Estas ondas son producidas por la vibración de piezoeléctricos (materiales que con la acción de un campo eléctrico sufren tensiones internas que crean el ultrasonido). Los efectos químicos producidos por el ultrasonido son derivados de la creación,

---

<sup>49</sup> Sonochemistry: The uses of ultrasound in chemistry, ed. T.J. Mason, 1990. Royal Society of Chemistry , Cambridge.



expansión y destrucción de burbujas pequeñas que aparecen cuando un líquido se está irradiando por US. Este fenómeno llamado "cavitación ". El líquido circundante enfría rápidamente estas partes de medio, por eso una "gruta" del tamaño de unas micras desaparece en menos de  $1 \times 10^{-6}$  de segundo. La temperatura de cavitación varía desde 1000 hasta 10000 °K, más frecuente en el rango 4500-5500 °K.



**Figura 11:** Frecuencias de ultrasonido.

Hay que mencionar que la radiación acústica es la energía mecánica (no cuántica) que se transforma en energía térmica. A diferencia de los procesos fotoquímicos, esa energía no se absorbe por las moléculas. Debido al rango extenso de frecuencias de la cavitación, muchas reacciones no son reproducibles. Por lo tanto cada publicación relacionada con US generalmente contiene la explicación detallada del equipo (dimensiones, frecuencia e intensidad del US.)



---

La influencia de varios factores para el éxito de la aplicación de US puede ser resumida de la manera siguiente:<sup>50</sup>

Frecuencia.

El aumento de la frecuencia lleva al descenso de la producción y la intensidad de la cavitación en los líquidos. Este hecho puede ser explicado así: a las frecuencias altas, el tiempo necesario para que una burbuja que aparece como resultado de la cavitación crezca hasta un tamaño suficiente para afectar a la fase líquida es demasiado pequeño.

Solvente.

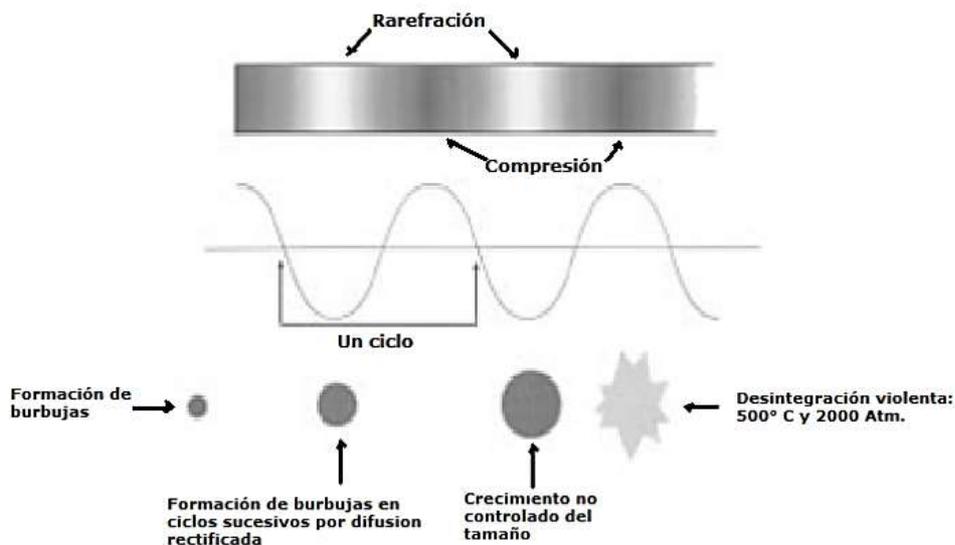
La cavitación produce efectos considerablemente menores en los líquidos viscosos o éstos en tensiones superficiales más altas.

Temperatura.

El aumento de la temperatura permite llevar a cabo la cavitación a intensidades acústicas más bajas. Esto es una consecuencia del aumento de la presión de vapor del solvente con el aumento de la temperatura.

---

<sup>50</sup> Mason, T.J. and Lorimer J.P. *Sonochemistry 1988: Theory, applications and uses of ultrasound in chemistry*: Ellis Horwood Limited. John Wiley y Sons. 251pp.



**Figura 12:** Propagación de una formación líquida de burbujas por la cavitación y su destrucción.

### Métodos de síntesis biológicos

Los químicos de procesos han reconocido desde hace mucho tiempo la necesidad de considerar métricas ambientales y económicas al desarrollar procesos que finalmente encontrarán aplicación en la fabricación de productos químicos. Más allá del uso de reactivos estequiométricos, la catálisis ofrece beneficios significativos y, en la actualidad, se está poniendo cada vez más énfasis en las reacciones químicas mediadas biológicamente, más generalmente denominadas bioconversión. El alcance de la bioconversión es muy amplio y resulta instructivo clasificar las bioconversiones en dos tipos principales. El



primer tipo es la bioconversión de células enteras asociada al crecimiento, que generalmente se define como fermentación. En tales casos, el reactivo (a menudo denominado sustrato) se utiliza para la producción del biocatalizador (y su mantenimiento), así como la reacción de interés, y además, la productividad se acopla a la tasa de crecimiento de las células (que puede ser bajo en fermentaciones aeróbicas). Por el contrario, los procesos biocatalíticos pueden definirse como aquellos en los que la producción del biocatalizador (enzima o célula "en reposo") y la etapa de conversión operan de forma independiente. En la actualidad, se han establecido procesos de fermentación para la producción de una variedad de productos (incluidos los aminoácidos de *Corynebacterium glutamicum* y *Escherichia coli* modificados). Otros productos incluyen ácido láctico, ácido succínico y ácido 3-hidroxiisovalérico, así como intentos recientes hacia el ácido itacónico y el ácido adípico.<sup>51</sup>

### Biocatálisis

La biocatálisis implica la implementación de catalizadores naturales, como enzimas, en lugar de catalizadores químicos en procesos sintéticos. En comparación con los catalizadores químicos, las enzimas ofrecen:<sup>52</sup>

---

<sup>51</sup> Sheldon, R. A., & Woodley, J. M. (2017). *Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry*. *Chemical Reviews*, 118(2), 801–838. doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00203

<sup>52</sup> Novozymes A/S. Lipases for biocatalysis for smarter chemical synthesis. Consultado el 28 de marzo de 2021. URL: [https://www.novozymes.com/.../Pharma/Biocatalysis\\_brochure\\_Li](https://www.novozymes.com/.../Pharma/Biocatalysis_brochure_Li)



- 
1. tasas de reacción más altas
  2. condiciones de reacción más suaves.
  3. alta especificidad de reacción sin productos secundarios

La biocatálisis, por supuesto, ha sido reconocida durante mucho tiempo como una importante herramienta sintética en la preparación de numerosos intermedios quirales y muchos de estos procesos ahora se llevan a cabo en un ámbito industrial.<sup>53</sup>

A su vez la biocatálisis se ha convertido en una herramienta cada vez más importante para los químicos médicos, los químicos de procesos y de polímeros, permitiendo el desarrollo de procesos sintéticos eficientes y altamente atractivos a escala industrial. El uso de enzimas en catálisis es una tecnología bien establecida dentro de la industria química. Una ventaja de las enzimas en la síntesis orgánica son sus notables propiedades selectivas, que brindan beneficios comerciales que incluyen:<sup>54</sup>

---

<sup>53</sup> Breen, G. F. 2004. *Enzymatic resolution of a secondary amine using novel acylating reagents.* *Tetrahedron: Asymmetry*, 15(9), 1427-1430. doi:10.1016/j.tetasy.2004.03.026

<sup>54</sup> Novozymes A/S. Lipases for biocatalysis for smarter chemical synthesis. Consultado el 28 de marzo de 2021. URL: [https://www.novozymes.com/.../Pharma/Biocatalysis\\_brochure\\_Li](https://www.novozymes.com/.../Pharma/Biocatalysis_brochure_Li)



1. alta selectividad en la producción de estereoisómeros individuales
2. menos reacciones secundarias
3. menos pasos de reprocesamiento y purificación
4. separación de productos más sencilla
5. menos polución.

Las enzimas como biocatalizadores ecológicos y sostenibles tienen ventajas incomparables a combinación de todas estas ventajas conduce a una reducción de costes. Por lo tanto, se cree que las enzimas son el sustituto perfecto de los catalizadores biomiméticos.<sup>55</sup> Las enzimas son proteínas que actúan como catalizadores. La mayoría de las enzimas disponibles comercialmente se extraen de hongos y bacterias.<sup>56</sup>

Los catalizadores enzimáticos funcionan reduciendo la energía de activación ( $E_a$ ) para una reacción, lo que aumenta drásticamente la velocidad de la reacción. Como resultado, los productos se forman más rápido y las reacciones alcanzan su estado de equilibrio en menor tiempo. La mayoría de las velocidades de reacción de las enzimas son

---

<sup>55</sup> S.-I. Shoda, H. Uyama, J.-I. Kadokawa, S. Kimura, S. Kobayashi, 2016. Enzymes as green catalysts for precision macromolecular synthesis, *Chem. Rev.* 116 (4) 2307–2413. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00472>

<sup>56</sup> Murillo, G., Sun, J., Ali, S. S., Yan, Y., Bartocci, P. 2018. *Evaluation of the kinematic viscosity in biodiesel production with waste vegetable oil, ultrasonic irradiation and enzymatic catalysis: A comparative study in two-reactors.* *Fuel*, 227, 448–456. doi:10.1016/j.fuel.2018.04.119



---

millones de veces más rápidas que las de reacciones no catalizadas comparables. Como ocurre con todos los catalizadores, las reacciones que catalizan no consumen enzimas ni alteran el equilibrio de estas reacciones. Sin embargo, las enzimas se diferencian de la mayoría de los demás catalizadores en que son muy específicas para sus sustratos.<sup>57</sup>

### Lipasas

Las lipasas (glicerol éster hidrolasas EC 3.1.1.3) constituyen un grupo especial de enzimas, cuya función biológica es catalizar la hidrólisis de triglicéridos en diglicéridos, monoglicéridos, ácidos grasos libres (FFA) y glicerol. Numerosos estudios demostraron que se observaron diferencias significativas en la actividad catalítica de la lipasa en términos de fuente, grado de pureza, estado (libre o inmovilizado), sustrato y medio de reacción (sin disolvente o bifásico).<sup>58</sup> Las reacciones catalizadas por lipasa ofrecen una vía ecológica para la síntesis de fármacos quirales enantioméricamente puros en comparación con los

---

<sup>57</sup> Novozymes A/S. Lipasas for biocatalysis for smarter chemical synthesis. Consultado el 28 de marzo de 2021. URL: [https://www.novozymes.com/.../Pharma/Biocatalysis\\_brochure\\_Li](https://www.novozymes.com/.../Pharma/Biocatalysis_brochure_Li)

<sup>58</sup> Liu, T., Liu, Y., Wang, X., Li, Q., Wang, J., & Yan, Y. 2011. *Improving catalytic performance of Burkholderia cepacia lipase immobilized on macroporous resin NKA. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 71(1-2), 45–50. doi:10.1016/j.molcatb.2011.03.007



---

métodos químicos convencionales. Muchas de estas reacciones son muy selectivas y pueden realizarse en condiciones de reacción muy suaves.<sup>59</sup>

Además, las lipasas son catalizadores bien establecidos en la síntesis orgánica hoy en día, porque son altamente estables y activas en disolventes orgánicos, y pueden catalizar una serie de biotransformaciones.<sup>60</sup>

Las moléculas de lipasa generalmente consisten en partes hidrofílicas e hidrofóbicas con activación interfacial, y el sitio catalítico está oculto bajo una hélice anfipática corta, que actúa como una “tapa” en interacciones hidrofóbicas. Las reacciones catalizadas por lipasa en medios no acuosos encuentran cada vez más aplicaciones en los campos de los aditivos alimentarios, productos farmacéuticos, aromas, materiales químicos y bioenergía.<sup>61</sup> Las fuentes más adecuadas para la producción de lipasa son los microorganismos que pueden producir lipasas de alta calidad a

---

<sup>59</sup> Gotor-Fernández, V., Brieva, R., Gotor, V. 2006. Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 40(3-4), 111–120. doi:10.1016/j.molcatb.2006.02.010

<sup>60</sup> Escorcía A. M., Molina, D., Daza M. C., Doerr M. 2013. *Acetylation of (R,S)-propranolol catalyzed by Candida antarctica lipase B: An experimental and computational study. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 98, 21–29. doi:10.1016/j.molcatb.2013.09.019

<sup>61</sup> Fu X., Zheng J., Ying X., Yan H., Wang Z. 2014. *Investigation of Lipozyme TL IM-catalyzed transesterification using ultraviolet spectrophotometric assay. Chinese Journal of Catalysis*, 35(4), 553–559. doi:10.1016/s1872-2067(14)60053-x



---

menor costo y menor tiempo. Los hongos son las fuentes más preferidas de lipasas debido a su estabilidad a diferentes temperaturas y pH7.

La purificación de enzimas permite la determinación exitosa de su secuencia de aminoácidos primaria y estructura tridimensional. Las preparaciones de lipasa purificada son necesarias en industrias que emplean enzimas para la producción biocatalítica de aditivos alimentarios, enzimas modificadoras del sabor, reactivos industriales, enzima hidrolizante de glicéridos, agentes quitamanchas, detergentes y aditivos, fármacos digestivos, enzimas de diagnóstico en aplicaciones médicas, nutracéuticos, tensioactivos y aditivos en cosméticos.<sup>62</sup>

Las lipasas son una de las clases de enzimas más utilizadas en biocatálisis. Las lipasas catalizan la hidrólisis de triacilgliceroles a diacilglicerol, monoacilglicerol, glicerol y ácidos grasos libres. La reacción se invierte en condiciones anhidras y la enzima es capaz de sintetizar nuevas moléculas por esterificación, alcoholisis y transesterificación. Todas las reacciones se pueden realizar con alta regio y enantioselectividad en condiciones de reacción suaves. Las lipasas se han utilizado en una variedad de sustratos y muestran una especificidad de sustrato muy amplia debido a la ubicuidad en la naturaleza y la heterogeneidad de las lipasas de

---

<sup>62</sup> Mehta, A., Grover, C., Bhardwaj, K. K., & Gupta, R. 2020. *Application of Lipase Purified from Aspergillus fumigatus in the Syntheses of Ethyl Acetate and Ethyl Lactate. Journal of Oleo Science*, 69(1), 23–29. doi:10.5650/jos.ess19202



diferentes fuentes.<sup>63</sup> Se ha demostrado que las Lipasas inmovilizadas (enzimas) en resinas mejoran las reacciones catalíticas de manera más eficaz que las lipasas libres.<sup>64</sup>

#### Lipasas en disolventes orgánicos<sup>65</sup>

Uno de los inconvenientes del uso de enzimas para síntesis orgánica es la escasa solubilidad de la mayoría de compuestos orgánicos con más de cuatro átomos de carbono cuando el proceso se realiza en agua. El agua es un mal disolvente para casi todas las aplicaciones de la química industrial, ya que muchos compuestos orgánicos a veces son inestables en solución acuosa. Además, la eliminación de agua es más tediosa y cara que cuando se utilizan disolventes orgánicos debido al menor punto de ebullición de ellos. El uso de disolventes orgánicos presenta varias ventajas, tales como:

1. Fácil recuperación del sustrato y un producto con alto rendimiento.

---

<sup>63</sup> Novozymes A/S. Lipases for biocatalysis, Obtenido el 29 de Marzo de 2021 de: [www.novozymes.com/-/media/Project/Novozymes/Website/website/document-li...](http://www.novozymes.com/-/media/Project/Novozymes/Website/website/document-li...) - Bing

<sup>64</sup> Liu T., Liu Y., Wang X., Li Q., Wang J., Yan Y. 2011. *Improving catalytic performance of Burkholderia cepacia lipase immobilized on macroporous resin NKA. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 71(1-2), 45–50. doi:10.1016/j.molcatb.2011.03.007

<sup>65</sup> Carrea G, Riva S. . 2000. *Properties and Synthetic Applications of Enzymes in Organic Solvents*. *Angew Chem Int Ed Engl* (13):2226-2254. PMID: 10941056. DOI: [10.1002/1521-3773\(20000703\)39:133.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20000703)39:133.0.CO;2-L)



- 
2. Es posible utilizar sustratos no polares.
  3. Evita reacciones secundarias.
  4. En muchos casos, la lipasa es termodinámicamente más activa.
  5. Cambio del equilibrio termodinámico para favorecer la síntesis sobre la hidrólisis. producto con alto rendimiento.
  6. Es posible utilizar sustratos no polares.
  7. Evita reacciones secundarias.
  8. En muchos casos, la lipasa es termodinámicamente más activa.
  9. Cambio del equilibrio termodinámico para favorecer la síntesis sobre la hidrólisis

La biocatálisis en medios no acuosos ha sido ampliamente utilizada para la resolución de alcoholes, ácidos o lactonas mediante reacciones de transesterificación enzimática utilizando diferentes lipasas. Además, otros procesos como la acilación enzimática de aminas o amoníaco, han demostrado ser de gran utilidad para la resolución de aminas y la preparación de amidas quirales. El mecanismo de estos procesos se conoce como mecanismo serina-hidrolasa, que es común para la hidrólisis de ésteres, y también para procesos enzimáticos de transesterificación, aminólisis, hidrazinólisis y también perhidrólisis de



---

ésteres, en los que el agua nucleófila natural se reemplaza por un alcohol, amina, amoníaco, hidracina o hidroperóxido.<sup>66</sup>

#### Aplicaciones de las Lipasas.<sup>67</sup>

Los catalizadores de lipasa se utilizan en aplicaciones industriales y las transformaciones químicas incluyen:

1. Resolución enantioselectiva de ésteres y amidas
2. Acilación de alcoholes y aminas para formar ésteres y amidas
3. Hidrólisis o acilación suave de sustratos sensibles
4. Resolución cinética por transesterificación de alcoholes racémicos
5. Resolución cinética por hidrólisis de éster racémico
6. Desimetrización de diésteres

#### Lipozyme® TL

Lipozyme® TL es una lipasa específica 1,3 procedente de *Thermomyces lanuginosus*. Es un catalizador muy eficaz para la transesterificación, interesterificación, hidrólisis de ésteres y desimetrización de ésteres. Lipozyme® TL exhibe un alto grado de selectividad de sustrato que

---

<sup>66</sup> Gotor-Fernández V., Brieva R., Gotor V. 2006. *Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 40(3-4), 111-120. doi:10.1016/j.molcatb.2006.02.010

<sup>67</sup> Novozymes A/S. Lipases for biocatalysis, Obtenido el 29 de Marzo de 2021 de: [www.novozymes.com/-/media/Project/Novozymes/Website/website/document-li... - Bing](http://www.novozymes.com/-/media/Project/Novozymes/Website/website/document-li... - Bing)



---

permite cadenas laterales voluminosas / grupos grandes en la parte de alcohol y ácido de la molécula. Un uso de Lipozyme® TL es en la fabricación comercial de pregabalina. El paso clave de la síntesis es la resolución enzimática de un éster ciano dietílico racémico (CNDE) para producir el enantiómero monoácido deseado. En esta aplicación, Lipozyme®TL se desempeña bien en actividad y enantioselectividad.<sup>68</sup>

Lipozyme TL IM es una enzima versátil y ha sido ampliamente utilizada en procesos industriales y pruebas de laboratorio, particularmente en la interesterificación de grasas a granel y la producción de grasas para freír, porque es económica y está disponible comercialmente.<sup>69</sup>

---

<sup>68</sup> Novozymes A/S. Lipases for biocatalysis, Obtenido el 29 de Marzo de 2021 de: [www.novozymes.com/-/media/Project/Novozymes/Website/website/document-li...](http://www.novozymes.com/-/media/Project/Novozymes/Website/website/document-li...) - Bing

<sup>69</sup> Fu X., Zheng J., Ying X., Yan H., & Wang Z. 2014. *Investigation of Lipozyme TL IM-catalyzed transesterification using ultraviolet spectrophotometric assay*. *Chinese Journal of Catalysis*, 35(4), 553–559. doi:10.1016/s1872-2067(14)60053-x



---

## Novozym 435

La Novozym 435, lipasa B comercial de *Candida antarctica* inmovilizada en una resina acrílica macroporosa, se utiliza como lipasa inmovilizada<sup>70</sup> por lo regular sobre una resina macroporosa acrílica.<sup>71</sup>

## Métodos de síntesis electroquímicos

Durante las últimas décadas, se han explorado miles de nuevas estrategias sintéticas en química orgánica con la fuerza impulsada del requisito y el interés tanto de la ciencia química como de la industria.

La síntesis orgánica electroquímica (SOE) siempre se ha empleado como un procedimiento general y sostenible con los criterios de la química verde. Más importante aún, en comparación con los métodos redox tradicionales, SOE exhibe ventajas únicas:

1. el uso de electrones como reactivos redox evita o reduce la utilización de reactivos químicos tradicionales, lo cual está en línea con el concepto de química ambientalmente amigable.
2. la reacción se puede ajustar arbitrariamente mediante las aplicaciones de potencial y corriente para realizar el control de la

---

<sup>70</sup> Hama S., Yoshida A., Tamadani N., Noda H., Kondo A. 2013. *Enzymatic production of biodiesel from waste cooking oil in a packed-bed reactor: An engineering approach to separation of hydrophilic impurities. Bioresource Technology, 135, 417–421. doi:10.1016/j.biortech.2012.06.059*

<sup>71</sup> Hvidsten B. I., Machetti. M. J. 2020, Novozym® 435 as bio-catalyst in the synthesis of methyl laurate, Energy Conversion and Management. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecmx.2020.100061>



- selectividad de la reacción, la velocidad de reacción y el grado de conversión del sustrato.
3. la polaridad de algunos grupos funcionales se invierte mediante la transferencia de electrones para lograr la selectividad de reacción, que no está disponible en los métodos tradicionales.

En la última década, SOE ha logrado un gran progreso, sin embargo, hay pocos informes sobre síntesis orgánica electroquímica asimétrica, especialmente con el logro de alta enantioselectividad.<sup>72</sup>

Mediante la acción de la electricidad se puede omitir en parte o incluso completamente la necesidad de grupos salientes, catalizadores metálicos, oxidantes estequiométricos o agentes reductores. La sustitución de los reactivos convencionales por electricidad sostenible no solo será benigna para el medio ambiente, sino que también permitirá importantes atajos en la síntesis electroquímica. Además, esta metodología puede considerarse intrínsecamente segura. La encuesta actual está organizada en conversiones catódicas y anódicas, así como por el número de grupos salientes involucrados. En algunas electroconversiones, los reactivos utilizados se regeneran en el electrodo, mientras que en otras electrotransformaciones se aprovechan

---

<sup>72</sup> Li, H., Xue, Y., Ge, Q., Liu, M., Cong, H. and Tao, Z., 2021. *Chiral electroorganic chemistry: An interdisciplinary research across electrocatalysis and asymmetric synthesis*. *Molecular Catalysis*, 499, p.111296. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2020.111296>



---

las secuencias de radicales libres para proporcionar un proceso altamente sostenible.<sup>73</sup>

### Electrocatalisis

La electrocatalisis y la catalisis heterogénea siguen algunos principios comunes en el transporte de reactivos a los sitios activos. La catalisis heterogénea proporciona información detallada sobre el mecanismo de reacción en la interfaz gas / sólido aprovechando las técnicas de espectroscopia en comparación con el mecanismo más complejo en los límites de triple fase para electrocatalizadores donde el reactivo, el electrón y los sitios activos están en contacto.

La electrocatalisis y la catalisis heterogénea están estrechamente relacionadas porque implican secuencias bien controladas de procesos elementales de ruptura y formación de enlaces y comparten muchos principios mecanicistas comunes en la transformación de moléculas sobre catalizadores de metales y óxidos metálicos soportados. Si bien existen muchas áreas de sinergia entre los dos, incluidos los materiales

---

<sup>73</sup> Siegfried R. Waldvogel, Sebastian Lips, Maximilian Selt, Barbara Riehl, and Christopher J. Kampf. 2018 *Chemical Reviews, Electrochemical Arylation Reaction* 118 (14), 6706-6765 DOI: 10.1021/acs.chemrev.8b00233



---

que se utilizan y las vías y mecanismos de reacción disponibles, también existen diferencias bien establecidas.<sup>74</sup>

Los electrocatalizadores participan en reacciones electroquímicas al facilitar la transferencia de electrones entre los reactivos y el electrodo, es decir, el uso directo de electrones (DUE) para permitir una transformación química.

Desarrollar procesos más eficientes es fundamental para salvaguardar el desarrollo económico sostenible. La catálisis heterogénea convencional se basa en la temperatura como fuente de energía. Por el contrario, la electrocatálisis utiliza el sobrepotencial aplicado para lograr la energía de activación requerida para la reacción deseada. El DUE tiene varias ventajas en comparación con los catalizadores heterogéneos, tales como:

1. La facilidad de control (encendido y apagado a través del control de voltaje / corriente).
2. Integración directa con fuentes de energía renovables que se alinean con la electrificación (que los autores se refieren como la transición a tecnologías impulsadas eléctricamente).

---

<sup>74</sup> Wieckowski, A., & Neurock, M. 2011. *Contrast and Synergy between Electrocatalysis and Heterogeneous Catalysis. Advances in Physical Chemistry, 2011, 1–18.* doi:10.1155/2011/907129



3. Temperaturas de operación bajas a intermedias, lo que permite una mayor flexibilidad en los materiales utilizados para el diseño de la carcasa / reactor.
4. Exigir una separación mínima o nula de productos y reactivos.
5. La naturaleza modular de los reactores DUE típicos (por ejemplo, agregar pilas de celdas individuales al sistema para aumentar la capacidad / producción).

Los elementos activos utilizados tanto en heterogéneos como en electrocatálisis son los mismos en algunos casos. Por ejemplo, el Pt se utiliza ampliamente como electrocatalizador para la reducción de oxígeno y la oxidación del alcohol, así como como catalizador heterogéneo para la hidrogenación de hidrocarburos en la conversión de petróleo. Sin embargo, cuando se aplica un potencial, puede tener lugar una transformación química reversible en el material del catalizador, que a veces no se observa con un cambio de temperatura.<sup>75</sup>

### Reacciones de Acetilación

Las reacciones de acetilación introducen un grupo funcional acetilo en un compuesto químico. Dichos compuestos se denominan ésteres de acetato o acetatos. Las reacciones de acetilación ocurren dentro de las

---

<sup>75</sup> Yazdani A., Botte G. 2020. *Perspectives of electrocatalysis in the chemical industry: a platform for energy storage. Current Opinion in Chemical Engineering*, 29, 89–95. doi:10.1016/j.coche.2020.07.003



---

células vivas como biotransformación de fármacos, por enzimas en el hígado y otros órganos. Los productos farmacéuticos emplean con frecuencia la acetilación para permitir que dichos ésteres atraviesen la barrera hematoencefálica.

Entre las reacciones catalizadas por lipasa más frecuentemente estudiadas se encuentra la acilación enantioselectiva de aminas racémicas y alcoholes secundarios en disolventes orgánicos utilizando acetato de vinilo o etilo como donante de acilo. Por el contrario, la acilación de los aminoalcoholes catalizada por lipasa se ha estudiado menos y ha ganado atención recientemente. En particular, la quimioselectividad de estas reacciones aún no se comprende completamente. Se ha sugerido que la *N*-acilación quimioselectiva catalizada por lipasa de aminoalcoholes de cadena corta como etanolamina, serina y 3-amino-1-propanol procede a través de la *O*-acilación inicial seguida de una migración espontánea de *O* a *N*-acilo

En general, las lipasas catalizan la *N*- u *O*-acilación de aminoalcoholes con una quimioselectividad que depende de la estructura del aminoalcohol, el disolvente, el donante de acilo y el tipo de lipasa utilizada como biocatalizador

*Pseudomonas SPP* ha demostrado que la lipasa, por ejemplo, cataliza la acilación *O*-selectiva de 2-amino-1-feniletanoles en disolventes de éter utilizando acetato de vinilo como donante de acilo. La *N*- y *O*-acilación de



---

propranolol catalizada por lipasa también se ha investigado utilizando diferentes lipasas (pero no CalB) y disolventes (cloroformo, tolueno y diisopropiléter), utilizando diferentes carboxilatos de divinilo como donantes de acilo. Se encontró que normalmente se favorece la *N*-acilación sobre la *O*-acilación, pero la selectividad depende del tipo de lipasa y del disolvente en el que se realiza la reacción.<sup>76</sup>

### Acetilación de Aminas

El estudio de la acetilación de aminas es de gran interés por la utilidad, dentro de la industria química, de las amidas, productos de reacción, sobre todo las aril amidas empleadas por su actividad biológica como analgésicos y antiinflamatorios.<sup>77</sup> Además constituye una de las transformaciones más frecuentemente usadas en síntesis orgánica, ya que proporciona un medio eficiente y económico para la protección del grupo amino en un proceso sintético. Han sido reportados estudios sobre empleo de amidas en la síntesis de productos químicos como por ejemplo insecticidas ambientalmente benignos e investigaciones sobre la protección del grupo amino en la síntesis de proteínas y síntesis de péptidos. La acetilación de una amina es una reacción de sustitución

---

<sup>76</sup> Escorcía A. M., Molina D., Daza M., Doerr M. 2013. *Acetylation of (R,S)-propranolol catalyzed by Candida antarctica lipase B: An experimental and computational study. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 98, 21–29. doi:10.1016/j.molcatb.2013.09.019

<sup>77</sup> Kushwaha N., Saini K.S. Kushwaha, 2011 Synthesis of some Amide derivatives and their Biological activity, Int. J. ChemTech Res.: 3 (1), 203-209



nucleofílica sobre carbono insaturado, siendo el nucleófilo la propia amina. Dicha reacción se puede llevar a cabo con cloruro de acetilo, con el agregado de una base, con acetato de amonio en ácido acético, ácido de Brønsted o con el agregado de un ácido de Lewis. El mecanismo de la acetilación consiste en un ataque de la amina al carbono del carbonilo del anhídrido acético, formando un intermediario tetraédrico, etapa determinante de la velocidad de reacción. Se han realizado estudios teóricos sobre la reacción de acetilación de aril aminas empleando el método DFT y trabajos experimentales sobre la reacción de acetilación de diferentes aminas con anhídrido acético y ambos coinciden en que la misma transcurre a través de la formación de un intermediario tetraédrico.<sup>78</sup>

La acetilación de aminas con anhídrido acético es una reacción de sustitución nucleofílica sobre carbono insaturado, donde el nucleófilo es la propia amina. El aumento de la velocidad de reacción se puede conseguir con el agregado de un catalizador, como una base.<sup>79</sup>

---

<sup>78</sup> Caglieri S. C., Macaño H. R. 2016. *Acetilación de Aminas Alifáticas y Aromáticas: Estudio Teórico. Información Tecnológica*, 27(2), 105–110. doi:10.4067/s0718-07642016000200013

<sup>79</sup> Claudia-Caglieri S., Rubén-Macaño H. 2018. *Reactividad de aminas en la acetilación catalizada por ácidos de Lewis e influencia de solventes: estudio teórico. Ingeniería, Investigación y Tecnología*, 19(2), 239–244. doi:10.22201/fi.25940732e.2018.19n2.020



---

### Acetilación de alcoholes

El estudio de la acetilación de alcoholes, dentro de la industria química, es de gran interés, por la utilidad de sus productos de reacción, los ésteres de lactosa para la formulación de aditivos para alimentos y aplicaciones médicas los ésteres de ascorbilo para su empleo como antioxidantes y surfactantes y los ésteres en general como materias primas para la síntesis de poliésteres.<sup>80</sup>

Además constituye una de las transformaciones más frecuentemente usadas en síntesis orgánica, ya que proporciona un medio eficiente y económico para la protección del grupo hidroxilo en un proceso sintético.<sup>81</sup>

La acetilación de un alcohol es una reacción de sustitución nucleofílica sobre carbono insaturado, siendo el nucleófilo el propio alcohol. Dicha reacción se puede llevar a cabo con cloruro de acetilo, con el agregado de una base, con anhídrido acético y acetato de sodio en presencia de un ácido de Brønsted o con el agregado de un ácido de Lewis. El mecanismo de la acetilación consiste en un ataque del alcohol al carbono del carbonilo del anhídrido acético, formando un intermediario tetraédrico,

---

<sup>80</sup> Kobayashi, S. 2015. "Enzymatic ring-opening polymerization and polycondensation for the green synthesis of polyesters". *Polymers for Advanced Technologies*. 26 (7), 677-686. ISSN: 1042-7147

<sup>81</sup> Adinolfi, M. et al. 2003 "An easy approach for the acetylation of saccharidic alcohols. Applicability for regioselective protections". *Tetrahedron Letters*. 44, 4661-4663. ISSN: 0040-4039



---

etapa determinante de la velocidad de reacción. Se han llevado a cabo estudios teóricos sobre la reacción de acetilación de metanol con anhídrido acético y trabajos experimentales sobre la reacción de acetilación de diferentes alcoholes con el mismo reactivo y ambos coinciden en que la misma transcurre a través de la formación de un intermediario tetraédrico.<sup>82</sup>

## Hipótesis

La biotransformación de xenobióticos en humanos y animales tiene la finalidad de modificar su estructura para facilitar su eliminación. Los metabolitos o productos formados pueden ser entonces indicativos de la presencia de un xenobioticos en el organismo.

Al respecto el clenbuterol es empleado de manera ilícita para la producción de ganado destinado a consumo humano, por lo que el consumo de carne contaminada con esta sustancia puede conducir a problemas de salud. En el ámbito deportivo, esta sustancia cobra mayor relevancia ya que un atleta puede consumir carne con clenbuterol y arrojar un resultado analítico adverso, con las consecuentes repercusiones en su vida deportiva.

---

<sup>82</sup> Yadav, V. K.; Babu, K. G.; Mittal, M. 2001. *"KF-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> is an Efficient Solid Support Reagent for the Acetylation of Alcohols and Amines. Impeding Effect of Solvent on the Reaction Rate"*. Tetrahedron. 57 (32), 7047-7051. ISSN: 0040-4020



---

Por lo que si se sintetiza y caracteriza un potencial metabolito del clembuterol como los compuestos *N*-Acetil y *O*-Acetil y *N,O*-Acetil, entonces estos podrán ser empleados como sustancias de referencia para una posible identificación y elucidación del consumo o exposición oral del organismo al Clembuterol.

## Objetivos

### Objetivo general

Llevar a cabo la obtención del producto *O*-Acetil así como *N*-Acetil a partir del clembuterol, mediante el empleo de estrategias sintéticas basadas en irradiación de microondas, irradiación infrarroja, ultrasonido, electro síntesis, así como del uso de Lipasa B de *Candida antarctica*, los cuales pueden ser usado como material de referencia, en el esclarecimiento de su vía de entrada al organismo.

### Objetivos particulares

1. Llevar a cabo la síntesis de los compuestos de interés mediante el empleo de fuentes alternas de activación como son: microondas, infrarrojo, ultrasonido y electrosíntesis.
2. Promover la obtención de los productos mediante un proceso biocatalítico promovido por Lipasa B de *Candida antártica*.
3. Caracterizar por medio de los datos de espectrometría de masas, Infrarrojo y Cromatografía los derivados acetilados *O*- Y *N*-acetil del clembuterol.



- 
4. Sintetizar los productos de interés a partir del clembuterol usando un proceso de acetilación Anhídrido acético/piridina.

## Parte experimental

### Reactivos y materiales

Los reactivos empleados: Piridina anhidra RA (99.8 %), Carbonato de cesio RA (99 %) y Bromuro de tetrabutilamonio RA (99 %) se adquirieron con Sigma-Aldrich y se utilizaron sin ningún tratamiento previo. El Bromuro de potasio RA (99 %), Cloruro de sodio RA (99 %) y el Sulfato de sodio anhidro fueron adquiridos con Reactivos J.T. Baker. Mientras el Anhídrido acético (97 %) se adquirió con Productos químicos Monterrey.

Los disolventes utilizados para realizar las reacciones fueron Acetato de etilo (99 %), Metanol (99.8 %), Hexano (98.5 %) fueron marca Reactivos Química Mayer. El Cloroformo utilizado fue grado HPLC de la marca Fisher Chemical, los disolventes que se utilizaron no se les realiza ningún tratamiento previo.

La Lipasa B de *Candida antarctica* Novozym 435 y Lipozyme TL fueron adquiridas en la empresa Novozymes, no recibieron ningún tratamiento previo.

El monitoreo de las reacciones se realizó por Cromatografía de Capa Fina (ccf), utilizando placas de sílica gel con fluorescente de la marca Sigma-



---

Aldrich, se empleando una luz UV (254 nm) y vapores de yodo como revelador.

La purificación de los productos obtenidos se realizó por medio de cromatografía en columna, empleando como fase estacionaria 60 g silica gel marca MN Kieselgel 60 de tamaño 0.04-0.063 mm, y como fase móvil 700 mL de una mezcla 9:1 Acetato de Etilo:Metanol.

### Equipos

Para la activación por Microondas se utiliza el CEM Discover microwave modelo 908005.

Para la reacción promovida por Ultrasonido, se utilizó un baño Ultrasónico de la marca Branson modelo 1510, su tanque fue llenado con agua destilada.

Para la reacción promovida por energía infrarroja se utilizó el equipo de infrarrojo que consiste en un equipo microondas dotado con foco de luz infrarroja General Electrics de 235 W y 125 V con una entrada para corriente.

Para el proceso promovido por electrosíntesis se utilizaron dos electrodos de grafito y una fuente de poder.

Para en análisis de IR se utilizó un espectrofotómetro Infrarrojo Marca BRUKER Tensor 37 Técnica de ATR.



---

Paralos análisis por GC-MS se utilizó un espectro de masas adquirido por ionización electrónica adquirido en un equipo de CG/EM marca Agilent Technologies 3Q Modelo 7010B (IE). Los datos del método de adquisición y de las condiciones del equipo se encuentran en el anexo 1.

### Procedimiento experimental

#### Acetilación de Clembuterol usando Microondas

De pesaron en la balanza analítica 200 mg de clembuterol RA y se colocaron en un matraz de bola de 100mL previsto con una barra de agitación, se adicionan 10 mL de Cloroformo y 0.2 mL de Piridina anhidra, posteriormente se añaden a la mezcla de reacción 2 mL de Anhídrido acético y se colocan en el microondas químico durante 60 minutos a 100°C y 300 Watts. La reacción se monitorea por *ccf* con una fase móvil 9:1 Acetato de etilo: Metanol.

Transcurrido el tiempo de reacción, la mezcla se transfiere a un embudo de separación, y se realiza una extracción líquido- líquido con 10 mL de agua destilada, por triplicado. Los productos obtenidos se purifican por medio de cromatografía de columna.



**Figura 13.** Reacción de activación por microondas en el equipo de microondas.

### Acetilación de Clembuterol mediante el empleo de Ultrasonido como activación

Se pesaron 200 mg de clembuterol RA y se colocan en un matraz de bola de 100 mL, se adicionan 10 mL de cloroformo, 0.2 mL de piridina anhidra y 2 mL de anhídrido acético RA, la mezcla de reacción se coloca en la cuba ultrasónica del equipo por una hora a 70°C. La reacción se monitorea por *ccf* usando una fase móvil 9:1 Acetato de etilo:Metanol



Transcurrido el tiempo de reacción la mezcla se transfiera a un embudo de separación y se realiza una extracción líquido-líquido con 10 mL de agua destilada y por triplicado. Los productos de la fase orgánica se purifican por cromatografía en columna, se recuperan y se colocan en el refrigerador.



**Figura 14.** Reacción activada por ultrasonido en la caba ultrasónica

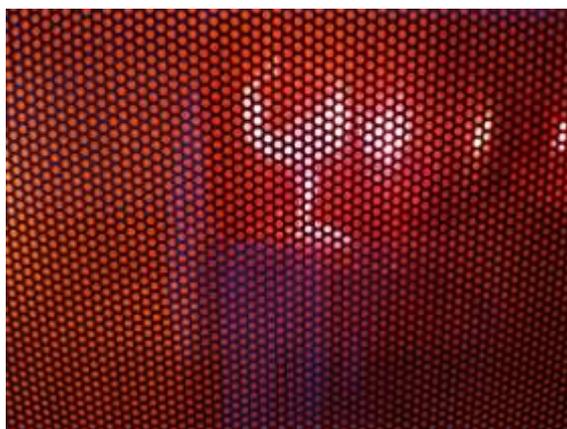
#### Acetilación de Clembuterol mediante el empleo de energía Infrarroja.

Se pesaron 200 mg de clembuterol RA y de colocan en un matraz de bola de 100mL previsto con una barra de agitación magnética, se adicionan 10 mL de cloroformo, 0.2 mL de piridina anhidra y 2 mL de anhídrido



acético, la mezcla de reacción se coloca en el equipo de irradiación infrarroja por una hora con agitación constante y vigorosa.

Transcurrido el tiempo de reacción la mezcla se transfiere a un embudo de separación y se realiza una extracción líquido-líquido, los productos de la fase orgánica se purifica mediante una cromatografía en columna, se recuperan los productos y se colocan en el refrigerador. La reacción se monitorea todo momento por *ccf* con una fase móvil 9:1 Acetato de Etilo: Metanol.



**Figura 15.** Reacción activada mediante infrarrojo.

[Acetilación de Clembuterol mediante el empleo de Novozym 435.](#)

Se pesaron 200 mg de clembuterol y se colocan en un vial ámbar de 100 mL con tapa y previsto con una barra de agitación magnética, se le adicionan 10 mL de Acetato de Etilo previamente secado con sulfato de



sodio anhidro así como 200mg de Lipasa B de *Candida antarctica* (Novozym 435), la mezcla se coloca en un baño de arena a 70 °C y con agitación durante 8 días. La reacción se monitorea por *ccf* con una fase móvil 9:1 Acetato de Etilo:Metanol. La mezcla de reacción se transfiere a un embudo de separación y se realiza una extracción líquido-líquido con 10 mL de agua destilada por triplicado, la fase orgánica se seca con sulfato de sodio anhidro y se purifica los productos presentes en esta mediante cromatografía en columna, se recuperan los productos y se colocan en el refrigerador.



**Figura 16.** Reacción empleando Novozym 435

#### Acetilación de Clenbuterol por medio de electrosíntesis.

Se pesaron 235 mg de Carbonato de cesio y se disuelven con 10 mL de agua destilada en un vaso de precipitado de 50mL previsto con una barra



de agitación magnética, se agregan 85 mg de bromuro de potasio RA y 200 mg de clenbuterol RA y se coloca en agitación vigorosa por 20 minutos, después se agregan 232 mg de Bromuro de tetrabutilamino y 2 mL de Anhídrido acético. Se sumergen los electrodos en la solución y se hace pasar corriente eléctrica de 50mV durante una hora. La reacción se monitorea por *ccf* con una fase móvil 9:1 Acetato de etilo:Metanol .



**Figura 17.** Reacción empleando electrosíntesis con electrodos de grafito.

A transcurrir el tiempo de reacción, se retiran los electrodos y el contenido del vaso se coloca en un embudo de separación y se realiza



---

una extracción líquido-líquido con 10 mL de Acetato de etilo por triplicado, los productos presentes en fase orgánica se purifican por cromatografía en columna, se recuperan y se colocan en un recipiente con tapa en el refrigerador.

#### Acetilación del clenbuterol mediante un método tradicional de reflujo.

En un matraz de bola de 100 mL previsto con una barra de agitación magnética, se colocaron 200 mg de clenbuterol RA, se mezclaron con 10 mL de Cloroformo posteriormente se agregaron 0.2 mL de Piridina anhidra, la mezcla se dejó en agitación durante 10 min, posteriormente se agregaron 2 mL de Anhídrido acético R.A., la mezcla de reacción se coloca a reflujo a temperatura de 85°C y con agitación vigorosa durante 120 min.

La reacción se monitorea mediante *ccf*, empleando una fase móvil 9:1 Acetato de etilo:Metanol .



La mezcla de reacción contenida en el matraz se colocó en un embudo de separación y se realiza una extracción Líquido-líquido con 10 mL de agua, por triplicado, la fase orgánica se purifica por medio de cromatografía de columna, se recuperan los productos y se colocan en el refrigerador.



**Figura 18.** Reacción empleando energía térmica en condiciones de reflujo.



---

## Resultados y discusión

Como ya se mencionó, se llevó a cabo la síntesis de los derivados *O*- y *N*-Acetil a partir de la molécula de clenbuterol, para lo cual se emplearon cuatro métodos promovidos por diferentes tipos de energía de activación como lo fueron las microondas, el infrarrojo, el ultrasonido y la electrosíntesis, así mismo se utilizó una reacción promovida por la Lipasa B de *Candida antarctica* (Novozym 435). Adicionalmente, se llevó a cabo la reacción de acetilación, empleando anhídrido acético/Piridina en condiciones de reflujo.

A continuación, y de manera gráfica se muestran los productos de acetilación que se generaron en este trabajo de tesis. Es importante mencionar que se discutirán y analizarán a detalle los resultados obtenidos de la reacción promovida por microondas y reflujo, como ejemplo, el resto de los experimentos y sus productos, sólo se discutirán empleando los datos obtenidos por espectrometría de masas, ya que al análisis es similar.

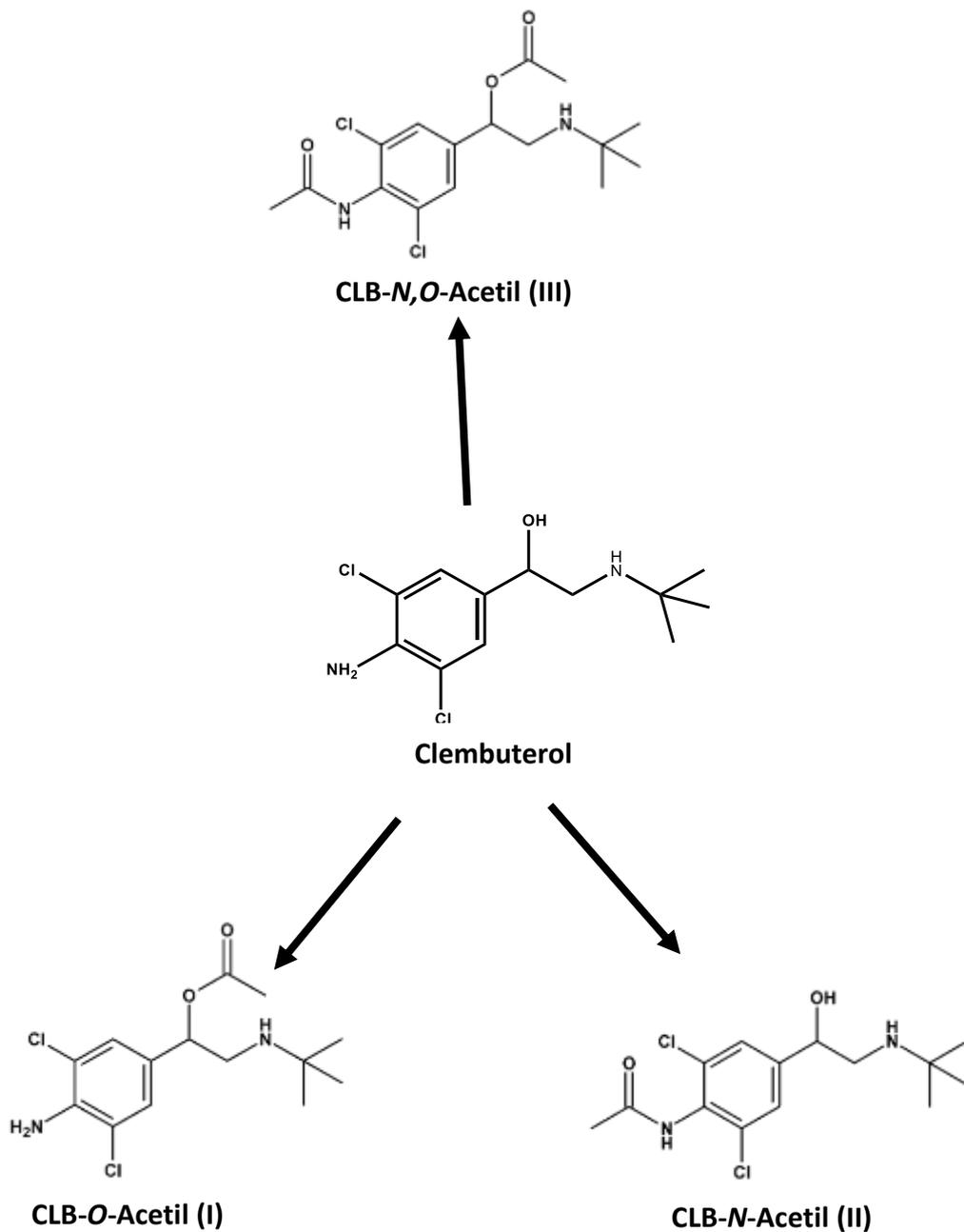


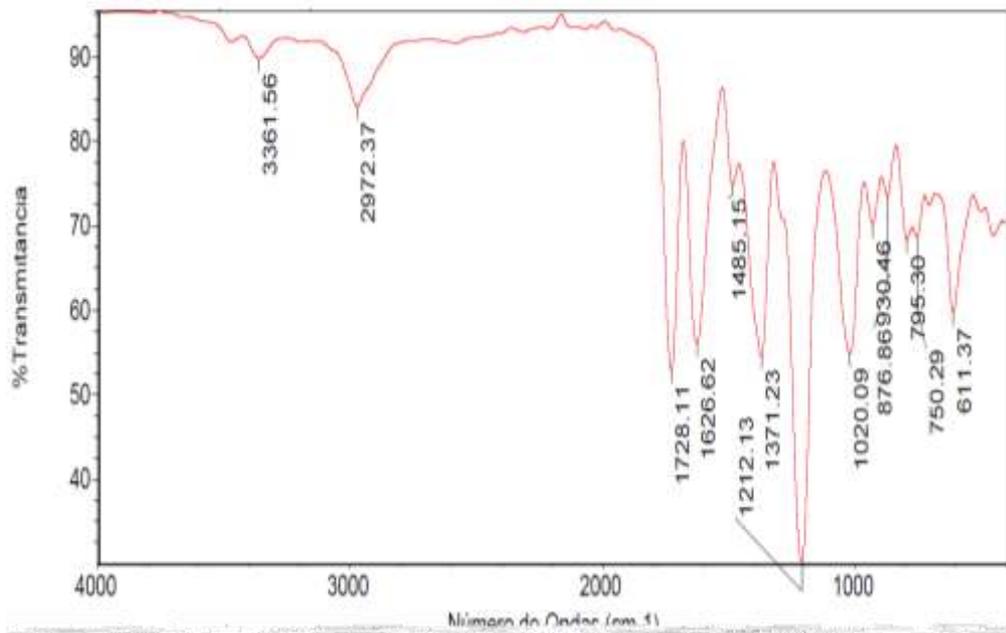
Figura 19. Productos de acetilación del clembuterol.



---

Como ya se indicó anteriormente, el objetivo de este trabajo de tesis, fue la obtención los derivados acetilados a partir de la molécula de clenbuterol, en donde existen dos potenciales grupos funcionales que pueden presentar esta modificación. En este sentido, y para tener una referencia de los productos objetivo, se llevó a cabo una reacción en condiciones de reflujo empleando anhídrido acético y Piridina en donde se generó un producto de diacetilación tanto en el grupo  $-OH$  como en el grupo  $-NH_2$ , el cual fue confirmado con base en el siguiente análisis de sus datos espectroscópicos.

En el espectro 1 de IR adquirido por la técnica de ATR, se observa una banda en  $1626\text{ cm}^{-1}$ , la cual se asignó al compuesto *N*-cetilado presente en el anillo aromático, ya que esta región es consistente con la formación de una amida de tipo secundaria, así mismo se observa una banda intensa en  $1728\text{ cm}^{-1}$  la cual fue asignada al sistema carbonilo del éster obtenido a partir de la función hidroxilo, además se observa el sobretono característico de carbonilo en  $3478\text{ cm}^{-1}$ .

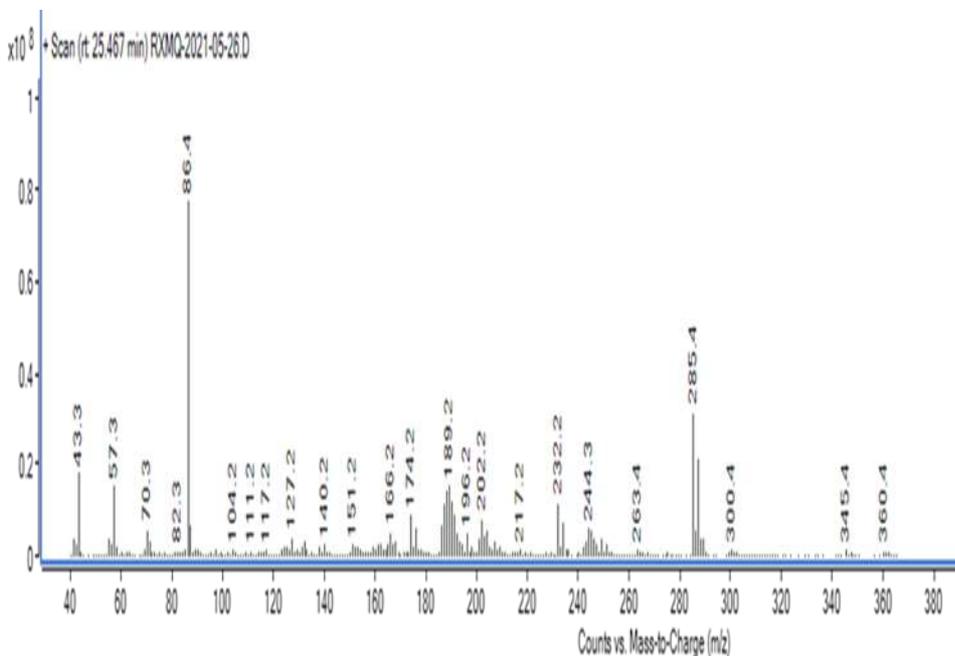


**Especto 1.-** Espectro de IR adquirido por ATR, de producto crudo de la reacción promovida por reflujo.

En el espectro de masas de esta misma reacción (*Espectro 2*), se observa un fragmento de  $m/z=360$  que fue consistente con el peso molecular de la molécula diacetilada (**III**), de acuerdo a las estructuras mostradas en la Figura 20, por lo que se asigna como el ion molecular  $[M]^+$ . En este mismo espectro se observa un fragmento  $m/z=345$  el cual es consistente con la pérdida de quince unidades que puede ser asignada a un metilo  $[M - 15]^+$ , además se observa un fragmento  $m/z=300$  el cual se explica



por la pérdida de un fragmento de  $m/z=60$  que puede ser asociado aun acetilo, así como un fragmento de  $m/z=285$  obtenido de [300-15].



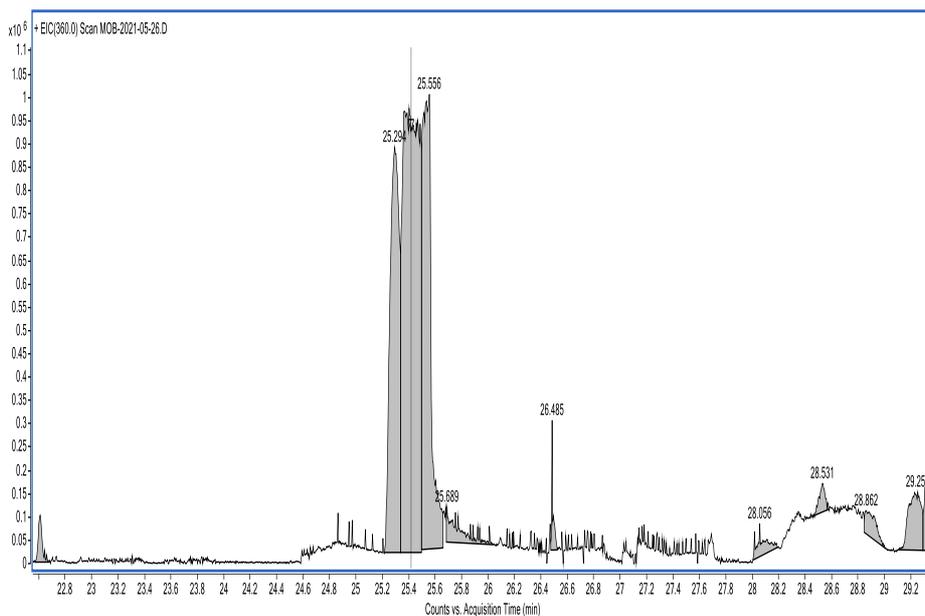
**Espectro 2.-** Espectro de masas (IE) del producto de reacción de acetilación promovida por reflujo.

A continuación, y a manera de ejemplo se analizará la reacción de acetilación promovida por microondas. Es importante resaltar que el extracto crudo se purifico por medio de cromatografía en columna de acuerdo a lo descrito en la metodología. Cada uno de Las fracciones



obtenidos (A y C), se analizaron por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas.

En el cromatograma de gases de la fracción “B”, se observa un pico de mayor abundancia en 25.56 minutos.

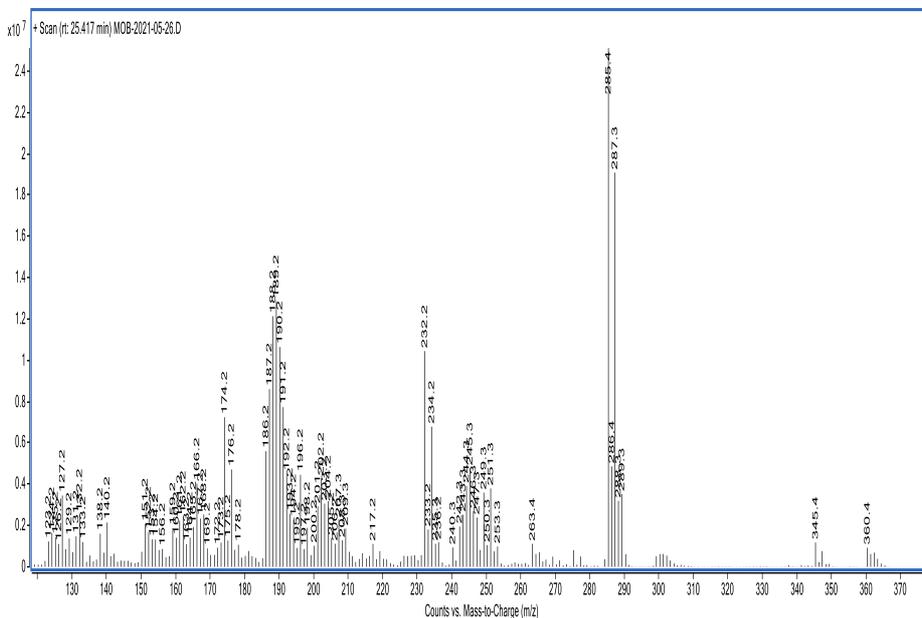


**Cromatograma 1.-** Cromatograma de GC, de la fracción “B” de la reacción de acetilación promovida por microondas.

Al adquirir el correspondiente espectro de masas por ionización electrónica, se observó la presencia de un fragmento de  $m/z$  360, el cual



fue asignado al ion molecular  $[M]^+$ , debido a que es consistente con el peso molecular del clenbuterol diacetilado (III).



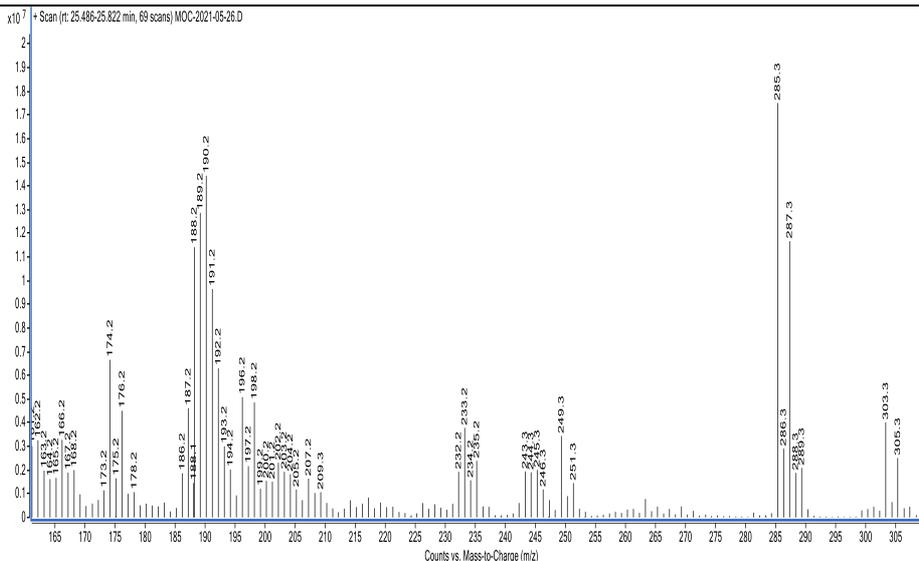
**Espectro 3.-** Espectro de masas (IE) obtenido del pico cromatográfico a 25.54 min.

Adicionalmente, se observa un fragmento de  $m/z=345$   $[M-15]$ , el cual puede ser asignado a la pérdida de un metilo (rompimiento  $\alpha$ -carbonilo), de uno de los acetatos, además se observa un fragmento  $m/z=285$ , que se propone para la escisión de un fragmento  $m/z$  60 consistente para la pérdida de un grupo acetato.



---

El espectro de IR del extracto crudo, revela la presencia de un compuesto diacetilado, ya que al analizar éste con el obtenido en condiciones de reflujo se observa una similitud de las bandas tanto en forma como en el número de onda de cada una de ellas, por lo que se confirma el compuesto diacetilado. En este mismo sentido se analizó la fracción "C" por cromatografía de gases-masas y se observó un fragmento de  $m/z=318$  el cual se asignó al ion molecular ya que es consistente con peso molecular del compuesto II. La confirmación de la acetilación en el átomo de Nitrógeno quedó de manifiesto por el fragmento de  $m/z=232$ , el cual se explica a través de la fragmentación del alcohol secundario presente en la estructura del clenbuterol, así mismo la presencia del grupo hidroxilo libre se explica por la pérdida de una molécula de agua a partir de [M-15-18]. A partir de  $m/z=232$  se puede confirmar que el átomo de N unido al anillo aromático está acetilado por la pérdida de la amida primaria ( $m/z=58$ ).



**Espectro 4.-** Espectro de masas (IE) obtenido del pico cromatográfico a 25.48 min de la misma fracción.

Adicionalmente se observa la pérdida de 16 unidades correspondiente al grupo amino unido al anillo aromático y de un fragmento  $m/z=71$  el cual es asignado a la ruptura  $\beta$  del grupo *tert*-butil amino.

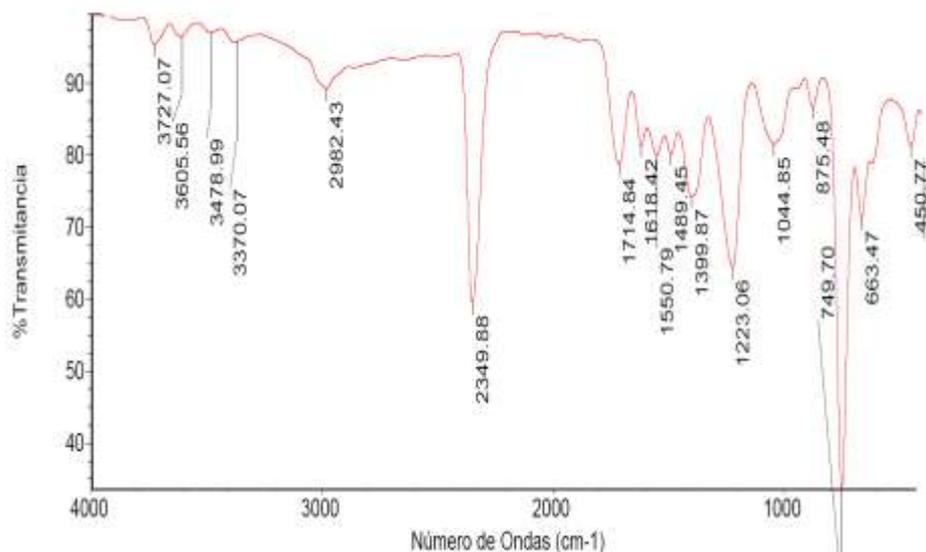
De la reacción de acetilación promovida por la Lipasa B de *Candida antarctica*, se generó un solo producto de acetilación de acuerdo al análisis de los datos de Infrarrojo adquiridos por la técnica de ATR. En este espectro se observa una banda en  $1714\text{ cm}^{-1}$  que fue asignado al carbonilo de la amida que corresponde al producto de acetilación del grupo amino unido al anillo aromático. Además la banda en  $3478\text{ cm}^{-1}$  corresponde al sobretono del carbonilo de la amida, así mismo se



---

observa una banda en  $1550\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a una banda de estiramiento *N-H* de la amida que confirma el producto de acetilación sobre el átomo de Nitrógeno en el anillo aromático. Adicionalmente se observan la banda característica de estiramiento *N-H* simétrico en  $3605\text{ cm}^{-1}$ , complementariamente la banda en  $749\text{ cm}^{-1}$  fue asignada a un estiramiento fuera del plano para el enlace *N-H*. Datos bibliográficos informan que la presencia de una banda cercana a  $750\text{ cm}^{-1}$  corresponde a la vibración fuera del plano de *N-H*. Finalmente la banda en  $1223\text{ cm}^{-1}$  fue asignada a la vibración *C-N*.

Adicionalmente y para confirmar la presencia del grupo hidroxilo libre, se verificó la presencia de una banda en  $1399\text{ cm}^{-1}$  y  $663\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a una vibración *O-H* en el plano y fuera del plano respectivamente.

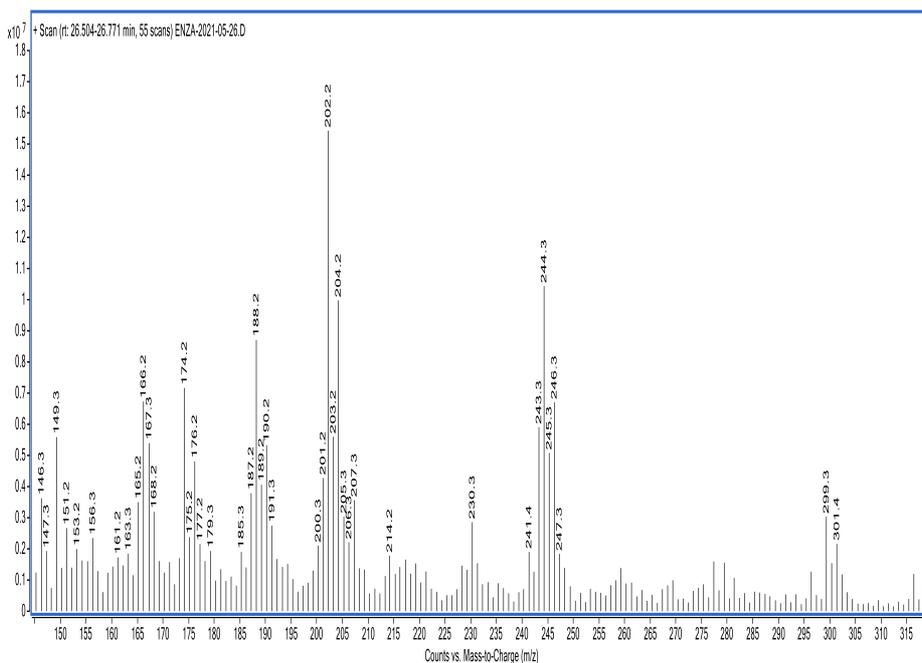


**Espectro 5.-** Espectro de IR adquirido por ATR, del producto de acetilación promovido por Lipasa B de *Candida antarctica*.

Del análisis de los datos obtenidos por espectrometría de masas de la única fracción que se obtuvo por este proceso biocatalítico, fue posible confirmar la acetilación del grupo amino presente en el sistema aromático, ya que en éste espectro se observó la presencia de un fragmento de  $m/z=318$ , el cual es consistente con el peso molecular de un compuesto monoacetilado además se observa un fragmento de  $m/z=303$  el cual se asignó a  $[M - 15]^+$ . De igual manera se observa un fragmento de  $m/z= 202$  (ar 100%), el cual es consistente para la escisión del anillo aromático de la cadena principal del clenbuterol, la formación



de este fragmento se confirmó además de la contribución isotópica 100:65:11 debida a la combinación de los dos átomos de Cloro presentes en este fragmento, por la presencia también de un fragmento de  $m/z=167$ , en donde ahora ya solo se observa la contribución isotópica de un átomo de Cloro en proporción 100:33. Adicionalmente se observa un fragmento  $m/z=174$  (ar 49%) el cual se asignó a la pérdida de  $[232-58]^+$  unidades.

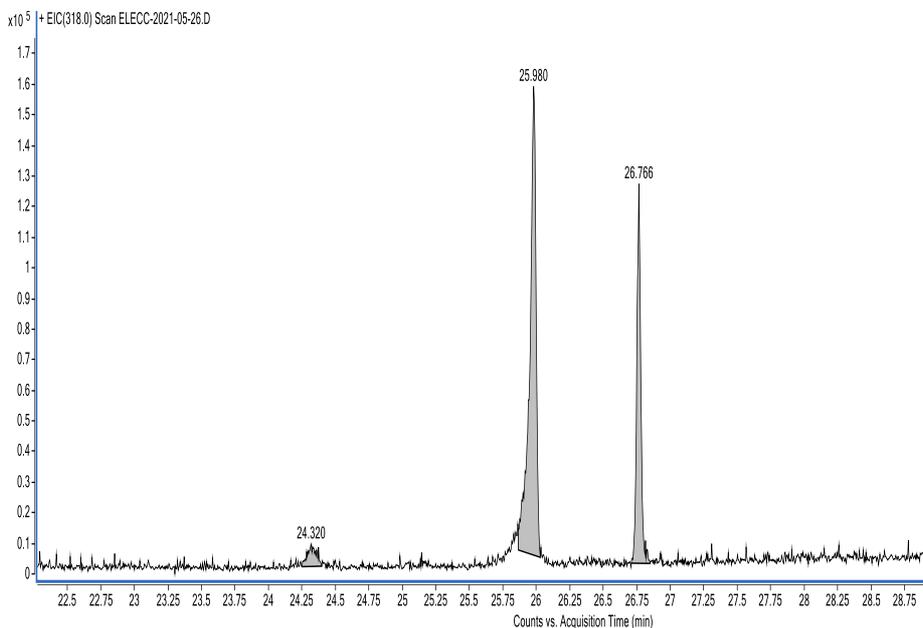


**Espectro 6.-** Espectro de masas (IE) del compuesto *N*-acetilado obtenido a partir de clenbuterol.

Por otro lado, en el cromatograma de la facción “C” correspondiente a la reacción de acetilación promovida por electro síntesis, se observa un



pico a 26.7 minutos, el cual al obtener su espectro de masas se detectó un fragmento  $m/z=318$ , por lo que corresponde a un derivado monoacetilado del clenbuterol.



**Cromatograma 2.-** Cromatograma de gases obtenido para la fracción C, de la reacción promovida por electrosíntesis.

Para identificar la posición del acetilo dentro de la estructura de la molécula de partida, se buscó el fragmento de [M-18], el cual de estar presente indicaría que la reacción de acetilación se llevó a cabo en el átomo de nitrógeno del anillo aromático, además y complementariamente, el fragmento de  $m/z= 232$ , el cual corresponde





átomo de Oxígeno de la posición 1 en la molécula del Clembuterol. En este mismo sentido, en la reacción promovida por la Lipasa B de *Candida antarctica* se generó solo el producto de acetilación en el átomo de Nitrógeno presente en el anillo aromático. En el resto de las reacciones promovidas por otras fuentes de energía de activación, se obtuvo además de un producto de mono acetilación el producto diacetilado.

**Tabla 2.** Derivados acetilados del clembuterol obtenidos en las diferentes métodos de activación según la Figura 20

| Método de activación | Producto de Acetilación |    |     |
|----------------------|-------------------------|----|-----|
|                      | I                       | II | III |
| Reflujo              |                         |    | SÍ  |
| Microondas           | SÍ                      |    | SÍ  |
| Ultrasonido          |                         | SÍ | SÍ  |
| Electrosíntesis      | SÍ                      |    |     |
| Enzimático           |                         | SÍ |     |
| Infrarrojo           |                         | SÍ | SÍ  |

Por lo que, de acuerdo a los resultados obtenidos, es factible generar los productos de acetilación del clembuterol, empleando diferentes fuentes de energía de activación.



---

Los resultados de este trabajo de tesis fueron presentados dentro del marco de las actividades académicas del Congreso Internacional de la Sociedad Química de México 2021 en el mes de agosto de 2021.

**CISQM-SM-CE01, Oscar Zúñiga García, Benjamín Velasco Bejarano\*, Anuar Gómez Tagle González, Raquel Gómez Pliego, Raquel López Arellano, Iván Missael Espinoza Muñoz. Productos de *O*- y *N*-acetilación del Clenbuterol, potenciales marcadores de su consumo, mediante un acercamiento a la química verde.**

<https://youtu.be/m5wVZp6S0Jk>

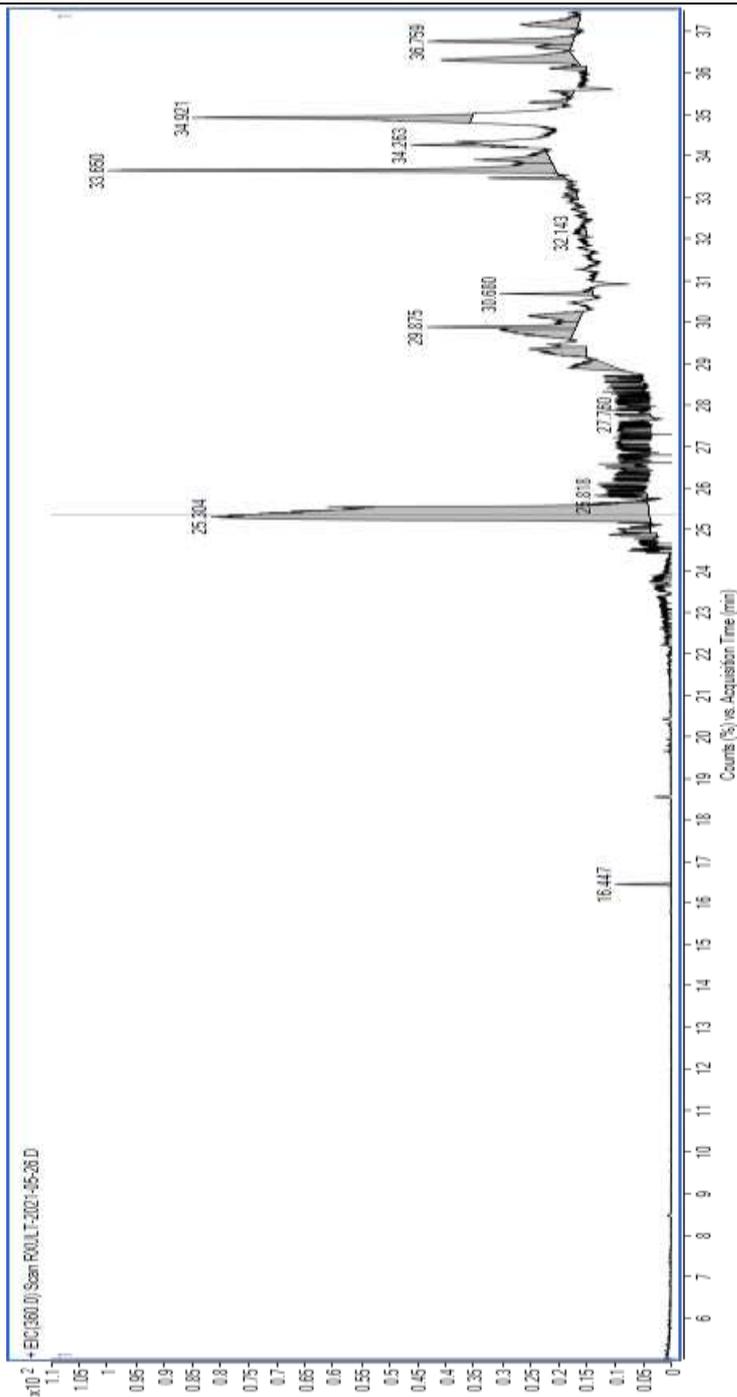


## Conclusiones

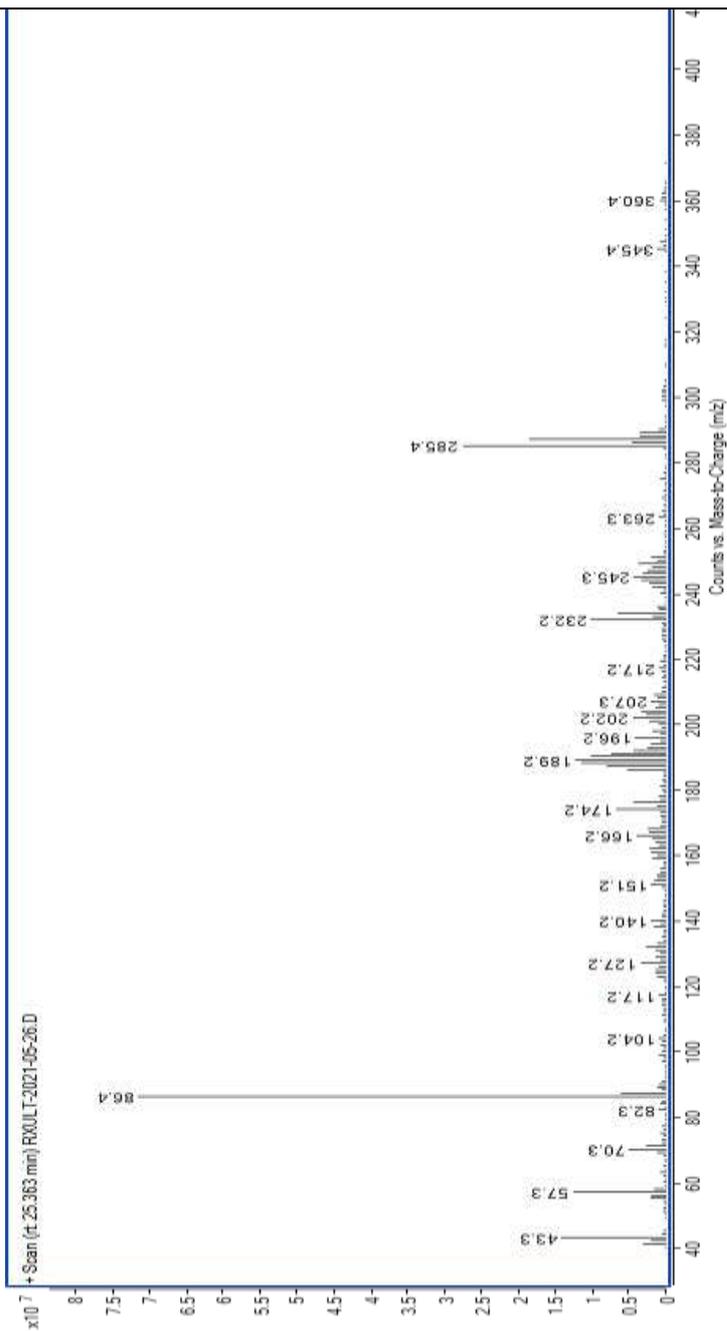
1. Con las diferentes fuentes de energía activación obtuvieron los productos mono y diacetilados a partir del clembuterol.
2. Se generó una metodología de síntesis para obtener las moléculas objetivo empleando diferentes fuentes de energía de activación.
3. Por medio de los datos espectroscópicos de IR y de espectrometría de masas se pudo llevar a cabo la caracterización de los productos *N*- y *O*- acetilados del clembuterol.
4. Se sintetizarón por estrategias acordes a la química verde, tres potenciales metabolitos acetilados del clembuterol.



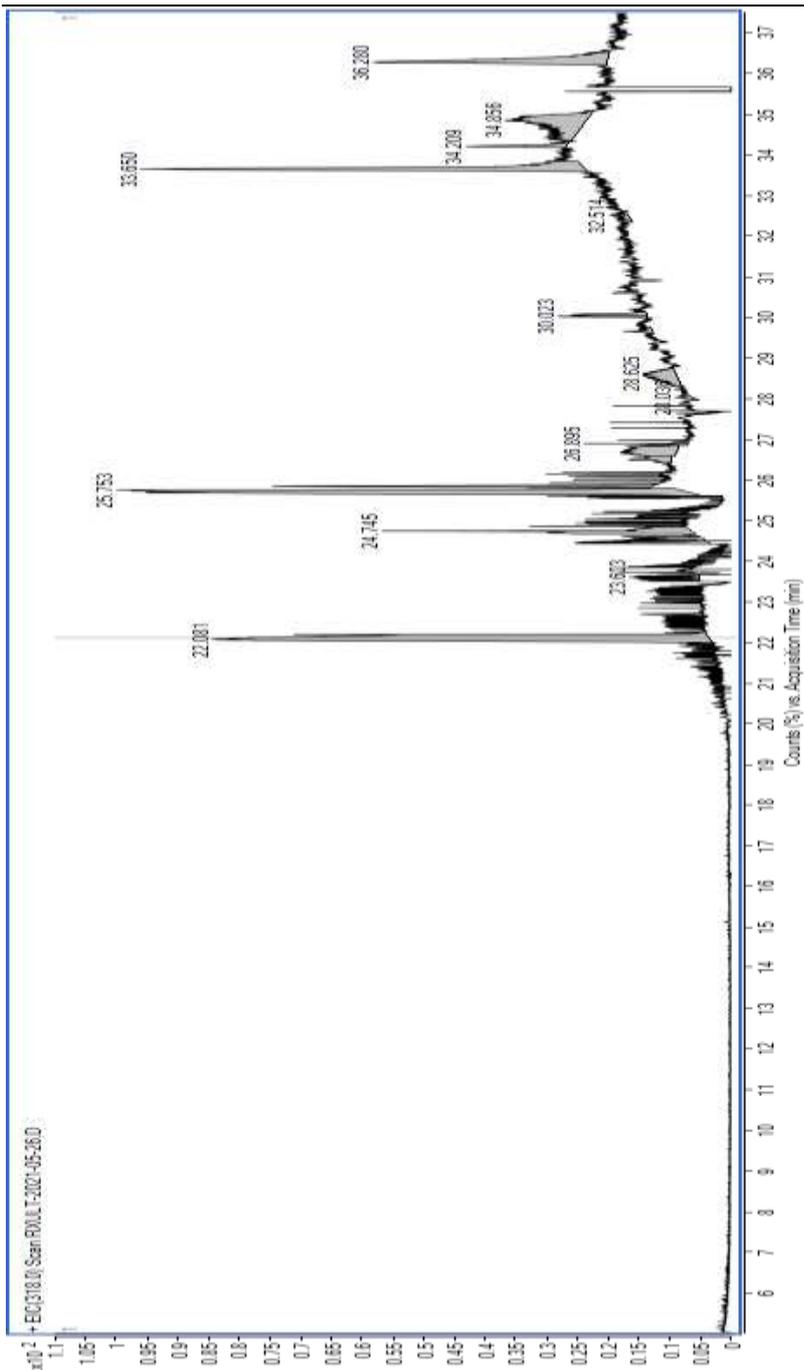
## Apéndice espectroscópico



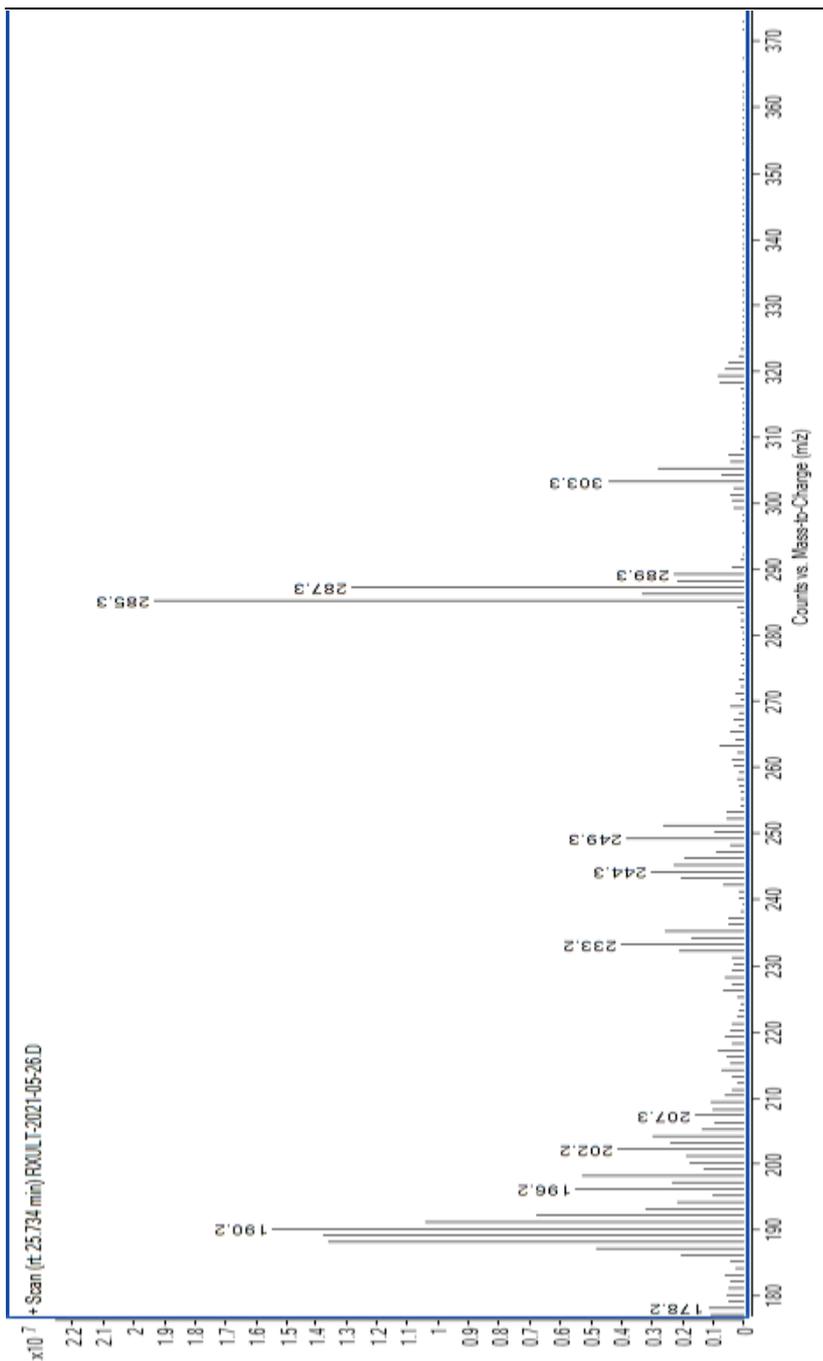
**Cromatograma 3.-** Cromatograma de CG de la reacción de acetilación de Clembuterol mediante activación por ultrasonido.



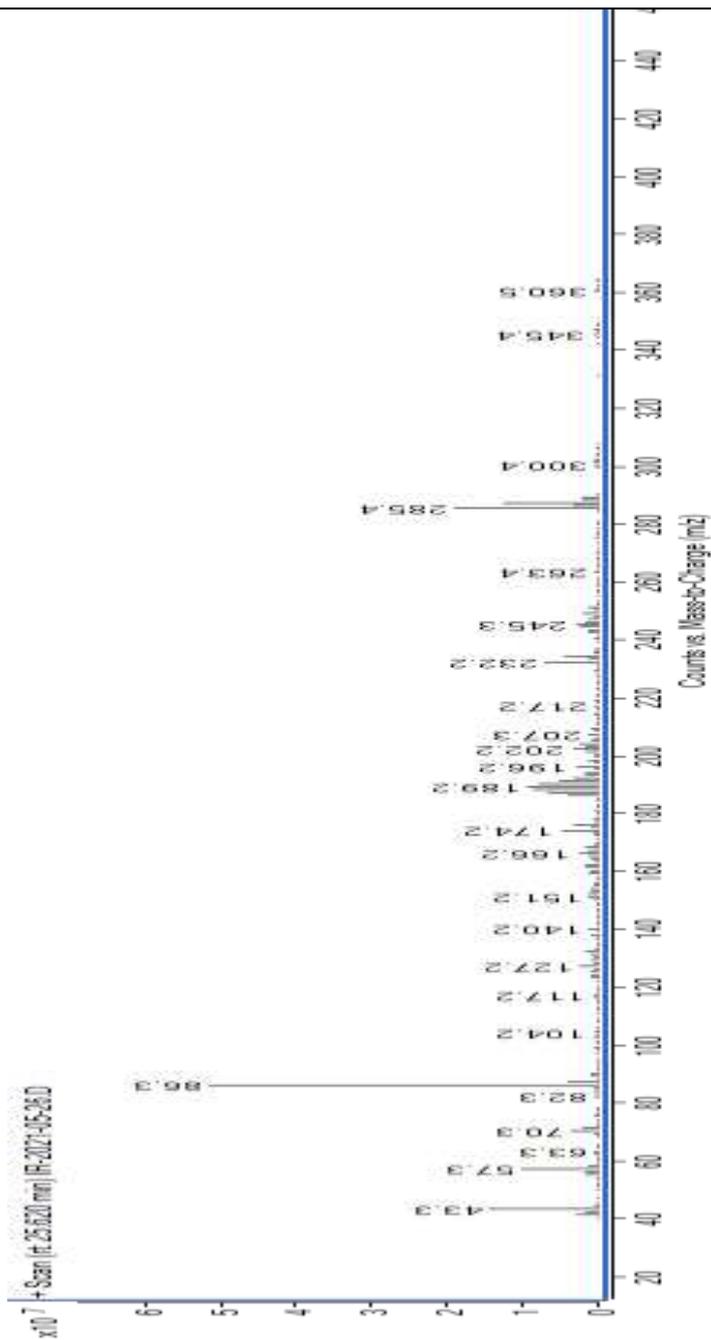
**Espectro 8.-** EM de la reacción de acetilación de Clembuterol mediante activación por ultrasonido adquirido para un tiempo de retención de 25.363 min.



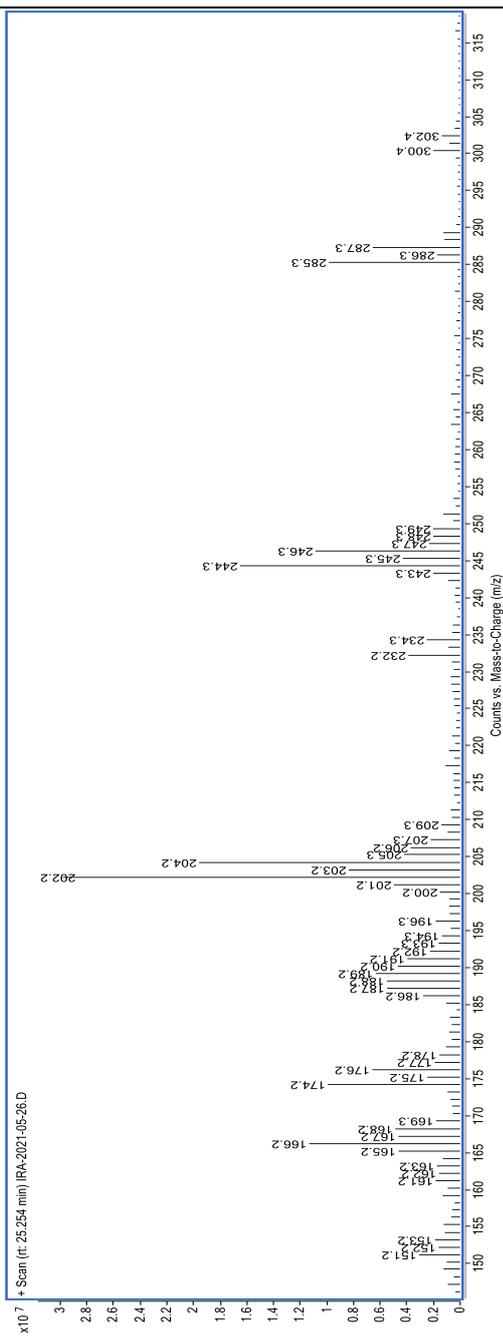
**Cromatograma 4.-** Cromatograma de CG de la reacción de acetilación de Clembuterol mediante activación por ultrasonido escaneando el ion 318.0.



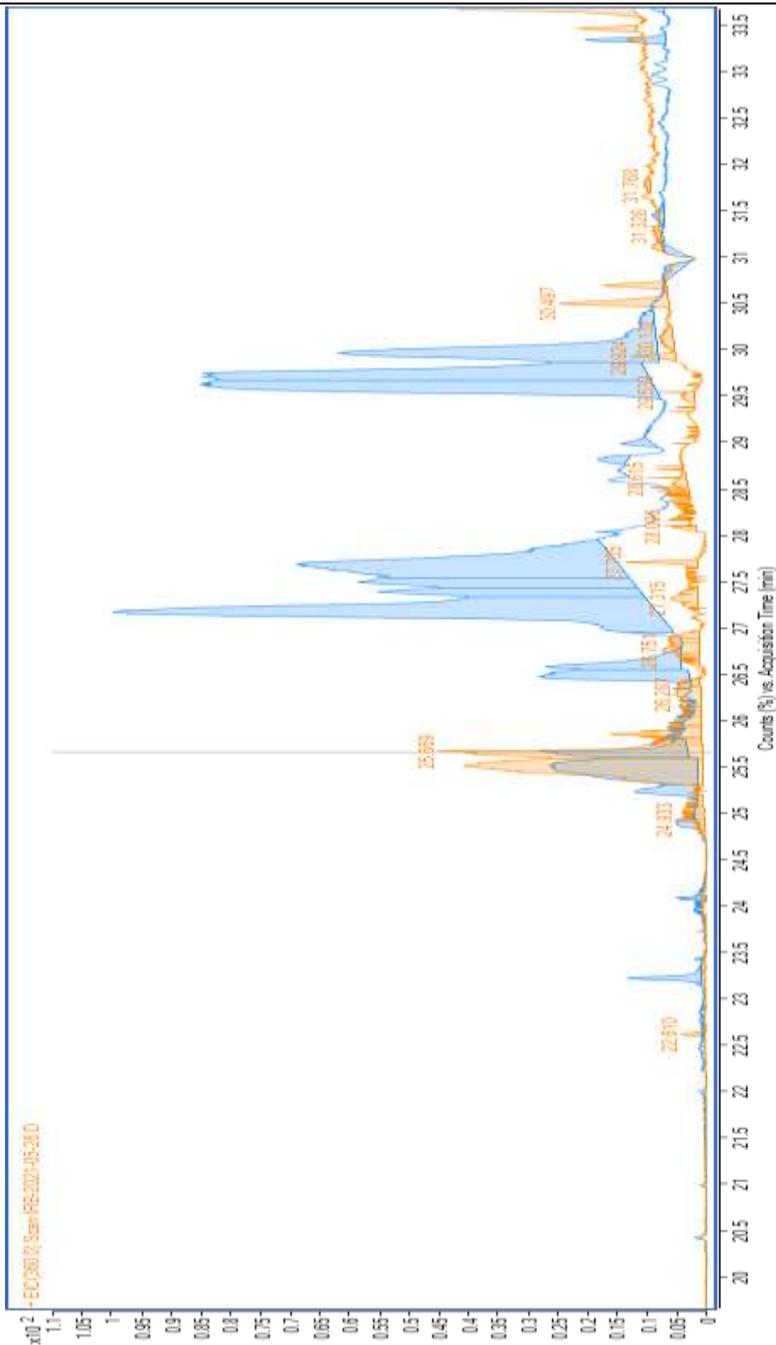
**Espectro 9.-** EM de la reacción de acetilación de Clembuterol mediante activación por ultrasonido escaneando a 25.734 min.



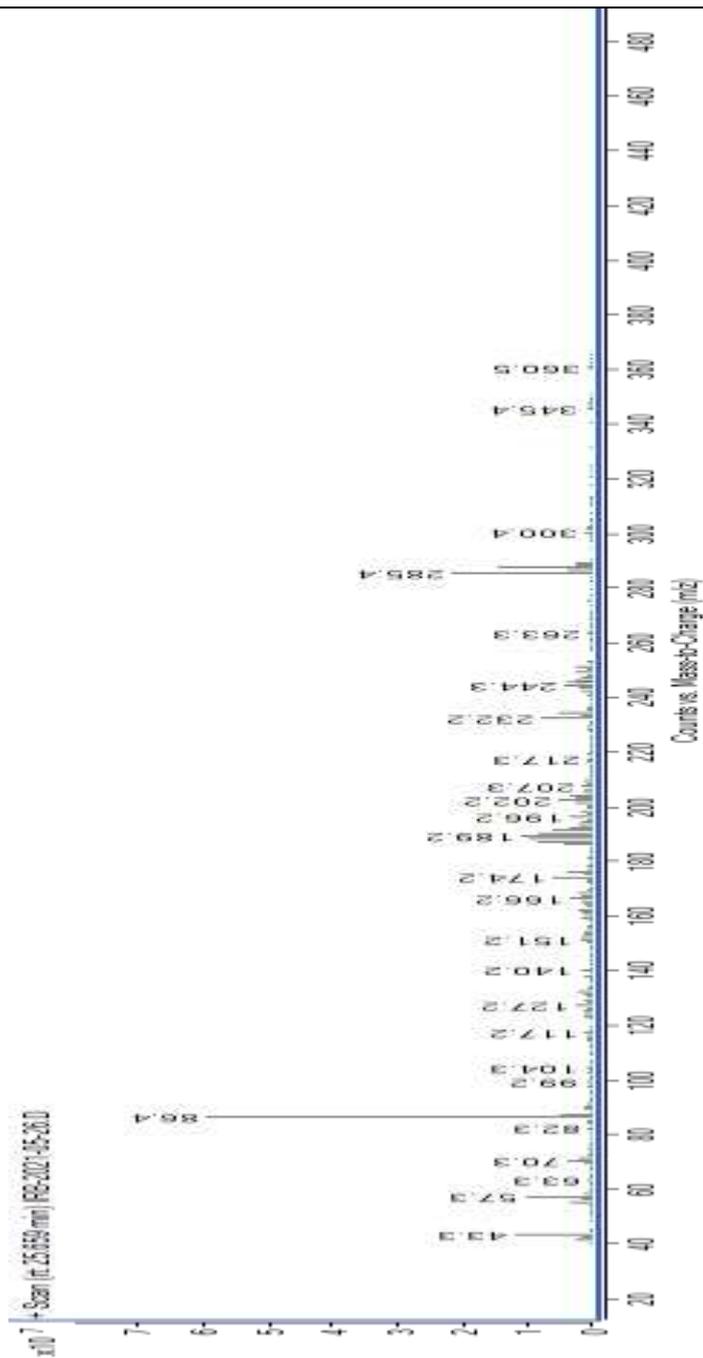
**Espectro 10.-** EM de la reacción de acetilación de Clembuterol mediante activación por infrarrojo.



**Espectro 11.-** EM del producto A obtenido de la reacción de acetilación de Clembuterol mediante activación por infrarrojo escaneando a 25.254, 24.424, 23.574, 24.157 y 24.424 min.



**Cromatograma 5.-** Cromatograma de CG del producto B obtenido de la reacción de acetilación de Clembuterol mediante activación por infrarrojo escaneando el ion 360.



**Espectro 12.-** EM del producto B obtenido de la reacción de acetilación de Clembuterol mediante activación por infrarrojo escaneando a 25.541 y 25.659 min.



## ANEXOS

### Anexo 1. Método de adquisición y de las condiciones del equipo de GC-MS

#### Triple Quadrupole Acquisition Method - MS Parameters Report

|                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| <b>Method File</b>                | D:\MassHunter\GCMS\1\methods\UNAM.M\qqqacqmethod.xml |
| <b>Tune File</b>                  | atunes.eihs.tune.xml                                 |
| <b>Ion Source</b>                 | EI   |
| <b>Source Temp. (°C)</b>          | 230  |
| <b>Electron Energy Mode</b>       | Use tune setting                                     |
| <b>Fixed Electron Energy (eV)</b> |  |
| <b>Stop Mode</b>                  | By Chromatograph Time                                |
| <b>Stop Time (min)</b>            | 1  |
| <b>Solvent Delay (min)</b>        | 5  |
| <b>Use Gain</b>                   | Yes  |
| <b>EM Saver</b>                   | 3E+08  |
| <b>Auto Baseline Subtract</b>     | Yes  |
| <b>Advanced Filtering</b>         | Yes  |

#### Time Filter Table:

| <b>Time filter type: off</b> |            |                  |
|------------------------------|------------|------------------|
| Row                          | Time (min) | Peak Width (sec) |

#### Time Segments:

| Index | Start Time (min) | Scan Type | Electron Energy (eV) | Data Stored | Delta EMV (V) | Gain |
|-------|------------------|-----------|----------------------|-------------|---------------|------|
| 1     | 5.00             | MS1 Scan  |                      | X           |               | 1    |



Time Events:

**Time Segment 1: MS1 Scan**

|                        |                   |                 |                       |
|------------------------|-------------------|-----------------|-----------------------|
| <b>Step size (amu)</b> | 0.1               |                 |                       |
| <b>Threshold</b>       | 100               |                 |                       |
| <b>Profile data</b>    | No                |                 |                       |
| <b>Segment name</b>    | <b>Start mass</b> | <b>End mass</b> | <b>Scan time (ms)</b> |
|                        |                   |                 |                       |
|                        | 40                | 500             | 300                   |

[+](#)

### Triple Quadrupole GC/MS Quick Tune Report

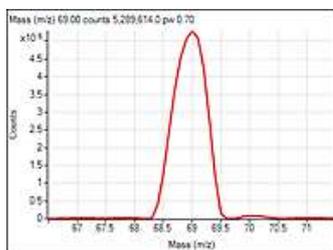
---

|                             |  |                 |                    |
|-----------------------------|--|-----------------|--------------------|
| <b>Instrument Name</b>      | COE Mexico / US2009V310                        | <b>MS Model</b> | 7010B              |
| <b>Tune Date &amp; Time</b> | 5/25/2021 10:05:02 AM                          | <b>Source</b>   | EI High Efficiency |
| <b>Tune File</b>            | D:\MassHunter\GCMS\1\7010\atunes.eihs.tune.xml |                 |                    |

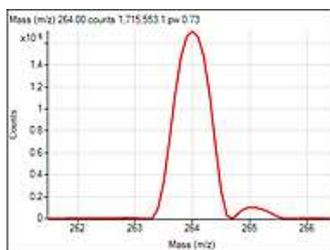
---



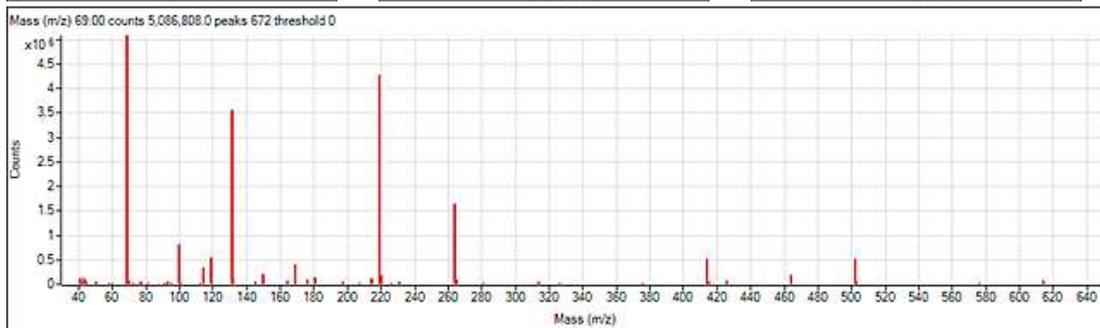
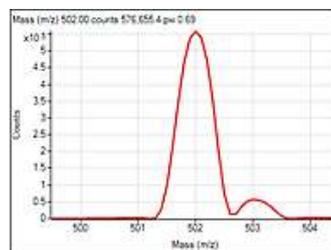
**Analyzer: Q1**



**Ion Polarity: Positive**



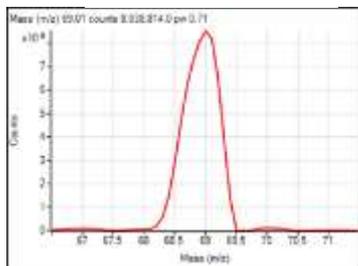
**Width: Unit**



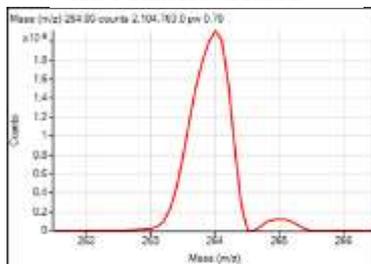
| m/z    | Abundance   | Rel Abund | Isotope | Iso Abund | Iso Ratio |
|--------|-------------|-----------|---------|-----------|-----------|
| 69.00  | 5,086,807.5 | 100.0%    | 70.00   | 74,705.6  | 1.5%      |
| 219.00 | 4,291,525.0 | 84.4%     | 220.00  | 194,343.3 | 4.5%      |
| 264.00 | 1,643,843.1 | 32.3%     | 265.00  | 96,597.1  | 5.9%      |
| 414.00 | 528,210.8   | 10.4%     | 415.00  | 47,252.3  | 8.9%      |
| 502.00 | 525,412.2   | 10.3%     | 503.00  | 52,865.4  | 10.1%     |



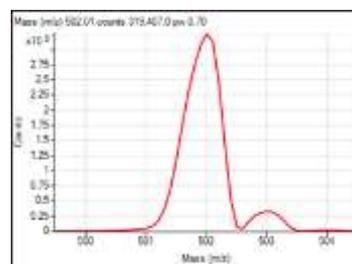
**Analvzer: O2**



**Ion Polarity: Positive**



**Width: Unit**



|                           |       |        |                         |         |        |
|---------------------------|-------|--------|-------------------------|---------|--------|
| <b>Instrument Actuals</b> |       |        | <b>Vacuum</b>           |         |        |
| Source Temp.              | 232   | °C     | Rough Vac               | 1.09E+2 | mTorr  |
| MS1 Quad Temp.            | 151   | °C     | High Vac                | 8.55E-5 | Torr   |
| MS2 Quad Temp.            | 151   | °C     | Turbo 1 Speed           | 100.0   | %      |
| Filament Current          | 100.1 | µA     | Turbo 1 Power           | 23.0    | W      |
| <b>GC Gas Flow</b>        |       |        |                         |         |        |
| Quench Flow               | 2.250 | mL/min | Column 1                | 1.200   | mL/min |
| Collision Cell            | 1.500 | mL/min | Column 2                | 0.000   | mL/min |
| <b>Ion Source</b>         |       |        |                         |         |        |
| Type/mode                 | EI+   |        | Repeller                | 15.3    | V      |
| Source Temp.              | 230   | °C     | Ion Body                | 9.6     | V      |
| Emission                  | 100.0 | µA     | Extractor               | Dynamic | V      |
| Energy                    | 70    | eV     | Post Extractor 1 Offset | -15.6   | V      |
| Filament                  | 1     |        | Post Extractor 2        | -40.0   | V      |
|                           |       |        | Ion Focus               | -194.0  | V      |



|   |                            | Entrance Lens            | Dynamic       | V |  |
|---|----------------------------|--------------------------|---------------|---|--|
| <b>Quadrupoles</b>  |                            | <b>Q1</b>                |               |   | <b>Q2</b>  |
| DC<br>Pos<br>t/Pr<br>e<br>Filt<br>er<br>Te<br>mp<br>era<br>tur<br>e |                            | 6.0 V<br>6.0 V<br>150 °C |               |   | -5.0 V<br>-15.0 V<br>150 °C                        |
| Polarity  |                            | Positive                 |               |   | Posi<br>tive                                       |
| DIP Mass  | 100.00                     | 1000.00 m/z              |               |   | 10<br>00.<br>00<br>m/<br>z                         |
| DIP Value   | 11.0                       | 100.0 %                  |               |   | 5<br>8<br>.0<br>%                                  |
| <b>Resolution</b>   | <b>U<br/>n<br/>i<br/>t</b> | <b>Wide</b>              | <b>Widest</b> |   | <b>Wid<br/>e</b> <b>W<br/>id<br/>e<br/>s<br/>t</b> |
| Mass Gain   | -1.12                      | -1.42                    | -1.30         |   | -<br>5.14<br>-<br>5<br>.3<br>9                     |
| Mass Offset   | Dynamic                    | -1.603                   | -1.167        |   | -<br>1.646<br>-<br>1<br>.                          |



|                       |              |    |                            |                         |    |  |
|-----------------------|--------------|----|----------------------------|-------------------------|----|--|
|                       |              |    |                            |                         |    | 2<br>6<br>4                              |
| Width Gain            | 2<br>2<br>:  |    | 22.1                       | 22.1                    |    | 25.<br>1<br>:                            |
| Width Offset          | 1<br>Dynamic |    | -0.195                     | -0.715                  |    | -<br>0.204<br>:<br>0<br>:<br>7<br>2<br>4 |
| <b>Collision Cell</b> |              |    | <b>Detect<br/>or</b>       |                         |    |  |
| Cell Entrance         | 7.0          | V  | Detector<br>Type           | Triple Axis<br>Series 2 |    |  |
| Hex DC                | 6.0          | V  | Iris                       | Dynamic                 | V  |  |
| Hex RF                | 400          | V  | HED                        | -10.0                   | kV |  |
| Hex Accel             | -5.0         | V  | EMV<br>(Gain=1.<br>0E+004) | 1265                    | V  |  |
| Cell Exit             | 0.0          | V  | Gain<br>Paramete<br>r a    | 12.09835                |    |  |
| Collision Energy      | 0            | eV | Gain<br>Paramete<br>r b    | -77.20428               |    |  |
|                       |              |    | Max Gain<br>Factor         | 3452                    |    |  |
| <b>Fast Scan</b>      |              |    |                            |                         |    |  |
| Fast Scan Offset      | -4.0         | V  |                            |                         |    |  |
| Q1 Mass Gain          | 18.14        |    | Q2 Mass<br>Gain            | -0.96                   |    |  |
| Q1 Mass Offset        | 2.400        |    | Q2 Mass<br>Offset          | -1.349                  |    |  |
| Q1 Width Gain         | 22.2         |    | Q2 Width<br>Gain           | 26.3                    |    |  |
| Q1 Width Offset       | -0.711       |    | Q2 Width<br>Offset         | -0.620                  |    |  |

