



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL**

**ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS MÉTODOS
PARA LA DETECCIÓN DE CLENBUTEROL, ENSAYO
INMUNOENZIMÁTICO (ELISA) Y CROMATOGRFÍA
DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) CON
DETECTOR DE FLUORESCENCIA**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

ADRIANA AYALA FLORES

TUTOR:

DR. RENÉ ROSILES MARTINEZ

COMITÉ TUTORAL:

**DRA. MARÍA DE LA SALUD RUBIO LOZANO
M. EN C. FRANCISCA AIDA ITURBE CHIÑAS**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria.

A mi mamá y mi hermana que siempre han estado a mi lado apoyándome en todo lo que hago.

A mi mejor y más querida amiga Larissa que siempre ha estado a mi lado en las buenas y en las malas.

A mí querida amiga Getza por su inigualable amistad y apoyo incondicional.

Al Lic. Héctor Rodríguez Licea que en paz descansa, por haberme brindado la oportunidad y la confianza permitiéndome escalar un peldaño más en mi vida profesional para llegara a ser la mejor.

A mis ex compañeros de la ANETIF el Dr. Jaramillo, Enrique, Coco y Oscar que siempre estuvieron pendientes de mi con gran cariño.

A ti mi Amor, que has sabido alentarme en los momentos más difíciles, con paciencia, con el gran amor que siempre me das y por la infinita confianza que has depositado en mí.

A todas las personas que en su momento me apoyaron y ayudaron a salir adelante en los momentos críticos.

A Dios por haberme permitido culminar esta etapa profesional de mi vida.

Gracias.

Agradecimientos.

Al Dr. Juan Gay Gutiérrez director general del Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal (CENAPA).

Al personal del laboratorio de residuos tóxicos a Cesar Linares y al químico Francisco Javier Ontiveros por su enseñanza y colaboración en el desarrollo de la técnica de ELISA para la detección de clenbuterol en músculo e hígado de bovino.

Al personal del laboratorio de Toxicología por su apoyo, comprensión y ayuda en la evaluación y desarrollo de la técnica de HPLC/F y en la validación de la técnica de HPLC/UV para la detección y confirmación de clenbuterol en músculo e hígado de bovino.

Al municipio de Tulancingo, Hidalgo, por su apoyo financiero para la realización de este trabajo.

Al Dr. René Rosiles Martínez, quién aportó gran parte del conocimiento para la elaboración de este trabajo.

Índice.

	Pag.
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	3
2.1 Uso de aditivos en alimentación animal.....	4
2.2 Promotores de crecimiento.....	6
2.3 ¿Qué es el clenbuterol?.....	8
2.4 Mecanismo de acción de los agonistas β -AR.....	11
2.5 Propiedades físicas.....	13
2.6 Inocuidad y calidad.	13
2.7 Dosis.	15
2.8 Uso en animales.....	17
2.9 Marco legal nacional.....	18
2.10 Marco legal internacional.....	24
2.11 Métodos de detección.	25
3. Hipótesis.....	34
4. Objetivos.....	35
5. Material y métodos.....	36
5.1 Identificación de clenbuterol por medio de la prueba de ELISA.....	37
5.2 Análisis del clenbuterol por cromatografía de líquidos con fluorescencia (HPLC/F)	41
5.3 Detección de clenbuterol por HPLC/UV.....	43
5.4 Validación del método HPLC/UV.....	45
6. Resultados.....	48
6.1 Resultados para ELISA.....	48
6.2 Resultados de los ensayos para el análisis de clenbuterol por HPLC y detector de Fluorescencia.....	51

6.3 Resultados de la validación del método cromatografía de líquidos y detector de luz ultravioleta HPLC/UV.....	53
6.4 Resultados para técnica de HPLC/UV.....	57
7. Discusión.....	60
8. Conclusión.....	66
9. Referencias.	67

Lista de figuras.

Figura 1. Principales estados productores de carne de bovino (2008).....	2
Figura 2. Serie histórica de la producción de carne de bovino 1998-2008.....	2
Figura 3. Estructura general de las fenetanolaminas.....	10
Figura 4. Estructura del clenbuterol.....	10
Figura 5. Molécula de clenbuterol.....	10
Figura 6. Mecanismo de acción de los beta-agonistas.....	12
Figura 7. Excreción del clenbuterol en bovino.....	18
Figura 8. Principales estados que han presentado casos de intoxicación por consumo de carne contaminada con clenbuterol 2002-2006.....	19
Figura 9. Fórmula estructural del Ortoftaldialdehído.....	31
Figura 10. Detector de fluorescencia.....	32
Figura 11. Kit Ridascreen Clenbuterol Fast ® (Bio-pharm).....	40
Figura 12. Sistema de Cromatografía Líquida de Alta Resolución.....	42
Figura 13. Procedimiento de extracción para la determinación de Clenbuterol por HPLC/Uv.....	45

Lista de cuadros.

Pag.

Cuadro 1. Concentración de clenbuterol en muestras de hígado (H) Distrito Federal, Toluca, Querétaro, Tulancingo. Analizadas por la técnica de ELISA.....	48
Cuadro 2. Concentración de clenbuterol en muestras de músculo (b) de bovino. Distrito Federal y Tulancingo. Analizadas por la técnica de ELISA...50	50
Cuadro 3. Índices de la regresión lineal en la linealidad del método analítico para la identificación del clenbuterol por HPLC/UV/HCl.....	55
Cuadro 4. Índices de la regresión lineal en la linealidad del método analítico para la identificación del clenbuterol por HPLC/UV/Fase móvil.....	56
Cuadro 5. Índices de regresión lineal para realizar el estimado de la concentración de clenbuterol en las muestras de campo.....	58

Resumen

El clenbuterol es un β - agonista administrado actualmente como promotor de crecimiento en forma ilegal al ganado. El objetivo de este trabajo fue analizar muestras de hígado y músculo de bovino por las técnicas de ELISA y cromatografía de líquidos de alta resolución para la identificación de clenbuterol. Se evaluó la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de fluorescencia y se validó la técnica de cromatografía de líquidos alta resolución con detector luz ultravioleta. La recolección de las muestras se realizó al azar, 80 de hígado y 80 de músculo de bovino. Las muestras fueron analizadas por la técnica de ELISA; se evaluó la técnica de HPLC/F y se llevó a cabo la validación e implementación del método HPLC/UV, tomando en cuenta los parámetros de desempeño: linealidad, especificidad, repetibilidad, límite mínimo de detección y límite mínimo de cuantificación. Se calculó el riesgo de exposición por tamaño de ración consumida. Los resultados obtenidos fueron 66 muestras positivas (41.25%) con un promedio de 7,480ppt en hígado y de 3,412ppt en músculo. Para la técnica HPLC/F, no se observaron señales asociadas con la concentración de clenbuterol. Los resultados para HPLC/UV fueron 8.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de clenbuterol, usando concentraciones de 27.2 a 6.8ng en 30 μl , con un CV de 0.66% y un TR de 2.3 min. La concentración mínima detectable se fue de 6.8 ng. Los resultados de este estudio se encuentran por encima del límite establecido como máximo. Se llevó a cabo la confirmación y documentación de los resultados, estableciendo que los análisis aplicados son confiables, adecuados para la finalidad que han sido empleados. La técnica ELISA, es un método rápido, sensible y fiable para detectar clenbuterol, efectiva para su utilización como método de *screening*. El método de HPLC/UV validado es un método confirmativo.

Abstract.

Clenbuterol is a β - agonist currently administered illegally as a growth promoter in cattle. The aim of this study was to analyze liver and muscle samples from bovine for the identification of clenbuterol by ELISA techniques and high resolution liquid chromatography. The high-performance liquid chromatography technique with a fluorescence detector (HPLC/F) was evaluated and the liquid chromatography technique with an ultraviolet light detector (HPLC/UV) was validated. The collection of samples was randomly; 80 of liver and 80 of muscle, all from cattle. The samples were analyzed by ELISA, the HPLC/F technique was evaluated and the implementation and validation of the HPLC/UV method was carried out, taking into account the performance parameters: linearity, specificity, repeatability, minimum limit of detection and minimum limit of quantification. It was calculated the risk of exposure by the size of the serving consumed portion. The results were 66 samples positive (41.25%) with an average of 7,480 ppt in liver and 3,412 ppt in muscle. In the HPLC/F technique, there were no associated signals with the clenbuterol concentration. The results for HPLC/UV were 8.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of clenbuterol, using concentrations from 27.2 to 6.8ng in 30 μl , with a VC of 0.66% and a RT of 2.3 min. The minimum detectable concentration was 6.8 ng. The results of this study are above the allowed maximum limit. The confirmation and documentation of the results has been done, proving that the applied tests are reliable and adequate for the purpose that they have been used in the past. The ELISA technique is a rapid, sensitive and reliable method for detecting clenbuterol; effective as a screening method. The validated HPLC/UV method is a confirmatory method.

Keywords: clenbuterol, validation, ELISA, HPLC/F, HPCL/UV.

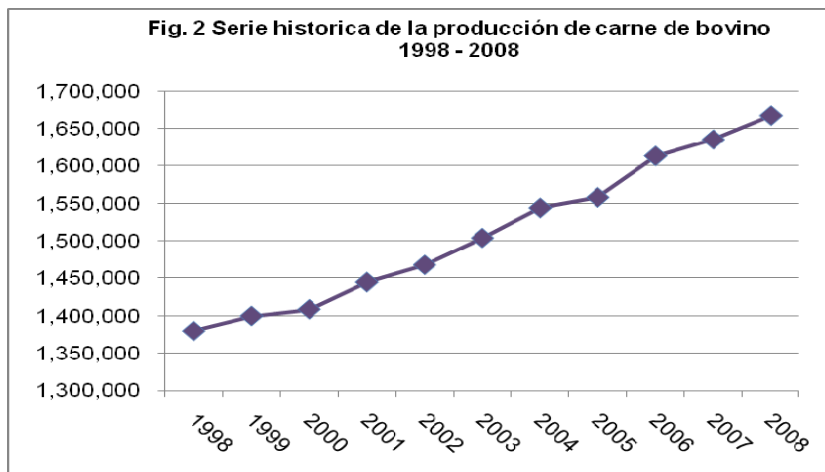
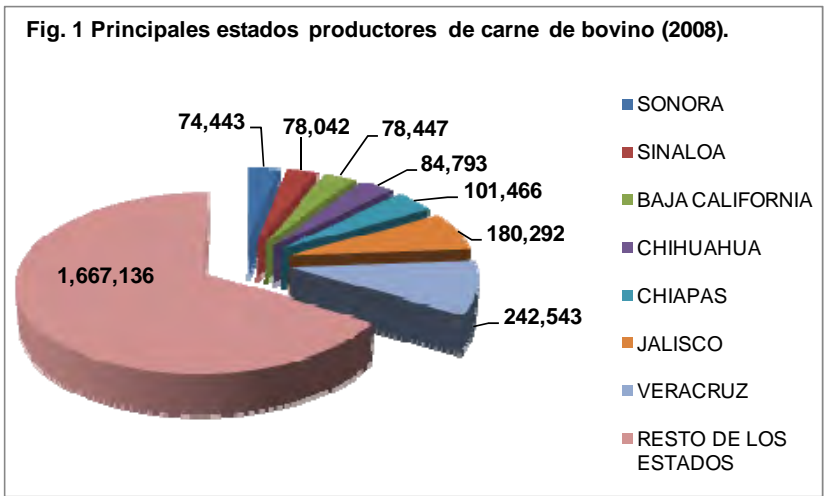
1. Introducción

Los alimentos de origen animal son un ingrediente indispensable en la alimentación del ser humano, ya que aportan y proveen grandes cantidades de nutrientes necesarios para que un individuo pueda desarrollarse y mantenerse en homeostasis¹.

Los diferentes tipos de carne son básicas para la alimentación del humano; en México se consumen principalmente la carne de res o bovino, carne de porcino y carne de ave, así como la carne de ovino, caprino, caballo y conejo en menor cantidad.

La carne de res (bovino) es uno de los principales y más complejos alimentos de origen animal que se consumen en México, debido a sus altas propiedades nutricionales, su alto contenido en hierro, vitaminas y proteínas. Actualmente gracias al desarrollo tecnológico se puede encontrar en el mercado carne de res mexicana de buena calidad, inocua, libre de patógenos y sustancias que puedan perjudicar al hombre; además de una gran variedad de productos con valor agregado.

El inventario de ganado bovino para 1998 era de 28,313,158 cabezas de ganado incrementándose en los últimos diez años a 29,420,059 cabezas en el año 2008, lo que representa un incremento del 3.91% en el número de animales en producción, según cifras reportadas por el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) con respecto a esto, se observa que la producción de carne en canal bovina en México se ha visto favorecida en los últimos años, al pasar de una producción de 1, 379,768 toneladas en el año 1998 a 1, 667, 136 toneladas en el año 2008. Lo que representa un incremento del 20.83% en los últimos diez años². Para el 2008 los principales estados productores de carne de bovino fueron Veracruz, Jalisco, Chiapas, Baja California, Sonora y Sinaloa (fig. 1).



El incremento en la producción nacional de carne de bovino se debe principalmente a la implementación de medidas de manejo, inclusión de ingredientes de mejor calidad en la ración y uso de sustancias tendientes a incrementar la eficiencia en la conversión alimenticia, que por ende, repercuten en la ganancia diaria de peso; así como la utilización de otras herramientas como la manipulación genética, con la cual se ha logrado la intensificación de la producción animal y ha difundido el empleo de líneas genéticas de alto rendimiento; como razas especializadas en producción de carne como son Belgain

blue, Simmental, Charolais, Limousin, Hereford, Santa Gertrudis, entre otras, que son destinadas para la producción de carne principalmente, además de las recientes mejoras en cuanto a la tecnificación y manejo de hato.

2. Antecedentes

En el transcurso de las décadas y de acuerdo con los patrones culturales de consumo de productos cárnicos, la carne de ganado bovino es uno de los ingredientes principales utilizados por el ama de casa para la elaboración de platillos tradicionales que se consumen en todo el país². Aumentando así factores antes no considerados como son salud pública, inocuidad alimentaria y la economía, que han repercutido y transformado los hábitos en el consumidor, prefiriendo ahora la carne libre de grasa.

Para los ganaderos producir carne a gran escala con el menor costo y tiempo posible es una necesidad; y por consecuencia con el paso del tiempo se han adoptado técnicas que permiten producir carne en canal en mayor cantidad por unidad de superficie y alimento utilizado.

Es así, como la adición de ingredientes altamente energéticos en las dietas de los animales en la etapa de finalización ha significado un factor esencial para lograr mayores ganancias diarias de peso.

La industria manufacturera de alimentos concentrados ha logrado la producción de alimentos eficientes que repercuten directamente y de manera positiva en la relación costo - beneficio de cada ciclo de producción. Que además de los beneficios antes mencionados, también brindan calidad e inocuidad al producto terminado necesaria para su venta, tomando en cuenta las preferencias del consumidor.

2.1 Uso de aditivos en alimentación animal.

Otra forma de incrementar la eficiencia productiva es por medio de la administración en la dieta de sustancias denominadas “aditivos”, los cuales tienen diversas procedencias (probióticos, antibióticos, hormonales, enzimas y beta-agonistas) mismos que producen un efecto positivo en la ganancia diaria de peso en los animales (Ganancia Diaria de Peso “GDP”)^{1,3}. Estas características representan para el ganadero, más ingresos en cada ciclo de producción, siendo redituable su utilización.

Se entiende por *aditivo alimentario* cualquier sustancia, que no se utiliza o consume normalmente como alimento, ni tampoco se usa como ingrediente básico en alimentos, tenga o no valor nutritivo, y cuya adición intencionada al alimento es con fines tecnológicos (incluidos los organolépticos) en sus fases de fabricación, elaboración, preparación, tratamiento, envasado, empaquetado, transporte o almacenamiento, que resulte (directa o indirectamente) por sí o sus subproductos, en un componente del alimento o elemento que afecte a sus características^{4, 5, 6}.

El uso de los aditivos en los alimentos debe basarse en el conocimiento de sus efectos y mecanismos de acción y en el empleo de las dosis adecuadas³.

Para su utilización y la obtención de excelentes resultados, se requieren tres factores básicos, que deben prevalecer en un hato de producción pecuaria:

- 1) Condiciones higiénicas sean adecuadas, para disminuir al máximo las afecciones por hongos y microorganismos patógenos.
- 2) Edad y procedencia de los animales sean similares, para disminuir el estrés por jerarquía en el manejo de lotes, y la aparición de patologías sea nula o mínima de acuerdo a la zona climática.

- 3) Utilización de un alimento de buena calidad que cubra las necesidades nutricionales del ganado^{1,7}.

Actualmente los aditivos son utilizados de forma rutinaria en la alimentación animal, fundamentalmente para: mejorar el sabor, la presentación y conservación de las materias primas utilizadas en la dieta, así como prevenir ciertas enfermedades y aumentar la eficiencia productiva de los animales³.

Se debe tener en cuenta que en la crianza de animales para la producción son factores importantes: el ritmo de crecimiento, la conversión alimenticia, la producción cárnica, la producción lechera, que pueden modificarse mediante el uso de alguna de estas sustancias en las diferentes etapas del ciclo de producción. El efecto de los aditivos en el animal se observa de forma individual, considerándose lo anterior como una ventaja, ya que el engordador tiene la libertad de elegir entre la amplia gama existente de aditivos en el mercado, ya sea el de su preferencia o el que dará resultados deseables para su producto terminado, considerando su costo y sus características⁸.

La lista de aditivos es muy amplia y se incluyen varios componentes que son de diferente naturaleza química, catalogados en base a sus características, mecanismo de acción, así como potencial de uso en los animales, clasificándose en: conservadores (antioxidantes, inhibidores de hongos, preservadores); estimulantes del consumo (emulsionantes, saborizantes), modificadores de la fermentación ruminal utilizados en bovinos, ovinos y caprinos, como agentes para reducir la presencia de microorganismos perjudiciales para el animal (antibióticos selectivos, ionóforos) y los promotores del crecimiento (hormonas, probióticos, prebióticos, β agonistas-adrenérgicos de naturaleza sintética y enzimas)^{3, 9,10}.

2.2 Promotores de crecimiento.

Los promotores del crecimiento son aditivos que requieren mayor control en su utilización, ya que deben administrarse según indicaciones del fabricante y de acuerdo al tipo de sustancia utilizada, respetando los periodos de retiro antes del sacrificio ^{11,12}.

Lamentablemente se han registrado evidencias de prácticas inadecuadas, utilizados en forma indiscriminada sin respetar las dosis estipuladas y los tiempos de retiro antes del sacrificio, esto refleja un riesgo de salud pública, provoca ETA's (enfermedades transmitidas por alimentos), que son enfermedades originadas por la ingestión de alimentos contaminados con microorganismos o sustancias tóxicas, y que representan actualmente uno de los riesgos sanitarios más frecuentes que enfrenta la población, se pueden presentar con padecimientos agudos o crónicos y de corta o larga duración. La exposición crónica se asocia principalmente a sustancias químicas como los aditivos que pueden dañar a mediano o largo plazo la salud del consumidor¹¹.

El grado de exposición de una población a los efectos adversos por el consumo de alimentos depende de la frecuencia con la que éstos se encuentren contaminados, y la magnitud del daño dependerá del grado de patogenicidad/toxicidad de las sustancias involucradas y de la susceptibilidad de las personas.

Otro factor de importancia son los patrones de consumo de la población, los cuales están relacionados con las preferencias del consumidor, aspectos socioeconómicos, regionales y culturales, características étnicas, estacionalidad, diferencias de edad y de comportamiento.

En animales productores de carne se utilizan como aditivos las hormonas anabólicas (esteroides, andrógenos y estrógenos) que al ser administradas en los animales destinados para abasto, causan retención de nitrógeno corporal, debido a la interacción de estas sustancias con los receptores androgénicos, que provocan una reducción en la degradación de proteínas musculares y aumento de la síntesis proteica obteniendo como resultado una mejora en la conversión alimenticia; lo que se traduce en un aumento de peso diario ¹³.

El estrógeno natural más activo es el estradiol, que modifica los patrones de crecimiento. A partir de 1930 se han producido otros estrógenos de naturaleza sintética en laboratorio; siendo uno de estos el dietilestilbestrol que adquirió gran relevancia por las consecuencias prácticas que se obtenían al utilizar esta hormona. Posteriormente se demostró que esta sustancia producía efectos carcinogénicos en animales de laboratorio; por tal motivo su uso se prohibió en México en el año de 1980 ^{9,13}.

Otras sustancias utilizadas como promotores del crecimiento son los antibióticos, cuyo propósito es modificar la microflora del rumen. Los principales antibióticos aceptados para uso en animales de abasto son; avopracina, bambermicina, virgiamicina, monensina y lasalocida ^{3,9,13}. Al igual que las hormonas se prohibió el uso de algunas sustancias como la tetraciclina, clortetraciclina, oxitetraciclina, lincomicina, penicilina, estreptomina y tilosina, el primero de julio de 1976 y que fueron incluidas en una lista publicada de aditivos no autorizados en Francia ^{9,13}.

La familia de los aditivos utilizados en la alimentación animal para aumentar la ganancia diaria de peso individual del animal así como mejorar la presentación del producto final (canal), son los adrenérgicos β -agonistas¹⁴.

Los β -agonistas son compuestos químicos del grupo de los beta-adrenérgicos, que confiere a cualquier producto, dilución o mezcla el carácter farmacéutico

específico de los mismos, con efectos de promoción de la masa muscular, reductor de la cantidad de grasa corporal y broncodilatador¹⁵.

Los β -agonistas se han utilizado en medicina veterinaria para el tratamiento de afecciones respiratorias por su acción broncodilatadora en equinos y como tocolíticos en bovinos y ovinos en el proceso del parto tardío o en corrección de distocias; al mismo tiempo son considerados desde 1983 como “mejoradores de la calidad de la canal” por disminuir la cantidad de grasa en la misma. Las sustancias que componen esta familia son: Zilpaterol, Ractopamina, Cimalterol, Isoproterenol y Clenbuterol, este último se sitúa en el centro de diversas controversias, por su uso inadecuado, que ha ocasionado su prohibición en México, ya que el aumento en la demanda de carne magra se ha incrementado en los últimos años^{16,17}.

Debido al efecto anabolizante que ejerce el clenbuterol, se comenzó a utilizar en la alimentación del ganado bovino para obtener un aumento en la masa muscular en los animales^{7, 16, 18}.

El uso de estas sustancias en la engorda de animales de abasto tuvo su inicio en el año 1970. En esta misma década el mal empleo de estos aditivos, produjeron las primeras intoxicaciones tanto en Estados Unidos como en Europa.

Al día de hoy estas sustancias anabólicas se siguen empleando como aditivos en la alimentación animal, para mejorar el rendimiento en canal de varias especies domésticas entre los que destacan el clenbuterol, zilpaterol y ractopamina.

2.3 ¿Qué es el clenbuterol?

Es una sustancia anabólica, β -agonista, considerado como un potente broncodilatador, y agente lipolítico, glicolítico y glucogénico en muchas

especies^{7,19,20,21}. Produce una distribución de los nutrientes hacia las vías metabólicas, aumentando la síntesis y depósito de proteínas (retención de nitrógeno) del animal y por consecuencia disminuyen la acumulación de materia grasa en los tejidos^{22, 23}.

Los efectos metabólicos de este compuesto, alteran la composición corporal de ganado destinado a la producción de carne durante su crecimiento, debido a que la energía ingerida altera metabólicamente diversas funciones, y por lo tanto a esto se le conoce como redistribución de la energía, ya que esta, se muestra disponible para la nueva formación de tejido (especialmente visible en los cuartos traseros de los animales) y en una disminución de la deposición de grasa corporal. Al mismo tiempo, provocan una relajación de los músculos lisos de los bronquios, vasos sanguíneos, vías genitourinarias y tracto gastrointestinal^{7,24,25}.

La administración de clenbuterol a dosis diez veces mayor a la indicada como terapéutica, presenta una acción anabolizante y actúa como modulador del crecimiento en bovinos, ovinos y porcinos ya que ejerce su acción selectivamente sobre los receptores del subtipo β , localizados principalmente en el tejido adiposo y muscular, promoviendo el incremento del músculo esquelético y la disminución de la grasa corporal, observándose mayores rendimientos en la canal, lo cual favorece la síntesis de proteína y disminuye la grasa^{16,25,26}. Administrado por periodos largos produce un crecimiento compensatorio²⁷.

Sin embargo el mejoramiento de la misma no es lineal a la dosis administrada, en cantidades mayores se afecta el bienestar animal causando aumento en la presión sanguínea, aumento arterial de oxígeno y glucosa además de taquicardia durante 24 horas después de su administración^{16,17,25}.

El Clenbuterol es un β -adrenoceptor que tiene un potente efecto bronquiolítico, por acción preferencial en los β adrenoceptores en el músculo, que resulta en la

relajación del músculo liso bronquial y en un descenso en la resistencia del paso del aire. Así mismo, a través de uniones selectivas con los β adrenoreceptores de la membrana celular del músculo liso uterino, ocurre relajación del útero (tocólisis)⁷.

El clorhidrato de clenbuterol es una arilamina de acción prolongada cuyo nombre químico es 4-amino-3,5 dicloro- α -terbutil-aminometil-bencil alcohol¹⁶. Es un simpaticomímético sintético del grupo de las fenetanolaminas, la dosis terapéutica óptima para producir una notoria broncodilatación es de 0.8mcg/kg/dos veces al día/cinco días, en bovinos y equinos; estas sustancias que como grupo requieren la presencia de un anillo aromático, con un grupo hidroxilo en la posición β del grupo alifático para mostrar actividad^{16,17}. Con excepción de la dobutamina, las catecolaminas naturales del organismo (epinefrina y norepinefrina) son muy similares a los agonistas (β -AR). Sin embargo el clenbuterol como todos los agonistas β -AR muestran importantes diferencias en las actividades intrínsecas, lo cual se debe a las características de los grupos sustituyentes⁷.

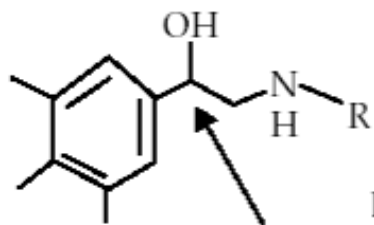


Fig. 3 Estructura general de las fenetanolaminas.

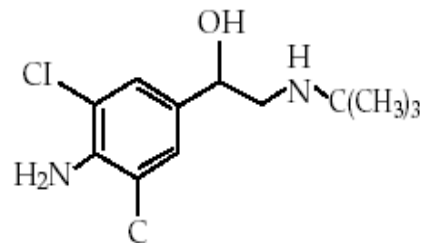


Fig. 4 Estructura del clenbuterol.

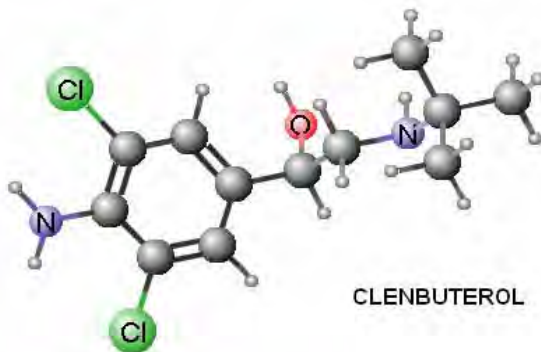


Fig. 5 Molécula de clenbuterol:
Peso molecular: 277.19 g/mol
Formula molecular: C₁₂H₁₈Cl₂N₂O
Nombre químico: 4-amino 3,5 dicloro- α -terbutil-aminometil-bencil alcohol.

2.4 Mecanismo de acción de los agonistas β -AR.

Este compuesto ejerce su efecto al activar a los receptores β -adrenérgicos específicamente del subtipo β de los tejidos adiposos¹⁷.

En general su mecanismo de acción se lleva a cabo cuando se pone en contacto con el receptor específico formando un compuesto agonista-receptor, este llega hasta las células del músculo. Ya que es una molécula de tamaño muy grande esta no puede pasar por la membrana plasmática celular, así que necesita un receptor que responde a las señales externas y actúan mediante proteínas G y GTP (por medio de un transporte activo). Estas proteínas G están formadas por tres sub unidades (α, β, γ). En ausencia de hormonas la Gs se encuentra en forma de GDP inactiva. La unión del compuesto al receptor induce el intercambio de GTP (debido a que el clenbuterol funciona como una hormona anabólica dentro del cuerpo) y este complejo se une a la proteína Gs α , produciendo así la liberación de GDP y permitiendo la unión del GTP. Así la Gs α – GTP activa a la adenil-ciclase, lo que altera la concentración de AMPc, el cual se sintetiza a partir de ATP por la enzima adenil-ciclase y es continuamente degradado mediante la fosfodiesterasa de AMPc.

El AMPc promueve la activación de lipasas en el adiposito para posteriormente liberar ácidos grasos a la sangre. A medida que se produce el AMPc, este se une a una subunidad reguladora inhibidora cinasa proteica-A, que provoca la separación de la subunidad, dejando libre la subunidad catalítica de la proteína Cinasa-A, para fosforilar las proteínas efectoras, que utilizan el ATP como fuente de grupo fosfatos de energía. La fosforilación de estas proteínas efectoras, puede incrementar o inhibir su actividad y por lo tanto inician una respuesta celular.

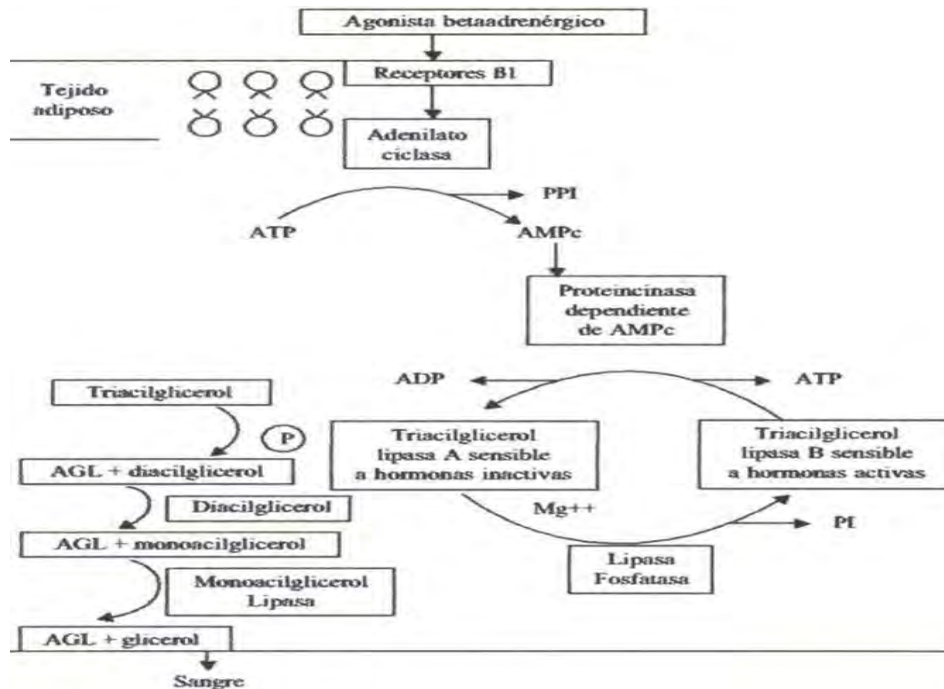


Fig. 6 Mecanismo de acción de los beta-agonistas ¹⁷.

Los β -agonistas poseen efectos muy marcados sobre el metabolismo de proteínas y lípidos, que se traducen en una hipertrofia muscular. El mecanismo de la síntesis proteica, se inicia por activación de los aminoácidos con ATP y una enzima específica para cada aminoácido, separándose dos moléculas de ácido fosfórico.

La segunda etapa del proceso incluye la transferencia del aminoácido, activado a una molécula de RNAt. Estas son pequeñas moléculas de ácido nucleico. La tercera etapa, incluye la transferencia de aminoácidos unidos a t-RNA de los ribosomas (lugar donde se lleva la síntesis de proteína dentro de la célula) del citoplasma celular, tanto las moléculas de RNAt como las de RNAm se unen a los ribosomas para lograr la síntesis de un polipéptido a partir de los aminoácidos transportados por el RNAt^{28,29}.

2.5 Propiedades físicas

El clenbuterol se puede encontrar en estado sólido y líquido. En sólido es un polvo incoloro, muy soluble en agua, metanol y etanol, ligeramente soluble en cloroformo o como sustancia líquida de color blanco amarillento, con un punto de fusión de 174 °C, soluble en agua, metanol y etanol y muy soluble en cloroformo. Es estable en agua caliente (100 °C) y en aceite caliente (260 °C), por lo que no se descompone con los procesos de ebullición, rostizado, freído ni en microondas^{30,31}.

2.6 Inocuidad y calidad.

La calidad e inocuidad de los alimentos siempre ha sido un factor de preocupación permanente a nivel internacional; se pueden considerar varios aspectos como son: nutricional, residuos químicos, residuos físicos, microbiológicos (virus, bacterias hongos, parásitos)³².

La utilización de clenbuterol durante la engorda del animal, ocasiona una disminución del 20 al 30 % de grasa en el ganado, así como un aumento de proteína del 13 % en la región del costillar, prevaleciendo dicho efecto si se administra por periodos largos (más de 30 días) y hasta el sacrificio. También se ha reportado que disminuye la calidad de la carne (terneza) ^{32,33}.

La calidad de la carne en canal, se ve afectada cuando a esta se le ha administrado clenbuterol previo al sacrificio, ya que la proteína en músculo aumenta y la grasa disminuye, así aumenta el % de masa muscular entre el 6 y 18% al mismo tiempo que promueve la disminución de grasa.

Antes del sacrificio la concentración de glucógeno disminuye esto a su vez limita la acidificación (pH de 0.3 a 0.4) de la carne *postmortem*, como resultado de las concentraciones de ácido láctico en el músculo y la baja concentración del pigmento hemo que produce el oscurecimiento de la carne, a lo que se le denomina carne DFD (oscura, firme y ceca)^{34,35}. Debido a que aumenta la cantidad de agua en la canal de los animales tratados con clenbuterol asociada al aumento de proteínas, durante el almacenamiento de la canal se da una excesiva pérdida de agua por goteo³², así la carne se deteriora más rápido debido a que el pH es mayor favoreciendo así a la contaminación microbiana afectando así la inocuidad del alimento.

Durante el proceso de almacenamiento la carne que contiene residuos de beta agonistas, presenta un acortamiento de las fibras musculares por el frío, esto debido a la reducción de grasa en la canal, provocando que esta se enfríe más rápido durante el proceso de maduración y por consiguiente la carne se vuelve más dura³².

Este endurecimiento de la carne se relaciona con el aumento en la cantidad de colágeno insoluble³⁶ que aumenta la producción de tejido conectivo³². Se ha demostrado que los beta agonistas interfieren reduciendo las acciones del sistema enzimático de las calpaínas; estas son responsables de la proteólisis *post mortem* que resulta en el ablandamiento de la carne y el calcio, causa debilitamiento o degradación de los discos Z al activar las calpaínas^{37,38}, así la proteólisis se ve disminuida debido a los bajos niveles de calcio existentes en el músculo *post mortem*^{14, 37,38}.

También se dan cambios en las miofibrillas musculares durante los procesos de maduración debido a las enzimas proteolíticas: los lisosomas contienen enzimas con gran actividad proteolítica como las catepsinas, que participan en el

ablandamiento de la carne; estas enzimas son activadas en el músculo *postmortem* al disminuir el pH^{14,32,37}.

Las catepsinas lisosomales tienen un efecto conjunto con las calpaínas del músculo, lo que se llama sistema calpaína/calpastatina, donde la calpastatina es un inhibidor de la capacidad proteolítica³². Durante la cocción la carne puede tardar más en cocerse, ya que requiere mayor temperatura debido a su elevado pH además de presentar una pérdida excesiva de agua.

La reducción de la grasa en la carne, conlleva a una disminución en el sabor. Ramos *et al.*, (2002) menciona que probablemente también disminuya su digestibilidad y el valor nutricional.

2.7 Dosis.

En los humanos, la dosis terapéutica del clenbuterol necesaria para producir un efecto broncodilatador es de 10, 20 y hasta 40mg/adulto, con una vida media de 34 horas, el efecto puede tener una duración de 8 a 12 horas tanto a nivel de vías aéreas centrales, así como periféricas de pequeño calibre. Su absorción por vía oral es rápida entre 15 y 45 minutos, alcanza niveles máximos en plasma 1 a 4 horas después de ser administrado³⁹, su eliminación se realiza en forma bifásica. La fase de eliminación corta (curva alfa) con vida media de una hora y la fase prolongada (curva beta) rebasa la fase corta con una vida media de 3 a 6 horas. La eliminación se realiza predominantemente por vía renal⁴⁰.

La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) ha establecido límites máximos permisibles (LMP) en cuanto a la dosis terapéutica administrada al ganado bovino y al consumo por el humano de carne o hígado de bovino; estableciendo como dosis terapéutica de 0.8µg/kg de peso corporal del animal y un límite máximo de

residuos en músculo recomendado de 0.2µg/kg y 0.6µg/kg en hígado; no señala una cifra de ingesta diaria admisible⁴¹. Para calcular el límite máximo permisible, es necesario conocer la ingesta diaria admisible (Admissible Daily Intake ADI)⁷, utilizando como factor de ADI un total de 300 g de carne o hígado; el valor de la ADI sería de 0.04µg/kg/día⁴² equivalente a 2.4mg/día para una persona de 60kg. Por seguridad el valor de la ADI se reduce (10 veces) según lo determinado por Boenisch *et al.* (1993), quedando en 4.1 ng/kg/día, considerando a un humano con un peso de 60 kg⁴³.

En base a los LMR que han establecido diversas organizaciones a nivel mundial se puede decir que la ADI sería aproximadamente de 0.235µg, sobre una base de consumo diaria de 300g de carne y 100g de hígado⁷.

La exposición de los humanos por consumo de carne o hígado contaminados con clenbuterol, cuando el período de retiro *ante-mortem* de este fármaco no ha sido suficiente para que los residuos desaparezcan totalmente los productos cárnicos en cuestión, ha dado lugar a diversos casos de intoxicaciones en diferentes países.

Para evitar efectos colaterales en el consumidor se deben aplicar y respetar los tiempos de retiro *ante-mortem*, algunos autores recomiendan 4 semanas de retiro previo al sacrificio^{7,42} siempre y cuando las dosis administradas hayan sido las convencionales para mejorar el rendimiento de la canal, ya que en algunas ocasiones al tratar de obtener un rendimiento aún más elevado en la canal, los productores o engordadores administran de 5 y hasta 10 veces más la dosis promotora de crecimiento (0.8µg/kg) que se podría considerar como óptima⁷.

Algunos de los síntomas que se han reportado por intoxicación debido al consumo de productos cárnicos contaminados con clenbuterol son: dilatación de pupilas,

dolor de cabeza, palpitaciones, diarrea, tremores distales, disnea, nauseas y vomitos^{27,44,45,46,47,48}.

2.8 Uso en animales.

Una vez administrado, dentro del organismo se deposita en varios órganos en diferente proporción, siendo la mayor concentración en riñón, ojo, hígado, pulmón, estos tejidos pueden ser un riesgo a la salud al ser consumidos, pues se encuentran dentro de la dieta del mexicano¹.

A pesar de su prohibición, su utilización ha ido incrementando en los últimos años, algunos ganaderos ocultan su uso cuidando los plazos de retiro antes de enviar a sus animales al sacrificio, ya que se almacena en retina, plasma, hígado, músculo, se excreta en orina; como caso particular cabe mencionar que en la retina no desaparece, permaneciendo durante toda la vida del animal y aún después de muerto, debido a que el compuesto se fija en la melanina presente en el humor acuoso y vítreo, así mismo los animales con piel oscura retienen mayores cantidades de residuos por la presencia de melanina en estos tejidos a diferencia de otros órganos^{7,24,32}.

Se piensa que su adhesión a la melanina contenida en ojo (retina y uvea) es debido a que los β -agonistas se unen a la rodopsina (fotopigmento llamado púrpura visual), que es el principal componente de los bastones y se encuentra presente en el cabello, en ambos sitios este fotopigmento es parecido a los β -receptores^{33,35}.

Se estima que el tiempo de eliminación en el del Clenbuterol es de la siguiente manera^{27,49,50,51}.

- o Hígado – 56 días
- o Retina – no se elimina
- o Riñón – 17 a 21 días
- o Músculo – 6 a 7 días
- o Pelo – hasta que el animal mude el pelo
- o Orina – 17 a 21 días
- o Suero – 3 días

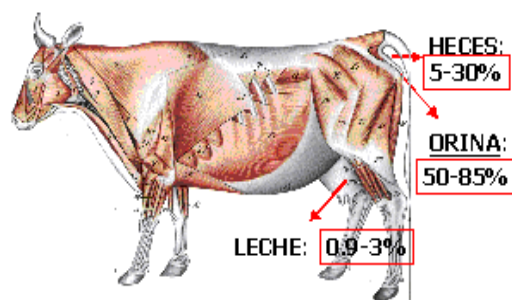


Fig. 7 Excreción del clenbuterol en bovino (4 a 15 días después de su aplicación).

El clenbuterol se utiliza generalmente en bovinos, con resultados satisfactorios al aumentar el volumen de masa corporal del animal, también se ha probado en cerdos, ovejas y aves de corral, pero se han obtenido resultados poco satisfactorios^{18,19}. Sin embargo es un tanto peligroso para la salud pública y representa un acto ilegal⁷.

2.9 Marco legal nacional.

A principios del año 2000 se presentaron casos de intoxicación en humanos por consumo de hígado y músculo de res contaminados con Clenbuterol en varios estados de la República Mexicana: Jalisco, 15 brotes con 65 casos; Distrito Federal, 4 brotes con 21 casos; Estado de México, 3 brotes con 17 casos; Hidalgo,

1 brote con 6 casos; Guanajuato, 2 brotes con 9 brotes; Querétaro, 1 brote con 11 casos; Michoacán, 1 brote con un caso^{1,52}.

A partir de este año se han registrado 192 brotes de intoxicaciones por el consumo de carne o hígado contaminado con clenbuterol 1,300 casos⁵³, llegando a un total de 2,037 casos para el año 2007, según el Senado de la Republica marzo 2009⁵⁴.

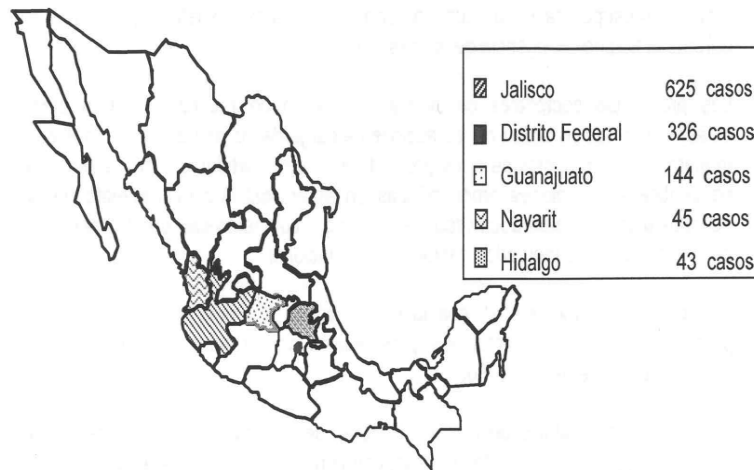


Fig. 8 Principales estados que han presentado casos de intoxicación por consumo de carne contaminada con clenbuterol 2002-2006.

Ante esta problemática, la Secretaría de Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) ha generado estrategias que pretenden evitar su distribución y utilización en la finalización de ganado destinado al abasto, para evitar estos riesgos. En marzo 1º de 2002 en el Diario Oficial de la Federación, se publicó la Norma Mexicana de Emergencia NOM-EM-015-ZOO-2002, misma que tiene el propósito de establecer las especificaciones técnicas para el control del uso de beta-agonistas en los animales.

El 25 de Marzo del 2002 se activó el Dispositivo Nacional de Emergencia de Sanidad Animal, el cual declara el interés zoonosanitario y de inocuidad alimentaria por el uso indebido del producto denominado Clorhidrato de Clenbuterol, ambas regulaciones ejercidas a nivel nacional.

Por su parte la Secretaría de Salud del Gobierno del Distrito Federal (SSA) en conjunto con la SAGARPA y la Comisión Federal para la Prevención de Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), y la Procuraduría General de Justicia (PGJ) han implementado en corrales de engorda, rastros y lugares donde se expenden alimentos, programas a nivel nacional de control con muestreos de rutina.

El Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-065-ZOO-2003 define como β -agonista no autorizado al compuesto químico del grupo de los β -adrenérgicos que confiere a cualquier formulación, dilución o mezcla el carácter farmacéutico específico de los mismos, con efectos de promoción de la masa muscular, reductor de la cantidad de grasa corporal y broncodilatador, que se comercializa o administra a los animales sin contar con la autorización de la SAGARPA⁵⁵.

Cabe mencionar que dicha norma aún se encuentra en revisión por la Comisión Federal de Mejora Regulatoria (COFEMER) y por lo tanto aún no se está aplicando, ya que para que esto suceda cualquier norma debe ser publicada en el Diario Oficial de la Federación, aunque al parecer debido a los acontecimientos que presentan intoxicaciones en varias partes del país, registradas en los últimos meses, se le está dando prioridad a este asunto, además de los recientes trabajos realizados en la cámara de diputados sobre la prohibición de este fármaco. Como parte de las acciones conjuntas del gobierno mexicano para eliminar el uso de clenbuterol en nuestro país, a partir del año 2006 el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) ha implementado un programa en varios estados de la República llamado “proveedor confiable”, dicho programa

consiste en un esquema de muestreo con cierta periodicidad en la unidad de producción mediante una técnica simple, para la detección de clenbuterol, otorgando al ganadero una certificación de ganado libre de clenbuterol y que además da un valor agregado al producto final. Dicho programa ha sido implementado de forma gradual en algunos estados de nuestro país.

Es así como el uso ilegal del clenbuterol se ha convertido en un problema muy grave que presenta consecuencias nocivas en la salud humana, que año con año el Senado de la Republica trabaja con el objetivo de conseguir su prohibición, pero no solo del que lo usa también de quien lo fabrica.

De acuerdo a lo estipulado en la Norma Emergente Oficial Mexicana NOM-EM-015-ZOO-2002, "Especificaciones técnicas para el control del uso de beta agonistas en los animales", se establecen los tipos de muestra y especificaciones para cada una de ellas, además de los métodos de identificación que son clasificados en métodos de detección y de cuantificación, y de los confirmativos, siendo las pruebas oficiales el ensayo inmunoenzimático y como prueba confirmativa la técnica cromatografía de líquidos de alta resolución y cromatografía de gases⁵⁶.

La Técnica Enzimática de inmunoensayo manejando el Kit Ridascreen Clenbuterol Fast ® (Bio-pharm), es establecida por la NOM-EM-015-ZOO-2002 para proporcionar una metodología rápida y específica para detección de Clenbuterol y otros β -agonistas en muestras de: orina, músculo, hígado, retina, pelo, alimento, leche⁵⁶.

En el punto (4.11.5) de la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-061-ZOO-1999, Especificaciones zoosanitarias de los productos alimenticios para consumo animal, se menciona que el Clenbuterol es una sustancia de uso prohibido y suele utilizarse en forma clandestina para incrementar el volumen de la masa muscular en el ganado⁵⁷.

En la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-194-SSA1-2004, Productos y Servicios. “Especificaciones sanitarias en los establecimientos dedicados al sacrificio y faenado de animales para abasto, almacenamiento, transporte y expendio”. Especificaciones sanitarias de productos⁵⁸. Que fue publicada en el Diario Oficial el 18 de septiembre de 2004 y entro en vigor en el año 2005. Describe que los productos de bovino deben estar libres de Clenbuterol, en el apartado de Contaminantes (6.10.5), así mismo en el punto 8.6 especifica que el método de prueba empleado será el ensayo inmunoenzimático.

La nueva Ley Federal de Sanidad Animal publicada en el Diario Oficial de la Federación el 23 de julio del 2007 en el Título Sexto “Del control de productos para uso o consumo animal, establecimientos y actividades y servicios”, capítulo 1 Del control de productos para uso o Consumo Animal, Artículo 19.- dice “que la Secretaria estará facultada para determinar, evaluar, dictaminar, registrar, autorizar o certificar”. Inciso IV. Los límites máximos de residuos permitidos de antibióticos, compuestos hormonales, químicos, tóxicos y otros equivalentes, en bienes de origen animal destinados para consumo humano, así como el tiempo de retiro de estas sustancias en animales vivos. Y en el artículo 92 menciona que “la Secretaría determinará aquellos productos para uso o consumo animal que por sus condiciones de inocuidad, eficacia y riesgo requieran de registro o autorización. Los requisitos y procedimientos para el otorgamiento y uso de los registros o autorizaciones a que se refiere este artículo, se establecerán en el Reglamento de esta Ley”⁵⁹.

En el Artículo 93 se establece que la Secretaría publicará en el Diario Oficial de la Federación el listado de las sustancias y productos cuyo uso o consumo en animales estén prohibidas.

Por otra parte en el artículo 95 menciona que la Secretaría expedirá disposiciones de sanidad animal en las que determinará las características y especificaciones

zoosanitarias que deberán reunir: en el tiempo de retiro de antibióticos, antimicrobianos, compuestos hormonales, químicos, plaguicidas y otros en animales vivos, los límites máximos de residuos permitidos de los mismos en bienes de origen animal, así como el Programa de Monitoreo de Residuos Tóxicos⁵⁹.

Por último en el Artículo 174 establece que “Al que ordene el suministro o suministre a animales destinados al abasto alguna sustancia o alimento prohibidos a los que se hace alusión esta Ley y demás disposiciones de salud animal, será sancionado con tres a siete años de prisión y de diez mil a cincuenta mil días de salario mínimo de multa”⁵⁹.

En el proyecto revisado por las diferentes dependencias de gobierno y organizaciones privadas involucradas, para la elaboración del Reglamento de la Ley Federal de Sanidad Animal se hace solo mención a lo siguiente respecto al uso de sustancias prohibidas:

Artículo 286. De conformidad con lo dispuesto en el Artículo 6º fracción LXVIII, de la Ley, el SENASICA expedirá criterios técnicos, que sirvan de base para la aplicación, registro, control, inspección y verificación de buenas prácticas pecuarias primaria, así como buenas prácticas de manufactura, Procedimientos Operacionales Estándar de Saneamiento o Análisis de Riesgos y Control de Puntos Críticos y otros que determine la Secretaría en los establecimientos TIF, además de: inciso VIII. Programas de muestro aleatorio de clenbuterol⁶⁰.

Y en el Artículo 230. Con fundamento en el artículo 93 de la Ley, el SENASICA publicará el listado de las sustancias o productos cuyo uso o consumo en animales esté prohibido o restringido⁶⁰.

Se clasificará un principio activo prohibido o restringido considerando lo siguiente:

- I. Cuando posterior a su revisión, y de ser necesaria su constatación, se determine que representa un riesgo zoonosario.
- II. Cuando no cuenten con el soporte técnico científico para establecer su tiempo de retiro bienes de origen animal.
- III. Aquellos ingredientes activos de nuevo desarrollo que no cuenten con el soporte técnico-científico que respalde su eficacia y seguridad para su empleo en animales.
- IV. Aquellos que por recomendación de Organismos Internacionales reconocidos hayan sido restringidos o prohibidos por razones zoonosarias.
- V. Aquellos que por sus características de uso representen un riesgo importante a la salud animal y humana por el uso indebido, los desvíos de uso y el abuso de los mismos.

2.10 Marco legal internacional.

En 2008 la FAO llevó a cabo la revisión del Reglamento Internacional de Salud Animal del 2005, algunos de los temas revisados fueron el clenbuterol en carne de cerdo⁶¹.

En el Código Federal de Regulación (CFR) del USDA, título 21 Food and Drugs. Capítulo 1: Food and Drugs Administration Department of Health and human Services. Sección 530.41 Subchapter E, Animal Drugs, Feeds and Related Products se establece que “queda prohibido el uso de fármacos y sustancias en alimentos para animales y animales destinados a la alimentación humana; el uso de clenbuterol, entre otros”⁶².

En la Unión Europea, el Reglamento (CEE) n° 2377/90 del Consejo de 26 de junio de 1990 establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal. Se establecen los límites máximos permisibles solo en el uso de clorhidrato de clenbuterol empleado de forma terapéutica, donde dice que para músculo el límite no debe sobrepasar 0.1 µg/Kg, para hígado y riñón 0.5 µg/Kg⁶³.

Por otro lado la Organización Mundial de la Salud indica un límite máximo permisible de no más de 220ppt en músculo de bovino⁶⁴.

La Comisión del Codex Alimentarius, Límites Máximos de Residuos para Medicamentos Veterinarios en los Alimentos, actualizado en la 29a Sesión de la Comisión del Codex Alimentarius Commission (Julio 2006) estableció los siguientes parámetros: Ingesta diaria admisible: 0-0.004 µg/kg de peso corporal, en músculo 0.2 LMR (µg/kg), en hígado 0.6 LMR (µg/kg) debido a la posibilidad del uso indebido de este medicamento, sólo se recomiendan los LMR cuando estén relacionados con un uso terapéutico aprobado en el ámbito nacional, tal como la tocólisis o como una terapia complementaria en las enfermedades respiratorias⁶⁵.

2.11 Métodos de detección.

Para la identificación de residuos del Clenbuterol se han desarrollado métodos analíticos de cuantificación en base al estudio de muestras de tejidos: hígado, riñón, músculo, grasa, suero sanguíneo, orina, bilis, pelo, retina y alimentos para animales. Siendo hígado y ojo las muestras más significativas para la detección de concentraciones residuales de este fármaco.

Los métodos analíticos resultan de gran importancia para monitorear abusos en el uso de clenbuterol²⁷.

La Norma Emergente Oficial Mexicana NOM-EM-015-ZOO-2002, “Especificaciones técnicas para el control del uso de beta agonistas en los animales”, establece los tipos de muestra y especificaciones para cada una de ellas.

En el Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-065-ZOO-2003, “Especificaciones técnicas para la erradicación del uso de beta-agonistas no autorizados en los animales” los métodos de prueba son clasificados en métodos de detección y de cuantificación, además de los confirmativos, siendo las pruebas oficiales el ensayo inmunoenzimático, cromatografía de gases y cromatografía de líquidos de alta resolución como confirmatorias.

La Técnica Enzimática de Inmunoensayo (ELISA) manejando el Kit Ridascreen Clenbuterol Fast ® (Bio-pharm), establecida en la NOM-EM-015-ZOO-2002. Proporciona una metodología rápida para detección de Clenbuterol y otros β -agonistas en muestras de: orina, músculo, hígado, retina, pelo, alimento y leche.

Es una técnica espectrofotométrica, basada en el principio de la reacción antígeno-anticuerpo^{47,70}. Una vez realizada la extracción y purificación de la muestra, el conjugado clenbuterol-enzima compite por los sitios de unión de los anticuerpos adheridos en los pozos con el clenbuterol contenido en las muestras o estándares, haciendo evidente la reacción inmunológica por medio de la adición de un sustrato y una sustancia cromógena. La reacción enzima-sustrato-cromógeno genera un producto de color azul. Esta reacción se detiene con el reactivo de paro de la reacción, el cual produce un cambio de la coloración azul a amarillo. La densidad óptica (DO) es inversamente proporcional a la concentración de clenbuterol^{47,70}.

Esta técnica es una herramienta para el tamizado simultáneo de los β - agonistas con una molécula de terbutil o isopropil ligada al grupo amino. El grupo metílico más pequeño no presenta afinidad por la epinefrina, esto quiere decir que la prueba de ELISA no resultará positiva frente a los β -agonistas corporales como es la epinefrina¹. Por otra parte el anticuerpo es suficientemente no específico para la detección de un gran número de compuestos sustituidos solo en el anillo aromático. Sin embargo el puente heterológico interno del antígeno y el marcador son necesarios para obtener una mayor sensibilidad²⁵.

La técnica de ELISA es una de las más rápidas y sensibles que permite el análisis de varias muestras en poco tiempo, una de sus ventajas es el bajo costo de los reactivos; es considerada como prueba tamiz. Sin embargo, una de sus principales limitantes es que la prueba forma reacciones-cruzadas con fármacos cuya estructura química es similar al Clenbuterol (como Bromuterol, Terbutalin, Salbutamol, Cimalterol, Adrenalina, entre otros). Por lo que se considera como un método muy sensible pero poco específico.

El método confirmatorio considerado como el más confiable actualmente para la detección de clenbuterol es la cromatografía líquida de alta resolución con detector de masas (HPLC/MS), este método se practica en los laboratorios de referencia autorizados en México para el análisis de clenbuterol, el procedimiento consiste en llevar a cabo una fragmentación de la partícula de clenbuterol induciendo la pérdida de una molécula de agua en el grupo hidroxil bencílico y el cambio de un átomo de hidrógeno del grupo metílico de la amina secundaria protonada, seguido por la pérdida de la mitad alquena n-sustituida. Ocurriendo un golpe en la célula que provoca que esta sea reducida a pequeñísimas partículas en las distintas fases²⁷.

El detector de masas es capaz de mostrar partículas de tamaño mínimo por debajo de los 2 micrones, detectando y escaneando picos muy angostos de la molécula; así como de las fracciones de la molécula una vez que se ha hecho el bombardeo con los iones²⁷.

Esta técnica posee una alta resolución sensibilidad y especificidad ya que nos da el peso molecular de los compuestos.

Sin embargo este método requiere de una extrema precisión del analista durante su procedimiento y más tiempo de dedicación. Debido a esto actualmente se han desarrollado técnicas alternativas donde se utiliza la HPLC y que además funcionan con detectores específicos, para el caso de este estudio se utilizaron el detector ultravioleta y de fluorescencia.

La técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución con detector ultravioleta (HPLC/UV), es un simple y rápido método de detección de clenbuterol, ya que no necesita la derivación y se puede llevar a cabo con una fase inversa rápida⁶⁹. La detección de β -agonistas por HPLC/UV habilita a los mediadores de los cromógenos en algunos compuestos que absorben altamente los rayos UV. En el caso del clenbuterol la cantidad mínima detectable por HPLC/UV es de hasta 1ppm (mg/kg o $\mu\text{g/g}$)⁶⁹.

Los detectores de absorbancia son dispositivos de doble haz, uno de los haces pasa por la cubeta de flujo y el otro a través de un filtro que reduce su intensidad; es un método que ya se ha empleado en la detección de clenbuterol y que posee una alta especificidad⁶⁹. La mayoría de los compuestos orgánicos pueden ser analizados por los detectores de UV.

Las bases fisicoquímicas para la prueba de identificación de clenbuterol con detector de luz ultravioleta (HPLC/UV) se establecen en los sistemas de extracción

con un buffer de fosfato de potasio al 0.02M y un disolvente orgánico polar. La limpieza de la muestra se lleva a cabo mediante un cartucho sep pak-C18 y es realizada con un pH controlado que oscila entre 2.8 a 9.3, la eliminación de la grasa se realiza con un disolvente orgánico (hexano) en pH alcalino, de igual forma que la limpieza final del extracto orgánico en pH controlado con éter terbutílico, finalmente la identificación de clenbuterol a una longitud de onda específica obtenida durante el escaneo de luz ultravioleta y la máxima absorción en 211 nm en longitud de onda. A estas condiciones fisicoquímicas se les conoce como sistemas de extracción, purificación y caracterización de máxima absorción en cierta longitud de onda específica (211nm)⁷³. El sistema de identificación del clenbuterol con luz ultravioleta tiene la característica de la selectividad en la separación en un sistema cromatografico de un líquido de mayor densidad (fase estacionaria) con un líquido de menor densidad fase móvil y la identificación en una longitud de onda específica obtenida durante el escaneo. Las condiciones de acoplamiento del tiempo de retención en los sistemas de integración de resultados, son un sistema de corroboración entre el estándar y la presencia del clenbuterol en el extracto de la muestra⁷³.

La cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de fluorescencia (HPLC/F) es una técnica cromatográfica que consta de un sistema isocrático, este sistema permite que la composición de la fase móvil permanezca constante a lo largo del proceso de elusión.⁷⁴ La separación cromatográfica se lleva a cabo en una columna C₁₈ (250 x 4.6 mm I. D.) y la derivación del compuesto fluorescente se realiza a nivel postcolumna donde se une el clenbuterol con el cromógeno (ortoftaldialdehído). Las condiciones fisicoquímicas se realizan mediante una bomba isocrática conectada con un conector en forma de T a la salida de la columna y antes del detector con un serpentín de 45cm. En este caso la detección se desarrolla con el detector de fluorescencia, explorando en el rango de 336-455

mm (excitación/emisión); conectado a una estación de integración, usando un software Total Chrom v. 5.1 y una impresora.

Las condiciones cromatográficas de la fase móvil consisten en una mezcla de acetonitrilo en buffer de fosfato de potasio al 0.02 M (25:75, v/v) ajustado en un rango de pH de 4.8 a 8.0. Este será desgasificado con un sistema de helio en línea, utilizando un filtro de membrana de 0.044 μm .

El desarrollo del método está basado en la reacción que se lleva a cabo con la derivación del grupo amino primario con el (OPA) en la presencia de 2-mercaptoetanol (ME); obteniendo un producto fluorescente como se señaló antes.

El 2-Mercaptoetanol es un líquido transparente, incoloro, con olor desagradable, su fórmula general $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{SH}$. Es miscible en agua y casi todos los solventes orgánicos comunes. Se produce por la reacción del gas de sulfuro de hidrógeno y óxido de etileno. Desnaturaliza las proteínas debido a sus propiedades de reducción fuerte mediante la reducción de puentes di-sulfuro y las divisiones o estructura de la proteína cuaternaria.

El ortoftaldialdehído (OPA) es un aldehído, su fórmula general es: R-CH=O donde el grupo R puede tener diversas características estructurales (saturado, insaturado, alifático cíclico, aromático) de estructura muy simple hasta muy compleja; su fórmula molecular es $\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_2$ con un peso molecular de 134.13. La Figura 11 muestra la fórmula estructural del Ortoftaldialdehído.

El OPA tiene un grupo carbonilo C=O y son catalogados dentro de un grupo muy extenso denominado "Compuestos Carbonílicos". Este grupo carbonilo presente en los aldehídos determina considerablemente sus propiedades físicas y químicas, el grupo carbonilo es también el responsable de la gran facilidad con que

intervienen en reacciones de adición nucleofílica ya que, debido a la gran atracción electrónica que ejerce el átomo de oxígeno, ocasiona una deficiencia electrónica en el átomo.

El OPA fue originalmente introducido como un reactivo alternativo a la ninhidrina en la postcolumna de derivación y suministró un significativo incremento en la sensibilidad. Los aminoácidos reaccionan con el OPA en presencia de un reductor fuerte, en condiciones alcalinas (pH 9 a 11), dando un compuesto fluorescente.

La derivación de los grupos aminos es una de las áreas de aplicación analítica de reacciones. Estos derivados son utilizados en distintos métodos analíticos, aplicados a compuestos aminos.

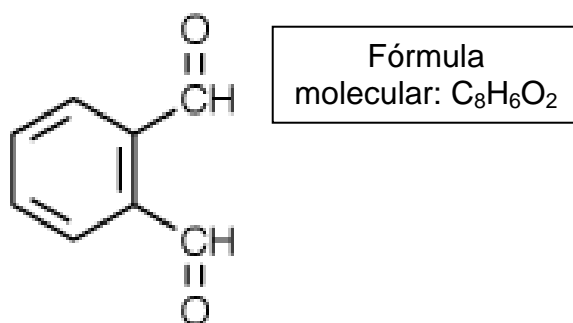


Figura 9. Fórmula estructural del Ortoftaldialdehido.

El límite de detección para HPLC/flourescencia (HPLC/F) se establece de acuerdo a la cantidad mínima detectable mediante el método de adición⁴⁷.

Los métodos de derivación son empleados para reducir la polaridad del grupo amino y mejorar el comportamiento de los compuestos.

Esta derivación del grupo amino es usada para activar la separación de estos compuestos, que de otra manera serian inseparables y confiere la detectabilidad por medio del análisis de HPLC⁷⁶.

La reacción de las aminas primarias no fluorescentes con los rendimientos derivados del reactivo intensamente fluorescente, son útiles en el análisis de HPLC. Así mismo ortoftaldialdehido (OPA), forma un derivado fluorescente con grupos amino primarios; se ha utilizado principalmente con derivación post columna en el análisis de los aminoácidos. El uso del ortoftaldialdehido tiene dos ventajas: una que es soluble en agua y que el resultado de la derivada potencialmente tiene mayor utilidad⁷⁶.

La identificación del clenbuterol se logra una vez que este, se convierte en un compuesto fluorescente debido a la unión con un fluorocromo. En el momento en que el clenbuterol sea identificado por el detector de fluorescencia, se incrementa la sensibilidad hasta mil veces con un derivado específico muy alto (hasta ppb ng/g o µg/kg).

El desarrollo de este método en la identificación del clenbuterol, ha logrado incrementar la sensibilidad hasta mil veces, así como su especificidad con la formación de un derivado fluorescente (ortoftaldialdehido); esto hace que se convierta en una técnica competitiva, de carácter específico al compararse con algunas características no deseadas en la técnica de ELISA. Este último método goza de una alta sensibilidad pero no de una alta especificidad por que se detectan al mismo tiempo varios beta agonistas (clenbuterol con sus congéneres)⁴⁷.

Este método se ha empleado para la identificación de varios compuestos, sin embargo en el caso de la detección de clenbuterol solo se tienen estudios preliminares.

En el estudio realizado por Gallegos (2005) la implementación y validación de la técnica de HPLC/F se hizo por ensayos del desarrollo del complejo clenbuterol – fluorocromo, molécula química que absorbe la luz a una determinada longitud de

onda (ENERGIA) de excitación y emite a una longitud superior (MENOR ENERGIA) interacciona con la luz de excitación procedente del láser⁴⁷. La cantidad de fluorescencia con la cual una célula se tiñe es proporcional a la cantidad de sitios de unión.

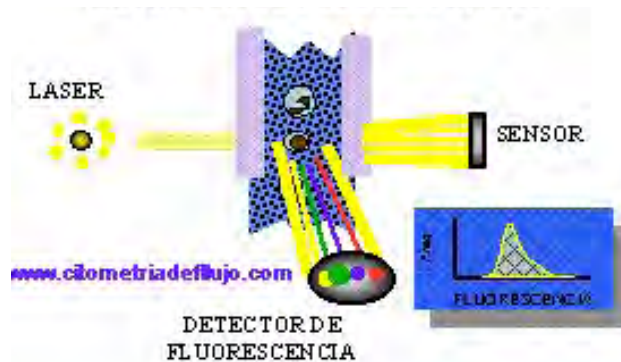


Fig. 10 Detector de florescencia.

Algunas otras técnicas que se pueden utilizar como confirmatorias son el radioinmunoanálisis (RIA), cromatografía en capa fina (CCF), electroforesis capilar, cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), cromatografía de gases (CG) y estas dos últimas con sus modalidades con acoplamiento a espectrometría de masas (MS)^{71,72}.

3. Hipótesis:

Los resultados del análisis para clenbuterol en muestras de hígado y músculo por la técnica de ELISA son similares a los obtenidos por cromatografía de líquidos.

4. Objetivos

Objetivo general:

El objetivo general de este trabajo fue analizar muestras de hígado y músculo de bovino por las técnicas de ELISA y cromatografía de líquidos de alta resolución para la identificación de clenbuterol.

4.1 Objetivos particulares:

- Evaluar la técnica de cromatografía de líquidos con detector de fluorescencia (CLAR/F) para la identificación de clenbuterol.
- Validar la técnica de cromatografía de líquidos con detector de luz ultravioleta (CLAR/UV) para el análisis de clenbuterol.
- Analizar comparativamente las concentraciones de clenbuterol obtenidas por la técnica de ELISA con las de HPLC/F/UV en muestras de hígado y músculo de bovino en expendios del centro de la Republica Mexicana.
- Identificar el riesgo de exposición de las personas de acuerdo a la cantidad de muestras positivas y la concentración de clenbuterol en estas al considerar el consumo diario y la vida media del clenbuterol en el organismo.

5. Material y métodos

Para el desarrollo del presente trabajo, el tamaño de muestra fue seleccionada al azar, es decir de acuerdo a la capacidad de análisis, la recolección de las muestras se realizó conforme a un programa de muestreo establecido para los expendios de carne de res existentes en cada una de las zonas, recolectando 80 muestras de hígado y 80 de músculo de bovino.

Los sitios de recolección se eligieron considerando los siguientes factores

- o Estados del centro del país
- o Mercados y expendios no formales
- o Antecedentes

Procedimiento de recolección.

- o Se ubicaron los principales expendios (mercados o carnicerías) de cada ciudad o municipio.
- o Se identificaron a las carnicerías que expenden carne de res.
- o En cada expendio se compró una porción aproximada de 100g de carne de res (bistec de bola) y/o hígado de bovino.
- o Al finalizar cada jornada de recolección las muestras fueron empacadas en bolsas con cierre hermético y fueron identificadas con un número consecutivo distintivo entre las muestras de hígado y las muestras de carne.

- o El manejo de las muestras se realizó de acuerdo a la NOM-110-SSA1-1994. Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.
- o El transporte se realizó siempre conservando la cadena de frío, hasta llegar al laboratorio.
- o En el laboratorio todas las muestras fueron pesadas y registradas en una hoja de cálculo capturando los siguientes datos (Fecha de recolección, # de muestra, peso, costo y lugar de recolección).
- o Posteriormente fueron depositadas en el congelador y almacenadas a -20°C hasta el momento en que se realizó el análisis.

Estas muestras fueron analizadas por la prueba de ELISA (método oficial) para clenbuterol, conforme al procedimiento que se emplea en el centro nacional de servicios en constatación en salud animal (CENAPA) en el laboratorio de residuos tóxicos; descrito en la referencia (ridascreen) a continuación:

Esta técnica se basa en el principio de la reacción antígeno-anticuerpo^{47,70}.

5.1 Identificación de clenbuterol por medio de la prueba de ELISA

Extracción de la muestra

- 1.- En un tubo para 50ml se pesaron 5g de la muestra previamente molida y se homogenizó a 9500rpm con 25ml de ácido clorhídrico 50mM.
- 2.- Se agitó por hora y media a temperatura ambiente a 200rpm.
- 3.- De los 6g de homogenizado se transfirió (1 g de muestra) a un tubo para centrifuga.
- 4.- Se centrifugó por 15 min a 3400rpm de 10 a 15 °C.
- 5.- El sobrenadante se transfirió a otro tubo, añadiendo 300µl de NaOH 1M y se mezcló por 15 min.

- 6.- Se añadieron 4 ml de Fosfato de potasio monobásico 0.5M (500mM) pH 3.0, y se homogenizó brevemente y almacenándolo de 2 a 8°C por hora y media.
- 7.- Se volvió a centrifugar durante 15 min. a 3400rpm a 10-15°C, para transferir el sobrenadante.
- 8.- Por último se purificó la muestra por medio de una columna C18.

Purificación por Columna C18.

Consiste en la limpieza de la muestra a través de una columna C18 para quitar las impurezas de la muestra.

1. Se enjuagó la columna con 2ml de solución de enjuague (buffer de KH_2PO_4) 50mM pH 3.
2. Se aplica el sobrenadante de la muestra.
3. Se enjuaga la columna con 2ml de solución de enjuague.
4. Se remueven los residuos del fluido mediante presión positiva y se secó la columna 2 min. con flujo de aire o nitrógeno.
5. La muestra fue eluida lentamente con 1 ml de metanol (100%) a una velocidad de 15 gotas por minuto.
6. Se evaporó completamente el solvente a 50 -60 C a una corriente débil de nitrógeno.
7. El residuo seco se reconstruyó con 400 μL de agua destilada y se emplearon 20 μl por pozo para el análisis.

Una vez realizada la extracción y purificación de la muestra, el conjugado clenbuterol-enzima compite por los sitios de unión de los anticuerpos adheridos en

los pozos con el clenbuterol contenido en las muestras o estándares, haciendo evidente la reacción inmunológica por medio de la adición de un sustrato y una sustancia cromógena⁷⁰.

Preparación de la microplaca.

1. Se utilizó la bolsa de aluminio que contiene la placa, con el objetivo de que a esta este expuesta lo menos posible a la luz.
2. Los pozos requeridos fueron retirados junto con el marco.
3. El resto de los pozos se mantuvieron con el agente de secado, bien cerrado dentro de la bolsa de aluminio a una temperatura de 2 a 8°C.
4. Se insertan los pozos en la placa integrada en el kit.
5. Se prepara el anticuerpo que viene presentado en forma concentrada. Debido a que la enzima conjugado tiene estabilidad reducida, solo se reconstruye la cantidad requerida.
6. Antes de pipetear la enzima conjugada, se agitó cuidadosamente. Y se preparó una solución 01:11 en solución buffer.
7. Se agregaron 100µl de solución de anticuerpos diluidos a cada pozo e incubaron por 15 minutos a temperatura ambiente.
8. Agregar 100µl de solución de anticuerpo diluido en cada pozo seleccionado e incubar por 15 minutos a temperatura ambiente.
9. Se vació el líquido de los pozos invirtiendo la micro placa boca abajo y después enjuagar con agua destilada y vaciarla nuevamente.
10. Repetir dos veces más el mismo procedimiento.
11. Posteriormente se agregan 20µl del estándar o de la muestra preparada.

12. Se agregaron 100µl de la enzima conjugada diluida, en el fondo de cada pozo, incubando por 30 minutos a temperatura ambiente.
13. De nuevo se enjuagaron los pozos invirtiéndolos como se realizó anteriormente.
14. A cada pozo se le agregan 100µl de sustrato-cromógeno. Mezclar e incubar en la oscuridad por 15 minutos a temperatura ambiente.
15. Después se agregan 100µl de la solución de paro a cada pozo. Se mezcla para después medir la absorbancia a 450nm contra un blanco de aire. Se debe leer dentro de un lapso no mayor a 60min.

La reacción enzima-sustrato-cromógeno genera un producto de color azul. Esta reacción se detiene con el reactivo de paro de la reacción, el cual produce un cambio de la coloración azul a amarillo. La densidad óptica (DO) es inversamente proporcional a la concentración de clenbuterol^{47,70}.



Fig. 11 Kit Ridascreen Clenbuterol Fast © (Bio-pharm)

Una vez obtenidos los resultados por la técnica de ELISA se identificaron las muestras conforme al valor obtenido de positividad, a la ubicación geográfica que de recolección y tomando como referencia la incidencia en brotes y eventos relacionados con la intoxicación o administración de clenbuterol tanto en humanos como en animales.

Posteriormente las muestras que resultaron positivas se identificaron en el laboratorio de toxicología de la facultad de medicina veterinaria y zootecnia de la UNAM, fueron separadas del resto y se prepararon para ser analizadas por la técnica de CLAR/F y la técnica de CLAR/UV.

5.2 Análisis del clenbuterol por cromatografía de líquidos con fluorescencia (HPLC/F)

Análisis de clenbuterol derivado con ortoformaldehído y mercapto-etanol (OPA/ME) pre-columna e identificación por HPLC y detector de fluorescencia

El sistema cromatográfico (fig. 15) utilizado en este estudio consta de un reodhine (sistema de válvulas para conectar el asa de la muestra con la columna de separación), una columna de separación con un líquido C18 adsorbido en partículas de 4 micras de diámetro, una bomba binaria modelo serie 200 equipado con un automuestreador, un detector de luz ultravioleta serie 200, conectado a una estación de integración de señales interface serie 900 PNelson y un software Total Chrom v. 5.1 e impresora.



Fig. 12 Sistema de Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

Para la búsqueda de las condiciones óptimas⁷⁶ de reacción entre el clenbuterol y el fluorocromo los ensayos realizados se basaron en la reacción entre el radical amino del clenbuterol y el OPA/ME (fluorocromo), en condiciones diferenciales tres pH: 6, 7 y 8. Estos ensayos se implementaron antes de la inyección en el cromatógrafo (pre-columna). Por medio de esta reacción se buscó el desarrollo de un compuesto fluorescente que pudiera ser identificado con el detector de fluorescencia en el HPLC. Las longitudes de onda de emisión y excitación fueron de 336/455 nm consideradas en el desarrollo de la identificación de los aminoácidos derivados con el OPA/ME.

Esta derivación de los aminoácidos (radicales amino) a compuestos fluorescentes es el principio básico para la identificación de la mayoría de los aminoácidos; dicha reacción se utilizó como base para la posible formación de un compuesto fluorescente a partir del OPA/ME que se adhiere al grupo amino del clenbuterol. Los posibles compuestos derivados de esta reacción se midieron en una columna amino que soportó los cambios de pH relativamente extremos de 4 a 8.

Los ensayos con este método se realizaron considerando temperatura ambiente del laboratorio, los recipientes de cristal y material utilizados y aplicación de volúmenes de los reactivos con pipetas graduadas; antes de la inyección en la columna con el estándar de clenbuterol en tres pH distintos 6 dentro del rango ácido, 7 en el rango neutro y 8 en el rango alcalino; usando tres concentraciones para la curva del estándar partiendo de la concentración mínima detectable esperada con una progresión geométrica que fue de 15, 30 y 60 ng/30µl, estas concentraciones fueron elegidas para obtener una respuesta lineal cercana a 0.999. Los pH de incubación se ajustaron a los señalados con acidificación o alcalinización del incubado.

Se inyectó en el rheodyne 30 µl de la mezcla suspendida y 1ml/minuto de la fase móvil a una presión de 2,000 libras.

5.3 Detección de clenbuterol por HPLC/UV

1. Extracción de la muestra.

La extracción y desengrasado de las muestras de hígado y músculo para el análisis del clenbuterol por cromatografía de líquidos y detector de luz ultravioleta se realizó conforme al método explicado en un experimento realizado por González *et al.*, (1996).

A un gramo de muestra se le adicionaron 10 ml de buffer de fosfato llevándola a un pH de 2.8, esta se sonicó durante 10 minutos y posteriormente se centrifugó a 15,000 g a una temperatura de 8 °C durante 10 minutos.

A continuación se separó el sobrenadante; y se ajustó a un pH de 9 con solución NaOH 2 mol.

La limpieza de la muestra (fig.13) se llevó a cabo en un sistema de separación líquido/sólido (cartucho), por medio de una columna sep PAK C-18 de 300mg, previamente activada con 5 ml de agua y 5 ml de metanol. En un sistema de vacío la muestra se hizo pasar por este cartucho para que ahí se atrapara el clenbuterol.

El clenbuterol se eluyó con 3 ml de metanol. Este eluato fue evaporado a 35°C con un flujo de nitrógeno, hasta llegar al estado de sequedad, el residuo se disolvió en 2ml de 0.01mol de ácido clorhídrico.

El desengrasado se practicó por la adición de 2 ml de n-hexano, el mezclado se realizó en un vortex y el centrifugado a 1000 g/3 minutos; una vez realizada esta parte del método, se desechó la fase orgánica y se agregaron de nuevo 2ml de n-hexano. Se alcalinizó la fase acuosa con 100 µl de NaOH 2 mol. Después de esto se añadieron 2ml de éter terbutil-metil y se centrifugó por tres minutos. La fase orgánica se transfirió a otro tubo y la extracción con el éter metil-terbutilo se repitió. En residuo después de la evaporación en el flujo de nitrógeno a 35°C se redisolvió en 100 µl de HCl 0.01 molar, una vez separada la fase orgánica, la muestra fue evaporada mediante un flujo de nitrógeno a una temperatura de 35 °C.

Finalmente el residuo fue resuspendido en HCl 0.01 mol con 100 µl, o en fase móvil (ACN /fosfato de potasio, 25/75%).

Se tomaron 30 µl para inyectarse en el rheodyne, para llevar a cabo la lectura en el cromatógrafo de líquidos con la columna alfa-amino 100/4.5 mm y partículas de 5µm; fase móvil de ACN y buffer de fosfato de potasio 25/75% y detector de luz ultravioleta a una longitud de onda de 211nm (ultravioleta). La separación del clenbuterol se llevó a cabo entre la columna y la fase móvil a una presión de 2770 lbs y 1ml/minuto de flujo.

Las señales se integraron en un equipo computarizado con la interfase NELSON y la tarjeta de transformación de la señal analógica a digital.

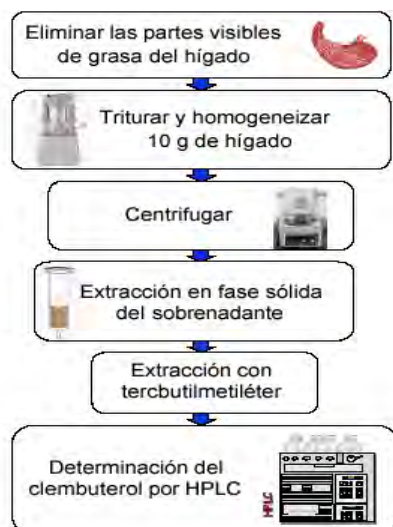


Fig. 13 Procedimiento de extracción para la determinación de Clenbuterol por HPLC/UV.

Por último estos residuos fueron resuspendidos en 100µl de HCl 0.01 M. Y también en 100µl de la fase móvil.

5.4 Validación del método HPLC/UV

Para este trabajo se llevó a cabo, previamente la validación del método analítico que es la adaptación específica de una técnica analítica para un propósito de medición seleccionado^{77, 78, 79}, en este caso para identificar clenbuterol por HPLC con detector UV. Este procedimiento ayuda a demostrar mediante estudios de laboratorio que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación

analítica deseada⁷⁷ ya que esto es parte fundamental para el desarrollo de una nueva técnica de análisis^{81,82}.

Reactivos, material y equipo:

Para la validación del método se utilizó un cromatografo serie 200, que consta de una bomba binaria, equipado con un automuestreador y un escáner conectado a una computadora y el software Total Chrom v. 5.1 y una impresora.

Se utilizó el estándar de clenbuterol en diferentes concentraciones.

Una fase móvil de acetonitrilo en buffer de potasio al 0.02M

Acido fosfórico.

Los parámetros de desempeño evaluados en este estudio; permiten una identificación del error en el manejo extracción e identificación de la muestra. Y por ultimo quizá en los parámetros de mayor peso analista es la adición del estándar interno en la muestra^{77, 80}. Esto quiere decir que el tamaño de la señal obtenida del extracto positivo a clenbuterol se incrementará tantas veces como la cantidad añadida de estándar de clenbuterol en la muestra⁷⁹.

Los parámetros de desempeño para la validación llevados a cabo en este estudio fueron:

Precisión: expresa la cercanía de coincidencia (grado de dispersión) entre una serie de mediciones obtenidas de múltiples muestreos de una misma muestra homogénea bajo condiciones establecidas. Puede considerarse a tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.^{77, 78}.

Linealidad: habilidad para asegurar los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática definida, son proporcionales a la concentración del analito dentro de un intervalo determinado^{77,80}.

Especificidad: capacidad de determinar el analito inequívocamente en presencia de componentes los cuales se espera que estén presentes. Comúnmente, esto puede incluir impurezas, degradantes, matriz, etc⁷⁸.

Repetibilidad: expresa la precisión en las mismas condiciones de funcionamiento en un intervalo corto de tiempo. Repetibilidad también se llama precisión intra-ensayo⁷⁸.

Límite mínimo de detección: es la concentración mínima del analito en una muestra, que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas^{77, 79}.

Límite mínimo de cuantificación: es la concentración mínima del analito, que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones de operación establecidas⁷⁷.

La evaluación de los resultados se sujeto a análisis estadístico descriptivo y análisis estadístico diferencial.

El riesgo de exposición se calculó por el tamaño de la ración consumida de músculo o hígado y el número de veces consumida y el tiempo en que el clenbuterol estuvo presente en el organismo, es decir la vida media.

6. Resultados

6.1 Resultados para ELISA.

Las muestras de tejido analizadas por la técnica de ELISA se realizaron en el Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal (CENAPA) utilizando el método aprobado del laboratorio de residuos tóxicos.

La presencia de clenbuterol se logró identificar en muestras de tejido (hígado y músculo) recolectadas en diferentes estados del centro del país (Tabla 1 y 2), se utilizo el kit ridascreen fast® (Bio -pharm) para (ELISA).

Se analizaron un total de 160 muestras de tejido animal (hígado y músculo).

Los resultados obtenidos para las muestras analizadas por la técnica de ELISA fueron los siguientes:

Se obtuvieron 66 muestras positivas (41.25%) estas presentaron concentraciones superiores a los límites máximos permitidos. Las 94 (58.75%) muestras restantes presentaron concentraciones menores a los límites máximos permisibles establecidos por lo tanto fueron consideradas como negativas y fueron desechadas por incineración.

En el cuadro 1 se muestran los valores obtenidos para las muestras de hígado que fluctúan entre 2,359.62 a 10,968.23 ng/kg (ppt) y en el cuadro 2 se muestran las concentraciones detectadas para las muestras de músculo los valores obtenidos fueron de 2,654.61 a 5,170.17 ng/kg (ppt).

Los valores promedio de absorbancia de cada muestra se convierten a concertación al usar la formula de la regresión simple $y=a+b*x$ donde:

$y = \text{concentración}$, $a = \text{intersección}$, $b = \text{pendiente}$, $x = \text{absorbancia}$,
 Esta regresión se realiza con los valores obtenidos de la curva estándar.

Cuadro 1. Concentración de clenbuterol en muestras de hígado (H) Distrito Federal, Toluca, Querétaro, Tulancingo. Analizadas por la técnica de ELISA.

NÚMERO DE MUESTRA	PPT*	NÚMERO DE MUESTRA	PPT*
3H	5,282.87	56H	8,789.28
14H	8,551.21	57H	9,181.49
15H	8,467.73	58H	7,068.49
21H	2,359.62	59H	4,774.04
23H	5,704.61	60H	7,683.57
34 H	8,040.65	61H	7,613.49
38 H	10,968.23	62H	5,589.83
41H	3,009.11	63H	8,113.42
44H	6,387.03	64H	9,422.75
47H	8,978.94	65H	7,896.47
53H	9,422.75	66H	5,091.03
54H	9,668.54	67H	8,334.49
55H	10,609.81		

*ppt partes por trillon

Los valores calculados para los estándares entran en un sistema de coordenadas semi-logarítmico contra la concentración equivalente de clenbuterol en (ng/kg). La curva de calibración es lineal ($r^2=0.999$) en el rango de 200 a 2000 ng/kg (ppt). Los equivalentes de clenbuterol en ng/kg correspondientes a la extinción de cada muestra pueden leerse a partir de la curva de calibración.

Para obtener la concentración de clenbuterol en ng/kg contenida en una muestra, la lectura de la concentración de la curva de calibración se multiplicó posteriormente por el factor de dilución Q (que en este caso es de .4) y el peso de la muestra.

Mayor color = mayor absorbancia = menor concentración

Lecturas bajas o inespecíficas

Menor color = menor absorbancia = mayor concentración

El estimado de la concentración se realizó por medio de la correlación simple

*donde: $y=a+b*x$*

a= intersección, b= pendiente, x=absorbancia

Cuadro 2. Concentración de clenbuterol en muestras de músculo (B) de bovino. Distrito Federal y Tulancingo. Analizadas por la técnica de ELISA.

NÚMERO DE MUESTRA	PPT*
23B	2,023.00
27B	3,820.19
53B	2,654.61
55B	3,563.42
56B	5,170.17
58B	2,722.78
64B	2,605.18
73B	4,732.85

*ppt partes por trillón

La prueba de ELISA se basa en la reacción ANTIGENO – ANTICUERPO, los pozos de la placa fueron cubiertos con anticuerpos específicos al clenbuterol, donde una vez que es adicionado el conjugado enzima a los pozos de la placa, los estándares de clenbuterol y la muestra compiten por los sitios de unión de los anticuerpos.

La enzima conjugada y el sustrato cromógeno son adicionados e incubados propiciando un enlace conjugado, resultando finalmente una coloración amarilla.

El análisis estadístico descriptivo, de las concentraciones de clenbuterol encontradas en muestras de hígado en Toluca fue de 4,032 ppt, 2 positivas; en Querétaro 8,097ppt 3 positivas; Tulancingo 7,951ppt 15 positivas y en el DF 7,079ppt 5 positivas, de 20 analizadas en cada entidad. De las 20 muestras analizadas para Cuernavaca, Morelos; no se detectó ninguna positiva. Esto nos indica que las mayores concentraciones encontradas en muestras de hígado fue en las provenientes de Querétaro 8,097ppt y las que presentaron menor concentración fueron las de Toluca 4,032ppt.

Para las muestras de músculo, también se analizaron 20 muestras de cada entidad y solamente se encontraron 7 positivas con un promedio de 3,574 ppt en las recolectadas en Tulancingo, Hidalgo, y dos positivas para las muestras de Distrito Federal con 2,921 ppt.

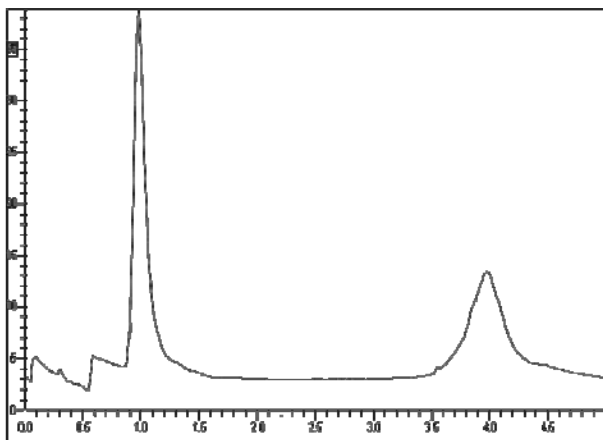
Las concertaciones encontradas en este estudio corresponden a concertaciones significativas que se encuentran por encima de las 2,000ppt y hasta 10,000ppt.

6.2 Resultados de los ensayos para el análisis de clenbuterol por HPLC y detector de Fluorescencia.

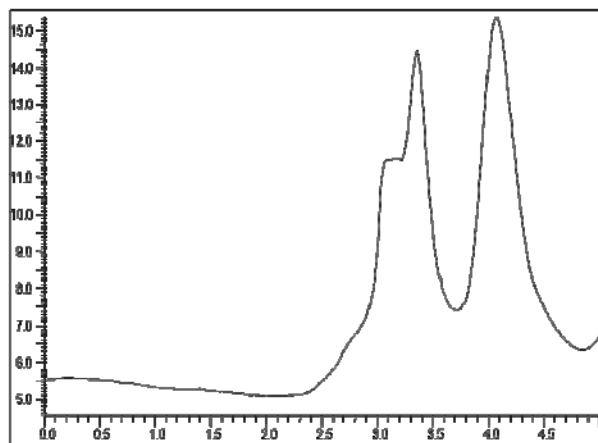
Para la técnica de cromatografía de líquidos con detector de fluorescencia HPLC/F, no se observaron señales escalonadas (como picos) asociadas con la concentración del clenbuterol, solo se observaron señales (deformes) que se consideraron parte del disolvente (sol. de ac. clorhídrico) y del derivatizante.

La identificación del clenbuterol por CLAR/F no se logró debido a que no se encontró el compuesto fluorescente derivado de la reacción del clenbuterol con el OPA/ME. En los cromatogramas (gráficas 1, 2, 3, y 4) solamente se detectó la respuesta fluorescente del OPA. Como se podrá observar en las gráficas, las

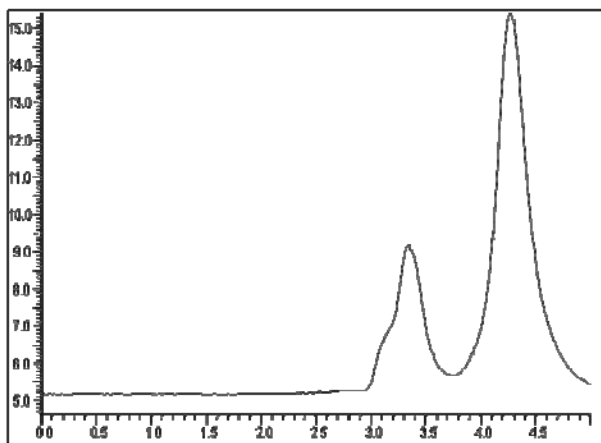
señales son variables en cuanto al tiempo de retención y no asociadas con la concertación del estándar, más bien consideradas como señales de ácido clorhídrico, OPA y ME.



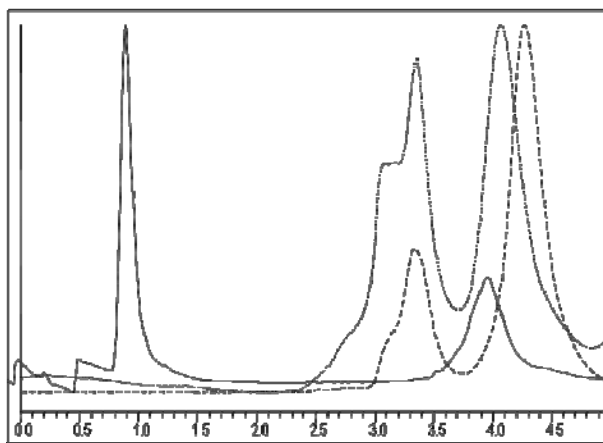
Gráfica 1. Cromatograma: ácido clorhídrico TR=1.2 min. y OPA 4 min con detector de fluorescencia.



Gráfica 2. Cromatograma: ácido clorhídrico TR=3.3 min y OPA 4 min con detector de fluorescencia.



Gráfica 3. Cromatograma: ácido clorhídrico TR=3.3 min y OPA 4.3 min con detector de fluorescencia.



Gráfica 4. Cromatograma: ácido clorhídrico, TR=3.3 min y OPA 4.3 min con detector de fluorescencia al comparar las gráfica 1, 2 y 3.

6.3 Resultados de la validación del método cromatografía de líquidos y detector de luz ultravioleta HPLC/UV

En los ensayos para la validación del método de HPLC/UV se observó la señal de clenbuterol al usar concentraciones de 6.8, 13.6 y 27.2 ng en 30µl para el establecimiento de la curva. Los valores de los ensayos de repetibilidad con tres estándares de la misma concentración 27.2 ng se obtuvo un coeficiente de variación del 0.66%.

La concentración mínima detectable se identificó con la respuesta de la señal de 6.8 ng.

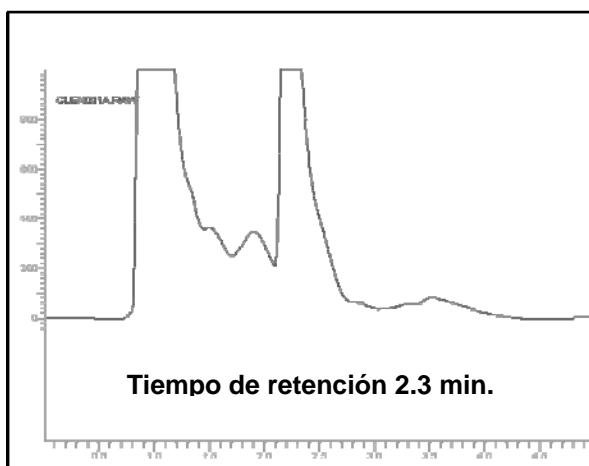
La concentración mínima calculada se obtuvo al dividir la cantidad mínima detectable por el tamaño de la muestra. En este punto resultó que el tamaño de la muestra que fue de un gramo y el volumen de resuspensión para la inyección de la muestra que fue de 100µl. esto quiere decir que el gramo de muestra se resuspendió en 100µl en lugar de 1000µl que sería la relación entre peso y volumen.

Al reducir 10 veces el volumen de resuspensión del gramo de muestra. Los 30µl de alícuota inyectados en el cromatograma representan 300mg de muestra, por esto la sensibilidad se incrementa 10 veces puesto que un µl de la alícuota corresponde a 10mg de la muestra por lo tanto al realizar el cálculo de la concentración de clenbuterol mínima detectable y cuantificable fue 10 veces más sensible (0.68 ng).

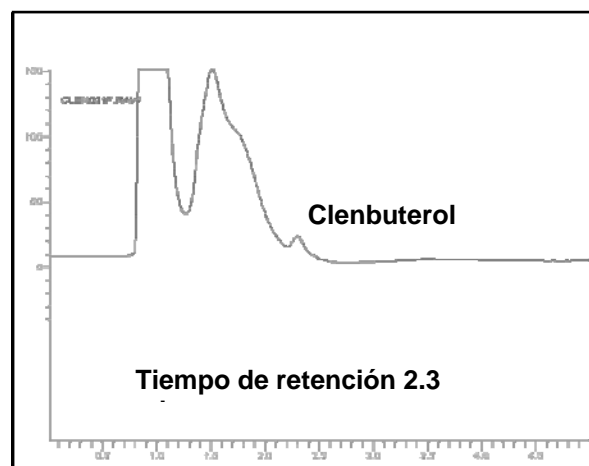
Como adición de la información general de este experimento se anexan los cromatogramas de la respuesta del clenbuterol en HPLC/UV en muestras de

hígado y músculo, donde se empata en el mismo tiempo de retención del estándar de las muestras -con el extracto practicado en las muestras.

La respuesta obtenida cuando la muestra fue re-suspendida en ácido clorhídrico; fue al observar un pico (señal) al principio del cromatograma que interfería con la señal del clenbuterol (gráfica 5), pero cuando se usó la fase móvil, la señal de esta, se separó de la señal del clenbuterol (gráfica 6), lo que hacía que se pudiera calcular el tamaño de este con más precisión.

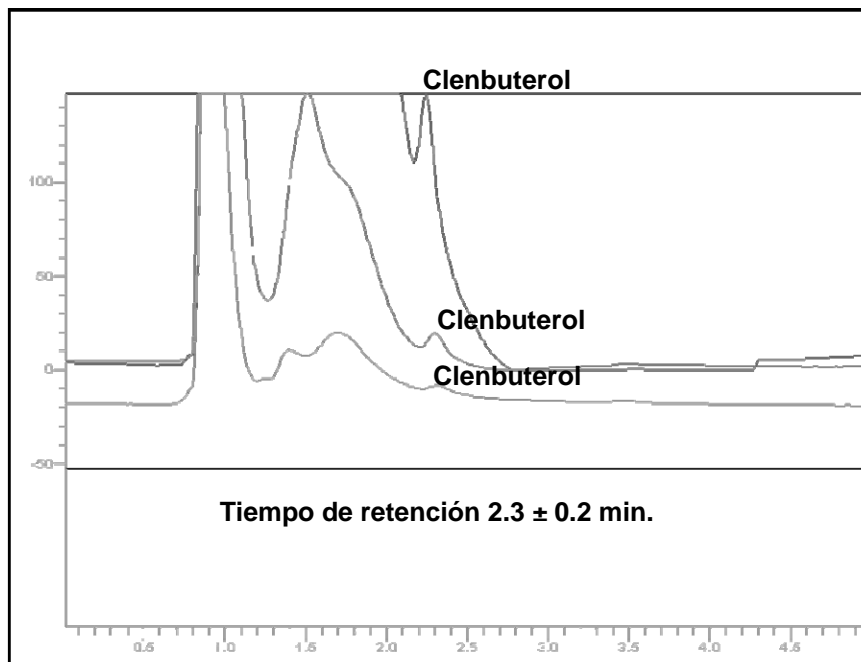


Gráfica 5. Señal del clenbuterol en HPLC/UV/Fase móvil de 1.360na.



Gráfica 6. Señal de clenbuterol en HPLC/UV/HCl 13.6na.

En la gráfica 7 se muestra el estándar de clenbuterol y ácido clorhídrico, con concentraciones que van de 27.2 a 6.8ng . Aquí se observa claramente como se va reduciendo el tamaño de la señal del ácido clorihídrico TR=1min. y el tamaño de la señal del clenbuterol TR=2.3 min.



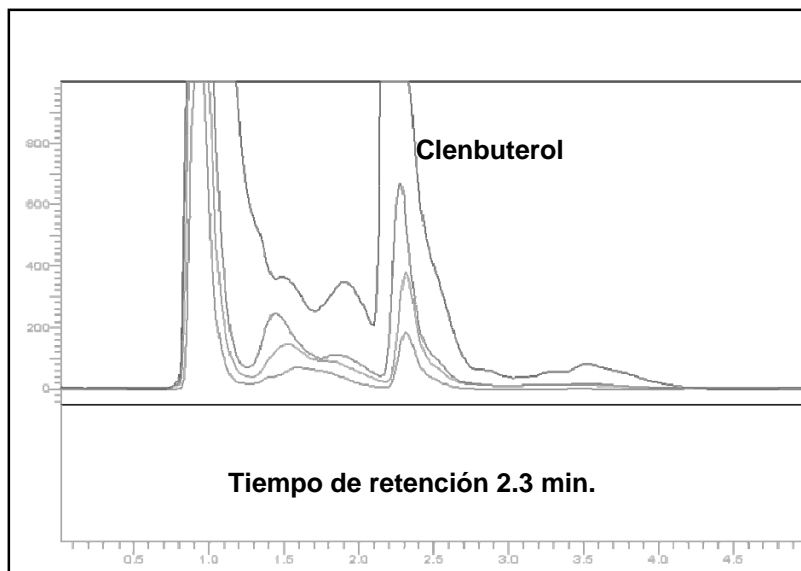
Gráfica 7. Repetibilidad (precisión, exactitud) y correlación de la señal de clenbuterol 27.2, 13.6 y 6.8 ng en HPLC/UV/HCl

En la gráfica 5 muestra la linealidad del sistema, utilizando estándares y sin usar una muestra fortificada. En el cuadro 3 se puede observar que de tres inyecciones con diferente concentración se obtuvieron los índices de correlación entre la superficie de área y la concentración de clenbuterol en ng y sus índices son $r^2 = 0.999$; intersección (a) = -127,264 y una pendiente de 32,377.44 cuando se usó el ácido clorhídrico como vehículo del clenbuterol en estas condiciones de operación del cromatografo el tiempo de retención del clenbuterol es de 2.3 min.

Cuadro .3 Índices de la regresión lineal en la linealidad del método analítico para la identificación del clenbuterol por HPLC/UV/HCl.

Superficie de área	Concentración ng			
94,908	6.8	r	0.99997	Regresión lineal
310,060	13.6	a	-127,265	Intersección
754,405	27.2	b	32,377	Pendiente

En la grafica 8 se observa la señal del clenbuterol en fase móvil con cuatro concentraciones diferentes que van de 1,360ng a 170ng.



Gráfica 8. Repetibilidad (precisión, exactitud) y correlación de la señal de clenbuterol en HPLC/UV/Fase móvil.

Para la fase móvil se emplearon 4 inyecciones con diferente concentración se obtuvieron los índices de correlación entre la superficie de área y la concentración de clenbuterol en ng y sus índices son $r^2 = 0.999$; intersección (a)= 4736.86 y una pendiente de 522.08 (Cuadro 4).

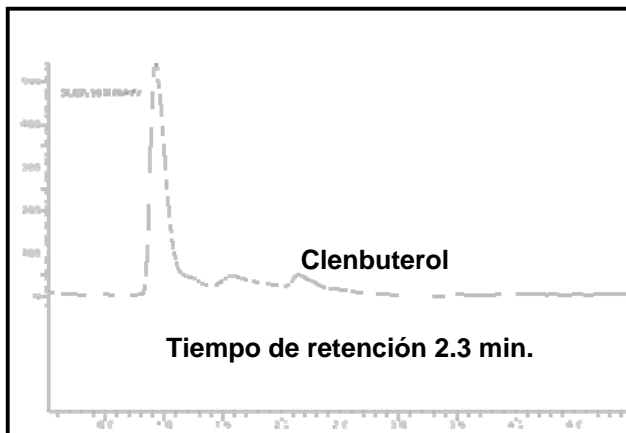
Cuadro .4 Índices de la regresión lineal en la linealidad del método analítico para la identificación del clenbuterol por HPLC/UV/Fase móvil.

Superficie de área	Concentración ng	Regresión lineal		
85,725	170	r	0.99998	
170,478	340	a	- 4,736.9	Intersección
350,728	680	b	522.1	Pendiente
705,428	1,360			

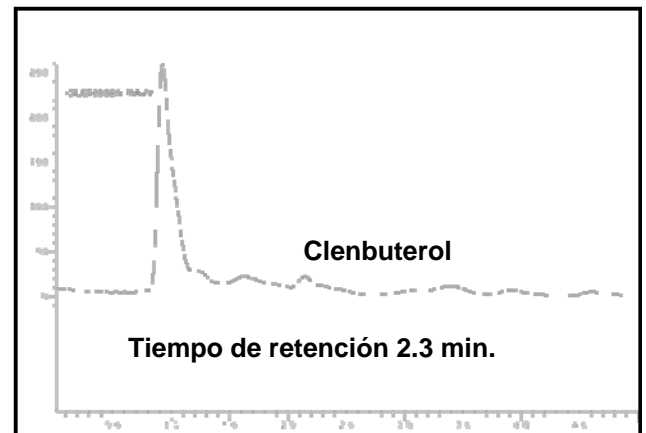
Para estimar la concentración de clenbuterol en las muestras se usaron los índices de correlación obtenidos con los estándares, en este caso la y de la regresión representa el valor desconocido de la concentración. El valor de la y se obtuvo al sumar el valor de la intersección con el valor de la pendiente y multiplicándolo por el valor de la superficie de la señal ($y = a + b * x$); donde y es la concentración de clenbuterol, a es la intersección, b es la pendiente y x es el valor de la superficie de área de respuesta.

6.4 Resultados para técnica de HPLC/UV

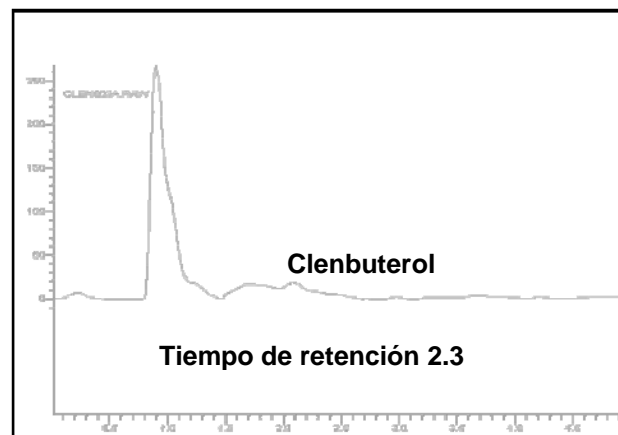
En las gráficas 10, 11 y 12 se observa la resuspensión del clenbuterol en fase móvil, (fosfato y acetonitrilo) TR=1 y el TR= clenbuterol es de 2.3 min.



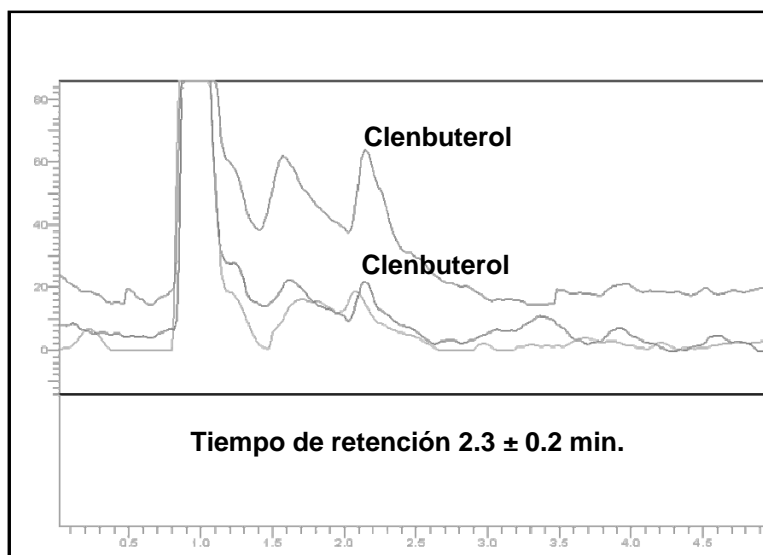
Gráfica 9. Detección clenbuterol de 27.2 ng plc/uv/fase-móvil.



Gráfica 10. Detección clenbuterol de 13.6 ng hplc/uv/fase-móvil.



Gráfica 11. Detección clenbuterol de 6.8 ng hplc/uv/fase-móvil



Gráfica 12. Se observa el comparativo de las gráficas 9, 10 y 11 con 27.2, 13.6 y 6.8 ng de clenbuterol en hplc/uv/fase-móvil.

Los índices de la regresión lineal (cuadro 5) de estos cromatogramas hechos entre la superficie de área y la concentración de clenbuterol fueron: $r^2 = 0.999$, intersección -127,264, y pendiente de 32,377 (Gráficas 9,10, 11 y 12) cuando se uso la fase móvil como vehículo del clenbuterol; en estas condiciones de operación del cromatografo el tiempo de retención del clenbuterol fue de 2.3 min.

Cuadro 5. Índices de regresión lineal para realizar el estimado de la concentración de clenbuterol en las muestras de campo.

Superficie de área	Concentración ng			
94,908	6.8	r	0.99997	Regresión lineal
310,060	13.6	a	-127,265	Intersección
754,405	27.2	b	32,377	Pendiente

La superficie de área señalada en el cuadro 5 es el promedio de dos repeticiones. Este ensayo se hizo para conocer la linealidad de la curva, cuando se hizo la titulación de clenbuterol en una muestra desconocida. La curva para la identificación de la concentración de clenbuterol en la muestra desconocida se desarrolla como primer paso al comienzo del trabajo, cada vez que se empieza una nueva jornada.

Para conocer el riesgo de exposición al clenbuterol por el consumo de hígado o músculo contaminado, se consideró la cantidad que causó la intoxicación en estudios reportados como el caso de Italia; con la cantidad encontrada en el hígado analizado de México y con esta comparación se identificó el número de veces que es inferior la cantidad encontrada en las muestras de hígados analizadas en este estudio (México). Es decir este número de veces diferente señala la posibilidad de que ocurra la intoxicación en México al ingerir el hígado contaminado por clenbuterol.

Las cantidades reales de clenbuterol que causaron intoxicación aguda en Italia; fueron de 1480 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de muestra. Esta cantidad se consideró como la responsable de inducir efecto en los consumidores de 250g de hígado.

Para conocer el riesgo de exposición de la cantidad de clenbuterol en México, por consumo de hígado contaminado con clenbuterol, se señala que al dividir la cantidad encontrada en estudios tomados como referencia, por la cantidad encontrada en México 8.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppt) el riesgo es de 179 veces inferior. Las concentraciones encontradas en otras muestras fueron de un promedio de 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ señalando un riesgo de 24ava parte.

7. Discusión

En las muestras analizadas por el método de ELISA se detectaron concentraciones en promedio de 7,480 ppt para las muestras de hígado de res; y para las muestras de músculo la concentración detectada fue en promedio de 3,412 ppt, y 8.4 µ/kg (8,400 ppt) encontradas por el método del HPLC con detector de UV; estas cifras están por encima del límite máximo de residuos de de 40 y 200 ppt clenbuterol para músculo e hígado de bovino que establece la Organización Mundial de la Salud (1998); así como de los 0.1µg/kg (100 ppt) en músculo y 0.5µg/kg (500 ppt) en hígado que establece el Reglamento CE No. 2377/90 del Consejo de la Unión Europea⁶³.

Por otra parte la FAO indica como límite máximo de residuos en músculo de 200 ppt y en hígado de 600 ppt debido a la posibilidad del abuso en el uso de este medicamento, estos límites se recomiendan únicamente cuando han sido utilizados con propósitos terapéuticos⁸³.

Tomando en cuenta que la ingesta diaria admisible de una persona de 60kg puede ser de hasta 300g de carne y 100 g de hígado, con un contenido de 235 ppt de clenbuterol según lo indicado por Sumano (2002); resulta altamente peligrosa la ingestión de carne contaminada con clenbuterol ya que los niveles encontrados en este estudio oscilan alrededor de las 7,480 para ELISA y hasta los 8400ppt para HPLC, que pueden ser altamente nocivos cuando la ingestión es por un tiempo prolongado. Esta cifra promedio es comparable con los resultados obtenidos para un estudio realizado por Hernández y col.⁸⁵ en 99 muestras de retina, analizadas por medio de la técnica de ELISA utilizando el Kit Ridascreen Clenbuterol Fast ® (Bio-pharm); de este análisis resultaron positivas el 53.5% y con concentraciones que oscilan entre 3,000 ppt y 8,100 ppt. Sin embargo se sabe que la acumulación en retina es permanente, ya que las cantidades detectadas aún y cuando se

respeten los tiempos de retiro considerados como idóneos de más de 4 semanas *ante-mortem*^{7,86,87,88}. Entonces al resultar positivas las muestras, indica que los animales si recibieron una dieta con clenbuterol, pero no es posible señalar la cantidad presente en músculo y en hígado, ni en el resto de la canal y vísceras, representando un riesgo de salud pública para los consumidores. Es importante destacar que la acumulación en retina puede ser útil para brindar información sobre el uso ilegal de clenbuterol en animales destinados para consumo humano, con base en el criterio de cero tolerancia que se practica actualmente en diversos países.

Este último caso es comparable con el estudio realizado en una planta Tipo Inspección Federal donde se colectaron muestras de hígado, mismas que fueron analizadas mediante la misma técnica de ELISA, donde se obtuvieron resultados positivos correspondientes al 100% de las muestras recolectadas, con concentraciones de 32.05 ± 18.17 ppt en promedio; concentraciones que se encuentran muy por debajo de las encontradas en este estudio, pero que indican la administración ilegal de clenbuterol a animales destinados para consumo humano, y que tal vez se manejó un tiempo de retiro *ante-mortem* de más de 4 semanas como se ha mencionado^{7,86,87}. Esto ocasiono que la mayor parte del clenbuterol sea eliminada del organismo antes de ser consumido el producto final. Sporano *et al.*, (1998) en un estudio realizado durante una intoxicación por consumo de carne contaminada por clenbuterol, donde las muestras fueron analizadas por la técnica de ELISA, en carne que había sido consumida por las personas que presentaron síntomas de intoxicación, obtuvo 0.8 a 7.4 ppm. Por otra parte en el trabajo realizado por Brambilla *et al.*, (2000) en Italia, a raíz de un brote de intoxicaciones debido a la ingesta de carne contaminada con clenbuterol, reporta como resultado del análisis químico realizado en muestras de carne ingerida por los pacientes entre 1,140 y 1,480 ng/g; se tiene como antecedente que la ingesta de los pacientes fue de 200g de carne, donde además considera que una rebanada de carne que pesa 66g contiene de 74 a 100 µg/g, es decir 66 x

1.140 o 66 x 1.480, entonces dos rebanadas contaminadas contienen 150 – 195 µg y tres rebanadas de carne contenían de 230 – 300 µg de clenbuterol. Esta dosis resultó altamente dañina ya que algunos pacientes presentaron síntomas durante 3 a 5 días posteriores a la ingestión. En cuanto a la concentración de este fármaco en el hígado Sauer *et al.*, (1995) menciona que cuando el ganado es sometido a un tratamiento de 20µg/g de peso corporal durante 20 días, dosis que regularmente es la utilizada por los engordadores, el hígado puede contener residuos de hasta 200ng/g, en cambio en la carne solo se presentaran residuos de 10 a 15 ng/g, lo que nos indica que el riesgo de intoxicación aumenta considerablemente al consumir hígado ya que el clenbuterol es primeramente metabolizado en hígado para posteriormente pasar a la sangre y finalmente a la masa muscular⁹⁰.

Un trabajo realizado debido a un caso de intoxicación por carne contaminada con clenbuterol; donde las pruebas fueron analizadas primeramente con la técnica de ELISA y utilizaron como método de confirmación HPLC debido a su alta confiabilidad, presentan resultados semejantes a los encontrados para este estudio; con valores que oscilaban de las 19 a las 5,395 ppb⁹⁰ donde el 56.25% de muestras recolectadas fueron positivas a clenbuterol.

La concentración encontrada en este estudio, nos indica que la cantidad es 25 veces inferior a la toxica; en el centro del País la carne de bovino que consumimos aún siendo músculo contiene niveles de consideración de este fármaco; y que a pesar de los diferentes operativos realizados el año pasado por las autoridades, el suministro y manejo indiscriminado que realizan los engordadores o ganaderos, no es el adecuado ya que además de una violación a la normatividad mexicana y a la Ley Federal de Sanidad Animal, no cumplen con los tiempos de retiro adecuados *ante-mortem* en el caso de este promotor de crecimiento.

Las cantidades encontradas de clenbuterol en este estudio son 25 veces inferiores a las responsables de toxicidad aguda. Si se considera que la vida media del clenbuterol en el organismo es de 21 días y el consumo de clenbuterol por los humanos con esta dosis diaria, hay que considerar la acumulación de este fármaco en el organismo durante este periodo. Si se multiplica la cantidad ingerida de $8\mu\text{g/g}$ por día durante 21 días nos da la cantidad de $168\mu\text{g/g}$ por persona, entonces esta dosis está muy cerca de la señalada como cantidad aguda responsable en el trabajo realizado en Italia.

Estas circunstancias se separan de la predisposición individual del peso y de la edad del humano expuesto; ya que si tenemos individuos altamente susceptibles se podrán encontrar posibilidades de la intoxicación aguda.

Respecto a las técnicas de análisis para detección de clenbuterol, tenemos que la prueba de ELISA, aunque es la más usada actualmente resulta ser una prueba con un procedimiento extracción largo, confiable, pero no especifica ya que facilita la detección de otros β -agonistas como el salbutamol o zipalterol entre otros, dando resultados falsos positivos. Se puede utilizar como prueba de rutina para determinar posible contaminación en animales, canales y vísceras, pero siempre realizando una prueba confirmatoria para los resultados; más especifica como la cromatografía líquida de alta resolución HPLC con UV y la adición de estándar interno a la muestra, ya que este sistema representa una herramienta confirmatoria y útil para la diferenciación con otros β -agonistas y por supuesto para identificación de clenbuterol.

En cuanto a la detección de clenbuterol por medio de HPLC con detector de Fluorescencia, se ha encontrado en otros estudios que este método posee un límite muy elevado de detección, además de selectividad. Algunos autores lo consideran como un método rápido y sencillo en comparación con otras técnicas utilizadas para este fin, se produce un alto rendimiento y una selectividad potencial

debido a sus características espectrales de emisión, muy importante es considerar la influencia del pH sobre el rendimiento de fluorescencia; esto proporciona ventajas adicionales en los análisis farmacéuticos⁴⁷.

De los ensayos practicados no se lograron identificar las condiciones que permitieran la derivación del clenbuterol con el OPA-ME. Este se fundamentó en la formación de un derivado fluorescente del grupo amino del clenbuterol. Como se puede observar en las gráficas 1, 2 y 3 donde no se obtuvieron respuesta cromatograficas en las inyecciones donde se esperaba la derivación fluorescente del clenbuterol.

Cabe mencionar que por medio de este método solo se pueden detectar compuestos que tengan fluorescencia nativa o compuestos cuya fluorescencia sea inducida por medio de la derivación.

La validación del método de HPLC/UV se llevó a cabo como lo indica la literatura^{77,78,79}, aún los métodos bien establecidos necesitan ser validados por los analistas usando el personal, reactivos y equipos de laboratorio que se emplearan para llevar a cabo la identificación del compuesto evaluando el desarrollo de dicho método, ya que no es seguro que el método opere de igual manera que en los estudios reportados con anterioridad en este caso el método empleado en el artículo de referencia de González *et al.* (1996), es por eso que previo al análisis de las muestras, se valido el método en el laboratorio; realizando el procedimiento analítico, mediante ensayos previos; tales como la medición analítica de la señal mediante el uso de instrumentos y la toma de datos para el análisis estadístico como lo indica la literatura^{77, 81}.

En este estudio se llevó a cabo la confirmación y documentación de los resultados arrojados, mediante los cuales se estableció que los análisis aplicados son confiables, adecuados para la finalidad que han sido empleados, en este caso

para la identificación de clenbuterol en carne e hígado de bovino enfocado a los problemas que puede causar en salud pública. En relación a los parámetros de desempeño evaluados los resultados para precisión nos indican que el método es preciso bajo las condiciones de análisis, esto debido a que las 4 inyecciones se obtuvo el mismo tiempo de retención, para el parámetro de linealidad, se obtuvo una regresión lineal de 0.99997, con cuatro inyecciones con diferentes concentraciones cada una en progresión geométrica; lo que indica la existencia de la respuesta del instrumento y las concentraciones conocidas de clenbuterol. Al evaluar la especificidad se obtuvieron resultados gracias a la capacidad del método para diferenciar al analito de otros compuestos contenidos en la muestra, esta fue debido a la limpieza de la muestra a través de una columna sep PAK C-18.

La repetibilidad se corroboró al obtener respuestas idénticas en varias inyecciones, con un mismo tiempo de retención (2.3 min) y el mismo tamaño de respuesta con concentraciones iguales. Estas realizadas por el mismo operador. El método de HPLC/UV presenta un % de recuperación de 90, lo que indica que es confiable, de acuerdo a las distintas guías de validación consultadas en este estudio ^{77, 79, 82}.

En los límites mínimos de detección y cuantificación, se mejoraron ya que en lugar de resuspenderse el sustrato en la muestra en un ml se resuspendió solo en 100ul.

8. Conclusión

En este trabajo se implementó y validó el método por HPLC/UV para identificación de clenbuterol para hígado y músculo de bovino. Se aplicó esta metodología para la identificación de clenbuterol en muestras de hígado y músculo expendidos comercialmente.

La estadística asociada a la validación del método es el uso de la regresión para hacer el estimado del valor de y (concentración) con la suma de $a + b$ y multiplicado por x .

La técnica ELISA, es un método rápido, sensible y fiable para la detección de clenbuterol, las características de esta técnica permiten el análisis de un número elevado de muestras simultáneamente obteniendo resultados en un corto espacio de tiempo características que la hacen efectiva para su utilización como método solo de *screening*.

El método de HPLC/UV fue validado comprobando que es un método confirmativo cuando se fortifica la muestra y se obtiene la misma señal con un valor alto correspondiente a la suma de la respuesta del clenbuterol contenido en la muestra y el clenbuterol añadido como fortificante.

9. Referencias.

1. Esquivel GM. Determinación de clenbuterol en muestras de bovino, porcino, ave, en tres delegaciones del Distrito Federal durante el periodo 2003 – 2005 (tesis de licenciatura) México, D. F. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM, 2006.
2. Secretaria de Agricultura Desarrollo Rural Pesca y Alimentación. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. México (DF): SIAP-SAGARPA, 2009.
3. Mendoza GDV, Ricalde VR. Alimentación del ganado bovino con dietas altas en granos. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco. 1993. 9:55
4. Norma General del Codex para los Aditivos Alimentarios. CODEX stan. 192-1995. Revisión 2007.
5. Multon JL. Aditivos y auxiliares de la fabricación en las industrias agroalimentarias. Ed. Acribia. Zaragoza, España. 1998.
6. U.S. Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition International Food Information Council Brochure: Aditivos en los alimentos. Enero 1992. Aviable from URL:www.cfsan.fda.gov
7. Sumano LH, Ocampo CL, Gutiérrez OL. Clenbuterol y otros β -agonistas, ¿una opción para la producción pecuaria o un riesgo para la salud pública?" Veterinaria México. 2002 33 (2) 137-159.

8. Newman AC. Ganado vacuno para la producción de carne. Noriega editores. 1991:653-671.
9. Sumano LH, Farmacología clínica en bovinos. Editorial Trillas.2003. 206-225.
10. Carro D. Los aditivos antibióticos promotores del crecimiento de los animales. Situación actual y posibles alternativas. Albeitar, España. Mayo 2002.
11. Guía para la realización del diagnóstico sanitario y detección de necesidades operativas de rastros y mataderos municipales. COFEPRIS. Secretaria de Salud. México D. F.2005.
12. Reglamento (CE) No.1831/2003 del departamento europeo y del consejo. Sobre los aditivos en la alimentación animal. Del 22 de septiembre de 2003.
13. Bavera G, Bocco O, Beguet H, Petryna A. promotores del crecimiento y modificaciones del metabolismo. Cursos de producción bovina de carne, F. A. V.UNRC www.produccion-animal.com.ar
14. Geesink GH, Smulders FJM, Van Laack HLJM, Van der Kolk JH, Wensing Th, & Breukink HJ. Effects on meat quality of the use of clenbuterol in veal calves. J Anim Sci 1993; 71:1161-1170.
15. Norma Oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-015-ZOO-2002, Especificaciones técnicas para el control del uso de Beta-Agonistas en los animales SAGARPA. 1º de marzo de 2002.

16. Blass JC, Illera G, Silvan M, Cinética del anabolizante clenbuterol en plasma medida mediante elisa. Dpto. de Fisiología Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. 1999. España.
17. García LA. Alerta epidemiológica por la intoxicación en humanos con clenbuterol y su empleo en la alimentación del ganado. Rev. Milit. México. 2002. 56(3):131-134.
18. Poblano CU. Evaluación del clenbuterol como promotor del crecimiento en dietas para pollos de engorda y como preventivo contra el síndrome ascítico. (tesis de licenciatura). Ciudad de Mexico, D.F. UNAM.1997.
19. Rehfeldt C, Schadereit R, Weikard R, Reichel K. Effect of Clenbuterol on growth, carcass and skeletal muscle characteristics in broiler chickens. British Poultry Science 1997.38: 366-373.
20. Merino R. Uso de un ensayo ELISA para la detección y cuantificación de clenbuterol en muestras de ave. Departamento de producción animal. Facultad de medicina veterinaria y zootecnia. UNAM. Ciudad de México (D. F.)2002
21. Lawrence FJ, Ménard C. Determination of clenbuterol in beef liver and muscle tissue using immunoaffinity chromatographic cleanup and liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. Journal of chromatography B. 1997; 696: 291-297.
22. Meyer HHD, Rinke ML, Dürch I. Residue screening for the β -agonist clenbuterol, salbutamol and cimaterol in urine using enzyme immunoassay and high-performance liquid chromatography. J of Chromatography 1991; 564: 551-556.

23. Sánchez EJ. Anabólicos y hormonas. En: Ávila E, Shimada A, Llamas G. Anabólicos aditivos en la producción pecuaria. Capítulo 4 alteradores del metabolismo y la salud. Sistema de educación continua en producción animal en México A. C. México D. F. 131-164.
24. Sauer MJ, Pickett RJH, Limer S, Dixon SN. Distribution and elimination of clenbuterol in tissues and fluids of calves following prolonged oral administration at a growth-promoting dose. *J. Vet. Pharmacol Therap.* 1995.18:81-86.
25. Silience MN, Munn KJ, Campbell RG. Manipulation of pigs trough treatment of the neonate with clenbuterol and somatotropin. *J. of Animal Sci.* 2002. 80 (7): 1852-1862.
26. Blanco A, Artacho PE, Flores AR, Agüera E, Monterde JG. Quantitative modification of the testicular structure in pigs fed with anabolic doses of clenbuterol" *Veterinary Research.* 2002. 33 (1): 47-53
27. Cai J, Henin J. Quantitative multi-residue determination of beta- agonistas in bovine urine using on-line immunoaffinity extraction-coupled column packed capillary liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B.* 1997; 691:357-370.
28. Burton JL, Mc Bride BW, Block E, Glimm DR, Kennelly JJ. A review of bovine growth hormone. *Can J Anim Sci* 1994 74:167-201
29. Eckert. *Fisiología animal, mecanismos y adaptaciones*". Ed. McGraw-hill. España.1998.

30. Zalco D; Debrauwer L; Bories G y Tuilliez. Evidence for a new and mayor metabolic pathway of clenbuterol involving in vivo formation of an N-hidroxarylamine. *Che Res Toxicol.* 1997; 10: 197-204
31. European pharmacopoeia 5th. 2005. 05:1317
32. Ramos F, Noronha da SMI. β -Adrenergic agonists and animal production: III-Zootecnical effects and meat quality. *Revista Portuguesa de Ciencias Veterinarias.* 2002. 97 (592) 51-62
33. Eisseman JH, Huhtington BG, Ferrell CL. Effects of dietary clenbuterol on metabolismof the hindquatres in eteers. *J. Anim. Science.*1988. 66:342-353.
34. Warris PD, Brown SN, Rolph TP, Kestin SC. Interactions between the beta-adrenergic agonist salbutamol and genotype on meat quality in pigs. *J. Anim. Sci.* 1990 68 3669-3676.
35. Barragry T. Clenbuterol, beta agonists and human health. 2007 *Contunding education* 50 (4) 249-253.
36. De Blass C. Efectos del empleo de beta-agonistas sobre la eficacia alimenticia y la calidad de la canal. *Bovis.* 1990. 36: 71-85.
37. Hui YH, Guerrero I, Rosmini MR. *Ciencia y tecnología de carnes.* Limusa Noriega editores. 2006: 139-160.
38. Luño M, Beltrán JA, Jaime I, Roncalés P. Textural assessment of clenbuterol treatment in beef. *Meat Sci* 1999; 51:297-303.
39. Heitzman R J. Clenbuterol Campton, Newbury. Berkshire, United Kingdon. Submitted to FAO by Boehringer Ingeiheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Germany. 1996.

40. Pulce C, Lamaison D, Keck G, Bostvironnois C, Nicolas J, Descotes J. Collective human food poisonings by clenbuterol residues in veal liver. 1991. *Vet Hum Toxicol* 33(5):480-481.
41. Organization Mundial de Sanidad Animal. Representación de la OIE para las Américas. Productos farmacológicos armonizados. Buenos Aires, Argentina. 2009.
42. Elliot CT, McCaughey WJ, Crooks SR, McEvoyJD, Kennedy DG. Residues of clenbuterol in cattle receiving Therapeutic doses: implications for differentiating between legal and illegal use. *Vet Q* 1995; 17:100-102.
43. Boenisch B, Quirke JF, Safety assessment of β -agonists. In: Kiuper HA, Hoogenboom LAP, editors. *In vitro toxicological studies and real time analysis of residues in food*. Wageningen, the Netherlands: RIKILT-DLO-wageningen, 1992:102-124.
44. Brambilla G, Cenci T, Franconi F, Galarini R, Macrì A, Rondoni F, Strozzi M, Loizzo A. Clinical and pharmacological profile in a clenbuterol epidemic poisoning of contaminated beef meat in Italy. *Toxicology Letter*. 2000 (114): 47-53.
45. Delgado SEJ. Calidad y nivel de residuos de β -agonistas adrenérgicos en carne de bovino nacional e importada en México. (tesis de maestría) ciudad de México (Distrito Federal): Universidad Nacional Autónoma de México. 2004.
46. Esquivel GM. Determinación de clenbuterol en muestras de bovino, porcino, ave, en tres delegaciones del Distrito Federal durante el periodo

2003 – 2005 (tesis de licenciatura) México, D. F. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM, 2006.

47. Gallegos RJ. Formación de un derivado fluorescente del clenbuterol y su comparación con el método de ELISA y cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) con detector ultravioleta. (tesis de maestría) ciudad de México (Distrito Federal): Universidad Nacional Autónoma de México, 2005.
48. Mitchel GA, Dunnavan G. Illegal use of beta-adrenergic agonists in the United States. *J Anim Sci* 1998. 76:208-211.
49. Smith J D., The Pharmacokinetics, Metabolism, and Tissue Residues of β -Adrenergic Agonists in Livestock. *J. Anim. Sci.* Vol. 76 1998:173-194.
50. Smith D., Paulson D., Distribution, Elimination, and Residues of Clenbuterol Hcl In Holstein Calves. *J. Anim. Sci.* 1997 Vol. 75: 4545-461.
51. Durch L, Meyer HHB and Karg H. Accumulation of the β -agonist Clenbuterol by Pigmented tissues in Rat, Eye and Hair of Veal Calves. *J. Anim. Sci.* 1995 Vol. 73:2050-2053.
52. Domínguez VIA, Mondragón AJ, González RM, Salazar GF, Bórquez GJL, Aragón MA. Los β -agonistas adrenérgicos como modificadores metabólicos y su efecto en la producción, calidad e inocuidad de la carne de bovinos y ovinos: una revisión. 2009. *Ciencia ergo sum*. Universidad autónoma del estado de México, Toluca, México. Vol. 16 (3): 278-284.
53. Boletín del sistema nacional de vigilancia epidemiológica, sistema único de información. México. 2007. 18 (24):1-3.

54. Gaceta del Senado de la República. LXI Legislatura. Proyecto de decreto para la modificación de los artículos 173 y 174 de la Ley Federal de Sanidad Animal. México. Marzo, 2009. 360.
55. PROY-NOM-065-ZOO-2003. Especificaciones técnicas para la erradicación del uso de beta-agonistas no autorizados en los animales. SAGRAPA. Ciudad de México (Distrito Federal). 2003.
56. NOM-EM-015-ZOO-2002. Especificaciones técnicas para el control del uso de beta agonistas en los animales. SAGARAPA. Ciudad de México (Distrito Federal). 2002.
57. NOM-061-ZOO-1999. Especificaciones zoosanitarias de los productos alimenticios para consumo animal. SAGARPA. Ciudad de México (Distrito Federal) 10 de agosto de 1999.
58. NOM-194-SSA1-2004 Productos y Servicios. Especificaciones sanitarias en los establecimientos dedicados al sacrificio y faenado de animales para abasto, almacenamiento, transporte y expendio. Secretaria de Salud. Ciudad de México (D. F.) 18 de septiembre de 2004.
59. Ley Federal de Salud Animal. SAGARPA. Ciudad de México (D. F.) 25 de julio de 2007.
60. Proyecto para el Reglamento de la Ley Federal de Sanidad Animal. 2008. SENASICA-SAGARPA.

61. Red Internacional de Autoridades en materia de Inocuidad de los Alimentos (INFOSAN). Nota de información INFOSAN No. 6/2007 – GLEWS. Sistema mundial de alerta anticipada ante las principales enfermedades de los animales, incluidas las zoonosis (GLEWS). 28 de septiembre de 2007.
62. Code Federal Regulations. Title 21 Food and drugs. Chapter I Food and drugs administration. Section.530.41 Subchapter E Animal Drugs, feeds and related Products. Available from URL: www.fsis.usda.gov
63. Reglamento (CEE) nº 2377/90 del Consejo de 26 de junio de 1990.
64. OMS. Evaluación de residuos de ciertos fármacos de uso veterinario en los alimentos. 47 Informe del comité mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios. Organización Mundial de Salud. Serie de Informes Técnicos, 876:92.
65. Directrices para el uso de la espectrometría de masas (EM) en la identificación, confirmación y determinación cuantitativa de residuos. Codex alimentarius CAC/GL 56-2005.
66. Groot MJ, Schilt R, Ossenkoppele JS, Berende PLM, Haasnoot W. Combinations of growth promoters in veal calves: consequences for screening and confirmation methods. J. Vet. Med. Series A. 1998; 45:425-440.
67. González GP, Fernández FT, Cadahía MO, Fente SCA, Franco AC, Cepeda SA. Rapid and simple determination of clenbuterol residues in retina by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. J. of Chromatography B. 1996; 677: 167-171.

68. González P, Fente AC, Vázquez B, Quinto E, Cepeda A. Determination of residues of the β -agonist clenbuterol in liver of medicated farm animals by gas chromatography-mass spectrometry using diphasic dialysis as an extraction procedure. *Journal of Chromatography B* 1997; 693: 321-326.
69. Lawrence FJ, Ménard C. Determination of clenbuterol in beef liver and muscle tissue using immunoaffinity chromatographic cleanup and liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. *Journal of chromatography B*. 1997; 696: 291-297.
70. R-Biopharm, Ridascreen Clenbuterol Fast. Enzyme Immunoassay for the quantitative analysis of clenbuterol and other beta-agonists. Art.No.R-1701, 2009.
71. Flores HO, Delgadillo JLM, Ontiveros EF. Técnicas analíticas para β -agonistas. Simposium internacional sobre Beta-agonistas y su uso en Medicina Veterinaria. 29-30 de julio 2002.
72. Boyd DM, O'Keeffe. Matrix solid phase dispersion as a multiresidue extraction technique for β -agonists in bovine liver tissue. *The analyst* 1994. 119:1467-1470.
73. González GP, Fernández FT, Cadahía MO, Fente SCA, Franco AC, Cepeda SA. Rapid and simple determination of clenbuterol residues in retina by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. of Chromatography B*. 1996. 677:167-171.

74. Lin AL, Tomlison AJ, Duane SR. Detection of clenbuterol in bovine retinal tissue by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography A*, 1997; 726:275-280.
75. Van VG, Preece S, Gaspar P, Manhuin-Rohister G, DePauw E. Gas and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for the multiresidue analysis of β -agonists in biological matrices. *Journal of Chromatography A*. 1996; 750: 43-49.
76. Knaap DR. Handbook of analytical derivatization reactions. Capitulo 2. Amino Compounds New York 1979:65-102.
77. Métodos analíticos. Guía de validación. 2002. Ma. Araceli García, Evelyn Soberón, Myriam Cortés, Ramón Rodríguez, José Luis Herrera, Alejandro Alcántara. Comisión de validación de métodos analíticos. Colegio nacional de químicos farmacéuticos A. C.
78. Pérez M, Ramírez G, Pérez M, Restrepo P. Validación del método analítico para la determinación de valsartán en plasma humano por HPLC/UV con adición de estándar empleando losartán como estándar intermedio. *Colombia medica*. 2007. 38 (1): 13-20.
79. Castillo AB, González HR. Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos. *Rev. Cubana de Farmacia*. 1996. 30(1).
80. The fitness for purpose of analytical methods a laboratory guide to method validation and related topics. EURACHEM. 1aEd. 1998.
81. Vinagre J. calidad de métodos analíticos. Departamento de agricultura. Deposito de documentos de la FAO Cap. 13
82. ICH Topic Q2B. Validation of Analytical Procedures: Methodology. Note for Guidance on validation of analytical procedures: Methodology (CPMP/ICH/281/95). The European agency for the evaluation of medicinal products. Human medicines evaluation unit. 1996. 4.

83. FAO Food and Agricultural Organization of the United Nations.
84. Hernandez CL, Pacheco GC, Gonzalez ADG, Ramirez AA. Aplicación de la técnica de ELISA para la determinación de clenbuterol en retina de bovino. Avances en la investigación científica del CUCBA. 2006:742-747.
85. Hawkins DR, Elsom LF, de Salis CM, Morris GR, Roberts NL, Cameron DM, Offer J, Fish C. The disposition of the combination product 14C-N-AB 365 CL Trimethoprim/Sulfadiazine in calves – U-Venti 70, Plani 42, Venti TMP/S 8 -. Submitted to FAO by Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Germany. 1985.
86. Elliot CT, Crooks SRH, McCaughey WJ. Development of a rapid screening test to detect β -agonist residues in bovine eye and hair. Vet Rec 1995;137:643-644.
87. Maucelli A, Ellendorf F, Meyer HHD. Tissue distribution and residues of clenbuterol, salbutamol and terbutaline in tissues of treated broiler chickens. J. Anim. Sci. 1994. 72:1555-1560.
88. Sporano V, Grasso LEM, Oliviero G, Brambilla G. Clenbuterol residues in non-liver containing meat as a cause of collective food poisoning. Veterinary Human Toxicology. 1998. 40(3):141-143.
89. Salleras L, Dominguez A, Mata E, Taberner JL, Moro I, Salva P. Epidemiologic study of a outbreak of clenbuterol poisoning in Catalonia, Spain. Public Health Reports. 1995. 110 (3):338-342.

90. Storev G, Michailova A. Quantitative determination of sulfonamide residues in food of animal origin by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J of Chrom A*. 2000. 841: 37-42.