



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**Comparación del método analítico CG/EM y ELISA
para la identificación de Clembuterol en órganos y
tejidos en una investigación forense.**

T E S I N A

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
PRESENTA:**

Gisela Reyes Alejo

Asesora: Q. F. I. Estela Valencia Plata

México D. F. 2012



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Nombre: Gisela Reyes Alejo

No. De Cuenta: 9463239-2

Año de terminación de carrera: 2003

Orientación: Farmacia

Título:

Comparación del método analítico CG/EM y ELISA para la identificación de Clembuterol en órganos y tejidos en una investigación forense.

Asesor: Q. F. I. Estela Valencia Plata

Lugar donde se desarrolla el trabajo:

Facultad de Estudios Superiores- Zaragoza

Opción de Titulación: Diplomado de Química Legal

La vida, para mí, no es una vela que se apaga. Es más bien una espléndida antorcha que sostengo en mis manos durante un momento, y quiero que arda con la máxima claridad posible antes de entregarla a futuras generaciones.

George Bernard Shaw

A mis tres pequeños hijos :

Karla, Antonio y Linet

Quiero agradecerles su ayuda, apoyo y comprensión.

Los amo, este trabajo es por ustedes.

A mi esposo :

José Antonio Granados, Gracias.

Porque sé que en ti tengo respaldo, ayuda y cariño,

eres mi ejemplo a seguir por tu esfuerzo y

dedicación en todo lo que haces.

A mi papi y a mi mami :

Gilberto Reyes y Maricela Alejo,

Porque siempre tienen para mí lo mejor de ellos,

amor, ayuda, cuidado, consuelo, una palabra de aliento,

todo incondicional

Los amo, los admiro y respeto.

A mi hermana Yazmin.

No solo tengo en ti a una hermana, sino a una gran amiga,

Y a cada uno de mis hermanos : Misael, Carlos, Eduardo y Gilberto.

Gracias por estar conmigo cuando los necesito, los quiero mucho.

Estoy convencido de que en este día somos dueños de nuestro destino, que la tarea que se me ha impuesto no es superior a mis fuerzas, que sus acometidas no están por encima de lo que puedo soportar. Mientras tengamos fe en nuestra causa y una indeclinable voluntad de vencer, la victoria estará siempre a nuestro alcance.

Winston Churchill

El trabajo realizado llevó mucho esfuerzo y dedicación, no solo personal, fue hecho con la ayuda, esmero y entusiasmo de mi asesora la Q.F.I. Estelita, y cada uno de mis sinodales : Maestra Gris, Maestra Leonor, Maestro Isidro y Maestro Victor, que no solo considero maestros y expertos, sino también amigos: A ellos, un fuerte abrazo y un sincero gracias.

A mis amigos, que tuvieron a bien preocuparse y ayudarme conforme a sus posibilidades y aptitudes : Ma. Del Refugio Hernández, Rosa María Granados, Lourdes Espejel, Guadalupe Rincón, Erika Nava, Coral Lozano, Marino Alcantara, Antonio Vazquez, Glafira, Marisol, Ana, Sandra... A cada uno de ellos muchas gracias, pues son parte importante del esfuerzo realizado.

INDICE

Página

| | |
|--|----|
| 1. Resumen | 1 |
| 2. Introducción | 2 |
| 3. Marco Teórico | |
| 3.1. Antecedentes | 4 |
| 3.2. Clembuterol | |
| 3.2.1. Descripción | 5 |
| 3.2.2. Propiedades físicas y químicas | 6 |
| 3.2.3. Usos | |
| 3.2.3.1. Clínicos | 8 |
| 3.2.3.2. Veterinaria | 9 |
| 3.2.4. Farmacología del clembuterol | |
| 3.2.4.1. Efectos farmacológicos | 10 |
| 3.2.4.2. Farmacodinamia | 12 |
| 3.2.4.3. Farmacocinética | 14 |
| 3.2.4.4. Metabolitos de clembuterol | 16 |
| 3.2.5. Reacciones adversas | 17 |
| 3.2.6. Residuos medicamentosos y químicos | 18 |
| 3.2.7. Toxicidad | |
| 3.2.7.1. Toxicidad aguda | 19 |
| 3.2.7.2. Toxicidad subaguda | 20 |
| 3.2.7.3. Toxicidad crónica | 20 |
| 3.3. Tiempo de retiro y Límite Máximo Permisible de clembuterol | 22 |
| 3.4. Requisitos que deben cumplir los alimentos | 25 |
| 3.5. Normas de control | 28 |
| 3.5.1. Entidades autorizadas | 31 |
| 3.6. Técnicas analíticas para la determinación de clembuterol | 33 |
| 3.6.1. Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) | 33 |
| 3.6.1.1. Descripción del método básico para detectar anticuerpos | 34 |
| 3.6.1.2. Variaciones de análisis de ELISA | 35 |
| 3.6.1.3. Metodología de ELISA aplicada a clembuterol | 39 |
| 3.6.2. Cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas | |
| 3.6.2.1. Cromatografía de gases | 41 |
| 3.6.2.2. Espectrometría de masas elemental | 46 |
| 3.6.2.3. Cromatografía de Gases acoplada a un Espectrómetro de Masas | 47 |
| 3.6.2.4. Metodología de CG/EM aplicada a clembuterol | 48 |
| 3.6.2.5. Espectros de la determinación de clembuterol | 50 |
| 4. Planteamiento del problema | 52 |
| 5. Objetivos | |
| 5.1. Objetivo general | 52 |
| 5.1.1. Objetivo particular | 52 |
| 6. Importancia del estudio | 53 |
| 7. Limitaciones del estudio | 53 |
| 8. Análisis comparativo de las técnicas | 54 |
| 9. Conclusiones | 56 |
| 10. Referencias Consultadas | 58 |
| 11. Glosario | 62 |

1. RESUMEN

En la actualidad existen problemas de intoxicaciones causadas por el uso incorrecto de clenbuterol en carne para consumo humano. Este problema surgió de la necesidad de obtener un mayor rendimiento en el aprovechamiento de la carne del ganado bovino y así un mejor rendimiento financiero y económico; como consecuencia de esto se obtuvieron resultados no favorables, la manifestación de la intoxicación por clenbuterol consiste en mareos, dolores de cabeza, calambres, incluso la muerte, entre otros, todo esto debido a que el clenbuterol es un medicamento con un rango de toxicidad muy amplio y la ingesta de carne contaminada excede fácilmente la dosis que debe ser administrada a un ser humano.

Actualmente se utilizan dos técnicas para la identificación y determinación de clenbuterol: la prueba de Inmunoensayo (ELISA) y Cromatografía de gases acoplada a un Espectrómetro de masas (CG/EM). En el presente trabajo de manera bibliográfica se realiza una comparación de ambos métodos analíticos para evaluar eficacia, utilidad, rapidez, ventajas y desventajas, aplicados a un laboratorio forense.

Al realizarse la investigación bibliográfica, se puede observar que ambos métodos son totalmente diferentes, llegando a la conclusión que ELISA tiende a ser un método presuntivo, ya que su grado de confiabilidad puede variar dependiendo de cada una de las variables utilizadas en el procedimiento. Por otro lado el método analítico CG/EM es confirmativo con un margen de seguridad del 99.9% de seguridad para detectar β_2 -agonistas, en este caso clenbuterol, sin embargo por el costo del equipo y de los reactivos que se utilizan para el análisis muchos laboratorios como SAGARPA utilizan el método de inmunoensayo (ELISA).

2. INTRODUCCIÓN

El consumo de carne vacuna, porcina, avícola o bovina, se está convirtiendo en un problema de salud pública en México, ya que los casos de intoxicación van en incremento y al parecer los ganaderos no tienen plena conciencia o poco les importa el impacto en la salud que le generan a la población expuesta, ya que entre otros tipos de sustancias emplean antibióticos, hormonas y clenbuterol. Este último con la finalidad de generar un fuerte efecto anabólico, es decir, el clenbuterol es una sustancia con capacidad para disminuir la tasa de reducción proteíca en la célula muscular y provocar así un mayor desarrollo de la misma. A esta acción anabólica se une el ligero efecto que tiene este agente sobre la temperatura corporal, la cual, después del uso del compuesto, aumenta. El incremento de la temperatura favorece el consumo de grasa en el organismo. (1, 3)

Estas propiedades son las que han hecho del clenbuterol uno de los compuestos más utilizados por atletas y deportistas que desean aumentar la masa muscular, aunque es una sustancia con efectos tóxicos si se consume de forma descontrolada y en dosis elevadas. (12)

Los efectos más destacables en dosis del orden de 100-140 µg/día en hombres y de 80-100 µg/día en mujeres son: palpitaciones, nerviosismo, temblores, temblor involuntario de los dedos, dolor de cabeza, aumento de la transpiración, insomnio, posibles espasmos musculares, aumento de la presión sanguínea y náuseas. Es importante comentar que si la persona expuesta padece alguna enfermedad crónica relacionada con alguna de las características de la intoxicación antes citada, puede funcionar como un agente sinérgico del problema de salud y llevarlo hasta la muerte. (5,8)

El clenbuterol es un fármaco comúnmente empleado en enfermedades respiratorias como descongestionante y broncodilatador en seres humanos. En el área de veterinaria se usa en el tratamiento de obstrucción pulmonar y como relajante uterino durante el proceso de parto en vacas y equinos. En el ámbito comercial y alimenticio empezó a utilizarse como promotor del crecimiento animal ya que mejora la eficiencia alimenticia y la relación músculo-grasa de los canales de bovinos, ovina, cerdos y aves, sin embargo tiene como resultado una acumulación en los tejidos comestibles, especialmente en hígado y en menor grado en el músculo, por lo que el consumo de vísceras siempre tiene mayor riesgo de toxicidad que la carne, en personas que los consumen. (15, 16)

En México, estadísticamente los casos reportados son pocos, siendo más recurrentes o al menos producto de una mejor investigación de dicho delito, en el Distrito Federal, Morelos y Querétaro, en los cuales se ha identificado en muestras de vísceras de animal y alimento de los mismos animales.

La SAGARPA ha publicado Normas que regulan y controlan el uso de aditivos en la alimentación animal, cuando se trata de alimento se realizan muestreos del alimento como

tal o como materia prima para ser mezclada con el mismo. El reto analítico para este tipo de muestras es sencillo, ya que generalmente se encuentra en forma de clorhidrato, y se pueden identificar fácilmente mediante técnicas de extracción básica líquido-líquido y espectrofotometría infrarroja. (29)

La importancia de realizar la identificación en órganos de animales, radica en identificar la presencia del clenbuterol en dichas muestras biológicas, ya que así, se puede demostrar como el animal fue expuesto a la acción de dicha sustancia incurriendo en incumplimiento en las normas establecidas para ello, como la NOM-EM-015-2002; cuyas sanciones se encuentran establecidas en la Ley Federal de Sanidad Animal, Ley Federal sobre Metrología y Normalización, y se procede a formular la demanda ante Ministerio Público de la Federación.

Desde el punto de vista analítico, ha sido complicado diseñar una técnica que permita de manera rápida la identificación del clenbuterol, principalmente en hígado que es uno de los órganos en donde se encuentra en mayor cantidad. Ya que es necesario eliminar de la muestra tanto las proteínas como las grasas para poder aislar y obtener al clenbuterol, al cual por sus características físico-químicas y de estructura, se requiere derivatizarlo para poder caracterizarlo más fácilmente. Lo ideal es emplear las técnicas de análisis inmunoenzimático, de forma presuntiva y la confirmativa con cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. ANTECEDENTES

En 1965 se demostró que en animales alimentados con clenbuterol, se modificaba el crecimiento, aumentaban la masa muscular y reducían grasa. Se sugirió que directa o indirectamente podían incrementar el peso al modificar la concentración intracelular del Adenosin monofosfato ciclico (AMPc). Al principio de los años 80 se investigaron y utilizaron los β -agonistas por administración vía oral para uso en el crecimiento de animales de granja y poder disminuir los costos de producción. Se reportaron ganancias de peso muy elevadas en bovinos de engorda y un rendimiento alto en canal. Este efecto anabolizante se produce con dosificaciones diez veces mayores a las terapéuticas para el animal. También se observó que los efectos en las aves no eran tan pronunciados como en los ovinos y en los bovinos. (1)

En México se obtuvieron resultados similares con el clenbuterol suministrado en alimentos, tanto a cerdos como a aves. Sin embargo en las aves se requirió una dosis cinco veces mayor a la utilizada en las demás especies para obtener resultados palpables.(2)

Después se empezó a descubrir que tenía efectos secundarios en el consumidor de la carne, causando intoxicaciones agudas, ya que la dosificación continua de clenbuterol en dosis no controladas conduce a la acumulación en los tejidos comestibles, especialmente en hígado, por lo que a partir de 1988 se consideró ilegal el uso de este compuesto en Estados Unidos, Canadá, y Europa. El clenbuterol tiene un estado legal difícil y polémico en varios países debido a sus estudios contradictorios respecto a sus efectos de largo plazo y su relación con problemas cardiacos, de ahí su prohibición en humanos y uso restringido en animales. En la actualidad, en México se vende y se usa en forma aislada o combinada como un mucolítico aunque internacionalmente esta prohibido como promotor del crecimiento y no hay valor mínimo en el que se pueda considerar seguro, por lo que su detección en productos cárnicos se considera un delito. En México se emitió la Norma Oficial Mexicana-NOM-061-ZOO-1999 que prohibió su empleo en el país. (32)

3.2. CLEMBUTEROL

3.2.1. DESCRIPCIÓN:

El clenbuterol es un fármaco agonista β , de la familia de las Fenitanolaminas o aminas simpaticomiméticas, su estructura básica es una feniletilamina, compuesta por un anillo de benceno y una cadena lateral de etilamina, (Fig.1). Sus propiedades y características son las siguientes:

-Nombre común: Hidrocloruro de clenbuterol

Clorhidrato de clenbuterol

-Formula química: $C_{12}H_{18}N_2Cl_2O$

-Peso molecular: 277.19

-Estructura molecular:

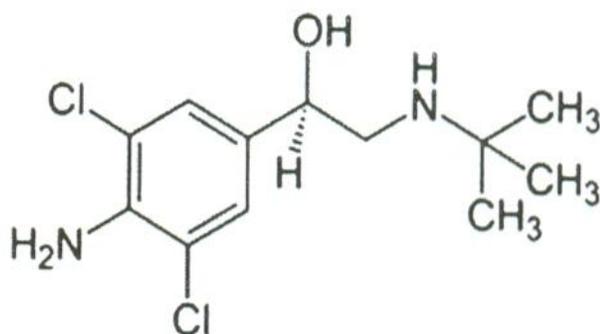


Fig. 1 Estructura molecular de clenbuterol.

-NOMBRES DE IUPAC:

- (R)-1-(4-amino-3,5-dicloro-fenil)-2-(tert-butilamino) etanol
- 1-(4-amino-3,5-dicloro- α [[1,1-dimetiletil]amino]-metil)bencenometanol
- Alcohol 4-amino- α -[(ter-butil-amino)-metil]-3,5-dicloro bencílico (4, 5)

3.2.2. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS:

Las propiedades y características del clenbuterol están determinadas por su estructura molecular.

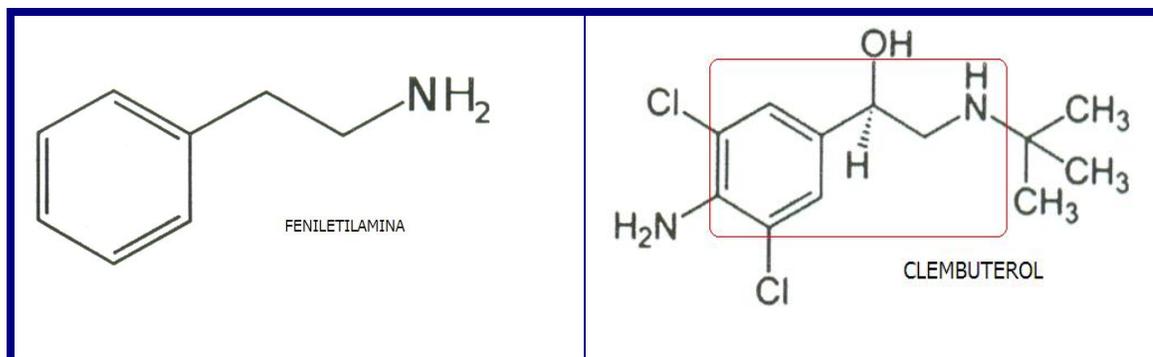


Fig. 2 Estructura molecular comparativa de Feniletilamina y clenbuterol.

La estructura molecular básica del clenbuterol es una β -feniletilamina, Fenilaminoetanol o feniletanolamina, constituida por un anillo de benceno y una cadena lateral de etilamina, la figura 2 hace una comparación de ambas estructuras.

Debido a esto el clenbuterol tiene las siguientes propiedades físicas y químicas:

- Polvo microcristalino incoloro.
- Muy soluble en agua, metanol y etanol
- Poco soluble en cloroformo
- Insoluble en benceno y en solventes orgánicos a pH fisiológico.
- Su Punto de fusión es de 174–175.5 grados Celsius.
- Su pka es de por lo menos 8.5 y superior a 10. (4,5)

Por su estructura molecular, el clenbuterol tiene las siguientes propiedades dentro del organismo:

- a. Tiene actividad simpaticomimética, la cual está determinada por dos átomos de carbono que separan al anillo del grupo amino. La actividad simpaticomimética es porque actúa a nivel del Sistema Nervioso Autónomo (S. N. Vegetativo).
- b. El tamaño del sustituto en el grupo amino le confiere afinidad en los receptores β_2 . Entre más grande es el sustitutivo en el grupo amino mayor es la selectividad por los receptores β .

- c. Las posiciones 3 y 5 en el anillo aromático tienen cloro (Cl), su presencia hace a la molécula afín a los tejidos lo que lleva a tener tiempo de vida media larga. (5)
- d. El suprimir uno o todos los grupos hidroxilo, significa mejorar la penetración a través de las membranas. (Barrera intestino-sangre: absorción inmediatamente después de la administración oral; barrera hematoencefálica: efectos sobre el S.N.C). El cloro hace a la molécula más liposoluble que a sus análogos, por lo que tiende a difundirse más profundamente en los tejidos.
- e. El Cl en las posiciones 3 y 5, y el sustituto del grupo amino confieren selectividad β_2 , ambas características tienen la propiedad de relajar la musculatura bronquial en pacientes asmáticos y generan estimulación cardíaca.
- f. La inclusión de un grupo hidroxilo en el carbono β disminuye las acciones del fármaco en el Sistema Nervioso Central, sobre todo porque es menos soluble en lípidos. Esta sustitución incrementa la propiedad agonista a nivel receptor α y β . Por esta razón se dilatan los bronquiolos, se incrementa la presión arterial y la frecuencia cardíaca.
- g. La polaridad se intensifica por el nitrógeno existente en un medio con un valor de pH fisiológico.
- h. La sustitución en el grupo amino de un sustitutivo mayor dificulta la destrucción por la monoaminoxidasa (MAO).
- i. La sustitución de los grupos hidroxilo en el anillo sirven de protección frente a la degradación provocada por la enzima catecolamin-O-metiltransferasa, (COMT)

(6, 7, 8)

El clenbuterol tiene diferencias con sus análogos en la actividad intrínseca, lo cual se debe a la sustitución de grupos funcionales en su molécula, las sustituciones en el anillo aromático son importantes para obtener una actividad biológica definida presentando comportamientos farmacocinéticos diferentes, como en la distribución y permanencia en el organismo, lo cual determina la magnitud del efecto del agonista y la persistencia de residuos en los tejidos. (1)

3.2.3. USOS

El clenbuterol es un fármaco agonista β , de la familia de las Feniletanolaminas, moléculas muy similares a las catecolaminas naturales como adrenalina y noradrenalina. Tiene propiedades adrenérgicas, es un simpaticomimético ya que tiene efectos en el sistema nervioso autónomo con propiedades selectivas β_2 estimulantes y con un mínimo efecto en β_1 o α , sus efectos son muy similares a los del neurotransmisor endógeno noradrenalina.⁽⁶⁾

3.2.3.1. USO CLÍNICO:

En humanos los agonistas β -adrenérgicos son los únicos medicamentos que tienen eficacia inmediata en el acceso agudo y grave de asma. El clenbuterol es un fármaco comúnmente empleado en enfermedades respiratorias como descongestionante, está indicado en el tratamiento y control de broncoespasmos de etiología asmática, en bronquitis crónica y aguda, bronquitis de fumadores, bronquitis enfisematosa y procesos broncopulmonares con componente espástico (broncoconstricción). La administración del clenbuterol es por vía oral, en tabletas o solución. ⁽¹⁵⁾

Regularmente se administra en niños de corta edad, menores de cinco años, debido a que no pueden manipular los inhaladores de dosis medidas y que presentan sibilancias ocasionales y en casos de infecciones virales de vías respiratorias; también es utilizado en individuos con exacerbaciones asmáticas graves y que al utilizar algún aerosol introducido por inhalador de dosis medidas o por nebulizador puede irritar y empeorar la tos y el broncoespasmo. Sin embargo, en adultos, es mayor la frecuencia de efectos sistémicos adversos con los fármacos orales que en los niños.

Además de estas propiedades terapéuticas, el clenbuterol se caracteriza por el fuerte efecto anticatabólico que presenta. Esto significa que es una sustancia que tiene la capacidad de disminuir la tasa de reducción proteica en las células musculares, provocando un mayor y rápido desarrollo de esta, lo que provoca un aumento en la temperatura corporal, propiedad que favorece el consumo de grasa en el organismo. Estas propiedades han hecho que también sea usado de forma ilegal por algunos atletas que lo utilizan generalmente durante el entrenamiento, para efecto a medio y largo plazo para aumentar la masa muscular, recuperarse físicamente más rápido y aumentar la duración y la intensidad del entrenamiento obteniendo así efectos físicos virilizantes ^(12,13, 24)

3.2.3.2. USO EN VETERINARIA

En veterinaria los agonistas β -adrenérgicos tienen efecto benéfico en el tratamiento broncoconstrictivo de las enfermedades del tracto respiratorio que cursan con acumulación de moco y broncoespasmos en afecciones agudas y crónicas en caballos y bovinos, también es un tocolítico, lo que quiere decir que es un relajante uterino durante el trabajo de parto, es utilizado como un inhibidor en las contracciones uterinas si el embarazo es tardío, siempre bajo la supervisión obstétrica. (1, 16, 17)

Se emplea en el tratamiento de alergias de caballos como un broncodilatador, puede ser administrado por vía oral o intravenosa

El clenbuterol es un agente de reparto, incrementa la síntesis proteínica muscular y disminuye la cantidad de grasa en la canal e inducen un efecto de reparto en ella. El fin es incrementar el rendimiento en canal de los animales para consumo humano. Se usa como anabólico para engordar de forma artificial el ganado, aumenta la masa muscular hasta un 15 % y disminuye la cantidad de grasa hasta el 18%, esta propiedad hace que su empleo sea ilegal en la ganadería, ya que al ser administradas dosis elevadas al animal, el fármaco se acumula en hígado, humor vítreo, riñón y es eliminado como fármaco no metabolizado.

En el ámbito internacional esta prohibido su uso como promotor del crecimiento, sin embargo y como consecuencia de las grandes ganancias obtenidas, su uso se ha vuelto clandestino. Este medicamento tiene efecto solo en la carne, hígado y ojos, la leche no se ve alterada en la calidad. Se administra en el alimento preparado, en forma farmacéutica o en el agua de beber. (2)

3.2.4. FARMACOLOGÍA DEL CLEMBUTEROL

3.2.4.1. EFECTOS FARMACOLÓGICOS

Los fármacos simpaticomiméticos producen una actividad intensa sobre todo el organismo, generando un estado de alta capacidad funcional, el Sistema Nervioso Central se alerta con atención y estimulación. Las principales funciones que cumplen estos fármacos son:

a). Vasos sanguíneos

El tono del músculo liso vascular se regula por receptores adrenérgicos. Los receptores β_2 promueven la relajación del músculo liso.

b). Corazón

Los efectos directos en el corazón se determinan en gran parte por los receptores β_1 , los receptores β_2 participan en menor grado. La activación de los receptores β_1 da por resultado un mayor flujo de entrada de calcio a las células cardíacas, lo que da consecuencias de tipo eléctrico y mecánico.

c). Presión arterial.

El efecto de los fármacos simpaticomiméticos sobre la presión arterial se explica en base en sus efectos sobre el corazón, la resistencia vascular periférica y el entorno venoso.

Los músculos deben de recibir de forma suficiente oxígeno y sustancias nutritivas, por ello aumenta la circulación en los músculos del esqueleto y se incrementa la frecuencia y la fuerza de contracción del corazón, de tal manera que entra mas sangre en la circulación, esto provoca un aumento de la presión arterial. Mediante un estrechamiento de los vasos sanguíneos en las vísceras, la circulación es canalizada hacia todos los músculos.

d). Aparato respiratorio.

Los bronquios se dilatan de tal manera que aumenta el volumen respiratorio, proporcionando una mayor captación de oxígeno por la sangre. ⁽⁸⁾

El músculo liso bronquial tiene receptores β_2 que producen relajación, lo que resulta una broncodilatación, la estimulación de estos receptores ayudan a incrementar la actividad de la enzima adenilato ciclasa, incrementando adenosin monofosfato cíclico, y la relajación del músculo liso bronquial. La estimulación de los β receptores sobre las células cebadas disminuye la liberación de mediadores inflamatorios de estas células. Hay algunas evidencias que los agonistas de receptores β -adrenérgicos incrementan la limpieza mucociliar en el tracto respiratorio.

e). Aparato digestivo.

Sobre el aparato digestivo, el transporte del contenido intestinal se frena reduciéndose el peristaltismo y estrechándose los músculos de los esfínteres. Con objeto de aumentar a pesar de todo, la oferta de alimentos al corazón y los músculos se libera en la sangre glucosa a partir del hígado degradando glucógeno y ácidos grasos del tejido adiposo por la descomposición de triglicéridos.

f). En ojos se observa poco efecto en la dilatación de la pupila.

g). Aparato genitourinario (Tocólisis)

El útero humano tiene receptores α y β_2 , los receptores β_2 determinan y median la relajación en el útero, lo que puede ser clínicamente útil en el embarazo. El efecto inhibitor de los β_2 -simpaticomiméticos sobre la actividad de las contracciones uterinas durante el parto puede utilizarse para eliminar las contracciones precoces, en peligro de un parto precoz. (7)

h). Glándulas exócrinas

La salivación es poca y espesa. Las glándulas salivales contienen receptores adrenérgicos que regulan la secreción de amilasa y agua, algunos simpaticomiméticos producen síntomas de sequedad bucal. Las glándulas sudoríparas apócrinas, localizadas en las palmas de las manos y algunas otras zonas, responden a los estimulantes de receptores adrenérgicos con un aumento en la producción de sudor, se inervan por vía simpática, resultando manos húmedas como en un estado de nerviosismo. Estas glándulas no termorreguladoras suelen relacionarse con el estrés.

i). Sistema Nervioso Central

Depende de la capacidad para cruzar la barrera hematoencefálica. Los efectos varían de nerviosismo a sensaciones indeseables. Los efectos periféricos son taquicardia y temblor, similares a las manifestaciones de ansiedad.

j). Efectos metabólicos

Los fármacos simpaticomiméticos tienen efectos importantes en el metabolismo intermedio. La activación de los receptores β adrenérgicos en los lipocitos conduce a un aumento de la liberación de ácidos grasos libres y de glicerol hacia el torrente sanguíneo. Los fármacos β_2 favorecen la glucogenólisis hepática, lo que produce un aumento en la liberación de glucosa a la circulación, el hígado humano esta mediado por receptores β_2 .

(6, 7, 8)

3.2.4.2. FARMACODINAMIA

A) Farmacodinamia Clínica.

Los agonistas adrenérgicos fisiológicos son noradrenalina y adrenalina. Los agonistas se han utilizado en la medicina humana por más de 40 años como broncodilatadores, tocolíticos y estimulantes cardíacos.

Son dependientes de diversos factores como:

- a) La afinidad del agonista con su receptor.
- b) Acoplamiento del complejo agonista-receptor al sistema transductor de señales.
- c) Transporte del fármaco al receptor.
- d) Número y cantidad de receptores adrenérgicos beta en el tejido blanco.

Los agonistas adrenérgicos β son moléculas orgánicas que actúan de la siguiente manera:

1. Se unen a los receptores adrenérgicos beta, formando un complejo agonista-receptor.
2. El complejo activa la proteína Gs y la subunidad alfa de esta proteína activa la enzima adenilatociclasa, la cual a su vez produce monofosfato de adenosina cíclico (AMPC), una de las principales moléculas de señalización intracelular.
3. Esta molécula produce sus efectos al unirse a la subunidad reguladora de la proteincinasa A, para liberar una subunidad catalítica que interviene en un gran número de reacciones intracelulares.
4. Dichas proteínas tienen funciones básicas que van desde permitir la entrada de Ca^{++} a la célula, hasta mediar la síntesis de proteínas clave para el funcionamiento celular y la liberación de lipasas. (1, 6)

B) Farmacodinamia veterinaria.

Al igual que otros agonistas β , estimula la producción de AMPC a través de la activación de la adenilciclasa.

El clenbuterol inhibe la liberación de histamina y otros mediadores de la inflamación inducida por antígenos y por estabilización de la membrana de las células cebadas. La dosificación de éste fármaco puede incrementarse y se observa un aumento satisfactorio significativo en el efecto, pero llega un punto en el que ya no tiene efecto terapéutico y empiezan a manifestarse los efectos adversos.

Disminuye la formación de los mediadores de la inflamación, prostaglandinas y leucotrienos. Incrementa el movimiento ciliar y aumenta la actividad secretomotora por incremento del metabolismo energético celular.

a). Efectos en el crecimiento muscular

El efecto producido por la administración del clenbuterol en bovinos, cerdos y ovinos es el aumento de la masa muscular. Se reconoce que un incremento de la síntesis proteínica muscular y un decremento en la degradación de esta o combinación de ambos, producen aumento en la masa muscular, la aplicación de agonistas adrenérgicos β amplifica estos efectos y se acompaña de incremento en la cantidad de tRNA para varias proteínas del músculo esquelético, entre las que se encuentran el mRNA para la miosina de cadena ligera, el mRNA de la α -actina y el inhibidor de proteasas. Los β -adrenérgicos aumentan el flujo sanguíneo a ciertas regiones del cuerpo, lo que permite el proceso de hipertrofia en el músculo esquelético al transportar mayores cantidades de sustratos y fuentes de energía para la síntesis proteínica.

b). Efectos en la grasa corporal.

El clenbuterol disminuye la cantidad de grasa e induce un efecto de reparto de ella. In Vitro se ha demostrado la degradación e inhibición de la síntesis de triacilglicéridos en los adipositos y de los ácidos grasos. Después de la administración prolongada, el tejido adiposo de los animales presenta aumento de la actividad lipolítica y un decremento de la actividad lipogénica. El ascenso de la concentración plasmática de ácidos grasos no esterificados, confirma la actividad lipolítica que ocurre.

c). Efectos en corazón

El clenbuterol tiene efecto similar a la adrenalina, estimula al miocardio dilatando los vasos sanguíneos que riegan al músculo estriado, este músculo tiene receptores β_2 y receptores α , la activación de los receptores β_2 produce la vasodilatación, por lo que se incrementa la frecuencia cardíaca y la fuerza de contracción del corazón; y la estimulación de los receptores α provoca la constricción de los vasos sanguíneos. En cada uno de los receptores, la concentración de inicio de adrenalina, la activación de los receptores β_2 es menor a la actividad de los receptores α , pero cuando ambos receptores se activan a concentraciones altas predomina la reacción de los receptores α . Las concentraciones fisiológicas de adrenalina generan vasodilatación de manera primordial. (1,15, 16)

3.2.4.3 FARMACOCINÉTICA

A) Farmacocinética Clínica.

Debido a que los β -adrenérgicos comparten propiedades fisicoquímicas, su comportamiento es similar dentro de los organismos en algunos aspectos, como por ejemplo, alcanzan concentraciones plasmáticas máximas en 1-3 h en la mayoría de las especies, incluyendo al ser humano. El clenbuterol, por la presencia de Cloro en su molécula, posee vida media mucho más prolongada que otros agonistas, ya que estos tienen vidas medias plasmáticas relativamente cortas. La presencia de cloro en la molécula, lo hace más liposoluble, tiende a difundirse más profundamente en los tejidos, sobre todo en grasa, y su biotransformación hepática por las enzimas COMT se hace más lenta.

Vía de administración oral: solución oral y tabletas. La presentación en tabletas es de 0.02 mg y en solución es por cada 100 mL contiene 0.2 mg.

La administración por vía oral tiene ventajas sobre las otras vías, debido a su fácil administración a niños y ancianos, en dosis medidas aunque inexactas; sin embargo es una ruta que ocasiona efectos adversos importantes por la estimulación de los receptores β_1 -adrenérgicos del corazón y la estimulación de los receptores β_2 del músculo estriado, lo cual ocasiona temblor.

La dosis terapéutica media por vía oral en humanos adultos es de 20, 30 y 40 μg , muestran un aumento en su acción broncodilatadora. Las dosis mayores a 40 μg no tienen efecto terapéutico mayor, sin embargo si provocan reacciones adversas como taquicardias, palpitaciones, temblor de manos, ligero nerviosismo, entre otras.

Se absorbe rápidamente y casi por completo entre 15 y 45 minutos por vía oral y, alcanza niveles plasmáticos máximos a las 2 horas, fijándose en un 50% a proteínas plasmáticas, a partir del cual su eliminación se realiza de manera bifásica observándose dos curvas, una rápida de vida media de 2 horas y otra lenta con vida media de 36 horas.

Se distribuye por casi todos los tejidos incluyendo placenta y se acumula principalmente en hígado, riñón y ojo (retina).

Se elimina prácticamente el 100% por vía renal y es excretado del 75% al 87% de la dosis administrada como fármaco no metabolizado en un periodo superior a las 86 horas después de la administración, solo una pequeña parte de la dosis se metaboliza. (9,15,16)

B) Farmacocinética Veterinaria.

El clenbuterol es usado para el tratamiento de infecciones respiratorias y obstrucciones bronquiales, que cursan con acumulación de moco y/o broncoespasmos en enfermedades agudas, subagudas y crónicas del tracto respiratorio de equinos y bovinos.

Administración:

a). Vía oral: Gránulos de clorhidrato de clenbuterol 0.016 mg/g, que se administran en el alimento o en el agua de beber 10 g por cada 200 Kg. de peso del animal, dos veces al día (una dosis de 0.8-3.2 µg/Kg).

b). Vía intravenosa: Solución inyectable de Clorhidrato de clenbuterol 0.03 mg/mL, que se administra en dosis de 1.25 mL por cada 50 Kg. de peso del animal, dos veces al día, (0.8 µg/Kg de peso del animal). También se utiliza como tocolítico para disminuir las contracciones uterinas en equinos y bovinos, retrasa el proceso de parto en una dosis de 300-450 µg/animal en dosis de 0.8 µg/Kg. de peso del animal administrándose por vía oral o vía parenteral. (15)

El clenbuterol es un fármaco que se absorbe bien por vía oral, después de su absorción se distribuye ampliamente hacia todos los tejidos, traspasando incluso barrera placentaria.

Cuando se administra clenbuterol por vía oral, intravenosa o intramuscular, se observa que la mayor parte (50 -85%) de la dosis se excreta por orina y heces, y una pequeña parte (0.9-3%) por leche.

Presenta vida media de eliminación de residuos muy prolongada ($T_{1/2}$) la cual se ha estimado en 120 h, de la cual resulta la acumulación de los residuos en una amplia gama de tejidos, sobre todo en retina, piel pigmentada e hígado. (1, 2, 15, 16)

Cuando el clenbuterol es usado como promotor del crecimiento se administran dosis de 10 µg/Kg de peso corporal durante 10 días, y se observan efectos anabólicos con cambios metabólicos y físicos, se disminuye la deposición de grasa y aumenta la masa muscular, esto con el fin de aumentar el efecto y el rendimiento. Cabe mencionar que esta dosis es 10 veces mayor a la dosis terapéutica recomendada. (1)

3.2.4.4. METABOLITOS DEL CLEMBUTEROL

El clembuterol es bien absorbido por vía oral, tanto en humanos como en los mamíferos, después de su absorción se distribuye ampliamente hacia todos los tejidos, traspasando incluso barrera placentaria. Después de su absorción el clembuterol se metaboliza en cuatro principales moléculas, encontradas en hígado y riñón, pero solo uno de los metabolitos tiene actividad farmacológica significativa, 1-(4-amino-3,5-diclorofenil)-2-hidroxi-tert-butilamino)-etanol-HCl presentando un efecto broncodilatador en menor grado al de la propia molécula, (aproximadamente menor al 20%). La proporción del metabolito es de 1–2 % de los residuos extraíbles en hígado y menor al 1% de los residuos en riñón.

(27)

Sin embargo una cantidad considerable es excretada sin ningún cambio, esto es por la presencia de un grupo OH (hidroxilos) y dos grupos NH_2 (aminas), y se excreta en su forma conjugada, por lo que el tratamiento químico de las muestras biológicas incluye una desproteínización y desconjugación. Las rutas metabólicas son muy parecidas, únicamente existe una ligera variación en los porcentajes entre éstos y la cantidad de los metabolitos producidos. (22, 23)

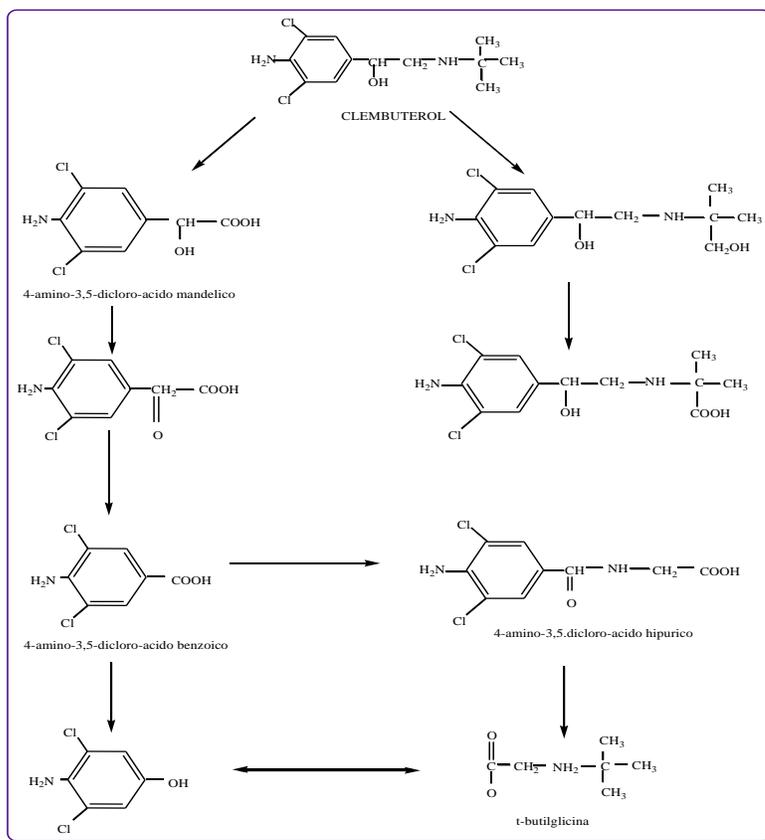


Fig. 3. Biotransformación del clembuterol en varios mamíferos.

3.2.5. REACCIONES ADVERSAS

La reacción adversa a un fármaco es una respuesta dañina y no deseada. Todos los efectos adversos son eventos serios, que amenazan la vida, se deben informar ya que pueden ser causa de muerte por indicaciones confusas, es la falla de la acción terapéutica, eventos por la suspensión del medicamento o algún evento inesperado no listado en la información del fármaco y puede generar por sus efectos dañinos algún accidente. Las reacciones adversas pueden darse por sobredosis, efectos excesivos o interacciones farmacológicas, también están determinados por el estado del individuo como la intolerancia, idiosincrasia (a menudo por origen genético) y alergia (habitualmente por su base inmunológica).

La reacción adversa de un medicamento según la NOM-220-SSA1-2002, se define como cualquier efecto perjudicial y no deseado que se presenta a la dosis empleada en el humano para la profilaxis, el diagnóstico, la terapéutica o la modificación de una función (OMS 1972) y la farmacovigilancia como la ciencia que trata de recoger, vigilar, investigar y evaluar la información sobre los efectos de los medicamentos, productos biológicos, plantas medicinales y medicinas tradicionales, con el propósito de identificar nuevas reacciones adversas y prevenir los daños en los pacientes (OMS 2002).

La detección de las reacciones adversas se lleva a cabo en los estudios clínicos, en los cuales se obtiene información limitada, lo que a su vez hace necesario continuar con esta tarea durante su comercialización para así detectar las reacciones adversas poco frecuentes (incidencia $<1/1000$) y de inicio tardío puesto en este momento ya se incluya a todo tipo de sujetos. Sin embargo la detección de estos efectos involucra una gran incertidumbre ya que las reacciones adversas de los medicamentos a menudo se confunden ya sea con la evolución natural del padecimiento o bien con patologías que también pueden estar relacionadas con otros agentes etiológicos o incluso con la aplicación de intervenciones diagnósticas.

El uso terapéutico de un medicamento se basa en estudios de eficacia y seguridad, considerados desde la perspectiva de la relación riesgo beneficio. De manera general, un medicamento es seguro cuando sus riesgos se consideran aceptables con relación al beneficio terapéutico que aporta, es decir cuando el patrón de reacciones adversas resulta tolerable. (44)

Los efectos adversos de los agonistas β_2 -adrenérgicos son resultado de la activación de los receptores β_2 -adrenérgicos y el efecto más frecuente es el temblor del músculo estriado, el cual desarrolla tolerancia si el tratamiento se inicia a dosis bajas y este se incrementa de manera progresiva conforme se desarrolla tolerancia al temblor. Sin embargo el tratamiento puede verse limitado por sensaciones de inquietud, aprensión y ansiedad, sobre todo después de la administración oral o parenteral. La taquicardia es un

efecto adverso frecuente de los agonistas β_2 -adrenérgicos administrados por vía general.⁽⁶⁾

El uso de clenbuterol requiere mucho cuidado, ya que, tiene un margen terapéutico muy estrecho. En humanos, dosis mayores de 40 a 60 μg las reacciones adversas frecuentes son: taquicardia, palpitaciones, nerviosismo, dilatación de las pupilas, dilatación de los bronquios, dolor de cabeza, náuseas, vómito, dolor de pecho, boca seca, calambres musculares, temblor de manos, incremento de la presión sanguínea y sudoración excesiva. (7, 11)

La actividad cardioestimuladora del clenbuterol es aproximadamente 2 000 veces superior a la de su análogo zilpaterol. (1, 11, 15, 18, 20)

3.2.6. RESIDUOS MEDICAMENTOSOS Y QUÍMICOS

Como consecuencia del empleo de medicamentos y sustancias químicas en el control y tratamiento de las enfermedades de los animales o de su inclusión, como aditivos en el pienso (alimento) para promover el crecimiento y mejorar su eficacia, pueden depositarse o almacenarse residuos de estas sustancias y sus metabolitos en células, tejidos u órganos de animales. Estas sustancias pueden ser administradas intencionadamente o involuntariamente, como el caso de los medicamentos o productos químicos usados para algún tratamiento. Todos los residuos, incluidos los productos madre, sus metabolitos y sus productos de descomposición (incluso la combinación de estos) son potencialmente importantes desde el punto toxicológico. Las cantidades residuales de medicamentos, sustancias químicas y sus derivados se expresan en partes por unidad de peso: ppm = mg/Kg y mg/L, ppb = $\mu\text{g}/\text{Kg}$ y $\mu\text{g}/\text{L}$, ppt = ng/Kg y ng/L. Los residuos no intencionales son los que aparecen en el pienso o alimento como resultado de circunstancias que no perseguían protegerlo frente al ataque de enfermedades infecciosas o parasitarias. El residuo puede llegar al alimento o pienso en cualquier momento durante el crecimiento, producción o almacenamiento, también se consideran residuos medicamentosos o químicos que aparezcan como contaminante ambiental y no pueda diferenciarse de los que son consecuencia del empleo normal para uso y control cotidiano. Un aditivo o residuo intencional o directo es el medicamento o sustancia química adicionada a una ración para controlar una enfermedad o promover el crecimiento.

3.2.7. TOXICIDAD

Toxicidad se define como la propiedad, estado o grado de una sustancia de ser venenosa, que puede ser aguda o crónica y se expresa en términos de “Dosis Letal Media” (DL_{50}). Dependiendo también por la vía de introducción, la cual puede ser oral, dérmica, por inhalación, endovenosa, intramuscular y subcutánea. (30)

Todos los fármacos son tóxicos a determinada dosis, la toxicidad es el grado de efectividad de una sustancia tóxica. Se trata de una medida que se utiliza para nombrar el grado tóxico de los elementos, tanto sobre un organismo completo (por ejemplo, el ser humano) como sobre una subestructura (una célula). La toxicidad depende de varios factores, como el tiempo de exposición a la sustancia en cuestión, la cantidad de exposiciones y la vía de administración. Se habla de una intoxicación aguda cuando una única exposición puede causar un daño severo, mientras que la toxicidad crónica es aquella que involucra a una exposición durante un periodo prolongado. (25)

La toxicidad se determina por sustancias o residuos de sustancias que afectan al organismo que entran, estos residuos tóxicos se definen como compuestos o la suma de compuestos presentes en cualquier porción comestible de productos animales, cuyo origen sea medicamentoso, como parte de las prácticas de producción o por contaminación ambiental, y que por estudios científicos se ha demostrado que puede constituir un riesgo para la salud pública si se consume por encima de niveles máximos de residuos permitidos. (29, 30, 31)

3.2.7.1. TOXICIDAD AGUDA

El estudio de la toxicidad aguda tiene por objeto determinar los efectos de una sustancia en una dosis única y muy elevada. Usualmente, el punto final del estudio es la muerte del animal y la toxicidad aguda se expresa por la dosis letal 50 (DL_{50}), que viene a representar la dosis de la sustancia que produce la muerte en el 50% de los animales.

La determinación del estudio se realiza en dos especies, con 5 grupos de 10 animales de cada sexo, ensayando dos vías de administración, se observa a los animales después de la administración de la sustancia y el estudio dura hasta 14 días, después de los cuales los animales son sacrificados y autopsiados.

La determinación de la DL_{50} se suele llevar a cabo en rata y ratón evaluando al menos dos vías de administración oral, i.v o i.m. En el perro y otros animales de tamaño parecido, el punto final del estudio no suele ser la muerte del animal, sino la determinación de la dosis que produce efectos adversos severos.

La DL₅₀ de clenbuterol en humanos adultos, masculino esta entre 80–180 mg/Kg. siendo la vía parenteral la ruta más tóxica. (19)

La DL₅₀ vía oral: en ratones 176 mg/Kg, en ratas 315 mg/Kg y en puercos de guinea 67.1 mg/Kg; Vía intravenosa: 27.6, 35.3, 12.6 mg/Kg respectivamente. (9, 15)

3.2.7.2. TOXICIDAD SUBAGUDA

En estas pruebas la administración del fármaco se lleva a cabo diariamente durante periodos que oscilan entre 15 días y 4 semanas. Las principales Administraciones Sanitarias requieren, antes de autorizar la administración de una dosis única de la sustancia al ser humano, que se hayan realizado estudios de toxicidad subaguda en dos especies animales, una de las cuales deberá ser no roedora. En ambas especies, se suelen utilizar entre 4 y 5 dosis de sustancia (vehículo, dosis baja, media - dosis alta o vehículo - dosis baja -dosis media baja - dosis media alta - dosis alta).

En la rata se requieren al menos 10 animales de cada sexo para cada dosis y en el perro, al menos 4 animales de cada sexo. Muy frecuentemente, se añaden dos grupos control de animales (uno tratado con vehículo y otro con la dosis más alta) que no son sacrificados al final del estudio, sino que se les deja una o dos semanas para recuperarse de las posibles lesiones inducidas por el producto.

Durante el estudio se controlan diariamente varios parámetros como aspecto, comportamiento, peso, consumo de agua y alimento, electrocardiogramas, examen oftalmoscópico, etc. y al final los animales son sacrificados y autopsiados. Al inicio del estudio y antes de la autopsia, se toman muestras de sangre y orina para ser analizadas. La autopsia consiste en el examen macroscópico de las vísceras y tejidos y en la toma de especímenes para su examen anatomopatológico.

La prueba se realiza con tres dosis y dos especies. Puede requerirse de 4 semanas a 3 meses antes de la prueba clínica. Cuanto más prolongado sea el uso clínico que se contemple, más larga será la prueba de toxicidad subaguda.

3.2.7.3. TOXICIDAD CRÓNICA

Básicamente, estos estudios tienen características similares a los anteriores en cuanto al número de animales, número de dosis, observaciones, etc. Los estudios de toxicidad subcrónica suelen durar hasta 3 meses, mientras que los de toxicidad crónica suelen durar 6 meses o un año, según el uso terapéutico que vaya a tener la sustancia.

Si, por ejemplo, la sustancia es un antihipertensivo o antidiabético oral, cuya administración en el hombre se prevé dure años, la toxicidad crónica durará un año.

En el caso de un antibiótico, usado en el hombre durante periodos de 8-10 días, bastará con estudios de 6 meses.

Es importante decidir la forma de administrar la sustancia a los animales durante estos períodos tan largos. Si la administración con una sonda gástrica no suele ocasionar problemas en tratamientos cortos, el estrés o la posibilidad de accidentes con el sondeo deben ser considerados frente a la mayor imprecisión y otros problemas que conlleva el administrar el fármaco mezclado con el alimento (rechazo del alimento, dilución de la dosis en el tiempo, absorción diferente, etc.)

Las administraciones exigen al menos dos especies animales, una de las cuales deberá ser no-roedor para los estudios de toxicidad subcrónica y crónica.

Para las pruebas de toxicidad crónica se utilizan especies de roedores y no roedores en un tiempo de 6 meses o más, Esta prueba es necesaria cuando se pretende usar el fármaco en humanos por períodos prolongados, se efectúa con la prueba clínica.

La ingesta de carne tratada con clenbuterol consumida por humanos conlleva a exceder las dosis médicas habituales, que van de los 40 a 60 μg al día y que no deben exceder de 150 μg / día. ⁽⁹⁾

La ingestión de productos cárnicos provenientes de animales tratados con clenbuterol y en los que no se aplicó un tiempo de retiro adecuado (más de 30 días), producen efectos que resultan peligrosos para el ser humano, los efectos que se han manifestado por la ingestión del fármaco contenido en carne contaminada son: adormecimiento de manos, temblores musculares, nerviosismo, dolor de cabeza y temblores.

3.3. TIEMPO DE RETIRO Y LÍMITES MÁXIMOS PERMISIBLES DE CLEMBUTEROL.

Para poder calcular los límites máximos permisibles es necesario conocer la ingesta o aporte diario aceptable (IDA), la cual es la dosis diaria de residuos medicamentosos o químicos que durante toda la vida aparece en una persona sin riesgo apreciable, o sea que no tiene efectos perjudiciales para la salud, de acuerdo al conocimiento científico de ese momento, este dato constituye una guía para conocer a cantidad máxima que puede ingerirse diariamente con el alimento sin riesgo apreciable para el consumidor. Los valores se van modificando continuamente cada vez que existan modificaciones en las leyes o normas para la salud, los valores de IDA se expresan en mg de medicamento o producto químico / Kg. de peso corporal.

La concentración máxima de residuos de un fármaco y sus metabolitos en tejidos o leche se calcula a partir de la ingesta diaria admisible (IDA), utilizando como factor de alimento diario ingerido un total de 300 gramos de carne, 300 g de grasa, 300 g de vísceras 2 huevos y un litro de leche. Para el caso del Clembuterol, el fármaco original es el residuo marcador y constituye el único residuo de importancia sanitaria, por lo que se considera a lo encontrado como el 100% de los residuos totales en músculo, grasa y leche y 60% de los residuos totales en hígado y riñón de bovinos. (1,2)

El uso terapéutico de este fármaco en veterinaria ocasiona la aparición de residuos de la sustancia en el tejido procedente de los animales tratados que irán destinados al consumo humano, por esta razón las autoridades sanitarias intentan controlar las cantidades del fármaco en los tejidos donde se acumula en mayor cantidad, de esta forma prevenir cualquier riesgo que se pueda presentar en la salud del consumidor.

Se ha establecido un Límite Máximo de Residuos (LMR) permitido después de la utilización del fármaco, este límite se basa en peso fresco de los animales. El LMR se basa en el tipo y en la cantidad de residuos que se considera que no constituye un riesgo toxicológico para la salud humana y se expresa en base a la dosis diaria admisible, dicho valor para clembuterol es de 0.04 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{día}$, lo que equivale a 2.4 $\mu\text{g}/\text{día}$ para una persona de 60 Kg, la cual está calculada a partir de los estudios experimentales realizados en animales de laboratorio y la aplicación de un factor de seguridad a la dosis a la que no se observan efectos.

El límite máximo de residuos establecido para equinos y bovinos es de 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en músculo, 0.5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. en hígado y en riñón, 0.05 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ en leche de vacas tratadas. El comité mixto FAO/OMS de expertos en aditivos Alimentarios recomienda los siguientes valores de LMR de clembuterol en bovinos 0.2 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ en músculo y grasa; 0.6 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ en hígado y riñones y 0.05 $\mu\text{g}/\text{L}$ en leche, a partir de estos valores de LMR, la ingesta diaria máxima sería de 0.235 μg , sobre un consumo diario de alimento de 300 g de músculo, 100 g de hígado, 50 g de riñón y grasa y 1.5 L de leche.

Para asegurar el LMR, deben fijarse tiempos de espera en función de la posología y la especie del animal, así como destino y función del fármaco para poder garantizar el consumo de los órganos o productos sin riesgo para el consumidor.

El tiempo de espera es el período que se ha de respetar desde el cese del tratamiento y hasta antes del sacrificio del animal, este tiempo se calcula aplicando modelos estadísticos e intervalos de confianza de forma que el 95 % de los animales tratados con una especialidad determinada y según una pauta concreta, las concentraciones de clenbuterol en los tejidos estarán por debajo de los niveles máximos establecidos.

En base al criterio de cero residuos se determina un tiempo de retiro de por lo menos 30 días, cuando se utiliza una dosis convencional solo para mejorar el rendimiento del canal. Los residuos hepáticos del clenbuterol permanecen en un rango de partes por billón (ppb) entre los días 16-39 después de terminado el tratamiento y en el rango de partes por trillón (ppt) hasta 56 días después del retiro, lo que deja de ser un riesgo para uso de consumo humano, si se realiza un retiro adecuado. Los residuos presentes en los diferentes tejidos disminuyen lentamente en hígado y riñón. En bovinos las concentraciones de clenbuterol disminuyen a un 16% a partir de los seis días después de la última administración. (2)

La administración terapéutica de clenbuterol, bajo prescripción veterinaria y respetando los tiempos de espera, los riesgos que se presentan serán nulos. El riesgo es cuando se utiliza de manera ilegal como anabolizante para formar masa muscular y como agente repartidor de la grasa, causando intoxicaciones debido a las altas cantidades de clenbuterol administradas a los animales, aún antes del sacrificio. (24, 27, 28)

A) Límite máximo de residuos (LMR): Es el nivel más alto permisible de un residuo o contaminante que puede considerarse como aceptable en una porción comestible de productos animales en particular, cuando éste es analizado por la metodología oficialmente aceptada para su cuantificación. También se conoce como límite de tolerancia.

Para la identificación y cuantificación de los límites máximos de residuos deben utilizarse métodos analíticos validados, oficiales, criterios para su funcionamiento, aplicación e interpretación. Los laboratorios deben ser oficiales y aprobados por las secretarías, por lo que deben ser laboratorios de prueba aprobados en materia Zoosanitaria, con métodos oficiales y validados internamente. Asimismo, las sustancias o materiales de referencia primarios, deben ser certificados con trazabilidad a patrones nacionales y cuando no existan dichos patrones en el país, la trazabilidad será a patrones internacionales, todos estos métodos deben realizarse en equipos e instrumentos a los que debe ser realizado un mantenimiento y calibración vigente, documentada y vigente, realizada en empresas preferentemente acreditadas, en tal caso que no existan estas empresas, deberán

demostrar experiencia en mantenimiento y calibración del equipo o instrumento específico al que brinden sus servicios.

B). Límite mínimo de detección (LMD): Es la concentración mínima de un residuo o contaminante a la que un método de laboratorio puede detectar muestras realmente positivas con una certeza estadística definida. También es conocida como capacidad de detección. (27,28,29,30)

| | MÉXICO SAGARPA NOM-004- ZOO-1994 | EUROPA EMEA | Consejo de las comunidades europeas. CEE2377/90 y CEE1312/96 | MÉXICO CONADE- WADA Agencia Mundial Antidopaje |
|-------------------------|---|------------------------|---|---|
| Hígado | 0.0001 ppm | 0.5 µg/Kg | 0.5 µg/Kg | |
| Riñón | 0.0001 ppm | 0.5 µg/Kg | 0.5 µg/Kg | |
| Músculo | 0.0001 ppm | 0.1 µg/Kg | 0.1 µg/Kg | |
| Grasa | 0.0001 ppm | | | |
| orina | 0.0001 ppm | | | |
| Leche | 0.0001 ppm | 0.05 µg/Kg | 0.05 µg/Kg. | |
| Atletas | | | | 2ng/mL |
| Método analítico | ◆Presuntivo o para detección: (ELISA) ◆Cuantificación: HPLC GC ◆Confirmatorios: GC/MS HPLC/MS | GC/MS | GC/MS | GC/MS |

Tabla. 1. Comparación de los límites máximos permisibles según las diferentes entidades, en Europa y México.

3.4. REQUISITOS QUE DEBEN CUMPLIR LOS ALIMENTOS

Los alimentos son sustancias que, en estado natural, preparado o transformado son consumidas por el hombre. Bajo este concepto se agrupan sustancias comestibles y nutrientes. Existen sustancias que se añaden a los alimentos para modificar sus características o conferirles efectos o propiedades especiales, estas son llamados aditivos y su empleo esta estrictamente regulado en lo referente y en la cantidad. Las materias primas y productos derivados que como resultado de su tratamiento o transformación han de convertirse en alimentos deben reunir los requisitos exigidos de acuerdo a las normas legales de los alimentos.

El grado en que un alimento reúne todos los requisitos que debe cumplir es la calidad, por lo que es el resultado de sumar las características de un artículo alimenticio que indican la idoneidad de éste para el fin al que se destina. Los factores que determinan la calidad de los alimentos pueden reunirse en tres grupos: tecnológicos, higiénico-nutritivos (contenido de nutrientes, ausencia de gérmenes patógenos o la presencia en los alimentos de residuos que supongan un peligro para la salud del consumidor) y psicológicos de calidad (destacan por su importancia al aspecto exterior de los artículos, los envases, la comodidad de su preparación, así como el aroma y sabor. La determinación de la calidad se consigue comparando el alimento en cuestión con un modelo o patrón teórico que viene descrito en las disposiciones legales generales o bien procede de las normas de comercio. Esta actividad no debe confundirse con las pruebas de aceptación que lleva a cabo un sector público medio, carente de formación técnica.

Las disposiciones legales resultan de tomar en consideración diversos puntos de vista, algunos de estos son:

- Lo que tecnológicamente es posible y habitual (costumbres y hábitos profesionales).
- Particularidades regionales en lo que se refiere a preferencias de consumo (Costumbres locales)
- Criterios de fisiología de la nutrición.
- Posibilidades económicas y diferentes necesidades de una a otra región, en lo que concierne a aportar el mayor número posible de productos animales adecuados para la obtención de alimentos.
- Exigencias higiénicas.

En principio resulta imposible obtener alimentos sin ningún riesgo, los factores de influencia que actúan sobre los alimento en su largo recorrido desde su obtención (animal o vegetal) hasta que llega al consumidor, son diversos, diferentes en cada uno de los pasos o tratamientos que se le da al alimento hasta llegar a un producto final.

Las especificaciones que deben cumplir los alimentos destinados al consumo humano por las disposiciones legales son:

A). Los alimentos deben ser sanitariamente intachables en lo referente a su consumo. Esta exigencia se hace extensiva a las materias primas utilizadas y a todos los productos intermedios de la obtención, preparación y transformación de un alimento.

B). Existen alimentos en los que siempre existirá un cierto riesgo por sus peculiares condiciones, pero que sin embargo existen normas y leyes particulares para su análisis, aprobación y control estos son el huevo, mejillones, carne cruda, etc.

C). Para la aplicación es necesario considerar algunos puntos como la tecnología en la industria alimenticia, la cual debe cumplir con una certificación de su inocuidad sanitaria. La calificación de inocuidad sanitaria se basa en el exacto cumplimiento por parte de los alimentos de los conceptos y especificaciones expresados en las disposiciones legales correspondientes. En los casos dudosos se actuará siempre de manera que quede protegida la salud del consumidor.

D). Los alimentos deben ser aptos para el consumo, es decir, no provocaran trastornos perjudiciales que impidan su oferta en las vías de comercio ordinarias, esto es: no estarán alterados, ni mostrarán desviaciones en su estado higiénico. Este principio es la ausencia de cualquier amenaza para la salud. El concepto antihigiénico es la nociva influencia por parte de características perjudiciales y el aumento del grado de contaminación de un alimento, así como la sensibilidad y la capacidad de aceptación por parte de la gente.

E). Tanto las materias primas, como los productos intermediarios deben cumplir con los requisitos de las normas en el transcurso de su elaboración y transformación. Esta prohibido llevar a cabo un proceso en el que no se le aplique un estudio o análisis a los productos intermedios. Por ejemplo, destinar a la fabricación de conservas de hígado a los cuales previamente no se le hayan expurgado focos parasitarios presentes, aún cuando el incumplimiento de esta norma no expusiera algún peligro sanitario y los consumidores no tuvieran noticia de la misma.

F). Los alimentos deben responder a las disposiciones legales en vigor y a las normas comerciales generales, en lo concerniente a su tecnología de fabricación, composición y demás características, así como en sus formas de presentación. En caso contrario, se declararan no aptos para salir al mercado alimentario.

G). Los fraudes (imitaciones, correcciones, sustituciones, falsificaciones y mermas de la calidad) no deben tener lugar en la comercialización de los alimentos.

H). Los alimentos no deben contener aditivos no autorizados, así como tampoco productos químicos nocivos, o sustancias y agentes de acción farmacológica, para estas

sustancias las disposiciones legales fijan los contenidos máximos permitidos en los alimentos.

l). Los alimentos deben exhibir una adecuada identificación, en sus envases deberán contener la siguiente información: denominación comercial, nombre y dirección del fabricante y del envasador, relación de los ingredientes, peso neto y escurrido, si procede y fecha tope de conservación. También se expresan los contenidos en calorías, nutrientes. En todos los casos debe quedar garantizado que lo expresado mediante palabras y dibujos en los envases y etiquetas responde a la realidad de forma inequívoca.^(25,26)

3.5. NORMAS DE CONTROL

Debido a sus efectos contradictorios, en varios países el uso del clenbuterol está prohibido en humanos y restringido en animales. Sin embargo siguen reportándose problemas de salud por la ingesta de productos cárnicos en diversos países como China, Irlanda, México y países del Centro y sur de América.

Actualmente en México existe una comisión intersecretarial para el control del clenbuterol constituida por:

A). La Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), Es la institución que regula los productos biológicos, químicos, farmacéuticos y alimenticios para uso en animales o consumo para éstos, y es la responsable del control de las sustancias que constituyan un riesgo zoonosológico.

B). La Secretaría de Salud (SSA), por ser el clenbuterol un riesgo para la salud pública.

C). La Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS).

El 8 de Noviembre de 1994 se emitió una norma Oficial Mexicana para el control de residuos tóxicos en carne, grasa, hígado y riñón de bovinos, equinos, porcinos y ovinos, (NOM-004-ZOO-1994), emitida por la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, en donde se establecen las bases para la detección y el control de residuos tóxicos en tejidos alimenticios de origen animal provenientes de establecimientos de sacrificio ubicados en el país o de una planta aprobada por la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, cuando los tejidos sean de importación. En la tabla 2 se muestra el grupo de sustancias que deben controlarse, los tejidos que deben analizarse y la metodología que debe ser utilizada, según la NOM-004-ZOO-1994.

| Compuestos | Tejidos | Métodos analíticos |
|------------|-------------------------|---|
| Anabólicos | Hígado, Riñón y Músculo | Extracción Líquido-líquido Cromatografía de gases Espectrometría de Masas |

Tabla 2. Puntos importantes marcados por la NOM-004-ZOO-1994, para el control de Clenbuterol. (30)

En 1996 surge una modificación a esta norma en la que se integra el método analítico de Cromatografía de Gases acoplada a un Espectro de masas, en el 2001, además de este punto, también se mencionan los Límites Máximos permisibles y los Procedimientos de muestreo, igualmente para el grupo en general de anabólicos.

En mayo de 2011 se emitió una modificación a la NOM-004-ZOO-1994, la cual tiene por objetivo especificar los límites máximos permisibles de residuos tóxicos en alimentos de origen animal. Esta norma es aplicable a todos los establecimientos que estén bajo el control de la SAGARPA y a los autorizados a exportar a México. En esta norma se menciona que:

1. El control de residuos tóxicos se establece con el fin de asegurar a los ciudadanos el suministro de alimentos sanos e inoocuos, ya que el consumo de alimentos de origen animal contaminados durante la producción implica diversos riesgos para la salud que dependen de la presencia y magnitud de los residuos nocivos.
2. Los residuos presentes en los alimentos pueden ser de naturaleza biológica por contaminación microbiana, proveniente del manejo inadecuado de los productos; química por el uso incorrecto de medicamentos veterinarios o plaguicidas; por no concluir el lapso de retiro o plazo de seguridad estipulado; por contaminación ambiental por diversos elementos.
3. Los beneficios que reporta el hecho de contar con un programa eficaz de residuos, se encuentra el de participar con mayor confianza en el comercio internacional de alimentos, contando de esta forma con las bases suficientes para certificar la inocuidad de los productos alimenticios de origen animal, tanto de importación como de exportación.
4. Por la continua comercialización de alimentos nacionales de origen animal y de importación, es indispensable actualizar los límites máximos permisibles de residuos tóxicos, biológicos y contaminantes, motivo de interés sanitario en alimentos de origen animal, mismos que es recomendable adoptar u homologar en el ámbito Nacional.
5. En materia de métodos y técnicas de laboratorio constantemente se está generando información técnica y científica que garantiza mejora en la confianza y eficiencia para el monitoreo y el control de residuos tóxicos, biológicos y contaminantes en los alimentos, misma que basada en los criterios de los organismos internacionales es recomendable considerar, y en su caso, adoptar para que de manera oportuna se beneficie la constatación de alimentos en apoyo a la salud animal y humana.

La tabla 3 menciona los tejidos que deben muestrearse, así como los métodos convenientes para la detección, cuantificación y confirmación de clenbuterol, según la modificación de la NOM-004-ZOO-1994, emitida durante este año. . (29)

| Grupo | Compuesto | Tejido o producto | Método presuntivo o de detección | Método para cuantificación | Método confirmatorio |
|--------------------|-------------|---|----------------------------------|----------------------------|----------------------|
| β -agonistas | Clenbuterol | Hígado músculo riñón grasa orina leche | ELISA | HPLC GC | GC-MS HPLC-MS |

Tabla 3. Modificación de los requisitos para el control de clenbuterol en la NOM-004-ZOO-1994

En el año 2002, SAGARPA emite una alerta sanitaria nacional para el control del uso de clenbuterol, elaboró y publicó una norma emergente la NOM-EM-015-ZOO-2002, “Especificaciones técnicas para el control de beta-agonista en los animales”, bajo esta norma se realizaron muestreos en todo el país, en animales vivos se analizó pelo, suero sanguíneo, orina, lana y plumas de aves; en animales sacrificados de los rastros se tomó músculo, hígado, riñón y globo ocular. Todas las muestras son enviadas para su análisis a laboratorios de SAGARPA y externos capacitados y aprobados. Las medidas de la aplicación de control siguen en marcha debido al dispositivo nacional de emergencia en salud animal. En la Norma Oficial Mexicana NOM-015-ZOO-2002, se mencionan los métodos analíticos para realizar la identificación del clenbuterol.

En la Secretaría de Salud existe un marco regulatorio en el que se prohíbe el uso de clenbuterol en productos cárnicos bovinos, dentro de este se pueden señalar las siguientes Normas:

- Norma Oficial Mexicana NOM-061-ZOO-1999, (4.11.5). Especificaciones Zoosanitarias de Los Productos Alimenticios para Consumo Animal, en esta norma se prohíbe el uso del clenbuterol en la formulación de productos alimenticios para consumo animal.

- Norma Oficial Mexicana NOM-194-SSA1-2004, (8.6). Productos y Servicios. Especificaciones sanitarias en los establecimientos dedicados al sacrificio y faenado de animales para abasto, almacenamiento, transporte y expendio. La técnica utilizada por SAGARPA y SSA para la identificación de clenbuterol es la prueba de ensayo inmunoenzimático (ELISA).

Existen otras normas que surgen a la par con las anteriores, las cuales sirven para reforzar y ayudar en el cumplimiento de las primeras normas, algunas de estas son:

- La NOM-003-ZOO-1994, Criterios para la operación de Laboratorios de Prueba Aprobados en Materia Zoosanitaria.
- La NOM-009-ZOO-1994, Proceso Sanitario de la Carne.
- La NOM-030-ZOO-1995, Especificaciones y Procedimientos para la verificación de carnes, canales, vísceras y despojos de importación en puntos de verificación zoosanitaria. (29,30,31,32,33,34)

3.5.1. ENTIDADES AUTORIZADAS.

Cada una de las normas antes citadas sirven como elementos a la Secretaría de Salud para el monitoreo y control de los residuos tóxicos y contaminantes de los alimentos de origen animal, por lo que el incumplimiento a las disposiciones contenidas en las Normas se sanciona conforme a lo establecido por la ley Federal de Sanidad Animal y la Ley Federal sobre Metrología y Normalización. (30,31)

Las autoridades encargadas y facultadas para sancionar el mal uso o incumplimiento a las Normas son:

- Procuraduría General de la República (PGR), quien persigue los delitos contemplados en la Ley Federal de Sanidad Animal.
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), encargada de regular medicamentos veterinarios y vigilar que no se utilice esta sustancia en la engorda de ganado y encargada de aplicar medidas cuarentenarias y sancionar administrativamente a los infractores.
- Comisión Federal para la protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), encargado de revisar que la carne con clenbuterol no llegue al comercio y encargada de sancionar a los rastros y puntos de venta.
- Comisión Nacional de Cultura Física y Deporte (CONADE), autoridad deportiva que coadyuva en diversas acciones de prevención.
- Secretaría de Seguridad Pública (SSP), Genera inteligencia que permite conocer de fondo las redes de distribución del clenbuterol.
- Servicio de Administración Tributaria (SAT) y Aduanas-México, se encargan de detectar importaciones ilegales y sancionar a evasores de impuestos.

El principal objetivo de la aplicación de las Normas, su cumplimiento, acciones y sus sanciones es contribuir a:

1. Prevenir el riesgo sanitario por intoxicación de clenbuterol en humanos.
2. Prevenir que la industria ganadera, los productores y los consumidores se vean dañados económicamente.
3. Prevenir el enriquecimiento ilícito de los ganaderos y productores a costa de la salud animal y humana.
4. Determinar la presencia de clenbuterol por origen alimentario en la comunidad deportiva.
5. Sancionar de manera más eficiente el uso del clenbuterol a través de procesos penales y administrativos que refuercen a la presencia del estado y la percepción de riesgo. (29,30,31,32,33,34)

3.6. TÉCNICAS ANÁLITICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE CLEMBUTEROL.

3.6.1 ENSAYO INMUNO ENZIMÁTICO (ELISA).

El análisis de inmunoabsorción unido a enzimas, es una de las técnicas inmunológicas que se basan principalmente en las interacciones entre antígenos y anticuerpos, son aplicadas para detectar y cuantificar endotoxinas bacterianas, así como para la identificación de cualquier molécula que actúe como antígeno en los tejidos, las cuales pueden estar presentes en alguna muestra problema, sirviéndose de métodos inmunocitoquímicos. Esta prueba inmunológica implica la interacción antígeno–anticuerpo y su capacidad para precipitar cuando se combinan en proporciones de equivalencia o cercana a ella. La prueba de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA, Enzyme-Linkedimmunosorbent Assay), sirve para cuantificar cantidades muy pequeñas de estas moléculas. El antígeno marcado se mezcla con el anticuerpo a una concentración que satura los sitios de unión a un antígeno del anticuerpo. La enzima conjugada con un anticuerpo reacciona con un sustrato incoloro para generar un producto con color. Ese sustrato se denomina sustrato cromógeno. Para ELISA se utilizan varias enzimas, como fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante y β -galactosidasa. Las técnicas de inmunoanálisis en las que se utilizan reactivos marcados para detectar antígenos y anticuerpos presentan muy buena sensibilidad, y los reactivos que se utilizan son muy económicos, además permiten llevar a cabo una gran cantidad de determinaciones en un corto espacio de tiempo. (36)

El análisis por ELISA tiene dos aspectos clave:

1. Debe de existir al menos de uno de los reactivos en estado puro y detectable a fin de cuantificar la reacción, esto, para realizar una preparación pura del antígeno o del anticuerpo conocidos o ambos para la estandarización del análisis.
2. Debe de existir una forma de separar la fracción unida del reactivo marcado de la fracción libre o no unida, de manera que pueda calcularse el porcentaje de la unión específica. Esta separación se logra inmovilizando el componente no marcado sobre un soporte sólido. Las moléculas marcadas que no se unen pueden lavarse, dejando solo el componente marcado que se ha unido. (El antígeno no marcado está acoplado al pocillo y el anticuerpo marcado queda atrapado al unirse a éste). La separación de las fracciones unidas y libres constituye un paso esencial de cualquier análisis que emplee anticuerpos. Estos análisis no permiten evaluar directamente la cantidad de antígeno o anticuerpo de una muestra de composición desconocida, ya que dependen de la unión de un anticuerpo o antígeno purificado.

3.6.1.1. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO BÁSICO PARA DETECTAR ANTICUERPOS.

1. El antígeno, en solución salina se incuba en un tubo o placa de plástico.
2. La superficie del plástico absorbe pequeñas cantidades del antígeno, el antígeno libre se elimina por lavado, ya que la placa puede bloquearse después de un exceso de una proteína irrelevante, se trata de evitar la unión inespecífica de proteínas
3. Se añade la muestra de anticuerpos, los cuales se unen a los antígenos
4. Las proteínas no unidas se eliminan por lavado.
5. Se añade el ligando, el cual es una molécula específica para detectar al anticuerpo, este se encuentra unido covalentemente a una enzima como la peroxidasa.
6. Lavar el exceso.
7. El ligando unido al anticuerpo se visualiza mediante la adición de un cromógeno, el cromógeno es una sustancia incolora, que constituye el sustrato sobre el cual actúa la porción enzimática del ligando para dar finalmente un producto coloreado.
8. La cantidad del anticuerpo problema se determina evaluando la cantidad de producto coloreado mediante la lectura de la densidad óptica. (35,36)

El método está representado en la siguiente ilustración, (fig. 4)

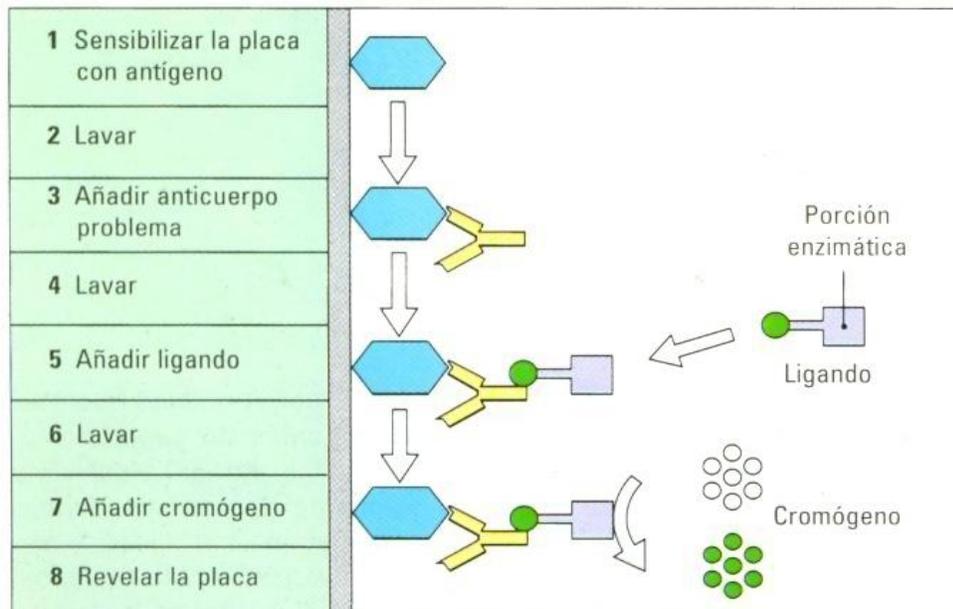


Figura 4. Análisis de inmunoabsorción unida a enzimas (ELISA)

3.6.1.2. VARIACIONES DE ANÁLISIS DE ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO.

Se cuenta con algunas variaciones de ELISA que permiten la detección cualitativa o la medición cuantitativa de antígeno o anticuerpo. Cada tipo de ELISA puede usarse de manera cualitativa para detectar la presencia de anticuerpo o antígeno. De manera alternativa, se realiza una curva estándar con base en concentraciones conocidas de anticuerpo o antígeno, a partir de la cual es posible determinar la concentración desconocida de una muestra.

A. ELISA indirecto.

Por medio de esta prueba se pueden detectar anticuerpos o determinarse de modo cuantitativo suero o alguna otra muestra que contenga el anticuerpo primario, se añade a un foso de microtítulo recubierto con antígeno y se permite que reaccione con el antígeno unido al foso. Después de eliminar por lavado cualquier anticuerpo primario libre, la presencia de anticuerpo unido a antígeno se detecta mediante la adición de un anticuerpo secundario, el cual está conjugado con una enzima, que se une al anticuerpo primario. Después se elimina por lavado cualquier anticuerpo secundario libre y se añade un sustrato para la enzima. La cantidad de producto de la reacción de color que se forma se mide con lectores espectrofotométricos de placa especializados, que pueden medir la absorbancia de la totalidad de los fosos de una placa de 96 fosos en segundos. Este método se utiliza para detectar la presencia de anticuerpos séricos contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el agente causal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

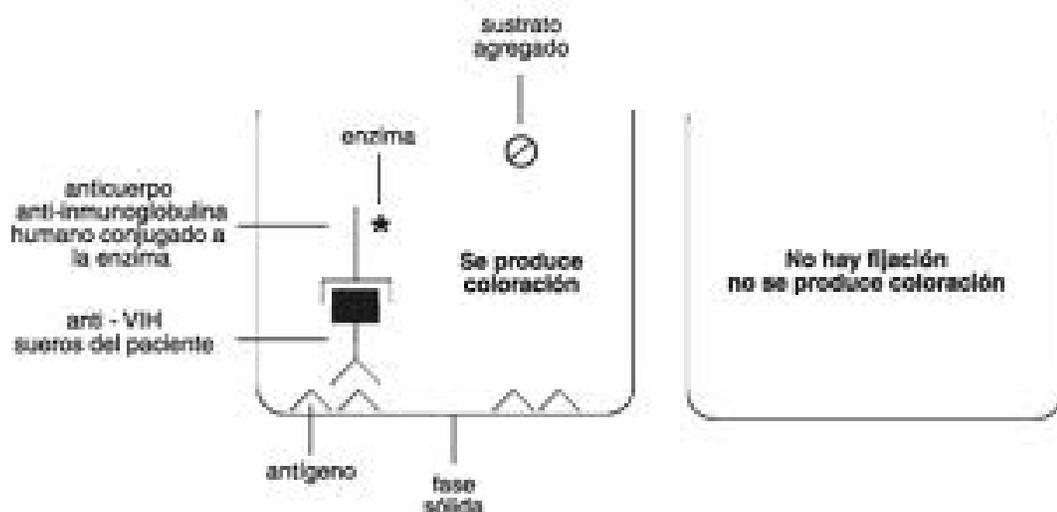


Fig. 5 Principio de ELISA indirecto.

B. ELISA en sándwich

Es el análisis de captura de antígeno, se puede usar para detectar productos secretados como las citocinas. Los anticuerpos antígenos-específicos se unen a la placa, estos son capaces de unir antígeno con gran afinidad y de este modo concentrarlo en la superficie de la placa, incluso con antígenos que se encuentran a muy baja concentración en la mezcla inicial. Para detectar el antígeno unido se utiliza un anticuerpo marcado diferente que reconoce el antígeno unido a un epítipo distinto al que reconoce el primer anticuerpo inmovilizado sobre la placa. En la figura 6, se muestra el procedimiento de esta técnica, en la cual, en el lugar del antígeno, el anticuerpo se inmoviliza en un foso de microtítulo (1). Se realiza un lavado (2). Se añade una muestra que contiene antígeno y se deja reaccionar con el anticuerpo inmovilizado (3). Se deja incubar para la fijación o captura del antígeno (4). Después de lavar el foso (5), Se agrega un segundo anticuerpo ligado a enzima específico para un epítipo distinto del antígeno (6) y se permite que reaccione con el antígeno unido (7). Tras eliminar cualquier segundo anticuerpo libre mediante lavado, se añade sustrato y se mide el producto de la reacción de color (8).

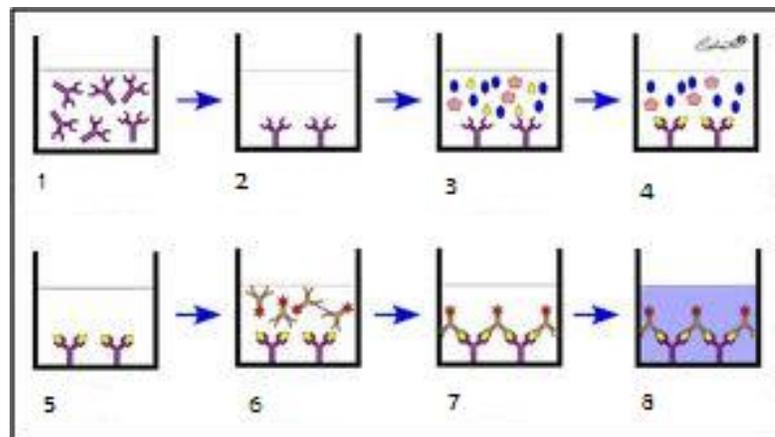


Fig. 6 Principio de ELISA en sandwich.

C. ELISA competitivo.

La presencia y la cantidad de un antígeno en concreto en una muestra desconocida se determinan por su capacidad de competir con un antígeno marcado empleado como referencia, en su unión a un anticuerpo acoplado a un pocillo de plástico. Se elabora una curva estándar añadiendo cantidades variables en una preparación estándar no marcada y preestablecida. El análisis permite evaluar la cantidad de antígeno en muestras desconocidas en comparación con el estándar, también puede emplearse para medir la cantidad de anticuerpo en una muestra, utilizando el antígeno apropiado unido a la placa y evaluando la capacidad de la muestra para inhibir la unión del anticuerpo específico marcado. En la figura 7 se esquematiza el proceso. Se incubó primero el anticuerpo en

solución con una muestra que contiene antígeno, después la mezcla del antígeno y anticuerpo se añade a un foso de microtítulo recubierto con antígeno. Cuanto más antígeno se encuentra en la muestra, tanto menos anticuerpo libre está disponible para unirse al foso recubierto con antígeno. La adición de un anticuerpo secundario conjugado con la enzima específica para el isotipo de un anticuerpo primario unido al foso como en un ELISA indirecto. En la prueba competitiva cuanto más alta es la concentración de antígeno en la muestra original tanto más baja es la absorción.

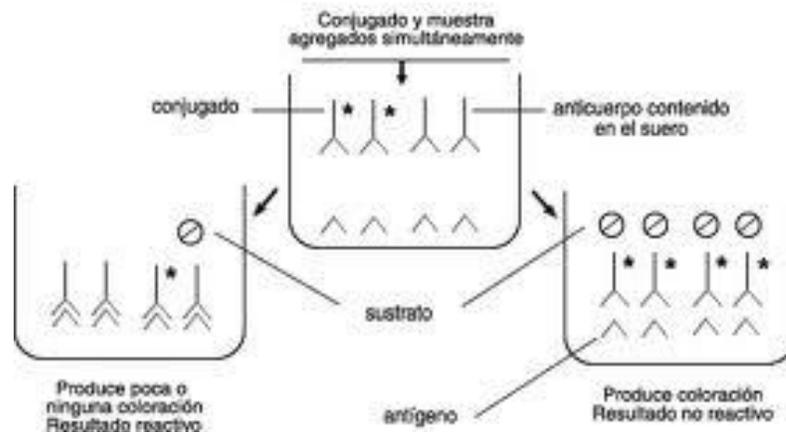


Fig. 7 Principio de ELISA de tipo competitivo.

D. Prueba de Quimioluminiscencia.

La luz que se produce por quimioluminiscencia durante determinadas reacciones químicas constituye una alternativa conveniente y muy sensible para las mediciones de absorbancia en ELISA. Las versiones de ELISA que recurren a la quimioluminiscencia usan un sustrato luxógeno (que genera luz) en lugar del sustrato cromógeno de las reacciones ELISA ordinarias. La luz que se genera durante las reacciones luxógenas puede detectarse en virtud de su capacidad de exponer película fotográfica. La medición cuantitativa de la emisión de luz puede hacerse por medio de un luminómetro. La ventaja de las pruebas de quimioluminiscencia sobre las cromógenas es la mejoría de la sensibilidad, la detección puede incrementarse cuando menos 10 veces si se cambia el sustrato cromógeno a un luxógeno y más de 200 veces cuando se adicionan agentes de realce.

E. Prueba ELISPOT

Un ensayo de puntos por inmunoabsorción unida a enzimas (Enzyme-Linked ImmunoSorbent SPOT) es un método común utilizado para monitorizar la respuesta inmune de seres humanos y animales. Fue desarrollado por Cecil Czerkinsky en 1983.

Los ensayos ELISPOT se encuentran basados, y fueron desarrollados a partir de una versión modificada de los ELISA. En concreto el primer ELISPOT fue desarrollado para enumerar células B secretoras de anticuerpos específicos, y luego fue subsecuentemente adaptada para varias finalidades, especialmente para la identificación y enumeración de células productoras de citoquinas. Bajo las condiciones correctas un ensayo de tipo ELISPOT permite la individualización de cada una de las células secretoras o activadas, en base a la visualización de su producto secretorio. Por lo tanto los ensayos ELISPOT proveen tanto información cualitativa (tipo de proteína secretoria) como cuantitativa (número de células reactivas). Debido a la exquisita sensibilidad de los ensayos ELISPOT, se ha convertido en una práctica relativamente sencilla la caracterización de poblaciones celulares sumamente pequeñas (por ejemplo las responsables de una respuesta contra un antígeno específico). Esta excepcional sensibilidad es en parte debida a que el producto secretorio es rápidamente capturado en torno a la célula, antes de que se diluya en el sobrenadante, antes de que sea capturado por células adyacentes, o sea degradado. Esto hace a los ensayos ELISPOT mucho más sensibles que los convencionales ELISA. Los límites de detección para estos ensayos se encuentran en el orden de 1:100.000 moléculas, esto permite automatizar gran parte del proceso lo que a su vez permite un mayor nivel de precisión que el que puede ser alcanzado por medio de técnicas manuales.

ELISPOT permite la detección cuantitativa del número de células con una población que produce anticuerpos específicos contra un antígeno determinado o un antígeno contra el que se dispone de un anticuerpo específico. En este método las placas se recubren con el antígeno (antígeno de captura), reconocido por el anticuerpo de interés o con el anticuerpo (anticuerpo de captura) específico para el antígeno cuya producción se valora. Luego se añade a las placas recubierta una suspensión de la población celular que se investiga y se incuba. Las células se asientan en la superficie de la placa, y las moléculas secretadas reactivas a las moléculas de captura son unidas en la cercanía de las secretorias, lo que produce un anillo de complejos antígeno-anticuerpo alrededor de cada célula que sintetiza la molécula de interés. A continuación la placa se lava y un anticuerpo unido a enzima específico para el antígeno secretado o para la especie del anticuerpo secretado se añade y se deja unir. El revelado ulterior del ensayo por la adición de un sustrato cromógeno o luxógeno adecuado indica la posición de cada célula productora de anticuerpo o de antígeno como un punto de color o luz. (36,37,38,)

3.6.1.3. METODOLOGÍA DE ELISA APLICADA A CLEMBUTEROL.

La técnica de ELISA para clenbuterol se basa en la reacción antígeno-anticuerpo, utiliza una enzima conjugada y un cromógeno para desarrollar color, la cantidad de compuesto resultante, se lee en un lector de ELISA a 450 nm, para conocer la concentración de clenbuterol en la muestra.

A). Materiales:

- ◆ Muestra hepática de 15 g con un tiempo mínimo de siete días.
- ◆ Kit Clenbuterol fase marca RIDA® C18 Ridascreen Clenbuterol
 - Estándares de clenbuterol
 - Conjugado Enzima-clenbuterol.

B). Método:

1. Se toman 5 g de muestra (hígado) y se le realiza una extracción ácida con 25 mL de HCl 50mM durante una hora y media.
2. Se centrifuga a 7000 rpm durante 15 minutos.
3. El sobrenadante obtenido se mezcla con 300 µL de NaOH 1M y 4 mL de solución amortiguadora de fosfatos (KH₂PO₄) a pH 3 y se purifica por cromatografía de afinidad en columnas para extracción en fase sólida C18 (RIDA®C18 de r-biopharm).
4. Los extractos metanólicos obtenidos se evaporan a 60°C y el residuo se dissolve en 4 ml de agua.
5. 20 µL de la solución obtenida para cada muestra es sometida a análisis empleando la técnica de inmunoensayo (RIDASCREEN Clenbuterol Fast de r-biopharm)
6. El conjugado Enzima-clenbuterol, los estándares de clenbuterol y la muestra son adicionados a la placa, la enzima de conjugado y el clenbuterol compiten por los sitios de unión de los anticuerpos.
7. Cualquier enzima conjugada no unida es eliminada con lavados.
8. La enzima sustrato y el cromógeno son adicionados a los pozos y se incuban.
9. El enlace de la enzima conjugada se convierte con el cromógeno de color azul al amarillo tras adicionar el reactivo stop.
10. Las lecturas son realizadas en un lector ELISA a 450 nm. La absorbancia es inversamente proporcional a la concentración de clenbuterol en la muestra.

11. Los resultados de absorbancia obtenidas se analizan mediante el programa RIDA WIN®.

C). Condiciones para la técnica.

- ◆ Para determinar una muestra positiva debe considerarse un valor de 3000 ppt con un rango analítico de la prueba de 0 a 8100 ppt. (Ridascreen 2002).
- ◆ Los resultados son dados por las concentraciones promedio de clenbuterol, y se reportan en nanogramos del fármaco por Kilogramo de hígado (ng/Kg), también llamado partes por trillón (ppt).

NOTA:

- » FAO estipula un Límite Máximo Residual de 0.6 µg/ Kg (600 ppt) de hígado y de 0.2 µg/Kg (200 ppt) de músculo en 2003.
- » Secretaria de Salud y SAGARPA consideran pruebas positivas en hígado a partir de 3 µg/ Kg (3000 ppt).
- » El tiempo de análisis es de tres horas en promedio. ⁽³⁹⁾

3.6.2. CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (CG/EM)

3.6.2.1. CROMATOGRAFÍA DE GASES

Es una de las técnicas más utilizadas en análisis cualitativo y cuantitativo, ya que permite la separación, identificación y determinación de los componentes químicos en mezclas complejas, es un excelente medio para confirmar la presencia o ausencia de un posible compuesto en una mezcla, estas mezclas son de compuestos que son volátiles o se pueden hacer volátiles. La cromatografía se basa en el uso de una fase estacionaria y una fase móvil, en la cromatografía de gases los componentes de una muestra vaporizada se separan como consecuencia de su reparto entre una fase móvil gaseosa y otra fase estacionaria líquida o sólida mantenida en una columna, lo que quiere decir que los componentes de la mezcla son transportados a través de la fase estacionaria por el flujo de la fase móvil, y las separaciones se basan en las diferencias de velocidad de migración entre los distintos componentes de la mezcla.

La cromatografía de gases se usa para establecer la pureza de compuestos orgánicos, si hay contaminantes, se hacen evidentes por la aparición de picos adicionales. Esta técnica también sirve para evaluar la efectividad de los procedimientos de purificación. En teoría los tiempos de retención deben ser útiles para identificar componentes de mezclas, para el análisis se dispone de una muestra estándar auténtica de dicha sustancia y al agregar el compuesto conocido no deben aparecer nuevos picos en el cromatograma de la mezcla y se observa la intensificación de un pico ya existente.

Al realizar una separación por cromatografía de gases, la muestra se vaporiza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica, la elusión se logra mediante el flujo de una fase móvil de gas inerte. A diferencia de otros tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito, sino que su única función es transportar el analito a lo largo de la columna. Hay dos tipos de cromatografía de gases:

1. Cromatografía de gas-sólido: Se basa en una fase móvil que es un gas y una fase estacionaria sólida, donde la retención de los analitos ocurre como resultado de una adsorción física. Permite la separación y determinación de gases de bajo peso molecular, como los componentes del aire, sulfuro de hidrógeno, monóxido de carbono y óxidos de nitrógeno.

2. Cromatografía de gas- líquido: Se basa en el reparto del analito entre una fase móvil gaseosa y una fase líquida inmobilizada sobre la superficie de un sólido inerte o en las paredes del tubo capilar por adsorción o por enlaces químicos. La cromatografía de gas-líquido es aplicable a especies que poseen una apreciable volatilidad y estabilidad térmica a temperaturas de hasta unos 100 °C. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada en la separación y determinación de compuestos en diversos tipos de muestras. (40)

A). INSTRUMENTACIÓN

Se han desarrollado instrumentos de alto rendimiento y costo moderado, también el desarrollo de columnas tubulares abiertas que permiten separar los componentes de mezclas complejas en periodos relativamente cortos.

1. Sistema de gas portador.

El gas de la fase móvil en cromatografía de gases se llama gas portador. El Helio es el más usado, también se puede usar Argón, Nitrógeno e Hidrógeno, estos gases vienen en tanques presurizados. La selección del gas portador se determina por el detector empleado en el instrumento. Se requieren reguladores de presión, calibradores y medidores de flujo para controlar la velocidad del gas.

La velocidad del flujo del gas se controla mediante un regulador de presión en dos etapas en el canal de gas y algún tipo de regulador de presión o de flujo montado en un cromatógrafo. Las presiones de entrada suelen ser 10-50 psi (libras/pulgada) mayores que la presión ambiental, lo que produce velocidades de flujo de 25-150 mL/min en columnas empaquetadas y de 1.25 mL/min con columnas capilares tubulares abiertas. Se supone que la velocidad de flujo es constante si la presión de entrada se mantiene constante, esto es, mediante un fotómetro colocado en la cabeza de la columna resulta posible establecer las velocidades de flujo, solo que el dispositivo no es tan preciso como el medidor de pompas de jabón. Es usual que el medidor de flujo se localice al final de la columna. En el trayecto del gas se forma una película de jabón cuando se comprime un bulbo de caucho que contiene una disolución acuosa del jabón o detergente, se mide el tiempo necesario para mover esta película entre dos graduaciones de la bureta y se convierte a velocidad de flujo volumétrico.

El instrumento puede ser operado a una temperatura constante o ser programado para funcionar a diferentes temperaturas si la muestra tiene componentes con volatilidades distintas.

2. Sistema de inyección de muestras.

Para que la columna sea eficiente se requiere que la muestra sea de un tamaño adecuado y se introduzca una cantidad de vapor específico, se realiza la inyección de la muestra, la cual no debe ser lenta o con muestras de tamaño excesivo, ya que producen ensanchamiento de bandas y una deficiente resolución. Se usan microjeringas calibradas para inyectar muestras de líquido a través de un septum de caucho o silicona en un puerto de muestras calentado y se localiza en la cabeza de la columna. Generalmente el puerto de muestras se mantiene a unos 50 °C por encima del punto de ebullición del componente menos volátil de la muestra. En ocasiones la muestra que es inyectada por un septo, se inyecta como líquido, y la temperatura del puerto de inyección debe estar arriba del punto

de ebullición de los componentes para que se evaporen al inyectarlos. La muestra de vapor pasa rápido por la columna, una parte como gas y otra parte disuelta en la fase líquida. Los componentes volátiles que están presentes, sobre todo en la fase gaseosa, tendrán un coeficiente de partición bajo y se moverán con rapidez por la columna, Los compuestos con puntos de ebullición más altos se moverán con lentitud por la columna. El efluente pasa por un detector que produce una señal eléctrica proporcional a la concentración de los componentes volátiles. En el caso de columnas analíticas empaquetadas normales, el tamaño de la muestra varía desde menos de 1 μL hasta 20 μL . Las columnas capilares requieren muestras que sean menores en un factor de al menos 100. Es necesario emplear un divisor de muestras con las columnas capilares, con el fin de introducir una fracción pequeña conocida (1:100 a 1:500) de la muestra inyectada, mientras que el resto se desecha. Mediante una válvula de muestras, se pueden obtener tamaños de muestras de gases y líquidos más reproducibles para el análisis cuantitativo. Las muestras sólidas se introducen en disolución o se sellan en el interior de ampollas de la pared delgada, que se introducen en la cabeza de la columna y se perforan o comprimen desde el exterior.

3. Columnas.

Son dos tipos de columnas para cromatografía de gases: las columnas empaquetadas y las columnas tubulares abiertas o capilares. Las segundas son las más usadas en la actualidad y resultan más rápidas y eficientes. Estas columnas tienen diámetros internos de 0.25 a 0.50 mm y varían su longitud desde menos de 2 m hasta más de 50 m. Se fabrican de acero inoxidable, vidrio, sílice fundida o teflón, a fin de que encajen en un horno para su calentamiento, es habitual enrollarlas en serpentines con diámetro de 10 a 30 cm.

Las columnas empaquetadas consisten en un tubo de diámetro estrecho llenas con un sólido finamente dividido, el cual son partículas inertes como tierras diatomáceas o polímeros porosos o cuentas de vidrio cubiertas con una fase líquida no volátil, este líquido es la fase estacionaria. La fase móvil ocupa los espacios abiertos entre las partículas del empaquetamiento.

La fase estacionaria líquida debe ser no volátil a las temperaturas empleadas, térmicamente estable y no reaccionar con los solutos por separar. La fase estacionaria se denomina no selectiva cuando la separación se basa ante todo en la volatilidad relativa de los compuestos. Las fases líquidas selectivas se emplean para separar compuestos con base en la polaridad relativa.

La temperatura de las columnas es una variable importante, que para trabajar con precisión, debe controlarse con una exactitud de unas pocas décimas de grado. La columna se coloca dentro de un horno con termostato. La temperatura óptima de la

columna depende del punto de ebullición y del grado de separación que se requiera. La duración de la temperatura tiene una duración entre 2 y 30 min. Cuando se son muestras con intervalos de ebullición amplio, es necesario utilizar un programa de temperaturas, con el que se incremente la temperatura de la columna de forma continua o escalonada, a medida que avanza la separación. La resolución óptima se asocia a la mínima temperatura, esto implica un mayor tiempo en elusión y, por lo tanto, de análisis.

4. Sistema de detección.

En cromatografía de gases se dispone de diversos detectores que indican los cambios en la composición del eluyente. Un detector idóneo para la identificación y cuantificación de los componentes de una muestra serían:

1. Sensibilidad adecuada. En general, la sensibilidad de los detectores actuales se ubica en el intervalo de 10^{-8} a 10^{-15} gramos de soluto por segundo.
2. Buena estabilidad y reproducibilidad.
3. Respuesta lineal a solutos que abarque varios órdenes de magnitud.
4. Intervalo de temperatura desde la ambiental hasta al menos 400 °C.
5. Tiempo de respuesta breve e independiente de la velocidad de flujo.
6. Alta fiabilidad y facilidad de empleo. El detector debe ser, en la medida de lo posible, a prueba de errores en manos de operadores inexpertos.
7. Similitud en la respuesta a todos los solutos, o alternativamente, respuesta muy predecible y selectiva hacia una clase de solutos.
8. Que no se destruya la muestra.

Existen varios tipos de detectores para cromatografía de gases, cada uno de ellos con distintas características, selectividad y sensibilidades a los compuestos, en la tabla 4 se mencionan los más comunes y usados con sus límites de detección y sus intervalos lineales.

| Tipo de Detector | Límite de detección aproximado /g s ^{-x} | Intervalo aproximado lineal | Muestras aplicables |
|---|---|---|---|
| Conductividad térmica (DCT) | $10^{-5} - 10^{-6}$ | $10^3 - 10^4$ | Detector universal. Mide cambios en la conductividad del calor. |
| Ionización de llama (DIF) | 10^{-12} | $10^6 - 10^7$ | Detector universal. Mide corrientes iónicas de pirólisis e hidrocarburos. |
| Captura de electrones (CE o DCE) | 10^{-14} | $10^2 - 10^3$ | Detector selectivo para compuestos con átomos de afinidades electrónicas altas. Compuestos halogenados. |
| Fotometría de llama (DFF) | 10^{-13} | 10^2 | Detector selectivo para compuestos que contiene azufre y fósforo. |
| Nitrógeno-Fósforo (NPD) | $10^{-8} - 10^{-14}$ | $10^5 - 10^7$ | Detector selectivo para compuestos que tienen nitrógeno y fósforo. |
| Fotoionización (DFI) | $10^{-8} - 10^{-12}$ | 10^5 | Detector universal, con cierta selectividad debido a la identidad del gas en la lámpara. (Compuestos ionizables por la radiación ultravioleta). |
| Detector Hall | 10^{-11} | 10^5 | Detector específico para compuestos que contiene halógenos, azufre o nitrógeno. |
| Espectrómetro de masas (EM) | 10^{-12} | Variable y dependiente del tipo de EM y de los compuestos a analizar. | Detector universal |
| Infrarrojo de transformad de Fourier (IRTF) | 10^{-10} | 10^2 | Detector para moléculas polares. (compuestos orgánicos) |

Tabla 4. Principales detectores utilizados en la determinación de compuestos en Cromatografía de gases.

3.6.2.2. ESPECTROMETRÍA DE MASAS ATÓMICAS O ESPECTROMETRÍA DE MASAS ELEMENTAL.

Los métodos de espectroscopia atómica se utilizan en la determinación cualitativa y cuantitativa de más de 70 elementos, se pueden detectar partes por millón, partes por billón y partes por trillón, estos métodos son rápidos, convenientes y de alta selectividad. La determinación espectroscópica de especies atómicas sólo puede efectuarse en un medio gaseoso, donde están muy separados entre sí los átomos o iones elementales, por lo que es necesario en primer lugar para todo procedimiento de espectroscopía atómica una atomización, proceso en el que una muestra se volatiliza y se descompone de manera que se produzcan átomos e iones en fase gaseosa. La eficacia y reproducibilidad de la etapa de la atomización influye en la sensibilidad, precisión y exactitud del método.

Déspues de convertir la muestra en átomos gaseosos o iones elementales se pueden utilizar diversos tipos de espectroscopía, como la espectrometría de masas y la espectrometría óptica. En el caso de la espectrometría óptica los átomos o iones en fase gaseosa no tienen estados de energía migratoria o rotacional, por lo que sólo ocurren transiciones electrónicas, dando lugar a espectros ópticos, los cuales pueden ser de emisión atómica, absorción o fluorescencia.

En la Espectrometría se masas atómica, también llamada espectrometría de masa elemental es deseable para la muestra obtener iones en fase gaseosa antes que átomos en fase gaseosa. En el caso de las fuentes de atomización energéticas, como los plasmas, una fracción considerable de los átomos producidos se ioniza, generalmente como iones monovalentes positivos. Los iones de masa atómica distinta se separan en un dispositivo, llamado analizador de masas, para producir el espectro de masas. La separación se basa en la proporción masa/carga de la especie iónica. Los iones producidos en la espectrometría de masas atómica suelen ser monovalentes, de modo que la proporción masa/carga en ocasiones se abrevia de manera conveniente al término masa y se expresan en unidades de masa atómica (UMA) o dalton (Da), los cuales se definen como $1/12$ de la masa de un átomo neutral de $^{12}_6\text{C}$. El espectro de masas es una gráfica del número de iones producidos frente a la relación masa/carga o, en el caso de iones monovalentes, frente a la masa. (41)

3.6.2.3. CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A UN ESPECTRÓMETRO DE MASAS

Es la combinación de dos técnicas para obtener un poderoso identificador y detector de iones, átomos o ambos. La identificación definitiva de las muestras que salen de las columnas cromatográficas de gas es posible cuando se utiliza en espectrómetro de masas como detector. Las sustancias separadas de un cromatógrafo de gases entran a la fuente donde las muestras son bombardeadas con electrones para formar iones moleculares cargados y fragmentados. Las moléculas se descomponen en fragmentos característicos de acuerdo con su estructura molecular. Estas partículas son concentradas para que entren al sector de filtración de masas donde son clasificadas según su relación masa-carga, (m/z) y son contadas mediante un multiplicador de electrones, originando un espectro de masas. Los patrones de fragmentación característicos que producen estos iones se emplean para identificación. Las bibliotecas por computadora y algoritmos de comparación están disponibles dentro del instrumento para comparar resultados espectrales de masas de una sustancia conocida obtenida de una muestra con la biblioteca de referencia.

Los sistemas CG/EM se emplean de manera extensa para medir drogas en confirmaciones toxicológicas. Las drogas y metabolitos deben ser extraídos de los líquidos corporales y por lo común reaccionan con reactivos de derivación para formar compuestos que son más volátiles para procesos de cromatografía de gases. (40,41)

3.6.2.4. METODOLOGÍA DE CG/EM APLICADA A CLEMBUTEROL

Debido a que el clenbuterol se encuentra en la muestra en combinación con materia orgánica como azúcares, proteínas, lípidos, etc., es necesario realizar un procedimiento para la separación, identificación y cuantificación correcta, usando reactivos, materiales y equipos, que permitan su fácil separación y conservación de clenbuterol.

A). Material:

◆Muestra hepática de 10 gramos.

B). Método:

1. Se pesan 10 gramos de hígado.
2. Colocar la muestra de hígado en un mortero.
3. El hígado se corta en pequeños fragmentos con tijera o cúter.
4. El hígado se muele hasta formar una masa uniforme y sin fragmentos. Se puede utilizar una licuadora, sin embargo se requiere de una mayor cantidad de muestra para poder molerla.
5. Se agregan 30 mL de una solución de NaOH 3N
6. La desproteínización y desconjugación se puede realizar dejando el macerado reposar durante una noche en el refrigerador a 4 °C o calentando la mezcla durante 2 horas a 80 °C.
7. La muestra macerada se transfiere a un embudo de separación y se adicionan 20 mL de n-Heptano y se agita por 10 minutos.
8. Transferir la mezcla a tubos de ensayo y centrifugar por 10 minutos a 3000 rpm.
9. Separar a fase orgánica en tubos limpios y repetir el paso 7 y 8.
10. Los extractos orgánicos se colocan en un embudo de separación limpio y se agregan 15 mL de agua acidificada a pH 1-2 con HCl.
11. Agitar por 10 minutos.
12. Tomar la fase acuosa (previamente centrifugada) y transferirla a un tubo de ensayo con tapa de rosca, con capacidad para 30 mL, la fase orgánica se desecha.
13. Ajustar a pH alcalino entre 9 y 11 con hidróxido de amonio.
14. Agregar 10 mL de cloroformo y agitar en vortex por 10 minutos.

15. Centrifugar a 3000 rpm por 5 minutos.
16. Colocar la fase clorofórmica en un tubo de ensayo limpio.
17. Evaporar la fase orgánica a sequedad a temperatura ambiente y con N₂
18. Agregar 50 µL de BSTFA con 1 % de TMCS ⁽⁴⁴⁾
19. Se derivatiza a 60°C por 25 minutos con tubo sellado.
20. Dejar enfriar a temperatura ambiente.
21. Inyectar 1µL.

C). Condiciones del método Cromatográfico

◆Inyector :

Temperatura del inyector: 250 °C

Modo del inyector: Splitless

Flujo de purga para venteo del inyector: 50mL/min. durante 0.2 min

Gas Saver 20 mL/min. durante 2 min. El gas de acarreo puede ser Helio o Nitrógeno.

◆Columna :

Longitud: 30 m, Diámetro: 0.25 mm, película 0.25 µm de grosor (5 % Fenil) metilpolisiloxano (fase estacionaria).

Modo: flujo constante con flujo de 1.0 mL/min.

◆Horno :

Temperatura inicial 120 °C por 2 minutos.

Rampa: 20 °C/min. hasta 280 °C y mantener por 8 minutos.

◆Solvent Delay: Después de que se inyecta, el tiempo transcurrido para que salga el solvente es de 6 minutos.

◆Línea de transferencia: Es la línea por donde pasa el compuesto en forma de gas para ser analizado en masas : 280 °C

◆Rango de Masas: 50 a 450 UMA (unidad de masa atómica)

◆Threshold: Rango del ruido producido: 200 (20, 43, 44)

3.6.2.5. ESPECTROS DE LA DETERMINACIÓN DE CLEMBUTEROL

Los resultados están determinados por los espectros obtenidos, los cuales muestran picos sobresalientes en ciertos puntos de la gráfica, estos picos sirven para la comparación con los resultados espectrales de masas de clembuterol el cual es la sustancia conocida y obtenida de la biblioteca de referencia.

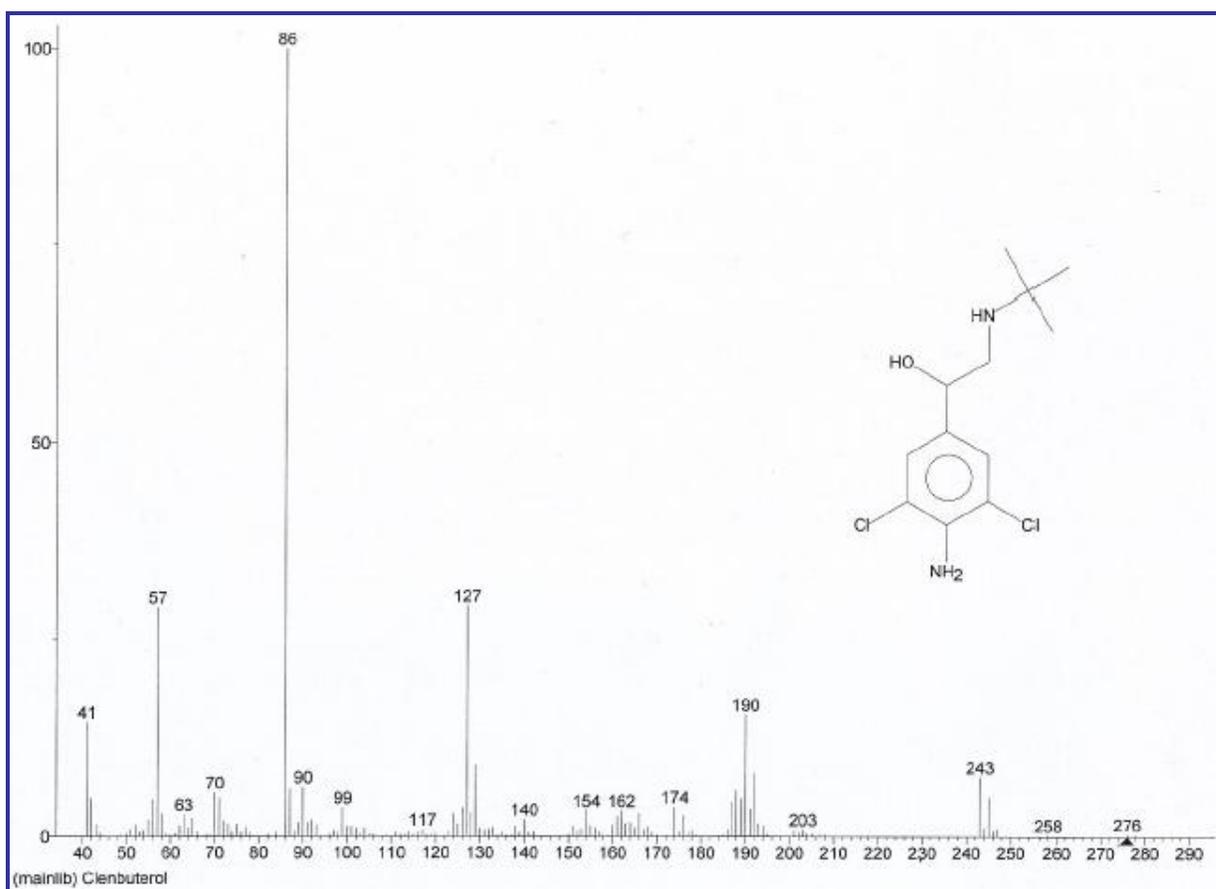


Fig. 8. Espectro de Clorhidrato de clenbuterol (NIST)

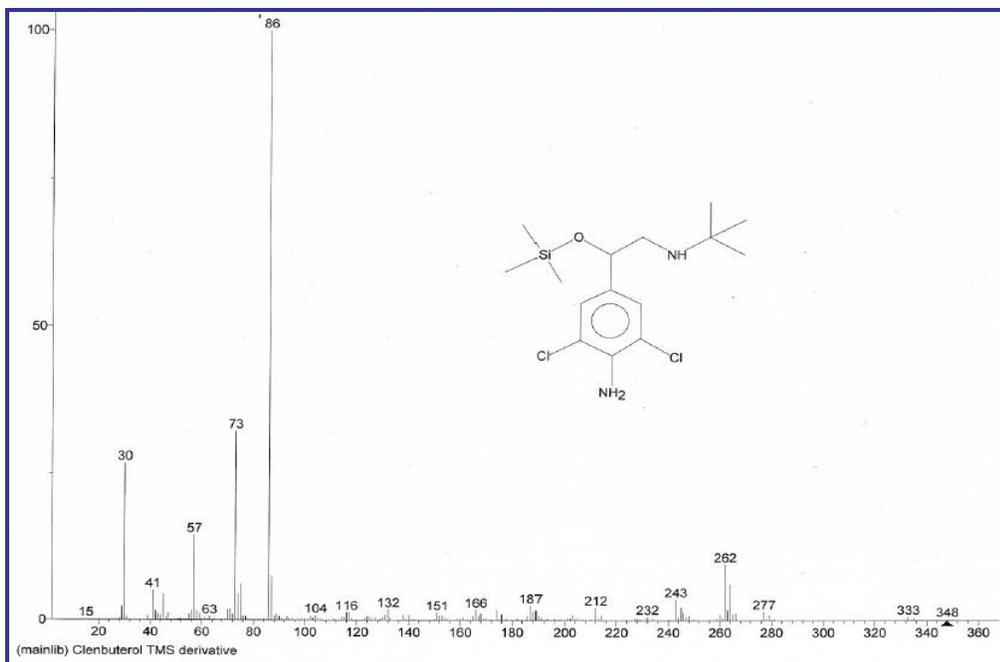


Fig. 9. Espectro de clenbuterol TMS derivatizado con trimetilclorosilano: 86, 73, 57, 262 (NIST)

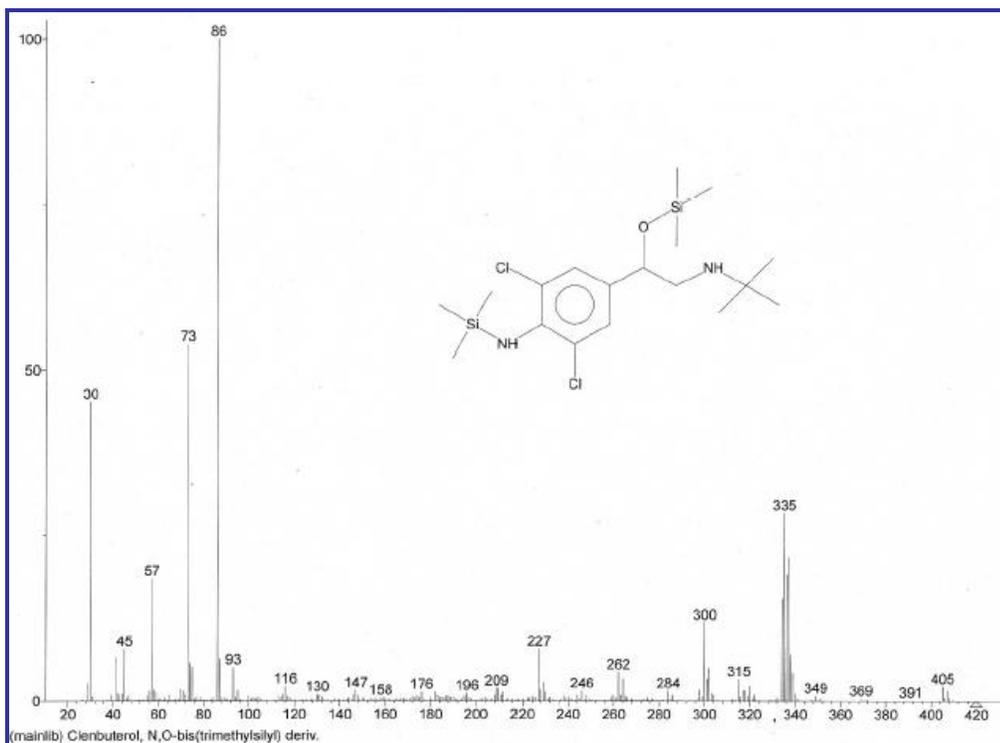


Fig. 10. Espectro de clenbuterol, N,O-bis(trimethylsilyl) derivatizado, clenbuterol bis TMS: 86, 73, 57, 335, 300, 227 (NIST)

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La administración y el abuso del clenbuterol en animales para el consumo humano es un problema de salud pública ya que repercute en el bienestar de los propios animales que son tratados y en las personas que consumen carne o sus vísceras. Se ha demostrado que es un agente que causa problemas serios de salud e incluso la muerte a dosis elevadas. La falta de ética y la necesidad de dinero han hecho que algunos ganaderos utilicen al clenbuterol en la dieta de sus animales, para obtener carne sin grasa. Dado que el clenbuterol es una sustancia química que no se observa a la vista en la carne de los animales en canal, el laboratorio de química forense está en la necesidad de tener un método que permita su identificación en pocos pasos, con pocos recursos, de la forma más rápida y también lo más confiable posible, utilizando parámetros de tolerancia, nivel de intoxicación y los métodos posibles para identificar con exactitud la presencia de esta sustancia en cualquier órgano o tejido en una investigación toxicológica.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Comparar teóricamente la eficiencia de la prueba de ensayo inmunoenzimático (ELISA) y Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometro de Masas (CG/EM), a partir de sus ventajas y desventajas respecto al uso de reactivos, rapidez y utilidad.

5.1.1. OBJETIVO PARTICULAR

Señalar la importancia que tiene la utilidad de las técnicas analíticas ELISA y Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masas en la determinación de clenbuterol en órganos o tejidos de origen animal.

6. IMPORTANCIA DEL ESTUDIO

Estudiar y comparar de manera bibliográfica el método analítico más eficiente para la identificación de clenbuterol, confrontándolos en tiempos, reactivos, recursos y exactitud de los resultados, dando a conocer las ventajas y desventajas de cada uno.

7. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

El estudio es una recopilación bibliográfica y no un trabajo experimental, por lo que no se usará el equipo de cromatografía de gases acoplado a un espectro de masas, y tampoco el kit para realizar el método de ELISA, cada uno de ellos con muestra. Es importante mencionar que no se comprobaran los métodos analíticos por estudios estadísticos, solo en función de los datos extraídos de la bibliografía.

8. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LAS TÉCNICAS

Comparación de los métodos por su eficacia, utilidad, rapidez, ventajas y desventajas.

| | ELISA | CG/EM |
|-----------|---|---|
| Muestras | Hígado 10 a 15 g de un mínimo de siete días. | Hígado 10 g |
| Estándar | Clenbuterol para realizar una curva de calibración. | Estandar de Clorhidrato de clenbuterol. |
| Reactivos | <ul style="list-style-type: none"> ▶ HCl 50mM, 25mL ▶ NaOH 1M, 300mL ▶ Solución amortiguadora de fosfatos 500mM a pH 3 ▶ Kit de Ridascreen-Clenbuterol | <ul style="list-style-type: none"> ▶ NaOH 3N ▶ 20 mL n-heptano ▶ Agua acidificada con HCl a pH 1- 2 ▶ Hidróxido de amonio pH9-11 ▶ N₂ ▶ 50 µL de BSTFA con 1% de TMCS |
| Procesos | <ul style="list-style-type: none"> ▶ Centrifugación (7000 rpm) ▶ Purificación por cromatografía de afinidad (RIDA ® C18 de r-biopharm) ▶ Evaporación. ▶ Análisis por inmunoensayo (Ridascreen) <ul style="list-style-type: none"> - Incubación por 2 horas - Lectura de ELISA a 450 nm, - O en un densitómetro para leer la absorbancia a 245 nm de longitud de onda. | <ul style="list-style-type: none"> ▶ Maceración (desproteización y desconjugación) ▶ Refrigeración a 4° C ▶ Calentamiento dur. 2 h a 80° C ▶ Centrifugación por 10 min. a 3000 rpm (tres veces) ▶ Agitación en vortex ▶ Análisis por CG/EM |

| | | |
|-------------------------|--|---|
| Ventajas y desventajas. | <p>▶ La técnica es sensible a los incrementos de la concentración de clenbuterol, por lo tanto es de utilidad para la detección de clenbuterol.</p> | <p>▶ La cantidad de reactivos y el número de procesos que se realizan son más y por lo tanto más tardado es el procedimiento.</p> |
| | <p>▶ Para las muestras que no requieren de tratamiento previo, como orina, suero o plasma, el tiempo de análisis será aun más corto.</p> | <p>▶ El número de reactivos utilizados es mayor, el n-heptano es tóxico y el TMCS es cancerígeno.</p> |
| | <p>▶ Cuando se trata de alimento (pienso), tiempo de análisis es corto, ya que el proceso en el tratamiento previo no requiere de una preparación.</p> | <p>▶ Todas las muestras biológicas requieren de un tratamiento previo para la separación del fármaco o su derivado.</p> |
| | <p>▶ El número de muestras que pueden analizarse en un día es de 90.</p> | <p>▶ El número de muestras dependerá del tiempo de retención del clenbuterol y de las condiciones del cromatógrafo.</p> |
| | <p>▶ Se pueden identificar concentraciones bajas y altas de Clenbuterol, ya que tiene un rango analítico de prueba de 0 a 8100 ppt.</p> | <p>▶ Se pueden detectar hasta 2 ng/mL</p> |
| | <p>▶ El método soporta el 1% de error de pipeteo, si es mayor, se recomienda repetir la prueba, por lo que se aumentan los costos en reactivos y el tiempo de análisis</p> | |
| | | |

9. CONCLUSIONES

1. El clenbuterol es un fármaco que tiene como propiedad la virtud de modificar y mejorar el rendimiento de carne en canal, sin embargo, pese a esto es utilizado de forma indiscriminada y violenta para bien de los productores, generando daños en los animales y en los consumidores de los productos que se consumen. Si se usara el clenbuterol de la forma correcta, en las dosis y tiempos de administración, así como su tiempo de retiro, el clenbuterol sería una buena opción para la cría y engorda de producción de carne en bovinos, ya que éste no tiene un efecto sobre la genética de los animales.

2. Los métodos analíticos usados presentan variantes uno del otro, se puede observar que ELISA tiene más ventajas con respecto a la facilidad y rapidez del método, la cantidad de reactivos utilizados (son pocos reactivos), el costo y gasto de reactivos (debido a que son comunes, su costo es bajo, con excepción del Kit Ridascreen-Clenbuterol, el cual se utilizará solo para una prueba) y el número de muestras analizadas a la vez (90 muestras en una prueba), el cual es mayor en comparación a la cantidad de muestras analizadas en CG/EM, en ELISA se pueden analizar al mismo tiempo y en CGEM el número de muestras analizadas dependerá del tiempo de retención del clenbuterol y de las condiciones que se le den al cromatografo. Sin embargo en ELISA se tiene el riesgo de error el cual aún mínimo (1%), puede ocasionar la repetición de todo el trabajo, generando pérdidas como tiempo, uso de reactivos, y el uso de un nuevo kit para el análisis. Al no realizarse previo tratamiento a las muestras el riesgo de identificar y hasta cuantificar otra sustancia que no sea clenbuterol puede resultar probable. El uso de al menos uno de los reactivos, de preferencia el estándar, tiene que estar en estado puro, con el fin de poder cuantificar la reacción. El método de ELISA por los puntos mencionados, debería solamente utilizarse como una prueba analítica presuntiva.

3. En las investigaciones forenses, se requieren pruebas confirmativas. El método analítico de CG/EM es un método cuantitativo, conveniente y de alta selectividad, además de ser confiable con un mínimo del 99.9% de seguridad, esto es debido a que se realizan validación al equipo y al método. Los reactivos para esta determinación en cantidad son más y no muy comunes o fáciles de conseguir y algunos de alto costo, como los derivatizantes. El procedimiento es más tardado, puesto que se requiere que primero, de la muestra sea separado el clenbuterol, después pasarlo a estado gaseoso y por último identificar los elementos buscados. El equipo tiene la propiedad de la reproducibilidad lo que influye en la sensibilidad, precisión y exactitud del método, debido a esto, el factor

humano no afecta en gran medida al análisis, la desventaja es que solo puede analizarse una muestra a la vez, haciendo un mayor tiempo para obtener resultados finales.

4. La concentración de clenbuterol en hígado después del segundo día de retiro es mayor que en riñón, bilis y orina, pero para fines legales, es mejor emplear ojo (coroides/retina), ya que la concentración en este músculo es 10 veces mayor que en hígado, lo que puede ser útil para proporcionar información directa y segura sobre el uso de clenbuterol en los animales de rastro.

10. REFERENCIAS CONSULTADAS

1. Sumano L. H.; Ocampo C. L.; Farmacología Veterinaria 3ª ed. Ed. Interamericana Mc Graw Hill, México D.F.2006. pp. 379-382 y 556-557
2. Sumano L, Ocampo C, Gutiérrez O., Clenbuterol y otros b-agonistas, ¿Una opción para la producción pecuaria o un riesgo para la salud? Vet Mex, abril-junio 2002, vol. 33, no. 2, p137-159.
3. Beltrán Braauer, Beatriz. Clenbuterol, su uso como promotor de crecimiento animal y su control. Grupo CENCON, Centro de control, Anual del consejo Técnico Consultivo Nacional, México 2005, [en línea], <http://www.alfa.editores.com/carnilac/octubre%20noviembre%2005/Notas.html>, consultado 4 de Junio de 2010
4. The Merck Index, on Enciclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals, 14ª ed. Merck & Co., Inc Whitehouse NJ USA 2006, p 2348
5. USP/NF Farmacopea de los Estados Unidos de América. Formulario Nacional, Compendio de normas oficiales. Año 2007 Vol.1 Método 621, pp.266.
6. Godman & Gilman, Las bases Farmacológicas de la terapéutica. Vol. I, 9ª ed. Mc Graw Hill-Interamericana editores, México 1996, p. 211-229 y 711-713.
7. Katzung B. G. Farmacología Básica y Clínica, 10ª. ed. Ed. Manual Moderno, México, D. F. 2007, pp.129-135, 326-328.
8. Lullman, H., Mohr, K., Ziegler, A., Atlas de Farmacología, Ediciones científicas y técnicas, Salvat Med. España 1992. pp. 76-86.
9. PLM. Diccionario de Especialidades Médicas, 41ª.ed. México 1995, pp.1296, 1581.
10. Rang H. P., Dale M. M., Farmacología, 2ª ed. Ed. Churchill Livingstone, España 1992, pp 419, 440-441
11. Rodríguez P. C; Garfias A. A. Farmacología para Enfermeras. Ed. Mc Graw Hill-Interamericana, México 2007, pp. 724-726.
12. Laurence D.R., Bennett P. N., Clinical Pharmacology, 8ª ed., Ed. Churchill Livingstone, New York Edinburg 1997, pp. 419
13. WADA Technical Document – TD2010 MRLP. Minimum Required Performance Level for Detection of Prohibited Substances. Septiembre 2010. [En línea] http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/perf_limits_2.pdf

14. Urriarte B. V; Trejo F. S., Farmacología Clínica, Editorial Trillas, México 2003. pp. 136-139.
15. The Merck Veterinary Manual, 8^a. Edition, Merck & CO. Inc. 1998, U.S.A. Ed. National Publishing, Inc. Philadelphia, Pensilvania. Editor Aiello, S. E. pp 1725 -1727
16. Rojas, G. O. Directorio de Veterinaria, Nutrición y Zootecnia, 1^a. ed. Mercadeo Estadístico, S. C. México 1997, pp. 193-194.
17. Lorenzo P., Moreno A., Velásquez. Farmacología Básica y Clínica, 18^a. Edición. Editorial Panamericana. 2005, pp.147-152, 733-734.
18. Hitner T., Introducción a la Farmacología 5^a. Edición, Editorial Mc Graw Hill, México 2007. pp. 60-61.
19. Cortés A., García L., Valdez R., Efectos toxicológicos por uso ilegal de Clenbuterol, Gaceta Universitaria, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Enero 2002, p. 16.
20. Kuiper, H. A.; Noordam, M. Y.; Van Dooren. Flipsen, M. M. H.; Schilt. R.; A. H. Illegal use of b-adrenergic agonist: European Community, Journal of Animal Science, 1998, 76, 195-207.
21. Aiache, J. M.; Guyot A. M. Biofarmacia. Editorial El Manual Moderno, México D.F. 1983. pp. 52-75
22. Zimmer, A. Metabolism and species comparison in the rat, rabbit and dog (ADME IV). Unpublished report. Submitt to WHO by Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim am Rhein, Germany 1971.
23. Schimid, J. Pharmacokinetics, metabolism and tissue distribution of ¹⁴C-NAB 365 Cl in the baboon. Unpublished report No. 2220 form Inveresk Research International. Submitted to WHO by Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH , Ingelheim am Rhein, Germany 1982
24. Pérez F. B., Los efectos tóxicos del Clenbuterol, Facultad de Veterinaria Universidad Autónoma de Barcelona. [En Línea]
<http://.consumer.es/seguridad.alimentaria/ciencia-y-tecnologia/2002/11/21/4173.php>
Consultado 7 de Septiembre de 2011
25. Booth, N. H., Mc Donald L.E. Farmacología y terapéutica Veterinaria Vol. II Toxicología de los residuos medicamentosos y químicos, Editorial ACRIBIA, S: A. Zaragoza, España 1987, pp.450-455.
26. Fehlhaber K., Janetschke P., Higiene Veterinaria de los Alimentos. Editorial ACRIBIA, S. A. Zaragoza, España, 1995, pp.3-9 y 91-99

27. EMA/MRL/030/95. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines and information technology Unit. Comité for Veterinary Medicinal Products, Clenbuterol Hydrochloride. [En línea]
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1990R2377:20060408:ES:PDF>
Consultado 26 de Junio de 2011
28. FAO/OMS, 2005. Norma Oficial de Residuos de medicamentos veterinarios en alimentos. [En línea]
<http://www.codexalimentarius.net/mrls/servlet/VetDrugServlet?Substances=321&Items.pdf>.
29. SAGARPA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Proyecto de Modificación a la Norma oficial Mexicana NOM-004-ZOO-1994, Grasa, hígado, músculo y riñón en aves, bovinos, caprinos, cérvidos, equinos, ovinos y porcinos. Residuos tóxicos. Límites Permisibles y procedimientos de muestreo., 2011. (1.5)
30. Norma Oficial Mexicana NOM-004-ZOO-1994,. Control de residuos tóxicos en carne, grasa, hígado y riñón de bovinos, equinos, porcinos y ovinos. 1994. (5.1) [En línea]
<http://www.cmp.org/NORMAS/NOM-004-ZOO-1994.pdf>
31. Norma Oficial Mexicana NOM-030-ZOO-1995, Especificaciones y procedimientos para la verificación de carnes, canales, vísceras y despojos de importación en puntos de verificación zoosanitaria. [En línea]
<http://www.senasica.gob.mx>
32. NOM-61-ZOO-1999. Especificaciones Zoosanitarias de los productos alimenticios para consumo animal. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 1999. (4.11.5)
33. NOM-EM-015-ZOO-2002. Especificaciones Técnicas para el control del uso del beta-agonistas en los animales. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2002.
34. NOM-194-SSA1-2004, Productos y Servicios. Especificaciones sanitarias en los establecimientos dedicados al sacrificio y faenado de los animales para abasto, almacenamiento, transporte y expendio. (8.6).
35. Roitt I., Brostoff J., Inmunología Medica, 4ª Edición, Editorial Harcourt Brace, España 1997, pp. 619-621.
36. Janeway C. A.; Travers P. Inmunología. El Sistema Inmunitario en concisiones de Salud y Enfermedad. 2ª. Edición. Editorial Masson, España 2003. pp.28.1- 28.15

37. Margini. A. R. Inmunología e Inmunoquímica, 5ª ed. Ed. Médica Panamericana, Argentina 1996, pp.799-820.
38. Kindt T. j., Goldsby R. A., Osborne B. A., Inmunología de Kuby, 6ª ed., Ed. Mc Graw Hill, México 2007, pp.155-157.
39. RIDASCREEN® Clembuterol Fast. 2002. R-Biopharm, Alemania.
40. Bishop M. L. Química Clínica, Principios, procedimientos y correlaciones, 5ª ed. Ed. Mc Graw Hill, México 2007, pp.111-115.
41. Skoog D., West D., Fundamentos de Química Analítica, 8ª ed. Ed. CENGAGE learning, México 2009, pp. 851-854, 959-970.
42. Ortiz B. J., Alcocer V. V., Castellanos R. A., Determinación de Clenbuterol por el método de gases/masas y su cuantificación en bovinos sacrificados en dos rastros. Tec-Pecuaria, México 2005: 43 (1); Universidad Autónoma de Yucatán. pp. 57-67 [En línea]: <http://www.tecnicapecuaria.org.mx/trabajos/200502253884.pdf>
Consultado el día 1 de Junio de 2010
43. Supelco, BSTFA + TMCS, Sigma-Aldrich Co. 1997. [En línea]
http://www.sigmaaldrich.com/etcmedialib/docs/Aldrich/General_information/bstfa_tmcs.Par.0001.File.tmp/bstfa_tmcs.pdf
Consultado el día 13 de Mayo de 2011.
44. Norma Oficial Mexicana NOM-220-SSA1-2002, Instalación y operación de la farmacovigilancia. [En línea]: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/220ssa102.html>

11. GLOSARIO

Agonista: Fármacos que se fijan al receptor y lo activan de algún modo, directa o indirectamente.

AMPc: Siglas de Adenosin Monofosfato cíclico.

Anabólico: Sustancia que favorece la síntesis de las proteínas corporales.

Antagonista: Fármacos que evitan que otras moléculas se unan y provoquen una reacción en el organismo.

Anticuerpo: Molécula producida por los animales en respuesta al antígeno, tiene la propiedad de combinarse específicamente con el antígeno que indujo su formación, es una molécula adaptadora de capacidad intrínseca para activar el sistema de complemento y estimula las células fagocíticas, además se adhiere al microorganismo agresor. Tiene tres regiones de las cuales dos se comunican con el complemento y los fagocitos y una que se fija al microorganismo en particular, haciendo un reconocimiento externo.

Antígeno: Molécula que induce la formación de anticuerpos.

Broncodilatador: Cualquier fármaco que aumente el calibre de los conductos pulmonares.

BSTFA: N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamida), su fórmula molecular es $CF_3C=NSi(CH_3)_3OSi(CH_3)_3$

Catabolismo: Parte del metabolismo que comprende las reacciones de degradación de los alimentos para dar dióxido de carbono, agua y energía, o bien para formar las moléculas clave del metabolismo intermediario.

Catecolamina: Fármacos simpaticomiméticos y agonistas de los receptores adrenérgicos. Su estructura básica es un anillo de benceno con sustituciones hidroxílicas y una cadena lateral de etilamina.

Células cebadas: Básofilos.

COMT: Siglas de Enzima Catecolamin-O-metiltransferasa

Disnea: Dificultad para respirar.

ELISA: Del inglés enzyme-linked immunosorbent assay, análisis de inmunoabsorción vinculado a enzimas.

Eluato: Es la fase móvil que sale de la columna.

Elusión: Es el proceso en el cual los solutos son arrastrados a través de una fase estacionaria por el movimiento de una fase móvil.

Eluyente: Es un disolvente que se usa para transportar los componentes de una mezcla a través de una fase estacionaria.

FAO: siglas de Food and Agricultural Organization, Organización para la alimentación y la agricultura.

MAO: Siglas de Monoaminoxidasa.

Método cualitativo: Método analítico que identifica una sustancia basándose en sus propiedades químicas, biológicas o físicas.

Método cuantitativo: Método analítico que determina la cantidad o la fracción de la masa de una sustancia de forma que pueda expresarse como valor numérico de unidades apropiadas.

Método de confirmación: Método que proporciona información total o complementaria que permite identificar y en su caso cuantificar de manera inequívoca la sustancia a nivel de interés

Método presuntivo o de detección: Método utilizado para detectar la presencia de una sustancia o tipo de sustancias al nivel de interés. Este método permite analizar un elevado número de muestras y se utiliza para monitorear grandes cantidades de muestras en busca de posibles resultados no conformes. Están diseñados específicamente para evitar resultados de falso conforme.

Pienso: Porción de alimento seco administrado al ganado.

Ppb: Partes por billón.

Ppt: Partes por trillón.

Receptor: Componente de una célula u organismo

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

Simpaticomimético: Aminas sintéticas con actividad farmacológica semejante a la adrenalina con requisitos básicos estructurales para la actividad.

Tiempo de retención: Tiempo transcurrido que pasa al momento de eluir el máximo de concentración del analito desde que se inyecta hasta la aparición del pico del compuesto de interés.

Tiempo muerto: Es el tiempo que tarda en eluir un soluto que no interacciona con la fase estacionaria,

TIF: Siglas de Tipo Inspección Federal

TMCS: Trimethylchlorosilane, su fórmula molecular es $\text{ClSi}(\text{CH}_3)_3$

Vía Parenteral: Administración de medicamentos en caso de urgencia, o cuando los principios activos no son absorbidos por las mucosas gástricas e intestinal y/o son eméticos o son destruidos o inactivados por las secreciones del aparato digestivo.