

Centro de Investigación en
Alimentación y Desarrollo, A. C.

SISTEMA ANALÍTICO PARA LA DETECCIÓN, CUANTIFICACIÓN Y
CONFIRMACIÓN DE CLENBUTEROL EN CARNE DE BOVINO POR MEDIO
DE ELISA Y CROMATOGRFÍA DE GASES ACOPLADO A LA
ESPECTROMETRÍA DE MASAS-MASAS

POR

MARÍA DEL CARMEN ESTRADA MONTOYA

TESIS APROBADA POR LA
DIRECCIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE
ORIGEN ANIMAL

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRÍA EN CIENCIAS

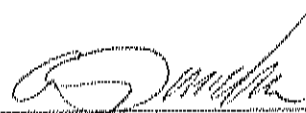
HERMOSILLO, SONORA

DICIEMBRE DEL 2003

DECLARACION INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos se deberá contar con la autorización escrita del Director General del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C.

La publicación en comunidades científicas o de divulgación popular de los datos obtenidos en esta tesis, deberá dar los créditos a CIAD, previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión, del director de la tesis.

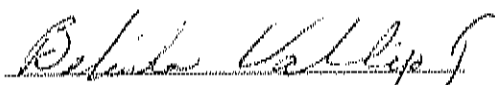


Dr. Alfonso A. Gardea Béjar

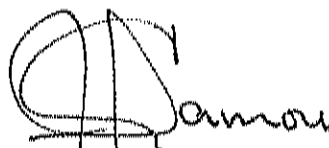
Director General

APROBACION

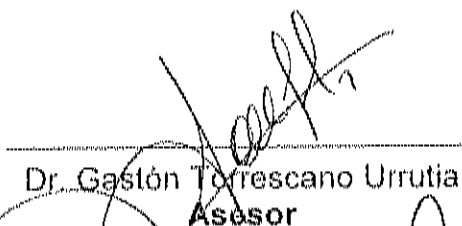
Los miembros del comité designado para revisar la tesis de María del Carmen Estrada Montoya, la han encontrado satisfactoria y recomiendan sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



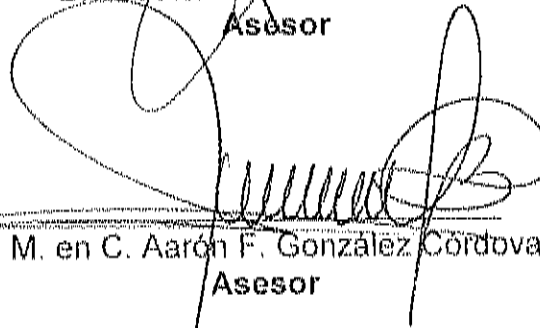
Dra. Belinda Vallejo Galland
Directora de Tesis



Dr. Juan Pedro Camou Arriola
Asesor



Dr. Gastón Torrecano Urrutia
Asesor



M. en C. Aarón F. González Córdova
Asesor

DEDICATORIA

Esta Tesis la Dedico con Mucho Cariño y Amor:

A mi madre **Margarita Montoya Escalante**, por su amor, su dedicación, su sacrificio y porque gracias a ella he culminado una etapa más de mi vida. Gracias por tu apoyo y protección incondicional, estaré siempre en deuda contigo madre.

A mis hermanos **Agustín Valeriano, Erika Consuelo y Patsy Margarita**, que siempre me han dado su cariño y su amor incondicional.

A mi sobrina **María Daniela**, quien es una dicha y bendición de Dios, quien vino a alegrarme la vida con su ternura y amor.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme llegar hasta este momento que hoy culmina.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico brindado para la realización de mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD), por aceptarme en el programa de posgrado y de esta manera poder realizar mis estudios de Maestría en Ciencias.

A la Dirección de Tecnología de Alimentos de Origen Animal (DTAOA), por facilitarme las instalaciones y todo lo necesario para la realización de mi tesis.

Al laboratorio de la Procuraduría General de Justicia del Estado de Baja California, especialmente al Q. F. B. Jaime Vázquez y Q. F. B. Laura Castañeda por facilitarme las instalaciones para la realización de mi tesis.

A la Dra. Belinda Vallejo Gallan, directora de mi tesis, quien me apoyó y quien siempre tuvo disposición de ayuda, para la realización de este trabajo.

Al comité de tesis, Dr. Juan Pedro Camou Arriola, Dr. Gastón Torrescano Urrutia y al M. en C. Aarón Fernando González Córdova, por su excelente contribución y gran apoyo en la realización de esta tesis.

A mis amigos, Armida Sánchez, Natalia González, Gastón Torrescano, Juan Pedro Camou, Aarón González, quienes siempre me han brindado su

ayuda incondicional y su amistad, gracias por compartir conmigo esos momentos.

A todos mis compañeros de generación, que siempre manifestaron amistad; especialmente a Rafael Jiménez y Alejandra Rodríguez, que compartimos juntos experiencias inolvidables.

A mi amiga, Dulce Patricia Galindo por estar siempre al pendiente de mi evolución académica, aún estando lejos.

A mi amigo Juan Carlos Yocupicio, por su disposición de ayuda incondicional y por su desinteresada amistad.

A Faly Gil-Lamadrid y al M. en C. Miguel Angel Mazorra M. por su amistad y apoyo.

Finalmente a todas las personas que intervinieron de alguna forma en la realización de este trabajo.

CONTENIDO

| | PAGINA |
|--|--------|
| INDICE DE TABLAS..... | ix |
| INDICE DE FIGURAS..... | x |
| RESUMEN..... | xi |
| INTRODUCCION..... | 1 |
| ANTECEDENTES..... | 4 |
| Características del clenbuterol..... | 7 |
| Estructura química..... | 8 |
| Propiedades físicas..... | 9 |
| Comercialización..... | 9 |
| Mecanismo de acción..... | 9 |
| Metabolismo..... | 13 |
| Farmacodinámica (acción/efecto)..... | 13 |
| Farmacocinética (destino de las muestras en el organismo)..... | 15 |
| Absorción..... | 15 |
| Distribución..... | 15 |
| Biotransformación..... | 15 |
| Excreción..... | 15 |
| Toxicidad..... | 15 |
| Residuos encontrados en tejido animal..... | 16 |
| Riesgos en la salud humana..... | 17 |
| Situación actual en México..... | 18 |
| Métodos analíticos de detección para clenbuterol..... | 24 |
| Extracción y purificación..... | 24 |
| Métodos analíticos..... | 27 |
| Métodos inmunológicos..... | 27 |
| Técnicas confirmativas..... | 29 |
| MATERIALES Y METODOS..... | 36 |

| | |
|--|-----------|
| Recolección de muestras | 36 |
| Reactivos | 36 |
| Preparación de estándares | 37 |
| Solución Madre de clenbuterol (1 mg/L) | 37 |
| Solución intermedia de clenbuterol (10 µmg/ mL)..... | 37 |
| Solución de trabajo de clenbuterol (1 µmg/ mL) | 37 |
| Análisis por ELISA..... | 37 |
| Procedimiento de extracción de la muestra | 37 |
| Procedimiento de purificación de la muestra | 38 |
| Análisis de clenbuterol..... | 38 |
| Análisis de datos..... | 40 |
| Recuperación del método..... | 41 |
| Análisis por cromatografía de gases | 41 |
| Procedimiento de extracción de la muestra | 41 |
| Purificación en columna de C ₁₈ | 42 |
| Proceso de derivatización de la muestra | 42 |
| Identificación por GC-MS/MS | 42 |
| RESULTADOS Y DISCUSION | 45 |
| Determinación de clenbuterol en carne de bovino por ELISA..... | 45 |
| Confirmación por GC-MS/MS..... | 50 |
| CONCLUSIONES | 59 |
| BIBLIOGRAFIA | 60 |

INDICE DE TABLAS

| | PAGINA |
|---|--------|
| 1. Distribución y funciones de los receptores β 1 y β 2 en los órganos y en los tejidos | 14 |
| 2. Intoxicaciones con clenbuterol asociados al consumo de carne o hígado de bovino reportadas en México | 21 |
| 3. β -agonistas prohibidos como promotores de crecimiento en México | 23 |
| 4. Reactividad cruzada del anticuerpo clenbuterol con diferentes compuestos..... | 39 |
| 5. Condiciones para el análisis por espectrometría de masas/masas..... | 44 |
| 6. Recuperación del clenbuterol en carne por ELISA (n=3) | 46 |
| 7. Concentración de clenbuterol en carne de bovino (ELISA). | 48 |

INDICE DE FIGURAS

| | PAGINA |
|--|--------|
| 1. Estructura de los principales β -agonistas adrenérgicos | 5 |
| 2. Estructura del clenbuterol..... | 10 |
| 3. Mecanismo de acción de los β -agonistas..... | 12 |
| 4. Evaluación temporal de los casos de clenbuterol..... | 19 |
| 5. Componentes de un espectrómetro de masas..... | 31 |
| 6. Fragmentación del clenbuterol por GC-MS | 33 |
| 7. Cromatograma y espectro de masas del estándar de clenbuterol (10 ppb) analizado por GC-MS en modo SIM (m/z 73, 86, 190, 262 y 277)..... | 51 |
| 8. Análisis del clenbuterol por GC-MS/MS y sus iones productos m/z = 188, 191 y 225 (precursor m/z 262) | 52 |
| 9. Estructura del TMS derivativo del clenbuterol y sus correspondientes iones precursores y iones hijos..... | 54 |
| 10. Análisis por GC-MS/MS de una muestra de carne libre de clenbuterol.. | 55 |
| 11. Cromatograma representativo (GC-MS/MS) obtenido de un muestra de carne fortificada (3 ppb) con clenbuterol..... | 56 |
| 12. Cromatograma de una muestra positiva (control positivo por ELISA) analizada por GC-MS/MS | 57 |

RESUMEN

En México se creó un estado de alerta ante la detección del uso indiscriminado del β -agonista clenbuterol, utilizado como promotor de crecimiento en ganado. Los residuos de este fármaco encontrados en la carne para consumo humano provocaron intoxicaciones de 132 personas. Con la finalidad de proteger la salud de los consumidores, la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) publicó una norma emergente (NOM-EM-015-ZOO-2002) en la que prohíbe el uso de β -agonistas, entre ellos el clenbuterol, como promotores de crecimiento en el ganado. Entre los métodos analíticos que establece dicha Norma, se encuentran los inmunoensayos ligados a enzima (ELISA) y los cromatográficos como la cromatografía de gases o la cromatografía de líquidos. Sin embargo, las primeras presentan reactividad cruzada y pueden resultar en falsos positivos y las segundas son técnicas de separación y no de identificación. Por lo que es necesario desarrollar e implementar sistemas analíticos que no solo detecten, sino que confirmen la presencia de clenbuterol en carne. El objetivo de este trabajo fue desarrollar e implementar un sistema analítico para detectar, cuantificar y confirmar la presencia de clenbuterol en carne de bovino por medio de una técnica de ELISA y confirmar su presencia por Cromatografía de Gases con Espectrometría de Masas-Masas (GC-MS/MS). Para la detección tentativa de clenbuterol y su cuantificación, se implementó una metodología de ELISA utilizando un kit comercial. De 50 muestras de carne de bovino, pulpa negra (*m. semimembranosus*) o molida, colectadas del mercado local, el 12% resultaron positivas para clenbuterol. La curva de calibración construida para la cuantificación del clenbuterol, presentó un coeficiente de Determinación altamente significativo ($p < 0.001$) de $R^2 = 0.9997$ ($Y = -18.396 \ln(X) + 184.68$) en el rango 0 a 8100 ppt. Coeficientes de variación menores a 1.5 % para los estándares y 2.5 % para las muestras indicaron que la técnica fue reproducible.

Para la identificación y confirmación de las muestras positivas, se desarrolló e implementó una técnica de GC-MS/MS. Los trimetilsilil (TMS) derivados de clenbuterol produjeron un ión precursor o ión padre de 262 (m/z = masa/carga), el cual fue seleccionado para una segunda fragmentación (MS/MS). Los iones productos en MS/MS que fueron utilizados para identificar inequívocamente la presencia de clenbuterol fueron 188, 190 y 225 (m/z). El análisis de los espectros de MS/MS de las seis muestras que resultaron positivas para clenbuterol por la técnica de ELISA, presentaron los iones característicos del clenbuterol, quedando con esto confirmada su presencia. Aunque se han realizado muestreos para detectar la presencia de clenbuterol en carne, en otros Estados de la República Mexicana y en algunas ciudades, este es el primer estudio que utiliza la GC-MS/MS para confirmar la presencia de este β -agonista en muestras de carne de bovino.

INTRODUCCION

Actualmente la demanda para producir carne de bovino con menor contenido de grasa ha sido una exigencia en muchos de los mercados del mundo. Esta situación ha propiciado la generación de distintos compuestos, como los β -agonistas adrenérgicos que ofrecen alternativas para producir animales con mayor capacidad para depositar proteína en sus tejidos y consecuentemente la reducción de depósitos de grasa como los β -agonistas adrenérgicos (Garza, 2002).

Los β -agonistas adrenérgicos son compuestos naturales o artificiales (análogos sintéticos) farmacológicamente clasificados como un grupo de compuestos adrenérgicos por su estructura análoga a la noradrenalina y adrenalina. Estos producen una repartición de los nutrientes hacia vías metabólicas que aumentan la síntesis y deposición de proteínas y por consecuencia disminuyen la acumulación de materia grasa en los tejidos (Lone, 1997; Rojas y Tregar, 2002). Los β -agonistas mejoran la capacidad del ganado bovino para utilizar eficientemente los alimentos al ser administrados por vía oral, permitiendo su administración al ser mezclada con los alimentos y dando como resultado una carne más magra (Guy *et al.*, 1999)

En México se creó un estado de alerta ante la detección del uso indiscriminado del β -agonista clenbuterol (Guy *et al.*, 1999; Peña y Arias, 2001). Los residuos de este fármaco encontrados en la carne para consumo humano provocaron intoxicaciones de 132 personas (García-López, 2002). Con la finalidad de proteger la salud de los consumidores, la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, SAGARPA, publicó una norma emergente, la Norma Oficial Mexicana (NOM-EM-015-ZOO-2002) en la

que prohíbe el uso de β -agonistas como promotores de crecimiento en los animales. En diferentes países europeos, como Reino Unido, Francia y España existe una normatividad equivalente que también prohíbe el uso de β -agonistas (Peña y Arias, 2001).

Entre los métodos analíticos oficiales que establece la Norma Mexicana para identificar la presencia de clenbuterol en carne se encuentran los inmunoensayos realizado por ELISA, que es una técnica fácil, rápida y sensible pero tiene el inconveniente de dar reactividad cruzada. Otros, son los métodos cromatográficos como la cromatografía de gases y la cromatografía de líquidos (NOM-EM-015-ZOO-2002), sin embargo, ambas son técnicas de separación de compuestos que proporcionan una identificación tentativa más no confirmativa.

La espectrometría de masas es una técnica de identificación de sustancias que acoplada a cualquiera de los métodos cromatográficos antes mencionados, es indudablemente una mejor herramienta ya que permite confirmar la presencia de compuestos específicos con una confiabilidad inigualable (Flores *et al.*, 2002). Sin embargo, se han realizado estudios que sugieren que con la primera ionización de la espectrometría de masas (MS_1) no es suficiente, debido a que hay compuestos que tienen estructura similar. Por lo tanto, se recomienda la fragmentación del compuesto por espectrometría de masas-masas (MS_2) para una mayor confiabilidad de la confirmación de la identidad del analito (Careri *et al.*, 2000).

Los productores de ganado han manifestado preocupación por la revisión sanitaria que se realiza en el ganado. La carne que hoy se comercializa en México, podría ser un riesgo toxicológicos por la presencia de clenbuterol. Además los métodos que establece la Norma emergente no son confirmatorios, por lo que pueden conducir a falsos positivos. Por esto, el objetivo de este

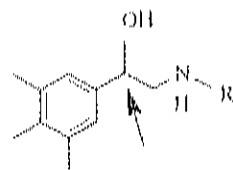
trabajo fue desarrollar e implementar un sistema analítico para detectar la presencia de clenbuterol en carne de bovino por medio de una técnica de ELISA y confirmar inequívocamente su presencia por Cromatografía de Gases con Espectrometría de Masas-Masas (GC-MS/MS).

ANTECEDENTES

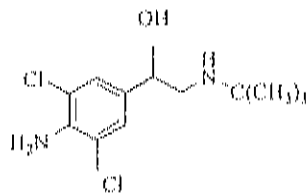
El uso de promotores de crecimiento en la producción de productos de origen animal para consumo humano, ha sido objeto de debates científicos y políticos. A consecuencia de esto, en 1986 fueron prohibidos los esteroides anabólicos y sus análogos, por la Comunidad Europea. Esto propició el interés del sector ganadero por sustancias alternativas como los β -agonistas, porque además de ejercer efectos similares en los animales, presentan ventajas adicionales, como ser administrados por vía oral mezclados con los alimentos (Kuiper *et al.*, 1998; Carmona, 2002).

Dentro de los muchos aditivos alimenticios, utilizados por los especialistas en alimentación animal, se encuentran los β -agonistas adrenérgicos, que farmacológicamente son clasificados como un grupo de compuestos relacionados estructuralmente y funcionalmente con la norepinefrina (Carmona, 2002; García-López, 2002). Estos derivados sintéticos, como su nombre lo indica, tienen la capacidad de unirse a los receptores adrenérgicos tipo β (β -adrenérgicos) localizados en la membrana celular para producir efectos fisiológicos como el incremento de la velocidad cardiaca (Boyd *et al.*, 1996). Los β -agonistas también afectan las funciones metabólicas, aumentando la deposición de proteína, disminuyendo el tejido graso y promoviendo la conversión del alimento en forma eficiente (Lone, 1997).

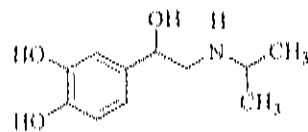
Los β -agonistas son generalmente divididos en dos grupos principales: los de anilina sustituida como clenbuterol y cimaterol, y los de fenoles sustituidos el cual incluye al salbutamol y terbutalina. En la Figura 1 se muestran las estructuras de β -agonistas seleccionados, representativos de cada grupo (Boyd *et al.*, 1996).



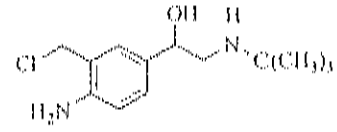
Estructura general de las feniletanolaminas



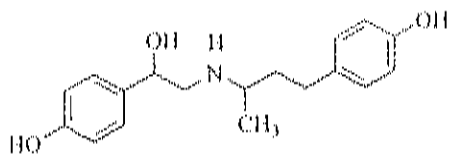
Clenbuterol



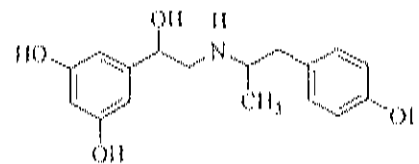
Isoproterenol



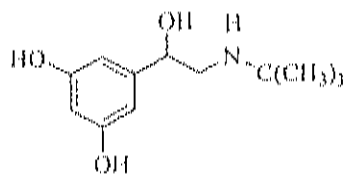
Albuterol



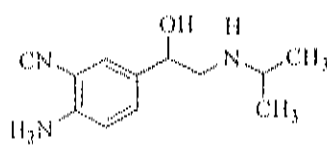
Ractopamina



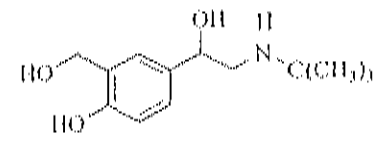
Fenoterol



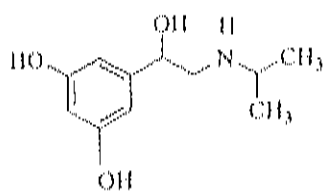
Terbutalina



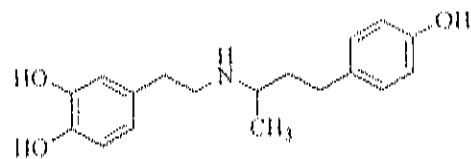
Cimaterol



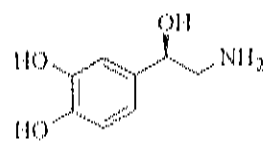
Salbutamol



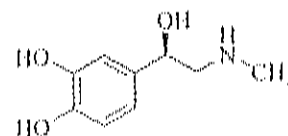
Metaproterenol u orciprenalina



Dobutamina



Norepinefrina



Epinefrina

Figura 1. Estructura de los Principales β -Agonistas Adrénrgicos (Sumano *et al.*, 2002).

Los β -agonistas se utilizan generalmente en animales de ganado bovino, aunque también se han probado en cerdos, ovejas y aves de corral pero obteniéndose resultados pocos satisfactorios en estos últimos. Una posible explicación de estos resultados es que algunas especies han sido seleccionadas para un crecimiento rápido y por lo tanto tienen menos potencial para incrementar el crecimiento, debido a que están muy cercanas al crecimiento biológico máximo, como los pollos en engorda (Rojas y Treguear, 2002). Mersman *et al.* (1998) utilizaron β -agonistas en cerdos de 10 kg de peso, hasta alcanzar 60 kg, encontrando que dichos productos no tienen un efecto sobre las ganancias de peso de animales en rápido crecimiento, ni tampoco se observa un efecto significativo sobre la repartición de la grasa corporal, debido a que no es sino hasta después de los 60 kg cuando se empieza a desarrollar al máximo la deposición de grasa corporal (García-López, 2002).

Otro uso de los β -agonistas es en medicina humana y en veterinaria como drogas terapéuticas, especialmente en el tratamiento de enfermedades respiratorias (asma) por su acción broncodilatadora y como tocolíticos. Sin embargo, cuando se administran en dosis diez veces superiores a las terapéuticas, presentan una acción anabolizante, favoreciendo la síntesis de proteína y disminuyendo la de grasa, por lo que se les conoce como "agentes repartidores de energía" (Blass *et al.*, 1998; Crescenzi *et al.*, 2001).

La utilización de estos compuesto en forma indebida, con dosis altas y tiempos de tratamientos prolongados, favorecen la aparición de residuos en los diferentes órganos del animal que provocan intoxicaciones en las personas que los consumen (Blass *et al.*, 1998). Estas intoxicaciones se manifiestan con la presencia de dilatación de bronquios, dilatación de pupilas, vómito, problemas cardiovasculares, metabolismo elevado, temblores musculares, náuseas, dolor

de cabeza y taquicardia. Esta última es la más peligrosa y relevante ya que puede producir la muerte (Flores *et al.*, 2002).

Los β -agonistas más utilizados por los ganaderos y productores como promotores de crecimiento son: clenbuterol, ractopamina, salbutamol, cimaterol, fenoterol, ritodrine, terbutaline y zilpaterol (García-López, 2002).

Características del Clenbuterol

El clenbuterol fue el primer β_2 -agonista adrenérgico utilizado como promotor de crecimiento. Fue desarrollado para uso terapéutico como agente broncopasmolítico en humanos, así como su uso en animales para el tratamiento de afecciones respiratorias y como relajante uterino en el parto (tocolítico) (Amendola *et al.*, 2002). Este efecto positivo en el crecimiento de animales productores de carne fue descrito por Baker *et al.* en 1984 (Gleixner, 1998). Para su acción como anabólico, es necesario aplicar dosis mayores a 10 veces la dosis terapéutica (0.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso) por lo que sus residuos son detectados en plasma y orina, durante y después de su aplicación (Gleixner *et al.*, 1997).

Los efectos anabólicos del clenbuterol sobre la masa muscular y la grasa corporal han favorecido su uso ilegal en la alimentación animal. El clenbuterol causa disminución de la grasa corporal, crecimiento de la masa muscular y ganancia de peso, acumulándose en el hígado en grandes cantidades, por lo que el consumo de las vísceras con lleva mayor riesgo que el de la carne. Su uso está permitido bajo supervisión veterinaria y cuenta con periodos de retiro de 45 días antes del sacrificio, tiempo requerido para que la carne destinada

para consumo este libre de residuos (O'Keeffe *et al.*, 1998; Hernández *et al.*, 2001). Sin embargo éstos se pueden detectar fácilmente en animales tratados, debido a un uso ilegal por ser adicionados en el agua o el alimento, o por no cumplir con las condiciones de retiro (Botsoglou y Fletouris, 2001).

El clenbuterol es el β -agonista más popular, que hoy en día ha causado un gran número de intoxicaciones alimenticias tanto en la Comunidad Europea, en los Estados Unidos y en México. Por esto, se ha prohibido el uso de β -agonistas como promotores de crecimiento en animales para la producción de carne (Kool *et al.*, 1999).

El uso indiscriminado de clenbuterol como promotor de crecimiento en la producción de carne de bovino, presenta ventajas económicas para la industria cárnica. Estas mejoran la capacidad del ganado bovino para utilizar eficientemente los alimentos y producir una carne más magra y obtener una ganancia de peso en poco tiempo (Guy *et al.*, 1999). Sin embargo esto se convierte en una competencia desleal entre los productores y constituye un fraude al producir un alimento adulterado, que pone en riesgo la salud de los consumidores.

Estructura Química

El clenbuterol es un fármaco β -agonista con afinidad para receptores β_1 y β_2 , y es un compuesto sintético que pertenece a las denominadas feniletanol aminas, medicamentos que, como grupo, requieren la presencia de un anillo aromático con un grupo hidroxilo en la posición β del grupo alifático para mostrar actividad. La presencia del grupo nitrogenado y la sustitución del grupo R por un grupo voluminoso, a menudo cíclico, hace más específica a la

molécula por lo receptores β -adrenérgicos como en el caso de la dobutamina, Figura 1 (Sumano *et al.*, 2002).

Químicamente el clenbuterol se conoce como 4-amino-3,5-dicloro- α -[(ter-butilamino)-metil] benzil alcohol (Figura 2), su fórmula química es $C_{12}H_{18}N_2OCl_2$ y su peso molecular es 277g/mol (O'Keeffe *et al.*, 1998).

Propiedades Físicas

El clenbuterol se presenta como un polvo cristalino, incoloro, con punto de fusión de 174-175°C, es muy soluble en agua, ligeramente soluble en cloroformo y es altamente sensible a la luz (Botsoglou y Fletouris, 2001).

Comercialización

Boehringer Ingelheim registró el clenbuterol en 1978, para comercializarlo en dos formas: Oral en forma de gránulos, cada gramo contiene 0.016 mg de clorhidrato de clenbuterol (0.0016%) y como jarabe o gel se comercializa conteniendo 0.025 mg de clorhidrato de clenbuterol por mL (0.0025%) y Parenteral como solución inyectable por vía intra muscular o intravenosa a una concentración de 0.03 mg/mL (Cajal y Alvarez, 2002).

Mecanismo de Acción

En la membrana celular existen dos tipos principales de receptores adrenérgicos, conocidos como α y β , y cada uno de ellos con diferentes

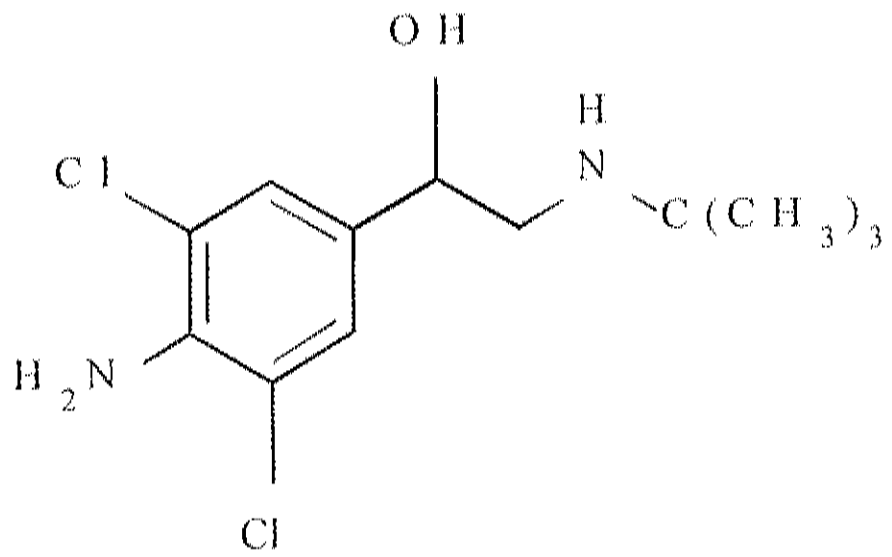


Figura 2. Estructura del Clenbuterol (O'Keeffe *et al.*, 1998).

subtipos (α -1, α -2, β -1, β -2, y β -3). Estos receptores son de naturaleza protéica, cumplen con diferentes funciones fisiológicas dependiendo del tejido donde se localizan y tienen distintas propiedades farmacológicas (Intervet, 2002; Sumano et al., 2002). Los β -agonista adrenérgicos son moléculas orgánicas que se unen a los β -receptores dando lugar al complejo agonista-receptor, que a su vez activa a la proteína Gs. La subunidad α de la proteína Gs activa a la adenilato-ciclasa, enzima localizada en la membrana celular que convierte el ATP en monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), el cual se une a la proteína kinasa A, liberando una unidad catalítica que fosforila a las proteínas intracelulares, dependiendo del tejido en el que actuaron estos compuestos β -agonistas (Intervet, 2002; Sumano, et al., 2002).

En el tejido adiposo, el AMPc activa a la enzima lipolítica responsable de la degradación de triglicéridos (triacilglicerol lipasa), enzima que cataboliza a las grasas liberando ácidos grasos libres (AGL) y glicerol hacia el torrente sanguíneo (Mersmann, 1998). Los AGL vertidos en la sangre son utilizados por ciertos tejidos (cerebro y músculo cardíaco) como fuentes de energía. El efecto sobre el animal es una reducción en el contenido de grasa corporal debido, principalmente, a una reducción en la lipogénesis y a un incremento en la lipólisis (Intervet, 2002). En la Figura 3 se muestra cómo estos compuestos ejercen su efecto al activar a los receptores β -adrenérgicos, específicamente del subtipo 1 del tejido adiposo (García-López, 2002).

En el tejido muscular, el AMPc se une a la proteína activadora de genes (PAG), el complejo AMPc-PAG, estimula a la polimerasa del ARN, enzima que es responsable de la transcripción de ADN que tiene como resultado un incremento de la síntesis de proteína muscular. Adicionalmente, produce una reducción importante en la degradación (proteólisis) de la proteína muscular que disminuye la liberación de aminoácidos del músculo. El efecto combinado

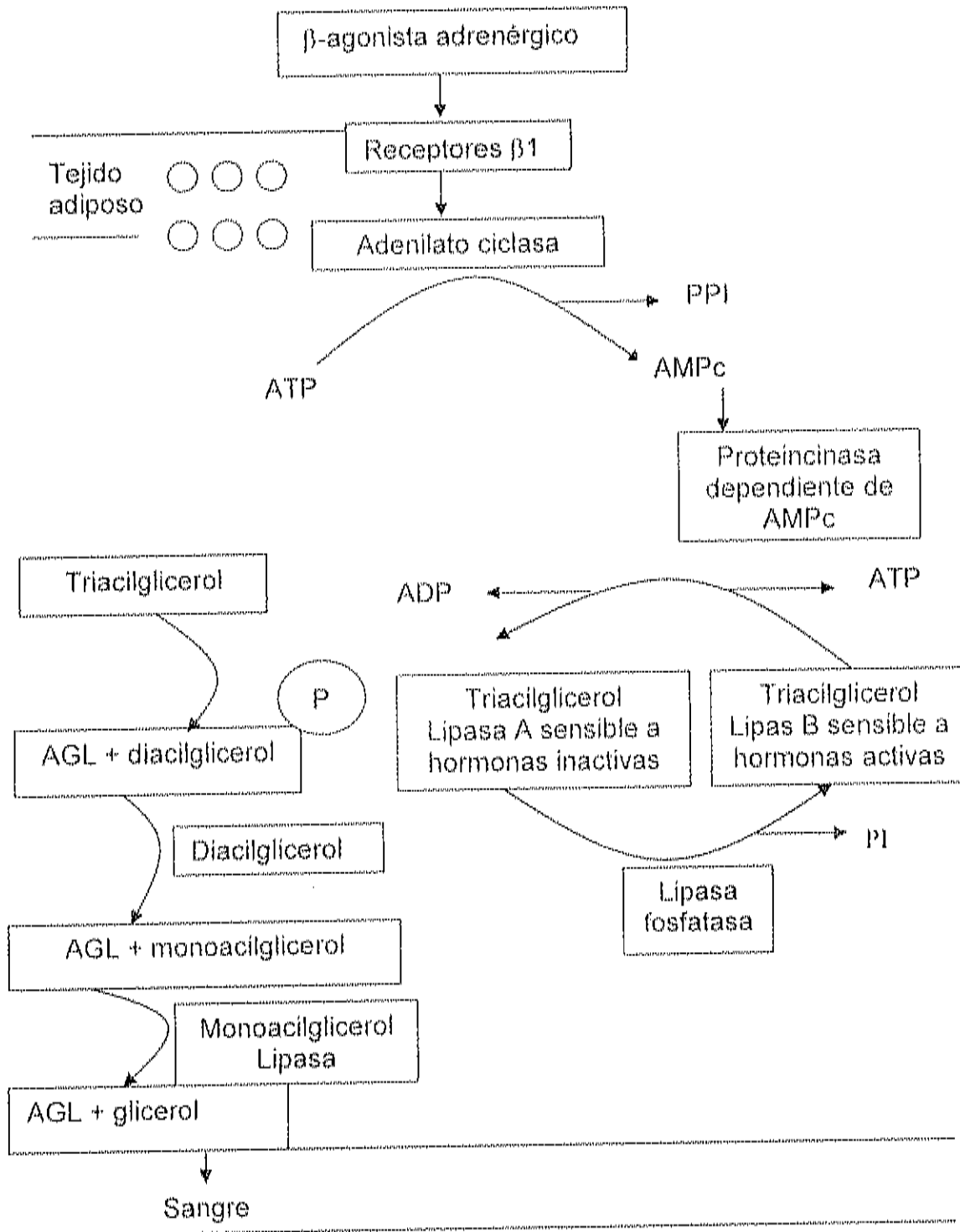


Figura 3. Mecanismo de Acción de los β -Agonistas (García-López, 2002).

del aumento de la síntesis y la reducción de la degradación de proteína, es una hipertrofia muscular (Intervet, 2002).

Metabolismo

Estudios farmacocinéticos han mostrado que los β -agonistas con grupos halogenados en el anillo aromático como el clenbuterol, son metabolizados por caminos oxidativos y conjugativos y tienen una vida media más larga en el plasma que los compuestos con grupos hidroxilos en el anillo aromático como el salbutamol y que son metabolizados solamente por conjugación (Botsoglou y Fletouris, 2001).

Farmacodinámica (acción/efecto)

El clenbuterol tiene afinidad por los receptores adrenérgicos β -1 y β -2. Cuando actúa en los receptores β -1, tiene su efecto en el metabolismo causando el desdoblamiento de lípidos y estimulando la síntesis de proteína (efecto anabólico) muscular, y en el corazón aumenta la frecuencia cardíaca e intensidad de la contracción (Ruvalcaba, 2003). También actúan como activador de los β -receptores adrenérgicos del tipo β -2 del árbol bronquial como relajantes en la fibra muscular lisa (vasodilatación y broncodilatación) y además de que actúa sobre el sistema nervioso central, SNC (Smith, 1998). Se encuentra como mezcla racémica 50% y 50%. En la Tabla 1 se muestra resumida la localización de los β -receptores.

Tabla 1. Distribución y Funciones de los Receptores β -1 y β -2 en los Órganos y en los Tejidos.

| Órganos | Tipo | Funciones |
|------------|-------------------------|------------------------------|
| Adipocitos | β -1, β -2 | Lipólisis |
| Arterias | β -1 < β -2 | Relajación |
| Bronquios | β -1 < β -2 | Relajación |
| Corazón | β -1 > β -2 | Inotropismo+, Cronotropismo+ |
| Útero | β -2 | Relajación |

Fuente: Rico, 2002.

Farmacocinética (destino de las sustancias en el organismo)

Absorción. Se absorbe por vía oral (en hombre y animales), la concentración sanguínea máxima se alcanza a las 2-3 hr de la administración y tiene una vida media plasmática en bovinos de 16-105 hr (Ruvalcaba, 2003).

Distribución. Se distribuye ampliamente por todo el organismo atravesando la barrera placentaria (monos, bovinos, ratas, etc). Se acumula principalmente en el hígado donde permanece por varias semanas y se almacena en tejido retinal hasta por 5 meses (Ruvalcaba, 2003).

Biotransformación. Se metaboliza por medio de reacciones de N-oxidación, en hidroxiclenbuterol y conjugados glucurónidos. Se biotransforma escasamente y se conoce poco acerca de cuatro metabolitos del clenbuterol: N-hidroxilarilamina, hidroxiclenbuterol, N-nitroso clenbuterol y 1-(4-amino-3,5-diclorofenil)-2-hidroxi-terbutilamino-etanol-HCl, con propiedades toxicológicas de riesgo para la salud humana para este último (Zalko *et al.*, 1997).

Excreción. Presenta una excreción renal bifásica (una porción rápida y otra lenta). La orina es la vía principal de excreción, ya que a través de ella se elimina 50-85% del compuesto. La excreción a través de las heces es del 5-30% y en la leche del 0.9-3% del compuesto (Ruvalcaba, 2003).

Toxicidad. El clenbuterol tiene una toxicidad aguda de moderada a alta. La DL50 está entre 80-180 mg/kg, siendo la vía parenteral la ruta más tóxica. La forma levógira es la forma más tóxica de la mezcla racémica. No existe evidencia de que produzca carcinogenicidad. (Ruvalcaba, 2003).

Residuos Encontrados en Tejido Animal

Con el fin de tener mejor control sobre el uso ilegal de éste fármaco, se han desarrollado varios métodos analíticos para establecer el nivel de contaminación, utilizando muestras de tejidos como hígado, riñón, músculo, o fluidos corporales (plasma, orina y bilis) (Sumano *et al.*, 2002). Smith y Paulson (1997) encontraron concentraciones máximas de clenbuterol en el plasma a partir del día 10 del tratamiento, sin diferencias significativas entre las concentraciones de clenbuterol en riñón e hígado en el día 2 de retiro del tratamiento. Para el día 4 a partir del retiro, no se presentaron cambios significativos. Sin embargo, las concentraciones fueron altas en el hígado en comparación con otros tejidos y fluidos, lo cual sugiere que el hígado es el órgano más apropiado para el análisis de residuos. La concentración media para el clenbuterol en el día 16 del retiro del fármaco fue de 9.8 ng/g en hígado. Smith (1998) encontró alrededor de 0.5 ng/g de clenbuterol en el hígado, el día 14 después del retiro del tratamiento. En otro estudio realizado en España, los residuos de clenbuterol encontrados en hígado de vaca oscilan entre 160 y 291 mg/kg. Las diferencias pueden deberse en parte a las dosis utilizadas en los estudios (Peña y Arias, 2001).

El uso terapéutico de este fármaco en veterinaria puede resultar en la aparición de residuos de esta sustancia en los tejidos procedentes de animales tratados y que irán destinados al consumo humano. Por este motivo, las autoridades sanitarias intentan controlar la presencia de clenbuterol en los tejidos en el que se ha fijado y tratar de prevenir cualquiera de los riesgos que produce esta sustancia en la salud del consumidor. Para ello, se ha establecido un límite máximo de residuos (LMR) (expresado en $\mu\text{g/Kg}$ sobre la base del peso fresco) que son autorizados por la Unión Europea. Este LMR establecido en equinos y bovino es de 0.1 $\mu\text{g/Kg}$ en músculo, 0.5 $\mu\text{g/Kg}$ en

hígado y riñón y de 0.05 µg/Kg en la leche procedente de vacas tratadas con el fármaco (Sánchez *et al.*, 2003).

Riesgos en la Salud Humana

Aunque los residuos de fármacos de uso veterinario son relativamente frecuentes en los alimentos, las reacciones adversas en humanos pocas veces resultan visibles, ya que la cantidad ingerida de residuos no es lo suficientemente grande para producir signos clínicos (Peña y Arias, 2001). En humanos, el clenbuterol produce un efecto broncolítico con una dosis única vía nasal de 10 mg (0.167 mg/kg de peso por día), sin ninguna evidencia de taquicardia. Con una dosis vía oral superior a 5 mg/día (0.08 mg/kg de peso por día) por 3 días, no se detectaron efectos en la resistencia bronquial, el volumen de gas torácico y presión sanguínea. En estudios en humanos para investigar los efectos broncopasmóticos, se administraron dosis orales de hasta 30 mg por persona. Los pacientes que tomaron dosis de 5 mg o más exhibieron efectos broncopasmolíticos y la dosis sin efecto fue de 2.5 mg por persona, equivalente a 0.04 mg/kg de peso corporal (Smith, 1998).

A consecuencia del uso de estos fármacos para la engorda del ganado, en diversos países europeos (Francia, Italia y España), se registraron 809 casos de intoxicación después del consumo de alimentos y subproductos de origen animal, procedentes de bovinos tratados con clenbuterol. El β-agonista más popular, el clenbuterol, es también conocido como "la cocaína del ganado", debido a la cantidad de dinero negro que mueven los fabricantes. (Mitchell y Dunnavan, 1998; Hernández *et al.*, 2001; Carmona 2002). Los primeros casos

de intoxicaciones se reportaron entre octubre de 1989 y julio de 1990, en donde 135 personas resultaron intoxicadas por consumir hígado de vaca contaminado con clenbuterol. En 1992, el número de intoxicaciones aumentó a 232 personas, siendo el último caso el reportado en 1998 (Figura 4). Los signos de las intoxicaciones aparecieron después de 30 minutos y hasta 6 horas de haber ingerido el alimento contaminado (Blass *et al.*, 1998). En Barcelona en 1998, 15 personas resultaron afectadas (Smith y Paulson, 1997). El hecho de que la mayoría de las intoxicaciones se hayan producido por consumo de hígado, se debe a que es el órgano donde se acumula la mayor concentración de residuos de este β -agonista (Carmona, 2002).

Actualmente, el uso de β -agonistas como promotores de crecimiento se encuentran prohibidos en Europa, Estados Unidos y Chile. Investigaciones hechas en Estados Unidos a comienzos de los 90's dejaron en evidencia el peligro que ocasionan los β -agonistas debido al deceso de 3 ciudadanos norteamericanos. (Rojas y Treguear, 2002).

Situación Actual en México

El clenbuterol es un producto que tiene prohibida su venta en México, según el Diario Oficial de la Federación del 10 de agosto de 1999. Esto se debe, a que en otros países ha dejado secuelas graves en el organismo humano, después de consumir carne de animal alimentado con esta sustancia.

De acuerdo con autoridades sanitarias, productores avícolas y fabricantes de alimentos, el consumir carne contaminada por esta sustancia produce en los consumidores una intoxicación. Los síntomas de esta

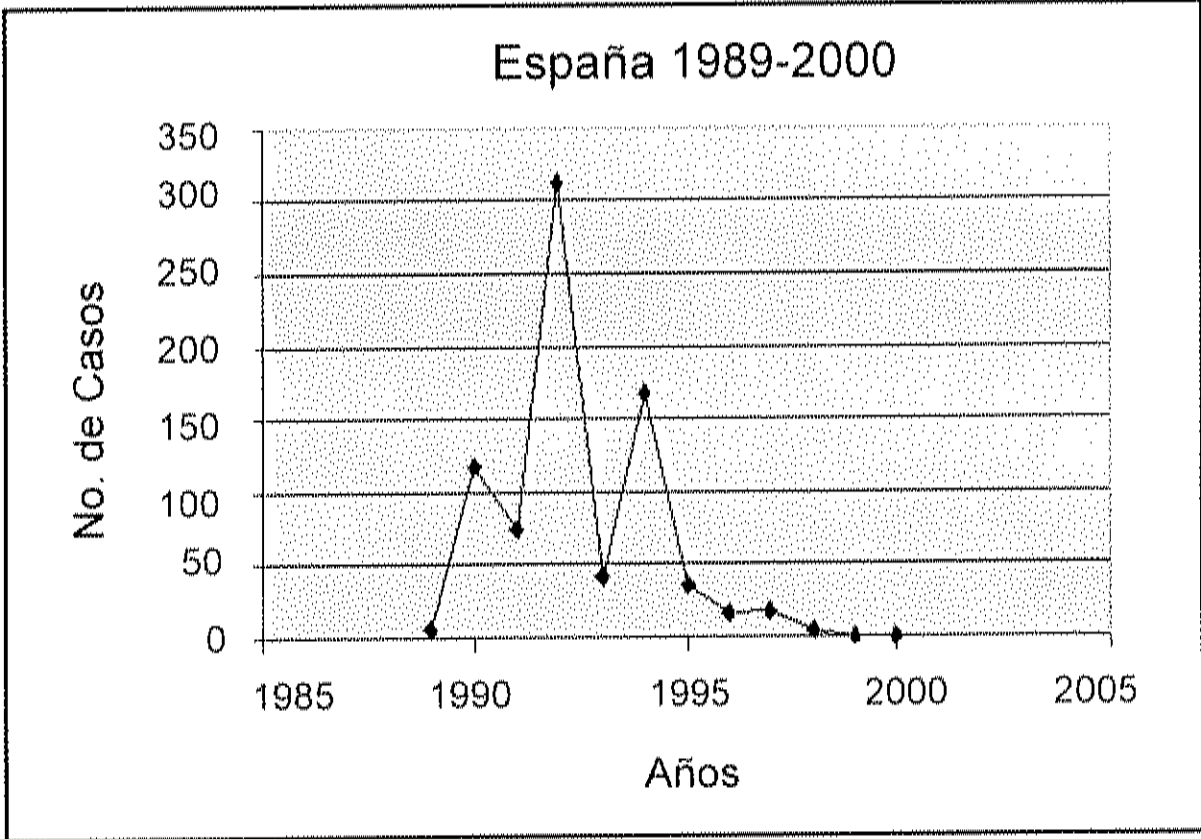


Figura 4. Evaluación Temporal de los Casos de Clenbuterol (Hernández *et al.*, 2001).

intoxicación se manifiestan como taquicardia, problemas gastrointestinales, temblores, vértigo, dolores musculares y articulaciones, dolor de cabeza, cáncer de próstata y gástrico. En caso del que el afectado sea cardíaco, el consumo de este producto puede provocar la muerte (Flores, 2000). Es importante señalar que solamente en el caso del clenbuterol se han documentado estos efectos derivados de la ingesta del fármaco incluido en productos de origen animal (Sumano, *et al.*, 2002).

En nuestro país, se han detectado casos de intoxicación con clenbuterol en algunos estados de la República. Los datos oficiales del Centro de Vigilancia Epidemiológica han notificado hasta la fecha 27 casos que han afectado a 132 personas, en todos los casos se asociaron al consumo de hígado de res.

El grupo de edad y sexo más afectado es el femenino, de 25 a 44 años. La Tabla 2 muestra el número de casos de intoxicación por clenbuterol reportado por el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, catalogados por entidad federativa (Gracia-López, 2002).

La presencia de clenbuterol en carne y vísceras de ganado bovino fue identificado como el responsable de varios casos de intoxicación alimentaria por el consumo principalmente de hígado. Debido al uso indiscriminado de clenbuterol en la alimentación de animales para el abasto público, como agente promotor del crecimiento que fomenta la hipertrofia muscular y reduce la producción de grasas en los animales; la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) emitió la Norma Oficial Mexicana de Emergencia, NOM-EM-015-ZOO-2002, especificaciones técnicas para el control del uso de β -agonistas en animales. En ella se prohíbe la producción, manufactura, fabricación, elaboración, preparación, importación, tráfico, acondicionamiento, transportación, comercialización, suministro y/o

Tabla 2. Intoxicaciones con Clenbuterol Asociadas al Consumo de Carne o Hígado de Bovino Reportadas en México.

| Entidad federativa | No. De Casos | No. de Personas |
|--------------------|--------------|-----------------|
| Jalisco | 15 | 67 |
| Distrito Federal | 4 | 21 |
| Estado de México | 3 | 17 |
| Hidalgo | 1 | 6 |
| Guanajuato | 2 | 9 |
| Querétaro | 1 | 11 |
| Michoacán | 1 | 1 |
| Total | 27 | 132 |

Fuente: García-López, 2002.

utilización de los siguientes principios activos como ingredientes activos, ingredientes alimentarios y/o medicamentos en formulación de productos alimenticios destinados para consumo y uso en animales (Tabla 3). Sin embargo, hace la excepción de aquellos productos β -agonistas que cuenten con registro y autorización de la SAGARPA. Además establece multas de mil a 30 mil salarios mínimos a quien administre clenbuterol a ganado destinado para consumo humano (NOM-EM-015-ZOO-2002).

Los productos que marcan la excepción y que cuentan con registro de la SAGARPA son los siguientes (García-López, 2002):

Zilmax: Cuyo principio activo es el zilpaterol, de laboratorios Hoechst Roussel, registrado desde 1997 (SAGARPA 0697-086), autorizado su empleo sólo en bovinos.

Paylean: que tiene como principio activo ractopamina, de laboratorios Elanco, registrado en el 2001 (SAGARPA Q1807-036), autorizado su empleo sólo en porcinos.

Tabla 3. β -Agonistas Prohibidos como Promotores de Crecimiento en México.

| | |
|---------------|---------------|
| Brombuterol | Mabuterol |
| Carbuterol | Orciprenalina |
| Cimaterol | Pirbuterol |
| Cimbuterol | Ractopamina* |
| Clenbuterol | Salbutamol |
| Fenoterol | Terbutalina |
| Isoproterenol | Zilpaterol* |

* Están permitidos.

Fuente: NOM-EM-015-ZOO-2002.

Métodos Analíticos de Detección para Clenbuterol

El uso ilegal de β -agonistas como sustancias promotoras de crecimiento en ganado vacuno destinado para consumo humano, subraya la necesidad de desarrollar sistemas propios de control, los cuales incluyen técnicas de alta sensibilidad y procesamientos adecuados de las muestras (Careri *et al.*, 2002).

Extracción y Purificación

A consecuencia de la prohibición del uso de β -agonistas como promotores de crecimiento en la Unión Europea, se requieren de métodos analíticos para detectar su uso ilegal. Estas nuevas estrategias se basan en la selectividad de los procesos de extracción, purificación y análisis de las muestras (Fiori *et al.*, 2002).

Los β -agonistas son compuestos polares que se extraen de matrices biológicas, empleando solventes acuosos u orgánicos. Para muestras líquidas, tales como orina y plasma, la materia suspendida puede ser removida por centrifugación o filtración (Boyd, *et al.*, 1996) y sus extractos son tratadas con enzimas como la β -glucoronidasa-sulfatasa para facilitar su hidrólisis (Botsoglou y Fletouris, 2001).

Las muestras sólidas, tales como el hígado y músculo requieren de tratamientos más intensos. Para asegurar la extracción máxima de los analitos, la muestra es homogenizada en agua, ácido o buffer acuosos, seguido de la centrifugación. El sobrenadante puede ser tratado de varias maneras, puede ser acidificado o alcalinizado o tratado con solventes orgánicos para la remoción de la grasa, o también puede ser tratado con enzimas (proteasas) para facilitar la digestión (Boyd *et al.*, 1996).

Existen varios métodos para la extracción del clenbuterol y otros β -agonistas en los que se incluye: matriz de dispersión en fase sólida (MDFS), extracción en fase sólida (EFS), cromatografía de inmunoafinidad (CIA) y extracción líquido-líquido (ELL) con extracción en fase sólida (EFS) (Collins y O'keeffe, 1994; Polettini *et al.*, 1995). Guy *et al.* (1999) y Botsoglou y Fletouris (2001) indicaron que estos métodos se pueden combinar para mejorar eficientemente la purificación de los extractos.

Las técnicas convencionales para el análisis de residuos en tejido inician con la etapa de homogeneización, seguido por extracción y purificación de la muestra. Estos procesos son muy laboriosos y requieren de varios pasos para la purificación del analito. Por lo que el uso de matrices de extracción en fase sólida es una alternativa, ya que la extracción y purificación pueden realizarse simultáneamente. Estas técnicas presentan ventajas económicas al reducir los tiempos de proceso y minimizar el uso de solventes. La extracción en matriz de dispersión en fase sólida (MDFS) es un ejemplo de ésta (Horne, 1998). Crescenzi *et al.* (2001) combinaron MDFS con extracción molecular impresa en fase sólida (MISPE, por sus siglas en inglés), y analizaron β -agonistas por cromatografía líquida de alta resolución con detección electroquímica y espectrometría de masa (LC/ECD/MS). El límite de detección determinado fue de 0.4 ng/g y la recuperación fue del 90%.

Fiori *et al.* (2002) compararon diferentes columnas de extracción en fase sólida como las de intercambio iónico con cianopropil (CN), resinas de intercambio catiónico (SXC), mezclas de fases (MPH)/(C8+SXC) y C₁₈ (C₁₈NE). Esta última columna es capaz de purificar los β -agonistas que se encuentran en concentraciones menores de 0.5 ppb y con un 93% de recuperación. Para esta determinación se usó la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (CG-MS), como método de detección.

Guy *et al.* (1999) concluyeron que la purificación en columnas de C₁₈ y resina de intercambio catiónico (SCX), evitan el uso de columnas de inmunoafinidad. El empleo de columnas de inmunoafinidad proporciona extractos de gran pureza, pero son muy costosas para análisis de rutina.

La cromatografía de inmunoafinidad (CIA) también es muy valiosa para aislar y purificar muestras para el análisis de residuos; aunque se ha reportado que una concentración insuficiente de anticuerpos o de baja actividad es una limitante (Brambilla *et al.*, 1998). Estas técnicas exploran interacciones anticuerpo-antígeno para aislar selectivamente los analitos de mezclas complejas. Crescenzi *et al.* (2001) utilizaron una columna de inmunoafinidad con α -ácido-glucoproteína para la purificación de adrenérgicos en muestras de orina. Los extractos fueron derivatizados y analizados por cromatografía de gases espectrometría de masas-masas (GC-MS/MS) con ionización química positiva. Los resultados indicaron que la columna de inmunoafinidad con α -ácido-glucoproteína fue efectiva en la purificación de β -agonistas. Esto se debió a su capacidad de carga dando lugar a una mayor concentración (0.2 g/mL) del analito.

La aplicación de muestras preparadas antes de un inmunoensayo puede reducir interferencias en la matriz y concentrar los analitos de interés. Haasnoot *et al.* (2002) desarrollaron un método de inmunofiltración (IF) que fue aplicado para purificar las muestras en combinación con un ELISA. Con este acoplamiento (IF-ELISA), se encontraron concentraciones entre 0.14 y 0.21 ng/mL, por debajo del límite máximo de detección y un 77% de recuperación. Collins y O'keeffe (1994) presentaron un método en donde combinan extracción líquido-líquido y extracción en fase sólida. La ventaja de ésta técnica es la alta recuperación de varios β -agonistas de manera rápida. Las concentraciones

reportadas por este método, para clenbuterol en orina e hígado son de 0.13 ng/mL y 0.46 ng/g, respectivamente.

Métodos Analíticos

La utilización de β -agonistas en forma ilegal requiere del desarrollo de procedimientos analíticos capaces de detectar y confirmar un gran número de β -agonistas de manera simultánea (Kulper *et al.*, 1998). Después de los procesos de extracción y purificación, los β -agonistas pueden ser detectados por diversas técnicas. Entre las principales se incluyen inmunoensayos, cromatografía de gases (GC), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y estas dos últimas con sus modalidades con acoplamiento a espectrometría de masa (MS) (González *et al.*, 1997).

Métodos Inmunológicos. Se han publicado y discutido algunos métodos inmunoquímicos para determinar la presencia de estas drogas en matrices biológicas. En los laboratorios, la estrategia más común para el análisis de residuos de β -agonistas, se basan en ensayos inmunoquímicos que tienen la ventaja de ser rápidos, sensibles, específicos, económicos y de fácil manejo. Los métodos utilizados más frecuentemente son: Radioinmunoanálisis (RIA, por sus siglas en inglés), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA, por sus siglas en inglés) e inmunoensayo absorbente (EIA, por sus siglas en inglés) (Hogendoorn y Zoonen, 1998).

Una de las primeras metodologías desarrolladas para la identificación y cuantificación de β -agonistas fue el radioinmunoanálisis (RIA), reportado por Kopitar y Zimmer para estudios farmacológicos de clenbuterol en tejido animal (Boyd *et al.*, 1996). Esta es una técnica altamente sensible, por lo que permite medir compuestos a muy bajas concentraciones; el límite de detección

reportadas por este método, para clenbuterol en orina e hígado son de 0.13 ng/mL y 0.46 ng/g, respectivamente.

Métodos Analíticos

La utilización de β -agonistas en forma ilegal requiere del desarrollo de procedimientos analíticos capaces de detectar y confirmar un gran número de β -agonistas de manera simultánea (Kuiper *et al.*, 1998). Después de los procesos de extracción y purificación, los β -agonistas pueden ser detectados por diversas técnicas. Entre las principales se incluyen inmunoensayos, cromatografía de gases (GC), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y estas dos últimas con sus modalidades con acoplamiento a espectrometría de masa (MS) (González *et al.*, 1997).

Métodos Inmunológicos. Se han publicado y discutido algunos métodos inmunoquímicos para determinar la presencia de estas drogas en matrices biológicas. En los laboratorios, la estrategia más común para el análisis de residuos de β -agonistas, se basan en ensayos inmunoquímicos que tienen la ventaja de ser rápidos, sensibles, específicos, económicos y de fácil manejo. Los métodos utilizados más frecuentemente son: Radioinmunoanálisis (RIA, por sus siglas en inglés), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA, por sus siglas en inglés) e inmunoensayo absorbente (EIA, por sus siglas en inglés) (Hogendoorn y Zoonen, 1998).

Una de las primeras metodologías desarrolladas para la identificación y cuantificación de β -agonistas fue el radioinmunoanálisis (RIA), reportado por Kopitar y Zimmer para estudios farmacológicos de clenbuterol en tejido animal (Boyd *et al.*, 1996). Esta es una técnica altamente sensible, por lo que permite medir compuestos a muy bajas concentraciones; el límite de detección

reportado en tejido fue de 0.125 ng/g (Flores *et al.*, 2002). Collins y O'keeffe (1994) también describieron un método para identificar multiresiduos de 4 β -agonistas (clenbuterol, salbutamol, mabuterol y terbutalina) usando un radioinmunoanálisis (RIA) como método de determinación. Debido a que puede detectar un rango amplio de residuos de β -agonistas presentes en las muestras, el radioinmunoanálisis puede ser usado como método rápido de rutina (Haughey *et al.*, 2001). Sin embargo se requiere contar con la disponibilidad del anticuerpo marcado y equipo analítico específico (Flores *et al.*, 2002).

Otra prueba inmunológica disponible es ELISA, la cual es usada exitosamente en varios países. Actualmente se dispone de una gran cantidad de kit comerciales para realizar inmunoensayos. Estos kits, fueron diseñados para clenbuterol, pero presentan reactividad cruzada al detectar otros β -agonistas (salbutamol, mabuterol, mapenterol, cimaterol, bromobuterol y terbutalina) lo cual conduce a falsos positivos. Los métodos inmunoquímicos de detección solamente muestran especificidad por una sustancia o sustancias muy similares, pero no proporcionan la identidad química del analito (Wicker *et al.*, 1995).

Ramos *et al.* (1998) demostraron que el método de ELISA es un método rápido de detección. Los resultados confirmaron que el clenbuterol sigue siendo el β -agonista más usado ilegalmente para promover el crecimiento en ganado bovino. El límite mínimo de detección es de 12.5 ppt y no requieren de un equipo sofisticado para su implementación en el laboratorio (Urquidez, 2001).

El método de ELISA tiene la ventaja de que se pueden manejar un elevado número de muestras, lo que repercute en la disminución del precio por muestra analizada. Es un método muy sensible, rápido y de fácil manejo y requiere de inversión mínima de equipo, materiales y reactivos. La principal

desventaja ha sido la reactividad cruzada con otros miembros de la misma familia química lo cual conduce a falsos positivos (Flores *et al.*, 2002).

Haasnoot *et al.* (1990) desarrollaron un inmunoensayo absorbente (EIA) para detectar clenbuterol en plasma. Posteriormente fue desarrollado un método (EIA) para detectar ractopamina en orina (Haasnoot *et al.*, 1994). Este método es sensible y rápido, y puede ser usado como método de rutina para el análisis de clenbuterol y ractopamina. El tiempo máximo de corrida del ensayo es de 35 min, por lo que se puede determinar un gran número de muestras en corto tiempo ya que no requiere de procedimientos de extracción y purificación de muestras (Blass *et al.*, 1997).

Técnicas Confirmativas. Los métodos por inmunoensayos son muy útiles como pruebas preliminares para el análisis de rutina de β -agonistas, sin embargo, se requieren de procedimientos confirmatorios para la identificación inequívoca. La detección con espectrometría de masa (MS) es un método confirmatorio, ya que proporciona la información estructural del analito y provee la identificación inequívoca de la sustancia detectada (O'Keeffe, 1999). Las aplicaciones típicas en análisis de residuos son interfazando una separación cromatográfica con un detector de MS. Esta interfase puede ser por vía presión atmosférica (APCI), electro-atomización (ESI), impacto electrónico (EI) o ionización química (CI); estos dos últimos son los más utilizados para el análisis confirmatorio de β -agonistas (Visser *et al.*, 1994; Boyd *et al.*, 1996).

Un espectrómetro de masas es un equipo analítico que determina el peso molecular del compuesto químico por separación de los iones moleculares conforme a su relación masa carga (m/z). Los iones son generados por inducción, es decir por la pérdida o ganancia de una carga. El resultado de la

ionización, separación del ión y detección produce un espectro de masas característico (Siuzdak, 1996).

Un espectrómetro puede ser dividido en tres partes fundamentales: fuente de ionización, analizador y detector. La muestra se introduce en la fuente de ionización del instrumento, una vez dentro, la molécula es ionizada, y por último estos iones son llevados hacia la región del analizador de masas, donde son separados de acuerdo a su relación masa/carga (m/z). Estos iones separados son detectados y la señal se envía a un sistema de datos donde la relación m/z es graficada en función de la abundancia relativa de cada ión, generándose lo que se denomina un espectro de masas (Sánchez y Granda, 2003). La Figura 5 ilustra los componentes básicos de un espectrómetro de masas.

Los espectrómetros de masa cuadrupolo y los de trampa de iones son los que más se utilizan en el análisis de drogas de abuso. La cromatografía de gases acoplada a cualquiera de los dos espectrómetros, trabajando en modo "full scan" con impacto electrónico, identifica drogas y sus metabolitos presentes en matrices biológicas y no biológicas (Sánchez y Granda, 2003).

Debido a que hay compuestos que tienen estructuras muy similares, la primera aplicación de la espectrometría de masas (MS) no es suficiente. Por lo tanto se recomienda la fragmentación del compuesto por espectrometría de masas en tandem o MS/MS para una mayor confiabilidad o validación de la confirmación de la identidad del analito (Careri *et al.*, 2000; Flores *et al.*, 2002).

Para la determinación de β -agonistas, la MS/MS ofrece ventajas sobre un simple MS. La MS/MS proporciona la discriminación entre los analitos en

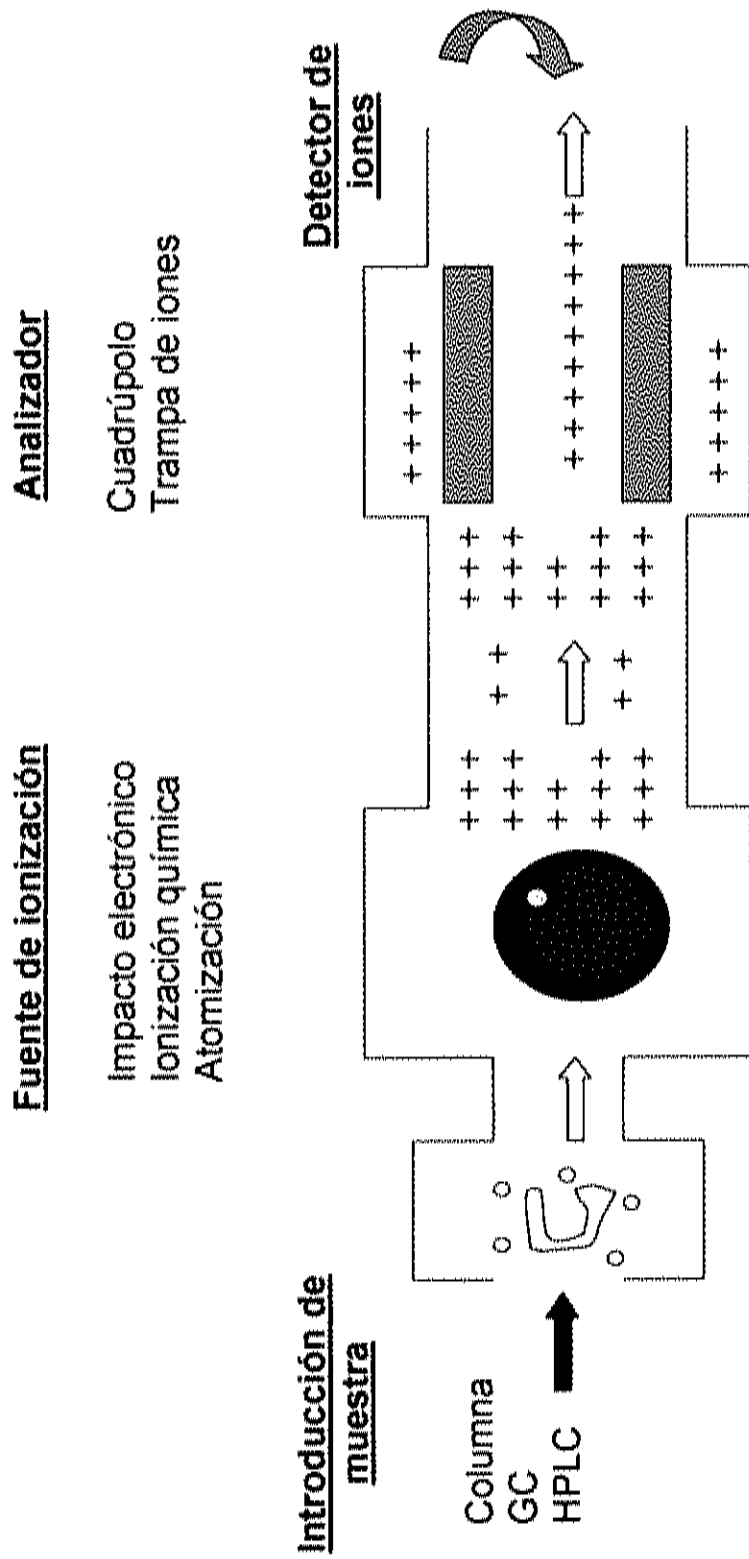


Figura 5. Componentes de un Espectrómetro de Masas (Ziuzdak, 1996).

base a las propiedades cromatográficas de detección (tiempo de retención) de los iones padres, MS_1 , y los iones hijos, MS_2 (De Wasch *et al.*, 1998).

La espectrometría de masas en tandem consiste en obtener un segundo espectro de masas a partir del primero, o sea después de la fragmentación de una molécula, es necesario volver a fragmentar de nuevo para que se formen nuevos fragmentos o se intensifiquen algunos de los ya existentes. A partir de un denominado ión padre o ión precursor obtenido de la primera fragmentación (Figura 6), se obtienen los denominados iones hijos o iones productos. Esta segunda fragmentación se lleva a cabo a través de la denominada disociación mediante colisión inducida.

Se han descrito varios métodos analíticos para la confirmación de residuos de β -agonistas en tejido animal y en fluidos corporales. Para la identificación de estos compuestos, se pueden emplear los métodos de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y/o la cromatografía de gases (GC), ambas acopladas a espectrometría de masas (Guy *et al.*, 1999).

Un prerrequisito del análisis de β -agonistas por GC-MS es la derivatización de los grupos polares funcionales (-OH, -NH₂) en la molécula (Hogendoorn y Zoonen, 1998; Guy *et al.*, 1999). Los sililderivativos son los más utilizados; un procedimiento típico de sililación fue descrito por Furst *et al.* (1989). García-Regueiro *et al.* (1993) extrajeron salbutamol y clenbuterol utilizando extracción en fase sólida para purificar los extractos analizados por GC-MS. Los compuestos fueron derivatizados con bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA). Whaites y Murby (1999) desarrollaron una metodología por GC-MS para la determinación de clenbuterol en orina utilizando un di-trimetilsilil derivativo (MSTFA) a 60°C.

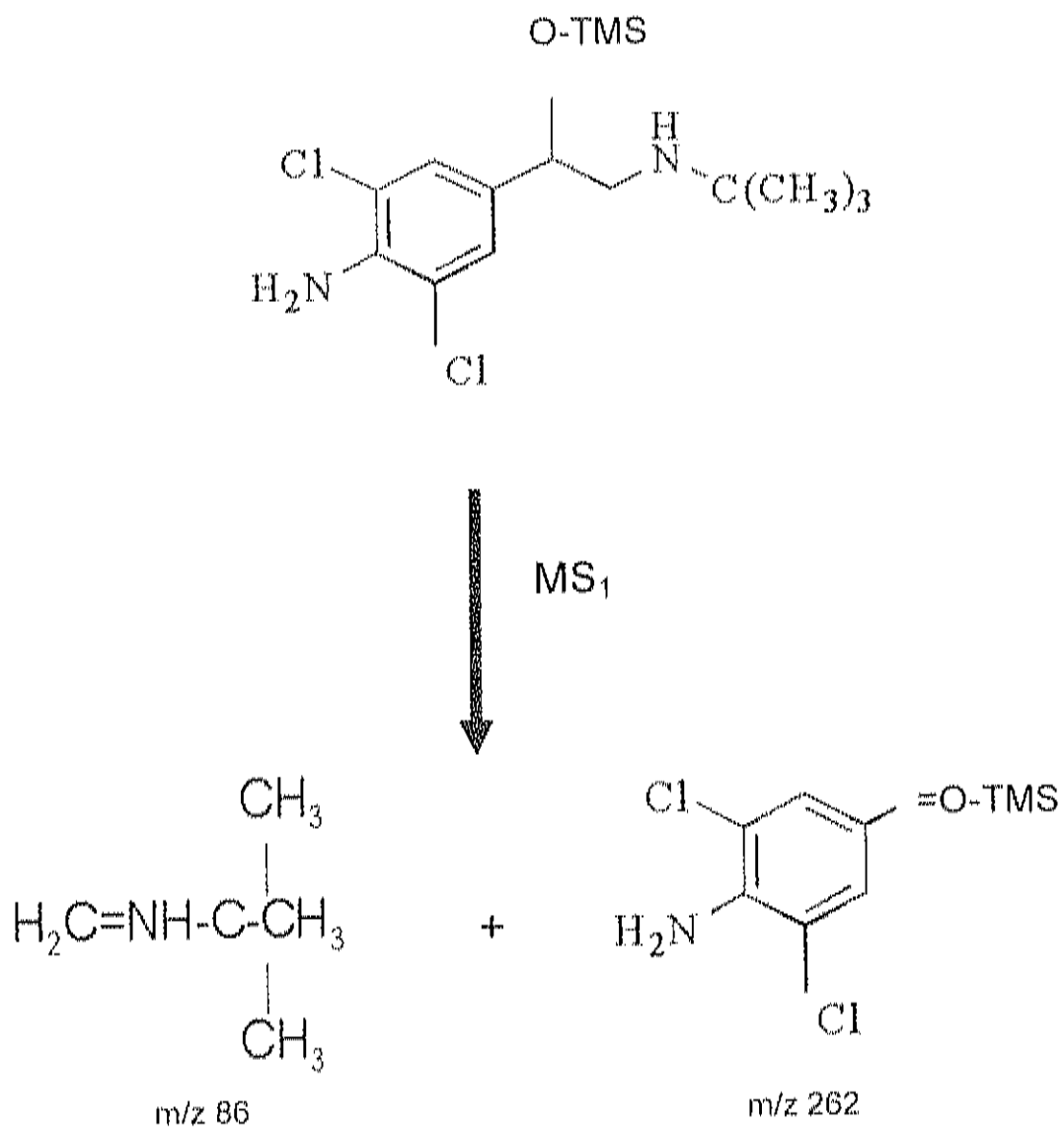


Figura 6. Fragmentación del Clenbuterol por GC-MS (Fente *et al.*, 1999).

Fiori *et al.* (2002) desarrollaron un procedimiento por cromatografía de gases y espectrometría de masas/masas, para confirmar la presencia de clenbuterol y verificar la eficiencia del procedimiento de purificación de muestras de hígado en columnas de C₁₈. Fente *et al.* (1999) realizaron confirmaciones por cromatografía de gases con espectrometría de masas con impacto electrónico (EI), para detectar clenbuterol (5 ng/g) en pelo de bovino. En el mismo año, Whaites y Murby (1999) demostraron que el método puede detectar la presencia de clenbuterol en orina de bovino en ppb (0.1 ng/mL). González *et al.* (1997) también desarrollaron un método de GC-MS después de extraer muestras de hígado por diálisis. La técnica presentó un límite de detección de 250 ppt en hígado.

La cromatografía líquida se ha utilizado como método de separación de residuos de β -agonistas en ganado bovino. Su aplicación es limitada por la deficiente sensibilidad y selectividad de los detectores por ultravioleta, electroquímica o fluorescencia para el análisis de residuos (Poletini *et al.*, 1995; Guy *et al.*, 1999).

La cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas (LC/MS), permite la identificación de β -agonistas sin la necesidad de derivatizar (Elliott, 1998; Guy *et al.*, 1999). Este método unido a ionización con electroatomización (ESI) y ionización química a presión atmosférica (APCI), se utiliza para identificar el ión padre (M+H)⁺ de los β -agonistas. Sin embargo para una identificación inequívoca del analito, es necesaria la fragmentación del compuesto, es decir, es necesario realizar masas/masa, MS/MS (De Wasch *et al.*, 1998).

De Wasch *et al.* (1998), utilizaron cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con ionización por atomización (LC/ESIMS/MS) para

identificar cuatro β -agonistas y cuantificar clenbuterol en hígado. Guy *et al.* (1999) también monitorearon clenbuterol en productos cárnicos e hígado por (LC/EISMS/MS), encontrando límites de detección de 10 ng/kg.

MATERIALES Y METODOS

Recolección de Muestras

Se realizaron tres muestreos completamente al azar en el mercado de la localidad. Las muestras de carne de bovino (pulpa negra y molida) obtenidas fueron de 9 centros comerciales en tres muestreos, haciendo un total de 50 muestras. El primero y segundo muestreos fueron realizados en Septiembre y Octubre del 2002. El tercer muestreo fue realizado en Agosto del 2003. Las muestras fueron congeladas a -20 °C hasta su análisis.

Reactivos

El estándar de clenbuterol, el fosfato de potasio monobásido anhidro, el ácido perclórico, el agente derivatizante bis(trimetilsilil)trifluoro-acetamida (BSTFA), ácido fórmico, acetato de etilo, metanol y n-heptano, fueron obtenidos de Sigma (St. Louis, Mo, USA). El tris-buffer (hidroximetil) aminometano fue obtenido de Bio-Rad (Richmond, CA, USA). El kit de ELISA para clenbuterol y las columnas C18 fueron de RIDASCREEN[®] (R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany). El hidróxido de sodio y el ácido clorhídrico fueron de Merck (Darmstadt, Germany). Todos los solventes fueron grado HPLC.

Preparación de Estándares

Solución Madre de Clenbuterol (1 mg/mL)

Se transfirieron 10 mg de clenbuterol a un matraz volumétrico de 10 mL, aforándolo con agua destilada y adicionando 2 gotas de ácido fórmico 0.1 M para proporcionarle estabilidad al compuesto. Esta solución puede ser almacenada bajo refrigeración durante 2 meses.

Solución Intermedia de Clenbuterol (10 µg/mL)

Se transfirió 1 mL de la solución madre a un matraz volumétrico de 100 mL, aforándolo con agua destilada.

Solución de Trabajo de Clenbuterol (0.1 µg/mL)

Se transfirió 1 mL de solución intermedia a un matraz volumétrico de 100 mL, aforándolo con metanol. La solución de trabajo fue preparada diariamente a diferentes concentraciones.

Análisis por ELISA

Procedimiento de Extracción de la Muestra

5g de muestra de carne se depositaron en un tubo para centrifuga de 50 mL y se homogenizaron con 25 mL de 50 mM tris-buffer (trishydroximethylaminometano, a pH 8.5) por 30 min. Al tubo se le añadieron 15 mL de n-heptano y fue agitado por 5 min para desgrasar la muestra. Posteriormente se centrifugó por 5 min a 5000 rpm a 4°C. La capa superior de heptano fue

removida juntamente con la capa intermedia de grasa, usando una pipeta pasteur. El proceso de extracción con heptano fue repetido una vez más con otros 15 mL. Al homogenizado acuoso se le adicionaron 0.5 mL de HCl concentrado, agitándolo por 1 hr. Después fueron tomados 6 g del homogenizado de carne y depositados en un vial, centrifugándolo por 15 min a 5000 rpm a 4°C. El sobrenadante fue transferido a otro vial, conteniendo 300 µL de NaOH 1M, mezclándolo por 15 min con 4 mL de KH₂PO₄-buffer 500 mM, pH 3. El tubo fue almacenado a 4°C por 16 h (R-biopharm, 2002).

Procedimiento de Purificación de la Muestra

La columna C₁₈ fue primeramente lavada con 3 mL de metanol (100%). Después de que el metanol fue eluido, la columna fue equilibrada con 2 mL de solución de KH₂PO₄-buffer 50 mM a pH 3. Después la muestra fue pasada a través de la columna y lavada con 2 mL de solución buffer de KH₂PO₄ (50 mM, pH 3). La muestra fue eluida con 1 mL de metanol (100%). El eluyente fue evaporado completamente a una temperatura entre 50 y 60°C con corriente de nitrógeno, y el residuo seco fue redisolto en 0.4 mL de agua destilada. Alícuotas de 20 µL del extracto fueron usadas en el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) (R-biopharm, 2002).

Análisis de Clenbuterol

El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) del kit fue usado para el análisis de clenbuterol. La reactividad cruzada del anticuerpo con los diferentes compuestos como fue proporcionada por el proveedor se muestra en la Tabla 4.

100 µL de solución del anticuerpo diluido (400 µL del anticuerpo anti-clenbuterol + 4 mL buffer) fueron añadidos a cada pozo del microplato e incubados por 15

Tabla 4. Reactividad Cruzada del Anticuerpo Clenbuterol con Diferentes Compuestos.

| Compuesto | Reactividad cruzada (%) |
|---------------|-------------------------|
| Clenbuterol | 100.0 |
| Brombuterol | 150.0 |
| Terbutalina | 10.0 |
| Salbutamol | 10.0 |
| Cimaterol | 6.0 |
| Mabuterol | 86.0 |
| Carbuterol | 4.0 |
| Isoproterenol | <0.1 |
| Adrenalina | <0.01 |
| Noradrenalina | <0.01 |

Fuente: R-biopharm, 2002.

min a temperatura ambiente en la oscuridad. Posteriormente, a cada pozo se le añadieron 20 µL de solución estándar de clenbuterol (0, 100, 300, 900, 2700 y 8100 ng/L) y 20 µl del extracto de la muestra. A cada pozo se le añadieron 100 µL de solución del conjugado enzimático (peroxidasa conjugada anti clenbuterol) y el microplato fue incubado por 30 min a temperatura ambiente. Los residuos del conjugado enzimático fueron removidos vertiendo el microplato en un papel absorbente, seguido de 3 lavados con 250 µl de agua destilada. Al finalizar los lavados 100 µl del substrato (urea peróxido) y cromógeno (tetrametilbenzidina) fueron adicionados a cada pozo. El contenido fue mezclado manualmente e incubados por 15 min a temperatura ambiente bajo oscuridad. Después, 100 µl de solución paralizadora de la reacción (ácido sulfúrico 1 M) fueron añadidos a cada pozo, el contenido fue mezclado cuidadosamente y la absorbancia fue leída en el lector de micro-placa de ELISA (OPSYSMR-DYNEX Technologies, USA) a 450 nm (R-biopharm, 2002). Todos los análisis se realizaron por duplicado.

Análisis de Datos.

Los datos se analizaron con el programa computacional RIDAWIN ELISA (R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany) conectado al lector de ELISA que promedia los duplicados, da la desviación estándar de la lectura y ajusta la curva de calibración. Los valores medios de la absorbancia obtenidos de los estándares y de las muestras, son divididos por el valor de la absorbancia del estándar cero y multiplicado por 100. El estándar cero representa el 100% y los valores de las absorbancias son representadas en porcentajes:

$$\frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del estándar cero}} \times 100 = \% \text{absorbancia}$$

Los valores de las absorbancias calculadas de los estándares son graficados contra la concentración de clenbuterol en ng/kg (ppt).

Recuperación del Método

Muestras de carne (5g) que resultaron negativas por la prueba de ELISA, fueron fortificadas con solución metanólica de clenbuterol en niveles de 1, 2, 3 y 6 ppb para verificar la exactitud del método (Sawaya *et al.*, 2000).

Análisis por Cromatografía de Gases

Procedimiento de Extracción de la Muestra

La extracción de la muestra se realizó por la técnica reportada por R-Biopharm (2002) del kit de ELISA con modificaciones. Se homogeneizó 1 g de muestra con 1 mL tris-buffer 50 mM (trishydroxymethyl-aminomethane, pH 8.5) utilizando un homogenizador Ultraturax a máxima velocidad, por 2 min. A este homogenizado contenido en un tubo para centrifuga de 50 mL de polipropileno, se le añadieron 2 mL de n-heptano. Esta suspensión fue mezclada utilizando un vortex por 2 min y centrifugada a 10000 rpm por 15 min a 4°C. La capa superior de heptano fue removida juntamente con la capa intermedia de grasa, usando una pipeta pasteur. El proceso de extracción con heptano fue repetido una vez más con otros 2 mL. Al homogenizado acuoso se le adicionaron 0.5 mL de ácido perclórico concentrado, agitándolo por 20 min y centrifugándolo por 15 min a 10,000 rpm a 4°C. El sobrenadante fue transferido a otro vial, conteniendo 300 µL de NaOH 10 M, se mezcló por 5 min y se añadieron 4 mL de buffer de KH₂PO₄ 500 mM, a pH 3. Se ajustó el pH de la muestra a 6 y esta fue almacenada a 4°C por 1h.

Purificación en Columna de C₁₈

La columna fue primeramente acondicionada con 6 mL de metanol al 100%. Después de que el metanol fue eluido, la columna se equilibró con 2 mL de buffer de fosfato 1.0 M (KH₂PO₄; pH=3). El extracto previamente obtenido fue eluido a través de la columna la cual fue lavada con 2 mL de buffer de fosfato 1.0 M (KH₂PO₄; pH=6). El clenbuterol fue eluido con 1.5 mL de metanol (Sawaya *et al.*, 2000). El extracto fue colocado en un vial de derivatización y concentrado hasta sequedad bajo flujo continuo de nitrógeno a 45°C.

Proceso de derivatización de la muestra

El residuo fue derivatizado con 100 µl de una mezcla de BSTFA (trimetilsilil-trifluoroacetamida) y acetato de etilo (1:1, v/v) y calentado a 70°C por 30 min (Haasnoot *et al.*, 2002). Después de que el proceso de derivatización fue completado, la muestra fue transferida a un vial para cromatografía y el solvente fue evaporado a 35°C bajo nitrógeno. El residuo fue disuelto en 25 µl de acetato de etilo, de los cuales 3 µl fueron inyectados en el cromatógrafo de gases en modo splitless (Fente *et al.*, 1999; Haasnoot *et al.*, 2002).

Identificación por GC-MS/ MS

El instrumento fue un cromatógrafo de gases CGQ plus de Finnigan (Thermo Quest, Italy) equipado con un automuestreador AS 2000 (Thermo Quest, Italy). El sistema cromatográfico fue interfaseado a un detector de masas Finnigan (Thermo Quest, Italy) con trampa de iones modelo 2000. La separación cromatográfica fue realizada en una columna capilar DB-5 de 15 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 µm (J & W Scientific, Folsom, CA, USA). Las condiciones de análisis fueron las siguientes: la temperatura inicial en el horno fue de 120°C por 0.1 min, después se aumentó la temperatura a 245°C a 15°C/min y se

mantuvo la temperatura por 1 min, seguido por un incremento hasta una temperatura final de 270°C a 30°C/min y mantenida por 5 min. El gas acarreador fue helio con una velocidad de flujo de 1 mL/min. La temperatura del inyector operado en modo splitless (1.85 min), de la línea de transferencia y del detector fueron de 280°C, 275 y 260°C, respectivamente. El análisis fue realizado en el modo de ionización en impacto electrónico. La temperatura de la fuente de iones fue de 200°C. El sistema fue operado en modo MS/MS, analizando el fragmento de la estructura molecular original obtenida del MS, y los fragmentos del ión precursor ($m/z = 262$) característico del clenbuterol (Ramos *et al.*, 1998). En la Tabla 5 se resumen las condiciones del GC-MS/MS.

Tabla 5. Condiciones para el Análisis por Espectrometría de Masas/Masas.

| | |
|--|---------------------------|
| Temperatura de la fuente de iones (°C) | 200 |
| Tiempo de inicio (min) | 4 |
| Modo de análisis | MS/MS; q=0.25 |
| Ión precursor | 262 |
| Ancho (m/z) | 4 |
| Energía de colisión (v) | 1.15 |
| Iones productos (m/z) | 188-192, 225-229, 262-264 |

RESULTADOS Y DISCUSION

Determinación de Clenbuterol en Carne de Bovino por ELISA

En este trabajo se utilizó un método de ELISA específico para clenbuterol de R-biopharm (2002). Las concentraciones de clenbuterol para construir la curva de calibración fueron de 0, 100, 300, 900, 2700 y 8100 ppt (partes por trillón). La curva de calibración mostró una relación logarítmica en el rango de concentraciones bajo estudio, con un coeficiente de determinación de $R^2 = 0.9997$ ($y = -18.396\text{Ln}(x)+184.68$) para el clenbuterol.

La recuperación de clenbuterol por la técnica de ELISA fue evaluada preparando muestras de carne fortificadas. Se observó una recuperación de 95-101 % en el rango de fortificación de 1000 a 3000 ppt (Tabla 6). Una recuperación de tan solo 43.5 % se observó para una fortificación con 6000 ppt. Se han reportado porcentajes de recuperación de clenbuterol determinados por ELISA que varían entre 44.8 y 80.5 % para orina (Sawaya *et al.* 2000; Haasnoot *et al.* 2002) y de 95% a 113% para hígado (Degand *et al.* 1992). El límite de detección establecido por el kit de ELISA específico para clenbuterol es de 100 ppt.

La reproducibilidad de la técnica fue buena, ya que los coeficientes de variación para los estándares de clenbuterol fueron menores a 1.5 % y para las muestras fueron menores a 2.42 %.

Se colectaron un total de 50 muestras de carne de bovino de nueve establecimientos diferentes siendo estas, 5 tiendas de autoservicio y 4 carnicerías. Las muestras fueron colectadas en tres ocasiones diferentes, el primer y segundo muestreo fueron realizados en el 2002 y el tercero en el 2003.

Tabla 6. Recuperación del Clenbuterol en Carne por ELISA (n=3).

| Concentración añadida (ppb) | Concentración promedio (ppb) | Recuperación (%) |
|-----------------------------------|------------------------------------|---------------------|
| 1.0 | 0.95 ± 0.21 | 95.0 |
| 2.0 | 2.023 ± 0.22 | 101.15 |
| 3.0 | 3.034 ± 0.02 | 101.20 |
| 6.0 | 2.612 ± 0.51 | 43.53 |

De las 50 muestras de carne de bovino colectadas del mercado local en tres ocasiones diferentes y analizadas por ELISA, 6 muestras (12 %) se encontraron contaminadas con clenbuterol (Tabla 7). Dos de las muestras analizadas presentaron concentraciones de 3000 ppt de clenbuterol y las cuatro restantes estuvieron en el rango de 5000 - 6000 ppt. De acuerdo a lo establecido por los laboratorios de SAGARPA, las muestras que se encuentren en concentraciones mayores o iguales a 2000 ppt de clenbuterol, son consideradas positivas. Las muestras que resultaron positivas fueron analizadas por GC-MS/MS para su confirmación.

En varios Estados de la República Mexicana, se han reportados casos de intoxicación por el consumo de alimentos de origen animal contaminados con residuos de clenbuterol. Esto ha provocado la verificación de la carne e hígado en los puntos de venta y en los rastros, mediante muestreos y análisis en los laboratorios de Salud Pública. La técnica utilizada en todos estos casos ha sido ELISA, sin embargo los resultados no han sido confirmados por espectrometría de masas-masas como fue recomendado por la Comunidad Económica Europea (Boyd *et al.*, 1996; Kuiper *et al.*, 1998; De Boer *et al.*, 1999).

Los resultados obtenidos en otros Estados y ciudades de la República presentaron un mayor número de muestras positivas, ya que en Guanajuato se encontró un 16.61 %, en Michoacán un 14.46 % y en Guadalajara un 68.9 % en el 2002 (Zenteno y Montero, 2002). Para el 2003, se registró una disminución de muestras positivas en el Estado de Jalisco, ya que solo fue del 5.3% (Maldonado, 2003).

Un comportamiento similar se observó en este estudio ya que las muestras positivas se presentaron en el primer y segundo muestreo que fueron realizados en los meses de Septiembre y Octubre del 2002. Sin embargo para

Tabla 7. Concentración de Clenbuterol en Carne de Bovino (ELISA).

| Muestras No. | 1er. Muestreo (ppt) | 2do. Muestreo (ppt) | 3er. Muestreo (ppt) |
|-----------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Pulpa negra | | | |
| 1 | < LD | 415.3 | 459.6 |
| 2 | < LD | 399.6 | 923.1 |
| 3 | 137.0 | 401.8 | 472.9 |
| 4 | 112.4 | 3511.5* | 975.5 |
| 5 | 288.8 | 334.6 | < LD |
| 6 | 247.5 | 332.7 | 401.4 |
| 7 | 6124.7* | 378.2 | 1311.0 |
| 8 | 5524.5* | 517.6 | 433.5 |
| 9 | ND | ND | 861.4 |
| Carne molida | | | |
| 10 | 106.9 | 806.4 | 433.5 |
| 11 | 228.4 | 664.9 | 539.7 |
| 12 | < LD | 1303.8 | 928.3 |
| 13 | < LD | 1829.9 | 275.4 |
| 14 | 205.0 | 1556.1 | 314.9 |
| 15 | 413.0 | 135.5 | < LD |
| 16 | 5071.1* | 641.3 | < LD |
| 17 | 5044.3* | 3068.7* | 423.8 |
| 18 | ND | ND | 124.8 |

ND= No determinado; * Muestras positivas; LD= Límite de detección.

el 2003 todas las muestras colectadas de los mismos puntos de venta fueron negativas. Esta notable disminución en muestras positivas podría deberse a la emisión de la norma de emergencia NOM-EM-015-ZOO-2002 de SAGARPA y a la verificación realizada por la SAGARPA y la Secretaría de Salud.

Las concentraciones de clenbuterol en las muestras de carne que resultaron positivas en este trabajo se encontraron en el rango de 3.069 a 6.125 $\mu\text{g/L}$ (3069 a 6125 ppt), que fueron mucho más bajas que las reportadas en diferentes estudios (Maistro *et al.*, 1995; Brambila *et al.*, 1997; Sporano *et al.*, 1998). Concentraciones en carne comercial implicadas en intoxicaciones humanas en España fueron de aproximadamente 800 a 7400 $\mu\text{g/L}$ (Soprano *et al.*, 1998; Smith, 2000).

El uso de clenbuterol como promotor de crecimiento en ganado no está permitido ni en México ni en la Comunidad Económica Europea. De acuerdo a la WHO y al Comité Mixto de la FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios los límites máximos de clenbuterol son de 200 ppt para músculo y 600 ppt para hígado (Guy *et al.*, 1999; Smith, 2000; Sumano *et al.*, 2002). En base a estos límites, las muestras analizadas se encuentran por arriba de lo permisible.

Es importante resaltar que en el transcurso del 2003, la Comisión Estatal de la Carne de Sonora y los laboratorios de la Secretaría de Salud Pública, realizaron 824 análisis de clenbuterol en hígado al momento del sacrificio. Las muestras todas provenientes de ganado de engordadores de Sonora fueron negativas, por lo que se podría asegurar que la carne producida en Sonora se encuentra libre de clenbuterol (López Montaña, Comunicación Personal, 2003). Sin embargo, parte (40 %) de la carne que se comercializa en Sonora puede proceder de otros Estados de la República o del extranjero (López Montaña, Comunicación Personal, 2003). Por lo que para proteger la salud de los

consumidores en Sonora, es necesario no solo muestrear y analizar la carne de los engordadores de Sonora, sino que también es necesario exigir la certificación libre de clenbuterol de carnes introducidas al Estado.

Confirmación por GC-MS/MS

Para la identificación y confirmación del clenbuterol en carne de las muestras positivas por ELISA, los extractos acuosos de las muestras fueron analizadas por cromatografía de gases y espectrometría de masas/masas (GC-MS/MS) por ionización con impacto electrónico. El ión precursor de clenbuterol fue primeramente identificado en modo "SIM" por GC-MS, para posteriormente someterlo al análisis secuencial de MS/MS. El ión precursor y el espectro de masas característico del clenbuterol se observan en la Figura 7. El espectro fue obtenido de una solución estándar de clenbuterol (10 µg/L).

El clenbuterol fue derivatizado con *N*, *O*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA), para formar un mono-trimetilsilil derivativo (TMS) el cual dió un ión precursor de $m/z = 262$ (Figura 7). Este ión molecular fue seleccionado como el ión padre para el análisis por MS/MS. La Figura 8 muestra el cromatograma y espectro de masas/masas obtenido de una solución estándar de clenbuterol (3 µg/L). Los productos de la fragmentación por MS/MS fueron los iones con $m/z = 188, 190$ y 225 (Figura 8).

Se han empleado una gran variedad de agentes derivatizantes en el análisis del clenbuterol por cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC/MS) (Fente *et al.*, 1999; Amendola *et al.*, 2002; Haasnoot *et al.*, 2002). Entre estos se encuentra el BSTFA, que produce TMS derivados que

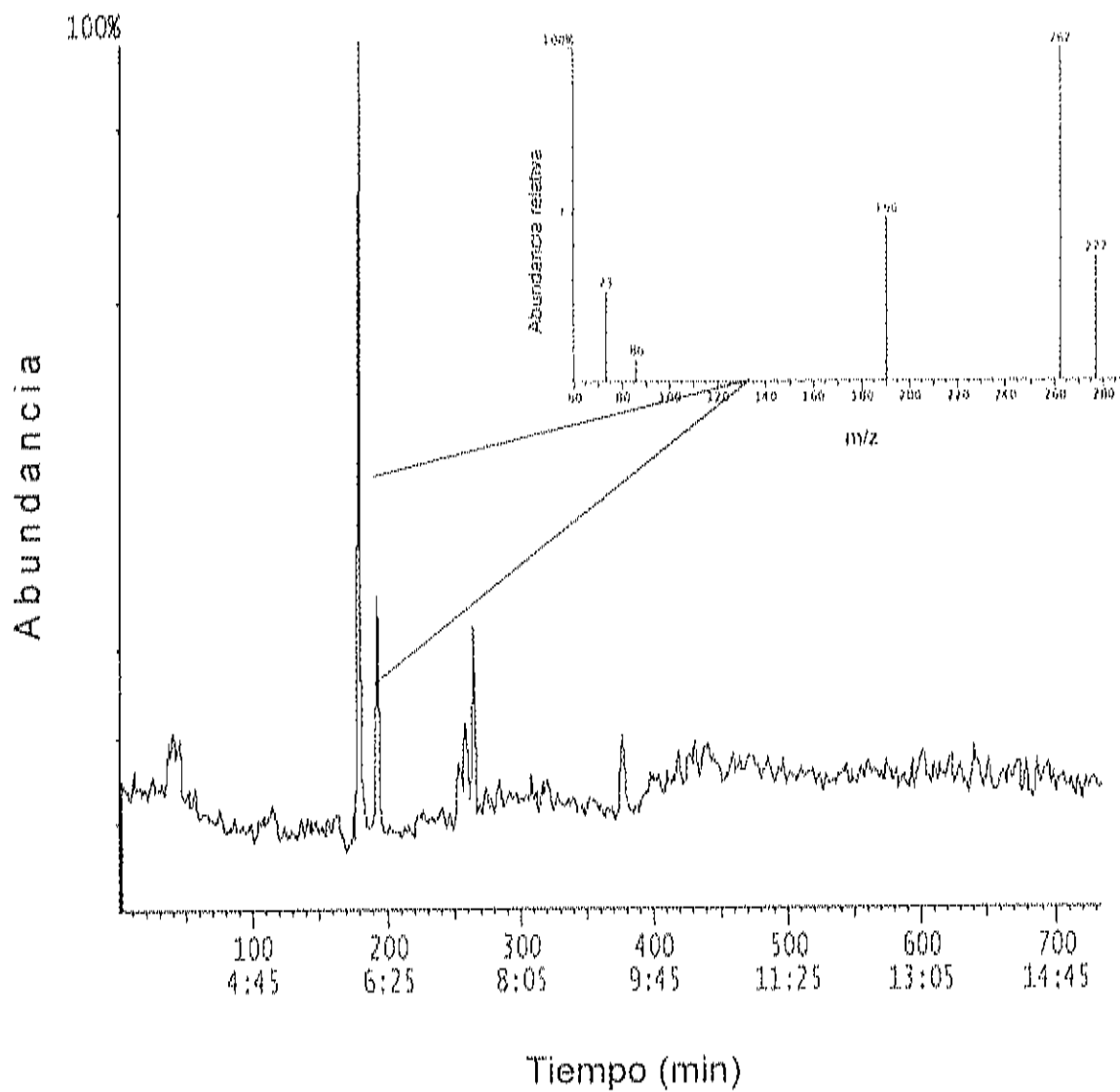


Figura 7. Cromatograma y Espectro de Masas del Estándar de Clenbuterol (10 ppb) Analizado por GC-MS en Modo SIM (m/z 73, 86, 190, 262 y 277).

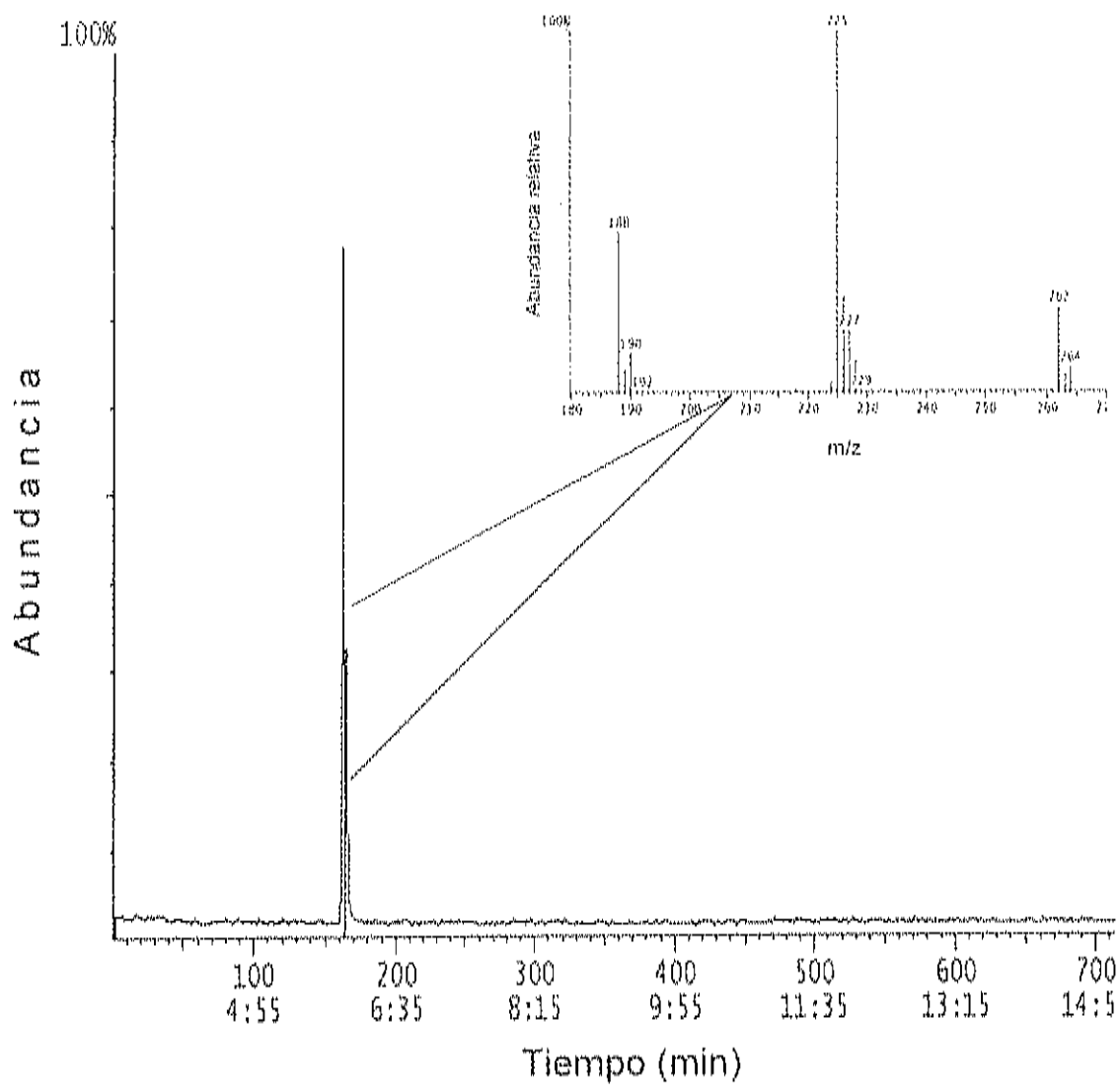


Figura 8. Análisis del Clenbuterol por GC-MS/MS y su Iones Productos $m/z = 188, 190$ y 225 (Precursor $m/z = 262$).

presentan la ventaja de ser estables y evitan la degradación de la columna cromatográfica y es por esto, que son los más utilizados (Whaities *et al.*, 1999). La estructura del clenbuterol con su TMS derivativo y los iones característicos ($m/z= 86, 188, 225$ y 262) se muestran en la Figura 9.

Un cromatograma típico de una muestra de carne negativa para clenbuterol analizada por GC-MS/MS muestra la ausencia del pico de clenbuterol en el tiempo de retención de 5.3 min (Figura 10). Un cromatograma típico de una muestra de carne fortificada con 3 ppb de clenbuterol analizada por GC-MS/MS muestra el pico de clenbuterol en el tiempo de retención de 5.3 min y su respectivo espectro de masas mostrando los iones producto de $m/z= 188, 190$ y 225 (Figura 11).

La Figura 12 muestra el cromatograma y espectro de masas característico de una muestra de carne positiva por ELISA que presenta el pico de clenbuterol y los iones producto de $189, 191$ y 225 , confirmando con esto su presencia en la muestra.

Las seis muestras de carne que resultaron positivas para clenbuterol por la técnica de ELISA fueron confirmadas por GC-MS/MS. Aunque en este estudio no resultaron falsos positivos, otros estudios reportaron 6.8 % de falsos positivos en carne y 36 % de falsos positivos en orina cuando los resultados de ELISA fueron confirmados por GC-MS (Boyd *et al.*, 1996).

La mayoría de los kits comerciales diseñados para análisis de clenbuterol por ELISA, pueden presentar reactividad cruzada detectando otros β -agonistas con estructuras similares como el mabuterol, mapenterol, clenproperol, cimaterol, bromobuterol y terbutalina (Kuiper *et al.*, 1998). Además el proveedor del kit no presenta una validación precisa del método, por lo que para utilizarlo

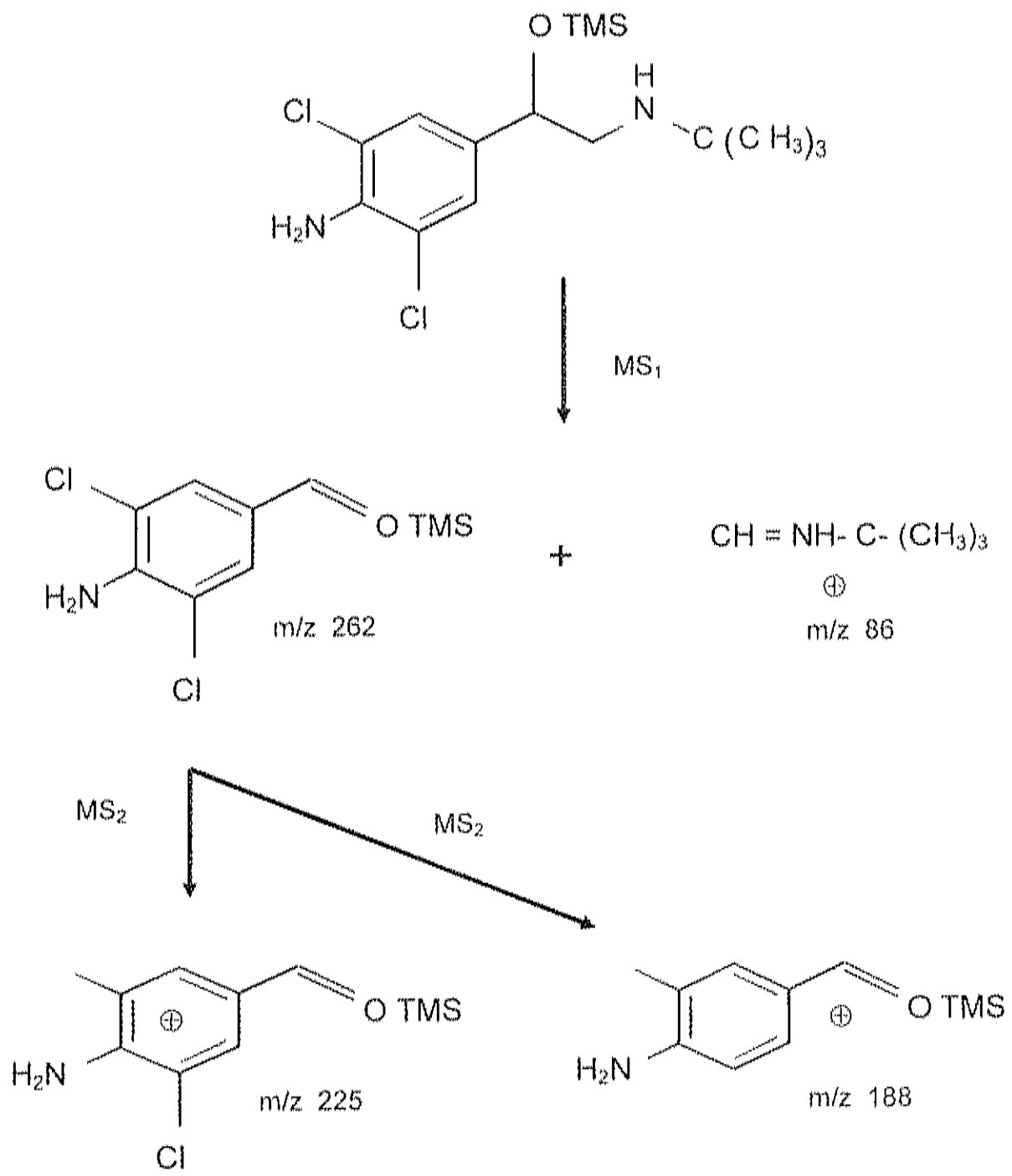


Figura 9. Estructura del TMS Derivativo del clenbuterol y sus Correspondientes Iones Precursores y Iones Hijos.

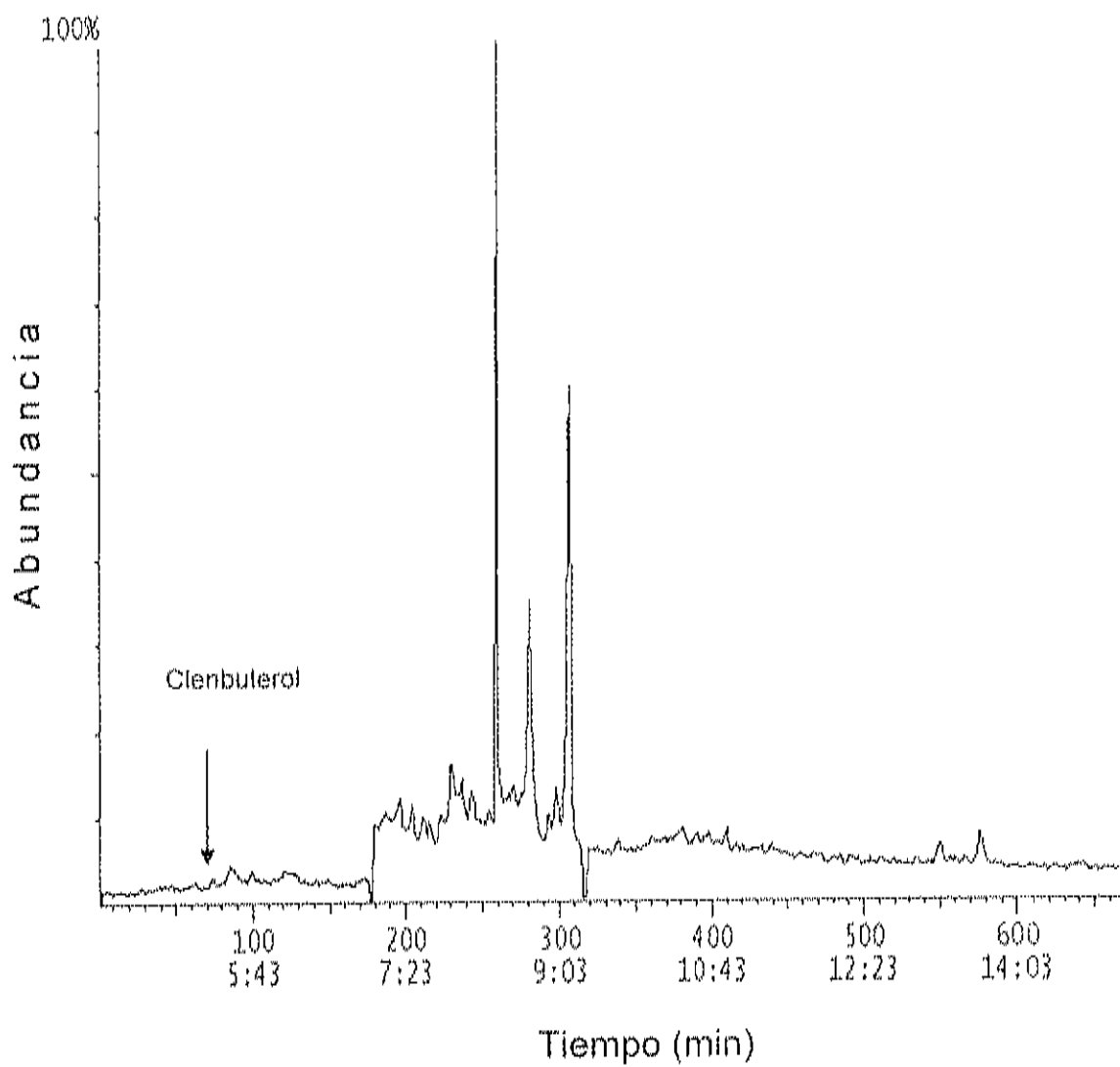


Figura 10. Análisis por GC-MS/MS de una Muestra de Carne Libre de Clenbuterol.

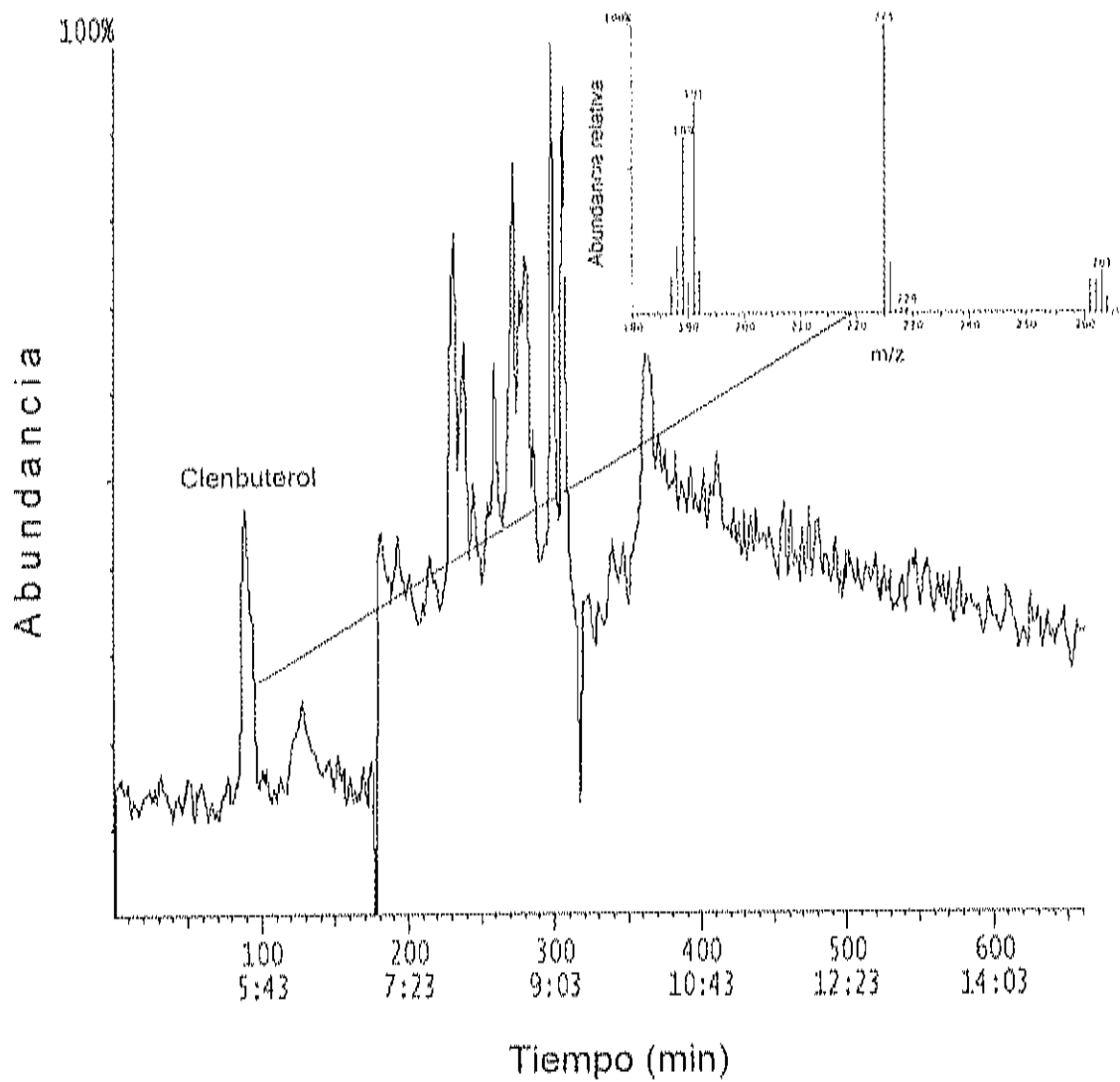


Figura 11. Cromatograma Representativo (GC-MS/MS) Obtenido de una Muestra de Carne Fortificada (3 ppb) con Clenbuterol.

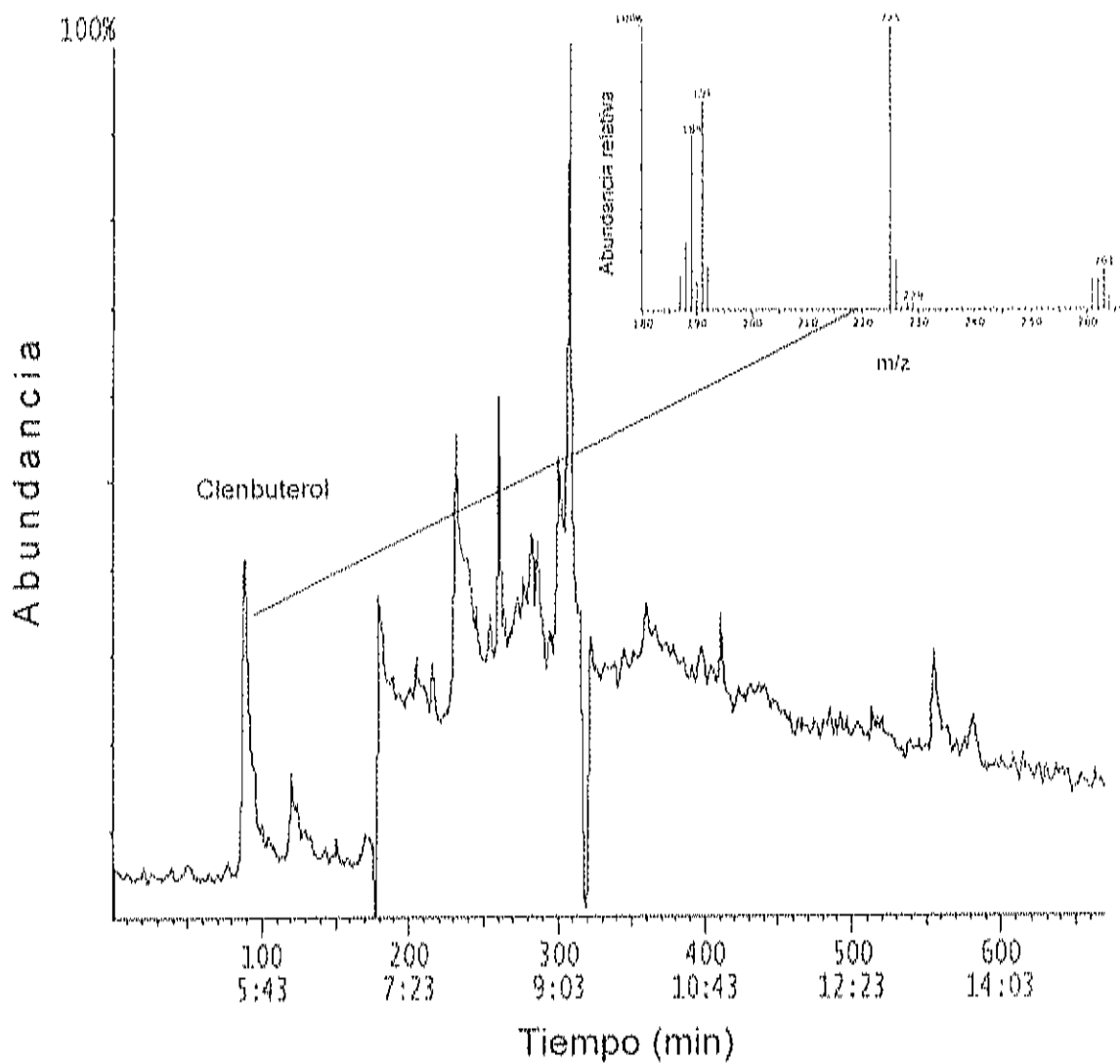


Figura 12. Cromatograma de una Muestra Positiva (Control Positivo por ELISA) Analizada por GC-MS/MS.

como pruebas preliminares fue necesario validar el método. Sin embargo para asegurar la confiabilidad de los resultados fue necesario realizar métodos confirmatorios como la GC-MS/MS.

Los métodos inmunoquímicos preliminares como el ELISA solo muestran la posible presencia del analito, pero no la identidad química. De acuerdo a la Comunidad Europea, los análisis confirmatorios deben de realizarse por medio del análisis de cromatografía de gases y espectrometría de masas (Kuiper *et al.*, 1998). La Comisión Económica Europea propuso la identificación inequívoca de clenbuterol y otras sustancias prohibidas, por medio de la detección del ión padre y dos iones producto, resultantes del análisis por GC-MS/MS (Fiori *et al.*, 2002).

Aún más, la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas es la única metodología que puede sostener y defender resultados en una corte de justicia (Lone, 1997). Para la identificación inequívoca de clenbuterol y su diferenciación de otros β -agonistas muy similares, más información analítica es necesaria obtenida de una segunda fragmentación que constituye el proceso de MS/MS o masas en tandem. La MS/MS ofrece ventajas sobre la MS, ya que la primera permite la discriminación entre analitos en base a las propiedades cromatográficas (tiempo de retención) y la detección del ión padre, MS y de los iones hijos, MS/MS (De Wasch *et al.*, 1998).

CONCLUSIONES

El 12% del total de las muestras de carne de bovino colectadas en Hermosillo y analizadas por ELISA se encontraron contaminadas con clenbuterol en un rango de 3192 a 6331 ppt. Debido a que la técnica de ELISA puede resultar en falsos positivos, fue necesario identificar de manera inequívoca la presencia de clenbuterol por medio de la cromatografía de gases con espectrometría de masas/masas (GC-MS/MS). El total de las muestras que resultaron positivas por ELISA fueron confirmadas por (GC-MS/MS).

Se han reportado estudios que utilizan la GC-MS/MS para confirmar la presencia de clenbuterol en hígado, pelo y orina de bovino, sin embargo, hasta donde se tiene conocimiento el presente trabajo es el primer reporte que utiliza la GC-MS/MS para identificar y confirmar la presencia de clenbuterol en carne.

Aunque se han realizado monitoreos para detectar la presencia de clenbuterol en carne, en otros Estados de la República Mexicana y en algunas ciudades, este es el primer estudio que utiliza la GC-MS/MS para confirmar la presencia de clenbuterol en muestras de carne de bovino. Es necesario que los monitoreos que se realizan en el país para la detección de clenbuterol en carne, utilicen la GC-MS/MS para confirmar muestras positivas resultantes de la técnica de ELISA recomendada por la SAGARPA, antes de imponer sanciones de carácter legal. De lo contrario, los resultados de ELISA pueden ser fácilmente refutados en una corte de justicia con fundamentos técnicos.

BIBLIOGRAFIA

- Amendola, L., Colamonici, C., Rossi, F. and Botre, F. Determination of Clenbuterol in Human Urine by GC-MS-MS-MS: Confirmation Analysis in Antidoping Control. *Journal of Chromatography B*, **2002**, 773, 7-16.
- Blass, A., Illera, J. C. Silvan, G., Sauer, M. J. and Illera, M. Cinetica del Anabolizante Clenbuterol en Plasma Medida Mediante ELISA. *Invest. Agr: Prod. Sanid. Anim.* **1998**, 13, 136-144.
- Blass, A., Illera, J. C. Silvan, G., Sauer, M. J. And Illera, M. Rapid Determination of Clenbuterol Residues in Plasma by a Sensitive Enzyme Immunoassay. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* **1997**, 20, 294-317.
- Botsoglou, N. A. and Fletouris, D. J. Anabolic Hormonal-Type Growth Promoters. *Drug Residues in Foods; Cap. 7; Botsoglou, N. A. And Fletouris, D. J., Ed. Publisher: New York, United States of America.* **2001**, 193-208.
- Boyd, D., O'Keeffe, M. and Smyth, M. R. Methods for the Determination of β -Agonists in Biological Matrices. A Review. *The Analyst*. **1996**, 121(1R-10R).
- Brambilla, G., Fiori, M., Curiel, H., Serpe, L. and Gallo, P. α_1 -Acid Glycoprotein Affinity Columns for the Clean-Up of Adrenergic Drugs. *The Analyst*. **1998**, 123, 2693-2696.
- Brambilla, G., Loizzo, A., Fontana, L., Strozza, M., Guarino, A. and Sporano, V. Food Poisoning Following Consumption of Clenbuterol Treated Veal in Italy. *J. Am. Med. Assoc.* **1997**, 278, 635.

Cajal, M. C. y Alvarez, A. R. El Lado Positivo del Uso de Clenbuterol en Ganadería, como Broncodilatador y Tocolítico. 1er. Simposio Internacional Sobre β -Agonistas y su Uso en Medicina Veterinaria, 29 y 30 de Julio del **2002**.

Careri, M., Bianchi, F. and Corradini, C. Review: Recent Advances in the Application of Mass spectrometry in Food-Related Analysis. *Journal of Chromatography A*. **2000**, 1-000-000.

Carmona, S. A. Más Que de Salud, el Clenbuterol es un Problema Social y Económico. Universidad Autónoma del Estado de México. **2002**.
www.mexicopolitico.com/noticias/noticentro.htm. (25/03/2002).

Collins, S. and O'keeffe, M. Multi-Residue Analysis for Beta-Agonists in Urine and Liver Samples Using Mixed Phase Columns with Determination by Radioimmunoassay. **1994**, 119, 2671-2674.

Crescenzi, C., Bayoudh, S., Cormack, P. A. G. Klein, T. and Ensing, K. Determination of Clenbuterol in Bovine Liver by Combining Matrix Solid-Phase Dispersion and Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction Followed by Liquid Chromatography/Electrospray Ion Trap Multiple-Stage Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2001**, 73, 2171-2177.

De Boer, W. J., Der Voet, H. V., Van Rhijn, H., Cooper, K. M., Kennedy, D. G. And Grases, J. M. Optimizing the Balance Between False Positive and False Negative Error Probabilities of Confirmatory Methods for the Detection of Veterinary Drug Residues. *The Analyst*. **1999**, 124, 109-114.

- Degand, G., Bernes-Duyckaerts, A. and Maghuih-Rogister, G. Determination of Clenbuterol in Bovine Tissues and Urine by Enzyme Immunoassay. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, 40, 70-75.
- De Wasch, K. D., Brabander, H. D. and Courtheyn, D. LC-MS-MS to Detect and Identify Four Beta-Agonists and Quantify Clenbuterol in Liver. *The Analyst.* **1998**, 123, 2701-2705.
- Elliott, C. T., Thompson, C. S., Arts, J. M., Crooks, R. H. Baak, M. J. Verheij, E. R. and Baxter, G. A. Screening and Confirmatory Determination of Ractopamine Residues in Calves Treated with Growth Promoting Doses of the β -Agonist. *The Analyst.* **1998**, 123, 1103-1107.
- Fente, C. A., Vázquez, B. I., Franco, C., Cepeda, A. and Gigoso, P. C. Determination of Clenbuterol Residues in Bovine Hair by Using Diphasic Dialysis and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography B.* **1999**, 726:133-139.
- Fiori, M. Cartoni, C. Bocca, B. and Brambilla, G. The Use of Nonendcapped C18 Columns in the Cleanup of Clenbuterol and a New Adrenergic Agonist from Bovine Liver by Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Analysis. *Journal of Chromatographic Science.* **2002**, 40, 92-96.
- Flores, H. O., Delgadillo, M. J. L. y Ontiveros F. E. Técnicas Analíticas para β -Agonistas. 1er Simposium Internacional Sobre β -Agonistas y su Uso en Medicina Veterinaria. 29 y 30 de Julio del **2002**.
- Flores, H. F. Decomisan Anabólico Ganadero Dañino para Humanos. *El Financiero.* **2002**, Pp. 81. (28/08/2002).

- Furst, P., Furst, C. and Groebel, W. Dksh. Lebensm. Rundsch. **1989**, 85, 35.
- Garza, F. J. D. Antecedentes y Desarrollo Técnico de Zilmax en México. 1er Simposium Internacional sobre β -Agonistas y su Uso en Medicina Veterinaria. 29 y 30 de Julio del **2002**.
- García-López, A. Alerta Epidemiológica por la Intoxicación en Humanos con Clenbuterol y su Empleo en la Alimentación del Ganado. Rev. Sanidad Milit. Mex. **2002**, 56(3):131-134.
- García-Regueiro, J. A., Pérez, B. and Casademont, G. J. Chromatography. **1993**, 655, 73.
- Gleixner, A. Probenecid Markedly Reduces Urinary Excretion of Ethinylestradiol and Trimethoprim Slightly reduces Urinary Excretion of Clenbuterol. Food Additives and Contaminants. **1998**, 15(4):415-420.
- Gleixner, A. Sauerwein, H. and Meyer, H. H. D. Effects of Drugs which Influence Renal Transport Systems on the Urinary Excretion of the β_2 -Adrenoreceptor Agonist Clenbuterol and the Anabolic Steroids Ethinylestradiol and Methyltestosterone. Food Additives and Contaminants. **1997**, 14(2):143-150.
- González, P., Fente, C. A., Franco, C., Vázquez, B., Quinto, E. y Cepeda, A. Determination of Residues of the β -Agonist Clenbuterol in Liver of Medicated Farm Animals by Gas Chromatography-Mass Spectrometry Using Diphasic Dialysis As an Extraction Procedure. Journal of Chromatography B. **1997**, 693, 321-326.

Guy, P. A., Savoy, M. C. and Stadler, R. H. Quantitative Analysis of Clenbuterol in Meat Products Using Liquid Chromatography-Electrospray Ionisation Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography B*. **1999**, 736, 209-219.

Haasnoot, W., Voncken, A. K. and Samson, D. Immunofiltration As Sample Cleanup for the Immunochemical Detection of β -Agonists in Urine. *The Analyst*. **2002**, 127, 87-92.

Haasnoot, W., Ploum, M. E., Paulussen, R. J. A., Schilt, R. And Huf, F. A. Rapid Determination of Clenbuterol Residues in Urina by High-Performance Liquid Chromatography With On-Line Automated Sample Processing Using Immunoaffinity Chromatography. *Journal of Chromatography*. **1990**, 519, 323-335.

Haasnoot, W., Stouten, P., Lommen, A., Cazemier, G., Hooijerink, D. and Schilt, R. Determination of Fenoterol and Ractopamine in Urine by Enzyme Immunoassay. *The Analyst*. **1994**, 119, 2675-2680.

Haughey, S. A. Baxter, G. A. and Elliott, C. T. Determination of Clenbuterol Residues in Bovine Urine by Optical Immunobiosensor Assay. *J. of AOAC International*. **2001**, 84(4), 1025-1030.

Hernández, P. G., García, V. R., Mangas, G. I., Martínez, N. F. Martín, J y González, O. Intoxicaciones por Clenbuterol en España. *Boletín Epidemiológico*. **2001**, 9(1):1-8.

Hogendoorn, E. A. and Zoonen, P. The Potential of Restricted Access Media Columns as Applied in Coupled-Column LC/LC-TSP/MS/MS for the High-

Speed Determination of Target Compounds in Serum. Application to the Direct Trace Analysis of Salbutamol and Clenbuterol. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 1362-1368.

Horne, E., O'Keeffe, M., Desbrow, C. and Howells, A. A Novel Sorbent for the Determination of Clenbuterol in Bovine Liver. *The Analyst.* **1998**, *123*, 2517-2520.

Intervet. Zilmax .Guía Técnica. **2002**, 4-7.

Kool, A., Bosman, J., Franke, J. P. and de Zeeuw, R. A. Multiresidue Analysis of β_2 -Agonists in Human and Calf Urine Using Multimodal Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection. *Journal of Chromatography B.* **1999**, *726*, 149-156.

Kuiper, H. A., Noordam, M. Y., Schilt, R. and Roos, A. H. Illegal Use of β -Adrenergic Agonist: European Community. *J. Anim. Sci.* **1998**, *76*, 195-207.

Lone K. P. Natural Sex Steroids and Their Xenobiotic Analogs in Animal Production: Growth, Carcass Quality, Pharmacokinetics, Metabolism, Mode of Action, Residues, Methods, and Epidemiology. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* **1997**, *37(2)*, 93-209.

López Montaña, R. Vocal Ejecutivo de la Comisión Estatal de la Carne en el Estado de Sonora.

- Maistro, S., Chiesa, E., Angeletti, R. and Brambilla, G. Beta Blockers to Prevent Clenbuterol Poisoning. *Lancet*. **1995**, 346, 180.
- Maldonado, S. Surgen Casos del Clenbuterol. Violencia al Ganado por Inyecciones Prohibidas.
[Hptt://www.Semanario.com.mx/2003/337-20072003/campo_y_medio_ambiente.html](http://www.Semanario.com.mx/2003/337-20072003/campo_y_medio_ambiente.html). Edición 259, 1-3
- Mersmann, H. J. Overview of the Effects of β -Adrenergic Receptor Agonists on Animal Geowth Including Mechanisms of Action. *J. Anim. Sci.* **1998**, 76,160-172.
- Mitchell, G. A. and Dunnavan, G. Illegal Use of β -Adrenergic Agonist in the United States. *J. Anim. Sci.* **1998**, 76, 208-211.
- Norma Oficial Mexican de Emergencia NOM-EM-015-ZOO-2002. Especificaciones Técnicas para el Control del Uso de Beta-agonistas en los Animales. Diario Oficial de la Federación. 1 de Marzo de 2002. 1-9.
- O'Keeffe, M. Methods for Veterinary Drug Residue Analysis in Food. B.Sc. Ph.D. The National Food Centre, Dunsinea, Castleknock, Dublin 15. Final Report. Project ARMIS No.4033, **1999**, 1-11.
- O'Keeffe, M. J., O'Keeffe, M., Glennon, J. D., Lightfield, A. R. and Maxwell, R. J. Supercritical Fluid Extraction of Clenbuterol from Bovine Liver Tissue. *The Analyst*. **1998**, 123, 2711-2714.
- Peña S. D. y Arias, A. D. Clenbuterol en medicina Veterinaria. *Acontecer porcino*. **2001**, 4, 47.

Polettini, A., Montagna, M. Hogendoorn, E. A., Dijkman, E., Zoonen, van P. and Ginkel, van L. A. Applicability of Couples-Column Liquid Chromatography to the Analysis of β -Agonists in Urine by Direct Sample Injection. I. Development of a Single-Residue Reversed-Phase Liquid Chromatography-UV Method for Clenbuterol and Selection of Chromatographic Conditions Suitable for Multi-Residue Analysis. *Journal of Chromatography A*. **1995**, 695, 19-31.

Ramos, F., Castillo, M. C. and Noraonha, M. I. Occurrence of β_2 -Adrenergic Agonist Residues in Urine of Animal Meat producer in Portugal. *Journal of AOAC International*. **1998**, 81(3):544-548.

R-Biopharm. Inmunoensayo enzimático para el análisis cuantitativo de clenbuterol y otros β -Agonistas. RIDASCREEN[®] Clenbuterol fast kit.: Darmstadr Germany. **2002**.

Rico, A. Agonistas β_2 . 1er. Simposio Internacional sobre β -agonistas y su Uso en Medicina Veterinaria, 29 y 30 de Julio de **2002**.

Rojas, P. y Treguear, W. Ingal Usach.

[http:// www. geocities.com/collgePark/lab/2960/betagonistasbody.htm](http://www.geocities.com/collgePark/lab/2960/betagonistasbody.htm).
(28/10/2002).

Ruvalcaba, B. S. Características del Clenbuterol. Colegio de Médico Veterinario Zootecnista Especialistas en Higiene Alimentaria del Estado de Jalisco, A. C. [http:// www. cucba. Udg.mx/new/publicaciones/salud_publica/2/](http://www.cucba.udg.mx/new/publicaciones/salud_publica/2/).
(01/02/03).

Sánchez, B. J. y Granada, F. M. Espectrometría de Masas en Tandem (MS/MS) y el Control del Dopaje. Instituto de Medicina Deportiva. Cuba.
<http://www.inder.co.cu/Espectrometr%20.htm>. (31/01/03).

Sawaya, W. N., Lone, K., Husain, A., Dashti, B. and Saeed, T. Screening for β -Agonists in Sheep Urine and Eyes by an Enzyme-Linked Immunosorbent assay in the state of Kuwait. *Food Control*. **2000**, 1-5.

Siuzdak, G. Ion Sources and Sample Introduction. *Mass Spectrometry for Biotechnology*. Academic Press. **1996**. Pp. 4.

Smith, D. J. Total Radioactive Residues and Clenbuterol Residues in Swine After Dietary Administration of [^{14}C] Clenbuterol for Seven Days and Preslaughter Withdrawal Periods of Zero, Three, or Seven Days. *J. Anim. Sci.* **2000**, 78, 2903-2912.

Smith, D. J. The Pharmacokinetics, Metabolism, and Tissue Residues of β -Adrenrgic Agonists in Livestock. *J. Animal.Sci.* **1998**, 76, 173-194.

Smith, D. J. and Paulson, G. D. Distribution, Elimination, and Residues of [^{14}C] Clenbuterol HCl in Holstein Calves. *J. Anim. Sci.* **1997**, 75, 454-461.

Sporano, V., Grasso, L., Esposito, M., Oliviera, G., Brambilla, G.n and Loizzo, A. Clenbuterol Residues in Non-Liver Containing Meat As a Cause of Collective Food Poisoning. *Vet. Hum. Toxicol*, **1998**, 40, 141-143.

Sumano, L. H., Ocampo, C. L. y Gutiérrez, O. L. Clenbuterol y otros β -Agonistas, ¿ Una opción para la Producción Pecuaria o un Riesgo para la Salud Pública?. *Veterinaria México*. **2002**, 33(2):136-159.

Urquidez, R. R. Hormonas Promotoras de Crecimiento Utilizadas en Ganado Bovino, Efectos Adversos en el Hombre y Metodologías Usadas para su Análisis. Métodos para la Detección de Hormonas. Tesis de Licenciatura. UNISON. 2001, pp 46-71.

Visser, T, Vredendregt, M. J. and Jong, A. P. J. Confirmational Analysis of Beta-Agonists by Cryotrapping Gas Chromatography-Fourier Transform Infrared Spectrometry. *The Analyst*. 1994, 119, 2681-2683.

Whaites, L. X. and Murby, E. J. Determination of Clenbuterol in Bovine Urine Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry Following Clean-Up on an Ion-exchange Resin. *Journal of Chromatography B*. 1999, 728, 67-73.

Wicker, A. L., Turberg, M. P. and Coleman, M. R. Evaluation of Ractopamine Cross-Reactivity in Several Commercially Available β -Agonist Enzyme Immunoassay Kits. *The Analyst*. 1995, 120, 2879-2881.

Zalko, D., Debrauver, L., Borjes, G., Tullez, J. Evidence for a New and Major Metabolic Pathway of Clenbuterol Involving in Vivo Formation of a N-Hidroxil-Aryamine. *Chem. Res. Toxicol*. 1997, 10, 197-204.

Zampronio, C. G., Guarden, S. P., Morales, L. A. B., Eberlin, m. N., Smilde, A. k. and Popii, R. J. Direct Sampling Tandem Mass Spectrometry (MS/MS) and Multiway Calibration for Isomer Quantitation. *The Analyst*. 2002, 127, 1054-1060.

Zenteno, A. y Montero, E. Otro Brote por Clenbuterol en Jalisco, hay 29 Intoxicados. <http://www.unom@suno/1104/20>

Urquidez, R. R. Hormonas Promotoras de Crecimiento Utilizadas en Ganado Bovino, Efectos Adversos en el Hombre y Metodologías Usadas para su Análisis. Métodos para la Detección de Hormonas. Tesis de Licenciatura. UNISON. 2001, pp 46-71.

Visser, T, Vredenburg, M. J. and Jong, A. P. J. Confirmational Analysis of Beta-Agonists by Cryotrapping Gas Chromatography-Fourier Transform Infrared Spectrometry. *The Analyst*. **1994**, 119, 2681-2683.

Whaites, L. X. and Murby, E. J. Determination of Clenbuterol in Bovine Urine Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry Following Clean-Up on an Ion-exchange Resin. *Journal of Chromatography B*. **1999**, 728, 67-73.

Wicker, A. L., Turberg, M. P. and Coleman, M. R. Evaluation of Ractopamine Cross-Reactivity in Several Commercially Available β -Agonist Enzyme Immunoassay Kits. *The Analyst*. **1995**, 120, 2879-2881.

Zalko, D., Debrauver, L., Bories, G., Tullez, J. Evidence for a New and Major Metabolic Pathway of Clenbuterol Involving in Vivo Formation of a N-Hydroxyl-Aryamine. *Chem. Res. Toxicol*. **1997**, 10, 197-204.

Zampronio, C. G., Guarden, S. P., Morales, L. A. B., Eberlin, m. N., Smilde, A. k. and Popii, R. J. Direct Sampling Tandem Mass Spectrometry (MS/MS) and Multiway Calibration for Isomer Quantitation. *The Analyst*. **2002**, 127, 1054-1060.

Zenteno, A. y Montero, E. Otro Brote por Clenbuterol en Jalisco, hay 29 Intoxicados. <http://www.unom@suno/1104/20>

Urquidez, R. R. Hormonas Promotoras de Crecimiento Utilizadas en Ganado Bovino, Efectos Adversos en el Hombre y Metodologías Usadas para su Análisis. Métodos para la Detección de Hormonas. Tesis de Licenciatura. UNISON. 2001, pp 46-71.

Visser, T, Vredenburg, M. J. and Jong, A. P. J. Confirmational Analysis of Beta-Agonists by Cryotrapping Gas Chromatography-Fourier Transform Infrared Spectrometry. *The Analyst*. 1994, 119, 2681-2683.

Whaites, L. X. and Murby, E. J. Determination of Clenbuterol in Bovine Urine Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry Following Clean-Up on an Ion-exchange Resin. *Journal of Chromatography B*. 1999, 728, 67-73.

Wicker, A. L., Turberg, M. P. and Coleman, M. R. Evaluation of Ractopamine Cross-Reactivity in Several Commercially Available β -Agonist Enzyme Immunoassay Kits. *The Analyst*. 1995, 120, 2879-2881.

Zalko, D., Debrauver, L., Bories, G., Tullez, J. Evidence for a New and Major Metabolic Pathway of Clenbuterol Involving in Vivo Formation of a N-Hydroxyl-Aryamine. *Chem. Res. Toxicol*. 1997, 10, 197-204.

Zampronio, C. G., Guarden, S. P., Morales, L. A. B., Eberlin, m. N., Smilde, A. k. and Popii, R. J. Direct Sampling Tandem Mass Spectrometry (MS/MS) and Multiway Calibration for Isomer Quantitation. *The Analyst*. 2002, 127, 1054-1060.

Zenteno, A. y Montero, E. Otro Brote por Clenbuterol en Jalisco, hay 29 Intoxicados. <http://www.unom@suno/1104/20>