

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Diseño y validación de un método analítico para la
identificación y cuantificación de clenbuterol en músculo
bovino

Trabajo de graduación presentado por Ana Lucía Valdéz
Micheo para optar al grado académico de Licenciada en Química
Farmacéutica

Guatemala

2017

Diseño y validación de un método analítico para la
identificación y cuantificación de clenbuterol en músculo
bovino

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



Diseño y validación de un método analítico para la
identificación y cuantificación de clenbuterol en músculo
bovino

Trabajo de graduación presentado por Ana Lucía Valdéz
Micheo para optar al grado académico de Licenciada en Química
Farmacéutica


Guatemala
2017

Vo. Bo. :

(f) 
Licenciada Ana Luisa Mendizabal Solé de Montenegro
Asesor

Tribunal Examinador:

(f) 
Licenciada Ana Luisa Mendizabal Solé de Montenegro
Asesor

(f) 
Dr. Herber Ronaldo Morales Estevéz

(f) 
Dr. Eliego Rolando López García

Fecha de aprobación: Guatemala, 29 de junio de 2017.

ÍNDICE

LISTA DE CUADROS	viii
LISTA DE GRÁFICOS Y FIGURAS	ix
AGRADECIMIENTOS	x
RESUMEN	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO CONCEPTUAL	2
A. Antecedentes del problema	2
B. Justificación	4
C. Planteamiento del problema	5
D. Alcance y limitantes del problema	5
III. MARCO TEÓRICO	6
A. Clembuterol.....	6
B. Cromatografía de gases	12
C. Validación de métodos analíticos	14
IV. MARCO METODOLÓGICO	18
A. Objetivos	18
B. Población y muestra	18
C. Procedimientos	18
D. Diseño de investigación	22
E. Análisis estadístico	22
V. MARCO OPERATIVO	27
F. Recabación y tratamiento de los datos.	27
G. Recursos.....	27

1. Recursos humanos	27
VI. RESULTADOS	29
A. Precisión (repetibilidad)	29
B. Especificidad.....	29
C. Linealidad.....	29
D. Límite de detección y Límite de cuantificación	30
E. Robustez: Ver Gráfico No. 4, en apéndice, sección de datos experimentales. ...	30
H. Gráficos y figuras.....	31
VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	37
A. Metodología	37
B. Parámetros de validación	40
VIII. CONCLUSIONES	42
IX. RECOMENDACIONES	43
X. BIBLIOGRAFÍA	44
XI. APÉNDICE	49
A. Lavado de cristalería	49
B. Glosario de términos.....	50
C. Diagrama de procedimiento.....	52
D. Datos experimentales	53
E. Certificados de análisis.....	54

LISTA DE CUADROS

Cuadro

1. Tiempo de eliminación de clenbuterol en tejidos y fluidos animales.....	9
2. Ingesta diaria admisible de clenbuterol por kg de peso corporal y Límites máximos permitidos de residuos (LMR).....	10
3. Intoxicación alimenticia luego del consumo de animales contaminados en el mundo.....	11
4. Valores de distribución para la prueba “t”.....	24
5. Repetibilidad de 6 inyecciones de estándar de clenbuterol	29
6. Promedio de tiempos de retención de soluciones estándar de clenbuterol...	29
7. Curva de calibración de soluciones estándar de clenbuterol.....	29
8. Resultados de límite de detección y límite de cuantificación.....	30
9. Áreas de clenbuterol obtenidas según concentración para la curva de calibración y tiempos de retención.....	53
10. Áreas blanco de clenbuterol y metoprolol para determinación de límite de detección y cuantificación.....	54

LISTA DE GRÁFICOS Y FIGURAS

Gráficos

1. Curva de calibración de estándares de clenbuterol en una concentración de 5.00 a 40.00 $\mu\text{g/mL}$ 30
2. Comparación de abundancia inyección de 1 μL (negro) y 5 μL (azul) 31
3. Cromatograma de clenbuterol y metoprolol identificados por la biblioteca de NIST en los tiempos de retención de 11.363 y 11.937 respectivamente. 32
4. Comparación de temperatura inicial de horno, en azul 70 $^{\circ}\text{C}$ y en negro a 120 $^{\circ}\text{C}$ para parámetro de robustez 33
5. Comparación de gráficos al configurar el equipo con la opción SIM (inferior) y la opción SCAN (superior) 36
6. Resolución picos de clenbuterol-TMS (derivatizado) en tiempo de retención de 11.317 min y metoprolol-TMS (derivatizado) en 11.898 min. 36

Figuras

1. Comparación espectros de masas de la señal obtenida por el metoprolol de manera experimental y el espectro teórico de masas 34
2. Comparación espectro de masas del clenbuterol obtenido de forma experimental y el espectro teórico de masas del clenbuterol. 35
3. Diagrama de procedimiento a seguir para la derivatización de estándares de clenbuterol 52

AGRADECIMIENTOS

Al Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación (MAGA) y al Organismo Internacional Regional de sanidad Agropecuaria (OIRSA) por su importante participación para el desarrollo de este trabajo.

A Chemilco, S.A. y Laprin-Eurofarma por proporcionar los estándares internos de clenbuterol y metoprolol para el desarrollo y validación de la metodología analítica.

Al Laboratorio de Análisis Instrumental Avanzado de la Universidad del Valle de Guatemala por proporcionar las instalaciones para la preparación de muestras y el cromatógrafo de gases con detector de masas.

RESUMEN

El clenbuterol es un fenilaminoetanol, compuesto simpaticomimético que actúa a nivel de los receptores β -2 (receptores β -2 adrenérgicos) utilizado para el tratamiento de enfermedades como asma y EPOC. Es utilizado en ganadería de forma ilegal como anabólico que promueve el crecimiento del músculo, provocando que a los animales a los que se les administra, tengan una gran concentración de clenbuterol en tejidos como la carne, pudiendo provocar intoxicación en las personas que consumen la carne presentando sintomatología aguda variada como dolor y tremor muscular, dolores de cabeza y efectos crónicos como alteraciones metabólicas, alteración de tiroides, aumento del tamaño de las células cardíacas, entre otros. En Guatemala, en el Laboratorio de Inocuidad del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación (MAGA), anteriormente no existía un método para la identificación y cuantificación de clenbuterol en carne de bovino. Es por esto que se desarrolló un método lineal con un coeficiente de determinación de 0.9969, preciso, específico y con bajos límites de detección (0.0018 $\mu\text{g/mL}$) y cuantificación (0.0054 $\mu\text{g/mL}$) para el análisis de estándares de clenbuterol en cromatografía de gases con detector de masas que permitiera detectar y cuantificar clenbuterol en un rango de 5.00 $\mu\text{g/mL}$ a 40 $\mu\text{g/mL}$ y derivatizándolo con BSTFA/TMCS utilizando metoprolol tartrato como estándar interno.

Para el análisis de muestras de carne se utilizaron tres metodologías de extracción y purificación para la determinación de clenbuterol, basadas en la homogenización con buffer acuoso, centrifugación, tratamiento con ácidos y bases fuertes y posterior purificación con columnas de extracción de fase sólida C18 utilizando como acondicionantes de columna metanol y para los lavados buffers de fosfatos a distintos pH para finalmente eluir la muestra con metanol en dos de las metodologías y una mezcla de diclorometano, isopropanol e hidróxido de amonio en otra de las metodologías. Bajo las condiciones utilizadas para el desarrollo de las metodologías antes mencionadas, no se pudo determinar un procedimiento que fuera exacto para la cuantificación de clenbuterol en la carne por cromatografía de gases con detector de masas. Por lo que se recomienda, utilizar homogenizador para la homogenización de tejido, probar metodologías que incluyen la digestión enzimática con beta- glucoronidasa y proteasa, y el tratamiento del extracto con pHs superiores a 10 previo a la purificación de columna de fase sólida para poder cuantificar el clenbuterol de forma exacta y con porcentajes de recuperación de entre el 85 y 115%.

I. INTRODUCCIÓN

El clenbuterol es una sustancia utilizada en medicina humana y veterinaria para el tratamiento de afecciones respiratorias como el asma y EPOC (Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica), y como agente tocolítico. Debido a su mecanismo de acción, agonista de receptores β_2 , se ha utilizado de forma ilegal como agente anabólico, a dosis superiores a la terapéutica, para producir el crecimiento de ganado, aumentando la cantidad de masa muscular.

Su uso se popularizó principalmente en la década de los 90 y se ha extendido hasta la actualidad, y ha estado implicado en múltiples intoxicaciones alimenticias en consumidores de carne que estuvieron expuestos al clenbuterol, en Europa, China, México y otros países como Guatemala en los que no se ha tenido registros documentados sobre intoxicaciones. Los síntomas de intoxicación más comunes del β agonista son principalmente aumento de la presión arterial, dolores de cabeza, malestar generalizado, vómitos, entre otros.

El Codex Alimentarius es una guía de prácticas y estándares que tiene como objetivo el cumplimiento de la seguridad alimentaria y protección al consumidor, distintos países propusieron metodologías analíticas para el estudio del clenbuterol, el Codex definió ensayos enzimáticos, radioinmunoensayos o técnicas cromatográficas como cromatografía de gases con detector de masas y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

La monitorización de residuos de clenbuterol en músculo bovino es necesaria para evitar que exista una utilización ilegal ya que representa un problema de salud pública por la ingestión de carne contaminada por parte de la población. En Guatemala, es deber del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación (MAGA) velar porque se cumpla la prohibición de la utilización del clenbuterol en ganado con fines de crecimiento muscular, y así asegurar que la carne de bovino para consumo humano esté dentro de los límites especificados, con una cantidad máxima aceptada de 0.2 μ g/ kg de músculo bovino, este límite está establecido por el Codex Alimentarius.

Debido a que en Guatemala no existe un método que demuestre que es válido y confiable, en el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación (MAGA), el presente trabajo desarrolla y valida un método por cromatografía de gases con detector de masas para la identificación y cuantificación de clenbuterol en músculo bovino.

II. MARCO CONCEPTUAL

A. Antecedentes del problema

Desde junio de 1978 la Agencia de Drogas y medicamentos (FDA por sus siglas en inglés) aprobó que se realizaran pruebas sobre el uso de clenbuterol para el tratamiento de afecciones respiratorias en caballos. Luego, en 1988 la FDA aprobó el medicamento a base de clenbuterol "Ventipulmin Syrup" que fue fabricado por Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc., utilizado como tratamiento para la obstrucción de las vías respiratorias en caballos a dosis de 0.8-3.2 µg/ kg dos veces al día. Fuera de Estados Unidos el clenbuterol está disponible para el tratamiento de asma crónica en humanos en una dosis de 20-30 µg dos veces al día bajo la marca "Mucosolvan"

La única forma de detección de clenbuterol y su cuantificación en el tejido para el consumo humano, es realizar un análisis de los tejidos o fluidos biológicos del animal que ha sido tratado con la droga. Debido a esto se hace difícil rastrear a los rastros responsables de la producción de la carne contaminada. Generando por lo tanto pocos casos documentados sobre su uso ilegal y sobre intoxicaciones en el mundo.

A partir de lo anterior y que se utiliza el clenbuterol a dosis relativamente bajas, son necesarios métodos para la detección en fluidos corporales y tejidos. Estos se basan en distintas metodologías propuestas en el Codex Alimentarius, como ensayos enzimáticos, radioinmunoensayos o técnicas cromatográficas como cromatografía de gases con detector de masas, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Generalmente se utilizan los métodos inmunoquímicos debido a que son rápidos, sensibles y de bajo costo. (Parr, Opfermann y Schänzer, 2009). Estos son algunos de los estudios realizados para la identificación y cuantificación de clenbuterol:

En 1995, el estudio realizado por Ramos, Matos, Oliveira y Noronha da Silveira en Portugal, realizaron la determinación de clenbuterol en retina de bovino, la técnica utilizaba una extracción por medio de diálisis difásica con cromatografía de gases y detector de masas, se realizó una digestión alcalina a 80°C, la derivatización se realizó con ácido butilborónico (BBA). Se encontraron límites de detección de 2.5ng/g, una repetibilidad del 9.0%, reproducibilidad del 22.9% por lo que se logró la validación.

Ortiz, Alcocer y Castellanos realizaron un estudio en 2005 en la que buscaban estandarizar la técnica de cromatografía de gases con detector de masas para determinar clenbuterol en tejido hepático en México. Se analizaron muestras de dos rastros, una de 50 y la otra de 88. Se utilizó clorhidrato de clenbuterol para la detección del estándar y límite de detección del equipo y del método, repetibilidad y porcentaje de recuperación. Se concluyó que los rastros analizados no utilizaban clenbuterol.

En el estudio realizado por (Estrada *et al.*, 2008) realizado en México en el que se utilizó cromatografía de gases con detector de masas y técnica de inmunoensayo ELISA. Se analizaron 50 muestras de carne molida y lomo, primero con el test de ELISA, y luego las 6 muestras con la mayor cantidad de residuos de clenbuterol fueron analizadas por cromatografía de gases como confirmación.

Posteriormente en el estudio de (Hajrulai *et al.*, 2013), se utilizan técnicas de inmunoensayo (ELISA) y método de cromatografía de gases con detector de masas, se analizaron 55 muestras de carne de bovino. Para la técnica de inmunoensayo ELISA se utilizó un kit para ELISA para los cuales se encontraron 11 con presencia de clenbuterol y 34 se encontraban por debajo del límite de detección (0.1µg/kg), mientras que con la cromatografía de gases se utilizó la derivatización con TMS y se encontró solamente una muestra positiva. Se concluyó que todavía se utilizaba el clenbuterol de manera ilegal, aunque con la técnica de tamizaje con ELISA podía existir una mayor cantidad de casos falso-positivos.

Existen otras técnicas para la detección de clenbuterol como la propuesta por la Farmacopea Europea en la que para la identificación de clenbuterol se realiza una cromatografía de capa fina utilizando como fase estacionaria sílica gel F254 y como fase móvil una mezcla de tolueno, etanol y amonio, utilizando reveladores como nitrito de sodio (Moffat, y Osselton, 2004). Otra de las técnicas utilizadas es la de electroforesis capilar que produce separación efectiva, poca utilización de la muestra y de soluciones tampón y se utiliza para análisis de muestras multiresiduos, en un estudio realizado por Chen *et al.*, 2008, se determinó el clenbuterol con niveles de desviación estándar relativa menor al 5%.

No existen estudios similares realizados en Guatemala para la identificación y cuantificación de clenbuterol, sin embargo, en 2007, la delegación de Guatemala, en la reunión de la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación) y la OMS (Organización Mundial de la Salud) en el congreso en Roma, Italia, realizado en el año 2007. Expuso la preocupación sobre los problemas causados por el uso indebido de clenbuterol como

promotor del crecimiento de músculo en ganado que ha llevado a intoxicación alimenticia en algunos países. Por lo que el Comité declaró que debían reforzarse el Códex de Límites Máximos de Residuos permitidos para drogas veterinarias y otros Codex como el Código de Práctica para Control de Drogas Veterinarias (CAC/RCP 38-1993) (FAO/OMS, 2007).

B. Justificación

En 1991, la FDA y el Servicio de Inspección y Seguridad Alimenticia (en inglés *Food Safety and Inspection Service*, FSIS) fueron alertados sobre el uso de clenbuterol para la ganancia de músculo (uso como anabólico) en animales como terneros, corderos y cerdos. Según el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, los animales que mostraban el uso del clenbuterol representaban menos el 1% de todos los animales que eran sacrificados; sin embargo, advirtió que podría ser un problema para la salud pública si la carne con residuos de clenbuterol de estos animales era utilizada como alimento para humanos (FSIS, 1995).

Luego de esto, el clenbuterol estuvo implicado en casos de intoxicación en Europa debido a su uso ilegal utilizado como anabólico y con dosis mayores a la terapéutica, y debido a la larga vida de eliminación del clenbuterol. En España se dieron los primeros casos registrados de intoxicaciones por el consumo de hígado con residuos de clenbuterol con 47 casos en el periodo comprendido entre 1990 y 2000 (Salleras *et al.*, 1995) En el caso de México, fueron reportados 2130 intoxicaciones en un periodo de 6 años (2002-2008) por el consumo de hígado bovino (Oyala, 2012). Otros casos similares se presentan entre los años 1990 y 2002, en países como Italia, Portugal y China. Siendo la mayoría en China con 1750 casos por consumo de carne e intestinos de cerdo con residuos de clenbuterol Las intoxicaciones de manera general estaban caracterizadas por temblores, palpitations, taquicardia, cefalea, mialgias, boca seca, dolor de pecho, calambres musculares, entre otros.

En Guatemala se emitió el Acuerdo Ministerial No. 821-2007 el 18 de diciembre de 2007, en el que se menciona que se prohíbe el registro, uso y comercialización de clenbuterol en todas las formulaciones del ramo pecuario. Además, que es obligación del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación velar por el cumplimiento de la prohibición. Actualmente en Guatemala, no hay documentados estudios sobre la detección de clenbuterol en ninguna matriz biológica, por lo que no existe un control verdadero respecto a su uso ilegal, lo que podría incurrir en futuras intoxicaciones. Es esencial desde el punto de vista de salud pública, que se implemente un método que permita monitorear el uso de clenbuterol en Guatemala.

A partir de lo anterior y debido a la administración de clenbuterol a dosis relativamente bajas, son necesarios métodos para la detección del clenbuterol en músculo bovino, que están

basados en ensayos enzimáticos o técnicas de espectrometría de masas para la detección de clenbuterol que sean exactos, válidos y confiables, además de que sean sensibles para detectar residuos a una escala de $0.2\mu\text{g}/\text{kg}$ de tejido. El objetivo de la siguiente investigación, es, por lo tanto, desarrollar y validar un método por cromatografía de gases y detector de masas para la identificación y cuantificación de clenbuterol en músculo bovino.

C. Planteamiento del problema

¿Es posible desarrollar una metodología, utilizando cromatografía de gases con detector de masas que genere resultados confiables, precisos, exactos y reproducibles para la identificación y cuantificación de clenbuterol en músculo bovino?

D. Alcance y limitantes del problema

1. Alcance: Se desarrolló y validó una metodología analítica para la identificación y cuantificación de clenbuterol por medio de cromatografía de gases con detector de masas para cualquier entidad pública o privada que presente el problema planteado.
2. Límites: Se analizó el clenbuterol en el rango de 0.125 a $1\mu\text{g}/\text{g}$.

III. MARCO TEÓRICO

A. Clembuterol

1. Propiedades fisicoquímicas y farmacológicas: El clembuterol es un fenilaminoetanol también conocido como (1-[4-amino-3,5-diclorofenil]-2-[tert-butilamino]etanol es un compuesto simpaticomimético que actúa a nivel de los receptores β -2 (receptores β -2 adrenérgicos). La activación de los receptores β -2 causa la apertura de los canales de calcio produciendo efectos cardiacos como el aumento de intensidad de contracción y disminución de la duración de la contracción en el músculo cardiaco; además, produce relajación en el músculo liso presente en los bronquios y útero. Por lo tanto, es utilizado como broncodilatador en enfermedades como asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC); cardiotónico debido a sus efectos cronotrópicos (aumento frecuencia cardiaca) e inotrópicos positivos (aumento fuerza contráctil) y agente tocolítico por la relajación del músculo liso del útero (Parr, Opfermann y Schänzer, 2009 y Oyala, 2012)

La activación de los receptores beta-adrenérgicos también provoca el aumento de la masa muscular y la reducción de la grasa corporal, es decir tienen una acción anabolizante, pero en dosis mayores a las terapéuticas (Oyala, 2012), por lo tanto, teniendo usos ilegales en la producción animal, con propósitos de pérdida de peso y ganancia de músculo en humanos en dosis de 60 y 160 mg (Parr, Opfermann y Schänzer. 2009).

Dentro de los efectos adversos que se presentan con el uso de clembuterol a nivel cardiovascular y neurológico son: aumento del ritmo cardiaco, palpitaciones cardiacas, cefalea, mareos, náusea, vómitos, temores musculares, visión borrosa, entre otros; que han sido reportados en humanos (WHO, 1997).

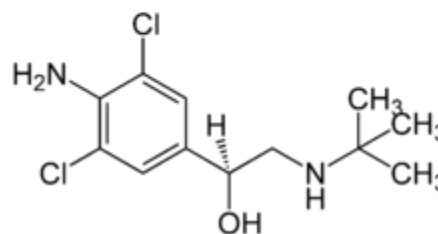
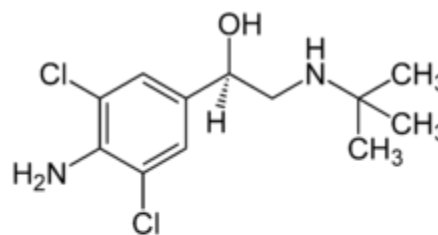
El clenbuterol tiene las siguientes propiedades fisicoquímicas:

Número CAS

37148-27-9

Fórmula y estructura

$C_{12}H_{18}N_2Cl_2O$



Peso molecular

277.19 g/mol

Apariencia

Polvo microcristalino incoloro, sustancia blanca y ligeramente amarillenta

Punto de fusión

174-175.5°C

Solubilidad

Muy soluble en agua, metanol y etanol. Ligeramente soluble en cloroformo, insoluble en benceno

Pico m/z en GC-MS

86

(WHO, 1997)

2. Farmacocinética

a. **Absorción:** El clenbuterol se absorbe rápidamente (70-90%) en un periodo de tiempo entre 15 y 45 minutos. El tiempo de absorción del clenbuterol depende de la vía de administración, por vía oral se alcanzan niveles plasmáticos máximos luego de 2 o 3 horas, por vía subcutánea o intramuscular el tiempo de absorción es de 15-30 minutos. El clenbuterol puede absorberse en el corazón, pulmones, vaso, riñones, cerebro e intestinos (Smith y Paulson, 1997). Estudios demuestran que la absorción en animales rumiantes es más lenta debido a que el pico de absorción máxima se presentó en un intervalo de entre 2 y 12 horas luego de la administración (Oyala, 2012).

b. **Distribución:** El clenbuterol se distribuye a todos los tejidos que tengan presencia de β -adrenoreceptores, principalmente en el ojo, hígado, riñón, placenta y pulmones, con una menor presencia en el tejido muscular (Dirección General de Epidemiología, 2012). Puede atravesar la placenta y por lo tanto tener contacto con el feto. Se ha encontrado una mayor presencia del estereoisómero dextrorrotatorio por lo que se supone que deben ocurrir procesos estereoselectivos durante la distribución y absorción del clenbuterol (Parr, Opfermann y Schänzer, 2009).

c. **Metabolismo.** El metabolismo del clenbuterol se da en el hígado, el metabolito central que se ha identificado en todas las especies es el clenbuterol no metabolizado, luego los óxidos de clenbuterol y conjugados con otras estructuras (Soma, 2004). Por otro lado, se ha encontrado ácido 4-amino-3,5-diclorobenzoico y ácido 4-amino-3,5-diclorohipúrico. En el hígado, los residuos en su mayoría se tratan de clenbuterol mientras que en el músculo se limitan a clenbuterol (Hawkins, 1993). Se convierte en 8 metabolitos de Fase I (menos del 6% de administrado) y no se han reportado metabolitos de fase II (Bres *et al.*, 1985)

En un estudio realizado en ganado, se encontró que el número total de residuos era mayor para los animales que recibían múltiples dosis diarias a aquellos a los que se les administraba una sola inyección. Por lo que la acumulación de clenbuterol en el hígado y demás tejidos depende de la dosificación y tiempo de administración, debido a que se ha demostrado que los niveles máximos se alcanzan luego de 15 días de medicación cuando la degradación se ha hecho más lenta (Dirección General de Epidemiología, 2012) El número total de residuos fue menor a 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en músculo y grasa y de 9.85 y 0.35 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en riñón e hígado. (WHO, 1997). Según la FDA y la Organización Mundial de Salud el límite máximo de residuos es de 0.2 ng/g en músculo y grasa, y 0.6 ng/g en hígado y riñón.

d. Excreción. El clenbuterol se elimina principalmente por la orina y por las heces. En un estudio realizado en ganado bovino, luego de administrar clenbuterol por vía oral, intramuscular e intravenosa, se encontró que la excreción se da sin cambios en un porcentaje de 50-85% en la orina, 5-30% en las heces, 0.9-3% en la leche durante y luego de 4 días después de la administración. En ganado la vida media de eliminación variaba entre 16 y 105 horas dependiendo de la población (WHO,1997). A continuación, se muestran los tiempos de eliminación de clenbuterol en tejidos y fluidos animales:

Cuadro No. 1- Tiempo de eliminación de clenbuterol en tejidos y fluidos animales

Tejido/fluido	Tiempo de eliminación
Plasma	2 días
Orina	3-5 días
Hígado	12-15 días
Retina y pelo	No se elimina

(Dirección Nacional de Epidemiología, 2012)

3. Uso de clenbuterol en animales. El clenbuterol, es utilizado en algunos países, en animales como terneros, ovejas, cerdo, al igual que en los humanos debido a las mismas propiedades terapéuticas como el tratamiento de alergias y broncodilatador en caballos. Se recomienda también para propósitos tocolíticos en dosis de entre 0.3 y 0.6 µg/Kg de forma intramuscular o intravenosa. Debe esperarse un periodo de retiro de 3.5 días para la producción de carne, grasa y riñón en ganado y ovejas, es decir tiempo entre la administración de clenbuterol y la realización del sacrificio. A pesar de esto, deben vigilarse las cantidades de residuos, la cantidad máxima de residuos permitidos en Estados Unidos es de 0.1 µg/ kg en músculo y 0.5 µg/kg en hígado y riñón son aceptados en ganado bovino (Sporano, 1998 y Ovala, 2012).

Sin embargo, también existe un uso ilegal en la ganadería debido a que es utilizado como anabolizante que promueve el crecimiento del músculo cuando se utiliza en dosis mayores a las terapéuticas. El clenbuterol está implicado en la producción acelerada de AMPc (adenosín monofosfato cíclico) en el músculo e hígado, y también producción acelerada de enzimas tipo fosforilasa, que catalizan la transformación de glucógeno en glucosa; por otro lado, también se encuentran implicadas enzimas proteincinasas, lipasas y fosfofructocinasas, entre otras. Por lo que logra un aumento en la velocidad de movilización de los ácidos grasos con formación de ácido láctico en la sangre, el hígado y el músculo. Es el responsable de la formación de proteínas a partir de los nutrientes que salen de los depósitos grasos. En el tejido adiposo, el clenbuterol aumenta

el metabolismo de los lípidos por lo que se reduce la síntesis y esterificación de ácidos grasos, teniendo como resultado una reducción del anabolismo de los lípidos. En el tejido muscular incrementa el AMPc aumentando la perfusión sanguínea hacia el músculo, produciendo una mayor cantidad de aminoácidos y energía, resultado en una hipertrofia muscular (Ovala, 2012).

De manera general, el clenbuterol se une a los receptores en los tejidos que lleva a una activación de las proteínas G y de la adenilil ciclasa. La adenilil ciclasa activada cataliza la síntesis de adenosin monofosfato cíclico a partir de adenosin trifosfato. El adenosin fosfato cíclico (cAMP) causa la conversión de glucógeno en glucosa 6-fosfato. El cAMP también estimula la actividad de la proteinkinasa A (PKA), que está encargada de la regulación del metabolismo de la glucosa y lípido, cataliza la fosforilación de distintas proteínas como glucógeno fosforilasa y la hormona sensible a la lipasa, que lleva a un aumento de la degradación de la grasa y lipólisis.

Los residuos de clenbuterol que se almacenan dentro de los distintos tejidos como músculo, ojo, hígado, corazón y pulmones en los animales pueden afectar las funciones de pulmones y corazón en los seres humanos que ingieren la carne o hígado contaminado excediendo las dosis habituales permitidas (Ovala, 2012).

Cuadro No. 2- Ingesta diaria admisible de clenbuterol por kg de peso corporal y Límites máximos permitidos de residuos (LMR)

Ingesta diaria admisible: 0-0.0004 µg/ kg de peso corporal			
Especie	Tejido	LMR (µg/kg)	Observaciones
Vacuno/ Vaca	Músculo	0.2	Solo se recomiendan los LMR cuando se usa de forma terapéutica en ciertos países
Vacuno/ Vaca	Hígado	0.6	cuando es utilizado como tocolítico o coadyuvante en las terapias de enfermedades respiratorias.

(FAO/OMS, 2015)

4. **Toxicología:** El amplio uso del clenbuterol de manera ilegal en animales como promotor del crecimiento en la producción animal, ha generado casos de intoxicación alimenticia luego de la ingestión de productos cárnicos contaminados con clenbuterol. Hay una prevalencia de la presencia predominante del esteroisómero dextrorrotatorio del clenbuterol en tejidos comestibles por lo que pueden ocurrir procesos estereoselectivos durante la absorción, distribución y metabolismo (Parr, Opfermann y Schänzer. 2009)

El clenbuterol tiene una toxicidad aguda que puede ser de morada a alta, la dosis letal 50, DL₅₀ (dosis de la droga que produce la muerte en el 50% de la población) es de un rango entre 80-180 mg/kg (Parr, Opfermann y Schänzer. 2009; y WHO, 1997).

En el siguiente cuadro se muestran algunos de los casos en los que se han presentado intoxicaciones por clenbuterol en el mundo.

Cuadro No. 3-Intoxicación alimenticia luego del consumo de animales contaminados en el mundo

Tejido	País	Concentración de clenbuterol (µg/g)	Número de casos	Año
Hígado de res	España	1.6-2.9	125	1990
Carne bovina	Italia	0.5	16	1995
Carne bovina	Italia	0.8-7.4	62	1996
Carne bovina	Italia	4.5	62	1996
Carne de ternera	Italia	1.14-1.48	15	1997
Carne bovina e hígado	Portugal	1.2	34	2001
Carne bovina	Portugal	1.2	4	2002 ¹
Hígado de bovino	México	ND	132	2002

ND: dato no disponible

(¹Barbosa *et al.*, 2006; Parr, Opfermann y Schänzer. 2009 y Oyala, 2012).

a. **Síntomas de intoxicación:** En España y Francia, se reportó intoxicación por hígado de ternera en los cuales se encontraron síntomas como temblores musculares, taquicardia (82%), aumento de la presión arterial, dolor muscular, dolor de cabeza, vómitos, sudor y fiebre. Casos similares se presentaron en México en 2005 en las que 225 personas se intoxicaron luego de consumir carne contaminada con clenbuterol, y sufrieron síntomas como temblores (75%), dolores de cabeza (36%) y malestar generalizado (Parr, Opfermann y Schänzer. 2009 y Oyala, 2012).

Dentro de los efectos graves descritos se encuentran alteraciones de la tiroides y disfunciones metabólicas. Por otro lado, el aumento del tamaño células cardíacas con lo que se reduce la capacidad del corazón para bombear sangre y necrosis del músculo cardíaco. Se ha descrito también muerte celular del miocito (apoptosis en los músculos), disminución de la función testicular, cambios en el metabolismo óseo (McKeever y Hoffman, 2007)

En casos de intoxicación aguda, puede ocurrir una arritmia cardíaca, disminución de la presión arterial, náuseas (74%), vómitos y diarrea (50%). La aparición de los síntomas puede variar entre 10 minutos hasta 6 horas, teniendo una duración aproximada en un rango de entre 90 minutos y 6 días (McKeever y Hoffman, 2007 y Ovala, 2012).

b. Tratamiento de intoxicación: Se da el tratamiento de los síntomas como la agitación, hipertensión y efectos simpaticomiméticos con benzodiazepinas. Para la hipertensión se considera que la utilización de metoprolol puede suponer un riesgo por ser un alfa agonista, por lo cual se recomienda el uso de labetalol. También, se recomienda el reemplazo electrolítico y fluidos intravenosos.

5. Normatividad clenbuterol en Guatemala. En Guatemala se emitió el Acuerdo Ministerial No. 821-2007 el 18 de diciembre de 2007, Artículo 1 que dice:

«Se prohíbe el registro, uso y comercialización de CLEMBUTEROL, en todas sus formulaciones, en el ramo pecuario.»

Además, en el Artículo 2 se menciona que el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación velará por el cumplimiento de la prohibición del registro y uso del medicamento.

B. Cromatografía de gases

La cromatografía de gases es una técnica de separación en la que la muestra se vaporiza y se inyecta en una columna cromatográfica, se utiliza para la separación de solventes orgánicos en base a las volatilidades, proporciona información cualitativa y cuantitativa de los componentes de la mezcla. De manera general tiene como elementos, la fase móvil, el puerto de inyección, el horno de la columna, columna, fase estacionaria, detector y sistema de registro de datos (Skoog, *et al.*, 2010).

1. Fase móvil y estacionaria. La fase estacionaria puede ser un líquido retenido sobre la superficie de un sólido inerte por adsorción o por enlaces químicos (cromatografía gas-

líquido), o fases absorbentes (cromatografía gas-sólido), esta última se utiliza en menor proporción (Olguín y Rodríguez, 2004; Skoog *et al.*, 2010 y Harris, 2001)

Como fase móvil se utiliza un gas inerte, esta no interacciona con el analito sino que solo lo transporta a lo largo de la columna. La fase móvil la constituyen gases inertes como Helio, Argón o Nitrógeno. La fase estacionaria separa los componentes de la muestra, en el caso de fases estacionarias sólidas puede tratarse de aluminio, sílica gel, entre otros, si es una fase estacionaria líquida no polares pueden incluirse fenil 5%-metilpolisiloxano o dimetilpolisiloxano al 100% o cualquier otro compuesto que cumpla con las características de tener baja volatilidad (punto de fusión menor a 100°C), estabilidad térmica, que sea químicamente inerte y que tenga características de disolventes. Con este tipo de columnas no polares se separan sustancias poco o no polares, se puede trabajar a temperaturas de hasta 300°C (Olguín y Rodríguez, 2004; Skoog, *et al.*, 2010 y Harris, 2001).

En el caso de la determinación de clenbuterol se recomienda utilizar columnas como DB-5 y HP-1. La columna DB-5 posee las siguientes características:

- El compuesto con el que está recubierto la columna es (5%-fenil)-metilpolisiloxano
- No polar
- Límites altos de temperatura (325-350°C)
- Equivalente a fase USP G27 (Agilent, 2016).

La columna HP- 1 posee las siguientes características:

- 100% dimetilpolisiloxano como recubrimiento de la columna
- No polar
- Equivalente a fase USP G2 (Agilent, 2016).

2. Puerto de inyección: El puerto de inyección tiene como propósito principal convertir la muestra líquida a fase de vapor, la temperatura en su interior debe ser adecuada para permitir una vaporización espontánea, sin que exista vaporización incompleta o degradación de la muestra. En el modo de inyección puede ser de tipo split o splitless; en la inyección tipo Split la muestra se vaporiza y aproximadamente 0.1-10% del vapor entra a la columna por lo que no es recomendada para el análisis de trazas, en el modo de inyección splitless se utiliza para realizar análisis de trazas o en las que el analito se encuentra en bajas concentraciones (nanogramos); la temperatura del inyector para este tipo de inyección debe ser aproximadamente 40°C menor que el punto de ebullición que el solvente de la muestra (Skoog *et al.*, 2008; Poole, 2008; Olguín y Rodríguez, 2004 y Harris, 2001).

3. **Columnas:** Las columnas pueden ser columnas empaquetadas, columnas tubulares abiertas o capilares. Se fabrican generalmente de acero inoxidable, vidrio, sílice fundida o teflón. La temperatura de la columna depende del punto de ebullición de las muestras y del grado de separación que se desea obtener, cuando se quieren analizar muestras con intervalo amplio de ebullición se utiliza un programa de temperaturas de forma continua o escalonada (Skoog *et al.*, 2010).

4. **Detector de masas:** La espectroscopia de masas tiene como etapas: (1) la atomización, (2) conversión de una fracción de átomos, que fueron transformados durante la primera fase, en un flujo de iones, luego se da (3) la separación de iones con base a su relación masa-carga (m/z), “m” representa el número de masa del ion en unidades de masa atómica (UMA) y “z” representa el número de cargas fundamentales de un ion (carga del ión/carga del electrón) y por último (4) se da el conteo del número de iones de cada medición (Skoog *et al.*, 2008 y Skoog *et al.*, 2010).

El espectrómetro de masas es utilizado como detector en la cromatografía de gases, en este caso la tasa de flujo que proviene de la columna capilar es generalmente baja por lo que seguido de la elusión se puede llevar directamente a la cámara de ionización en el detector. Una de las dificultades de la cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas es la degradación térmica debido a las superficies metálicas de la fuente de iones del espectrómetro. Las fuentes de iones más utilizadas son el impacto de electrones y la ionización química. Mientras que los analizadores son los cuadrupolares y los de trampa de iones (Skoog *et al.*, 2008 y Skoog, *et al.*, 2010)

C. Validación de métodos analíticos

Es el proceso mediante el cual se demuestra que un procedimiento analítico es adecuado para los fines por los cuales fue planteado, determina que un método es lo suficientemente exacto y preciso para la obtención de resultados en las condiciones planteadas. La validación debe ser realizada en equipo calificado y cumpliendo los criterios de aceptación (FDA, 2015).

1. Tipos de procedimientos analíticos

a. **Pruebas de identificación:** Pruebas que aseguran la identidad de un analito en una muestra. Se logra mediante la comparación con características como espectro,

comportamiento cromatográfico, y reactividad química, de la muestra con un estándar de referencia.

b. **Determinación de impurezas:** Determinación de impurezas. Pruebas que buscan reflejar la pureza de una muestra o una prueba cuantitativa para límite de impurezas.

c. **Procedimientos de ensayo.** Miden el analito en una muestra (ICH, 2005).

2. Parámetros analíticos

a. **Exactitud:** Expresa qué tan cercano se encuentra el valor encontrado en el análisis al valor teórico o verdadero del estándar de referencia, debe encontrarse dentro del rango especificado para el procedimiento analítico. Se puede determinar mediante la comparación de resultados del método analítico propuesto con los resultados obtenidos de otro procedimiento que se encuentre estandarizado adecuadamente (ICH, 2005; USP, 2006 y RTCA, 2006)

b. **Precisión.** Grado de concordancia entre una serie de mediciones obtenidas a partir de una serie de análisis de la misma muestra homogénea bajo condiciones determinadas. La precisión de una metodología analítica se expresa como la varianza, desviación estándar o coeficiente estándar de variación de una serie de mediciones (ICH, 2005).

1) **Repetibilidad:** Precisión del método para la misma muestra, en las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo. También es llamada “precisión intra-ensayo”. Se utilizan un mínimo de 9 determinaciones que cubran el rango del procedimiento.

2) **Precisión intermedia:** expresa variaciones que pueden ocurrir por la variación de día, analista, equipo, entre otros. Se deben establecer los efectos que pueden tener circunstancias que se presenten de manera aleatoria como los días, analistas, equipo, entre otros.

3) **Reproducibilidad:** indica la precisión entre laboratorios, se aplica a estandarización de metodologías (ICH, 2005).

c. **Especificidad.** Capacidad del proceso analítico de medir el analito, de manera inequívoca y exacta, en presencia de componentes que no se espera que se encuentren en la muestra como impurezas o productos de degradación. En los procedimientos analíticos de identificación se utiliza para asegurar la identidad del analito. En el caso de una validación para identificación, el método debe ser capaz de diferenciar entre compuestos que tengan estructuras parecidas que posiblemente se encuentren presentes en la muestra. Por lo que se puede realizar mediante la comparación con un estándar de referencia como un control positivo, y como control

negativo una muestra que no contenga el analito para una futura comparación (ICH, 2005; USP, 2006 y RTCA, 2006)

d. Límite de detección. Es la mínima cantidad de analítico que puede ser detectada, más no necesariamente cuantificada (ICH, 2005). Puede determinarse por:

1) Señal de ruido. Se compara las señales medidas con muestras a bajas concentraciones del analito a las señales obtenidas en muestras que no contienen el analito, y determinar a qué concentración el analito puede ser detectado.

2) Basado en la desviación estándar de la respuesta y pendiente

$$DL = \frac{3.3 \sigma}{S}$$

3) Basado en la desviación estándar del blanco

4) Basado en la curva de calibración (ICH, 2005).

e. Límite de cuantificación. Es la cantidad mínima de analito en una muestra que puede ser determinado de manera cuantitativa con precisión y exactitud. Se utiliza principalmente en la determinación de impurezas o productos de degradación, debido a que es un parámetro de los ensayos cuantitativos en los cuales existe una baja cantidad de compuestos dentro de una muestra. Al igual que para el límite de detección puede utilizarse la señal de ruido con la utilización de una muestra con el analito y una sin el analito y determinar la mínima concentración a la que el analito puede ser cuantificado. También, puede terminarse por la desviación estándar de la respuesta y pendiente ($QL = 10 \sigma/S$) y la desviación estándar del blanco y curva de calibración (ICH, 2005).

f. Linealidad. Es la capacidad de un método analítico de obtener resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra en un intervalo determinado. Se evalúa con una serie de puntos en función de la concentración del analito, que se acompaña con la utilización de herramientas estadísticas como el trazo de una línea de regresión por el método de mínimos cuadrados. Deben proporcionarse datos como el coeficiente de correlación lineal, el intercepto en y, la pendiente de la línea y la suma de residuos cuadrados. Se recomiendan un mínimo de 5 concentraciones para establecer la linealidad (ICH, 2005).

g. Rango. Intervalo entre la concentración superior e inferior del analito en la muestra, que incluye estas concentraciones, para el que el procedimiento analítico tenga un nivel adecuado de linealidad, exactitud y precisión. Normalmente se extrae de la linealidad y se obtiene mediante

la confirmación de que el procedimiento analítico da un adecuado grado de linealidad, exactitud y precisión cuando es aplicado a las muestras que contienen el analítico (ICH, 2005).

h. Robustez. Medida de la capacidad del método analítico de no verse afectado por variaciones, incluso pequeñas, en los parámetros de medición por lo que hace que el método sea fiable bajo condiciones normales de operación (ICH, 2005). Dentro de las variaciones que pueden presentarse se encuentran:

- Estabilidad de las soluciones analíticas
- Tiempo de extracción
- Uso de diferentes columnas (cromatografía de gases)
- Temperatura (cromatografía de gases)
- Velocidad de flujo (cromatografía de gases) (ICH, 2005).

IV. MARCO METODOLÓGICO

A. Objetivos

1. Generales

a. Desarrollar, estandarizar y validar un método por cromatografía de gases, que cumpla con las directrices de validación propuestas en la Conferencia Internacional de Armonización (ICH), para la identificación y cuantificación de clenbuterol en músculo bovino.

b. Generar información respecto a la calidad de la carne en cuanto al contenido de clenbuterol en Guatemala.

2. Específicos

a. Determinar la linealidad, precisión, exactitud, robustez y selectividad del método a desarrollar.

b. Desarrollar una metodología que sea exacta y precisa para la cuantificación y determinación de la presencia de clenbuterol en músculo bovino

c. Evaluar la presencia de Clenbuterol en muestras de carne de bovino obtenidas por el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación (MAGA)

B. Población y muestra

1. Población: La población de la investigación es músculo bovino (carne) comercializado en Guatemala.

2. Muestra: La muestra consistió en 3 muestras de carne de bovino

C. Procedimientos

El procedimiento se desarrolló en ocho pasos generales para la muestra:

1. **Recopilación de información.** Se recopiló información de fuentes como artículos científicos y guías con directrices internacionales para el manejo del clenbuterol en la carne.

2. **Muestreo.** Se tomaron muestras de 500 g de carne de bovino, mediante un muestreo sistemático, se seleccionó la muestra de cada cantidad de producto a ser sometido a muestreo. Se almacenaron las muestras a -4°C hasta la fecha que se realizó el análisis.

3. Preparación de estándares (ver anexo para esquema)

1) Soluciones patrón

a) **Solución stock:** En un matraz volumétrico de 5 mL se disolvieron 2.5 mg de estándar de clorhidrato de clenbuterol en metanol para obtener una concentración final de 0.5 mg/mL.

b) **Soluciones hijas:** Las soluciones de trabajo se prepararon cada día por dilución con metanol. En un balón aforado de 5 mL, añadir 0.5 mL de la solución stock.

c) Soluciones netas

- 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$: En un matraz de 1 mL, se agregaron 20 μL de solución stock, aforar con metanol.
- 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$: En un matraz de 1 mL, se agregaron 100 μL de solución stock, aforar con metanol.
- 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$: En un matraz de 1 mL, se agregaron 200 μL de solución stock, aforar con metanol.
- 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$: En un matraz de 1 mL, se agregaron 400 μL de solución stock, aforar con metanol.
- 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$: En un matraz de 1 mL, se agregaron 600 μL de solución stock, aforar con metanol.
- 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$: En un matraz de 1 mL, se agregaron 800 μL de solución stock, aforar con metanol.

Se almacenaron soluciones patrón por debajo de 0°C .

d) **Solución patrón interno:** En un matraz volumétrico de 5 mL disolver 2.5 mg de estándar interno de metoprolol en metanol para obtener una concentración final de 0.5 mg/mL. Se realizó una solución hija de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, de la cual se tomaron 100 μL y se añadieron al balón de 1 mL, a cada uno de los balones de soluciones netas de clenbuterol.

2) Luego de añadidas las soluciones patrón, se evaporaron con flujo de nitrógeno a 40°C y se pasó al proceso de derivatización.

4. Extracción: no se logró determinar un método efectivo para la extracción de clenbuterol en músculo bovino.

5. Purificación: no se logró determinar un método efectivo para la purificación del extracto de la matriz de clenbuterol mediante la utilización de columnas de fase sólida C18.

6. Derivatización

a. Se añadieron 100 μ L de mezcla de BSTFA/TMCS 99:1 y 100 μ L de acetato de etilo al residuo en el balón de 1 mL y se taparon con tapón de vidrio.

b. Se calentó a 70°C por 30 minutos en un calentador de bloque, hasta completar el proceso de derivatización.

c. Se evaporó la solución a sequedad bajo condiciones de flujo de nitrógeno.

d. Se reconstituyó la muestra en 1mL de acetato de etilo.

e. Se inyectaron 5 μ L de la muestra en el cromatógrafo de gases.

f. Se repitió la inyección para completar un análisis en duplicado

7. Desarrollo del método

a. Condiciones cromatográficas

1) Columna

a) Columna capilar HP-5MS (5%-fenil metilpolisiloxano)de 30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 μ m

2) Inyector

a) Temperatura: 280°C

b) Modo: splitless

3) Gas acarreador (fase móvil): Helio

4) Flujo de fase móvil: 1 mL/min

5) Temperatura de horno:

a) 70 °C (0.1 min) a 245°C a una tasa de 15 °C/min. Mantener esta temperatura por 1 minuto

b) Elevar la temperatura a 270°C a 30°C/min y mantener por 10 minutos

6) Temperatura del detector: 280°C

7) Modo: impacto de electrones (EI)

Modo del sistema: SIM con detección de iones 86 y 262 m/z para clenbuterol y 72 y 223 m/z para metoprolol

b. Procedimiento

- 1) Se estabilizó la columna
- 2) Se inyectaron volúmenes de 5 μL para cada muestra
- 3) Se obtuvieron los cromatogramas utilizando software del equipo.

8. Validación del método

a. Linealidad: Se analizó por triplicado cada una de las concentraciones utilizadas en la curva de calibración 1, 5, 10 20, 30 y 40 $\mu\text{g/ml}$. Se construyó una curva de calibración, con el coeficiente de correlación lineal menor al 0.990, y el coeficiente de determinación (r^2) de 0.98. Se evaluó el coeficiente de variación, que debía ser igual o menor al 2.0%, el intercepto en y debe ser aproximadamente 0.

b. Exactitud: Se analizó por duplicado una solución de concentración 20 $\mu\text{g/mL}$. Se evaluó la exactitud mediante el porcentaje de recuperación, que debía encontrarse entre $\pm 15\%$ del valor teórico, además la desviación estándar y la desviación estándar relativa.

c. Precisión

1) Precisión intermedia. Preparar por separado 6 soluciones a una concentración 5 $\mu\text{g/ mL}$, se realizaron las determinaciones diferente día. Se calculó la desviación estándar relativa, esta debe ser menor al 10%.

2) Repetibilidad Se analizó por triplicado soluciones de concentraciones 10 $\mu\text{g/mL}$ (80%), 20 $\mu\text{g/mL}$ (100%) y 30 $\mu\text{g/mL}$ (120%). Se inyectaron 5 μL de cada una de las soluciones, 3 veces y se calculó el coeficiente de variación.

d. Límite de detección: Se inyectó 20 veces el blanco (metoprolol derivatizado en acetato de etilo), Se calculó la desviación estándar de la medición de los blancos, y se le sumó tres veces la desviación estándar.

e. Límite de cuantificación: Se utilizó la media de las mediciones de los 20 blancos del límite de detección y se le sumó el resultado de la desviación estándar multiplicado por 10.

f. Robustez: se cambió la temperatura del horno a iniciando con 120°C con la misma rampa de temperatura definida por el método.

g. Selectividad: Comparación de picos obtenidos por estándar y la muestra para la presencia de clenbuterol. No se realizó este procedimiento.

h. Rango: se verificó que hubiera precisión, exactitud y linealidad en el intervalo de concentraciones máxima y mínima.

D. Diseño de investigación

1. Desarrollo del método

- El método para el análisis de clenbuterol debe poder ser utilizado para el análisis de residuos de clenbuterol en carne de bovino.
- Se realizó una curva de calibración con un patrón estándar para comprobar que el analito detectado en la muestra se trata de clenbuterol.

2. Validación del Método

- Se utilizaron los parámetros de validación propuestos por la ICH, USP y RTCA.

3. Verificación de la Validación del método

- Se utilizaron los parámetros estadísticos como desviación estándar, desviación estándar relativa, porcentaje de recuperación, límite de detección y cuantificación, método de mínimos cuadrados para la aceptación o verificación de que el método propuesto es validable.

E. Análisis estadístico

1. Promedio: La media de la muestra es el promedio aritmético de una muestra extraída de una población de datos. Se calcula con la suma de los valores medidos (X_i) dividida entre el número de valores medidos (N) (Skoog *et al.*, 2008).

$$\bar{x} = \frac{\sum X_i}{N}$$

2. Desviación estándar y RSD. La desviación estándar es la medida de la precisión de una población o muestra de datos; también se denomina como una medida del grado de proximidad de los datos respecto al valor de la media. A menor desviación estándar, hay menor

distribución de los datos y error aleatorio, también se dice que el método es más preciso. (Skoog et al, 2008 y Gómez, 2010). Se calcula mediante la ecuación:

$$\text{Desviación estándar } (S) = \sqrt{\frac{\sum(X_i - \bar{x})^2}{N - 1}}$$

En donde X_i se refiere a la medición realizada, \bar{x} a la media de la muestra y N-1 los grados de libertad.

La desviación estándar relativa (RSD), es un parámetro estadístico utilizado en el laboratorio para determinar también precisión, está expresada de la siguiente forma (Gómez, 2011):

$$RSD = s/\bar{x}$$

También es llamada coeficiente de variación y se expresa en términos de porcentaje:

$$CV = \left(\frac{S}{\bar{x}}\right) * 100$$

El coeficiente de variación y la desviación estándar relativa proporciona la desviación de los datos analizados sin tomar en cuenta la medida ni la metodología analizada, es decir no toma en cuenta la variación de la concentración. Es decir, que refleja un índice de la desviación estándar respecto a la concentración por lo que proporciona una mejor estimación de la distribución de los datos en un rango de concentraciones (Gómez, 2011)

La desviación estándar como medida de precisión tiene una mayor confiabilidad cuando el grado de confianza de la desviación es mayor, esto se logra mediante la realización de una mayor cantidad de mediciones (N), cuando N es mayor a 20, la desviación estándar de la muestra se acerca más a la desviación estándar poblacional (Skoog *et al.*, 2008).

3. Intervalos de confianza. Los intervalos de confianza surgen como respuesta a las limitaciones de muestreo para obtener una media poblacional cuyo valor sea verdadero y exacto, entonces se calculan estos intervalos en torno a la media, en los que se tiene cierta probabilidad de que se encuentre incluida la media poblacional y por lo tanto obtener una media poblacional verdadera.

Los intervalos de confianza tienen límites denominados límites de confianza que son los valores dentro de los que se encuentra la media poblacional. La amplitud de los intervalos de

confianza se obtiene a partir de la desviación estándar muestral, la siguiente fórmula es aplicable cuando se desconoce la desviación estándar poblacional

$$IC \text{ de } \mu = \bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{N}}$$

Se utiliza el parámetro estadístico t para expresar la variabilidad de la desviación estándar, este valor está definido por el nivel de confianza que se desee utilizar y los grados de libertad.

4. Prueba (t). La prueba t, corresponde al conjunto de pruebas de significancia. Tiene como objetivo comparar, tomando en cuenta la dispersión de los datos, la media de la muestra calculada experimentalmente y el valor considerado verdadero, por lo que el resultado de la prueba demuestra si ambos valores difieren de manera significativa para determinado grado de probabilidad o confianza. Se calcula con la siguiente fórmula (Skoog *et al.*, 2008).

$$t = \frac{|x - \bar{x}|}{S * \sqrt{n}}$$

En donde x es el valor al cual se le quiere evaluar la diferencia con el valor de referencia (\bar{x}), n es la cantidad de datos y S es la desviación estándar muestral. Para el resultado $t_{absolluto} < t_{critico}$. En la siguiente tabla se buscan el valor t crítico basado en los grados de libertad, el nivel de confianza y el nivel de significancia (α) para calcular el nivel de confianza ($\alpha = 0.05$ corresponde a un nivel de confianza del 95%). (Duffau *et al.*, 2010).

Cuadro No.4-Valores de distribución para la prueba "t"

α	0.100	0.05	0.025
1	6.314	12.706	25.452
2	2.920	4.403	6.205
3	2.353	3.182	4.176
4	2.132	2.776	3.495
5	2.015	2.571	3.163

(Duffau *et al.*, 2010)

5. Sesgo. Diferencia entre la expectativa relativa de los resultados de una medición y el valor verdadero. Como valor de referencia puede tomarse el valor de la medición de material de referencia, material de control o material fortificado. Para esto se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{Sesgo} = x - x_{\text{referencia}}$$

6. **Recuperación.** Definido por (Duffau *et al.*, 2010) es la fracción de la sustancia agregada a la muestra (muestra fortificada) antes del análisis, al ser analizadas muestras fortificadas y muestras sin fortificar. Se utiliza para determinar la exactitud de un método analítico. El porcentaje de recuperación puede calcularse con la siguiente fórmula:

$$R = \left| \frac{C_e - C_o}{C_a} \right|$$

El valor C_e corresponde a la concentración del analito en la muestra enriquecida, el valor C_o es la concentración del analito en la muestra sin ninguna modificación y C_a corresponde a la concentración del analito adicionado a la muestra enriquecida. Luego puede calcularse el porcentaje de recuperación que es como sigue:

$$\%R = (R) * 100$$

7. **Método de los mínimos cuadrados.** Es el método utilizado con el fin de determinar la linealidad de una validación analítica, se realiza mediante el desarrollo de un gráfico de concentración versus respuesta (función respuesta). A partir del gráfico se establece de manera cualitativa el rango lineal y se grafica (curva de calibración). Luego de esto se evalúan los estimadores de regresión lineal del gráfico:

- Pendiente (m)
- Coeficiente de correlación (r)
- Intercepto en y

Y se construye la siguiente ecuación:

$$y = mx + b$$

El coeficiente de correlación indica la correspondencia entre la variable concentración y la variable de respuesta en la curva de calibración. El valor puede estar comprendido entre el rango de -1 a 1, el valor máximo 1 indica la correlación lineal exacta. Para una curva de calibración se recomienda un valor de 0.999.

8. **Límite de detección (LOD):** según (Duffau *et al.*, 2010) se recomienda el cálculo de al menos 6 mediciones del blanco, reactivo o concentración estimada cercana al rango:

$$LOD = 2t_{(1-\alpha)} * S_o$$

Si el intervalo de confianza se realiza al 95% la fórmula podría simplificarse como:

$$LOD = 3.29 * S_o$$

9. Límite de cuantificación: según (Duffau *et al.*, 2010) se calcula con la fórmula:

$$LOD = 10 * S_o$$

V. MARCO OPERATIVO

F. Recabación y tratamiento de los datos.

1. Selección de muestras: Se recibieron 3 muestras de 500 g de carne de bovino con ensayo ELISA positivo para beta-agonistas.

2. Tratamiento de datos: De los resultados obtenidos, se realizó la estadística descriptiva para determinar el cumplimiento de los parámetros analíticos propuestos por ICH para la validación de métodos.

G. Recursos

1. Recursos humanos

Autora: Ana Lucía Valdéz Micheo

Asesora: Licda. Ana Luisa Mendizábal de Montenegro

Colaboradores: Dr. Herber Morales

Asesor: Dr. Elfego Rolando López García

1. Recursos materiales.

a. Equipo

- | | |
|---|---|
| 1) Cromatógrafo de gases
marca Agilent modelo
6859 | 3) Potenciómetro marca Fischer
Scientific |
| a) Autoinyector marca
Agilent modelo 6850 | 6) Micropipeta Transferpette de
capacidades: 10, 100, 1000 µl y 5 ml. |
| b) Columna HP-5MS marca
Agilent | 7) Centrífuga marca Eppendorf con
capacidad para tubos de 50 mL y
refrigeración |
| c) Detector de masas marca
Agilent 5957C | 8) Mortero y pistilo |
| 4) Columna SPE Bond Elut C18
marca Agilent | 9) Vórtex marca Eurolab |
| 5) Balanza analítica marca Ohaus
Analytical Plus ±0.00001g | 10) Calentador de bloque marca Talboys |
| | 11) JT Baker 10 SPE Procesador de
columnas de fase sólida con vacío |

b. Cristalería

- 1) Beakers de 5, 10, 25, 50, 100, 150 mL
- 2) Pipetas volumétricas de 1 mL
- 3) Balones aforados de 1 y 5 mL
- 4) Pipetas Pasteur
- 5) Viales para inyección de 1 mL con tapones crimper
- 6) Insertos para viales de 250 μ l
- 7) Tubos de vidrio

c. Reactivos

- | | |
|---|--|
| 1) Estándar de Clenbuterol
HCl | 8) N-heptano |
| 2) Helio (gas acarreador) | 9) Buffer tris (hidroximetilaminoetano)
marca Merck |
| 3) Fosfato dihidrógeno de
potasio marca Merck
99.5% | 10) Hidróxido de sodio Merck 99% |
| 4) Ácido perclórico | 11) Ácido clorhídrico Merck 37% |
| 5) Acetato de etilo para
análisis marca Merck
99.5% | 12) Ácido fosfórico EM |
| 6) Ácido fórmico | 13) Nitrógeno gaseoso |
| 7) Metanol para HPLC
marca Merck 99.8 | 14) Viales con 99:1 BSTFA/TMCS
marca Supelco |

VI. RESULTADOS

A. Precisión (repetibilidad)

Cuadro No. 5 – Repetibilidad de 6 inyecciones de estándar de clenbuterol

Concentración ($\pm 0.052 \mu\text{g/mL}$)	Relación área (clenbuterol/metoprolol)	Desviación estándar	Coefficiente de Variación (%)	Coefficiente de Variación de Horwitz
5.120	1.5053	0.231	15.37	16
10.240	2.6623	0.264	9.90	
20.480	4.7529	0.514	10.81	

B. Especificidad

Cuadro No. 6 – “Promedio de tiempos de retención de soluciones estándar de clenbuterol”

No. de Inyecciones	Tiempo de retención	Desviación estándar	Coefficiente de variación	Coefficiente de variación esperado por ICH
15	11.319	0.004	0.036	<2%

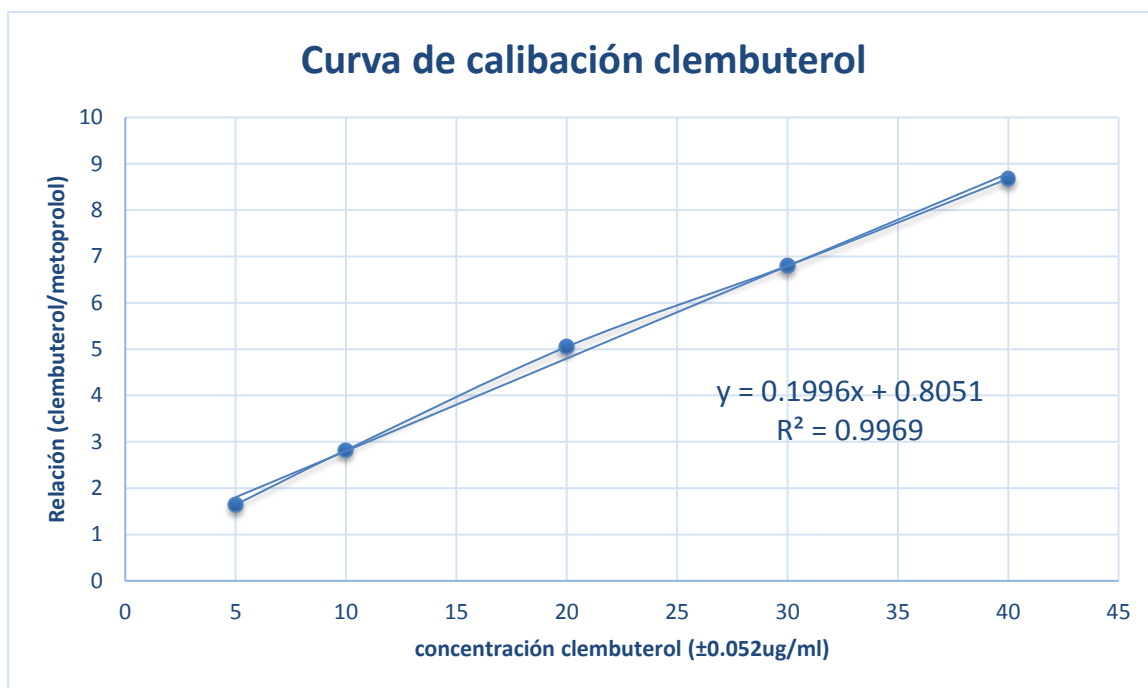
C. Linealidad

Cuadro No. 7 – “Curva de calibración de soluciones estándar de clenbuterol”

Concentración ($\pm 0.052 \mu\text{g/mL}$)	Relación área (clenbuterol/metoprolol)
5.120	1.642556937
10.240	2.819671012
20.480	5.049844232
30.720	6.797070658
40.960	8.677161972

$Y=0.1996x + 0.8051$
Coefficiente de correlación (r^2)=0.9969
R=0.9984

Gráfico No. 1- Curva de calibración de estándares de clenbuterol en una concentración de 5.00 a 40.00µg/mL



D. Límite de detección y Límite de cuantificación

Cuadro No. 8 – “Resultados de límite de detección y límite de cuantificación”

	$\mu\text{g/mL}$
Límite de detección	0.0018
Límite de cuantificación	0.0054

E. Robustez: Ver Gráfico No. 4, en apéndice, sección de datos experimentales.

H. Gráficos y figuras

Gráfico No. 2 -Comparación de abundancia inyección de 1 μ L (negro) y 5 μ L (azul)

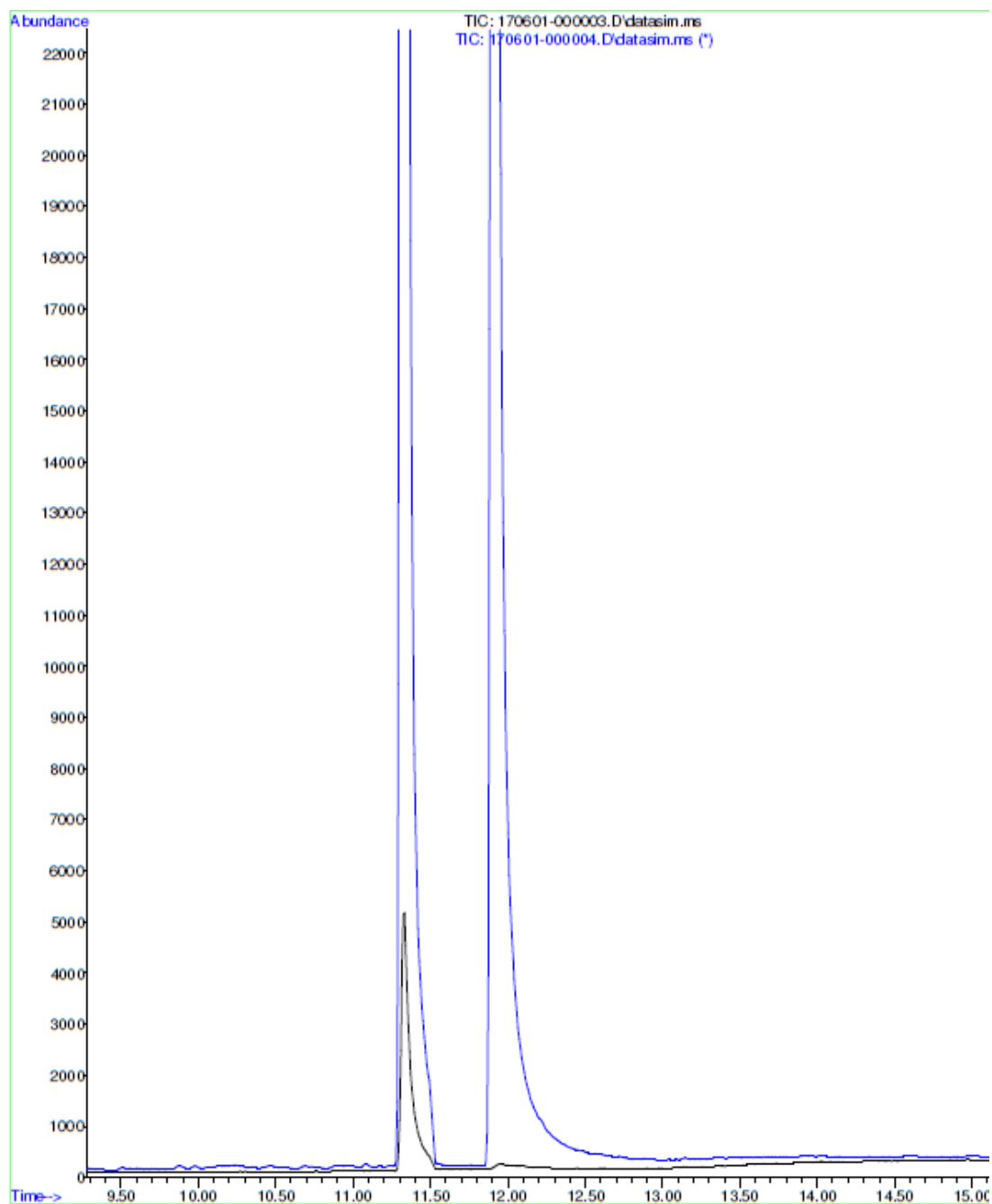


Gráfico No 3- Cromatograma de clenbuterol y metoprolol identificados por la biblioteca de NIST en los tiempos de retención de 11.363 y 11.937 respectivamente



Gráfico No. 4 -Comparación de temperatura inicial de horno, en azul 70°C y en negro a 120°C para parámetro de robustez

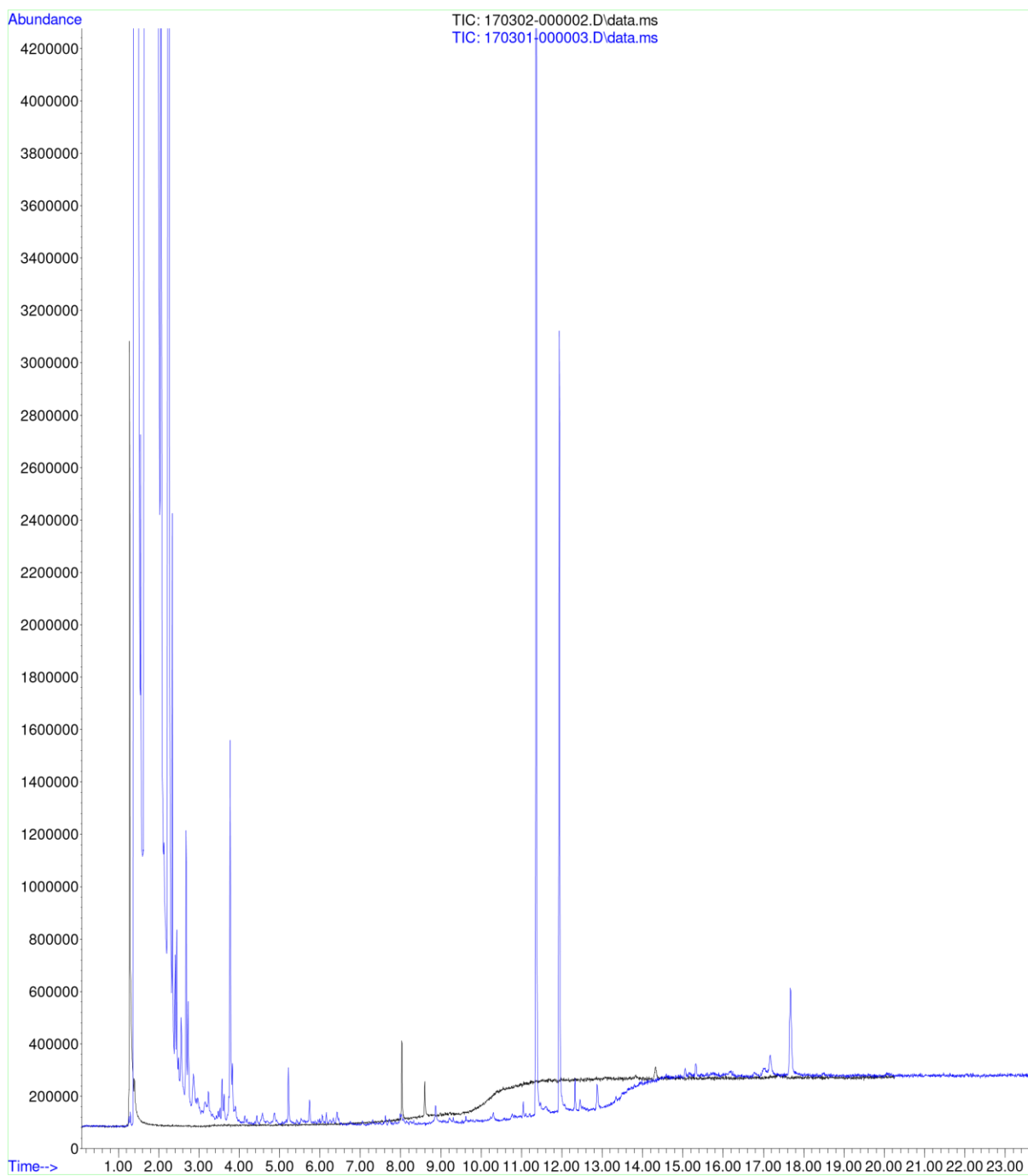
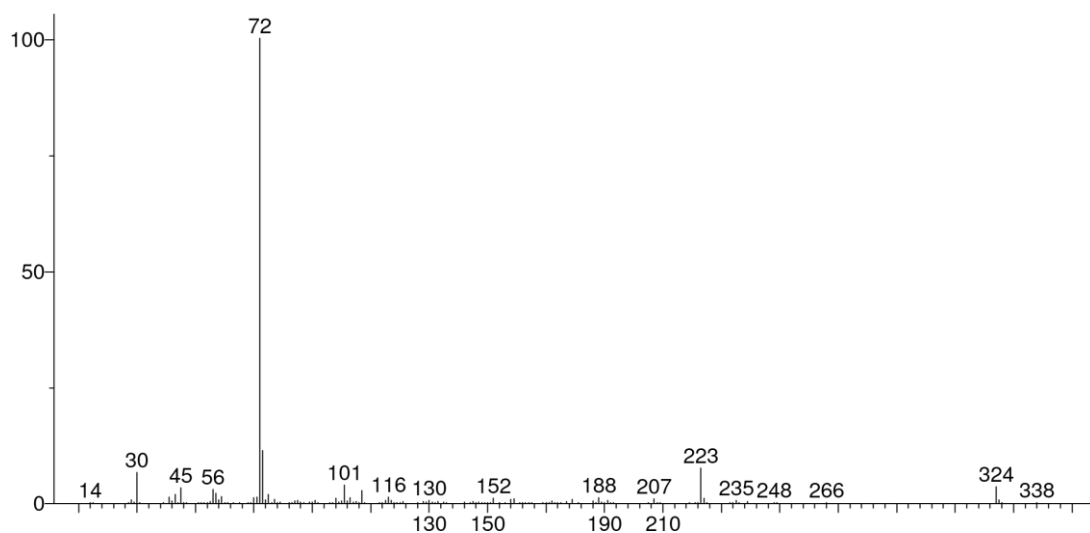
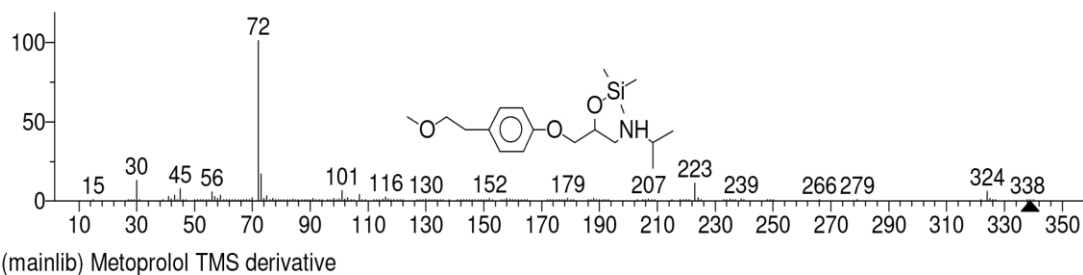
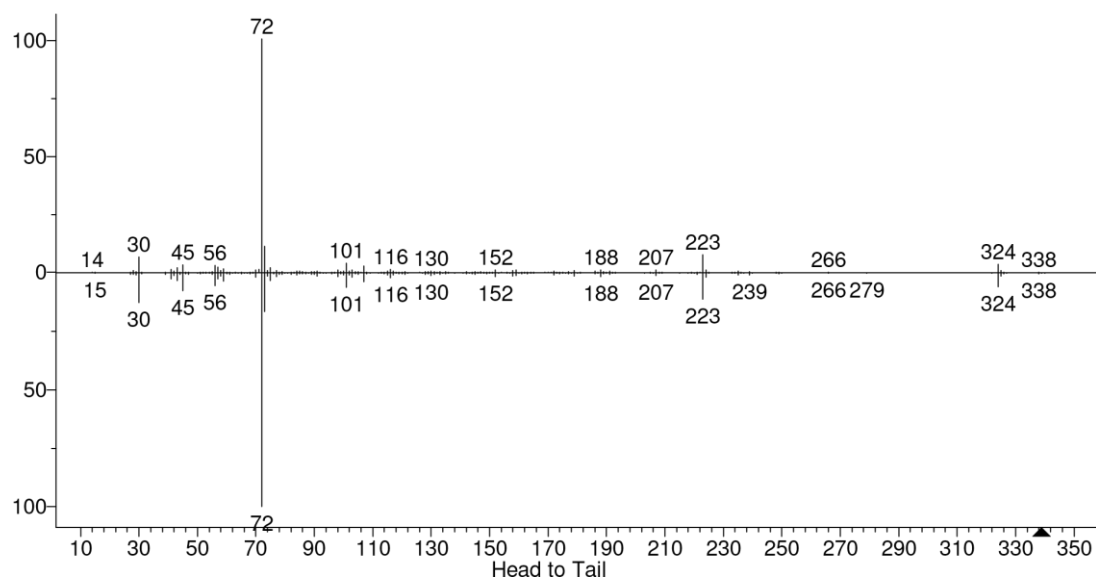


Figura No. 1- Comparación espectros de masas de la señal obtenida por el metoprolol de manera experimental y el espectro teórico de masas

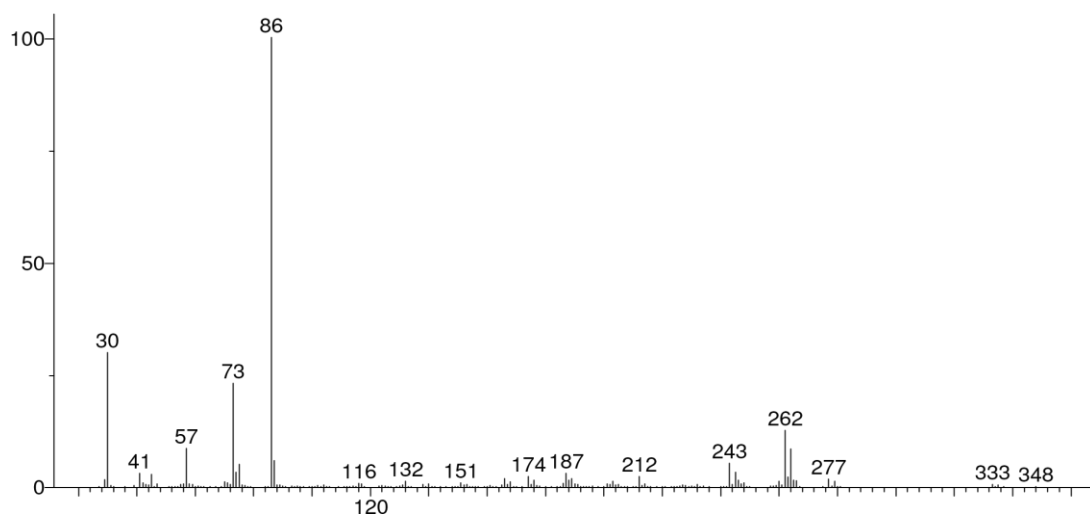


(Text File) Average of 11.932 a 11.945 min.: 170301-000002.D\data.ms

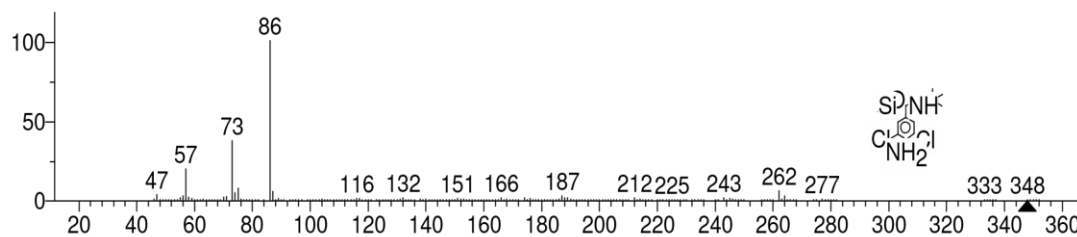
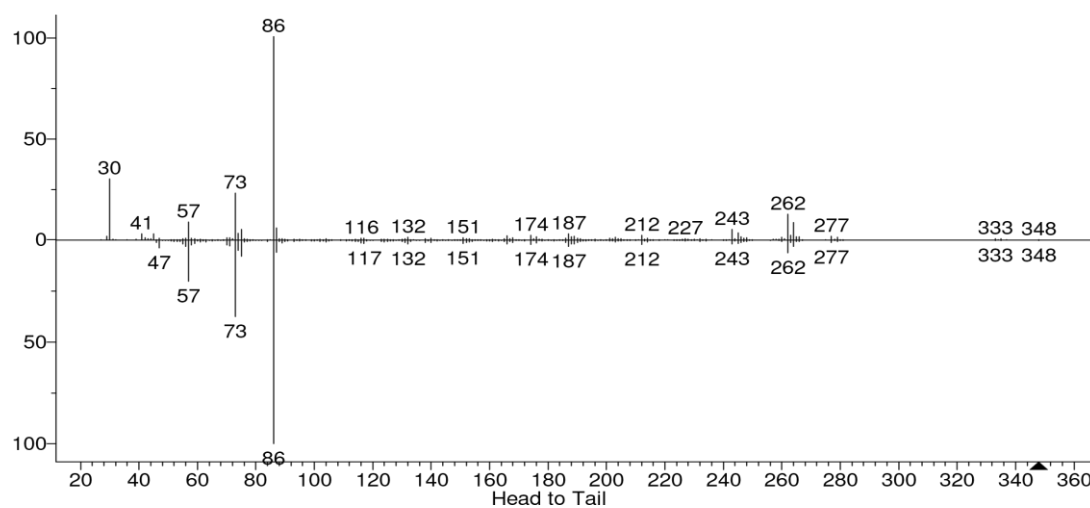


(mainlib) Metoprolol TMS derivative

Figura No. 2- Comparación espectro de masas del clenbuterol obtenido de forma experimental y el espectro teórico de masas del clenbuterol



(Text File) Average of 11.354 a 11.372 min.: 170301-000002.D\data.ms



(mainlib) Clenbuterol TMS derivative

Gráfico No. 5- Comparación de gráficos al configurar el equipo con la opción SIM (inferior) y la opción SCAN (superior)

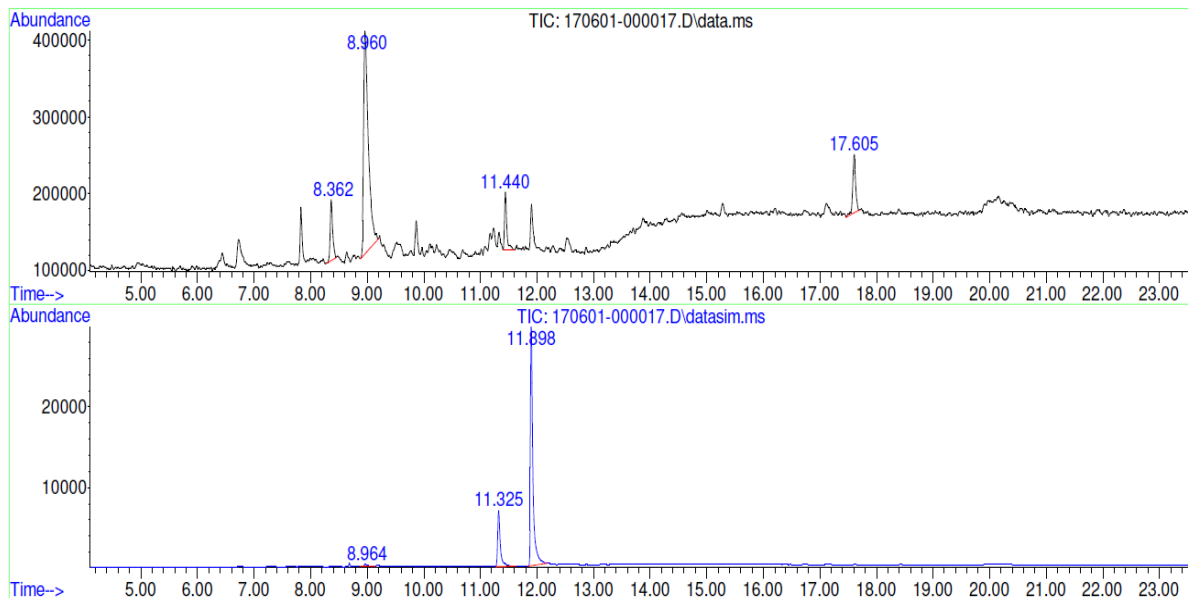
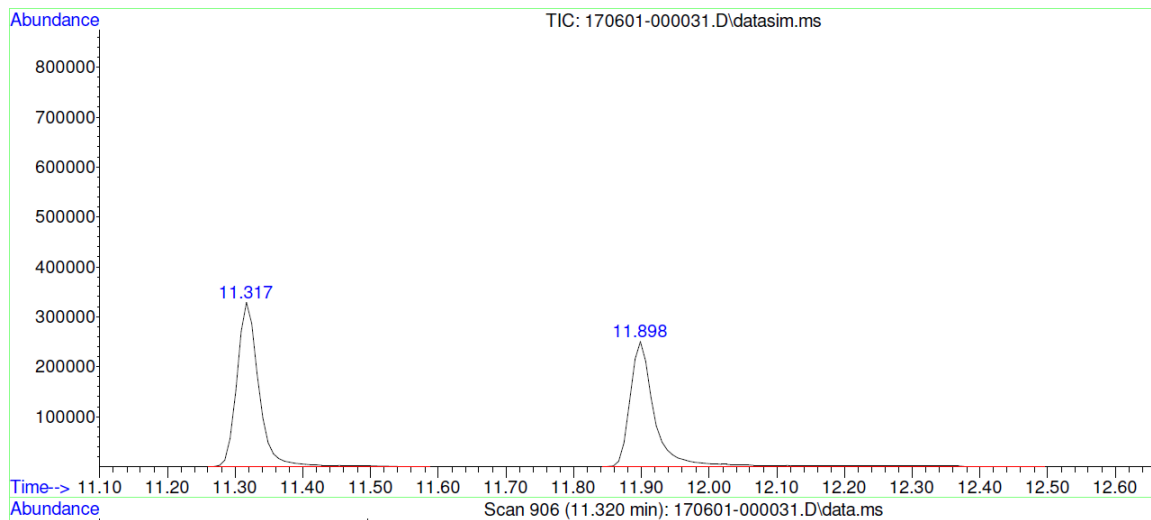


Gráfico No. 6- Resolución picos de clenbuterol-TMS (derivatizado) en tiempo de retención de 11.317 min y metoprolol-TMS (derivatizado) en 11.898 min.



VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

A. Metodología

1. **Estándares:** Inicialmente el Laboratorio de Inocuidad proporcionó la metodología propuesta por Borges *et al.* 2005, en la cual se analizó el clenbuterol sin derivatizar disuelto en tolueno, en un rango de 0.001 mg/mL a 1 mg/mL, sin la utilización de estándar interno. Sin embargo, se observó que el clenbuterol clorhidrato no era soluble en tolueno, además de que la referencia no mostraba gráficos en los que pudieran verse picos del clenbuterol con una buena resolución.

Por lo que, se utilizó la metodología propuesta por Estrada-Montoya *et al.* 2008, y se realizaron modificaciones como la utilización de estándar interno, en este caso metoprolol, para eliminar variaciones propias de la técnica analítica. Además, en la metodología de Estrada-Montoya *et al.* 2008 en la sección de “Soluciones estándar”, la solución stock de clenbuterol no se utilizó como solvente agua destilada sino en metanol, debido a que el metoprolol tiene una mayor solubilidad en metanol que en agua destilada. Se observó que ambas soluciones eran estables al ser almacenadas a una temperatura de 4°C por periodos mayores a una semana.

Además, se utilizaron volúmenes de inyección de 5 µl en vez de 1 µL, ya que, como se observa en el Gráfico No.2, se obtiene una mayor respuesta y de mejor resolución del clenbuterol y metoprolol, que al inyectar solo 1 µL. Por otro lado, se configuraron parámetros del modo SIM (*Selected-ion monitoring*), en el que se programaron los iones característicos del clenbuterol en el espectro de masas (86 y 262 m/z) y del metoprolol (72 y 223 m/z); con esto se logró identificar residuos de clenbuterol en cantidades de partes por millón con una buena resolución.

Considerando, que el proceso de derivatización con grupos silano es sensible a la humedad, se evaluaron medidas como: secar la cristalería con acetona, calentar la cristalería en el horno a 100°C para eliminar restos de agua, y guardarla en la desecadora junto con el reactivo derivatizante; por otro lado, añadir sulfato de sodio anhidro al acetato de etilo para eliminar cualquier resto de agua que pudiera interferir tanto en la reacción de derivatización, como en los productos derivatizados. También, se añadió un exceso de reactivo derivatizante para asegurar el desarrollo de la reacción y que se diera la sustitución del hidrógeno del hidroxilo de la molécula de clenbuterol que pudiera sustituirse con el grupo silano. El reactivo BSTFA/TMCS, como derivatizante demostró ser efectivo para la reacción con los grupos hidroxilo del clenbuterol con

silano, con formación de productos derivatizados con estabilidad de hasta dos semanas para los estándares, y una buena resolución en el cromatograma.

Para eliminar interferencias, durante el proceso de análisis se cambió la septa del puerto de inyección y el liner, además de realizarse el proceso “bake out” con el que se logró eliminar contaminantes de alto punto de ebullición que pudieran interferir en la medición del analito en el detector. También se analizaron los reportes de “auto tune” y “standard tune” del equipo, con esta con la que se calibra el equipo con ayuda del estándar PFTBA, además de poder detectar el funcionamiento óptimo del equipo, la cantidad de agua, nitrógeno, oxígeno y dióxido de carbono, cuyos niveles siempre se mantuvieron por debajo del 10%, por lo que se eliminó la posibilidad de la existencia de fugas en la puerta de vacío o en la entrada de la columna (Agilent, 2017).

2. Muestras: Para el análisis de muestras se evaluaron tres métodos de extracción distintos. El primer método fue el descrito por Estrada-Montoya *et al.* 2008; en este método se utilizaba la homogenización de 1 gramo de carne con buffer acuoso de Tris, seguida de una extracción líquido-líquido para eliminación de compuestos no polares, una digestión con ácido perclórico de la cual se tomaba la parte líquida y se pasaba a través de una columna de extracción de fase sólida C18, que previamente se acondicionaba con metanol y se efectuaban lavados con buffer de fosfatos pH 6, utilizando finalmente metanol como eluyente. Para esta técnica, se enriquecieron las muestras para dar una concentración final de 20 µg/mL, luego que se eluyeron los residuos con metanol se secaron con flujo de nitrógeno, se observó la formación de un líquido aceitoso soluble en metanol, pero no soluble en acetato de etilo. Luego de realizar el proceso de derivatización, se analizaron las muestras no obteniendo señales del clenbuterol ni metoprolol en el cromatograma.

Para la segunda técnica, se utilizó la extracción directa con acetonitrilo propuesta por Sniegocki *et al.*, 2002 y luego se hizo pasar por la columna de extracción de fase sólida, utilizando metanol también como eluyente y acondicionador de columna. Luego del paso por la columna, al evaporar el metanol se observó el residuo denso y aceitoso que también fue visible para el primer procedimiento. En este caso se enriqueció la muestra con cantidades por encima de la curva de calibración, en el rango de miligramos, para lo cual se obtuvieron picos en el cromatograma tanto para el clenbuterol como el metoprolol. Se procedió a enriquecer la muestra con valores dentro de la curva y con estos ya no se obtuvieron resultados positivos, por lo que se decidió utilizar un buffer acuoso pH 8.5 para lograr una mejor homogenización de la muestra, logrando resultados invariables entre la técnica original y la técnica modificada.

Como se mencionó, en ambas técnicas se obtuvo un residuo aceitoso como eluato luego de pasar la muestra por la columna C18, el cual no se mencionaba en las metodologías propuestas por Sniegocki *et al.* 2002 y Estrada-Montoya *et al.* 2008, esto se atribuyó a que pudieron haberse extraído otros componentes de la carne como colágeno, cuya extracción se basa en la homogenización de la matriz con un buffer, seguido de un tratamiento ácido o alcalino (Schmidt *et al.*, 2016).

El tercer procedimiento se basó en la metodología propuesta por Abukhalaf *et al.* 1999, en la que se homogenizaba la carne con buffer acuoso Tris y una digestión básica con hidróxido de sodio, para luego hacerlo pasar por la columna de fase sólida utilizando diclorometano, isopropanol e hidróxido de amonio (78:20:2). Con esta técnica tampoco se obtuvieron resultados, ni para las muestras enriquecidas ni las muestras sin enriquecer.

Las tres técnicas propuestas en general se basaban en la homogenización de la carne con un buffer acuoso con ayuda de un mortero con pistilo, y no con un homogenizador como recomendaban las metodologías, seguido de una digestión y luego purificación mediante una columna de fase sólida. Según la revisión de Boyd *et al.* 1996, para muestras sólidas como la carne, deben utilizarse solventes que extraigan la máxima cantidad del analito, utilizando ayuda mecánica como un homogenizador o una moladora de carne, se recomiendan como solventes: agua, ácido o un buffer acuoso, este último solvente fue utilizado para la extracción en las metodologías siendo el buffer Tris 50mM pH 8.5, con lo que se observó que se rompía el tejido. Luego, Boyd *et al.* 1996, menciona el tratamiento ácido o alcalino de la muestra, logrando la extracción y añadiéndose al procedimiento una extracción líquido-líquido para la eliminación de grasas.

Debido a falta de recursos materiales, no se desarrolló ninguna de las metodologías que proponían una digestión enzimática con proteasa y beta-glucuronidasa, está documentado que la utilización de digestión enzimática funciona mejor con beta-agonistas como salbutamol. El clenbuterol, por otro lado, no tiene los hidróxidos y alquilos en el anillo bencénico, responsables por la sulfo y glucuronidación. Sin embargo, según Fernando dos Ramos, 2000, se obtiene un mejor pre tratamiento de la muestra, para la extracción de clenbuterol, cuando se eliminan las proteínas de forma enzimática y con precipitación con ácido.

Para la sección de la purificación de clenbuterol en columna SPE, se recomienda la utilización de mezclas de metanol con otros eluyentes como agua y acetonitrilo. Para las tres técnicas, se llevó la muestra a pH cercano a neutro, sin embargo, metodologías revisadas por Boyd *et al.* 1996 indican que las muestras deben llevarse a pH superior a 10, para obtener una

mayor interacción entre la sección no polar alifática con el sorbente hidrofóbico del octadecil (columna C18).

B. Parámetros de validación

1. **Precisión (repetibilidad):** se analizó la precisión realizando 6 inyecciones de 3 concentraciones diferentes (5, 10 y 20 µg/mL). Se obtuvo un coeficiente de variación de entre 10.00 y 15.00%, valor que se encuentra por debajo coeficiente de variación de Horwitz, para análisis de residuos en nivel de partes por millón que es de 16% (Horwitz, 2006). Por lo que se puede decir que el método es reproducible en el rango estudiado, cumpliendo las tres concentraciones analizadas con el coeficiente de variación esperado.

Dentro de los parámetros de precisión, se encuentra la evaluación de la reproducibilidad en la que se evalúa la precisión entre distintos laboratorios, que por falta un equipo secundario no pudo llevarse a cabo

2. **Especificidad:** se identificó el clenbuterol en presencia de interferencias mediante la utilización del modo SIM en el que el equipo evaluó específicamente los compuestos que tenían presentes los iones 86 y 262 m/z en el tiempo de retención aproximado de 11.350 a 11.500 ±0.001 para clenbuterol y 73 y 223 m/z para metoprolol en el tiempo de retención de 11.900 ±0.001 minutos. Se obtuvo una respuesta de clenbuterol en el tiempo de retención promedio de 11.319 con una desviación estándar de 0.04 minutos. Además, se garantizó la identidad mediante la utilización de la biblioteca de compuestos de la NIST (“National Institute of Standards and Technology”), como se observa en el Gráfico No. 3. Por otro lado, se utilizaron los certificados de análisis de los estándares en los que se observó la pureza y características fisicoquímicas, ver certificados en apéndice, en la sección de certificados de análisis.

3. **Linealidad y Rango:** se encontró para el rango entre 5 µg/mL y 40µg/mL, la relación entre clenbuterol/metoprolol proporciona una respuesta lineal con un coeficiente de determinación de 0.9969, con lo que se cumplió con el criterio establecido por la USP e ICH de valores mayores a 0.990, por lo que en el rango analizado pueden obtenerse resultados exactos respecto al área en el cromatograma y la concentración del clenbuterol. El rango fue elegido según los valores tóxicos reportados en Italia por consumo de carne bovina, de 0.5 µg/g de carne a 4.5 µg/g de carne, que equivalen a valores de 32 µg/mL y 180 µg/mL respectivamente (Barbosa *et al.*, 2006; Parr, Opfermann y Schänzer. 2009 y Oyala, 2012).

En Guatemala, el Acuerdo Ministerial No. 821-2007, indica que se prohíbe el uso de clenbuterol en el ramo pecuario, por lo que, al analizar las muestras no debía encontrarse ninguna señal en el tiempo de retención de 11.319 ± 0.004 minutos en las muestras.

4. **Límite de detección y límite de cuantificación:** estos parámetros se analizaron con la lectura de 20 blancos enriquecidos con metoprolol, del cual se tomó en cuenta la relación entre el área del metoprolol y el área de la línea base en el tiempo en el que debía encontrarse el clenbuterol, aproximadamente en 11.300 minutos. El límite de detección fue de $0.0018 \mu\text{g/mL}$ y el límite de cuantificación fue de $0.0054 \mu\text{g/mL}$, estos límites se encuentran por debajo del límite establecido por la curva construida para niveles tóxicos de clenbuterol.

5. **Exactitud:** no pudo analizarse la exactitud debido a que ninguno de los métodos utilizados para la extracción de clenbuterol en la carne, fueron efectivos para la recuperación del estándar de clenbuterol añadido a las muestras. Este parámetro debió analizarse en tres muestras diferentes a tres diferentes concentraciones.

6. **Robustez:** se analizó la robustez cambiando la temperatura inicial del horno desde 120°C hasta 70°C con lo que se observó un retraso en el tiempo de retención que inicialmente era de aproximadamente de 8.000 ± 0.001 minutos para el clenbuterol y 9.000 ± 0.001 minutos para el metoprolol a tiempos de retención de 11.300 y 11.900 ± 0.001 minutos respectivamente. Además, de aumentar de forma significativa el área de ambos, como se observa en el Gráfico No. 4

VIII. CONCLUSIONES

1. Se desarrolló un método confiable para la detección de clenbuterol con derivatización precolumna con BSTFA/TMCS en cromatografía de gases con detector de masas, cumpliendo con los parámetros de validación de: linealidad, precisión, límite de detección y límite de cuantificación.
2. Se evaluó la importancia de la utilización de un estándar interno que sea adecuado, siendo el metoprolol efectivo para la determinación de clenbuterol, presentando una buena resolución en los picos del cromatograma y tiempo de retención cercano al del clenbuterol.
3. Se determinó que, bajo las condiciones de las metodologías antes planteadas para la extracción y purificación de clenbuterol a partir de carne de bovino, no fue posible desarrollar un método que fuera exacto, del cual pudieran obtenerse porcentajes de recuperación de clenbuterol en muestras enriquecidas, ni resultados en los cromatogramas de análisis de muestras con la mínima cantidad de interferencias.
4. Se encontró que el método era preciso y lineal para la detección de estándar de clenbuterol en un rango de 5.0 y 40.0 $\mu\text{g/mL}$, con un tiempo de retención promedio de 11.319 ± 0.004 minutos con límites de detección de 0.00180 $\mu\text{g/mL}$ y cuantificación de 0.00547 $\mu\text{g/mL}$.

IX. RECOMENDACIONES

1. Utilizar estándares primarios o estándares secundarios que posean certificado de análisis para el desarrollo de validaciones de métodos analíticos que aseguran mejores resultados en cuanto a exactitud y recuperación.
2. Desarrollar pruebas de reproducibilidad interlaboratorio para comprobar que el método para el análisis de estándares es robusto y reproducible para la determinación y cuantificación de clenbuterol.
3. Se recomienda usar el equipo adecuado para el tratamiento de muestras para comparar los resultados obtenidos por los métodos evaluados en este informe. Además de realizar alguna de las metodologías de hidrólisis enzimática utilizando beta-glucuronidasa y proteasa.
4. Proteger reactivos de la humedad con la utilización de agentes desecantes como sulfato de sodio, secar la cristalería en la desecadora y realizarle un “bake out” al equipo luego de trabajar con matrices que tengan grandes cantidades de interferencias.

X. BIBLIOGRAFÍA

Agilent | DB-5. 2006. Obtenido de: <http://www.agilent.com/en-us/products/gas-chromatography/gc-columns/capillary/db-5>

Agilent | HP-1. 2016. Columna capilar HP-1. Obtenido de <http://www.agilent.com/en-us/products/gas-chromatography/gc-columns/capillary/hp-1>

Agilent | KB002350: *What are the differences between Autotune and standard spectra tune.* 2017. <http://www.agilent.com/en-us/support/mass-spectrometry/kb002350>

Barbosa, J.; Cruz, C.; Martins, J. *et al.* 2006. «Food poisoning by clenbuterol in Portugal». *Food additiv. Contam.* 22: 563-566.

Bres, J.; Cauzel, A.; Pistre, M.; Rachmat, H. ; Bressolle, F.1985. *Metabolism of β adrenergic substances. Therapeutic implications.* *Bull. Eur. Physiopathol. Respir.* 21: 19-34.

Brett J, Dawson AH, Brown JA. *Clenbuterol toxicity: a NSW poisons information centre experience.* *Med J Aust.* 2014 Mar 3;200(4):219-21. PubMed PMID: 24580525

British Thoracic Society. *British Guideline on the management of asthma.* *Thorax* 63, iv1-121 (2008).

Boyd, D. O'Keeffe, M. y Smyth, M. 1996. *Methods for the Determination of beta-agonists in biological Matrices: A review.* *The Analyst* 121: 1R- 10R.

Chen, Q., Fan, L.-Y., Zhang, W., & Cao, C.-X. 2008. *Separation and determination of abused drugs clenbuterol and salbutamol from complex extractants in swine feed by capillary zone electrophoresis with simple pretreatment.* *Talanta*, 76(2), 282–287. <http://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.02.032>

- Dirección General de Epidemiología. 2002. *Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de Intoxicación Alimentaria asociada al consumo de carne contaminada con Clenbuterol*. México: Secretaría de Salud. 46 pp.
- Dos Ramos, J. 2000. *Beta 2-Agonist extraction procedures for chromatographic analysis*. Journal of Chromatography A. 880: 69-83.
- Duffau, B.; Rojas, F.; Guerrero, I.; et al. 2010. *Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: "Aspectos generales sobre la validación de métodos"*. Chile: Instituto de Salud Pública. 70 pp.
- Estrada-Montoya, M. C.; González-Córdova, A. F.; Torrescano, G.; Camou, J. P.; Vallejo-Cordoba. *Screening and confirmatory determination of clenbuterol residues in bovine meat marketed in the northwest of Mexico*. Ciencia y Tecnología Alimentaria, vol. 6, núm. 2, 2008, pp. 130-136
- Fajardo-Zapata, A.; Méndez, F.; Molina, L. *Residuos de fármacos anabolizantes en carnes destinadas al consumo humano*. Universitas Scientiarum [Colombia] 16 (1): 77-91.
- FDA. 2015, *Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics*. U.S. Department of Health and Human Services. 18 pp.
- FDA. *FOIA Drug Summaries - NADA 140-973 VENTIPULMIN® SYRUP - original approval*
Obtenido de:
<http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/Products/ApprovedAnimalDrugProducts/FOIADrugSummaries/ucm054881.htm>
- Gómez-Cambronero, L. G., & Sáez, S. 2011. *Sistema de mejora continua de la calidad en el laboratorio: Teoría y práctica*. España: Universitat de València. Pp. 74 y 75.
- Guatemala. 2008. *Acuerdo Ministerial No. 821-2007*. Oficina de Normas y Procedimientos. Unidad de Normas y Regulaciones. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación. 2 pp.
- Hajrulai, Z.; Uzunov, R.; Stojkovski, V.; Dimitrieska, E.; Stojanovska B. 2013. *Determination of Clenbuterol in meat samples with ELISA and GC-MS method*. Macedonia: Faculty of Veterinary Medicine. 817-824.

Harris, D. C. (2001). *Análisis químico cuantitativo*, 2 ed. España : Editorial Reverte. Pp. 655-684.

Hawkins, D. R., L. F. Elsom, M. H. Dighton, A. Kaur, and D. M. Cameron. 1993. *The pharmacokinetics, metabolism and residues of 14C-clenbuterol (14CN-AB 365 CL) following intramuscular administration to calves*. No. HRC/BOI 140/921418 de la base de datos de la OMS. http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_876_spa.pdf. Consultado el 24 de abril de 2011

International Conference of Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. 2005. *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology* Q2. (R1) 17 pp. Obtenido de: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf

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

McKeever, K. y Hoffman. 2007. *To Dope or Not to Dope: Abuse of Clenbuterol as a Diet Drug*. Obtenido de: <http://www.medscape.com/viewarticle/549131>

Moffat, A. and Osselton, M. 2004. *Carke's Analysis of Drugs and Poisons* 3rd ed. London, UK: Pharmaceutical Press.

Olguín, L. y Rodríguez, H. 2004. *Métodos en Biotecnología: Cromatografía de Gases*. México: Universidad Nacional Autónoma de México. 47 pp.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y Organización Mundial de la Salud (OMS). 2015. *Límites máximos de residuos (LMR) y recomendaciones sobre la gestión de riesgos (RGR) para residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos*. Codex Alimentarius CAC/MRL 2-2015. Pág. 10.

Oyala, Ernesto. 2012. *Residuos de Clenbuterol en tejidos comestibles de bovino*. Universidad Autónoma Chapingo, México: México. Pp. 2-34.

Parr, Maria. G. Opfermann y W. Schänzer. 2009. *Analytical methods for the detection of clenbuterol*. Rev. Bionalysis (2009) 1(2): 437-450.

Poole, C. F. (2012). *Gas Chromatography* 1st ed. USA: Elsevier. 743 pp.

Reglamento Técnico Centroamericano. *Productos farmacéuticos. Validación de Métodos Analíticos para la evaluación de la calidad de los medicamentos*. 11.03.38:06

Salleras, L., A. Domingues, E. Mata, J. L. Taberner, I. Moro, and P. Salva. 1995. *Epidemiologic study of an outbreak of clenbuterol poisoning in Catalonia, Spain*. Public Health Reports 110(3): 338–342.

Schmidt, M., Dornelles, R., Mello, R., Kubota, E., Mazutti, M. Kempka, A., y Demiate, I. *Collagen extraction process*. International Food Research Jour

SINAVE. 2007. *Intoxicación por clenbuterol*. Sistema nacional de vigilancia epidemiológica.<http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2007/sem18/pdf/edit1807.pdf>
Consultado el 20 de abril de 2010.

Skoog, D. A., Holler, J. H., Nieman, T. A. 2008. *Principios de Análisis Instrumental*, 6a Edición. McGraw Hill. Madrid, España. Pp. 281-302, 788-810.

Skoog, D.; West, D.; Holler, J. y Crouch, S. 2010. *Fundamentos de Química Analítica*, 9 ed. México: Editorial Cengage Learning 1065 pp.

Smith, D. J., and G. D. Paulson. 1997. *Distribution, elimination and residues of [¹⁴C] clenbuterol HCL in Holstein calves I*. Journal of Animal Science 75: 454-461.

Soma, L. R., et al. 2004. *Pharmacokinetics and disposition of clenbuterol in the horse*. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics 27 (2): 71–77.

Sporano, V.; Grasso, L.; Esposito, M. et al. (1998). *Clenbuterol residues in non-liver containing meat as a cause of collective food poisoning*. Veterinary and Human Toxicology, 40(3), 141–143.

The United States Pharmacopeia. 38nd USA Versión electrónica disponible en:
https://hmc.usp.org/sites/default/files/documents/HMC/GCs-Pdfs/GC_pdf_USP38/c1225

W. Horwitz and R.J. Albert “*The Horwitz Ratio (HorRat): A Useful Index of Method Performance with Respect to Precision.*” *Assoc. Off. Anal. Chem.*, Vol. 89, No. 4, 2006; pp. 1095- 1109.

W. H.O (1997). *Residues of Some Veterinary Drugs in Animals and Foods: Monographs Prepared by the Forty-seventh Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*, Rome, 4-13 June 1996. Food & Agriculture Org.

FAO/OMS. 2007. Codex Alimentarius Commission. *Report of the 15th sesión of the FAO/WHO Coordinating Committee for Latin America and The Caribbean. Roma, Italia.*

Ramos, F., Matos, A., Oliveira, A., & Silveira, M. I. N. da. (n.d.). *Diphasic dialysis extraction technique for clenbuterol determination in bovine retina by gas chromatography-mass spectrometry. Chromatographia*, 50(1–2), 118–120. <http://doi.org/10.1007/BF02493629>

FSIS (Food Safety and Inspection Service). 1995. United States Department of Agriculture. Washington, DC.

Sigma Aldrich. *Suggestions for Cleaning Glassware.* Disponible en: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Aldrich/Bulletin/al_techbull_al228.pdf [03/11/2016]

XI. APÉNDICE

A. Lavado de cristalería

1. Reactivos

- a. Ácido clorhídrico
- b. Bicarbonato de sodio
- c. Hidróxido de sodio

La cristalería nueva debe sumergirse en agua ácida (solución al 1% de ácido clorhídrico o ácido nítrico), antes de lavar.

2. Lavado general de cristalería nueva

- 1) Lavar la cristalería con agua destilada para remover cualquier residuo inmediatamente luego del uso.
- 2) Sumergir en un baño de ácido al menos una hora (preferiblemente por la noche). Asegurarse de que todas las superficies estén en contacto con el ácido.
- 3) Enjuagar con corriente de agua destilada, tres veces o más.
- 4) Secar por goteo invertido sobre una superficie apropiada.

3. Lavado de pipetas y buretas

- 1) Inmediatamente lavar la pipeta con agua destilada luego de usarla
- 2) Sumergir en HCl al 10%
- 3) Lavar con agua destilada seis veces o más (Sigma Aldrich, 2016)

4. Lavado general cristalería utilizada previamente

- 1) Lavar la cristalería con agua corriente
- 2) Utilizar como detergente Extran[®]
- 3) Lavar con agua destilada

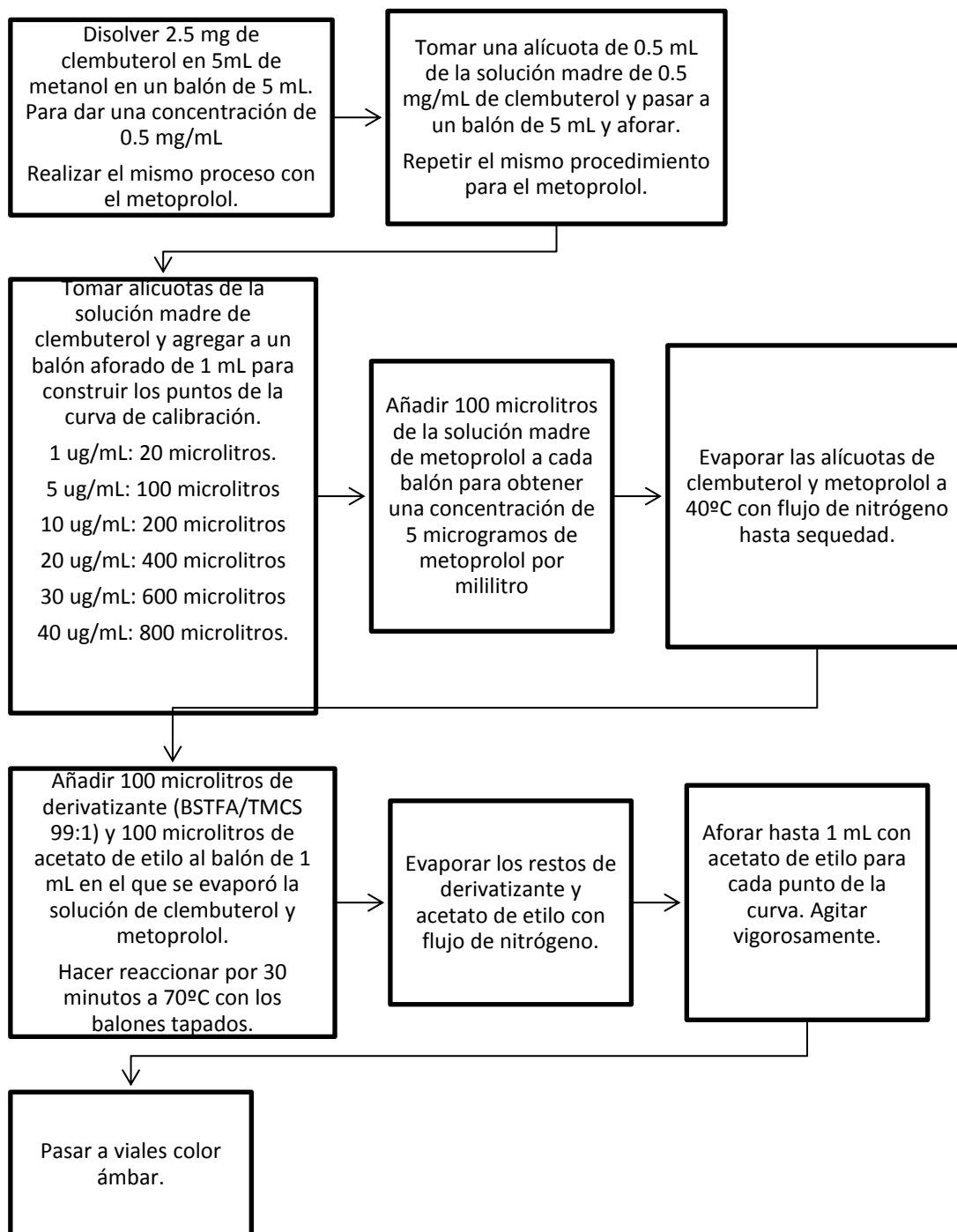
B. Glosario de términos

Absorción	cantidad de fármaco que ingresa al cuerpo
Anabolismo	procesos metabólicos que resultan en la síntesis de componentes celulares a partir de precursores de bajo peso molecular. Por lo tanto, es responsable de la ganancia de masa muscular, almacenamiento de energía en forma de glucógeno, y fabricación de distintos componentes celulares
BSTFA	N, O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida, es un compuesto químico que se utiliza en el proceso de derivatización de grupos lábiles como hidróxido con el grupo trimetilsilil que convierte el compuesto que tiene el hidróxido, más estable. En el caso de cromatografía de gases, se utiliza ya que los grupos siloxanos son más volátiles que los hidroxilos.
Derivatización	transformación de un compuesto químico, en un producto con una estructura química parecida.
Distribución	llegada del fármaco a los tejidos del cuerpo.
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
Excreción	eliminación de los fármacos del organismo inalterados o como metabolitos. La eliminación se puede llevar a cabo en el riñón, pulmones, piel, entre otros.
Ingesta diaria admisible (ADI)	cantidad de medicamento veterinario, expresada sobre el peso del cuerpo, que puede ser ingerida diariamente durante una vida sin presentar un riesgo significativo a la salud.
Límite máximo para residuos de medicamentos veterinarios (LMRMV)	concentración máxima de residuos resultante del uso de un medicamento veterinario expresada en mg/kg.

Medicamento veterinario	sustancia que se aplica a cualquier animal destinado a la producción de alimentos como los que producen la carne o leche, aves de corral, entre otros.
Metabolismo	transformación de fármacos dentro del organismo mediante distintas reacciones como la oxidación, reducción o hidrólisis en las que se producen metabolitos del fármaco.
Metabolito	resultado de la biotransformación de un fármaco que posee una estructura química diferente al fármaco original.
Residuo	Porción de una sustancia presente en tejidos, fluidos corporales, productos o excreciones debido al tratamiento de un animal, o causado por la contaminación en el ambiente.
TMCS	trimetilclorosilano, cloruro trimetilsilil, agente silante (catalizador).
Tocolítico	tipo de fármaco que se utiliza para suprimir el trabajo de parto prematuro.

C. Diagrama de procedimiento

Figura No. 3- Diagrama de procedimiento a seguir para la derivatización de estándares de clenbuterol



D. Datos experimentales

Cuadro No. 9-Áreas de clenbuterol obtenidas según concentración para la curva de calibración y tiempos de retención

Concentración ($\pm 0.052 \mu\text{g/mL}$)	Área Clenbuterol (± 1 unidades)	Área Metoprolol (± 1 unidades)	Relación área metoprolol/clenbuterol	Tiempo de retención
5.120	612218	314160	1.9487	11.325
5.120	782273	526583	1.4855	11.316
5.120	535646	358685	1.4933	11.317
PROMEDIO	643379	399809.33	1.6426	11.319
RSD	19.62013	28.01926	16.1453	0.0435
10.240	1534007	488825	3.1381	11.324
10.240	1551892	551810	2.8123	11.316
10.240	1951629	778008	2.5084	11.317
PROMEDIO	1679176	606214	2.8196	11.319
RSD	14.06169	25.08588	11.1678	0.0385
20.480	2721625	473527	5.7475	11.324
20.480	2664431	549208	4.8514	11.317
20.480	3216809	706903	4.5506	11.317
PROMEDIO	2867621	576546	5.0498	11.319
RSD	10.59254	20.651532	12.3307	0.0357
30.720	4089520	554937	7.36934	11.316
30.720	3914205	588249	6.6539	11.317
30.720	3835137	602263	6.3678	11.316
PROMEDIO	3946287	581816	6.7970	11.316
RSD	3.29906	4.178279	7.5890	0.00510
40 $\mu\text{g/mL}$	6718545	734178	9.1511	11.325
40 $\mu\text{g/mL}$	6514965	770737	8.4529	11.325
40 $\mu\text{g/mL}$	5628767	667907	8.4274	11.317
PROMEDIO	6287425	724274	8.6771	11.322
RSD	9.21563379	7.196932832	4.7325	0.04079

Cuadro No. 10- Áreas blanco de clenbuterol y metoprolol para determinación de límite de detección y cuantificación

Parámetros	Área clenbuterol ± 1 unidad	Área Metoprolol ± 1 unidad	Relación área clenbuterol/metoprolol
	5431	1598830	0.00340
	5388	1615018	0.00334
	5817	1759819	0.00331
	6810	2034065	0.00335
	7374	2135969	0.00345
	6439	1959429	0.00329
	5340	1620432	0.00330
	6321	1958365	0.00323
	6234	2008076	0.00310
	5688	1817578	0.00313
Promedio	6084.2	1850758.1	0.00329
Desviación estándar	673.9877678	195660.2275	0.00011
RSD	11.07767279	10.57189632	3.32511
Límite de detección	0.00180766	1.807660208	
Límite de cuantificación	0.005477758		

E. Certificados de análisis