



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE  
MORELOS

---



FACULTAD DE FARMACIA

**EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE RESIDUOS  
DE CLEMBUTEROL EN MUESTRAS DE  
PRODUCTOS CÁRNICOS DENTRO DEL ESTADO DE  
MORELOS**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN FARMACIA**

**PRESENTA:**

**L.F. AARÓN VALENCIA GARCIA**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DR. JULIO CÉSAR RIVERA LEYVA**

**CUERNAVACA MORELOS    01 de diciembre de 2019**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA

Consejo Interno de Posgrado

MAESTRÍA EN FARMACIA

Cuernavaca, Morelos a 6 de febrero de 2020

Folio: FF/D/SAc/ CIP /MF/002/2020

**L.F. AARÓN VALENCIA GARCÍA**  
**ESTUDIANTE DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA EN FARMACIA**  
**P R E S E N T E**

Por este medio le informo que, con base en la propuesta hecha en su solicitud, el Consejo Interno de Posgrado le asigno el siguiente jurado para evaluar la tesis "EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE RESIDUOS DE CLEMBUTEROL EN MUESTRAS DE PRODUCTOS CÁRNICOS DENTRO DEL ESTADO DE MORELOS".

Quedando integrado su comité de la siguiente manera:

**PRESIDENTE: Dra. Adriana Valladares Méndez**

**SECRETARIO: Dr. Juan Manuel Martínez Alejo**

**V.1. Dra. Josefina Vergara Sánchez**

**V.2. Dra. Natividad Sara Concepción García Jiménez**

**V.3. Dra. Mayra Yaneth Antúnez Mojica**

Se le solicita entregar las tesis al jurado designado y dar fluidez a los trámites como se indica en el manual de procedimientos.

Esperando que esta resolución sea en beneficio de su desempeño académico, y sin otro particular por el momento reciba un cordial saludo.

Atentamente  
*Por una humanidad culta*  
*Una universidad de excelencia*

**Dr. Julio César Rivera Leyva.**

**Jefatura de Posgrado**



ccp: archivo, jurado  
mitv

**UA  
EM**

*Una universidad de excelencia*

RECTORÍA  
2017-2023

**VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

**Nombre del alumno (a):** Aarón Valencia García

**Título de la tesis:** "EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE RESIDUOS DE CLEMBUTEROL EN MUESTRAS DE PRODUCTOS CÁRNICOS DENTRO DEL ESTADO DE MORELOS"

**Grado a obtener:**

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dra. Adriana Valladares Méndez

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

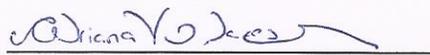
**Observaciones (solo en caso de rechazo):**

---

---

---

---

  
Firma del miembro del jurado

18 may 20

Fecha

**VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

**Nombre del alumno (a):** Aarón Valencia García

**Título de la tesis:** “EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE RESIDUOS DE  
CLEMBUTEROL EN MUESTRAS DE PRODUCTOS CÁRNICOS DENTRO DEL  
ESTADO DE MORELOS”

**Grado a obtener:**

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dr. Juan Manuel Martínez Alejo

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

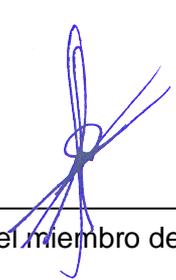
**Observaciones (solo en caso de rechazo):**

---

---

---

---

  
Firma del miembro del jurado

12-Mayo-2020

Fecha

**VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

**Nombre del alumno (a):** Aarón Valencia García

**Título de la tesis:** “EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE RESIDUOS DE  
CLEMBUTEROL EN MUESTRAS DE PRODUCTOS CÁRNICOS DENTRO DEL  
ESTADO DE MORELOS”

**Grado a obtener:**

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dra. Josefina Vergara Sánchez

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

**Observaciones (solo en caso de rechazo):**

---

---

---

---



Firma del miembro del jurado

13/05/2020

Fecha

**VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

**Nombre del alumno (a):** Aarón Valencia García

**Título de la tesis:** “EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE RESIDUOS DE  
CLEMBUTEROL EN MUESTRAS DE PRODUCTOS CÁRNICOS DENTRO DEL  
ESTADO DE MORELOS”

**Grado a obtener:**

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dra. Natividad Sara Concepción García Jiménez

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

**Observaciones (solo en caso de rechazo):** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Dra Natividad Sara C García Jiménez  
Firma del miembro del jurado

15 mayo 2020  
Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**NATIVIDAD SARA CONCEPCION GARCIA JIMENEZ | Fecha:2020-05-14 12:00:21 | Firmante**

GsGVw0oFwCKI1EJdD66L3MY1clcDhMASrCw8r2YY9yxMx8auaZndULoaUUUc7DGRut2W2QAaS1OQvOXNv7PDcixdtG6Yp+NDIs43HAoJymvIQkU/bBc2nHqAxK8kF2Yurm1cgl0H5mdX8NtAobTqbY118+G1BqycFuMQhxZ5jo2RjbafrmyfPOHqpekfEZRK3X2I5JN30m/iKF2nb3BLull0gVVR2owbzKGw1IGXWvPr7yKW+UDM2Z+ggqDt9xC13A2WqhmCEhaqi/Pg43w2hqRzFbbjHr7XUy8vjh6Tjp1INESikhGeDzSWsEheJoiFdXIk/P/aBvXIXyzBLsm3nJg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[R3W1&6NOM%n](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/QMV2ZGEJ1f3p0kWwIkU0exV4kY7kaL6U>



**VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

**Nombre del alumno (a):** Aarón Valencia García

**Título de la tesis:** "EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE RESIDUOS DE  
CLEMBUTEROL EN MUESTRAS DE PRODUCTOS CÁRNICOS DENTRO DEL  
ESTADO DE MORELOS"

**Grado a obtener:**

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dra. Mayra Yaneth Antúnez Mojica

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

**Observaciones (solo en caso de rechazo):** \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_



\_\_\_\_\_  
Firma del miembro del jurado

13-mayo-2020

\_\_\_\_\_  
Fecha

## 1. AGRADECIMIENTOS.

A la Universidad Autónoma del Estado de Morelos y Facultad de Farmacia que han sido mi casa los últimos 8 años.

Al Dr. Julio César Rivera Leyva por el apoyo y la confianza depositada en mi para realizar este proyecto.

A mi comité tutorial:

Dra. Adriana Valladares

Dr. Sergio Alcalá Alcalá

Dr. Julio César Rivera Leyva

Al jurado revisor por todas observaciones, correcciones y comentarios.

Dra. Adriana Valladares Méndez

Dr. Juan Manuel Martínez Alejo

Dra. Josefina Vergara Sánchez

Dra. Natividad Sara Concepción García Jiménez

Dra. Mayra Yaneth Antúnez Mojica

A mis compañeros en el laboratorio por la amistad y el apoyo brindado.

A mi familia que muy directamente forma parte de cada proyecto en mí vida.

Al CONACYT por la beca No. 894127 otorgada durante los dos años de la maestría.

## 2. DEDICATORIAS.

*A mi padre, sé que no podrás ver ya la culminación  
de este proyecto a pesar de que siempre te mantuvo  
expectante, me consuela saber que al menos  
estoy en un camino que te hiciera sentir  
orgulloso de mi, quiero pensar que de alguna  
u otra forma nos volveremos a encontrar, hasta pronto.*

## ÍNDICE GENERAL

<b>1. RESUMEN.</b>	<b>6</b>
<b>2. ANTECEDENTES.</b>	<b>8</b>
<b>2.1 LA CARNE COMO ALIMENTO EN HUMANOS.</b>	<b>8</b>
2.1.1 La importancia de la carne.	8
2.1.2 El consumo de carne.	9
2.1.3 Uso de promotores del crecimiento en el ganado.	11
2.1.3.1 Aditivos alimentarios.	11
2.1.4 Intoxicaciones por el consumo de carne con residuos de clenbuterol.	13
2.1.5 Síntomas de intoxicación por consumo de clenbuterol.	13
<b>2.2 CLEMBUTEROL.</b>	<b>14</b>
2.2.1 Características físico-químicas.	14
2.2.2 Farmacocinética.	15
2.2.2.1 Absorción.	15
2.2.2.2 Distribución.	15
2.2.2.3 Metabolismo.	15
2.2.2.4 Excreción.	16
2.2.3 Farmacodinamia.	16
2.2.3.1 Mecanismo de acción.	17
2.2.3.2 Efecto metabólico.	18
2.2.4 Indicaciones Terapéuticas.	18
2.2.5 Dosis Terapéutica.	19
2.2.5.1 En Humanos.	19
2.2.5.2 En animales.	19
<b>2.3 NORMATIVIDAD.</b>	<b>20</b>
2.3.1 A nivel internacional.	20
2.3.2 En Europa.	21
2.3.3 En Estados Unidos.	21
2.3.4 En México.	21
2.3.4.1 Para su uso como anabólico en el ganado.	22
<b>2.4 Técnicas de análisis aprobadas para detectar clenbuterol en muestras de tejidos.</b>	<b>24</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN.</b>	<b>25</b>

<b>4. HIPÓTESIS.</b>	<b>26</b>
<b>5. OBJETIVOS.</b>	<b>26</b>
<b>5.1 OBJETIVO GENERAL.</b>	<b>26</b>
<b>5.2 OBJETIVOS PARTICULARES.</b>	<b>26</b>
<b>6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.</b>	<b>27</b>
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	<b>28</b>
<b>7.1 Instrumentación, Equipos, Materiales y Reactivos.</b>	<b>28</b>
7.1.1 Instrumentación y Equipos.	28
7.1.2 Materiales.	28
7.1.3 Reactivos.	28
<b>7.2 MÉTODOS.</b>	<b>29</b>
7.2.1 Calificación del equipo de CLAR Hitachi LaChrom Elite.	29
7.2.2 Desarrollo del método para cuantificar clenbuterol por CLAR.	29
7.2.3 Preparación de los estándares de clenbuterol y Pirfenidona.	30
7.2.4 Método de extracción de clenbuterol a partir de hígado de bovino.	30
7.2.4.1 Extracción simple.	30
7.2.4.2 Extracción con fase orgánica y sales.	30
7.2.4.3 Extracción en fase sólida.	31
7.2.5 Optimización del método de extracción.	31
7.2.6 Validación del método de cuantificación de clenbuterol.	31
7.2.6.1 Adecuabilidad del método.	32
7.2.6.2 Linealidad del método.	32
7.2.6.3 Precisión del método.	33
7.2.6.4 Exactitud del método.	33
7.2.6.5 Límite de Detección (LD).	33
7.2.6.6 Límite de Cuantificación (LC).	34
7.2.6.7 Selectividad del método.	34
7.2.7 MUESTREO.	34
7.2.7.1 Recolección de las muestras.	34
<b>8. RESULTADOS.</b>	<b>38</b>
<b>8.1 DESARROLLO DEL MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE CLENBUTEROL.</b>	<b>38</b>
8.1.1 Determinación de la longitud de onda a utilizar.	38
8.1.2 Desarrollo y optimización del método.	39

8.1.3	Desarrollo del método de extracción de clembuterol.	40
8.1.4	Validación del método de cuantificación de clembuterol por CLAR.	42
8.1.4.1	Linealidad.	42
8.1.4.2	Precisión.	45
8.1.4.3	Exactitud.	47
8.1.4.4	Límite de Detección.	48
8.1.4.5	Límite de Cuantificación.	49
8.1.5	Análisis de las muestras.	50
<b>9.</b>	<b>DISCUSIÓN.</b>	<b>58</b>
<b>10.</b>	<b>CONCLUSIONES.</b>	<b>61</b>
<b>11.</b>	<b>PERSPECTIVAS.</b>	<b>61</b>
<b>12.</b>	<b>REFERENCIAS.</b>	<b>62</b>
<b>13.</b>	<b>ANEXOS.</b>	<b>66</b>
<b>13.1</b>	<b>RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN.</b>	<b>66</b>
13.1.1	Linealidad del sistema.	66
13.1.2	Linealidad del método.	66
13.1.3	Precisión del sistema.	67
13.1.4	Precisión del método.	68
13.1.5	Límite de detección y cuantificación.	70
<b>13.2</b>	<b>RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE MUESTRAS DE MÚSCULO DE RES POR ZONA.</b>	<b>72</b>
<b>13.3</b>	<b>ANÁLISIS DE MUESTRA DE HÍGADO DE RES POR ZONAS.</b>	<b>76</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1:</b> TOTAL DE MUESTRAS RECOLECTADAS, CLASIFICADAS POR CÓDIGO.....	36
<b>TABLA 2:</b> RESULTADOS DE LA LINEALIDAD DEL SISTEMA. ....	42
<b>TABLA 3:</b> RESULTADOS DE LA LINEALIDAD DEL MÉTODO. ....	43
<b>TABLA 4:</b> RESULTADOS DE LA REPETIBILIDAD DEL SISTEMA.....	45
<b>TABLA 5:</b> RESULTADOS DE LA REPETIBILIDAD DEL MÉTODO DÍA 1. ....	45
<b>TABLA 6:</b> RESULTADOS DE LA REPETIBILIDAD DEL MÉTODO DÍA 2. ....	46
<b>TABLA 7:</b> RESULTADOS DE LA REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO.....	47
<b>TABLA 8:</b> RESULTADOS DE LA EXACTITUD DEL SISTEMA.....	47
<b>TABLA 9:</b> RESULTADOS DE LA EXACTITUD DEL MÉTODO DÍA 1.....	48
<b>TABLA 10:</b> RESULTADOS DE LA EXACTITUD DEL MÉTODO DÍA 2.....	48
<b>TABLA 11:</b> VALORES DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN Y DE LOS BLANCOS PARA ESTIMAR LOS LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN. ....	48
<b>TABLA 12:</b> RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS DE MÚSCULO DE RES POR ZONAS Y POR ESTABLECIMIENTO.	50
<b>TABLA 13:</b> RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS DE HÍGADO DE RES POR ZONAS Y POR ESTABLECIMIENTO. ....	51
<b>TABLA 14:</b> MUESTRAS CON RESIDUOS DE CLEMBUTEROL. CATEGORIZADAS POR NIVELES DE CLEMBUTEROL INCLUIDAS AQUELLAS QUE ESTUVIERON DENTRO DEL LÍMITE DE DETECCIÓN.....	56
<b>TABLA 15:</b> CANTIDADES MÍNIMAS Y MÁXIMAS ENCONTRADAS EN EL ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS. ....	57

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1:</b> CONSUMO PER CÁPITA POR TIPO DE CARNE EN 2018.. ....	9
<b>FIGURA 2:</b> CONSUMO DE CARNE DE BOVINO A NIVEL MUNDIAL EN 2018.....	10
<b>FIGURA 3:</b> PREFERENCIA DE TIPO DE CORTE DE CARNE DE RES.....	10
<b>FIGURA 4:</b> PREFERENCIA POR EL LUGAR DE COMPRA DE CARNE RES. ....	11
<b>FIGURA 5:</b> ESTRUCTURAS QUÍMICAS DEL CLEMBUTEROL, 2D (A) Y 3D (B). ....	14
<b>FIGURA 6:</b> ESQUEMA DE LA FARMACODINAMIA DE LOS B-ADRENÉRGICOS. ....	17
<b>FIGURA 7:</b> OTROS B-AGONISTAS PROHIBIDOS EN MÉXICO PARA SU USO EN LA ALIMENTACIÓN DEL GANADO. .....	23
<b>FIGURA 8:</b> MAPA DEL MUNICIPIO DE CUERNAVACA DIVIDIDO POR ZONAS. ....	37
<b>FIGURA 9:</b> ANÁLISIS EN EL ESPECTRO UV DE 200 A 600 NM DEL ESTÁNDAR DE CLEMBUTEROL. ....	38
<b>FIGURA 10:</b> CROMATOGRAMA DEL MÉTODO DESARROLLADO PARA CUANTIFICAR CLEMBUTEROL S. ....	40
<b>FIGURA 11:</b> CROMATOGRAMA DE UNA MUESTRA DE HÍGADO DE RES. ....	41

<b>FIGURA 12:</b> CROMATOGRAMA COMPARATIVO DE LA INYECCIÓN DE LOS ESTÁNDARES DE CLEMBUTEROL Y PIRFENIDONA. ....	41
<b>FIGURA 13:</b> GRÁFICO DE LA LINEALIDAD DEL SISTEMA. ....	43
<b>FIGURA 14:</b> GRÁFICO DE LA LINEALIDAD DEL MÉTODO ....	44
<b>FIGURA 15:</b> CROMATOGRAMA DE LA LINEALIDAD DEL MÉTODO ....	44
<b>FIGURA 16:</b> CROMATOGRAMA DE LA REPETIBILIDAD DEL MÉTODO.....	46
<b>FIGURA 17:</b> GRÁFICO DEL ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DE MÚSCULO DE RES POR ZONA. ....	51
<b>FIGURA 18:</b> GRÁFICO DEL ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DE HÍGADO DE RES POR ZONA ....	52
<b>FIGURA 19:</b> GRÁFICO DEL TOTAL DE MUESTRAS ANALIZADAS DE MÚSCULO DE RES POR CENTRO DE DISTRIBUCIÓN .....	53
<b>FIGURA 20:</b> GRÁFICO DEL TOTAL DE MUESTRAS ANALIZADAS DE HÍGADO DE RES POR CENTRO DE DISTRIBUCIÓN. ....	54
<b>FIGURA 21:</b> GRÁFICO DEL TOTAL DE CASOS CUANTIFICABLES Y SU PORCENTAJE CORRESPONDIENTE POR ZONA.....	55

## 1. RESUMEN.

El clenbuterol es un agonista del grupo  $\beta$ -adrenérgico que se utiliza como aditivo alimentario en la alimentación del ganado ya que reduce la grasa y promueve la síntesis de proteínas cuando se administra en dosis más altas que la terapéutica. Las ventajas que puede tener el uso de clenbuterol como agente anabólico son innegables, ya que mejora la producción y las ventas; Sin embargo, utilizarlo para tal fin, ha causado intoxicaciones en la población con síntomas que abarcan temblores musculares, palpitations, taquicardia, nerviosismo, dolor de cabeza y mialgia. En México, se han emitido normas que prohíben el uso de clenbuterol en la alimentación del ganado; pero, se tiene conocimiento de su uso en la alimentación del ganado mediante la detección de casos de intoxicación por consumo de carne contaminada por clenbuterol en diferentes partes del territorio nacional. Por lo tanto, en este proyecto, se planteó analizar muestras de productos cárnicos (músculo e hígado) de bovino, obtenidos de diferentes zonas del área de Cuernavaca Morelos y determinar posible presencia de residuos de clenbuterol. Se desarrollaron y validaron los métodos de extracción y cuantificación de clenbuterol por CLAR cumpliendo con los parámetros de linealidad, precisión y exactitud, y se obtuvieron los límites de detección y cuantificación.

Para la recolección de las muestras se utilizó el método de muestreo por conglomerados, partiendo de la probabilidad de ocurrencia observada en estudios parecidos en distintas partes de la república. Una vez recolectadas las muestras fueron procesadas y analizadas por CLAR.

Se recolectaron y analizaron 88 muestras de músculo de res (pierna) y 18 muestras de hígado de res, de tres diferentes centros de recolección, mercados municipales, carnicerías y tiendas de auto servicio, distribuidos dentro del área de Cuernavaca Morelos la cual se dividió en cinco zonas, centro, norte, sur, este y oeste. De acuerdo a los resultados obtenidos, del total de muestras analizadas 106 de músculo e hígado de res, en 52 muestras se encontraron residuos de clenbuterol (49%). Las cantidades de clenbuterol encontradas en las muestras analizadas sobrepasan el límite máximo recomendado (LMR) por el *Codex Alimentarius* de la FAO.

## ABSTRACT

Clenbuterol is an agonist of the  $\beta$ -adrenergic group that is used as a food additive in livestock feed because it reduces fat and promotes protein synthesis when administered in higher doses than therapeutic. The advantages that the use of clenbuterol as an anabolic agent can have are undeniable, since it improves production and sales; However, using it for this purpose has caused poisoning in the population with symptoms that include muscle tremors, palpitations, tachycardia, nervousness, headache and myalgia. In Mexico, regulations have been issued that prohibit the use of clenbuterol in livestock feeding; However, its use is known in the feeding of cattle by detecting cases of intoxication due to consumption of meat contaminated by clenbuterol in different parts of the national territory. Therefore, in this project, it was proposed to analyze samples of bovine meat products (muscle and liver), obtained from different areas the Cuernavaca Morelos and to determine the possible presence of clenbuterol residues. The methods of extraction and quantification of clenbuterol by HPLC were developed and validated, complying with the parameters of linearity, precision and accuracy, and the limits of detection and quantification were obtained.

For the collection of the samples, the cluster sampling method was used, based on the probability of occurrence observed in similar studies in different parts of the republic. Once the samples were collected, they were processed and analyzed by HPLC.

88 samples of beef muscle (leg) and 18 samples of beef liver were collected and analyzed from three different collection centers, municipal markets, butchers and self-service stores, distributed along Cuernavaca Morelos. The area was divided into five zones, center, north, south, east and west. According to the results obtained, of the total samples analyzed 106 of muscle and beef liver, in 52 samples were found clenbuterol residues (49%). The amounts of clenbuterol found in the analyzed samples exceed the maximum recommended limit (MRL) by FAO *Codex Alimentarius*.

## **2. ANTECEDENTES.**

### **2.1 LA CARNE COMO ALIMENTO EN HUMANOS.**

#### **2.1.1 La importancia de la carne.**

Según la Norma Oficial Mexicana NOM-004-ZOO-1994, la carne es la estructura compuesta por fibra muscular estriada, acompañada o no de tejido conectivo, elástico, fibras nerviosas, vasos linfáticos y sanguíneos.

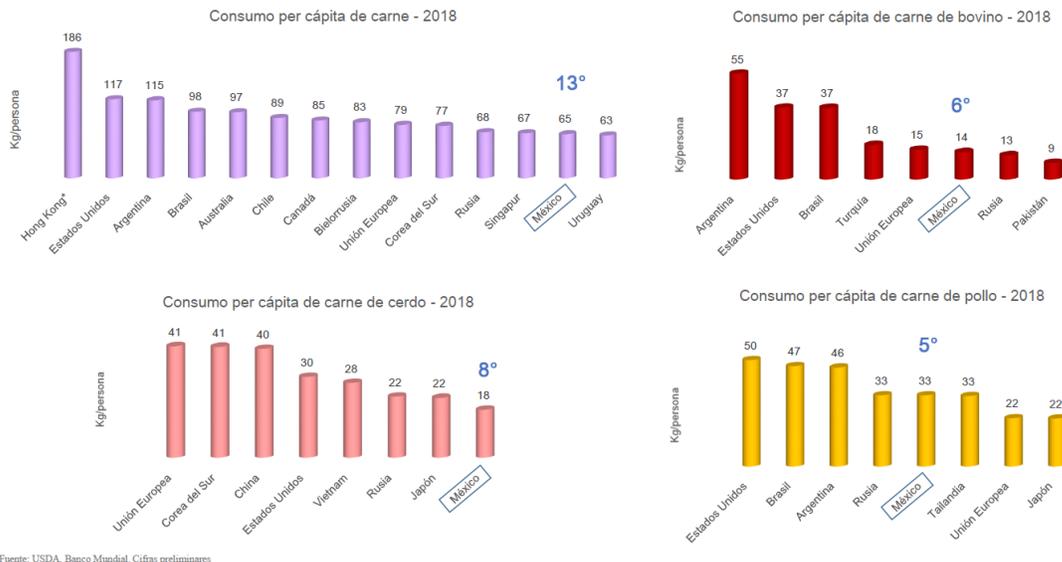
La carne constituye una importante fuente de proteínas alimentarias de gran calidad para una enorme proporción de la población mundial. Además, la carne roja, en particular, contribuye en gran medida a la adquisición de diversos micronutrientes, sobre todo hierro, zinc, selenio, vitamina D y vitamina B12, y si bien es posible obtener estos nutrientes ingiriendo cantidades suficientes de diversas frutas y hortalizas. En muchos países en desarrollo, donde este tipo de alimentos a veces escasea, la posibilidad de consumir carne suele proteger de la malnutrición y mejorar el desarrollo cognitivo de los niños (Salter, 2018).

Ante el crecimiento demográfico y la necesidad de cubrir las necesidades de la población en cuestión alimentaria, la carne se convierte en un activo importante en el tema. Si bien es innegable que los seres humanos son capaces no solo de sobrevivir sino mantener vidas largas y saludables con dietas libres de productos animales, también es cierto, que en muchos lugares en el mundo llevar una vida libre de productos de origen animal no es una elección, debido a la gama muy limitada de material vegetal lo cual los deja muy vulnerables a la desnutrición proteico-energética.

De acuerdo el Fondo de Población de la Naciones Unidas (UNFPA, 2019), la población mundial en el 2019 rebasó los 7700 millones de habitantes. En México, la población superó en ese mismo año los 132 millones de habitantes siendo uno de los 10 países más habitados del mundo, con una población que sigue en constante crecimiento la demanda de alimento también va en aumento.

## 2.1.2 El consumo de carne.

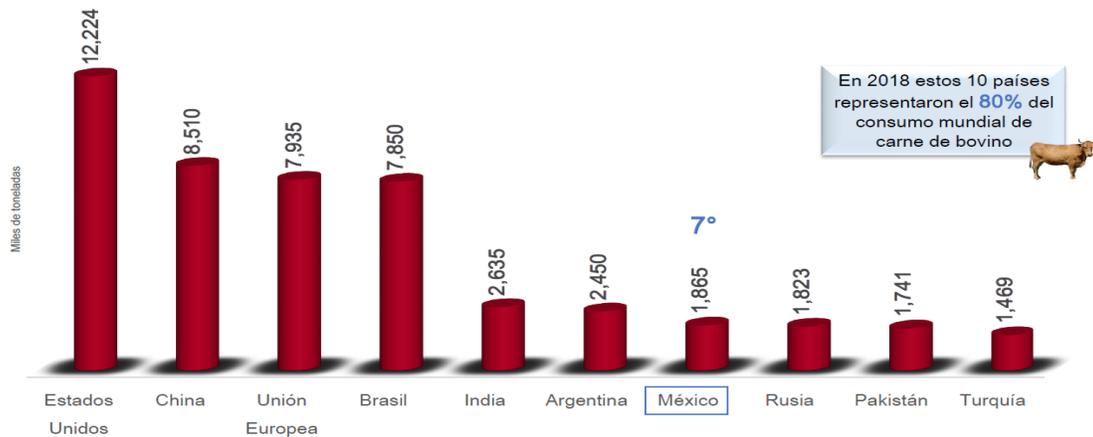
De las diferentes especies animales que se utiliza su carne para consumo humano, las más consumidas son las de aves de granja, bovino y la de porcino. De acuerdo con el Consejo Mexicano de la Carne, México ocupa los primeros lugares en el consumo per cápita de estos tipos de carnes (**Figura 1**).



**Figura 1:** Consumo per cápita por tipo de carne en 2018. México ocupa el 13° lugar en el consumo total de carne y el 6to lugar en el consumo de carne de bovino a nivel mundial (CMC, 2018).

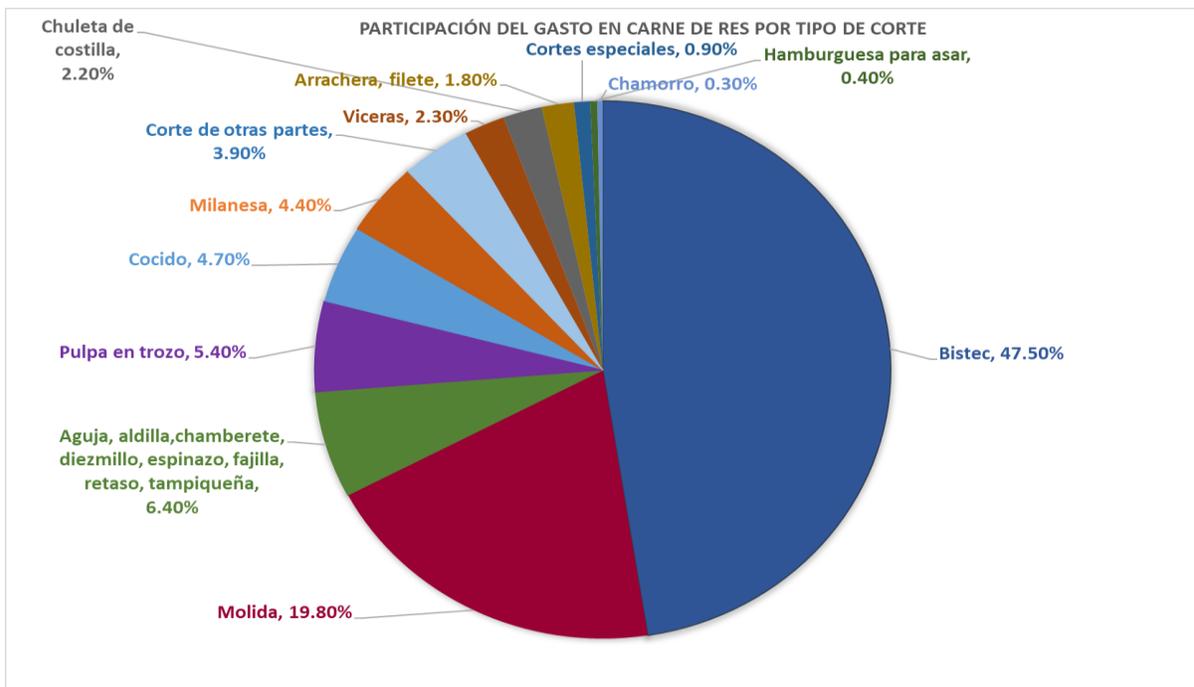
En lo que a carne de bovino se refiere, México es de los principales productores y consumidores, ocupando la séptima posición a nivel mundial (CMC & Consejo Mexicano de la carne, 2018) (**Figura 2**). La industria de la carne en México genera miles de millones de pesos al año, del año 2017 al 2018 generó hasta el 2% del producto interno bruto del país (INEGI, 2017).

Principales países consumidores de carne de bovino en el mundo – 2018

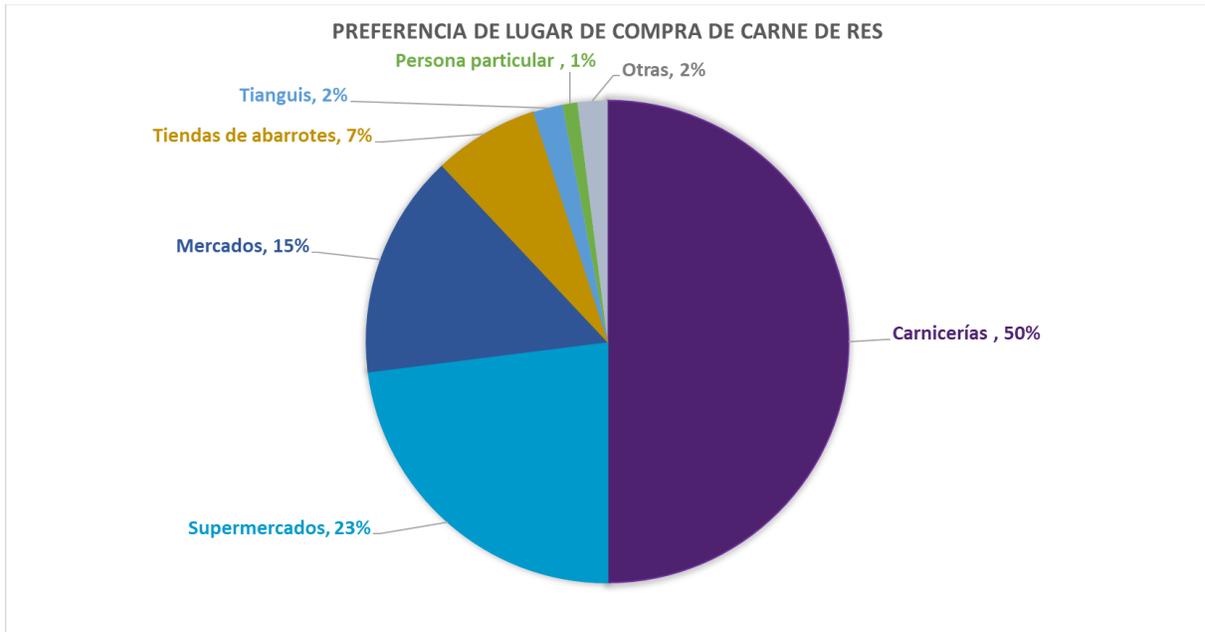


**Figura 2:** Consumo de carne de bovino a nivel mundial en 2018, 10 países representan el 80% del consumo total de carne de bovino, México ocupa la séptima posición (Compendio estadístico de la carne).

El mercado de la carne es amplio y de los distintos lugares donde se comercializa la carne de bovino los preferidos por la población en general para adquirirla son: carnicerías, tiendas de autoservicio y mercados municipales (CMC & Consejo Mexicano de la carne, 2018) (Figura 3).



**Figura 3:** Preferencia de tipo de corte de carne de res, obtenido y editado del Consejo Mexicano de la Carne y datos del INEGI.



**Figura 4:** Preferencia por el lugar de compra de carne res, obtenido y editado del Consejo Mexicano de la Carne y datos del INEGI.

### 2.1.3 Uso de promotores del crecimiento en el ganado.

En lo que a producción de carne para consumo humano se refiere, el principal objetivo de los productores de ganado ha sido siempre la de obtener mayores beneficios económicos de los productos. Una forma de lograr este objetivo es administrando sustancias que mejoran el crecimiento de las distintas especies animales. Estos productos se conocen como promotores de crecimiento y existe una gran variedad de ellos como los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos.

#### 2.1.3.1 Aditivos alimentarios.

Un aditivo alimentario es cualquier sustancia que no se consume normalmente como alimento, ni tampoco se usa como ingrediente básico en alimentos, tenga o no valor nutritivo, y cuya adición intencionada al alimento con fines tecnológicos (incluidos los organolépticos) en cualquiera de sus fases (fabricación, elaboración, preparación, etc.), resulte o pueda preverse razonablemente que resulte (directa o indirectamente) por si o sus

subproductos, en un componente de alimento o un componente que afecte a sus características (FAO, 1995).

Los  $\beta$ -agonistas, son aditivos alimentarios que en algunos casos están aprobados por la Food and Drugs Administration de los E.U.A. (FDA), como en los casos del zilpaterol y de la ractopamina (FDA, 2019), que comercializan en EUA desde que recibieron la aprobación de la FDA en 1999 y 2003 respectivamente. El efecto que produce un  $\beta$ -agonista como aditivo alimentario es incrementar la ganancia de masa muscular, mejorar la tasa de crecimiento y aumentar la eficacia de la alimentación. En México, la ractopamina y el zilpaterol aparecen en la lista de la norma NOM-EM-015-2002, de  $\beta$ -agonistas prohibidos para su producción, comercialización, importación, suministro y/o utilización de los principios activos como ingredientes activos, aditivos, alimenticios y/o medicamentos en formulación de los productos alimenticios destinados para consumo y uso en animales (Secretaría de Salud, 2002). La misma norma refiere que pueden estar exentos de tal prohibición si cuentan registro y autorización, como es el caso de ambos.

Un aspecto importante a considerar en la producción pecuaria, es la seguridad de los productos; es decir, que sean inocuos, y que a la vez garanticen la alimentación de todos los consumidores (SAGARPA, 2000). En los diferentes sistemas de producción se emplea una gran cantidad de sustancias que son aplicadas o adicionadas en la alimentación de las diferentes especies productivas con el interés de mejorar los parámetros productivo-reproductivos, con descuido en gran medida del aspecto de inocuidad, lo que implica la presentación de problemas en salud pública (Jimenez, Ramos, & Fragoso, 2011). Los agentes conocidos como promotores del crecimiento son aquellos que funcionan como estimulantes del crecimiento al ejercer una acción sobre el anabolismo proteico (Brown et al., 2018). Existe una gran variedad de promotores de crecimiento, de ellos los más utilizados por los ganaderos en la alimentación animal son los  $\beta$ -agonistas, debido a que obtienen mayor ganancia de peso en menor tiempo. De la variedad de  $\beta$ -agonistas que existe, el más utilizado en México es el clorhidrato de clenbuterol. No obstante, el uso de clorhidrato de clenbuterol ha propiciado intoxicaciones masivas en los consumidores, lo que ha conducido a un grave problema en salud pública (Bañuelos-Valenzuela et al., 2015).

#### **2.1.4 Intoxicaciones por el consumo de carne con residuos de clenbuterol.**

El uso de clenbuterol como promotor del crecimiento en animales de crianza, ha generado la aparición de varios casos de intoxicación en humanos en distintas partes del mundo. De los primeros casos documentados de intoxicación por clenbuterol por consumir hígado de bovinos se registraron en octubre de 1989 y julio de 1990 en España y en Francia, donde 135 personas fueron afectadas (Martínez, 1990). Según un estudio realizado por Salleras 1996, en España, en el periodo comprendido entre el año de 1989 y el 2000, fueron reportados 809 casos. El mayor número de casos se obtuvo en 1992 y desde entonces, la evolución de la tendencia temporal fue marcadamente decreciente. Enero fue el mes con mayor número de brotes (12) y de casos (452) notificados a lo largo del periodo estudiado (Salleras et al., 1995).

En México, también se han presentado casos de intoxicación por clenbuterol, a partir de lo cual se fortaleció la vigilancia epidemiológica de la Intoxicación Alimentaria por Clenbuterol, el promedio anual de casos notificados hasta el 2011 fue de 220. En el año 2007, se notificaron 555 casos, con una incidencia de 0.53 casos por 100, 000 habitantes y se notificaron 110 casos, con una tasa de incidencia de 0.10 casos por 100, 000 habitantes; lo anterior representó una reducción en la incidencia de los casos del 81% (Secretaría de Salud, 2013).

En 2011 varios estados notificaron casos de intoxicación por clenbuterol, entre ellos estuvieron Aguascalientes, Distrito Federal, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Querétaro, Veracruz y Zacatecas y los que presentaron la mayor tasa de incidencia en el mismo año fueron: Aguascalientes con una incidencia de 2.47 casos por 100 000 habitantes, seguido por Querétaro con 0.95, Guanajuato 0.43, Zacatecas 0.36 y Jalisco 0.28 casos por 100 000 habitantes (Proceso, 2011).

#### **2.1.5 Síntomas de intoxicación por consumo de clenbuterol.**

La intoxicación por la ingesta de carne contaminada con clenbuterol se basa principalmente en los efectos adversos intrínsecos del  $\beta$ -agonista. El diagnóstico de una posible intoxicación por residuos de clenbuterol está basado en los signos y síntomas de activación

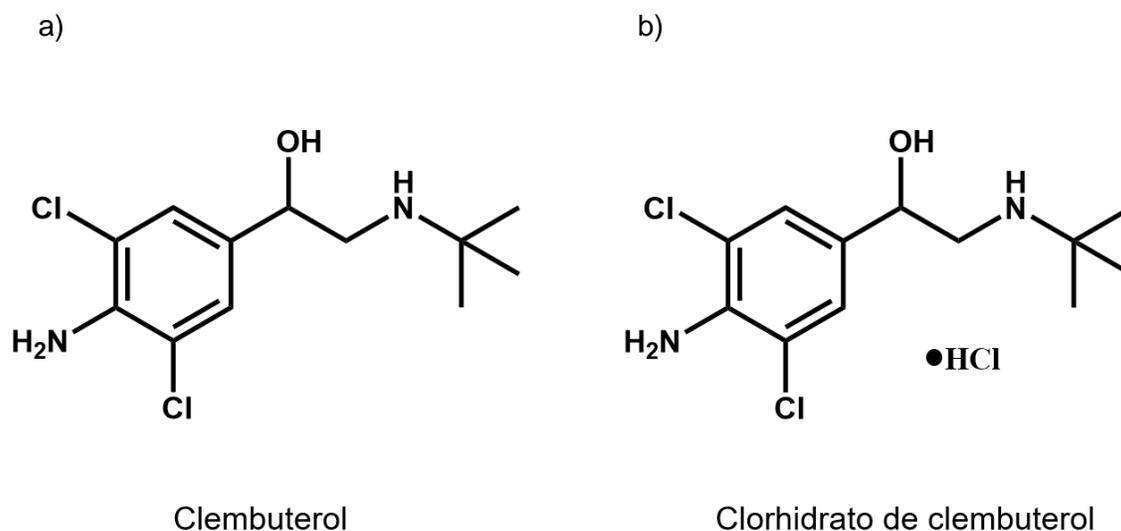
simpática junto con la sospecha clínica de la ingesta de vísceras de bovino (hígado, principalmente)

Entre los síntomas presentados por consumir carne con residuos de clenbuterol se encuentran: aparición brusca de temblores musculares, palpitations, taquicardia, nerviosismo, cefaleas y mialgias (Morales-Trejo et al., 2013)

## 2.2 CLENBUTEROL.

### 2.2.1 Características físico-químicas.

El clenbuterol (RS)-1--(4--amino-3,-5--dicloro-fenil)-2-(*tert*-butilamino)-etanol, es un polvo blanco, anhidro, con un peso molecular de 277.189 g/mol y 313.6 g/mol en su forma de sal (clorhidrato de clenbuterol). Es muy soluble en agua (NCBI, 2019), altamente estable a temperatura ambiente, con un punto de fusión de 174-175.5 °C y un logP de 2.2 (DrugBank, 2019). Es un aditivo sintético perteneciente a una clase de medicamentos fisiológicamente análogos a la adrenalina. Tiene una estructura química relacionada a las catecolaminas, capaz de interactuar con receptores adrenérgicos, generalmente del tipo  $\beta_2$  (**Figura 5**). Posee una vida media de acción prolongada, con la particularidad de poder almacenarse en hígado, riñón y músculo entre otros (Heitzman, 1996).



**Figura 5:** Estructuras químicas del clenbuterol (a) y clorhidrato de clenbuterol (b) (DrugBank 2019).

Los  $\beta$ -agonistas son análogos estructurales de las catecolaminas epinefrina y norepinefrina, las cuales tienen una estructura muy similar y ambas se unen a cuatro receptores diferentes de la superficie celular llamados adrenoreceptores (específicamente, los receptores  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$  y  $\beta 2$ ) Todos derivan de una estructura similar a la adrenalina y, por tanto, se basan en la estructura de la feniletilamina (Ackland & Stewart, n.d.).

## **2.2.2 Farmacocinética.**

### *2.2.2.1 Absorción.*

Los sitios de absorción y el efecto del clenbuterol están relacionados con la ubicación de los  $\beta$ -adrenoreceptores. El clenbuterol trabaja de manera similar a la de los transmisores adrenérgicos adrenalina-noradrenalina con propiedades selectivas a los receptores  $\beta 2$  estimulantes y con un mínimo efecto a los  $\beta 1$  y  $\alpha$ , actuando sobre los terminales posganglionares del sistema nervioso simpático (Dominguez et al., 2009).

El tiempo en que se da la absorción del clenbuterol depende de la vía de administración; por vía oral, la absorción alcanza los niveles máximos plasmáticos entre la segunda y tercer hora, sin embargo, por vía subcutánea o intramuscular es aún más rápida, alcanzándose las máximas concentraciones dentro de los 15-30 minutos después de la aplicación y su tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) es de 35 horas (Yamamoto, 2002).

### *2.2.2.2 Distribución.*

El clenbuterol se distribuye en casi todos tejidos debido a la ubicación de los  $\beta$ -adrenoreceptores. En la mayoría de las investigaciones sobre residuos de clenbuterol en tejidos de ganado bovino, coinciden que los niveles máximos de residuos se encuentran en ojo, hígado, riñones, y pulmones mientras que en el músculo y la grasa presentan los niveles más bajos (Marban & López, 2011).

### *2.2.2.3 Metabolismo.*

La biotransformación del clenbuterol difiere entre especies animales, como en el caso del ganado bovino y caballar, por lo que se han identificado diferentes metabolitos; sin embargo, el principal componente identificado en estas especies ha sido el clenbuterol no metabolizado, seguido de los óxidos y conjugados con otras estructuras (Heitzman, 1996).

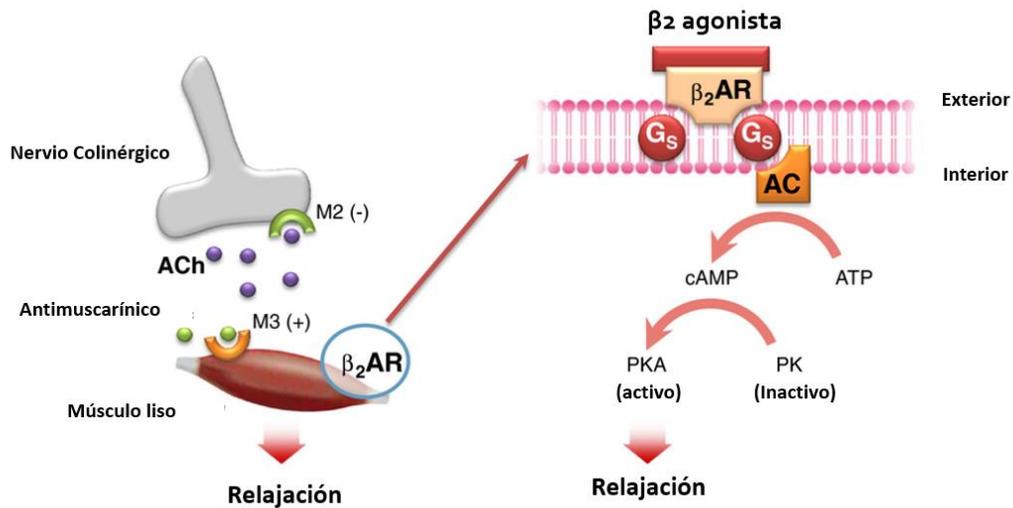
En el ganado bovino y en caballos, algunos autores han identificado al clenbuterol no metabolizado como el principal residuo encontrado en orina e hígado, también se han identificado pequeñas cantidades de ácido 4-amino-3,5-diclorobenzoico y ácido 4-amino-3,5-diclorohipúrico (Zalko, Debrauwer, Bories, & Tulliez, 1998).

#### *2.2.2.4 Excreción.*

El clenbuterol se excreta rápidamente en una gran proporción por la orina en forma de clenbuterol no metabolizado y el resto se elimina en su mayor parte con las heces. En bovinos administrados con clenbuterol por vía oral, inyección intramuscular e inyección intravenosa, se encontró que el 50 a 85% de la dosis se excretó en la orina, 5 a 30% se eliminó en las heces y una pequeña porción 0.9 a 3% por leche en vacas lactantes, 4 a 15 días después de la administración (Heitzman, 1996).

### **2.2.3 Farmacodinamia.**

Los  $\beta$ -adrenérgicos son moléculas orgánicas que se unen al receptor  $\beta$ -adrenérgico y dan lugar al complejo agonista-receptor que a su vez activa a la proteína Gs. La subunidad  $\alpha$  de la proteína Gs activa a la adenilato-ciclase, enzima que produce el monofosfato de adenosina cíclico (AMPC), una de las principales moléculas de señalización intracelular (**Figura 6**). Esta molécula produce sus efectos al unirse a la subunidad reguladora de la cinasa proteica A, para liberar la subunidad catalítica que fosforila a las proteínas intracelulares; estas proteínas tienen papeles funcionales vitales para una variada gama de acciones que van a permitir la entrada de  $Ca^{2+}$  a la célula, hasta mediar la síntesis de proteínas clave para la actividad celular (Smith, 1998).



**Figura 6:** Esquema de la farmacodinamia de los  $\beta$ -adrenérgicos, el incremento del AMPc produce una cascada de señalización para producir los efectos biológicos (Imagen obtenida y traducida de Nardini et al., 2014).

### 2.2.3.1 Mecanismo de acción.

Los agentes adrenérgicos pueden actuar directamente sobre las células efectoras o indirectamente para facilitar los mecanismos homeostáticos reflejos. En la célula, los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos se unen de manera reversible a un receptor, la adenil ciclasa, la unión induce un cambio en la estructura que activa su actividad enzimática. Al interactuar con su receptor, la adenosin cíclica 3'5'-monofosfato (AMPc), proteína quinasa dependiente, induce una serie en cascada de reacciones de fosforilación de proteínas. La proteína quinasa activada puede fosforilar una variedad de proteínas utilizando trifosfato de adenosina como sustrato. El resultado final es una mayor concentración intracelular de AMP cíclico. El AMPc controla la secuencia de eventos intracelulares que finalmente conduce a la actividad biológica, como la broncodilatación del músculo liso bronquial o la inhibición de la secreción mediadora de los mastocitos pulmonares. La potencia de un agonista es directamente proporcional a su afinidad por los receptores tisulares y su capacidad para activar la célula una vez que se produce la unión (Sillence & Matthews, 1994).

### 2.2.3.2 *Efecto metabólico.*

Los efectos metabólicos están relacionados con la concentración tisular de Adenosín Monofosfato cíclico (AMPc), a nivel muscular y hepático, la conversión de Adenosín Trifosfato (ATP) en AMPc se produce de manera acelerada al igual que la activación de distintas enzimas, fundamentalmente de tipo fosforilasa, que catalizan la transformación de glucógeno en glucosa, aunque también están implicadas otras, como proteínas quinasas, lipasas y fosfofructoquinasas, de esta manera, se produce una aceleración de la movilización de los ácidos grasos, formándose ácido láctico en sangre, hígado y musculatura esquelética, también presenta una tendencia especial hacia el incremento de la lipólisis o descenso de la lipogénesis (Choo, Horan, Little, & Rothwell, 1992).

En el tejido adiposo aumenta el metabolismo de los lípidos en el adipocito, por lo tanto, impiden y reducen la síntesis y la esterificación de ácidos grasos, resultando en una reducción en el anabolismo de los lípidos en el adipocito, Además, la activación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, causa un aumento en el AMPc, que activa a la proteincinasa A, la cual a su vez fosforila a la hormona sensible a lipasa dando inicio a la lipólisis (Johnson, Smith, & Chung, 2014).

En el tejido muscular el incremento de adenosin monofosfato cíclico (AMPc) provocado por la unión de un ligando extracelular a un receptor acoplado a proteína G permite que se unan la adrenalina y la noradrenalina a la proteína G y en respuesta a estos efectos se aumenta la perfusión sanguínea hacia el músculo dando como resultado una mayor disponibilidad de energía y aminoácidos, en consecuencia aumenta la síntesis y retención de proteína que favorece la hipertrofia muscular, principalmente de los músculos del cuarto posterior del animal al que se le ha administrado clenbuterol (Kim & Sainz, 1992).

### **2.2.4 Indicaciones Terapéuticas.**

La acción farmacológica de los fármacos adrenérgicos, depende de su capacidad para estimular específicamente los receptores  $\alpha$  o  $\beta$ , así como de la densidad de los receptores en el órgano o tejido diana. Los receptores de tipo  $\beta$  se distribuyen en diferente medida según sea el órgano del que se trate. Por ejemplo, los localizados en el corazón son preferentemente del tipo  $\beta_1$ , mientras que los que se encuentran ubicados en los bronquiolos son del tipo  $\beta_2$ . Los primeros aumentan la contracción y la frecuencia cardiaca, mientras que los segundos producen un efecto broncodilatador (Popa, 1984).

El clenbuterol se ha utilizado como fármaco broncodilatador para el tratamiento del asma. Su acción terapéutica es de un potente simpaticomimético con gran afinidad por los receptores  $\beta_2$  de la zona bronquial, elimina el broncoespasmo, estimula la vibración de los cilios bronquiales, facilita la expectoración y aumenta la ventilación pulmonar con efecto prolongado. Es utilizado también para el broncoespasmo, bronquitis, bronquiolitis, enfermedad pulmonar crónica obstructiva y afecciones pulmonares agudas y crónicas ha dado buenos resultados al ser administrado conjuntamente con antibióticos, y a su vez en la prevención de reacciones alérgicas respiratorias.

Se utiliza también como agente tocolítico, por su capacidad para relajar la musculatura lisa del útero. Su capacidad tocolítica es particularmente aprovechada en el área reproductiva en yeguas y vacas (Brockway JM, MacRae JC, 1987). También es estimulante cardiaco, por sus efectos cronotrópico e inotrópico positivos, lo que resulta de gran utilidad en tratamientos de urgencia de bradicardias producidas por bloqueo cardiaco o cuando es necesario aumentar la contractilidad miocárdica.

### **2.2.5 Dosis Terapéutica.**

#### *2.2.5.1 En Humanos.*

En medicina humana el clenbuterol es un medicamento broncodilatador para el tratamiento del asma y en fisicoculturismo es utilizado por su efecto anabólico. Como broncodilatador, bajo supervisión y prescripción médica, la dosis es de 10, 20 y hasta 40  $\mu\text{g}$ /adulto al día.

#### *2.2.5.2 En animales.*

En medicina veterinaria se usa también como broncodilatador principalmente utilizado en caballos de carreras a una dosis de 240 a 320  $\mu\text{g}/\text{día}$  en bovinos y equinos (Yamamoto, 2002).

El comité mixto de la FAO/OMS (1998) sin afán de proponer el uso del clenbuterol como promotor de crecimiento, basado en resultados de estudios *in vivo* de ratones de laboratorio, propuso el índice de la Ingesta Diaria Admisible (IDA) en 0.004  $\mu\text{g}$  de clenbuterol  $\text{kg}^{-1}$  de peso vivo  $\text{día}^{-1}$ , teniendo en consideración que está calculado con el fármaco clenbuterol, sin incluir a sus metabolitos.

## **2.3 NORMATIVIDAD.**

### **2.3.1 A nivel internacional.**

#### CODEX ALIMENTARIUS

El *Codex Alimentarius* son Normas Internacionales de los Alimentos que tienen como finalidad garantizar alimentos inocuos y de calidad a todas las personas y en cualquier lugar. Está integrado por 188 países y la Unión Europea, y México es miembro desde 1969. Es regido por el Comité Mixto de la FAO/OMS.

El Comité Mixto FAO/OMS de expertos en aditivos alimentarios (JECFA) es un comité científico internacional de expertos administrado conjuntamente por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS). Entre sus funciones de trabajo, están la evaluación de riesgos/evaluación de la inocuidad de aditivos alimentarios (añadidos intencionalmente), así como los residuos de medicamentos veterinarios en productos animales entre otros. Además de las especificaciones y métodos analíticos, definición de los residuos y propuestas de límites máximos de residuos (medicamentos veterinarios).

Dosis máximas.

El objetivo principal de establecer dosis máximas de uso para los aditivos alimentarios en diversos grupos de alimentos es asegurar que la ingestión de un aditivo procedente de todos sus usos no exceda de su ingesta diaria admisible IDA.

Ingestión Diaria Admisible.

Es una estimación efectuada por el JECFA de la cantidad de aditivo alimentario, expresada en relación con el peso corporal, que una persona puede ingerir diariamente durante toda la vida sin riesgo apreciable para su salud (FAO, 1995).

Límites Máximos de Residuos (LRM).

Se define como el nivel más alto permisible de un residuo o contaminante que puede considerarse como aceptable en una porción comestible de productos animales en particular, cuando éste es analizado por la metodología oficialmente aceptada para su

cuantificación, también se conoce como límite de tolerancia (NOM-004-ZOO-1994, 2001). El *Codex Alimentarius* del comité mixto FAO/OMS y la Norma Oficial Mexicana establecen un LRM de 0.2 µg/kg para músculo de res y 0.6 µg/kg para hígado de res (FDA & OMS, 2015).

### **2.3.2 En Europa.**

La Comunidad Europea comenzó a regular el uso de algunos promotores del crecimiento que pudieran ser empleados en la cría del ganado (Reig & Toldrá, 2008). Es hasta el 16 de septiembre de 1989 que se incluye a los β-agonistas en general y al clenbuterol en particular a la directiva 86/469/EEC, el cual prohíbe el uso de estas sustancias con fines de promotores de crecimiento, obligando a cada país del bloque a hacer una ampliación del Código Penal, tipificando el uso del clenbuterol en los animales cuyas carnes o productos se destinen al consumo humano, como delito contra la salud pública.

### **2.3.3 En Estados Unidos.**

Hay dos compuestos beta-agonistas aprobados por la FDA para su uso en especies animales comestibles en los Estados Unidos: clorhidrato de ractopamina y clorhidrato de zilpaterol. La ractopamina está aprobada para uso en cerdos, pavos y ganado, mientras que el zilpaterol solo está aprobado para su uso en bovinos. No existen beta-agonistas aprobados para su uso en pollo u oveja. La ractopamina y el zilpaterol también están aprobados para su uso en otros países del mundo, como Brasil, Canadá, Corea del Sur y México

### **2.3.4 En México.**

En México, es la Secretaría de Salud (SSA) lleva a cabo actividades referentes a la inocuidad de los productos cárnicos a través de la Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), y por la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER) (anteriormente conocida como Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación SAGARPA), a través del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), de acuerdo con sus ámbitos de competencia, en el cumplimiento respectivo de las leyes, reglamentos y normas oficiales mexicanas en dicha materia.

#### 2.3.4.1 *Para su uso como anabólico en el ganado.*

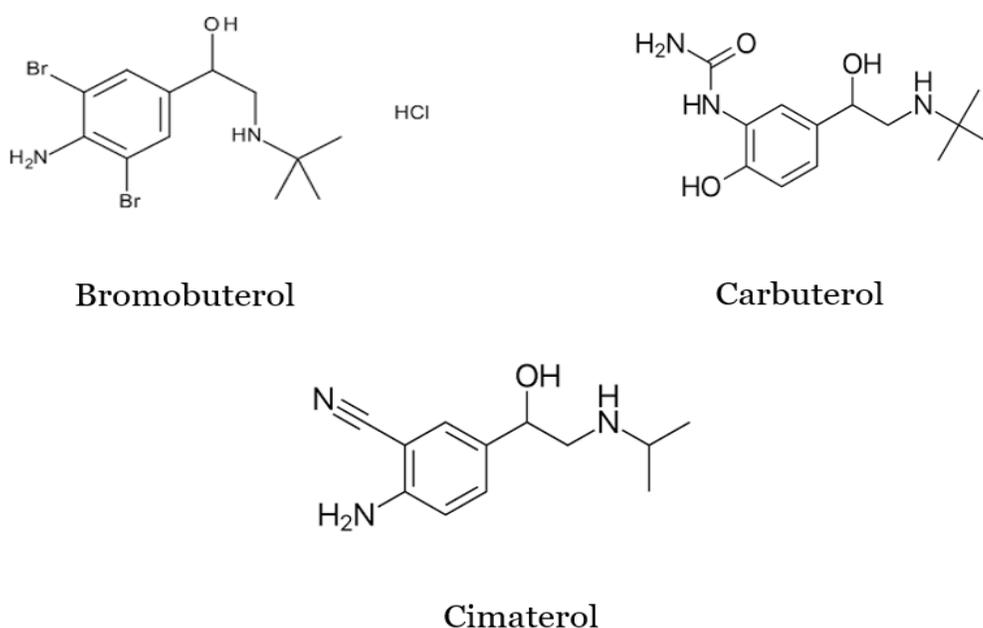
Con el fin de obtener la máxima ganancia en la comercialización de la carne, productores e introductores de ganado alimentan a sus animales con clenbuterol, sin importarles en absoluto que esta sustancia resulte dañina para el organismo humano. En México, se han emitido normas que prohíben el empleo del clenbuterol en la alimentación de animales domésticos, su importación, comercialización, transporte y suministro; sin embargo, su uso se sigue dando de manera clandestina

En 2011 en un reportaje de la Jornada, el Secretario Ejecutivo del Consejo Nacional de Educación de la Medicina Veterinaria y Zootecnia Carlos Antonio López Días explicó que el uso indebido del clenbuterol se sigue dando porque es cinco veces más barato que el zilpaterol que es un anabólico autorizado para su uso en bovinos, además, cada kilogramo de clenbuterol rinde para 50 toneladas de alimento, mientras que en el caso del zilpaterol solo rinde para 8 toneladas de alimento (La Jornada, 2011).

En México, la SAGARPA, tanto en el ámbito estatal como en el federal, para mantener operativos de vigilancia y control, así como para la erradicación del uso del clenbuterol, emitió en 1999 la Norma Oficial Mexicana NOM-061-ZOO-1999 (SAGARPA, 2000), denominada: Especificaciones zoosanitarias de los productos alimenticios para consumo animal, en la cual queda explícitamente prohibido el uso de clenbuterol, así como de todos aquellos ingredientes y/o aditivos alimenticios que comprobadamente puedan ser nocivos para la salud pública o representen riesgo zoosanitario, y que no cuenten con el soporte técnico correspondiente para su empleo en la nutrición de los animales. Esta norma, en su capítulo cuatro, en las especificaciones zoosanitarias de los productos alimenticios para uso animal, indica que es imperante adoptar buenas prácticas en la producción animal, a través de una adecuada alimentación animal, lo cual puede minimizar los riesgos zoosanitarios, lo que a su vez redundara en un incremento de la productividad en las especies para abasto. Al mismo tiempo se hace hincapié en cuidar y salvaguardar la salud pública, evitando el uso de sustancias prohibidas como el clenbuterol.

En marzo del 2002 se publicó en el Diario Oficial de la Federación la Norma Oficial de Emergencia la NOM-EM-015-ZOO-2002: Especificaciones técnicas para el control del uso de beta-agonistas en los animales. El 25 de marzo de 2002, se publicó el acuerdo por el que se activó el Dispositivo Nacional de Emergencia de Sanidad Animal, que establece

medidas para la detección del Clenbuterol a nivel nacional e impedir su uso, además de que queda prohibida la producción, manufactura, fabricación, elaboración, preparación, acondicionamiento, transportación, tráfico, comercialización, importación, suministro y/o utilización de los siguientes principios activos como ingredientes activos, aditivos, alimenticios y/o medicamentos en formulación de productos alimenticios destinados para consumo y uso en animales, tales como: Bromobuterol, Carbuterol, Cimaterol (**Figura 7**) y Clenbuterol, entre otros, otorgándole un carácter enunciativo más no limitativo por lo que incluye cualquier beta-agonista conocido o de nueva creación.



**Figura 7:** Otros  $\beta$ -agonistas prohibidos en México para su uso en la alimentación del ganado según la NOM-EM-015-ZOO-2002.

En mayo de 2011, se enuncia el proyecto de modificación a la norma oficial mexicana NOM-004-ZOO-1994 que emite los límites máximos permisibles y procedimientos de muestreo para grasa, hígado, músculo y riñón en aves, bovinos, caprinos, cérvidos, equinos, ovinos y porcinos, donde se modifican en el caso de los  $\beta$ -agonistas los límites máximos permisibles del clenbuterol, zilpaterol y ractopamina. En 2014 se da aviso de la cancelación de esta norma debido a la necesidad de actualizar la información.

## **2.4 Técnicas de análisis aprobadas para detectar clenbuterol en muestras de tejidos.**

Debido a la naturaleza, estructura y tamaño de la molécula de clenbuterol, existe una gran variedad de procedimientos analíticos que se han publicado en la literatura desde 1990, para la determinación de residuos de clenbuterol y otros  $\beta$ -agonistas en diferente tipo de tejidos.

En México de acuerdo a la norma oficial NOM-EM-015-ZOO-2002, los métodos analíticos oficiales para la detección de los beta-agonistas, son cualquiera de los siguientes:

- a) Ensayo inmuno-enzimático.
- b) Cromatografía de gases.
- c) Cromatografía de líquidos de alta resolución.

La cromatografía de líquidos proporciona ventajas significativas sobre el ensayo inmuno-enzimático y la cromatografía de gases para el análisis de clenbuterol, en este método no hay necesidad de derivatización, y el sistema cromatográfico es compatible con muestras biológicas, el desarrollo de interfaces de la cromatografía de líquidos como la termopulverización y electrospray ha permitido el análisis de clenbuterol en varias matrices como: orina, suero, plasma, hígado, pelo y retina, con límites de detección de 0.01 a 0.5 ng L<sup>-1</sup> (Tang, Wang, Shi, Hu, & Yuan, 2018). En lugar de detección por espectrómetro de masas, se han acoplado otros métodos instrumentales como: detectores electroquímicos y ultravioleta que proporcionan la sensibilidad necesaria para la confirmación de clenbuterol, sin embargo, la selectividad es menor que en el caso del detector selectivo de masas.

En 2013, Morales et al. desarrolló una metodología para la determinación de clenbuterol en hígado de bovino por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR). La extracción se realizó con acetonitrilo e isopropanol. El extracto se analizó empleando una columna de fase reversa C-18, un detector UV a 214 nm y una mezcla de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05M (pH 3.0) /acetonitrilo (85:15, v/v) como fase móvil. El tiempo de retención para el clenbuterol fue 24.82 min. Los límites de detección y de cuantificación obtenidos fueron de 0.9 y 1.8 ng/mL, respectivamente.

### **3. JUSTIFICACIÓN.**

Satisfacer las necesidades alimenticias de una población en constante crecimiento ha llevado a los productores de cárnicos a utilizar promotores de crecimiento en el ganado, lo que ha provocado varias intoxicaciones en diversas partes de México y el mundo. El clenbuterol está prohibido como promotor de crecimiento en México; sin embargo, el entorno social y económico de país indican que se sigue utilizando para tal fin. La SSA y la SADER concurren en la vigilancia sanitaria del clenbuterol, es por ello importante realizar un análisis constante de los productos cárnicos. En este trabajo se pretende evaluar el posible uso de clenbuterol en el ganado de consumo humano (bovino) mediante su cuantificación en distintos productos cárnicos que se pueden obtener en el mercado popular obtenidas de distintas zonas de Cuernavaca, Morelos para determinar su posible presencia.

## **4. HIPÓTESIS.**

El análisis de muestras de carne de bovino por cromatografía líquida de alta resolución, provenientes del mercado popular, permite determinar si el clenbuterol se utiliza como promotor del crecimiento en el ganado bovino y detectar riesgos de posibles intoxicaciones en humanos.

## **5. OBJETIVOS.**

### **5.1 OBJETIVO GENERAL.**

Recolectar y analizar muestra de carne de bovino provenientes de distintos centros de distribución dentro de Estado de Morelos para detectar y cuantificar posible presencia de residuos de clenbuterol.

### **5.2 OBJETIVOS PARTICULARES.**

- Desarrollar y validar el método para cuantificar clenbuterol por CLAR.
- Desarrollar el método de extracción de clenbuterol a partir de muestras de carne de bovino.
- Recolectar muestras de cárnicos (hígado y musculo de res) en distintos centros de distribución (carnicerías, mercados y tiendas de autoservicio) del Estado de Morelos.
- Realizar el análisis de las muestras de cárnicos por CLAR para cuantificar clenbuterol.

## 6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.

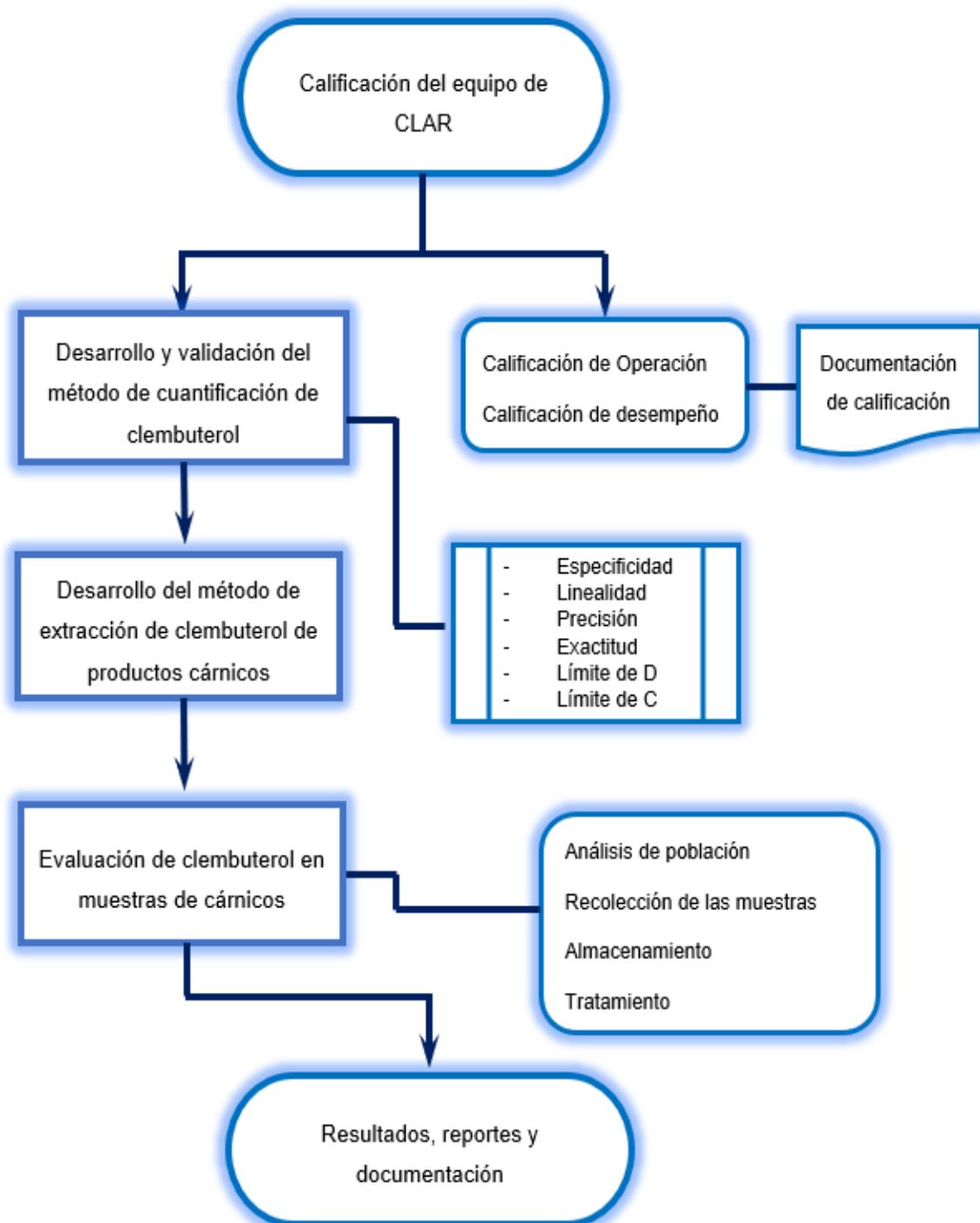


Figura 8: Estrategia experimental.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 7.1 Instrumentación, Equipos, Materiales y Reactivos.

#### 7.1.1 Instrumentación y Equipos.

Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Hitachi LaChrom Elite con detector UV y auto inyector con jeringa de 100  $\mu$ L e inyector de muestra de 100  $\mu$ L con interfase EZ LaChrom.

- Espectrofotómetro UV-2401, Shimadzu.
- Balanza analítica OHAUS PIONER® PA214.
- Sonificador Cole-Palmer.
- Centrifugadora Centurion Scientific Limit, con rotor para tubos de 50 mL.
- Potenciómetro Oaklon pH700.
- Campana de extracción.

#### 7.1.2 Materiales.

Columna Phenomenex C-18 de acero inoxidable de 150 mm de longitud por 4.6 mm de diámetro, tamaño de poro de 100 Å y tamaño de partícula de 3  $\mu$ m.

- Unidad de filtración Millipore
- Membranas de filtración Millipore de nylon con poro de 0.45  $\mu$ m.
- Tubos cónicos de 50 mL.
- Viales de capacidad máxima de 2 mL.
- Micropipetas de 10, 200 y 1000  $\mu$ L.

#### 7.1.3 Reactivos.

- Metanol grado HPLC (Fermont, varios lotes).
- Agua tridestilada.
- Clembuterol hidrocloreuro (Sigma Aldrich lote: BCBQ2163V).
- Fosfato de sodio monohidratado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) Lote: 738103.
- Sulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) lote: 749405.

- Cloruro de sodio (NaCl) lote: 724362.
- Acetonitrilo grado HPLC (Fermont, varios lotes).
- Gas nitrógeno.

## **7.2 MÉTODOS.**

### **7.2.1 Calificación del equipo de CLAR Hitachi LaChrom Elite.**

La calificación del equipo de cromatografía líquida de alta resolución Hitachi LaChrom Elite se realizó de acuerdo al protocolo por el laboratorio 4 de la facultad de farmacia de la UAEM.

### **7.2.2 Desarrollo del método para cuantificar clembuterol por CLAR.**

El sistema utilizado para identificación y cuantificación de clembuterol fue un cromatógrafo de líquidos de alta resolución con detector UV y jeringa de inyección automática de 100 µL. Para determinar la longitud de onda a utilizar primero se realizó un barrido en el espectro UV con el estándar de clembuterol (Sigma).

Para el desarrollo del método por CLAR se tomaron en cuenta las características fisicoquímicas y solubilidad de la molécula además de su polaridad y sus propiedades de absorción de luz UV, se planteó utilizar cromatografía de fase reversa con una columna C-18 como fase estacionaria y una fase móvil simple compuesta por metanol y agua. Pero, las características altamente orgánicas de la molécula de clembuterol lo hacen muy afín a la fase estacionaria de la columna C-18 lo que hacía difícil su elución.

Para resolver el problema se buscó mejorar la solubilidad en agua del clembuterol colocándolo en un medio rico en iones hidrogeno buscando protonar sus dos grupos amino. Para este se probó con una solución de buffer de fosfatos ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) a diferentes pHs por debajo de 7 (6, 5, 4.5, 4, 3.5 y 3); también se probaron mezclas con acetonitrilo a diferentes proporciones para mejorar la elución y resolución del pico correspondiente a clembuterol.

### **7.2.3 Preparación de los estándares de clembuterol y Pirfenidona.**

Solución stock de clembuterol:

Se pesaron 10 mg de clembuterol hidrocloreto y se disolvieron con agua/metanol 80:20 en matraz aforado de 10 mL, para una concentración de clembuterol de 1 mg/mL.

Soluciones de trabajo de clembuterol:

Solución de trabajo #1

Se tomaron 100  $\mu$ L de la solución stock de clembuterol (1 mg/mL) y se diluyeron con 9900 mL de solución diluyente (agua/metanol 85:15) para una concentración de 10  $\mu$ g/mL.

Preparación del patrón interno de Pirfenidona:

Las soluciones stock y de trabajo de Pirfenidona se prepararon de la misma manera que sus respectivas de clembuterol.

### **7.2.4 Método de extracción de clembuterol a partir de hígado de bovino.**

Se implementaron y analizaron diferentes métodos de extracción de clembuterol a partir de hígado de bovino, con el fin de evaluar la capacidad de extraer el máximo posible del analito de interés y que, a su vez, permitiera eliminar la mayor parte de los residuos no deseados presentes en la matriz. Los cuales se describen a continuación.

#### *7.2.4.1 Extracción simple.*

Se pesaron 5 g de muestra de hígado de res, se maceró y se agregaron 5 mL de acetonitrilo grado HPLC, la mezcla se homogeneizó y se centrifugó a 6000 rpm por 10 minutos. Se separó la parte líquida y se evaporó a sequedad en baño maría a 45°C, el residuo se disolvió con 1 mL de la solución diluyente y se filtró por membrana de 0.45  $\mu$ m antes de inyectar en el cromatógrafo.

#### *7.2.4.2 Extracción con fase orgánica y sales.*

Se pesaron 5 g de hígado de res, se maceraron con 5 mL de acetonitrilo grado HPLC, al macerado se agregó 1 g de NaCl y se agitó por 2 minutos a esta mezcla se agregaron 3 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se agitó por otros 2 minutos, posteriormente la mezcla se centrifugó por 2

minutos a 10000 rpm, se separó la parte líquida y se evaporó a sequedad y el residuo se disolvió con 1 mL de solución diluyente para después ser filtrado por membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  y finalmente analizado por CLAR.

#### *7.2.4.3 Extracción en fase sólida.*

Se pesaron y maceraron 5 g de hígado de res con 10 mL de buffer de fosfatos 0.05 M y pH 6.5, la mezcla se centrifugó por 6 minutos a 10000 rpm y 4 °C, la parte líquida se hizo pasar por cartuchos de fase sólida C-18 (phenomenex), la fase sólida se lavó con tres volúmenes de acetonitrilo para recuperar el compuesto retenido para posteriormente ser evaporado a sequedad con arrastre de nitrógeno y temperatura controlada de 45 °C, finalmente el residuo se disolvió con 1 mL de solución diluyente y se filtró por membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  y se analizó en el cromatógrafo.

#### **7.2.5 Optimización del método de extracción.**

Se pesaron 5 g de hígado de res y se maceraron y homogeneizaron con 13 mL de acetonitrilo grado HPLC, la mezcla se traspasó a un tubo cónico de 50 mL, se adicionaron 1 g de NaCl y 4 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> agitando después de cada adición durante 2 minutos, la mezcla se centrifugó por 10 minutos a 10000 rpm y temperatura de 4 °C, se separó la parte líquida y se evaporó a sequedad con temperatura controlada de 45 °C con arrastre de vapor con gas nitrógeno, el residuo se disolvió con 1 mL de solución diluyente y se filtró por membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  para posteriormente analizar por CLAR.

#### **7.2.6 Validación del método de cuantificación de clenbuterol.**

Para la validación del método se utilizó como guía las Normas Oficiales Mexicanas (NOM-177-SSA1-1998, 1998) y NOM-177-SSA1-2013, además de la guía internacional ICH Q2(R1) (ICH, 2005). Los resultados obtenidos del área bajo la curva (ABC) en unidades de absorbancia (mUV) se procesaron con el programa estadístico EXCEL 2016. El análisis se realizó a una longitud de onda de 210 nm ya que ésta se obtuvo la máxima absorción del clenbuterol. (**Figura 9**, apartado de resultados).

Se utilizó el método de patrón interno, el cual consiste en adicionar un estándar patrón de concentración conocida a muestras que contienen el analito de interés. En este caso se realizó la validación del sistema con el estándar de clenbuterol y el patrón interno en

solución; mientras que la validación de método se realizó con la adición del estándar de clenbuterol y el patrón interno a las muestras de tejido al inicio de la extracción.

La validación se planteó de acuerdo a las recomendaciones de la Norma Oficial NOM-177-SSA1-1998, donde se describe la validación del sistema y del método por separado, lo cual nos parece más adecuado para el método de patrón interno.

#### *7.2.6.1 Adecuabilidad del método.*

Se realizaron 5 inyecciones del estándar de clenbuterol más el estándar de pirfenidona a una concentración de 2 y 3  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. De los resultados de absorbancia se obtuvo el cociente de la relación de áreas y se calculó el promedio, la desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación (CV).

Con un criterio de aceptación para  $\text{CV} \leq 2\%$  (NOM-177-SSA1-1998 y la ICHQ2(R1)).

#### *7.2.6.2 Linealidad del método.*

Se prepararon curvas de calibración por triplicado de 7 niveles de concentración del estándar de clenbuterol en un rango de 50-5000  $\text{ng/mL}$  y el estándar de pirfenidona en una única concentración de 2000  $\text{ng/mL}$  en cada nivel. Con los resultados obtenidos de los cocientes de la relación de áreas (área de clenbuterol /área de pirfenidona), se construyeron las curvas de calibración y para cada una se calculó la pendiente (m), el intercepto (b), el coeficiente de correlación (r), el coeficiente de determinación ( $r^2$ ), el intervalo de confianza de la pendiente y del intercepto ( $\text{IC}\beta_1$  e  $\text{IC}\beta_0$  respectivamente) y el error típico.

El criterio de aceptación que se estableció fue:  $r \geq 0.99$ ,  $r^2 \geq 0.98$ ,  $\text{IC}\beta_1$  no incluye el cero,  $\text{IC}\beta_0$  incluye al cero y el error típico menor de 5%.

#### 7.2.6.3 *Precisión del método.*

Se evaluó con repetibilidad y reproducibilidad tanto para el sistema como para el método.

##### REPETIBILIDAD:

Se evaluaron por quintuplicado tres niveles de concentración (baja, media y alta) dentro del rango utilizado para la curva de calibración, de los resultados se calculó el promedio, la DE y el CV. Los criterios de aceptación establecidos fueron:

CV ≤ 2% para sistema y CV ≤ 15% para método.

##### REPRODUCIBILIDAD:

La reproducibilidad se evaluó con dos días más de repetibilidad del método. Criterio de aceptación: CV ≤ 15% (NOM-177-SSA1-1998 y 2013).

#### 7.2.6.4 *Exactitud del método.*

La exactitud se evaluó a partir de los ensayos de repetibilidad y reproducibilidad. Se calculó la concentración recuperada, el porcentaje de recobro y la desviación absoluta (DA) de cada inyección del estándar de clembuterol preparado.

#### 7.2.6.5 *Límite de Detección (LD).*

El límite de detección se calculó con base en la pendiente de la curva de calibración y la desviación estándar de los blancos.

Se calculó el LD con señal de ruido basal de 8 blancos (extractos de hígado res sin clembuterol) y la curva de calibración con la fórmula 1.

Fórmula 1:

$$LD = \frac{(3.3 \times S_b)}{b_1}$$

Donde:

S<sub>b</sub> = La desviación estándar de los blancos.

b1 = La pendiente de la curva de calibración.

#### 7.2.6.6 *Límite de Cuantificación (LC).*

El límite de cuantificación se calculó con base en la curva de calibración y la desviación estándar de los blancos.

Se calculó el LC con señal de ruido basal de 8 blancos (extractos de hígado res sin clembuterol) y la curva de calibración con la fórmula 2.

Fórmula 2:

$$LC = \frac{(10 \times S_b)}{b_1}$$

Donde:

S<sub>b</sub> = La desviación estándar de los blancos.

b1 = La pendiente de la curva de calibración.

#### 7.2.6.7 *Selectividad del método.*

La selectividad del método se evaluó verificando que no hubiera componentes de la matriz que interfirieran con la identificación y el análisis del clembuterol.

### **7.2.7 MUESTREO.**

#### 7.2.7.1 *Recolección de las muestras.*

Para la recolección de las muestras se utilizó el método de muestreo por conglomerados (clusters). Se decidió analizar 2 tipos de tejidos que fueron músculo e hígado de res. Así mismo los puntos de recolección se dividieron en 3, carnicerías localizadas en las diferentes

colonias del municipio, los mercados municipales y las tiendas de autoservicio que en algunos casos venden carne con el sello de TIF. La división de los conglomerados se realizó por zonas dividiendo el mapa de Cuernavaca en zona centro, norte, sur, este y oeste.

Para definir el tamaño de la muestra se utilizó la fórmula de tamaño de muestra corregido para cada conglomerado (Fórmula 3) basado en la probabilidad de encontrar una muestra contaminada con clenbuterol, para esto se tomaron en cuenta los antecedentes de estudios similares realizados en otros estados de la república mexicana.

Fórmula 3:

$$n = \frac{z^2 N p q}{d^2 (N - 1) + z^2 p q}$$

Donde:

p = Proporción que presenta el fenómeno de estudio.

q = Proporción que no presenta fenómeno de estudio.

N= Tamaño de la población.

z = Nivel de confianza.

d = Nivel de precisión.

Para obtener el número de muestras a recolectar (N) de cada zona a analizar se obtuvo la probabilidad de ocurrencia de acuerdo a los datos reportados en Sonora, Jalisco, Ciudad de México (antes Distrito Federal), Guerrero y el Estado de México. De acuerdo a los reportes todos los estudios muestran más del 50 % de encontrar tejidos contaminados con clenbuterol teniendo un promedio de 51.6%, así que se decidió utilizar un 50 % de probabilidad con un nivel de confianza del 95 % y un índice de error de 0.05.

Para identificar los puntos de recolección se utilizó la herramienta de mapas de Google, clasificando los puntos en tres grupos: carnicerías, mercados municipales y tiendas de autoservicio (**Figura 8**).

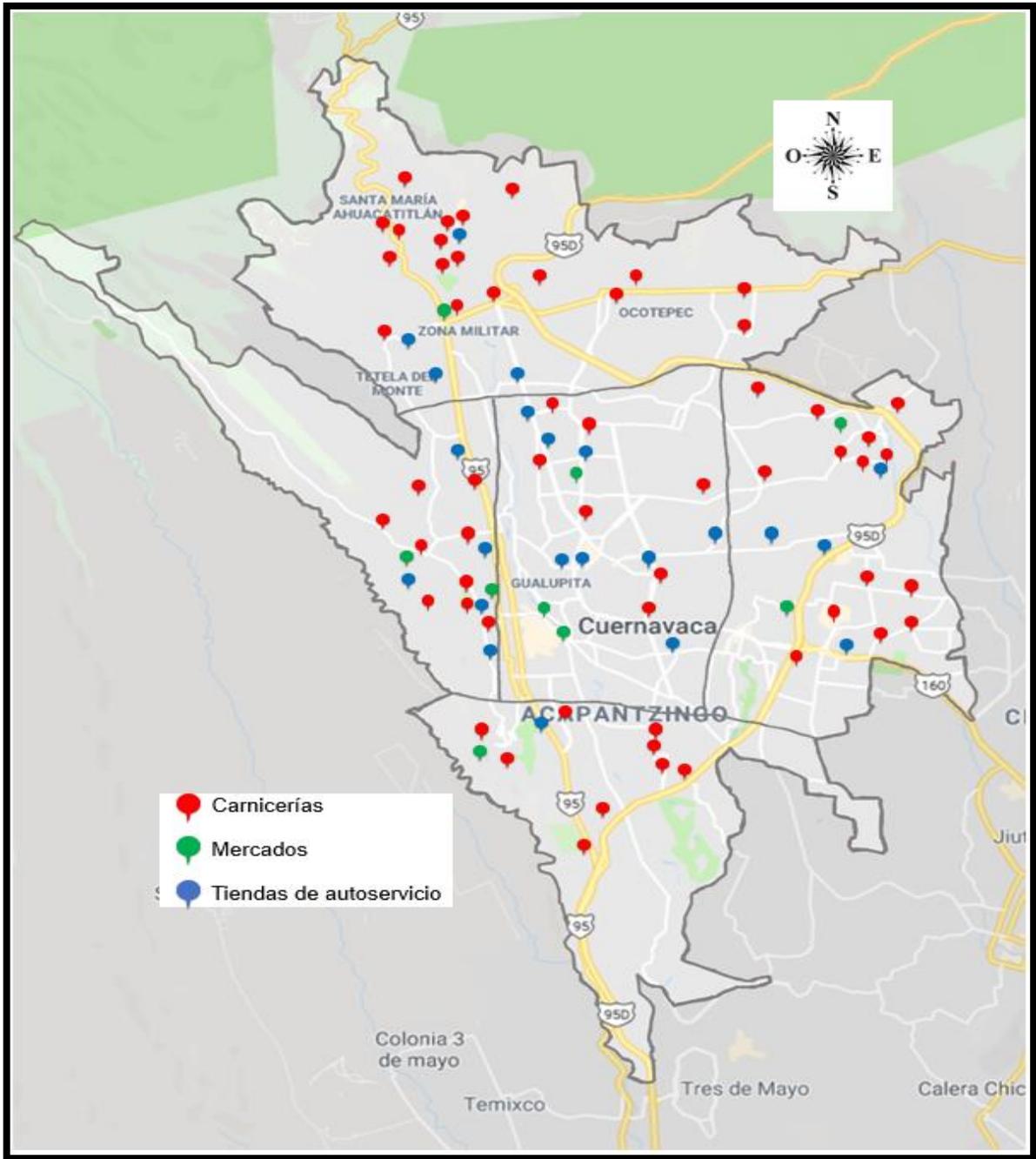
Las muestras se identificaron por tipo de muestra, zona, centro de distribución y número de muestra, por ejemplo:

**Músculo-Norte-Carnicería-muestra 07 = M-N-3-07 (Tabla 1).**

Una vez recolectada la muestra de tejido se identificó y guardó con papel aluminio en caja de unicele con gel refrigerante para su traslado al laboratorio para el análisis.

**Tabla 1:** Total de muestras recolectadas, clasificadas por código.

No.	MUESTRA										
1	M-C-1-01	19	M-N-1-01	37	M-N-3-14	55	M-E-2-01	73	M-O-1-01	91	H-C-2-01
2	M-C-1-02	20	M-N-2-01	38	M-N-3-15	56	M-E-2-02	74	M-O-1-02	92	H-C-2-02
3	M-C-1-03	21	M-N-2-02	39	M-N-3-16	57	M-E-2-03	75	M-O-2-01	93	H-C-2-03
4	M-C-2-01	22	M-N-2-03	40	M-N-3-17	58	M-E-2-04	76	M-O-2-02	94	H-C-2-04
5	M-C-2-02	23	M-N-2-04	41	M-N-3-18	59	M-E-3-01	77	M-O-2-03	95	H-C-2-05
6	M-C-2-03	24	M-N-3-01	42	M-S-1-01	60	M-E-3-02	78	M-O-2-04	96	H-N-2-01
7	M-C-2-04	25	M-N-3-02	43	M-S-2-01	61	M-E-3-03	79	M-O-2-05	97	H-N-2-02
8	M-C-2-05	26	M-N-3-03	44	M-S-3-01	62	M-E-3-04	80	M-O-3-01	98	H-N-2-03
9	M-C-2-06	27	M-N-3-04	45	M-S-3-02	63	M-E-3-05	81	M-O-3-02	99	H-S-2-01
10	M-C-2-07	28	M-N-3-05	46	M-S-3-03	64	M-E-3-06	82	M-O-3-03	100	H-E-1-01
11	M-C-2-08	29	M-N-3-06	47	M-S-3-04	65	M-E-3-07	83	M-O-3-04	101	H-E-2-01
12	M-C-3-01	30	M-N-3-07	48	M-S-3-05	66	M-E-3-08	84	M-O-3-05	102	H-E-2-02
13	M-C-3-02	31	M-N-3-08	49	M-S-3-06	67	M-E-3-09	85	M-O-3-06	103	H-O-1-01
14	M-C-3-03	32	M-N-3-09	50	M-S-3-07	68	M-E-3-10	86	M-O-3-07	104	H-O-2-01
15	M-C-3-04	33	M-N-3-10	51	M-S-3-08	69	M-E-3-11	87	M-O-3-08	105	H-O-2-02
16	M-C-3-05	34	M-N-3-11	52	M-S-3-09	70	M-E-3-12	88	M-O-3-09	106	H-O-2-03
17	M-C-3-06	35	M-N-3-12	53	M-E-1-01	71	M-E-3-13	89	H-C-1-01		
18	M-C-3-07	36	M-N-3-13	54	M-E-1-02	72	M-E-3-14	90	H-C-1-01		



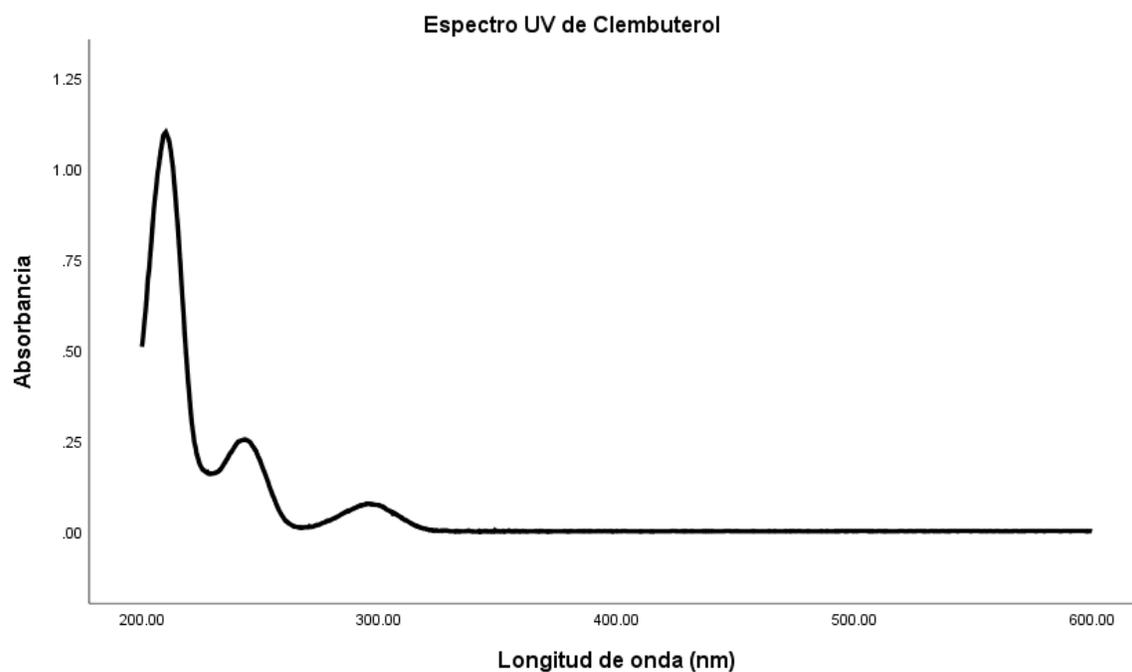
**Figura 9:** Mapa del municipio de Cuernavaca dividido por zonas. Los puntos de recolección están identificados por carnicerías (puntos rojos), Mercados municipales (puntos verdes) y tiendas de autoservicio (puntos azules).

## 8. RESULTADOS.

### 8.1 DESARROLLO DEL MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE CLEMBUTEROL.

#### 8.1.1 Determinación de la longitud de onda a utilizar.

La longitud de onda a utilizar se determinó mediante un análisis en el espectro UV de los 200 a los 600 nm del estándar de clenbuterol. De acuerdo a los resultados se observan 3 máximos de absorción 210, 243 y 290 nm (**Figura 9**). Se decidió utilizar la longitud de onda a la que absorbe más el clenbuterol (210 nm) debido a las bajas concentraciones esperadas en el análisis de las muestras.



**Figura 10:** Análisis en el espectro UV de 200 a 600 nm del estándar de clenbuterol con un máximo de absorción a los 210 nm (programa estadístico SPSS statistics).

### 8.1.2 Desarrollo y optimización del método.

Los ajustes y condiciones a los que se obtuvieron los mejores resultados fueron los siguientes:

Columna c-18 (Luna, Phenomenex), tamaño de partícula de 3  $\mu\text{m}$ , tamaño de poro de 100 Å, longitud de 150 mm por 4.6 mm de diámetro interno.

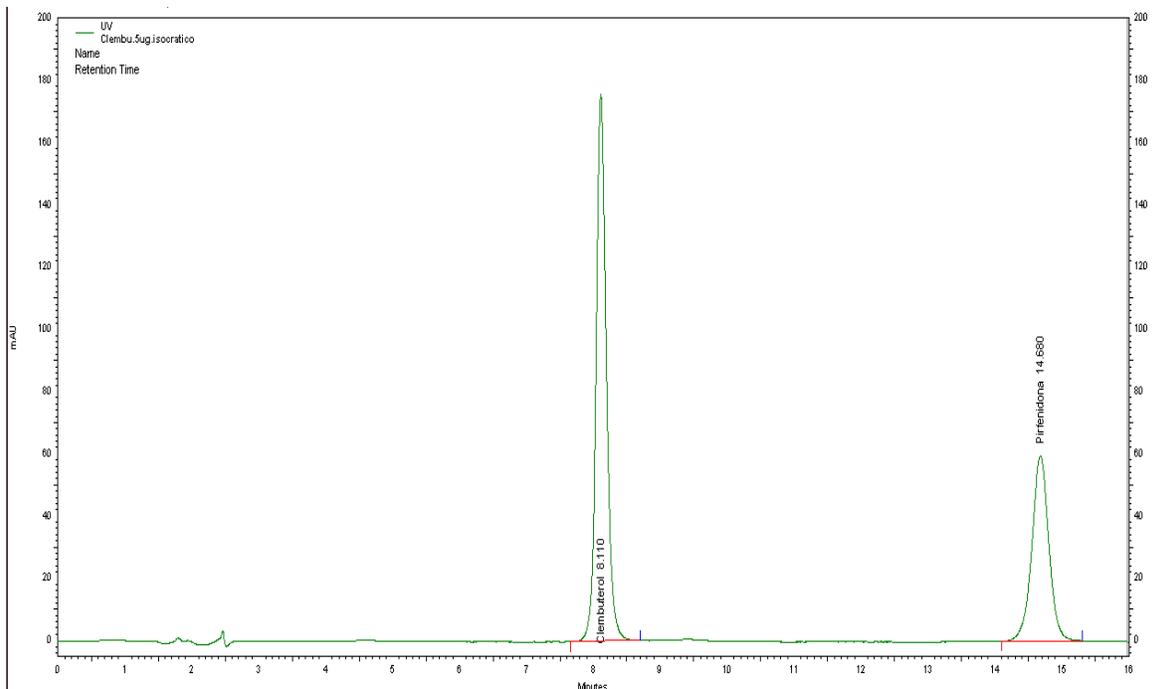
Fases móviles: Fase A: Buffer de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.05 M con pH de 3 ajustado con ácido fosfórico; Fase B: Acetonitrilo grado CLAR.

- Velocidad de flujo: 1 mL/minuto.
- Longitud de onda: 210 nm.
- Volumen de inyección: 50  $\mu\text{L}$ .
- Tiempo de análisis: 18 minutos.
- Temperatura: No controlada.

Método de patrón interno:

Debido a la posibilidad de que otros compuestos que se encuentran en la matriz pudieran eluir a un tiempo cercano a nuestro analito de interés y a las bajas concentraciones esperadas que se pueden obtener del mismo, se decidió desarrollar el método de cuantificación con la técnica de patrón interno. En esta técnica se añade un estándar de concentración conocida a la muestra que contiene el compuesto a cuantificar. El patrón interno ha de ser un compuesto de naturaleza similar al analito a cuantificar, pero que no esté presente en la muestra. Así, se compara la relación del compuesto a cuantificar con el patrón interno que tiene siempre la misma concentración.

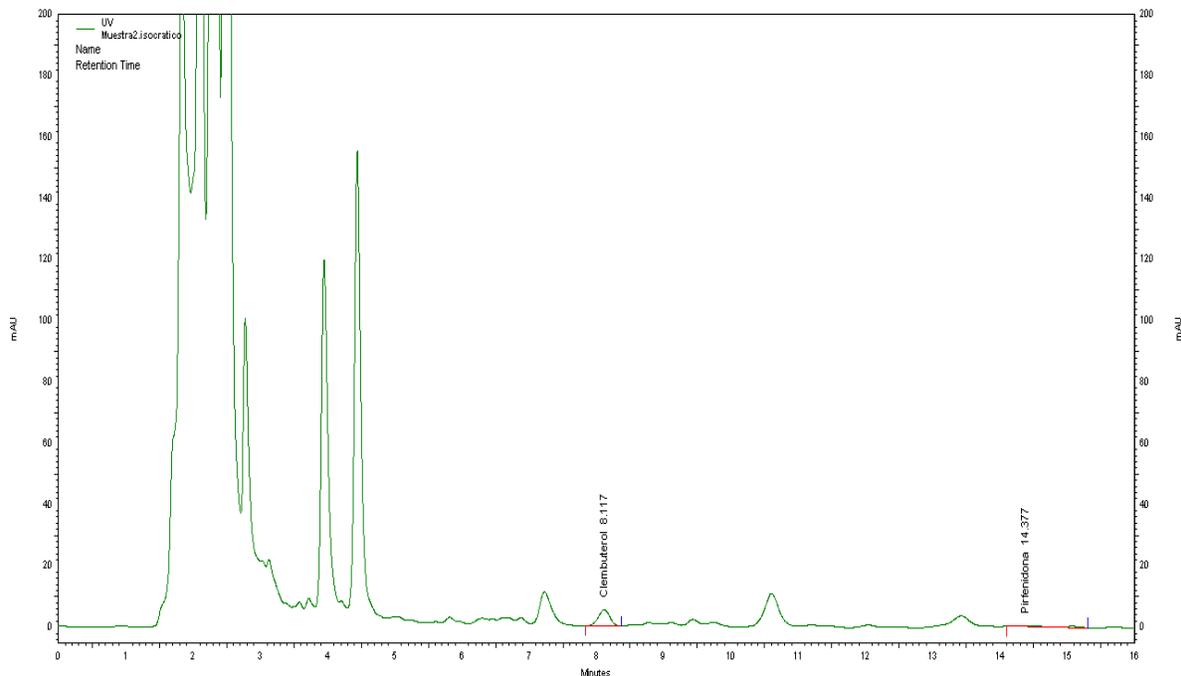
Para desarrollar el método se analizaron las características de los patrones internos con que contábamos en el laboratorio y se decidió probar aquellos que tuvieran una solubilidad en agua similar a la del clenbuterol. El patrón interno que mejor se adecuó a nuestro método fue la pirfenidona ya que eluía aproximadamente 6 minutos después que el clenbuterol, además de mostrar una buena resolución (**Figura 10**).



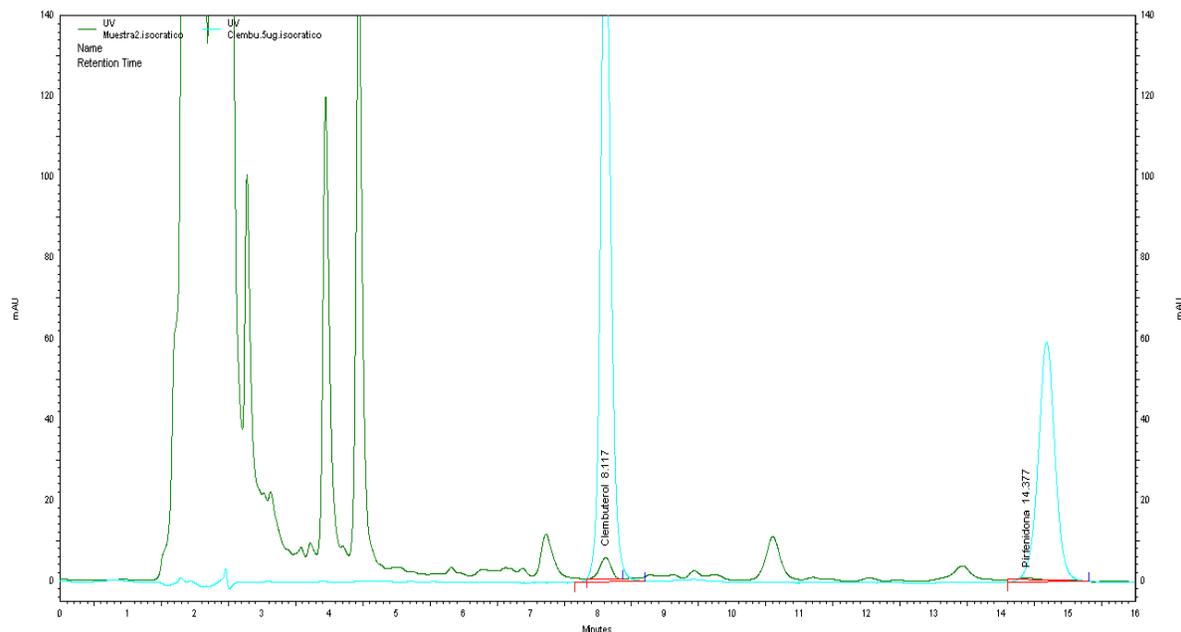
**Figura 11:** Cromatograma del método desarrollado para cuantificar clembuterol utilizando una metodología de patrón interno a 210 nm. El pico correspondiente al estándar de clembuterol eluye alrededor de los 8.1 minutos mientras que el pico correspondiente al patrón interno (pirfenidona) eluye alrededor de los 14.6 minutos.

### 8.1.3 Desarrollo del método de extracción de clembuterol.

Para la extracción de clembuterol de muestras de productos cárnicos de bovino, se probaron diferentes estrategias para obtener una muestra lo más limpia posible, es decir, libre de compuestos como ácidos grasos y proteínas que pudieran estar presentes en la matriz y que impidieran la correcta cuantificación del clembuterol. La mayoría de estos compuestos eluyen dentro de los primeros 4 minutos del análisis (**Figura 11 y 12**). Aproximadamente a los 8 minutos eluye el clembuterol y los 14.6 minutos la pirfenidona.



**Figura 12:** Cromatograma de una muestra de hígado de res, el pico que eluye a los 8.1 minutos corresponde con el tiempo de elución del clembuterol y no hay un componente en la muestra que interfiera con el tiempo de elución del patrón interno.



**Figura 13:** Cromatograma comparativo de la inyección de los estándares de clembuterol y pirfenidona (azul) y la inyección del extracto de una muestra de hígado de res (verde).

## 8.1.4 Validación del método de cuantificación de clenbuterol por CLAR.

### 8.1.4.1 Linealidad.

La linealidad se evaluó con 1 día del sistema (estándares en solución) y 1 día para el método (estándares en la matriz), con curvas de calibración por triplicado de 7 niveles de concentración. Para cada curva se obtuvo: el coeficiente de correlación, el coeficiente de determinación y los intervalos de confianza tanto de la pendiente como del intercepto.

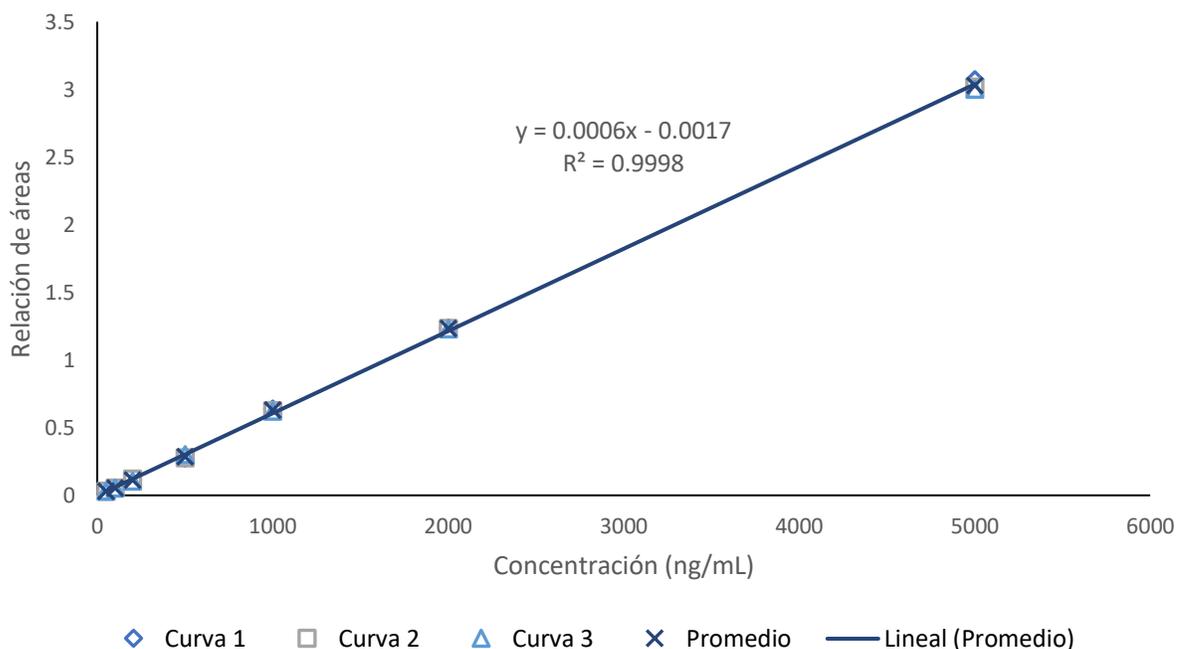
El método demostró ser lineal tanto para sistema (**Tabla 2**) como par el método (**Tabla 3**), en un rango de concentración de clenbuterol de 50-5000 ng/mL (**Figuras 13,14 y 15**), con una  $r^2$  mayor de 0.98.

Linealidad del sistema.

**Tabla 2:** Resultados de la linealidad del sistema.

<b>Parámetro</b>	<b>Curva 1</b>	<b>Curva 2</b>	<b>Curva 3</b>
Pendiente (m)	0.00062	0.00061	0.00060
Intercepto (b)	-0.00617	-0.00026	0.00139
Coef. Corre. (r)	0.99988	0.99987	0.99991
Coef. Deter ( $r^2$ )	0.99976	0.99974	0.99981
Intervalo de confianza de la pendiente (IC $\beta$ 1)	0.00060 - 0.00062	0.0005 - 0.0006	0.0005 - 0.0006
Intervalo de confianza del intercepto (IC $\beta$ 0)	-0.0289 - 0.0166	-0.0233 - 0.0228	-0.0182 - 0.0210

## Linealidad Sistema



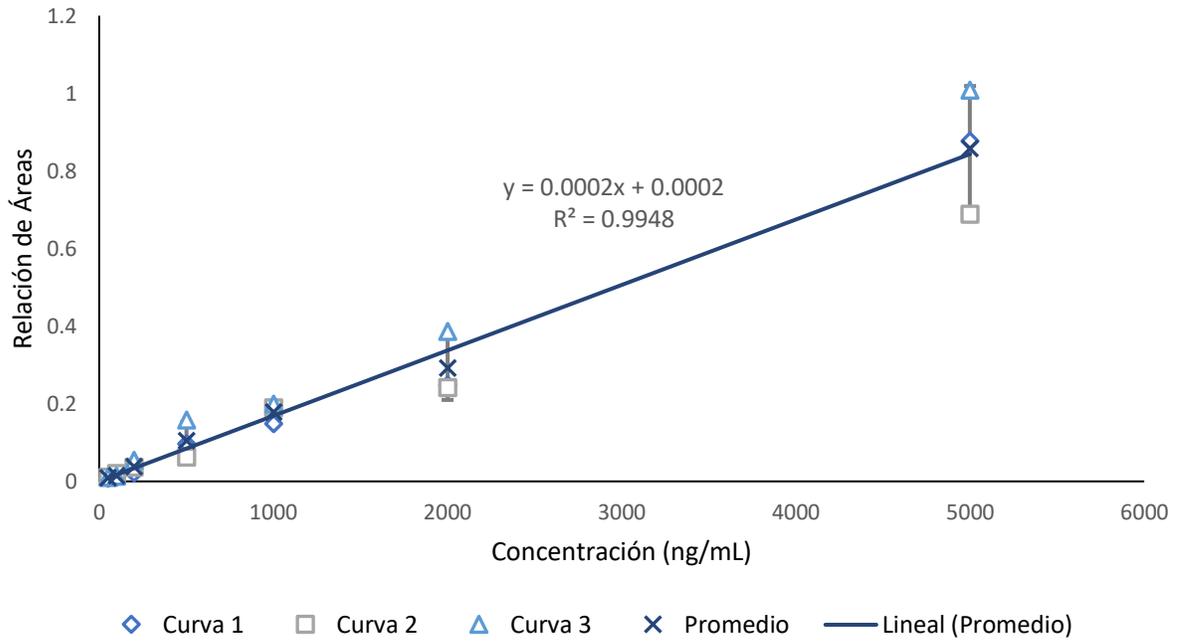
**Figura 14:** Gráfico de la linealidad del sistema, tres curvas de calibración y el promedio de las tres con su desviación estándar con la ecuación de la recta correspondiente al promedio.

Linealidad del método.

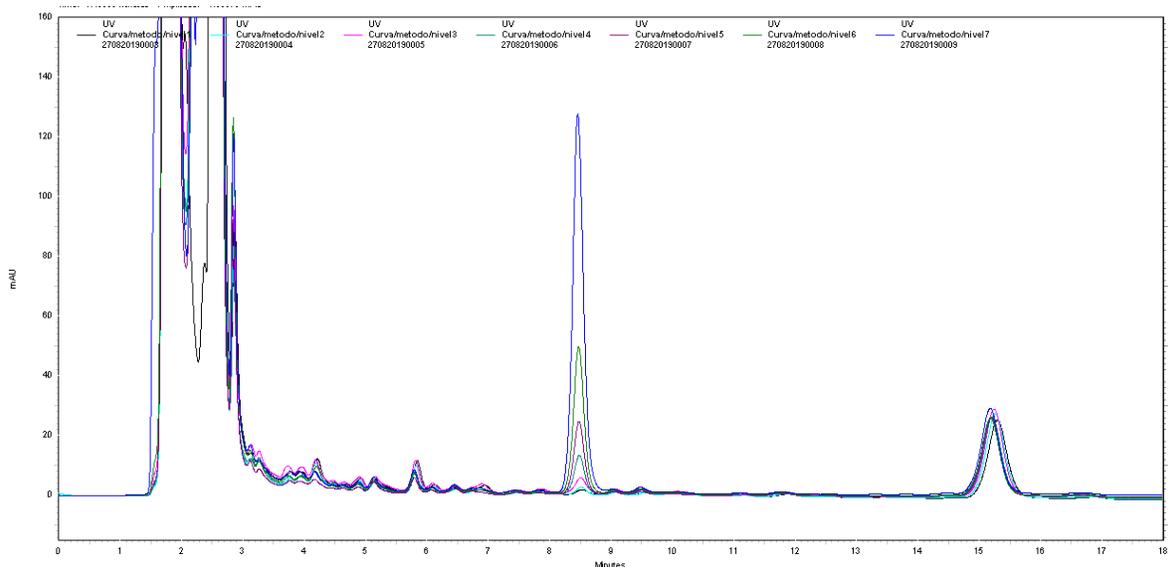
**Tabla 3:** Resultados de la linealidad del método.

<b>Parámetro</b>	<b>Curva 1</b>	<b>Curva 2</b>	<b>Curva 3</b>
Pendiente (m)	0.00017	0.00013	0.00020
Intercepto (b)	-0.01763	0.00784	0.01025
Coef. Corre. (r)	0.99252	0.99470	0.99783
Coef. Deter (r <sup>2</sup> )	0.98509	0.98944	0.99567
Intervalo de confianza de la pendiente (IC <sub>β1</sub> )	0.00015 – 0.00019	0.00011 – 0.00015	0.00018 – 0.00021
Intervalo de confianza del intercepto (IC <sub>β0</sub> )	-0.0685 – 0.0332	-0.0254 – 0.0411	-0.0210 – 0.0415

## Linealidad del Método



**Figura 15:** Gráfico de la linealidad del método, tres curvas de calibración, el promedio de las tres con su desviación estándar y con la ecuación de la recta correspondiente al promedio.



**Figura 16:** Cromatograma de la linealidad del método, se observa como el pico correspondiente a la concentración de clembuterol (8.5 min) va incrementando mientras que el del patrón interno (15.1 min) se mantiene constante.

#### 8.1.4.2 Precisión.

Se evaluó con repetibilidad y reproducibilidad que se describen a continuación.

##### 8.1.4.2.1 Repetibilidad.

La repetibilidad se evaluó con 1 día para sistema (en solución) y 2 días para el método (en la matriz), con la inyección por quintuplicado del estándar de clenbuterol y el patrón interno, a tres concentraciones conocidas baja, media y alta que se encontraban dentro del rango, pero que son diferentes a los puntos de la curva de calibración. De la relación de áreas y los valores de ecuación de la recta de la curva de calibración se obtuvo la concentración recuperada. El método demostró ser repetible ya que en cada nivel de concentración se obtuvo un CV menor del 3% para la repetibilidad del sistema (**Tabla 4**) y un CV menor del 15% para la repetibilidad del método (**Tablas 5 y 6**) (**Figura 16**).

Repetibilidad del sistema.

**Tabla 4:** Resultados de la repetibilidad del sistema, criterio de aceptación  $CV \leq 3\%$

Concentración nominal (ng/ml)	Concentración Recuperada (ng/ml)					Promedio	DE	CV
	1	2	3	4	5			
150	150.93	151.49	153.39	150.85	150.03	151.34	1.26	<b>0.83</b>
2500	2586.94	2495.41	2484.68	2556.27	2475.01	2519.66	49.17	<b>1.95</b>
4500	4505.91	4604.08	4564.61	4529.85	4494.79	4539.85	44.78	<b>0.99</b>

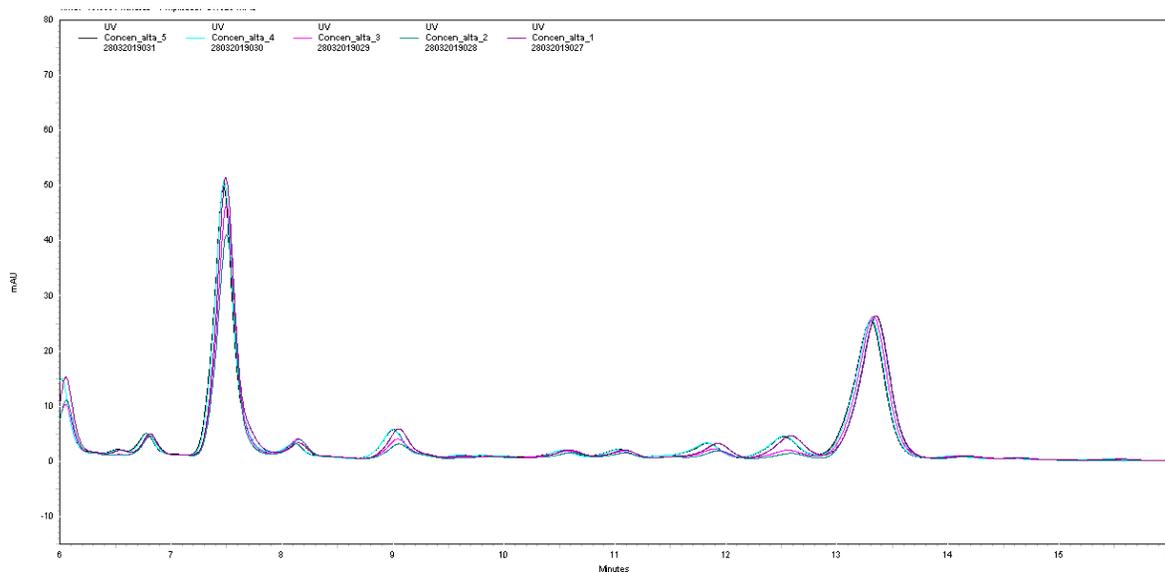
Repetibilidad del método día 1 y 2.

**Tabla 5:** Resultados de la repetibilidad del método día 1, criterio de aceptación  $CV \leq 15\%$ .

Concentración nominal (ng/ml)	Concentración Recuperada (ng/ml)					Promedio	DE	CV
	1	2	3	4	5			
150	147.96	162.29	149.82	146.04	166.40	154.50	9.20	<b>5.95</b>
2500	2599.14	2688.65	2714.52	2711.36	2701.03	2682.94	47.92	<b>1.79</b>
4500	4514.76	4365.49	4389.36	4357.44	4356.69	4396.75	67.28	<b>1.53</b>

**Tabla 6:** Resultados de la repetibilidad del método día 2, criterio de aceptación CV ≤ 15%.

Concentración nominal (ng/ml)	Concentración Recuperada (ng/ml)					Promedio	DE	CV
	1	2	3	4	5			
150	147.83	157.55	145.05	145.05	137.11	145.72	7.76	<b>5.32</b>
2500	2418.38	2426.14	2538.98	2423.89	2630.85	2487.65	94.59	<b>3.80</b>
4500	4643.29	4210.20	4254.77	4420.98	4665.39	4438.92	211.90	<b>4.77</b>



**Figura 17:** Cromatograma de la repetibilidad del método, 5 inyecciones de la concentración alta (4500 ng/ml) de clenbuterol (7.5 min) y el patrón interno (13.4 min).

#### 8.1.4.2.2 Reproducibilidad del método.

La reproducibilidad se obtuvo de los datos de los 2 días de repetibilidad, 3 concentraciones conocidas: baja, media y alta de los compuestos en la matriz. Las concentraciones utilizadas se encuentran dentro del rango y son diferentes a los puntos de la curva de calibración. El método mostró reproducibilidad con un coeficiente de variación menor del 15% de las concentraciones recuperadas a cada nivel de concentración (**Tabla 7**).

**Tabla 7:** Resultados de la reproducibilidad del método. Criterio de aceptación CV ≤ 15%.

Concentración nominal (ng/ml)	Concentración recuperada (ng/mL)				
	1	2	3	4	5
150	147.96	162.29	149.82	146.04	166.40
2500	2599.14	2688.65	2714.52	2711.36	2701.03
4500	4514.76	4365.49	4389.36	4357.44	4356.69
Concentración nominal (ng/ml)	Concentración recuperada (ng/mL)				
	6	7	8	9	10
150	147.83	157.55	145.05	141.06	137.11
2500	2418.38	2426.14	2538.98	2423.89	2630.85
4500	4643.29	4210.20	4254.77	4420.98	4665.39
Concentración nominal (ng/ml)	Promedio	DE	CV		
150	150.11	9.26	<b>6.17</b>		
2500	2585.30	124.87	<b>4.83</b>		
4500	4417.84	149.87	<b>3.39</b>		

#### 8.1.4.3 Exactitud.

La exactitud del método se evaluó con los datos de repetibilidad y reproducibilidad, de los cuales se obtuvo el porcentaje de recobro y la desviación absoluta para cada nivel de concentración. El método demostró exactitud con un % de recobro dentro del rango de 97-103% para la exactitud del sistema y % de recobro entre 85-115% para la exactitud del método (**Tablas 8, 9 y 10**).

**Tabla 8:** Resultados de la exactitud del sistema. Criterio de aceptación % de recobro entre 97-103%.

Concentración nominal (ng/ml)	% Recobro					Promedio
	1	2	3	4	5	
150	100.62	100.99	102.26	100.57	100.02	100.85
2500	103.48	99.82	99.39	102.25	99.00	
4500	100.13	102.31	101.44	100.66	99.88	

**Tabla 9:** Resultados de la exactitud del método día 1. Criterio de aceptación % de recobro entre 85-115%.

Concentración nominal (ng/ml)	% Recobro					Promedio
	1	2	3	4	5	
150	98.64	108.19	99.88	97.36	110.93	102.68
2500	103.97	107.55	108.58	108.45	108.04	
4500	100.33	97.01	97.54	96.83	96.82	

**Tabla 10:** Resultados de la exactitud del método día 2. Criterio de aceptación % de recobro entre 85-115%.

Concentración nominal (ng/ml)	% Recobro					Promedio
	1	2	3	4	5	
150	98.55	105.03	96.70	94.04	91.41	98.43
2500	96.74	97.05	101.56	96.96	105.23	
4500	103.18	93.56	94.55	98.24	103.68	

#### 8.1.4.4 Límite de Detección.

Se analizaron 8 blancos en los cuales se registró el valor del ABC de la señal de ruido y se calculó el promedio y la desviación estándar para el cálculo de los límites de detección y cuantificación en base a la curva de calibración (**Tabla 11**).

**Tabla 11:** Valores de la curva de calibración y de los blancos para estimar los límites de detección y cuantificación.

Datos de la curva de calibración		Datos de los blancos	
Pendiente (m)	1248.20	Promedio	5064.29
Intercepto (b)	-11284.61	DE	1900.65
Coef. Corre. (r)	0.99998		
Coef. Deter (r2)	0.99996		

$$LD = \frac{(3.3 \times S_b)}{b_1}$$

$$LD = \frac{(3.3 \times 1900.65)}{1248.20}$$

$$\mathbf{LD = 5.025 \text{ ng/mL.}}$$

#### 8.1.4.5 Límite de Cuantificación.

Se calculó de señal de ruido de 8 blancos y los valores de la curva de calibración.

$$LC = \frac{(10 \times S_b)}{b_1}$$

$$LC = \frac{(10 \times 1900.65)}{1248.20}$$

$$\mathbf{LC = 15.23 \text{ ng/mL.}}$$

La NOM-004-ZOO-1994 y el *codex alimentarius* de la FAO establecen el LRM en unidades de  $\mu\text{g/kg}$  de tejido. Para homologar las unidades de los límites de detección y cuantificación obtenidos se realizó la conversión de los límites de detección y cuantificación.

Puesto que el total del extracto de los 5 g de cada muestra tomada se disolvió con 1 mL de solución diluyente, y el análisis se realizó en unidades de ng/mL.

En términos de  $\mu\text{g/kg}$  de tejido los límites de detección y cuantificación serían:

$$\mathbf{LD = 1.005 \mu\text{g/kg}}$$

$$\mathbf{LC = 3.046 \mu\text{g/kg}}$$

El análisis de los resultados de las muestras se realizó en unidades de  $\mu\text{g/kg}$  de tejido.

### 8.1.5 Análisis de las muestras.

Se recolectaron y analizaron 88 muestras de músculo de res (pierna) y 18 muestras de hígado de res, de tres diferentes centros de recolección, mercados municipales, carnicerías y tiendas de auto servicio, distribuidos dentro del área de Cuernavaca Morelos la cual se dividió en cinco zonas, centro, norte, sur, este y oeste (**Tablas 12 y 13**). Se realizaron 2 análisis por muestra y se promediaron los resultados.

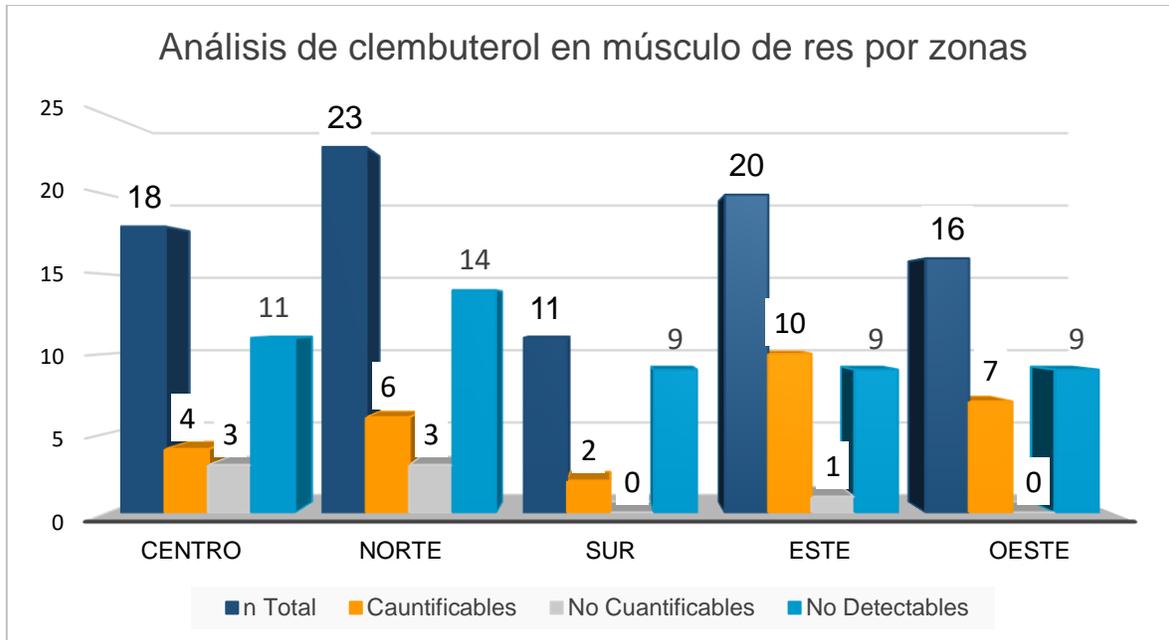
**Tabla 12:** Recolección de las muestras de músculo de res por zonas y por establecimiento.

ZONA	Mercados municipales (n)	Carnicerías locales (n)	Tienda de autoservicio (n)	N total
Centro	3	7	8	18
Norte	1	18	4	23
Sur	1	9	1	11
Este	2	14	4	20
Oeste	2	9	5	16
Total	<b>9</b>	<b>57</b>	<b>22</b>	<b>88</b>

Para categorizar los resultados del análisis de las muestras, nos basamos en los límites de detección y cuantificación, aquellas muestras que presentaron valores de clembuterol por encima del límite de cuantificación 3.046  $\mu\text{g/mL}$ , se clasificaron como Cuantificables. Las muestras que presentaron valores de clembuterol entre el límite de detección y el límite de cuantificación (de 1.005  $\mu\text{g/mL}$  a 3.046  $\mu\text{g/mL}$ ) se clasificaron como Detectables. Las muestras donde no se encontró o tuvieron valores de clembuterol por debajo del límite de detección fueron clasificadas como No Detectables (**Figuras 17 y 18**).

#### Análisis por zonas

De las 88 muestras analizadas de músculo de res, 29 muestras tuvieron valores por encima del límite de cuantificación (cuantificables) con valores que estuvieron desde los 3.06  $\mu\text{g/kg}$  hasta los 52.4  $\mu\text{g/kg}$  de tejido. 7 muestras tuvieron valores para considerarlas solo detectables y 52 estuvieron por debajo del límite de detección (No Detectables) (**Figura 17**).

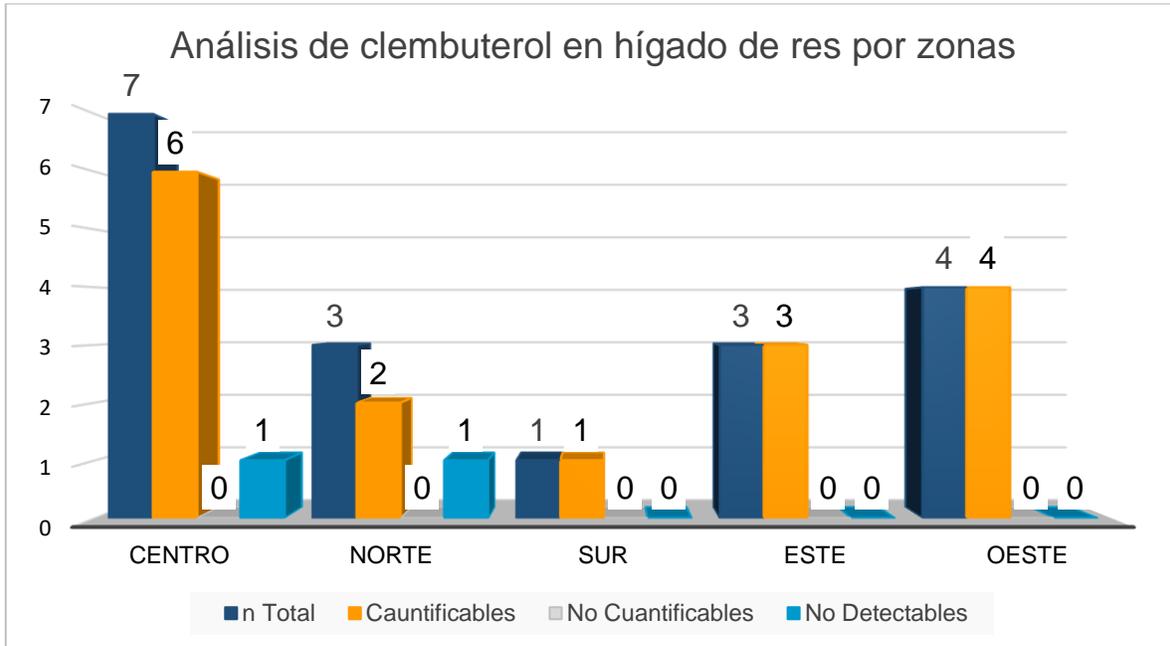


**Figura 18:** Gráfico del análisis de las muestras de músculo de res por zona. La barra azul oscuro representa el total de muestras analizadas por zona, la barra en naranja representa las muestras con cantidades de clenbuterol que entran dentro del límite de cuantificación, la barra en gris son la cantidad de muestras que no superaron el límite de cuantificación, pero si el límite de detección, y la barra en azul claro representa las muestras donde no se encontraron residuos de clenbuterol o tuvieron valores por debajo del límite de detección del método.

**Tabla 13:** Recolección de las muestras de hígado de res por zonas y por establecimiento.

ZONA	Mercados municipales (n)	Carnicerías locales (n)	Tienda de autoservicio (n)	N total
Centro	2	0	5	7
Norte	0	0	3	3
Sur	0	0	1	1
Este	1	0	2	3
Oeste	1	0	3	4
<b>Total</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>14</b>	<b>18</b>

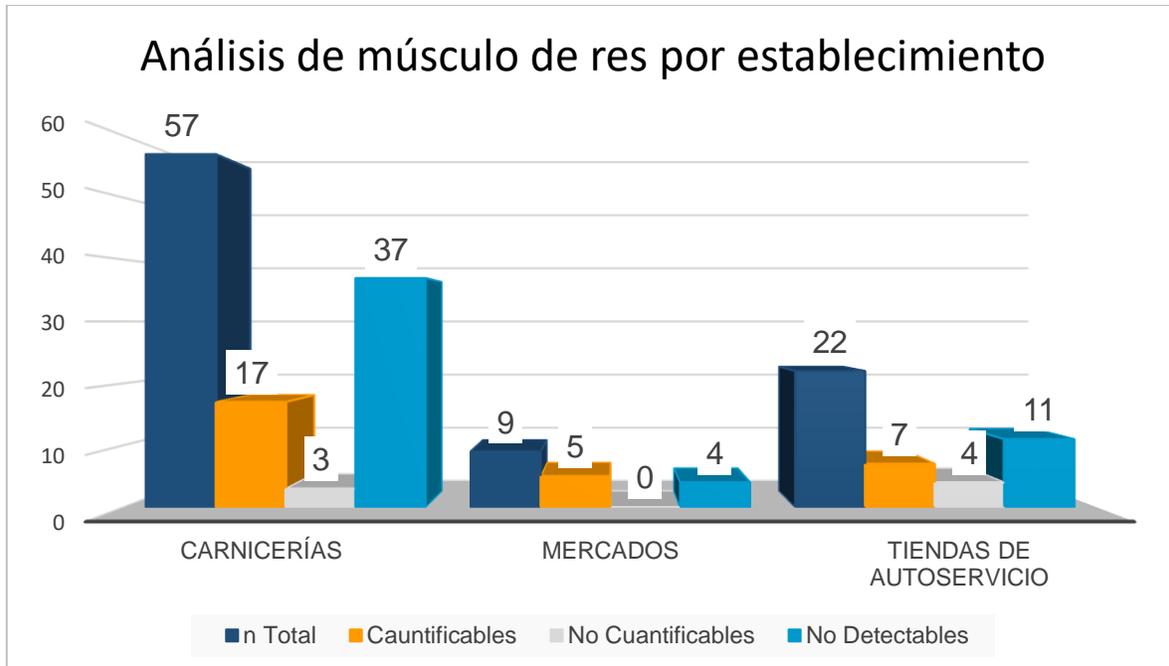
De las 18 muestras analizadas de hígado de res, 16 muestras tuvieron valores por encima del límite de cuantificación (cuantificables) con valor que estuvieron desde los 3.06 µg/kg hasta los 190 µg/kg de tejido. No hubo muestras que tuvieran valores para considerarlas solo detectables y 2 estuvieron por debajo del límite de detección (No Detectables) (**Figura 18**).



**Figura 19:** Gráfico del análisis de las muestras de hígado de res por zona. La barra azul oscuro representa el total de muestras analizadas por zona, la barra en naranja representa las muestras con cantidades de clembuterol que entran dentro del límite de cuantificación, la barra en gris son la cantidad de muestras que no superaron el límite de cuantificación, pero si el límite de detección, y la barra en azul claro representa las muestras donde no se encontraron residuos de clembuterol o tuvieron valores por debajo del límite de detección del método.

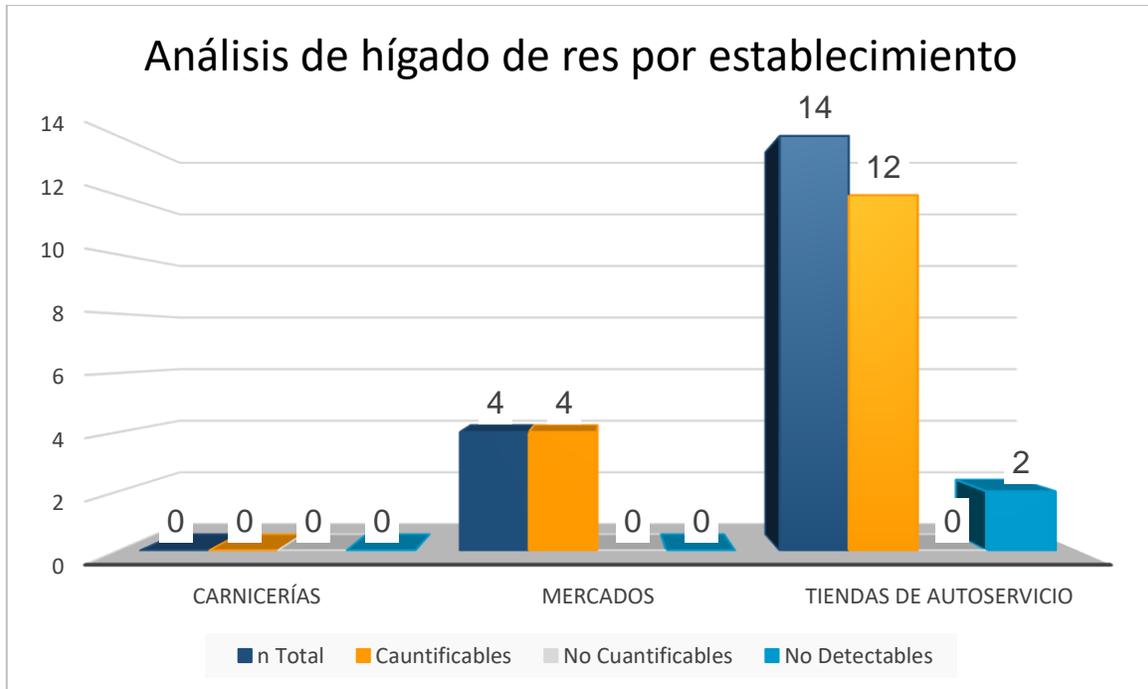
Análisis por punto de recolección.

De las 88 muestras analizadas de músculo de res, 57 muestras fueron de carnicerías de las cuales el 35.08% (20 muestras) tuvieron residuos de clembuterol; 9 de las muestras fueron de mercados municipales de las cuales el 55.55% (5 muestras) tuvieron residuos de clembuterol; 22 muestras fueron provenientes de tiendas de autoservicio de las cuales el 50% (11 muestras) tuvieron residuos de clembuterol. (**Figura 19**).



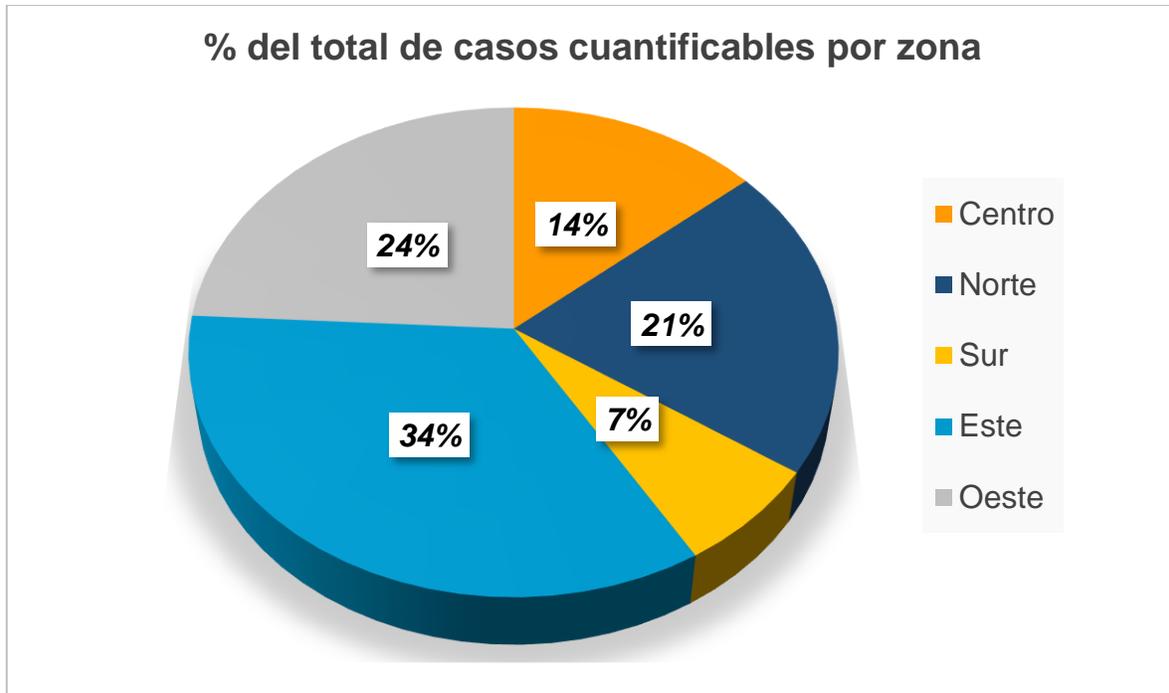
**Figura 20:** Gráfico del total de muestras analizadas de músculo de res por centro de distribución. La barra azul oscuro representa el total de muestras analizadas por establecimiento, la barra en naranja representa las muestras con cantidades de clenbuterol que entran dentro del límite de cuantificación, la barra en gris son la cantidad de muestras que no superaron el límite de cuantificación, pero si el límite de detección, y la barra en azul claro representa las muestras donde no se encontraron residuos de clenbuterol o tuvieron valores por debajo del límite de detección del método.

De las 18 muestras analizadas de músculo de res, 4 de las muestras fueron de mercados municipales de las cuales el 100% (4 muestras) tuvieron residuos de clenbuterol; 14 muestras fueron provenientes de tiendas de autoservicio de las cuales el 85.71% (12 muestras) tuvieron residuos de clenbuterol. No se recolectaron muestras de hígado en carnicerías (**Figura 20**).



**Figura 21:** Gráfico del total de muestras analizadas de hígado de res por centro de distribución.

Del total de muestras donde se encontraron valores de clembuterol por encima del límite de cuantificación, se graficaron los porcentajes correspondientes a cada zona (**Figura 21**).



**Figura 22:** Gráfico del total de casos cuantificables y su porcentaje correspondiente por zona. La zona Este (azul claro) tiene el mayor número de casos de muestras con residuos de clembuterol, mientras que la zona sur tiene el menor número de casos (amarillo).

Del total de muestras analizadas 106 de músculo e hígado de res, en 52 muestras se encontraron residuos de clembuterol (49%), debido a la sensibilidad del método el total de las muestras con residuos de clembuterol tienen nivel que sobrepasan los LRM (0.2 µg/kg para músculo y 0.6 µg/kg para hígado) recomendados por el *codex alimentarius*. (**Tabla 14**).

**Tabla 14:** Muestras con residuos de clenbuterol. Categorizadas por niveles de clenbuterol incluidas aquellas que estuvieron dentro del límite de detección.

Muestras por niveles de clenbuterol	Músculo de res	Hígado de res
Total, de muestras contaminadas con residuos de clenbuterol	36	16
Muestras con niveles de CLB menores de 0.2 µg/kg de tejido (LRM)	0	0
Muestras con niveles de CLB entre 0.2 y 2 µg/kg de tejido	2	0
Muestras con niveles de CLB entre 2 y 4 µg/kg de tejido	11	1
Muestras con niveles de CLB entre 4 y 10 µg/kg de tejido	9	0
Muestras con niveles de CLB entre 10 y 100 µg/kg de tejido	14	15

#### RELACIÓN CON LA INGESTA DIARÍA ADMISIBLE IDA

Analizando los resultados y relacionándolos con los límites establecidos en las normas nacionales e internacionales, se tiene que la Ingesta Diaria Admisibles (IDA) para clenbuterol es de 0.0 a 0.004 µg/kg de peso por persona, es decir, una persona que pesa 70 kg, tendría un límite de IDA de 0.28 µg de clenbuterol ( $0.004 \times 70 = 0.28$ ), tratando de ejemplificar el consumo diario. Por poner un ejemplo una pieza de bistec de músculo o hígado de res que tuviera un peso de 100 g (peso aproximado por porción en la dieta), y esa misma pieza perteneciera a una de las muestras analizadas en el presente proyecto de las que se encontraron residuos de clenbuterol, de acuerdo a los resultados obtenidos **Tabla 15**, tendrían entre 0.3-4.8 µg de clenbuterol en el caso de músculo y 0.35-21.7 µg de clenbuterol en hígado de res. Como se mencionó anteriormente una persona de 70 kg de peso corporal, no debe consumir más de 0.28 µg de clenbuterol diariamente para que no represente un riesgo a su salud, es decir, en todos los casos de las muestras analizadas ésta misma persona estaría consumiendo más de la cantidad recomendada por la norma.

**Tabla 15:** Cantidades mínimas y máximas encontradas en el análisis de las muestras.

Cantidades de CLB encontradas en músculo de res ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Cantidad de clenbuterol en 100 g de músculo de res ( $\mu\text{g}$ )	Cantidades de CLB encontradas en hígado de res ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Cantidad de clenbuterol en 100 g de hígado de res ( $\mu\text{g}$ )
3.0 - 48.0	0.3 - 4.8	3.5 - 217.0	0.35 - 21.7

#### RELACIÓN CON EL LÍMITE MÁXIMO DE RESIDUOS LRM

Los límites (LRM) establecidos por la FAO-OMS para clenbuterol son de  $0.2 \mu\text{g}/\text{kg}$  de tejido para músculo de res y  $0.6 \mu\text{g}/\text{kg}$  de tejido para hígado de res. De acuerdo con nuestros resultados y la sensibilidad del método, el límite de detección es de  $1.005 \mu\text{g}/\text{kg}$  de tejido analizado, esto significa que cualquiera de las muestras que tenga niveles de clenbuterol dentro de la detectable sobrepasa los límites establecidos en la norma  $0.2 \mu\text{g}/\text{kg}$  (músculo) y  $0.6 \mu\text{g}/\text{kg}$  (hígado).

## 9. DISCUSIÓN.

Al inicio del desarrollo del método, nos planteamos como objetivo un método lo rápido y sencillo posible, que fuera fácil de aplicar y que no requiriera tantos procesos que pudieran incrementar la cantidad de reactivos utilizados, por eso la primera metodología que se probó fue una extracción simple solo con acetonitrilo.

La decisión de utilizar el método de extracción líquida y sales fue analizando el costo beneficio de cada una de las técnicas utilizadas; la extracción simple no eliminaba los residuos de agua, proteínas y lípidos de la muestra lo que lo hacía difícil de leer en el cromatógrafo; en cuanto la extracción con fase sólida, se utilizabas alto volúmenes de solventes además de los cartuchos de fase sólida y la concentración recuperada de clenbuterol no era significativamente mayor que la de la extracción en fase líquida.

El método de patrón interno tiene algunas ventajas, cuando el analito de interés se encuentra en una matriz compleja con varios de otros compuestos y a cantidades a nivel de trazas, la recuperación y el análisis se complica, al incluir un patrón interno en la matriz se puede relacionar el tiempo de retención y el tamaño de los picos lo que hace más fácil identificar el analito de interés además de que permite detectar si hubo algún problema en la extracción ya que se relaciona las áreas de los picos, si el pico del patrón interno disminuyera significativamente significaría que algo paso en la extracción y por lo tanto no se estaría cuantificando adecuadamente el analito de interés.

Desde que se planeó la recolección de las muestras, se tenía previsto adquirir un muestra de músculo y una de hígado por punto de recolección, sin embargo, en lo que respecta al área de Cuernavaca Morelos, en las carnicería no se vende hígado de res, el lugar de venta de hígado de res es los puesto donde venden las vísceras, y esos se encuentra sólo en alguno mercados municipales, en los mercados pequeños no tiene puestos de vísceras, incluso sólo hay una carnicería.

El actual estudio demuestra que el clenbuterol se sigue utilizando en la alimentación del ganado como agente anabólico. Casi el 50% de las muestras analizadas resultaron contaminados con clenbuterol, este valor concuerda con lo observado en estudios

parecidos en otras entidades del país. Los niveles encontrados en las muestras analizadas de músculo e hígado de res, son considerablemente superiores a los límites establecidos por el codex alimentarius de la FAO/OMS, por lo que claramente nos encontramos ante un riesgo de salud pública. La intoxicación por comer carne contaminada con clenbuterol se manifiesta en síntomas que podrían ser confundidos con otros padecimientos, sobre todo en personas con problemas cardiacos, y no saber que se debe a la carne.

En cuanto a las cantidades de residuos de clenbuterol encontrados en muestras de hígado de res, claramente las cantidades son más altas que las de músculo de res, esto sería algo normal ya que el hígado es un órgano altamente irrigado y con mayor capacidad para almacenar los residuos, la misma norma (FAO/OMS) establece dos límites, uno para el músculo de res ( $0.2 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) y otro para el hígado de res ( $0.6 \mu\text{g}/\text{kg}$ ), con una relación de 3 a 1.

El límite de cuantificación del método es la concentración más baja del compuesto que puede cuantificarse cumpliendo con la precisión y exactitud establecidas en el método (NOM-177-SSA1-2013), esto no significa que las muestras pudieran estar libres del compuesto analizado, los límites de detección y cuantificación son el resultado de la sensibilidad del método. En el caso del presente método de cuantificación de clenbuterol por CLAR, existen muestras de tejido que se puede observar el pico correspondiente a clenbuterol, pero que no entran el límite de detección calculado del método, éstas muestras no se pueden considerar como libre de clenbuterol, simplemente el método no es lo suficientemente sensible para cuantificarlas. Si consideramos el total de las muestras donde se observó el pico de clenbuterol el porcentaje de muestras contaminadas con residuos de clenbuterol aumentaría a el 85% del total de muestras analizadas (90 de 106 muestras).

El hecho de que en más del 90% de las muestras analizadas de hígado de res, se hallan encontrado residuos de clenbuterol, nos indica que también en músculo de res se debe encontrar alrededor de este porcentaje.

La mayor interrogante ahora es ¿por qué se sigue encontrando carne de bovino contaminada con residuos de clenbuterol, si se supone que el uso de este anabólico se ha prohibido y regulado para ser utilizado en la alimentación del ganado?

La respuesta más probable sería que lo hacen de manera clandestina, las normas que se han emitido para controlar el uso de clenbuterol como anabólico, como la NOM-061-ZOO-1999 y la NOM-EM-ZOO-2002 que precisamente salió por la alta cantidad de casos de intoxicación en el país, no funcionan si no hay un seguimiento adecuado, se ha reportado casos año con año y se han reportado diversos estudios poblacionales de carne de res en distintas partes de México, pero el problema permanece. Como una experiencia personal, la discusión a etapas tempranas del presente proyecto con personas no relacionadas al campo de investigación, mostraba que las personas tenían un prejuicio claro con respecto a que indudablemente se encontrarían restos de clenbuterol en las muestras analizadas.

Por eso la importancia de este tipo de estudios, si bien no somos un organismo regulador ni se pretende en este trabajo actuar con objetivo punitivo, si podemos informar, difundir y hasta concientizar sobre la situación que vivimos con respecto a la seguridad de nuestros alimentos.

Otra de las interrogantes más importantes es la de saber si el clenbuterol se mantiene aun después de ser preparada la carne a altas temperaturas, aunque no se realizaron pruebas de estabilidad a estas condiciones, la evidencia de las intoxicaciones muestra que en efecto cierta cantidad ha de permanecer aún después de preparación.

## **10. CONCLUSIONES.**

Se desarrolló una metodología que permitió el análisis de muestras de productos cárnicos para detectar clenbuterol de una manera rápida y sin el uso de muchos reactivos.

Se validó el método de cuantificación de clenbuterol por CLAR que cumplió con los criterios recomendados por la NOM-177-SSA1-2013 y la guía internacional ICHQ (2) R1.

De acuerdo al análisis de muestras de músculo e hígado de carne de res, fue posible determinar efectivamente la presencia de clenbuterol en el 49% del total de muestras analizadas, los niveles encontrados son más altos que los límites máximos recomendados LMR por el *Codex Alimentarius* de la FAO, que son 0.2 µg/kg de peso en el músculo y 0.6 µg/kg en el hígado de res.

De los casos cuantificables la zona tuvo mayor incidencia fue la zona este con 34%, y la de menor incidencia fue la zona sur con 7%

## **11. PERSPECTIVAS.**

Realizar un seguimiento ante el actual problema de salud que representa el uso de clenbuterol en la alimentación del ganado bovino.

Dar a conocer en foros de investigación los resultados obtenidos en este proyecto para concientizar sobre el grave problema de salud pública que representa utilizar clenbuterol en la engorda de ganado.

Realizar la publicación de un artículo de investigación el actual proyecto.

## 12. REFERENCIAS.

- Ackland, T. R., & Stewart, A. D. (n.d.). *Chapter 6 Assessing Body Composition*. 88–101.
- Bañuelos-Valenzuela, R., Peña-Betancourt, S. D., Velázquez-Ordóñez, V., Echavarría-Cháirez, F. G., Muro-Reyes, A., & Ortega-Santana, C. (2015). Riesgos a la salud por el uso de clorhidrato de clenbuterol: una revisión. *Revista de Medicina Veterinaria*, (30), 139–149. Retrieved from [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0122-93542015000200012&script=sci\\_abstract&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0122-93542015000200012&script=sci_abstract&tlng=es)
- Brockway JM, MacRae JC, W. P. (1987). *Side effects of clenbuterol as a repartitioning agent*. 381–383.
- Brown, D., Ryan, K., Daniel, Z., Mareko, M., Talbot, R., Moreton, J., ... Brameld, J. M. (2018). The Beta-adrenergic agonist, Ractopamine, increases skeletal muscle expression of Asparagine Synthetase as part of an integrated stress response gene program. *Scientific Reports*, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34315-9>
- Choo, J. J., Horan, M. A., Little, R. A., & Rothwell, N. J. (1992). Anabolic effects of clenbuterol on skeletal muscle are mediated by  $\beta$ 2- adrenoceptor activation. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 263(1 26-1). <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1992.263.1.e50>
- CMC, & Consejo Mexicano de la carne. (2018). *Compendio Estadístico 2018*.
- Dominguez, V., Gastelum, J., Dominguez, V. I. a, Mondragon, J., Mondragon, J., Aragón, M., ... Aragón, M. a. (2009). Los  $\beta$ -agonistas adrenérgicos como modificadores metabólicos y su efecto en la producción, calidad e inocuidad de la carne de bovinos y ovinos: una revisión. *Ergo Sum*, 16(3), 1–7.
- DrugBank. (2019). Clenbuterol database. Retrieved November 26, 2019, from <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01407>
- FAO, O. (1995). Norma General Para Los Aditivos Alimentarios. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

- FDA. (2019). Code of Federal Regulations title 21. Retrieved November 26, 2019, from <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=558.665>
- FDA, & OMS. (2015). *Límites máximos de residuos (LMR) y recomendaciones sobre la gestión de riesgos (RGR) para residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos CAC/MRL 2-2015 Actualizado en la 38. Sesión de la Comisión del Codex Alimentarius (julio de 2015)*. 106.
- Heitzman, R. J. (1996). *VETERINARY DRUG RESIDUES Residues in food producing animals and their products: Reference Materials and Methods* (Vol. 636). <https://doi.org/10.1021/bk-1996-0636>
- ICH. (2005). ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology. *International Conference on Harmonization, 1994*(November 1996), 17.
- INEGI. (2017). *México : Consumo Nacional Aparente de Carne , 2016 ( miles de toneladas )*. 1–5.
- Jimenez, L. A., Ramos, J. G., & Fragoso, H. (2011). Sanitary surveillance on illegal use of clenbuterol and its intersectoral coordination in two states of Mexico. *Mexico, 01*(55), 11–26.
- Johnson, B. J., Smith, S. B., & Chung, K. Y. (2014). Historical overview of the effect of  $\beta$ -adrenergic agonists on beef cattle production. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 27*(5), 757–766. <https://doi.org/10.5713/ajas.2012.12524>
- Kim, Y. S., & Sainz, R. D. (1992). *Life Sciences, Vol. Printed in the USA 50, pp. 397-407 Pergamon*. 397–407.
- Marban, E. ., & López, F. . (2011). Intoxicación alimentaria por clenbuterol 63/er. Aniversario de la Revista de Sanidad Militar Food poisoning by clenbuterol. *Rev Sanid Milit Mex, 65*(3), 121–124. Retrieved from <https://www.medigraphic.com/pdfs/sanmil/sm-2011/sm113i.pdf>
- Martinez, J. F. (1990). Food Poisoning related to the consumption of illicit beta agonist in liver. *Opera Quarterly, 7*(2), 1–5. <https://doi.org/10.1093/oq/7.2.1>

- Morales-Trejo, F., Vega y León, S., Escobar-Medina, A., Pérez-González, J., Urbán-Carrillo, G., & Gutiérrez-Tolentino, R. (2013). Desarrollo y validación de un método de cromatografía líquida de alta resolución para la determinación y cuantificación de clenbuterol en hígado de bovino. *Revista de Salud Animal*, 35(1), 38–44.
- Nardini, S., Camiciottoli, G., Locicero, S., Maselli, R., Pasqua, F., Passalacqua, G., ... Vatrella, A. (2014). COPD: Maximization of bronchodilation. *Multidisciplinary Respiratory Medicine*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/2049-6958-9-50>
- NCBI. (2019). Clenbuterol database CID=5702273. Retrieved November 26, 2019, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Clenbuterol-hydrochloride>
- NOM-004-ZOO-1994. (2001). Normas Oficiales Mexicanas. *DOF, Diario Oficial de La Federación*, 66. Retrieved from [http://www.conagua.gob.mx/CONAGUA07/Noticias/NormasOficialesMexicanas.pdf%5Cnhttp://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4863829&fecha=06/01/1997](http://www.conagua.gob.mx/CONAGUA07/Noticias/NormasOficialesMexicanas.pdf%5Cnhttp://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4863829&fecha=06/01/1997)
- NOM-177-SSA1-1998. (1998). NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas. *Norma Mexicana*, 3–5.
- Popa, V. T. (1984). Clinical pharmacology of adrenergic drugs. *Journal of Asthma*, 21(3), 183–207. <https://doi.org/10.3109/02770908409077417>
- Proceso. (2011). Clembuterol: La corrupción de la carne. Retrieved December 1, 2019, from <https://www.proceso.com.mx/276817/clembuterol-la-corrupcion-de-la-carne>
- Reig, M., & Toldrá, F. (2008). Veterinary drug residues in meat: Concerns and rapid methods for detection. *Meat Science*, 78(1–2), 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.07.029>
- SAGARPA. (2000). NOM-061-ZOO-1999. *DOF, Diario Oficial de La Federación*, 15–23.
- Salleras, L., Dominguez, A., Mata, E., Taberner, J. L., Moro, I., & Salva, P. (1995). Epidemiologic study of an outbreak of clenbuterol poisoning in Catalonia, Spain. *Public*

*Health Reports*, 110(3), 338–342.

Salter, A. M. (2018). The effects of meat consumption on global health. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 37(1), 47–55. <https://doi.org/10.20506/rst.37.1.2739>

Secretaría de Salud. (2002). *Nom-Em-015- Zoo-2002*. 1–10.

Secretaría de Salud. (2013). Programa de Acción Específico Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica 2013-2018. *Dirección General De Epidemiología*, 1(1), 90. Retrieved from <http://www.spps.gob.mx/images/stories/SPPS/Docs/PAES2013-2018/DGE/Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiologica.pdf>

Sillence, M. N., & Matthews, M. L. (1994). Classical and atypical binding sites for  $\beta$ -adrenoceptor ligands and activation of adenylyl cyclase in bovine skeletal muscle and adipose tissue membranes. *British Journal of Pharmacology*, 111(3), 866–872. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1994.tb14818.x>

Smith, D. J. (1998). The Pharmacokinetics, Metabolism, and Tissue Residues of  $\beta$ -Adrenergic Agonists in Livestock 1, 2 ABSTRACT: *American Society of Food Safety*, 76, 173–194.

Tang, J., Wang, J., Shi, S., Hu, S., & Yuan, L. (2018). Determination of  $\beta$ -agonist residues in animal-derived food by a liquid chromatography-tandem mass spectrometric method combined with molecularly imprinted stir bar sorptive extraction. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/9053561>

UNFPA. (2019). Población Mundial. Retrieved December 1, 2019, from <https://www.unfpa.org/es/data/world-population-dashboard>

Yamamoto, I. (2002). Pharmacokinetics of plasma and urine clenbuterol in man, rat and rabbit. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, (43), 2091. Retrieved from <http://www.mendeley.com/research/geology-volcanic-history-eruptive-style-yakedake-volcano-group-central-japan/>

Zalko, D., Debrauwer, L., Bories, G., & Tulliez, J. (1998). Metabolism of Clenbuterol in Rats.

## 13. ANEXOS.

### 13.1 RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN.

#### 13.1.1 Linealidad del sistema.

Concentración (ng/ml)	Relación de áreas			Promedio	DE
	Curva 1	Curva 2	Curva 3		
50	0.02923388	0.02956523	0.03084386	0.02988099	0.00085017
100	0.05358796	0.05369763	0.0529446	0.05341006	0.00040681
200	0.11559716	0.1197199	0.10488089	0.11339932	0.00765976
500	0.27157658	0.2771459	0.30022127	0.28298125	0.01518776
1000	0.63608079	0.62493964	0.62151969	0.62751337	0.0076141
2000	1.23566117	1.23433659	1.22768442	1.23256073	0.00427462
5000	3.07000431	3.01467267	3.00116675	3.02861458	0.03647513
Pendiente (m)	0.00062	0.00061	0.00060	0.00061	0.00001
Intercepto (b)	-0.00617	-0.00026	0.00139	-0.00168	0.00398
Coef. Corre. (r)	0.99988	0.99987	0.99991	0.99989	0.00002
Coef. Deter (r2)	0.99976	0.99974	0.99981	0.99977	0.00004

#### 13.1.2 Linealidad del método.

Concentración (ng/ml)	Relación de áreas			Promedio	DE
	Curva 1	Curva 2	Curva 3		
50	0.0071455	0.01000227	0.01003881	0.00906219	0.00166001
100	0.01009366	0.02042006	0.01282849	0.0144474	0.00535017
200	0.02063556	0.03677749	0.05461707	0.03734338	0.01699782
500	0.09627989	0.06147342	0.15720072	0.10498468	0.04845368
1000	0.14776089	0.18920884	0.19876983	0.17857985	0.02711474
2000	0.24737197	0.24159935	0.38613666	0.29170266	0.08183316

5000	0.87732232	0.68788469	1.0082363	0.85781444	0.16106429
Pendiente (m)	0.00017	0.00013	0.00020	0.00017	0.00003
Intercepto (b)	-0.01763	0.00784	0.01025	0.00015	0.01545
Coef. Corre. (r)	0.99252	0.99470	0.99783	0.99502	0.00267
Coef. Deter (r2)	0.98509	0.98944	0.99567	0.99006	0.00532

### 13.1.3 Precisión del sistema.

Curva de calibración

Concentración (ng/ml)	Relación de áreas
50	0.0297
100	0.0590
200	0.1091
500	0.2938
1000	0.6378
2000	1.2437
5000	3.1108
Pendiente (m)	0.00062
Intercepto (b)	-0.00516
Coef. Corre. (r)	0.99995
Coef. Determ. (r2)	0.99991

Concentración Baja (150 ng/mL)									
# Inyección	Clembuterol				Pirfenidona				Relación de áreas
	Concentración (ng/ml)	tR (min)	Área (mAU)	Altura (mAU)	Concentración (ng/ml)	tR (min)	Área (mAU)	Altura (mAU)	
1	150	8.375	206541	27645	3000	14.811	2321222	107215	0.08897943
2	150	8.373	205697	27557	3000	14.803	2302704	103158	0.08932846
3	150	8.366	209087	29163	3000	14.794	2309917	105874	0.09051711
4	150	8.367	205076	28364	3000	14.801	2306062	103348	0.08892909
5	150	8.371	205582	28198	3000	14.791	2325129	101014	0.08841746

Concentración Media (2500 ng/mL)									
# Inyección	Clembuterol				Pirfenidona				Relación de áreas
	Concentración (ng/ml)	tR (min)	Área (mAU)	Altura (mAU)	Concentración (ng/ml)	tR (min)	Área (mAU)	Altura (mAU)	
1	2500	8.217	3329892	260541	3000	14.590	2070291	103820	1.60841737
2	2500	8.300	3208787	265859	3000	14.753	2068412	100009	1.55132875
3	2500	8.360	3210951	264672	3000	14.803	2078772	100741	1.54463837
4	2500	8.353	3297711	258552	3000	14.777	2074960	100976	1.58928895
5	2500	8.321	3194894	257461	3000	14.754	2076491	101125	1.53860238

Concentración Alta (4500 ng/mL)									
# Inyección	Clembuterol				Pirfenidona				Relación de áreas
	Concentración (ng/ml)	tR (min)	Área (mAU)	Altura (mAU)	Concentración (ng/ml)	tR (min)	Área (mAU)	Altura (mAU)	
1	4500	8.360	5872642	476221	3000	14.807	2093365	101671	2.80535979
2	4500	8.353	5964397	480520	3000	14.790	2080655	100535	2.86659586
3	4500	8.363	5910552	475792	3000	14.830	2079736	99800	2.84197225
4	4500	8.367	5851254	473608	3000	14.803	2074698	99543	2.82029192
5	4500	8.354	5816428	472364	3000	14.754	2078464	99854	2.79842615

### 13.1.4 Precisión del método.

DÍA 1

Curva de calibración

Concentración (ng/ml)	Relación de áreas
50	0.0592
100	0.0835
200	0.1609
500	0.3293
1000	0.6476
2000	1.2296
5000	2.8661
Pendiente (m)	0.00057
Intercepto (b)	0.05045
Coef. Corre. (r)	0.99965
Coef. Determ. (r <sup>2</sup> )	0.99931

Concentración Baja (150 ng/mL)									
# Inyección	Clembuterol				Pirfenidona				Relación de áreas
	Concentración (ng/ml)	tR (min)	Área (mAU)	Altura (mAU)	Concentración (ng/ml)	tR (min)	Área (mAU)	Altura (mAU)	
1	150	8.384	81638	4173	3000	14.661	607299	25152	0.13442802
2	150	8.399	82084	4034	3000	14.677	575783	28612	0.14256065
3	150	8.560	80710	4988	3000	14.609	595721	31092	0.13548289
4	150	8.345	67971	4271	3000	14.621	509755	26572	0.13334053
5	150	8.418	80504	4558	3000	14.621	555606	27156	0.14489404

Concentración Media (2500 ng/mL)									
# Inyección	Clembuterol				Pirfenidona				Relación de áreas
	Concentración (ng/ml)	tR (min)	Área (mAU)	Altura (mAU)	Concentración (ng/ml)	tR (min)	Área (mAU)	Altura (mAU)	
1	2500	8.338	859257	72143	3000	14.622	563202	563202	1.52566397
2	2500	8.361	858635	72470	3000	14.615	544658	544658	1.57646633
3	2500	8.349	825909	89256	3000	14.631	519064	519064	1.59115061
4	2500	8.377	808302	67528	3000	14.641	508573	508573	1.58935295
5	2500	8.358	831537	69967	3000	14.627	525128	525128	1.58349393

Concentración Alta (4500 ng/mL)									
# Inyección	Clembuterol				Pirfenidona				Relación de áreas
	Concentración (ng/ml)	tR (min)	Área (mAU)	Altura (mAU)	Concentración (ng/ml)	tR (min)	Área (mAU)	Altura (mAU)	
1	4500	8.352	1515136	128605	3000	14.625	579862	579862	2.61292514
2	4500	8.340	1517468	129653	3000	14.623	600216	600216	2.52820318
3	4500	8.369	1471487	125220	3000	14.648	578927	578927	2.54174879
4	4500	8.351	1441795	122504	3000	14.631	571317	571317	2.52363399
5	4500	8.375	1419431	120683	3000	14.646	562550	562550	2.5232086

## DÍA 2

### Curva de calibración

Concentración (ng/ml)	Relación de áreas
50	0.0288
100	0.0500
200	0.1136
500	0.2950
1000	0.5452
2000	1.0751
5000	2.9835
Pendiente (m)	0.00059
Intercepto (b)	-0.02362
Coef. Corre. (r)	0.99915
Coef. Determ. (r <sup>2</sup> )	0.99830

Concentración Baja (150 ng/mL)									
# Inyección	Clembuterol				Pirfenidona				Relación de áreas
	Concentración (ng/ml)	tR (min)	Área (mAU)	Altura (mAU)	Concentración (ng/ml)	tR (min)	Área (mAU)	Altura (mAU)	
1	150	8.607	132584	9541	3000	15.354	2065476	76490	0.06419053
2	150	8.560	142364	10021	3000	15.351	2034811	71457	0.06996424
3	150	8.587	130481	9311	3000	15.348	2086463	72159	0.06253693
4	150	8.543	126485	9157	3000	15.349	2102248	79316	0.06016655
5	150	8.547	121274	8846	3000	15.334	2097261	78689	0.05782494

Concentración Media (2500 ng/mL)									
# Inyección	Clembuterol				Pirfenidona				Relación de áreas
	Concentración (ng/ml)	tR (min)	Área (mAU)	Altura (mAU)	Concentración (ng/ml)	tR (min)	Área (mAU)	Altura (mAU)	
1	2500	8.542	2991560	284122	3000	15.337	2117465	81068	1.41280257
2	2500	8.540	3024933	286358	3000	15.33	2134122	81864	1.41741334
3	2500	8.538	3074431	281174	3000	15.328	2071108	79123	1.4844378
4	2500	8.541	2975514	276642	3000	15.333	2101234	80338	1.41607931
5	2500	8.537	3116284	296444	3000	15.325	2024874	77161	1.53900144

Concentración Alta (4500 ng/mL)									
# Inyección	Clembuterol				Pirfenidona				Relación de áreas
	Concentración (ng/ml)	tR (min)	Área (mAU)	Altura (mAU)	Concentración (ng/ml)	tR (min)	Área (mAU)	Altura (mAU)	
1	4500	8.535	5685023	514769	3000	15.321	2079143	77384	2.73431072
2	4500	8.536	5215486	485313	3000	15.311	2105507	80522	2.47706894
3	4500	8.536	5372201	498832	3000	15.306	2145840	82746	2.5035422
4	4500	8.534	5418791	500218	3000	15.304	2082337	78612	2.60226419
5	4500	8.531	5563087	503754	3000	15.312	2024829	72143	2.74743546

### 13.1.5 Límite de detección y cuantificación.

Curva de calibración

Nivel	Concentración (ng/ml)	tR (minutos)	Área (mAU)
1	50	8.540	66723
2	100	8.540	113629
3	200	8.540	240242
4	500	8.527	622361
5	1000	8.527	1217586
6	2000	8.543	2467639
7	5000	8.530	6239354

Pendiente (m)	1248.19506
Intercepto (b)	-11284.6087

Coef,Corre. (r)	0.99998136
Coef.Determ. (r2)	0.99996273

Blancos

Nivel	Concentración (ng/ml)	tR (minutos)	Área (mAU)
1		8.577	5811
2		8.547	6927
3		8.480	7350
4		8.479	4844
5		8.473	2289
6		8.487	5312
7		8.463	2917
8		8.452	6984
<b>Promedio</b>		8.495	<b>5304.250</b>
<b>DE</b>		0.044	<b>1886.014</b>

## 13.2 RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE MUESTRAS DE MÚSCULO DE RES POR ZONA.

ZONA CENTRO.

Muestra	Relación áreas (promedio)	Concentración (ng/ml)	Cantidad de CLB en tejido (µg/kg)
M-C-1-01	0.0397	54.00	10.80
M-C-1-02	0.0100	-4.30	-0.86
M-C-1-03	0.0096	-5.00	-1.00
M-C-2-01	0.0197	13.71	2.74
M-C-2-02	0.0052	-10.88	-2.18
M-C-2-03	0.0099	-2.87	-0.57
M-C-2-04	0.0091	-4.15	-0.83
M-C-2-05	0.0203	14.73	2.95
M-C-2-06	0.0251	22.88	4.58
M-C-2-07	0.1243	190.56	38.11
M-C-2-08	0.0184	11.46	2.29
M-C-3-01	0.0051	-0.41	-0.08
M-C-3-02	0.0121	12.80	2.56
M-C-3-03	0.0658	114.46	22.89
M-C-3-04	0.0000	0.00	0.00
M-C-3-05	0.0000	-10.07	-2.01
M-C-3-06	0.0000	0.00	0.00
M-C-3-07	0.0000	0.00	0.00

ZONA NORTE.

Muestra	Relación áreas (promedio)	Concentración (ng/ml)	Cantidad de CLB en tejido (µg/kg)
M-N-1-01	0.0693	112.19	22.44
M-N-2-01	0.0060	-9.38	-1.88
M-N-2-02	0.0173	9.74	1.95
M-N-2-03	0.0228	18.93	3.79
M-N-2-04	0.0216	16.91	3.38
M-N-3-01	0.0039	-16.24	-3.25
M-N-3-02	0.0010	-21.82	-4.36
M-N-3-03	0.0030	-17.95	-3.59
M-N-3-04	0.0023	-19.30	-3.86
M-N-3-05	0.0206	16.65	3.33
M-N-3-06	0.0026	-18.74	-3.75
M-N-3-07	0.0187	12.76	2.55
M-N-3-08	0.0012	-21.44	-4.29
M-N-3-09	0.0118	-0.66	-0.13
M-N-3-10	0.0116	-1.09	-0.22
M-N-3-11	0.0136	2.74	0.55
M-N-3-12	0.0150	5.66	1.13
M-N-3-13	0.0039	-16.28	-3.26
M-N-3-14	0.0077	-8.81	-1.76
M-N-3-15	0.0056	-12.96	-2.59
M-N-3-16	0.0037	-16.56	-3.31
M-N-3-17	0.0815	136.11	27.22
M-N-3-18	0.0358	46.44	9.29

ZONA SUR.

Muestra	Relación áreas (promedio)	Concentración (ng/ml)	Cantidad de CLB en tejido (µg/kg)
M-S-1-01	0.0032	-17.67	-3.53
M-S-2-01	0.0117	0.18	0.04
M-S-3-01	0.0294	45.58	9.12
M-S-3-02	0.0003	-9.47	-1.89
M-S-3-03	0.0000	-10.07	-2.01
M-S-3-04	0.0000	0.00	0.00
M-S-3-05	0.0000	-10.07	-2.01
M-S-3-06	0.0000	0.00	0.00
M-S-3-07	0.1438	262.01	52.40
M-S-3-08	0.0000	-10.07	-2.01
M-S-3-09	0.0025	-5.34	-1.07

ZONA ESTE-

Muestra	Relación áreas (promedio)	Concentración (ng/ml)	Cantidad de CLB en tejido (µg/kg)
M-E-1-01	0.0082	-7.76	-1.55
M-E-1-02	0.0561	86.31	17.26
M-E-2-01	0.1548	242.08	48.42
M-E-2-02	0.0198	13.90	2.78
M-E-2-03	0.0228	19.01	3.80
M-E-2-04	0.0234	20.02	4.00
M-E-3-01	0.0070	-10.10	-2.02
M-E-3-02	0.0009	-22.19	-4.44
M-E-3-03	0.0134	2.34	0.47
M-E-3-04	0.0214	18.10	3.62
M-E-3-05	0.0240	23.16	4.63
M-E-3-06	0.0287	32.52	6.50
M-E-3-07	0.0234	21.95	4.39

M-E-3-08	0.0200	15.31	3.06
M-E-3-09	0.0259	27.03	5.41
M-E-3-10	0.0090	-6.30	-1.26
M-E-3-11	0.0140	3.50	0.70
M-E-3-12	0.0108	-2.59	-0.52
M-E-3-13	0.0126	0.82	0.16
M-E-3-14	0.0023	-19.35	-3.87

ZONA OESTE.

Muestra	Relación áreas (promedio)	Concentración (ng/ml)	Cantidad de CLB en tejido ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
M-O-1-01	0.0748	122.95	24.59
M-O-1-02	0.0390	52.56	10.51
M-O-2-01	0.0131	2.52	0.50
M-O-2-02	0.0123	1.14	0.23
M-O-2-03	0.0003	-19.06	-3.81
M-O-2-04	0.0104	-1.97	-0.39
M-O-2-05	0.0118	0.41	0.08
M-O-3-01	0.0459	76.76	15.35
M-O-3-02	0.0796	140.63	28.13
M-O-3-03	0.0339	54.07	10.81
M-O-3-04	0.0006	-8.96	-1.79
M-O-3-05	0.0266	40.20	8.04
M-O-3-06	0.0000	0.00	0.00
M-O-3-07	0.0000	0.00	0.00
M-O-3-08	0.0238	34.94	6.99
M-O-3-09	0.0017	-6.93	-1.39

### 13.3 ANÁLISIS DE MUESTRA DE HÍGADO DE RES POR ZONAS.

#### ZONA CENTRO

Muestra	Relación áreas (promedio)	Concentración (ng/ml)	Cantidad de CLB en tejido ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
H-C-1-01	0.0709	115.35	23.07
H-C-1-01	0.0432	60.81	12.16
H-C-2-01	0.1070	161.38	32.28
H-C-2-02	0.2473	398.50	79.70
H-C-2-03	0.0000	0.00	0.00
H-C-2-04	0.1189	181.40	36.28
H-C-2-05	0.1102	166.71	33.34

#### ZONA NORTE.

Muestra	Relación áreas (promedio)	Concentración (ng/ml)	Cantidad de CLB en tejido ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
H-N-2-01	0.1139	172.93	34.59
H-N-2-02	0.0000	0.00	0.00
H-N-2-03	0.1687	265.59	53.12

#### ZONA SUR.

Muestra	Relación áreas (promedio)	Concentración (ng/ml)	Cantidad de CLB en tejido ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
H-S-2-01	0.1225	187.51	37.50

#### ZONA ESTE.

Muestra	Relación áreas (promedio)	Concentración (ng/ml)	Cantidad de CLB en tejido ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
H-E-1-01	0.0900	152.66	30.53
H-E-2-01	0.1399	216.90	43.38
H-E-2-02	0.1081	163.17	32.63

ZONA OESTE.

Muestra	Relación áreas (promedio)	Concentración (ng/ml)	Cantidad de CLB en tejido ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
H-O-1-01	0.0210	17.28	3.46
H-O-2-01	0.1096	165.66	33.13
H-O-2-02	0.1138	172.84	34.57
H-O-2-03	0.1197	182.83	36.57