



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO.

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN.

**Desarrollo de un método para el  
tratamiento de muestras de hígado y riñón  
de bovino para cuantificar zilpaterol**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**LICENCIADA EN FARMACIA**

PRESENTA:

**AIDE ARENAS LÓPEZ**

ASESORES:

M. EN C. MIRIAM AIDE CASTILLO RODRÍGUEZ

DRA. RAQUEL LÓPEZ ARELLANO

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO. 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

**Desarrollo de un método para el tratamiento de muestras de hígado y riñón de bovino para cuantificar zilpaterol.**

Que presenta la pasante: Aide Arenas López

Con número de cuenta: 412063389 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Farmacia.

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 05 de Junio de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M.F.C. Beatriz de Jesús Maya Monroy	
VOCAL	M. C. Elvia Adriana Morales Hipólito	
SECRETARIO	M.C. Miriam Aide Castillo Rodríguez	
1er. SUPLENTE	M.C. Gabriela Rodríguez Patiño	
2do. SUPLENTE	M.C. Mariana Dolores Hernández	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga\*

## DEDICATORIAS

---

*A mis padres:*

*María Felicitas López Velázquez y Alberto Arenas Rubio*

Quiero que sepan que son los mejores padres que Dios pudo darme; gracias a ustedes a su educación basada en valores y a todos y cada uno de sus consejos me he convertido en una mujer de bien, su apoyo y amor incondicional han dado frutos, esto y todo lo que soy es para ustedes es mi forma de agradecerles todo lo que me han dado, de verdad infinitas gracias papi y mami los amo.

*A mis Abuelos:*

*Mamá Felicitas y Papá Genarito*

Gracias por darme tanto amor y por la paciencia que tienen conmigo día con día, sus enseñanzas, historias y valores son incomparables los quiero mucho.

“Un abuelo es alguien con plata en su cabello, y oro en su corazón”.

*Lupita y Tachito (+)*

Gracias por sus atenciones y amor, los quiero mucho. Dicen que “los abuelos nunca mueren por que podemos escucharlos con el corazón”.

*A mis hermanos:*

*Mis gemelas (Arelí, Janís)*

Gracias por estar conmigo durante tantos años por sus abrazos, las peleas, las pláticas interminables por las noches y sus palabras de aliento, sé que algún día lograrán un triunfo igual de importante, estoy muy orgullosa de ustedes.

*Alberto*

A ti “tito” que fuiste la cereza del pastel, gracias por tus ocurrencias, travesuras y peleas, espero que esto te impulse a ser mejor que yo, estoy muy orgullosa de tenerte como mi hermano, así como a las gemelas te amo.

## AGRADECIMIENTOS

---

*A Dios*, porque él es mi refugio y mi fortaleza, gracias por todas las pruebas que has puesto en mi camino, sé que debo y puedo salir adelante.

*A mis Tíos y Tías*, por estar al pendiente de mí y por sus consejos; los quiero simplemente porque son mi familia.

*A mis primos y primas*, por todas esas aventuras, y risas que compartimos juntos, en especial a los que han vivido a mi lado Dillan, Uriel, Marco, Araceli, Laura, Elsa, Leticia y Oscar (Sé que estas en un mejor lugar, tú me enseñaste que los guerreros si existen) los quiero.

*A Carlos Gerardo*, por enseñarme que las decisiones que uno toma a veces no son las correctas, pero debemos afrontar las consecuencias de las mismas y que los amigos se cuentan con los dedos de las manos por todo esto; siempre tendrás un lugar en mi corazón, gracias.

*A Zochabeth*, gracias por ser sincera, por todos tus regaños y malas palabras, eres una gran amiga.

*A la Dra. Raquel López*, por permitirme formar parte de su gran equipo de trabajo, por la confianza y por todo el apoyo que me brindo, gracias por animarme y decirme tu puedes.

*Al profesor Juan José*, por otorgarme la beca para cursar el diplomado “Desarrollo Robusto de Medicamentos”

*A la maestra Miriam Castillo*, ni siquiera sé cómo agradecerle todo el apoyo que me ha brindado es una gran persona, se convirtió en mi amiga y mi confidente y eso nunca lo voy a olvidar, gracias maestra por la paciencia y consideración.

*A Gabriela Rodríguez (Gabs)*, porque te convertiste en mi hermanita mayor, gracias por todas las risas, las palabras de aliento, por prestarme tu hombro para llorar y sacar todas mis frustraciones, gracias por estar ahí en cada momento gracias por ser mi amiga.

*A Hugo “bochíto”*, porque tú me enseñaste a darle el valor más importante a las cosas más simples como sonreír y porque te convertiste en un buen amigo gracias.

*A todo el equipo de LEDEFAR, Mariana, la Maestra Ady*, (Gracias por sus consejos, su apoyo y por siempre responder mis dudas las estimo mucho); a la *Maestra Claudia, Bruno y Daniel* por todos los momentos divertidos, son un equipo maravilloso.

*A todos los que integran mi jurado*, gracias por tomarse el tiempo para revisar este trabajo, por sus recomendaciones y dudas.

## ÍNDICE

---

INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS .....	2
General:.....	2
Específicos: .....	2
MARCO TEÓRICO.....	3
1.Generalidades del Clorhidrato de Zilpaterol.....	3
2. Generalidades del Zilpaterol .....	5
3. Fármacos $\beta$ -adrenérgicos agonistas.....	6
3.1.2 Intoxicación por $\beta$ AA. ....	7
4.Hígado de los rumiantes. ....	7
4.1 Funciones del Hepatocito.....	7
5. Riñón de los rumiantes. ....	8
5.1 Forma de los riñones. ....	8
5.2 Estructura de los riñones. ....	9
6. Desnaturalización de proteínas. ....	10
7. Extracción en Fase Sólida (SPE).....	11
7.1 Definición. ....	11
7.1.2 Beneficios principales de la extracción en fase sólida. ....	11
7.1.3 Modos de cromatografía líquida .....	11
7.1.4 Modos de Separación por cromatografía líquida (LC).....	12
7.1. 5 Separación basada en la polaridad.....	12
7.1.6 Influencia de las Fases. ....	12
7.1.7 (SPE) Fase Móvil .....	13
7.1.8 (SPE) Fase estacionaria .....	13
7.1.9 Cromatografía en Fase Normal.....	14
7.2. Cromatografía en Fase Reversa .....	15
7.2.1 Protocolo para realizar la captura de una base débil en placas MCX. ...	17
7.2.2 Importancia de los pasos de acondicionamiento y equilibrio.....	18

*Universidad Nacional Autónoma de México FESC- Campo 1*

Separaciones basadas en carga.....	20
7.2.3 (IEC) Cromatografía de Intercambio Iónico.....	20
7.2.4 Estados de ionización. ....	21
7.2.5 Placa Oasis MCX. ....	24
7.2.6 Química de la fase estacionaria. ....	24
8. Espectrometría de masas. ....	26
8.1 Fundamento de la Espectrometría de Masas.....	27
8.2 Componentes del Espectrómetro de Masas. ....	27
8.3 Métodos de Ionización. ....	28
8.4 Analizadores de Masas. ....	28
8.5 Sistema ACQUITY UPLC.....	28
9. Validación. ....	29
9.1 Parámetros de Validación para un Método Bionalítico.....	30
PLAN DE TRABAJO .....	32
MATERIALES.....	33
PLAN EXPERIMENTAL GENERAL .....	35
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	36
DESARROLLO EXPERIMENTAL .....	37
RESULTADOS.....	45
Procedimiento experimental optimizado para el tratamiento de muestras de Riñón Bovino. ....	54
Procedimiento experimental para el Tratamiento de muestras de Hígado Bovino .....	55
Parámetros de desempeño evaluados del método bioanalítico.....	56
Selectividad .....	56
Linealidad del Sistema.....	59
Linealidad del Método para la matriz de Hígado.....	61
Linealidad del Método para la matriz de Riñón.....	64
Exactitud y Precisión del Método para la matriz de Hígado.....	67
Exactitud y Precisión del Método para la matriz de Riñón.....	68

*Universidad Nacional Autónoma de México FESC- Campo 1*

ANÁLISIS DE RESULTADOS .....	69
CONCLUSIONES.....	75
PERSPECTIVAS.....	76
REFERENCIAS.....	77
Anexo "A" .....	79
Anexo "B" .....	81
Anexo "C" .....	84



## **Índice de figuras**

Figura 1. Mecanismo de acción de los $\beta$ agonistas.....	6
Figura 2. Forma del riñón bovino.....	9
Figura 3. Estructura del riñón bovino.....	9
Figura 4. Espectro de Polaridad.....	12
Figura 5. Espectro de polaridad cromatográfica de acuerdo a la fase móvil. ....	13
Figura 6. Espectro de polaridad cromatográfica de partículas estacionarias. ....	13
Figura 7. Cromatografía en Fase Normal.....	15
Figura 8. Cromatografía en fase reversa.....	16
Figura 9. Protocolo a realizar para la captura de una base débil. ....	17
Figura 10. Sorbente en fase reversa con poros húmedos.....	18
Figura 11. Humidificación del poro.....	19
Figura 12. Pérdida de la retención del analito debido a poros secos. ....	20
Figura 13. Cromatografía de Intercambio Iónico.....	21
Figura 14. Estado de carga de los analitos frente al pH.....	21
Figura 15. Química de la fase estacionaria.....	24
Figura 16. Intercambio Catiónico Fuerte y Fase Reversa Modo SPE.....	25
Figura 17. Tipo de cartucho a utilizar de acuerdo al sorbente.....	26
Figura 18. Componentes básicos de un espectrómetro de masas.....	27
Figura 19. Sistema ACQUITY Espectrómetro de Masas TQ Xevo UPLC/MS de Waters.....	29
Figura 20. Plan de trabajo .....	32
Figura 21. Cromatograma de Zilpaterol [2ng/mL], precipitando proteínas con Acetonitrilo.....	46
Figura 22. Cromatograma de Zilpaterol [2ng/mL], precipitando proteínas con Ácido Tricloroacético 10%.....	47
Figura 23. Cromatograma de Zilpaterol, precipitando proteínas con $Zn(OH)_2$ 10%. .....	48

*Universidad Nacional Autónoma de México FESC- Campo 1*

Figura 24. Cromatograma de Zilpaterol, precipitando proteínas con una mezcla (sobrenadante Zn(OH) <sub>2</sub> .10%+ AFO 5%).	48
Figura 25. Cromatograma de Zilpaterol, precipitando proteínas con Zn(OH) <sub>2</sub> 10%.	48
Figura 26. Cromatograma de Zilpaterol, precipitando proteínas con ZnSO <sub>4</sub> . 10%.	49
Figura 27. Cromatogramas de Zilpaterol modificando la proporción de la mezcla de elución utilizada en la Extracción en Fase Sólida para Hígado.	51
Figura 28. Cromatogramas de Zilpaterol modificando la proporción de la mezcla de elución utilizada en la Extracción en Fase Sólida para Riñón.	53
Figura 29. Estándar de Zilpaterol [4ng/mL] abajo, Blanco preparado con mezcla Metanol/ NH <sub>4</sub> OH 5% [70:30] arriba.	56
Figura 30. Muestras de Hígado Blanco A, B, D.	57
Figura 31. Muestras de Hígado Blanco E, Z,3.	57
Figura 32. Muestras de Riñón Blanco A, B, C.	58
Figura 33. Muestras de Riñón Blanco D, E, F.	58
Figura 34. Linealidad del Sistema	60
Figura 35. Gráfico de Residuales (Linealidad del Sistema).	60
Figura 36. Gráfico de Concentración adicionada vs Concentración recuperada.	62
Figura 37. Gráfico de residuales	63
Figura 38. Gráfico de Concentración adicionada vs concentración recuperada.	65
Figura 39. Gráfico de Residuales.	66
Figura 40. Curva de Calibración de estándar de Zilpaterol en Ácido Fórmico al 2%	80
Figura 41. Curva de Calibración de estándar de Zilpaterol en Agua.	80
Figura 42. Procedimiento experimental para preparar la linealidad del sistema.	81
Figura 43. Procedimiento experimental para realizar exactitud y precisión del método para las matrices de hígado y riñón de bovino.	82
Figura 44. Procedimiento experimental para realizar Linealidad del método para las matrices de hígado y riñón de bovino.	83

## **Índice de tablas**

Tabla 1. Proteínas en Hígado de Bovino.....	8
Tabla 2. Comparación de cromatografía en fase normal y fase reversa .....	16
Tabla 3. Orientación sobre la elección del tipo de sorbente y el pH de la solución para los métodos SPE de intercambio iónico.....	22
Tabla 4. Familia Oasis de Intercambiadores de Iones. ....	23
Tabla 5. Parámetros de desempeño y especificaciones conforme a normatividad nacional e internacional.....	30
Tabla 6. Porcentajes aceptables de % CV de acuerdo a la concentración del analito y la técnica utilizada "UPLC MS/MS" .....	31
Tabla 7. Estándar Primario.....	33
Tabla 8. Reactivos.....	33
Tabla 9. Equipos e Instrumentos utilizados.....	33
Tabla 10. Materiales.....	34
Tabla 11. Muestras Biológicas .....	34
Tabla 12. Variables a estudiar para la optimización del método. ....	36
Tabla 13. Preparación de estándares de Zilpaterol.....	37
Tabla 14. Etiquetado de las muestras para evaluar la proporción de la mezcla de elución.....	43
Tabla 15. Composición de la Fase Móvil.....	44
Tabla 16. Condiciones de detección del Zilpaterol en MS/MS .....	44
Tabla 17. Estándares sometidos a diferentes temperaturas en el baño ultrasónico. ....	45
Tabla 18. Variación en la homogenización de estándares. ....	45
Tabla 19. Agentes precipitantes a utilizar para evaluar la técnica "precipitación de proteínas". ....	46
Tabla 20. Sobrenadante de Muestras de Hígado filtradas con acrodiscos 0.45µm de Nylon y precipitando proteínas con Ácido Tricloroacético 10%.....	47
Tabla 21. Recobros de Zilpaterol usando diferentes agentes precipitantes. ....	47

*Universidad Nacional Autónoma de México FESC- Campo 1*

Tabla 22. Recobros de Zilpaterol utilizando diferentes concentraciones de $Zn(OH)_2$ (7.5, 10 y 20%), como agente precipitante. ....	49
Tabla 23. Recobros de Zilpaterol modificando los tiempos de elución en el proceso de extracción en fase sólida, utilizando una mezcla 50:50 (Metanol/ $NH_4OH$ 5%). 49	
Tabla 24. Recobros de Zilpaterol modificando la proporción de la mezcla de elución utilizada en la Extracción en Fase Sólida para Hígado. ....	49
Tabla 25. Recobros de Zilpaterol modificando la proporción de la mezcla de elución utilizada en la Extracción en Fase Sólida para Riñón. ....	52
Tabla 26. Resultados obtenidos para la linealidad del Sistema .....	59
Tabla 27. Criterios de Aceptación para Linealidad del Sistema. ....	60
Tabla 28. Resultados obtenidos para la Linealidad del Método para Hígado. ....	61
Tabla 29. Criterios de aceptación para la cantidad adicionada contra la cantidad recuperada. ....	63
Tabla 30. Resultados obtenidos para la Linealidad del Método para Riñón.....	64
Tabla 31. Criterios de aceptación para la cantidad adicionada contra la cantidad recuperada .....	66
Tabla 32. Determinación de exactitud y precisión del método. ....	67
Tabla 33. Determinación de exactitud y precisión del método. ....	68
Tabla 34. Curva de Calibración de estándares de Zilpaterol en Ácido Fórmico al 0.2% .....	79
Tabla 35. Curva de Calibración de estándar de Zilpaterol en Agua .....	80
Tabla 36. Curva de Calibración del Sistema. ....	81

## ABREVIATURAS.

---

- **βAA** Beta adrenérgicos agonistas.
- **SPE** Extracción en Fase Móvil.
- **LC** Cromatografía Líquida.
- **IEC** Cromatografía de Intercambio Iónico
- **UPLC MS/MS** Cromatografía Líquida de ultra rendimiento acoplada a Espectrometría de masas en tándem.
- **TCA** Ácido Tricloroacético.
- **AF** Ácido Fórmico.
- **SAGARPA** Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
- **SENASICA** Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria.
- **NOM.** Norma Oficial Mexicana.
- **CODEX** Comité del Codex Alimentarius Internacional.
- **pka** Constante de disociación acida.
- **IUPAC** Unión Internacional de Química Pura y Aplicada.
- **°C** Grados centígrados
- **tr** tiempo de retención
- **LCAT** Lectin- colesterol actil-transferasa
- **THF** Tetrahidrofurano
- **CN** Cianuro
- **μL** Microlitros
- **mL** Mililitros
- **g** Gramos
- **tr** Tiempo de retención

*Universidad Nacional Autónoma de México FESC- Campo 1*

- **mg** Miligramos
- **ng** nanogramos
- **ppm** partes por millón
- **ppb** partes por billón
- **rpm** rpm=revoluciones por minuto
- **v** Voltaje
- **psi** Libra-fuerza por pulgada cuadrada
- **%** Porcentaje
- **μElution** Microelución
- **ESI +** Ionización por Electro Spray
- **VICH** Cooperación Internacional para la Armonización de los Requisitos Técnicos para el Registro de Medicamentos Veterinarios.
- **CV** Coeficiente de variación
- **r** Coeficiente de correlación
- **r<sup>2</sup>** Coeficiente de determinación
- **Ex.** Experimento
- **STD** Estándar
- **ZL** Zilpaterol
- **R** Riñón
- **H** Hígado
- **m/z** Relación masa/carga
- **IC(β<sub>1</sub>)** Intervalo de confianza para la pendiente
- **IC(β<sub>0</sub>)** Intervalo de confianza para la ordenada al origen
- **NH<sub>4</sub> OH** Hidróxido de Amonio.
- **Zn(OH)<sub>2</sub>** Hidróxido de Zinc.
- **ZnSO<sub>4</sub>** Sulfato de Zinc.

*Universidad Nacional Autónoma de México FESC- Campo 1*

- **ACN** Acetonitrilo.
- **s** Desviación estándar.
- **DCI** Denominación Común Internacional.
- **TAMB** Temperatura Ambiente.
- **FDA** Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos.
- **INEGI** Instituto Nacional de Estadística y Geografía.
- **mm** milímetros
- **LD** Límite de detección
- **LC** Límite de cuantificación

## INTRODUCCIÓN.

---

La cría, engorda y comercialización de ganado bovino para la producción de carne es una de las principales actividades del sector pecuario mexicano.

La carne de bovino forma parte importante de la canasta básica registrada por el INEGI. Para 2014, México ocupó el octavo lugar mundial en la producción mundial, con un total de 1.8 millones de toneladas, lo que representó un valor de 91 mil millones de pesos (SAGARPA, 2015).

La creciente demanda de productos de origen animal por parte de la población humana ha dado lugar a la intensificación de los sistemas de producción ganadera (María Lozano & Diana Arias, 2008). Este panorama ha ocasionado que el ganado se vea expuesto a distintos tipos de tratamientos para conseguir una ganancia de peso significativa en el menor tiempo para poder ser comercializados de manera más rápida.

El grupo de fármacos recientemente incorporados a la dieta del ganado bovino son los llamados  $\beta$ -Agonistas Adrenérgicos los cuales favorecen el crecimiento rápido de los animales que los consumen, debido a que estimulan el desarrollo de masa muscular mediante el aumento en la síntesis de proteína y reducción en la degradación de la proteína a nivel de músculo estriado, mientras que en tejido graso reduce la lipogénesis e incrementa la lipólisis (Macías-Cruz et al., 2013).

El Clenbuterol es el principal  $\beta$ -Agonista Adrenérgico utilizado para conseguir la ganancia de peso en bovinos, su uso irracional ha causado riesgos en la salud humana (Márquez Lara, 2008) , por lo cual en México la NOM-061-ZOO-1999 prohíbe su uso. Aunque en esta norma se excluye a la Ractopamina y al Clorhidrato de Zilpaterol, que son fármacos con menor potencia en la broncodilatación, vasoconstricción y en la frecuencia cardíaca (Domínguez et al., 2009).

Aunque el Zilpaterol no esté prohibido es de vital importancia analizar los límites mínimos y máximos de residuos que pueden estar presentes en el ganado bovino después del sacrificio, y así asegurar que el consumo de estos alimentos no afectara la salud humana. El objetivo de realizar el presente trabajo se centra en la optimización para lograr una limpieza adecuada de las matrices a analizar (hígado y riñón) y así poder detectar los límites de residuos permisibles de acuerdo a la normatividad (VICHGL49(R), 2015).



## OBJETIVOS

---

### **General:**

Desarrollar un método para el tratamiento de muestras de hígado y riñón de bovino por medio de una optimización para que sea capaz de cuantificar Zilpaterol mediante Cromatografía de Líquidos acoplado a Espectrometría de Masas (UPLC – MS/MS).

### **Específicos:**

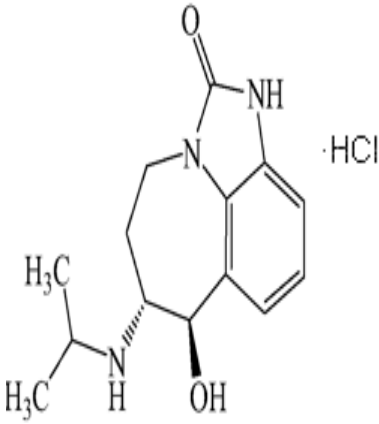
- Realizar una búsqueda bibliográfica consultando diversas fuentes de información para conocer las propiedades fisicoquímicas del Zilpaterol y así poder cuantificar su contenido en hígado y riñón de bovino por cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas.
- Revisar la composición en cuanto a proteínas de las matrices biológicas, hígado y riñón, mediante la búsqueda bibliográfica para lograr la extracción de las mismas.
- Plantear un plan experimental, realizando la optimización del proceso que permita determinar las condiciones del tratamiento de muestras de hígado y riñón de bovino para lograr la extracción y detección del Zilpaterol.

## MARCO TEÓRICO

Por más de 50 años la industria productora de carne ha utilizado diversos promotores de crecimiento con la finalidad de hacer más eficientes a los animales en términos de ganancia de peso y conversión alimenticia. A raíz de la prohibición de hormonas esteroideas como agentes promotores del crecimiento animal, comenzaron a popularizarse en todo el mundo los llamados “agentes de reparto” o  $\beta$ AA, como sustitutos de los compuestos hormonales (Contreras, 2015).

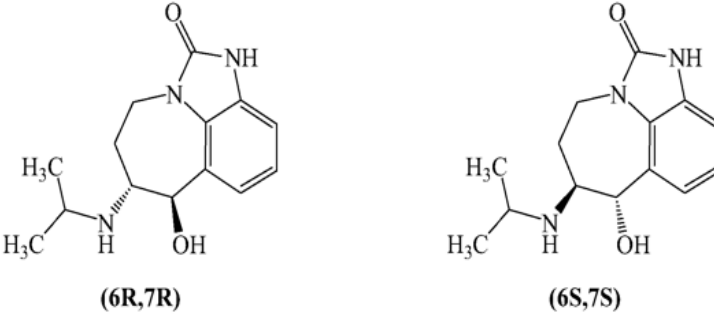
El clorhidrato de Zilpaterol es un miembro de una clase química de compuestos,  $\beta$ -agonistas, y está relacionado en estructura química y propiedades farmacológicas con derivados de catecolaminas. El cual está indicado en ganado bovino de engorda en etapa de finalización para aumentar la tasa de ganancia de peso y mejorar la conversión alimenticia (Contreras, 2015).

### 1.Generalidades del Clorhidrato de Zilpaterol.

<b>Denominación Común Internacional (DCI):</b>	<b>Clorhidrato de Zilpaterol</b>
<b>Apariencia:</b>	Polvo blanco a casi blanco
<b>Fórmula estructural (Zilpaterol base libre):</b>	
<b>Sinónimos:</b>	RU 42173, HCl zilpaterol, Zilmax®, Zilmax® Pre-mezcla.

<b>Estabilidad:</b>	Es estable a temperatura 2 a 8°C.
<b>Nombres IUPAC:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Trans (±) -4,5,6,7-tetrahydro-7-hydroxy-6-(isopropilamino) imidazo [4,5,1jk] - [1] benzazepin -2 (1H) - uno, monoclóhidrato.</li> <li>• Trans(±)-4,5,6,7-Tetrahydro-7-hidroxi-6-[(1-metil-etil) amino]imidazo[4,5,1-jk] [1]benzazepin-2(1H)-uno monoclóhidrato.</li> </ul>
<b>Formula Molecular:</b>	C <sub>14</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> .HCl
<b>Peso Molecular:</b>	297,56 g de clóhidrato de Zilpaterol
<b>Punto de fusión:</b>	219,5-220,5 ° C
<b>Solubilidad:</b>	<p>El clóhidrato de zilpaterol es muy soluble en agua y en otros medios acuosos (alrededor de 50% de producto disuelto) a diferentes valores de pH (1-10). Ligeramente soluble en metanol (aprox.3%) Insoluble en la mayoría de los solventes orgánicos (&lt; 0.1%). (National Center for Biotechnology Information, 2017)</p>

## 2. Generalidades del Zilpaterol

Denominación Común Internacional (DCI):	Zilpaterol
Apariencia:	Polvo blanco
Fórmula estructural (Zilpaterol base libre):	 <p>(6R,7R)                      (6S,7S)</p> <p>Zilpaterol tiene dos carbonos quirales y, por consiguiente, cuatro enantiómeros ópticos. Estos enantiómeros son: "(6R, 7R)", "(6R, 7S)", "(6S, 7R)" y "(6S, 7S)".</p>
Nombres IUPAC:	(+/-)-trans-4,5,6,7-Tetrahydro-7-hydroxy-6-(isopropylamino)imidazol[4,5,1-jk]bezazepin-2(1H)-one.
Formula Molecular:	C <sub>14</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>
Peso Molecular:	261.113 g de base libre Zilpaterol.
Punto de fusión:	161-163° C
Solubilidad:	Soluble en cloroformo, dimetilsulfoxido y metanol
pKa:	pKa: 13.39 (valor de referencia), pK <sub>b</sub> : 9.45 (valor de referencia)  (Boison J, Sander P., Chicoine A., 2015)

### 3. Fármacos $\beta$ -adrenérgicos agonistas.

Los fármacos  $\beta$ -adrenérgicos agonistas o BAA –también llamados lipomoduladores– se comportan del mismo modo que las catecolaminas, puesto que mimetizan la actividad natural. Los agonistas difieren en selectividad y afinidad por  $\beta$  receptores. El compuesto más difundido es clenbuterol, habitualmente utilizado como tocolítico y broncodilatador, fue el primer compuesto en incorporarse como recurso zootécnico, aunque también se dispone de cimaterol, salbutamol, fenoterol, zilpaterol, albuterol, mabuterol, terbutaline y ractopamina (Errecalde, 2003).

#### 3.1 Mecanismos de acción de los $\beta$ AA en el metabolismo.

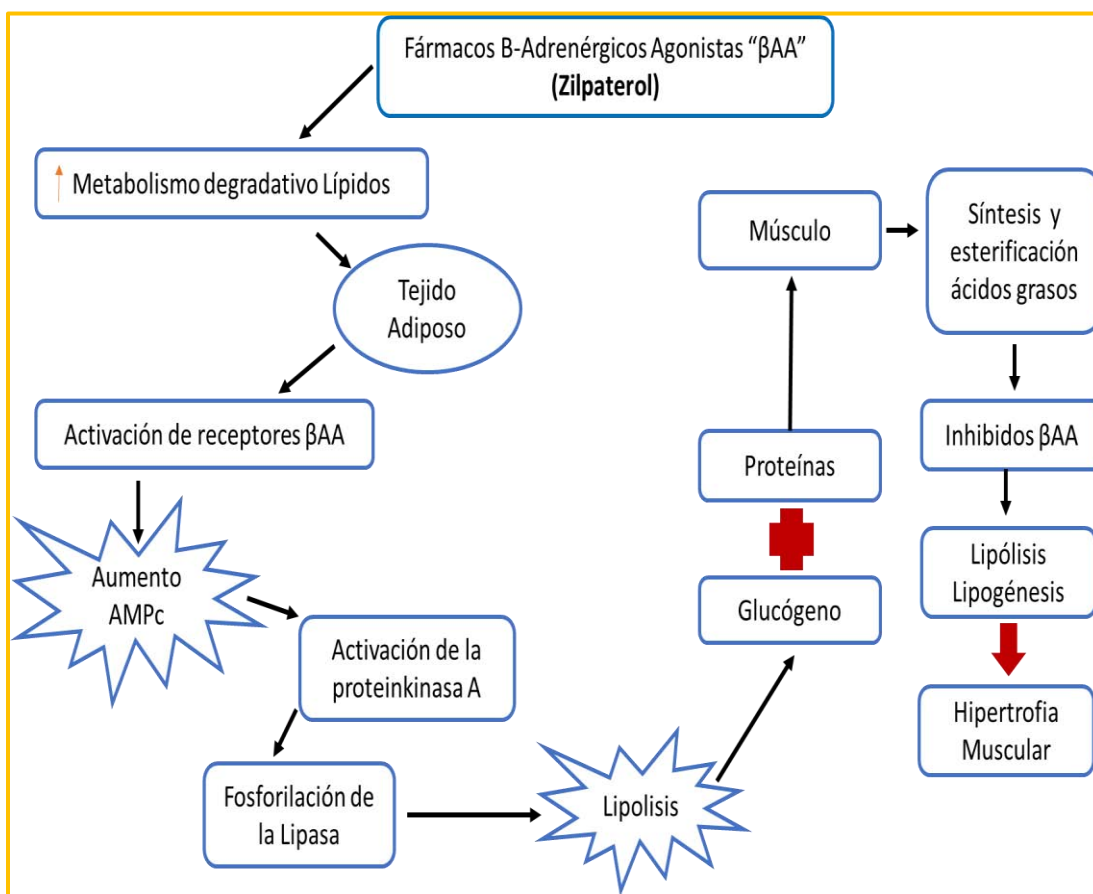


Figura 1. Mecanismo de acción de los  $\beta$  agonistas.

(Dominguez et al., 2009)

### **3.1.2 Intoxicación por $\beta$ AA.**

Información sobre efectos dañinos a la salud pública por el uso indebido de clenbuterol en Estados Unidos y la Unión Europea, originaron su prohibición en casi todo el mundo. En este siglo en México, se registraron 192 brotes de intoxicación por clenbuterol, con un total de 1 300 casos. El alimento consumido por las personas estuvo implicado en la mayoría de los brotes; en el 70% de los casos fue el consumo de hígado de res, dentro de un periodo de tiempo de 30 minutos a seis horas posterior a la ingesta, presentaron dos o más de las siguientes manifestaciones: taquicardia, cefalea, palpitaciones, náuseas, ansiedad, angustia y malestar general, con duración de 40 horas en promedio. En los casos de clorhidrato de zilpaterol y ractopamina, cuando se usan adecuadamente en la producción animal, no deben representar riesgo a la población que consume productos cárnicos de animales alimentados previamente con estos  $\beta$ AA; debido a sus propiedades químicas, estos compuestos se consideran de baja magnitud de riesgo asociado con el consumo de tejidos de animales tratados (Dominguez et al., 2009).

De acuerdo a la información antes mencionada los alimentos en los cuales se pueden almacenar residuos de este tipo de fármacos aparecen en su mayoría el hígado y riñón de bovino por lo que es importante mencionar sus características anatomo-fisiológicas.

## **4.Hígado de los rumiantes.**

El hígado constituye el 1.3% del peso corporal en especies mayores. Se considera al hígado como la glándula más grande del cuerpo y cumple una gran cantidad de funciones metabólicas y de defensa del organismo, cuyo parénquima (hepatocitos) representa el 70% del órgano y el estroma la diferencia (30%), formado por tejido conectivo, vasos y células de Kupffer (Nuñez Ochoa L., 2007).

### **4.1 Funciones del Hepatocito.**

- Síntesis de sustancias necesarias para el funcionamiento del organismo:
- Aminoácidos y proteínas:
  - Albúmina
  - Globulinas; grupo de proteínas que cumplen diversas funciones. Los principales sub-grupos son las  $\alpha$ -,  $\beta$ - globulinas.  
Ejemplos:
    - Inmunoglobulinas son sintetizadas por los linfocitos b a partir de las fracciones  $\beta$  y gamma.
    - Lipoproteínas son formadas en el hígado (de fracciones  $\alpha$  y  $\beta$ ;

- Glicoproteínas (de las fracciones  $\alpha$  y gamma); proteínas encargadas de transportar algunos metales, como la ceruloplasmina (de la fracción  $\alpha$ ), la transferina (de la fracción  $\beta$ ), y otras; la haptoglobina ( $\alpha$ -globulina); el angiotensinógeno ( $\alpha$ -globulina).

**Tabla 1. Proteínas en Hígado de Bovino.**

<b>Proteínas</b>	<b>Síntesis</b>
<b><math>\alpha</math>-globulinas</b>	
<b>Protrombina</b>	Hígado
<b>Transcortina</b>	Hígado
<b>Haptoglobina</b>	Hígado
<b>B-globulinas</b>	
<b>Transferrina</b>	Hígado
<b>Plasminógeno</b>	Hígado
<b>Lectin-colesterol actil-transferasa (LCAT)</b>	Hígado
<b>Fibrinógeno</b>	Hígado

(Nuñez Ochoa L., 2007).

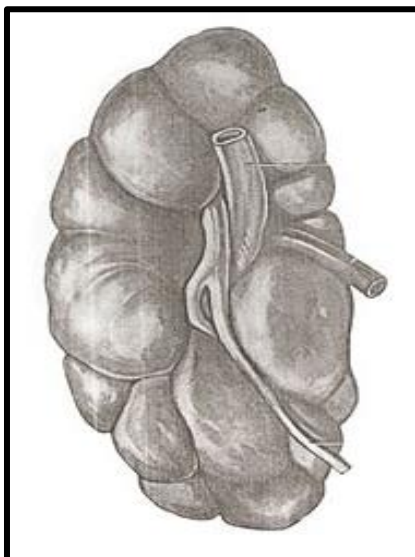
## **5. Riñón de los rumiantes.**

El riñón es un órgano que tiene a su cargo la formación y la eliminación de la orina. La formación de la orina se produce allí por filtración, secreción, reabsorción y concentración. En el riñón se filtran desde la sangre y se eliminan con la orina productos orgánicos del metabolismo y también sustancias nocivas exógenas que son catalizadas (Horst, et al 2005).

### **5.1 Forma de los riñones.**

Los riñones son órganos de color marrón rojizo y de una forma que difiere según la especie animal. En la vaca son irregularmente ovales (Horst; et al, 2005).

Los riñones del bovino presentan surcos que en su superficie delimitan lóbulos renales aislados y también grupos de lóbulos renales fusionados uno con el otro.



**Figura 2. Forma del riñón bovino.**

(Gelvez, 2016)

### **5.2 Estructura de los riñones.**

El parénquima renal está envuelto por una firme cápsula de fibras colágenas que puede ser separada del órgano con facilidad. El parénquima renal puede subdividirse en:

- Corteza del riñón (Córtex renis).
- Médula del riñón.

El uréter empieza en los cálices mayores, siguiendo los cálices menores cada uno de los cuales presenta una papila renal donde desembocan los conductos papilares.



**Figura 3. Estructura del riñón bovino.**

(Gelvez, 2016)



Luego de haber revisado las características de cada una de las matrices podemos decir que en cuanto a composición proteica el hígado cuenta con una variedad más amplia de proteínas por lo que la desnaturalización de las mismas es bastante importante.

## **6. Desnaturalización de proteínas.**

Cada tipo de molécula posee, en su estado nativo, una forma tridimensional característica que es conocida como su conformación o estructura.

El mantenimiento de esta estructura es fundamental para el normal funcionamiento de la proteína en cuestión, y una pérdida de esta conformación suele implicar una alteración en la misión biológica de la molécula proteica (Teijon Rivera Jose Ma., 2009).

Esta pérdida de la estructura tridimensional de una proteína, se conoce como desnaturalización. En la cual se producen cambios en las propiedades físicas, químicas y biológicas de una molécula proteica, por ejemplo:

- Disminución de la solubilidad
- Disminución de la simetría
- Disminución o pérdida total de la actividad biológica original
- Aumento en la reactividad química, en particular de los grupos ionizables.
- Aumento en la susceptibilidad de la hidrólisis por medio de enzimas proteolíticas.
- Alteración en la estructura interna y disposición de las cadenas peptídicas, sin rotura de los enlaces peptídicos (Teijon Rivera Jose Ma., 2009).

Las principales causas de la desnaturalización son:

- Un cambio significativo en el pH de la solución de la proteína.
- Cambios de temperatura, fundamentalmente a temperaturas altas.
- Concentraciones altas de compuestos polares neutros como la urea o la guanidina, ya que esos compuestos rompen los enlaces de hidrógeno formando otros enlaces nuevos.
- Tratamiento con disolventes orgánicos, etanol, acetona, etc.
- Radiación ultravioleta.
- Vibración ultrasónica, agitación energética de las soluciones acuosas

La solubilidad de una proteína es función de la composición iónica del medio ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ), de la fuerza iónica  $\mu$  y del pH.

Ya que las matrices biológicas son bastante complejas la extracción o desnaturalización de proteínas en algunas ocasiones no es suficiente para lograr obtener un sobrenadante limpio el cual pueda leerse en el UPLC MS/MS por lo que otra técnica utilizada para lograr obtener un sobrenadante "más limpio" o libre de impurezas es la extracción en fase sólida.

## **7. Extracción en Fase Sólida (SPE).**

### **7.1 Definición.**

El nombre técnico correcto de esta tecnología es "Extracción en fase líquido-sólido", ya que las partículas cromatográficas son sólidas y la muestra se encuentra en estado líquido.

La extracción en fase sólida es una tecnología de preparación de la muestra, el material de empaquetado cromatográfico que utiliza se compone de partículas sólidas, normalmente contenidas en un dispositivo de tipo cartucho, para separar químicamente los diferentes componentes de una muestra. Las muestras son casi siempre en estado líquido [aunque las aplicaciones especializadas pueden funcionar con algunas muestras en la fase de gas] (Arsenault, 2012).

#### **7.1.2 Beneficios principales de la extracción en fase sólida.**

1. La simplificación de la matriz o muestra compleja junto con la purificación del compuesto.
2. Reducir la supresión iónica y mejorar las aplicaciones en MS.
3. Capacidad para fraccionar la matriz y analizar los compuestos de acuerdo a su clase.
4. Indicación de concentración de compuestos de muy baja actividad (Arsenault, 2012).

#### **7.1.3 Modos de cromatografía líquida.**

Si el objetivo es la simplificación de la matriz de muestras, el fraccionamiento o la concentración de trazas, el científico analítico puede crear las condiciones cromatográficas adecuadas mediante la manipulación de la elección de sorbente [fase estacionaria] y disolventes [fase móvil].

Como en cromatografía líquida, hay varias opciones disponibles:

- fase normal
- fase inversa
- Intercambio iónico (Arsenault, 2012).

#### **7.1.4 Modos de Separación por cromatografía líquida (LC).**

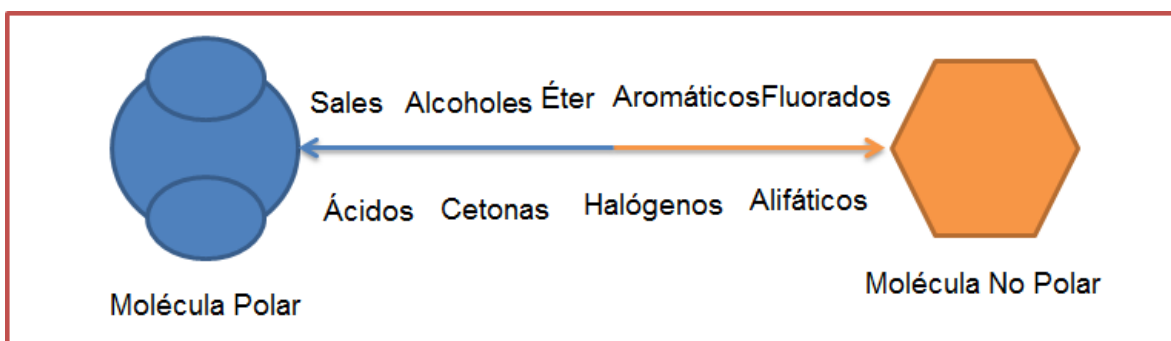
En general, se pueden usar tres características primarias de compuestos químicos para crear separaciones por LC Son:

- Polaridad
- Carga eléctrica
- Tamaño Molecular

#### **7.1. 5 Separación basada en la polaridad.**

Este enfoque aprovecha la polaridad o la no polaridad del compuesto objeto. Como sabemos, la estructura, la actividad y las características fisicoquímicas de una molécula se determinan por la disposición de sus átomos constituyentes y los enlaces entre ellos. Dentro de una molécula hay uno o más grupos funcionales, una disposición específica de ciertos átomos que es responsable de propiedades especiales y reacciones químicas predecibles. Es esta estructura la que a menudo determina si la molécula es polar o no polar.

Las moléculas con polaridad similar tienden a ser atraídas entre sí; Aquellos con polaridad diferente muestran una atracción mucho más débil, si la hay, e incluso pueden repeler unos a otros. Esto se convierte en la base para los modos de separación cromatográfica basados en la polaridad.(Arsenault, 2012)



**Figura 4. Espectro de Polaridad.**

(Arsenault, 2012)

#### **7.1.6 Influencia de las Fases.**

La combinación adecuada de fases móviles y estacionarias afecta la separación basada en la polaridad. Entonces, los compuestos de la muestra que son similares en polaridad a la fase estacionaria (material de empaque de la columna) serán atraídos preferentemente por ella y se moverán más rápido (Arsenault, 2012).

### 7.1.7 (SPE) Fase Móvil

Las fases móviles que compiten eficazmente con moléculas del analito para los sitios atractivos de la fase estacionaria desplazan a estos analitos, haciendo que se muevan más rápidamente a través de la columna. En el medio, los disolventes individuales y la mezcla de disolventes miscibles pueden ser colocados en orden de fuerza de elución (Arsenault, 2012).

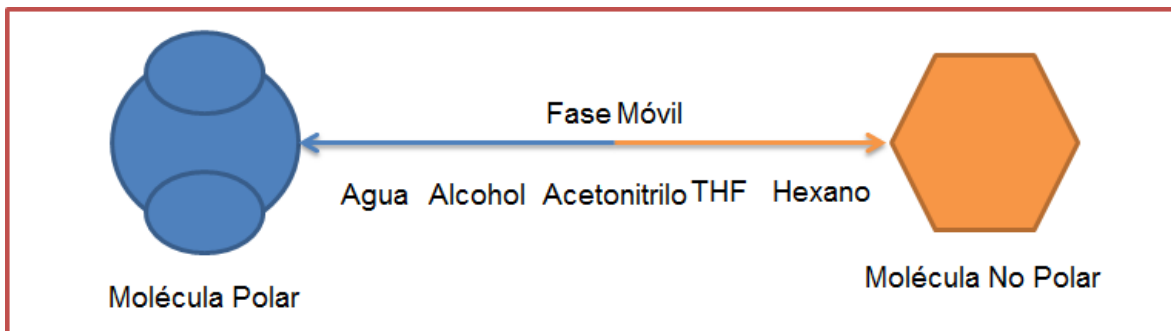


Figura 5. Espectro de polaridad cromatográfica de acuerdo a la fase móvil.

(Arsenault, 2012)

### 7.1.8 (SPE) Fase estacionaria

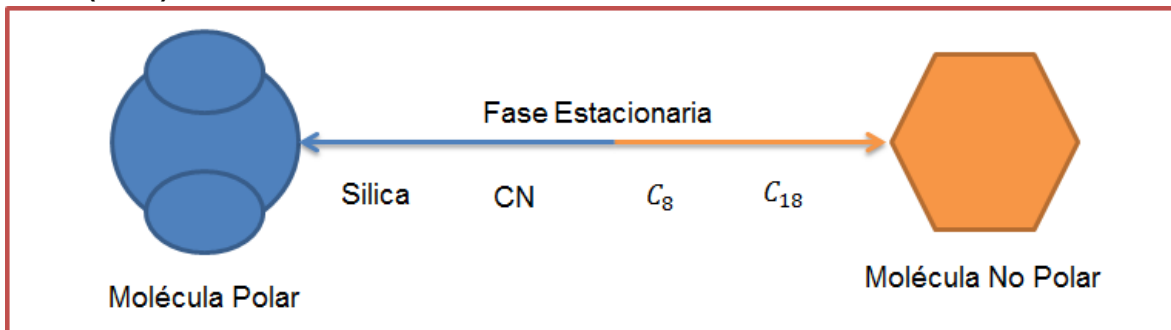


Figura 6. Espectro de polaridad cromatográfica de partículas estacionarias.

(Arsenault, 2012)

La sílica no unida tiene una superficie polar hidrófila activa que contiene grupos funcionales de silanol ácido. Por consiguiente, cae en el extremo polar de la escala de fase estacionaria mostrada en la figura 6 (Arsenault, 2012).

La actividad o polaridad de la superficie de sílice puede modificarse selectivamente uniéndose químicamente a grupos funcionales menos polares. Los ejemplos ilustrados aquí incluyen, en orden de polaridad decreciente. Este último [C<sub>18</sub>] es un empaque muy no polar hidrófobo.

Después de considerar la polaridad de ambas fases, el analista debe elegir una fase móvil para una fase estacionaria dada, en la que se retengan los analitos de interés, pero no tan fuertemente que no puedan eluirse. Por esta razón las características del analito deben tomarse en cuenta:

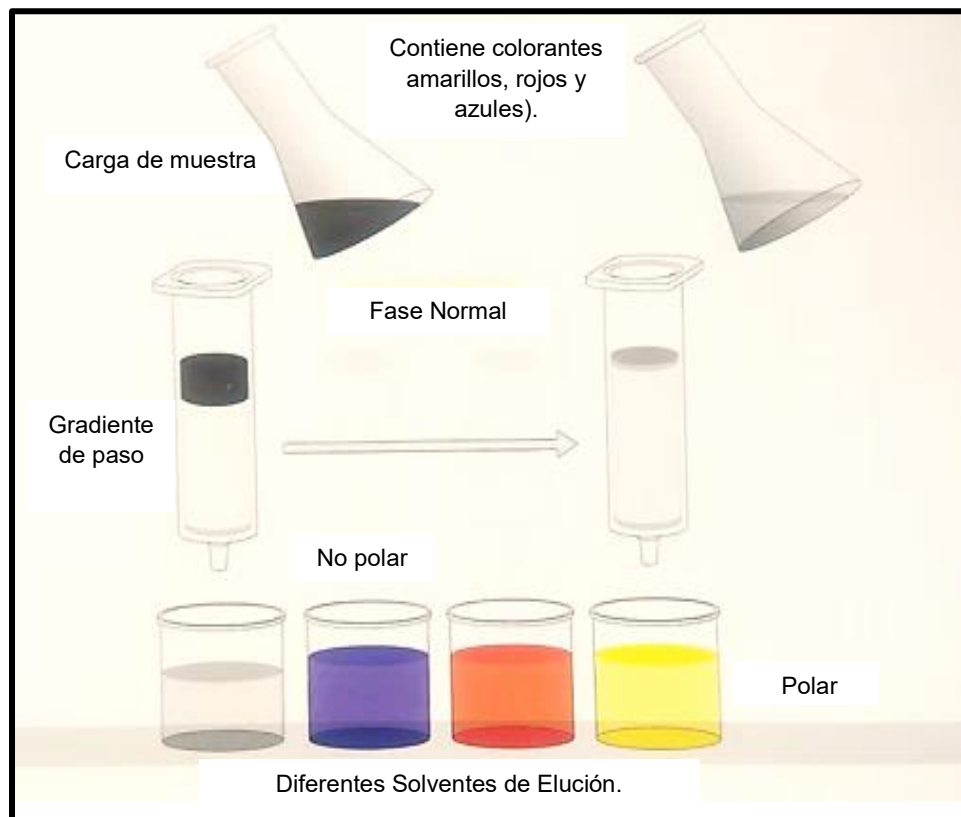
- pka
- Log P
- Solubilidad
- Polaridad

Entre los disolventes de similar polaridad, el analista debe considerar qué combinación de fases puede explicar mejor las diferencias más sutiles en la polaridad y solubilidad del analito para maximizar la selectividad del sistema cromatográfico. Al igual que los atrae, pero la creación de una separación basada en la polaridad implica el conocimiento de la muestra y la experiencia con diversos tipos de analitos y modos de retención (Arsenault, 2012)

En resumen, el analista debe elegir la mejor combinación de una fase móvil y una partícula de fase estacionaria con polaridades adecuadamente opuestas. A continuación, a medida que los analitos de la muestra se mueven a través de la columna, la regla "Similar atrae similares" determinará qué analitos se ralentizan y que proceden a una velocidad más rápida para eluirse primero (Arsenault, 2012).

#### **7.1.9 Cromatografía en Fase Normal.**

En la cromatografía de fase normal, la fase estacionaria es polar y retiene más fuertemente a compuestos polares, mientras los compuestos relativamente no polares son más atraídos por la fase móvil, por lo que si se utiliza un solvente no polar la elución será más rápidamente.



**Figura 7. Cromatografía en Fase Normal.**

(Arsenault, 2012)

## 7.2. Cromatografía en Fase Reversa

El término fase reversa describe el modo de cromatografía que es exactamente lo opuesto a la fase normal, a saber, el uso de una fase móvil polar y una fase estacionaria [hidrofóbica] no polar. Hoy en día, debido a que es más reproducible y tiene amplia aplicabilidad, la cromatografía de fase inversa se utiliza para más del 60% de todos los métodos SPE y LC. La mayoría de estos protocolos utilizan una fase móvil compuesta de una mezcla acuosa de agua con un disolvente orgánico polar miscible, tal como acetonitrilo o metanol. Esto asegura típicamente la interacción apropiada de los analitos con la superficie de partícula hidrófoba no polar.

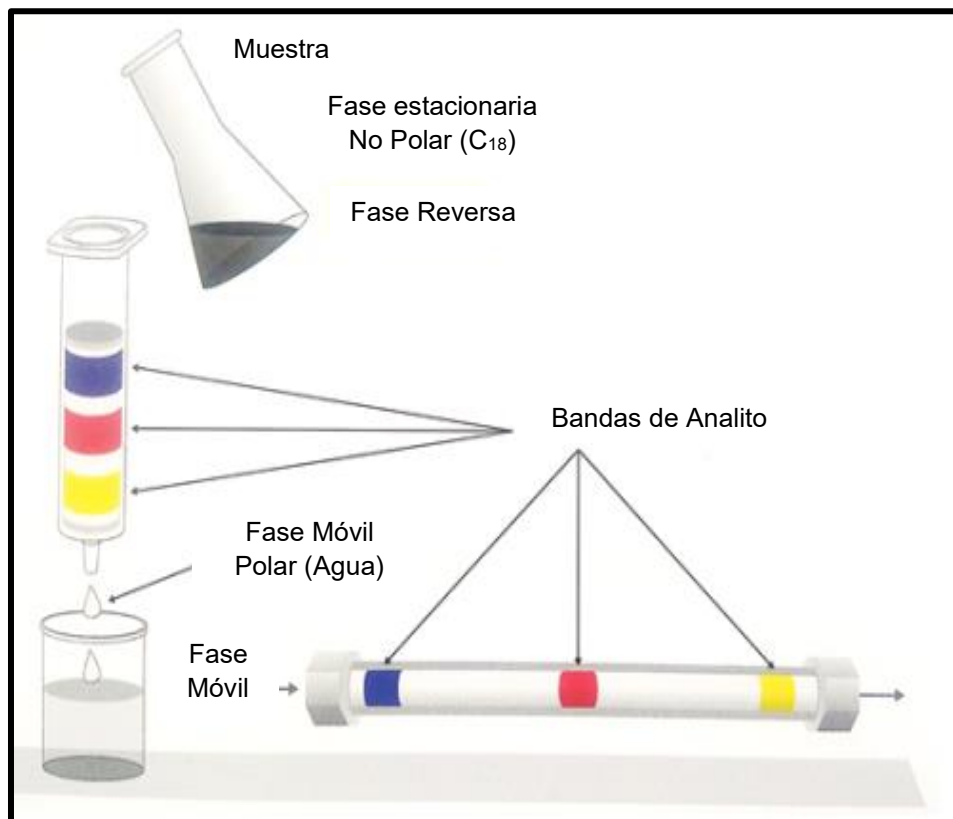


Figura 8. Cromatografía en fase reversa.

(Arsenault, 2012)

Tabla 2. Comparación de cromatografía en fase normal y fase reversa

	Fase Normal	Fase Reversa
<b>Sorbente</b>	Polar	No polar
<b>Fase Móvil (Condiciones Iniciales)</b>	No polar	Polar
<b>Analitos fuertemente retenidos</b>	Polar	no polar
<b>Analitos no retenidos</b>	No polar	Polar

### 7.2.1 Protocolo para realizar la captura de una base débil en placas MCX.

El desarrollo de métodos de extracción en fase sólida (SPE) se inicia conociendo la matriz de la muestra, la naturaleza y la concentración relativa de los analitos de interés, así como los compuestos endógenos que pueden provocar interferencias.

Se seleccionan los sorbentes y eluyentes adecuados para los pasos de carga, lavado y elución, dando lugar a la creación de protocolos robustos, fiables y selectivos. Los expertos en aplicaciones de Waters han diseñado algunos métodos para simplificar este proceso.

Metodología a seguir si se utiliza la placa MCX

- Acondicionamiento con Metanol
- Acondicionamiento con Agua
- Carga Muestra
- Lavado 1 Ácido Fórmico
- Lavado 2 Metanol
- Elución [Metanol/NH<sub>4</sub>OH 5%]

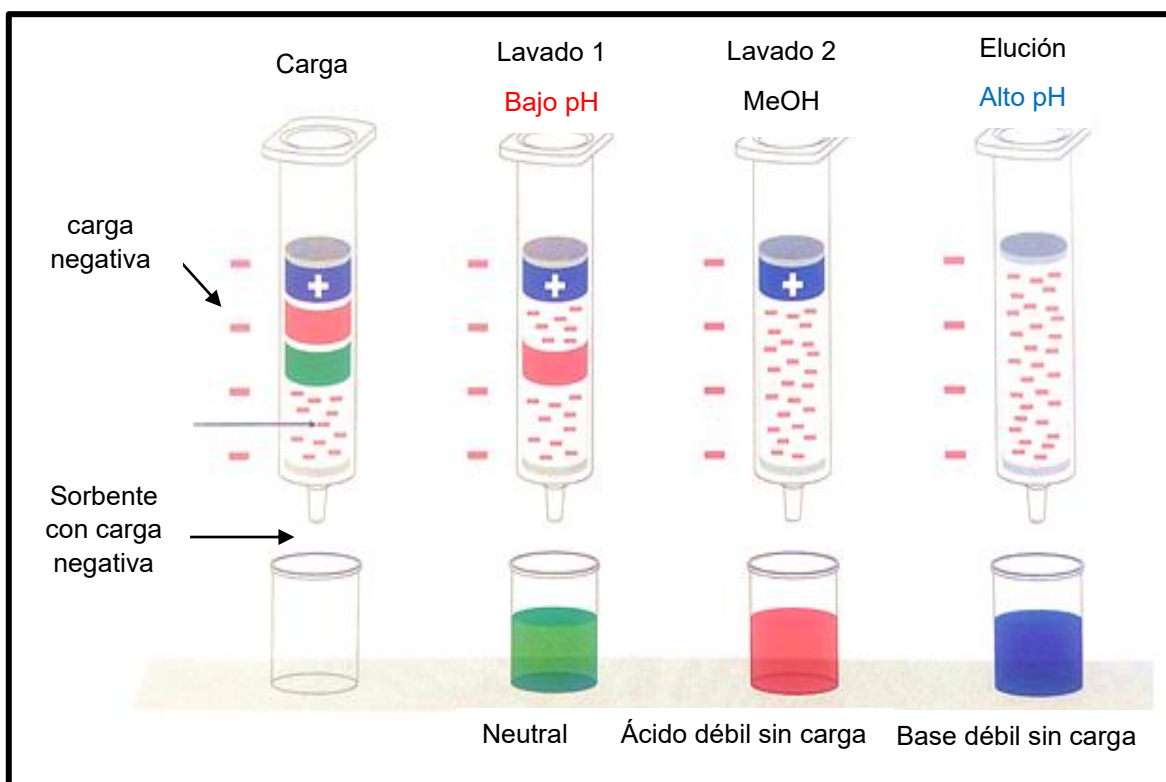


Figura 9. Protocolo a realizar para la captura de una base débil.

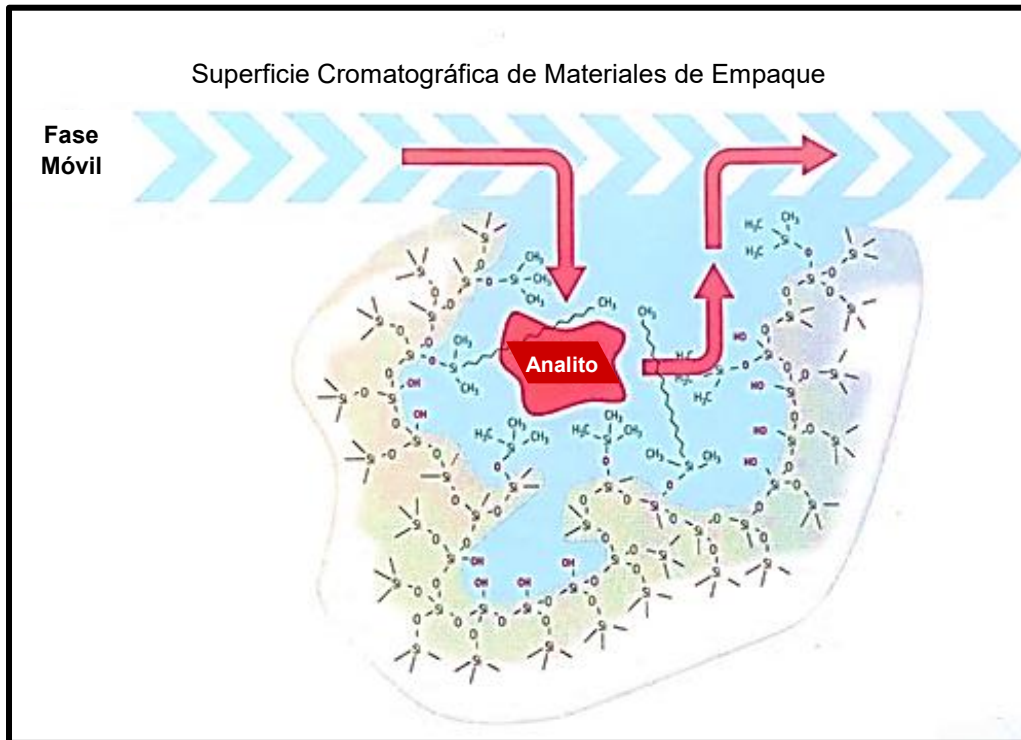
(Arsenault, 2012)



### **7.2.2 Importancia de los pasos de acondicionamiento y equilibrio.**

En la discusión de los métodos de SPE de fase reversa, necesitamos entender la importancia de los pasos de acondicionamiento y equilibrio en el protocolo SPE.

En cromatografía de fase reversa, las partículas de adsorbente poroso son muy no polares, y los analitos se encuentran típicamente en disolventes acuosos, más polares. Debido a su alta porosidad proporcionan una alta superficie la cual es requerida para realizar la separación cromatográfica con una cantidad relativamente pequeña de masa sorbente. Cuando se unen con ligandos de carbono tales como C18, los poros son muy no polares. Para acceder a esta superficie cromatográfica, los analitos [compuestos de interés] que están en la muestra deben viajar a los poros llenos de disolvente para que sean retenidos.

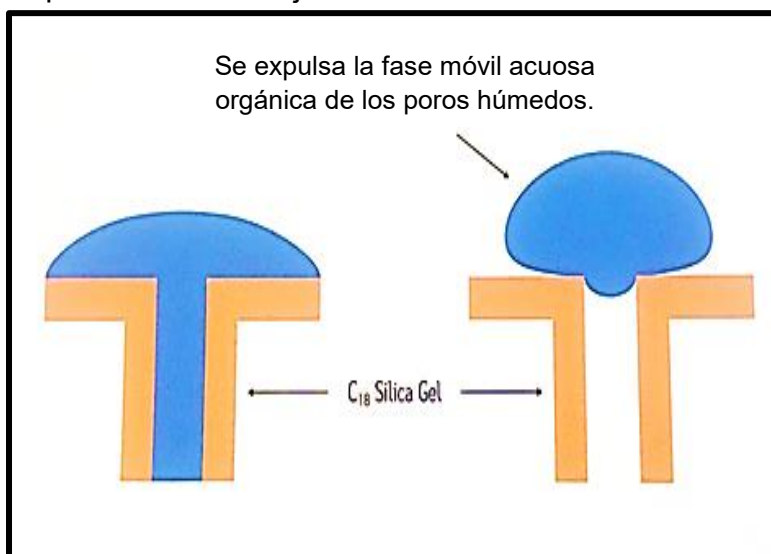


**Figura 10. Sorbente en fase reversa con poros húmedos.**

(Arsenault, 2012)

Las partículas de sorbente son muy porosas, al igual que los poros de una esponja 99% de las superficies cromatográficas está dentro de los poros. La fase móvil debe ser permitida dentro del poro para que tenga lugar la retención cromatográfica del analito. Si los poros están mojados, entonces el analito será retenido o capturado.

Por lo que los pasos de acondicionamiento y equilibrado aseguran que los poros de un sorbente de fase inversa se humedecen adecuadamente para permitir que el analito sea retenido. Sin embargo, si el disolvente de la muestra polar no desea estar en los poros no polares, debido a la polaridad opuesta, entonces los analitos no pueden viajar a los poros y la retención cromatográfica de los compuestos no se lleva a cabo y el protocolo SPE dejará de funcionar.



**Figura 11. Humidificación del poro.**

(Arsenault, 2012)

Cuando el poro se seca (figura de la derecha), a eso se llama "deshumidificación o colapso hidrófobo. Sin embargo, en realidad es causada por los poros que no se humedecen adecuadamente.

Por esta razón se requieren pasos de acondicionamiento y equilibrado para humedecer adecuadamente los poros de un sorbente no polar.

Aunque la retención también depende del área superficial y la densidad del ligando. Sin embargo, si la superficie no está humedecida, entonces el área superficial cromatográfica eficaz se reduce a un 95%, reduciendo de este modo la retención del analito. Esto produce una captura deficiente y aparece como si se hubiera producido colapso de fase hidrofóbica.

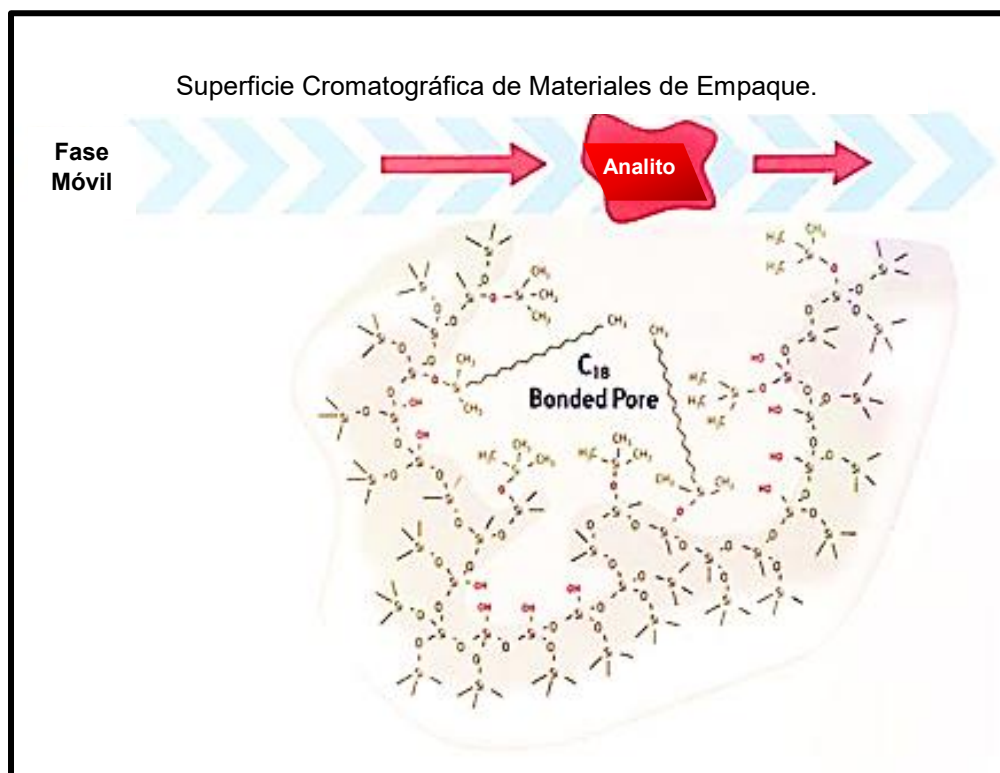


Figura 12. Pérdida de la retención del analito debido a poros secos.

(Arsenault, 2012)

Si los poros del sorbente se deshidratan o están secos entonces el analito, no interactúa con la fase estacionaria, eluyéndose rápidamente.

## Separaciones basadas en carga.

### 7.2.3 (IEC) Cromatografía de Intercambio Iónico.

La cromatografía de intercambio iónico se lleva a cabo con empaques de columna que tiene grupos funcionales cargados unidos a una matriz polimérica. El mecanismo de retención más común es el intercambio simple de los iones de la muestra y de la fase móvil con el grupo cargado de la fase estacionaria.

Las fases estacionarias para las separaciones de intercambio iónico se caracterizan por la carga sobre sus superficies y los tipos de iones que atraen y retienen. El intercambio de aniones se usa para retener y separar los iones de carga negativa sobre una superficie positiva. Por el contrario, el intercambio catiónico se usa para retener y separar positivamente iones de carga sobre una superficie negativa.

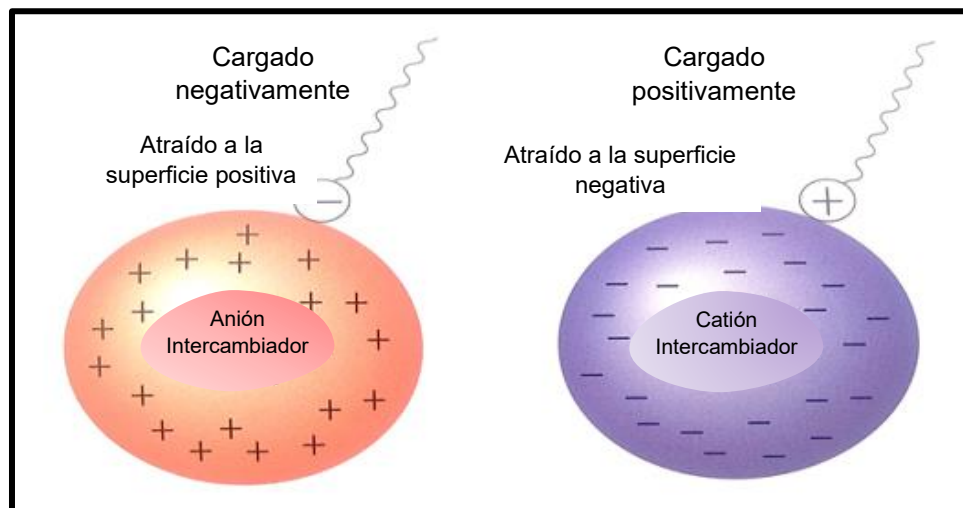


Figura 13. Cromatografía de Intercambio Iónico.

(Arsenault, 2012)

### 7.2.4 Estados de ionización.

Las separaciones basadas en carga dependen de los estados de ionización de los analitos (ácidos y bases) y los sorbentes implicados.

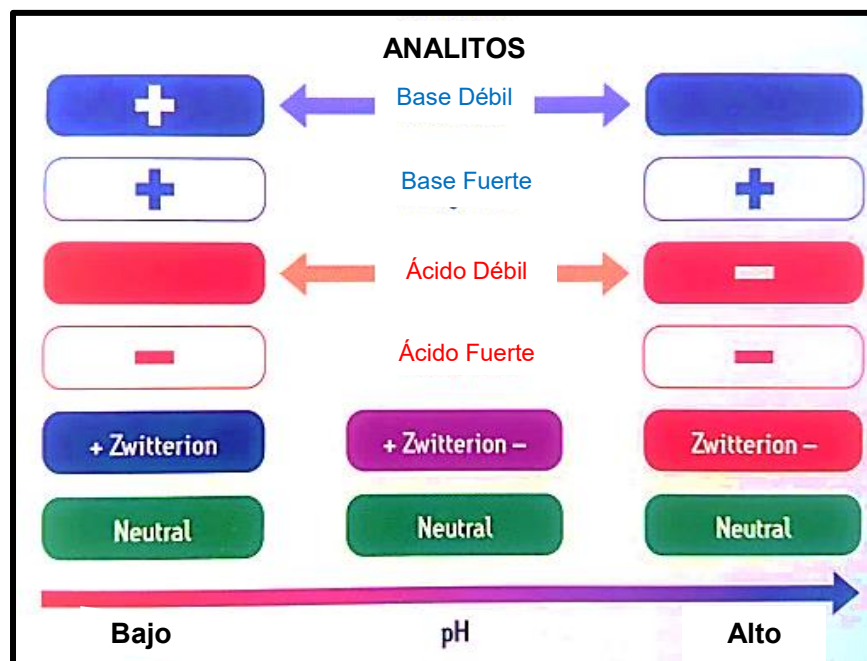


Figura 14. Estado de carga de los analitos frente al pH.

(Arsenault, 2012)

Algunos compuestos se llaman zwitterion porque tienen sitios ácidos y básicos, que ambos se pueden cargar a valores de pH 6-9.

Los intercambiadores de iones fuertes llevan grupos funcionales (Aminas cuaternarias o ácidos sulfónicos) que están siempre ionizados. Se usan típicamente para retener y separar los iones débiles. Estos iones débiles pueden ser eluidos por desplazamiento con una fase móvil que contiene iones que son atraídos fuertemente a los sitios de la fase estacionaria. Alternativamente, los iones débiles pueden retenerse en la columna, luego se convierten en su forma no ionizada in situ cambiando el pH de la fase móvil, haciendo que pierdan su atracción y sean eluidos. Con el advenimiento de las aplicaciones de LC-MS, cada vez más métodos de SPE utilizan intercambio iónico combinado con modos de cromatografía en fase inversa en el mismo dispositivo SPE, ya que proporciona extracto más limpio que reduce la supresión iónica o ionización en el espectrómetro de masas.

Intercambiadores de iones débiles llevan grupos funcionales (aminas secundarias o ácidos carboxílicos) los cuales se pueden neutralizar por encima o por debajo de un cierto valor de pH y perder su capacidad para retener iones por carga.

**Tabla 3. Orientación sobre la elección del tipo de sorbente y el pH de la solución para los métodos SPE de intercambio iónico.**

Tipo de analito.	Ácido débil p.ej; Pka ~ 5	Ácido fuerte	Base débil, por ejemplo, pka ~ 10	Base fuerte
<b>Estado de carga vs. pH</b>	Sin carga a pH <3 / - [anión] a pH > 7	[Anión] Siempre cargado.	+ [Cación] a pH <8 / Sin carga a pH > 12	+ [Cación] Siempre cargado
↓	↓	↓	↓	↓
<b>Partícula de fase estacionaria</b>	Intercambiador fuerte de aniones	Intercambiador de aniones débiles, por ejemplo, pka ~ 10	Intercambiador de cationes fuerte	Intercambiador de cationes débiles p.ej; Pka ~ 5
<b>Estado de carga vs. pH</b>	Siempre cargado	+ A pH <8 / Sin carga a pH <12	- Siempre cargado	Sin carga a pH <3 / - a pH > 7

↓	↓	↓	↓	↓
<b>Retener analito [capturar]</b>	pH>7	pH<8	pH<8	pH>7
<b>Retener analito [eluir]</b>	pH<3	pH>12	pH>12	pH<3

(Arsenault, 2012)

La Tabla 3 Proporciona orientación sobre la selección del tipo de sorbente y el pH de la solución para los métodos SPE de intercambio iónico.

- ✓ En primer lugar, determinar el tipo de analito.
- ✓ A continuación, siga las flechas correspondientes hacia abajo para las partículas recomendadas y el pH de la fase móvil.

De acuerdo con lo que se menciona en la tabla 3 pueden existir dos tipos de sorbetes:

1. Sorbentes para compuestos “fuertes”

Si el compuesto es "fuerte", se debe utilizar un sorbente “débil”. El sorbente tendrá carga opuesta para la captura y luego estará en su forma no ionizada para la liberación del compuesto "fuerte" ajustando el pH.

2. Sorbentes para compuestos “débiles”

Si el compuesto es, “débil” utilizar sorbentes fuertes, los cuales siempre están cargados. El compuesto tendrá carga opuesta para la captura, y después se encontrará en su forma no ionizada para su liberación ajustando el pH.

Muchos sorbentes combinan tanto la capacidad de intercambio iónico como la de fase reversa por eso se crearon diferentes tipos de placas que combinan estas características.

**Tabla 4. Familia Oasis de Intercambiadores de Iones.**

	<b>Intercambiador de aniones</b>	<b>Intercambiador de cationes</b>
<b>Fuertes</b>	Oasis MAX	Oasis MCX
<b>Débiles</b>	Oasis WAX	Oasis WCX

(Arsenault, 2012)

La placa Oasis MCX de acuerdo a sus características es la que se utilizara en el presente trabajo.

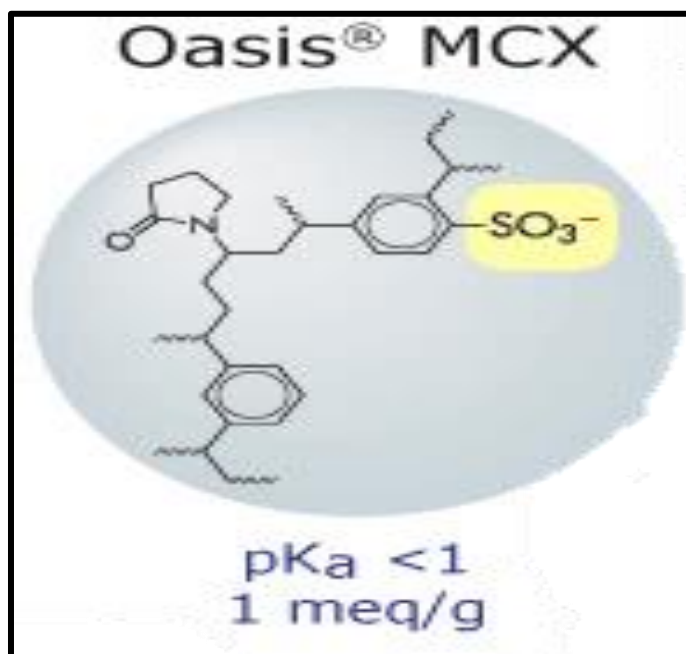
### **7.2.5 Placa Oasis MCX.**

La placa patentada de 96 pocillos Oasis MCX  $\mu$ Elution está diseñada para la limpieza SPE y el enriquecimiento de analito de volúmenes de muestra que van de 10  $\mu$ L hasta 500  $\mu$ L. El mecanismo de retención más común es el intercambio simple de los iones de la muestra y de la fase móvil con el grupo cargado de la fase estacionaria.

### **7.2.6 Química de la fase estacionaria.**

Cada pocillo de la placa  $\mu$ Elution contiene 2 mg del sorbente Oasis MCX, que es un nuevo sorbente polimérico de modo mixto de fase reversa/intercambio catiónico fuerte, este sorbente polimérico es humectable y estable a pH 0-14. Oasis MCX es selectivo para las bases y estable en eluyentes orgánicos.

La fase estacionaria está compuesta por grupos funcionales de naturaleza ácida fuerte como ácido sulfónico ( $R-SO_3^-$ ), con el fin de que los cationes puedan interactuar y se dé el intercambio catiónico (Hidalgo, 2016).



**Figura 15. Química de la fase estacionaria.**

(Arsenault, 2012)

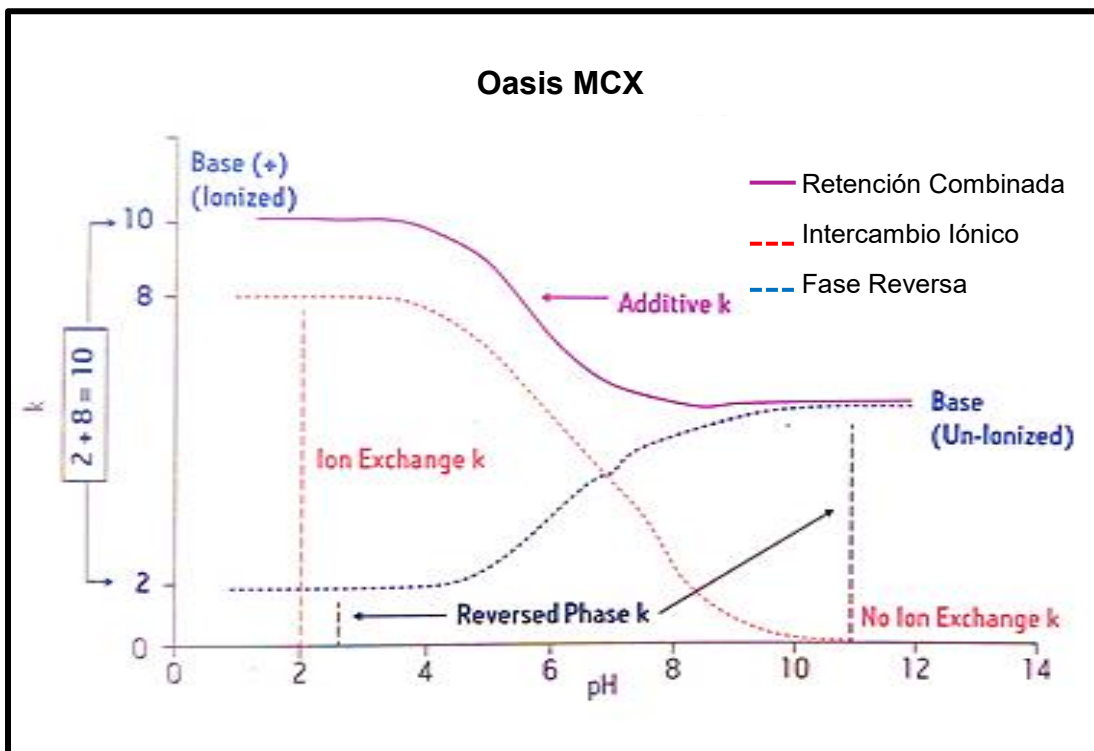


Figura 16. Intercambio Catiónico Fuerte y Fase Reversa Modo SPE.

(Arsenault, 2012)

El mecanismo de retención en fase reversa se muestra como una curva con puntos azules. Hay un aumento en la retención cuando la base se vuelve no ionizada la línea punteada roja es el mapa puro de retención de intercambio catiónico. Puesto que se trata de un intercambiador de iones fuerte, el sorbente está siempre cargado. Sin embargo, el intercambio iónico sólo puede ocurrir cuando el compuesto tiene la carga opuesta, que para una base débil está a pH bajo. La curva roja tiene alta retención a pH bajo y no tiene retención de intercambio iónico a pH alto debido a que el compuesto se hace no ionizado.

La curva púrpura se muestra para ambos mecanismos de retención, que es lo que sucedería a un compuesto de base débil en este sorbente. Por ejemplo, para usar la estrategia de captura para una base débil, la muestra debe cargarse, y luego lavarse a pH bajo para mantener la retención más fuerte, y después eluir a pH alto. Este disolvente de alto pH típicamente tendrá una alta concentración orgánica para ser lo suficientemente fuerte como para liberar el compuesto que ahora se retiene solamente por fase reversa para una base no ionizada.



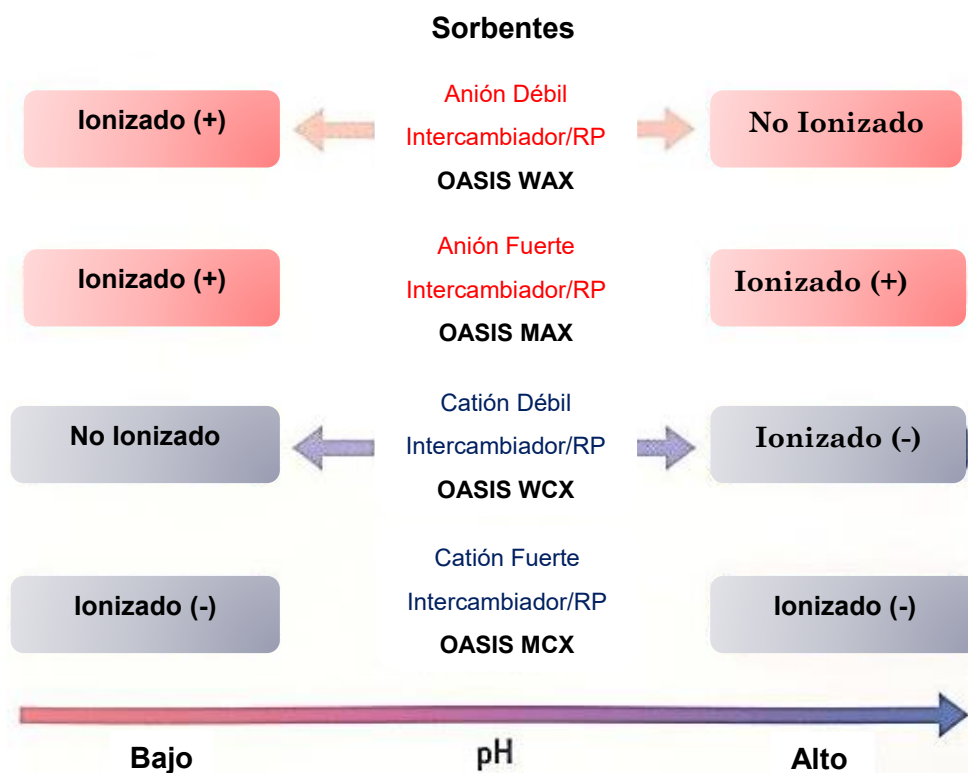


Figura 17. Tipo de cartucho a utilizar de acuerdo al sorbente.

(Arsenault, 2012)

La figura 17 nos muestra que si se tiene un intercambio catiónico fuerte se usa un cartucho MCX y se procede a seguir el protocolo.

La base débil se captura a pH bajo cuando está cargada positivamente y se eluye a pH alto cuando está en su forma no ionizada, cerrando así el mecanismo de intercambio iónico (Arsenault, 2012). Para poder demostrar que la extracción en fase sólida es eficiente se necesita cuantificar las muestras por eso la espectrometría de masas es una técnica importante durante este proceso.

## 8. Espectrometría de masas.

La Espectrometría de Masas es una poderosa técnica microanalítica usada para identificar compuestos desconocidos, para cuantificar compuestos conocidos, y para elucidar la estructura y propiedades químicas de moléculas (Plascencia, 2003).

## 8.1 Fundamento de la Espectrometría de Masas.

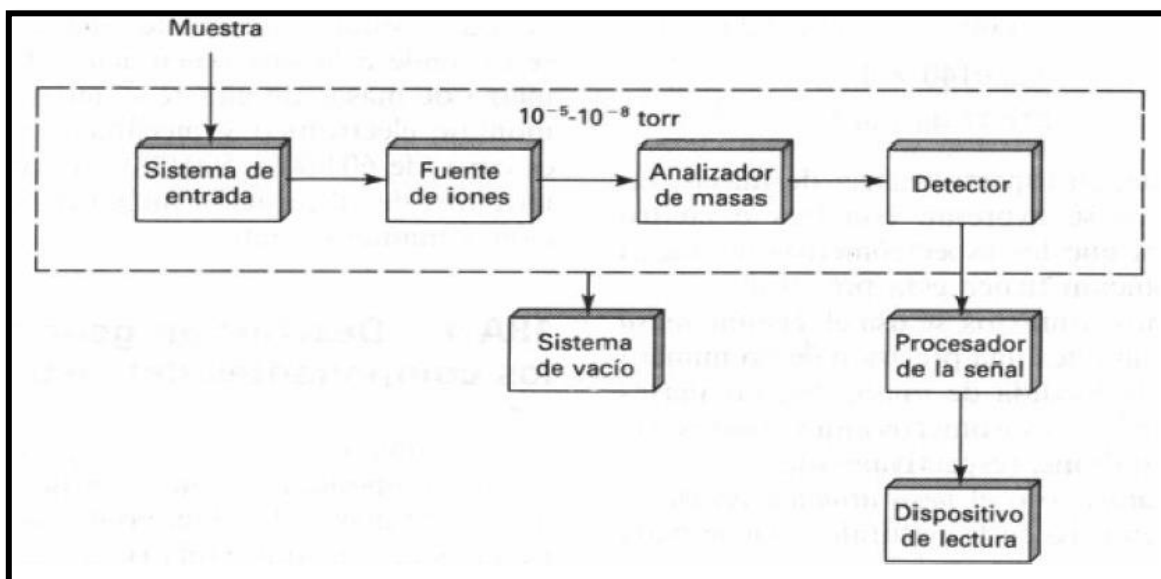
Un espectrómetro de masas no mide la masa molecular directamente, pero mide la relación masa/carga de los iones formados de las moléculas. El principio de la espectrometría de masas es la producción de iones a partir de compuestos neutros y la observación de la subsiguiente descomposición de estos, los cuales se mueven rápidamente y son “clasificados de acuerdo a su relación  $m/z$  (masa/ n° de cargas del ion). El espectrómetro no solo clasifica los fragmentos sino que además mide la cantidad que se forman de ellos (Breton, 2004).

## 8.2 Componentes del Espectrómetro de Masas.

Los espectrómetros de masas tienen siete componentes mayores:

- ✓ Sistema de entrada
- ✓ Fuente de iones
- ✓ Analizador de masas
- ✓ Detector
- ✓ Sistema de vacío
- ✓ Sistema de control
- ✓ Sistema de datos.

El sistema de entrada, junto con la fuente de iones y el tipo de analizador de masas definen el tipo de espectrómetro y las capacidades del sistema.



**Figura 18. Componentes básicos de un espectrómetro de masas.**

(Plascencia Villa, 2003)

### **8.3 Métodos de Ionización.**

Un reto fundamental en la espectrometría de masas de cualquier tipo de analitos es la producción de iones en fase gaseosa de estas especies, y dificultades en la producción de los mismos que puedan impedir el análisis por espectrometría de masas de ciertas clases de moléculas. Por lo cual la Ionización es importante y puede generarse de diferentes formas:

- ✓ Impacto Electrónico (*Electron Impact EI*)
- ✓ Ionización Química (*Chemical Ionization CI*)
- ✓ Ionización por Electrospray (*Electrospray Ionization ESI*). Esta técnica es una de las más usadas en el acoplamiento a Cromatografía de Líquidos.

### **8.4 Analizadores de Masas.**

Los analizadores de masas llevan a cabo la separación de los iones producidos por diferentes métodos en una fuente de iones, de acuerdo a su relación masa/carga ( $m/z$ ) para que puedan llegar al detector. Esta separación se produce por la aplicación de diferentes campos eléctricos y magnéticos.

Existen diferentes tipos de analizadores que poseen características diferentes en lo que se refiere a sensibilidad, rango de masas que se puede separar y capacidad de separar masas que se diferencian solo en decimales (resolución) (Sanchez, 2015)

Los tipos de analizadores más utilizados son:

- ✓ Cuadrupolo (quadrupole).
- ✓ Trampa de iones (ion-trap).
- ✓ Tiempo de vuelo (time -of-flight).

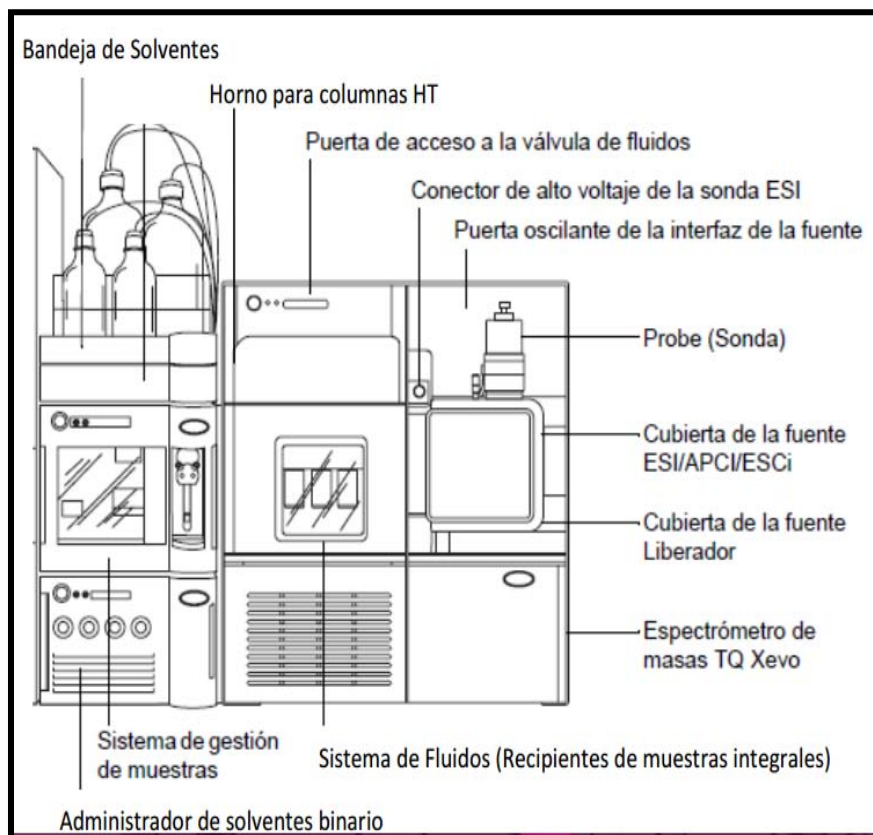
El espectrómetro de masas a utilizar en el presente trabajo es el Xevo™ TQ MS de Waters®.

### **8.5 Sistema ACQUITY UPLC.**

Los sistemas ACQUITY UPLC incluyen un sistema administrador binario de solventes, un sistema administrador de muestras, un horno de columnas y una columna ACQUITY UPLC especial

El espectrómetro de masas Xevo™ TQ MS de Waters® es un espectrómetro de masas con cuadrupolos en tándem, el cual está equipado con la fuente de ionización por electrospray (ESI).

Diseñado para el análisis sistemático de UPLC™ MS/MS para aplicaciones cuantitativas y cualitativas, puede funcionar a velocidades de adquisición elevadas compatibles con UltraPerformace (Sanchez, 2015).



**Figura 19. Sistema ACQUITY Espectrómetro de Masas TQ Xevo UPLC/MS de Waters.**

(Sanchez, 2015).

## 9. Validación.

La validación de un método analítico es el proceso por el cual se establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del método cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas (USP30, 2007).

## 9.1 Parámetros de Validación para un Método Bionalítico

Los parámetros de desempeño que marca la (VICHGL49(R), 2015) son:

- Selectividad
  - Linealidad
  - Exactitud
  - Precisión
- } Método y Sistema.
- Límite de cuantificación
  - Límite de detección
  - Estabilidad de la muestra.
    - Corto plazo
    - Ciclos de congelación y descongelación

En la tabla 5 se muestran los parámetros de desempeño evaluados en el presente trabajo.

**Tabla 5. Parámetros de desempeño y especificaciones conforme a normatividad nacional e internacional.**

Parámetro de validación.	Especificación		
	NOM-177-SSA1-2013	VICH. GL-49	Codex Alimentarius
<b>Selectividad</b>	La respuesta analítica de las interferencias próximas al tiempo de retención debe ser menor al 20% para el límite inferior de cuantificación del analito.	No exista pico al mismo tiempo de retención del analito Si existe la respuesta debe ser menor a 20% de la respuesta del Límite de Cuantificación.	N/A
<b>Linealidad del sistema</b>	$R^2 \geq 0.98$ $IC_b$ debe contener el cero. $CV < 15\%$	La distribución de los residuales debe ser aleatoria. $CV < 15\%$ y si es el Límite de Cuantificación $< 20\%$ .	Exista una respuesta lineal
<b>Linealidad del Método</b>	Los datos de concentración recuperada deben estar dentro del 15%	La distribución de los residuales es aleatoria.	Que exista una respuesta lineal en el rango de concentraciones a trabajar.

	de la concentración nominal y para el LQ debe estar dentro del 20%.	CV < 15% y si es el Límite de Cuantificación < 20	
<b>Exactitud</b>	El CV del valor promedio de la desviación de la concentración obtenida con respecto a la nominal no debe ser mayor que el 15% o para el LQ al 20%.	Concentración de analito < 1ng/mL - 50% a +20%. % Recobro 50% al 120%	Concentración de analito ≥ 1 ng/mL < 10 ng/mL de -40% a +20%
<b>Precisión</b>	El CV del valor promedio no debe ser mayor que el 15% o para el LC menor al 20%.  (NOM-177-2013)	Concentración de analito < 1ng/mL -50% a +20%.  (VICHGL49(R), 2015)	Concentración de analito ≥ 1 ng/mL < 10 ng/mL de -40% a +20%. (Codex Alimentarius, 2014)

- Nota: La guía en la que nos basamos para realizar los parámetros de validación fue la VICH GL 49.

De acuerdo a la AOAC, (Programas de Validación de Métodos (Departamento OMA / PVM), incluyendo el Apéndice D: Directrices para los Procedimientos de Estudio Colaborativo para Validar las Características de un Método de Análisis.

**Tabla 6. Porcentajes aceptables de % CV de acuerdo a la concentración del analito y la técnica utilizada "UPLC MS/MS".**

<b>Analito (%)</b>	<b>Unidad</b>	<b>OAAC (%CV)</b>
100	100%	1.3
10	10%	1.8
1	1%	2.7
0.1	0.1%	3.7
0.01	100 ppm	5.3
0.001	10 ppm	7.3
0.0001	1 ppm	11
0.00001	100 ppb	15
0.000001	10 ppb	21
0.0000001	1 ppb	30

## PLAN DE TRABAJO

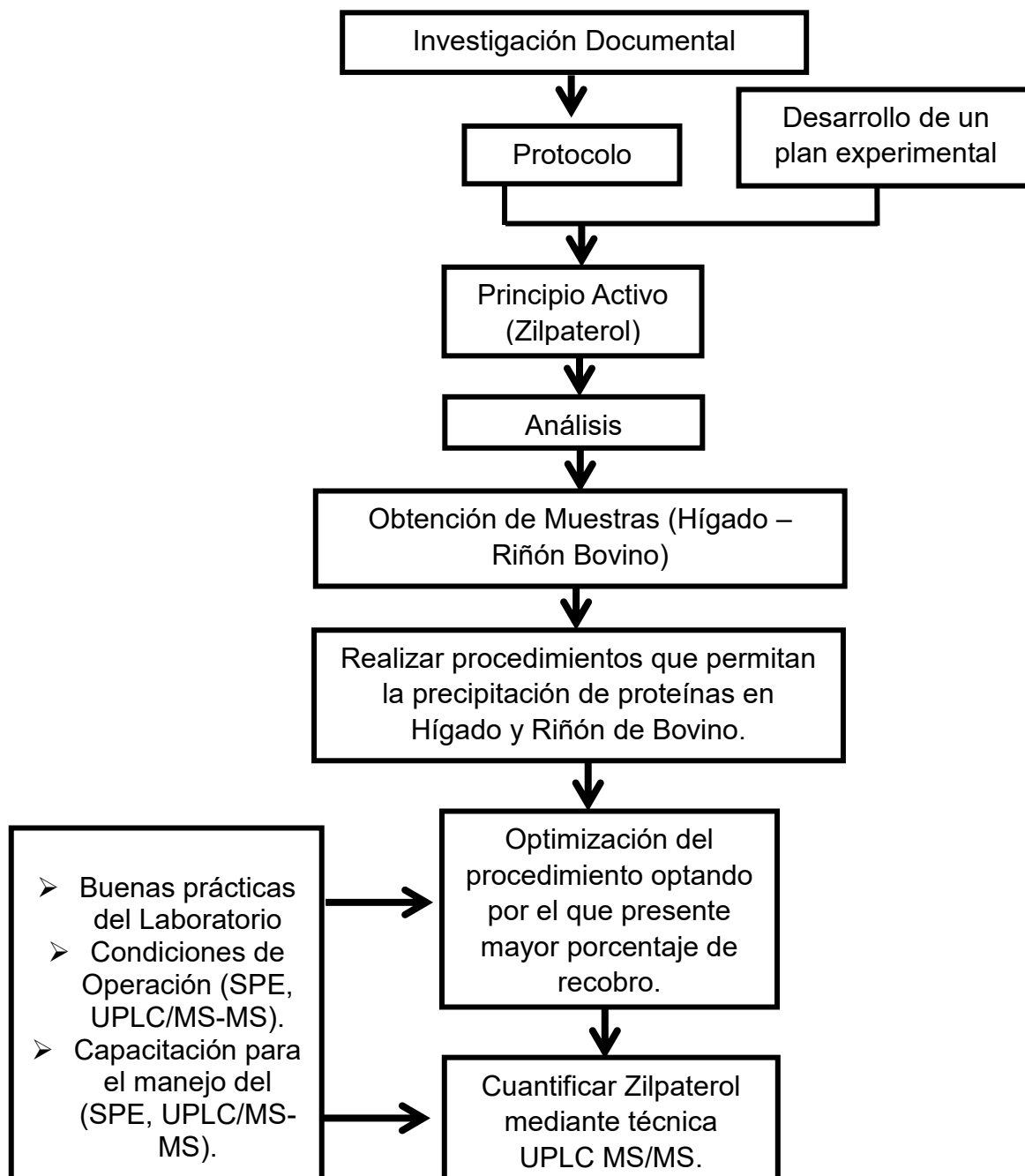


Figura 20. Plan de trabajo

## MATERIALES

**Tabla 7. Estándar Primario**

<b>Principio Activo</b>				
<b>Nombre</b>	<b>Grado</b>	<b>Ensayo</b>	<b>Lote</b>	<b>Condiciones de Almacenamiento.</b>
Clorhidrato de Zilpaterol	Sigma Aldrich	99%	SZBE174XV	Refrigeración

**Tabla 8. Reactivos**

<b>Solventes</b>	<b>Grado</b>	<b>Ensayo (%)</b>	<b>Marca</b>
Ácido Tricloroacético	Reactivo	99	J.T. Baker
Ácido Perclórico	Reactivo	69-72	J.T. Baker
Acetonitrilo	HPLC	99.98	J.T. Baker
Sulfato de Zinc	Reactivo	99.9	J.T. Baker
Hidróxido de Sodio	Reactivo	98.4	J.T. Baker
Hexano	Reactivo		
Metanol	HPLC	99.95	J.T. Baker
Ácido Fórmico	HPLC	88	J.T. Baker
Hidróxido de Amonio	Reactivo	28 -30	J.T. Baker
Agua Milli-Q	-----	-----	-----

**Tabla 9. Equipos e Instrumentos utilizados**

<b>Equipo</b>	<b>Marca</b>
Balanza Analítica	Mettler Toledo
Potenciómetro	Mettler Toledo
Agitador Vortex	Genie
UPLC Acquity MS-MS XEVO TQ	Waters



Positive Pressure 96 (SPE)	Waters
Ultracentrífuga	Beckman Coulter

**Tabla 10. Materiales**

<b>Material</b>	<b>Especificaciones</b>	<b>Marca</b>
Micropipetas	100-1000µL, 1-5mL, 5-50µL	Finnpipette
Vasos de precipitados	50, 100, 250, 500mL	Kimax
Matraces volumétricos	10, 25, 50, 100, 200mL	Blau Brand
Probetas	25, 100mL	Blau Brand
Piseta	-----	-----
Microtubos	2,5mL	Eppendorf
Columna	ACQUITY UPLC® C18 1.7 µm de 2.1 x 50 mm	Waters®
Cartuchos MCX	Oasis MCX µElution Plate 30µm	Waters®
Barra Magnética	-----	-----
Molinox	-----	T-fal
Sonicador	S 40 H	Elmasonic

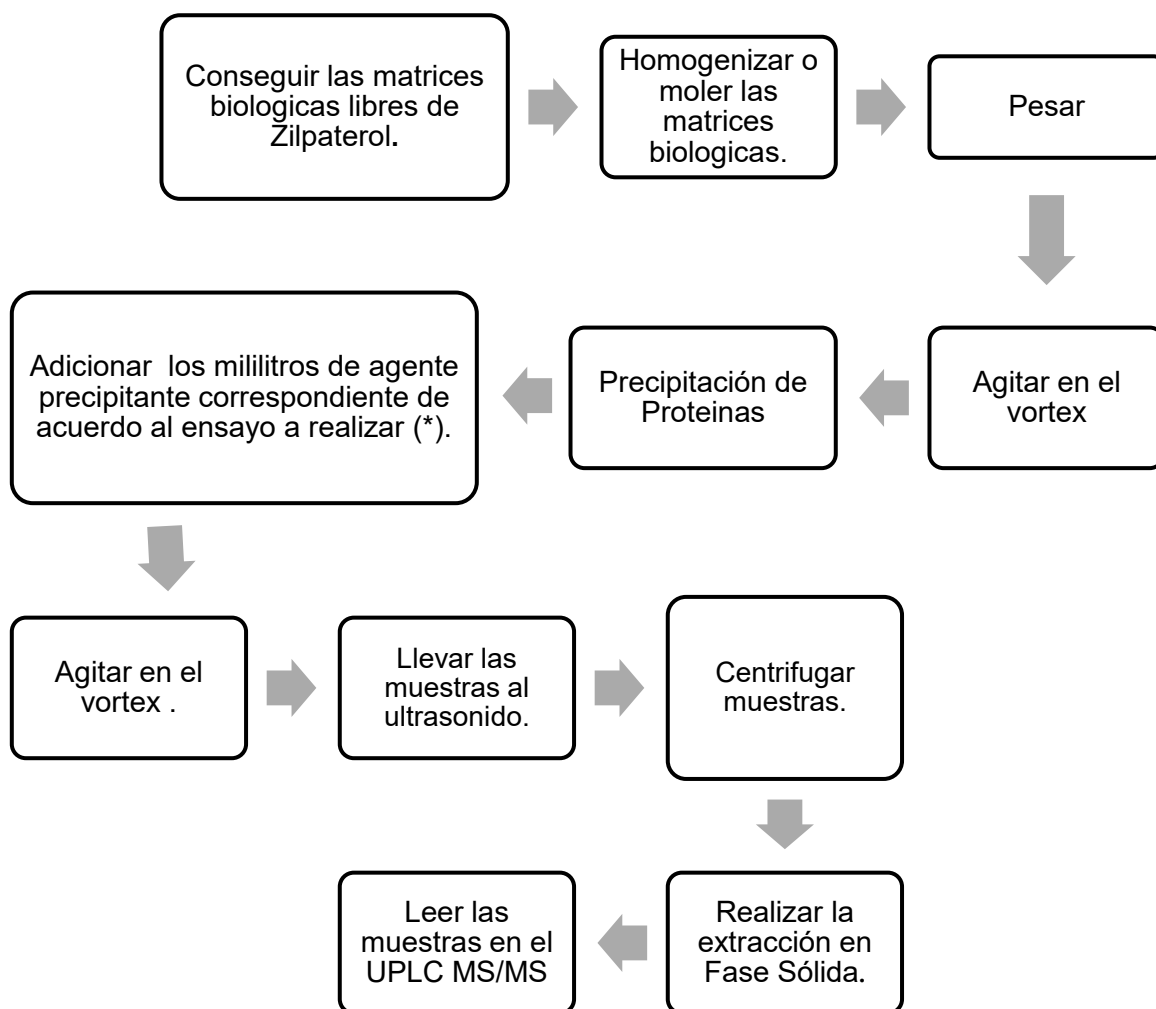
**Tabla 11. Muestras Biológicas**

<b>Hígado Bovino</b>
<b>Riñón Bovino</b>

Las muestras biológicas de hígado y riñón, utilizadas para la optimización del método fueron compradas en supermercados y mercados de Cuautitlán Izcalli.

## PLAN EXPERIMENTAL GENERAL

---



(\*) El volumen a adicionar depende del agente precipitante y el peso de la muestra a analizar.

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Se espera evaluar cada condición de operación.

**Tabla 12. Variables a estudiar para la optimización del método.**

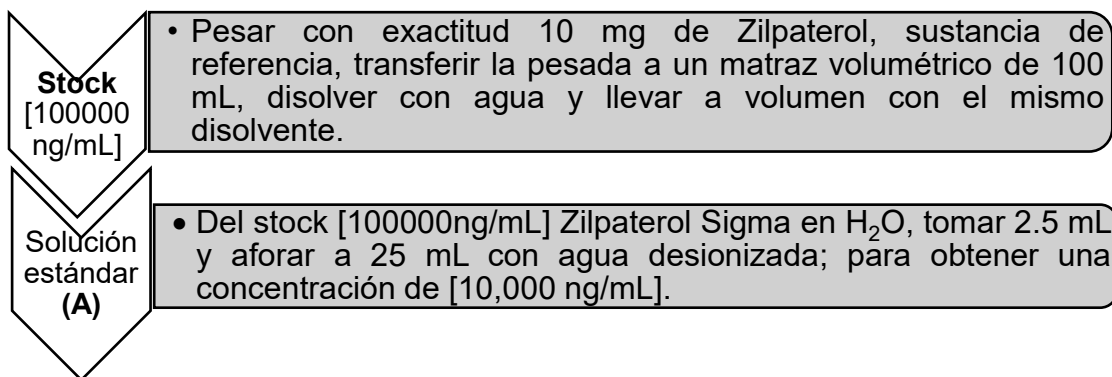
<b>Precipitación de proteínas</b>	Agente Precipitante	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Acetonitrilo</li> <li>• Ácido Tricloroacético 10%</li> <li>• Sulfato de Zinc</li> <li>• Hidróxido de Zinc 10%,20% y 7.5%</li> <li>• Sobrenadante de Hidróxido de Zinc 10%</li> <li>• Acido perclórico.</li> <li>• Ácido fórmico</li> </ul>
<b>Filtración de muestras</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sin filtración</li> <li>• Con filtración</li> </ul>
<b>Variación en la homogenización</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ultrasonido</li> <li>• VORTEX</li> </ul>
<b>Temperatura en el Ultrasonido</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Temperatura Ambiente</li> <li>• A 80 °C</li> </ul>
<b>Extracción en Fase Móvil</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tiempo de Elución</li> <li>• Porcentaje de la Fase de Elución.</li> </ul>

## DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 1.1 Preparación de las muestras biológicas (Hígado y Riñón Bovino).

Se utilizaron 6 muestras de hígado y 6 de riñón bovino cada muestra se molió con ayuda de un molinex por separado, hasta su homogeneización completa, se transfirieron a bolsas ziplock previamente etiquetadas y se almacenaron en refrigeración a -20°C.

### 1.2 Preparación de Soluciones.



De la solución A tomar los microlitros correspondientes de acuerdo a la tabla 13:

**Tabla 13. Preparación de estándares de Zilpaterol**

Stock A	Aforo / Milli Q	Concentración[ng/mL]	Estándares
0.2 mL	25mL	80	Estándar 1
0.4 mL	25mL	160	Estándar 2
0.6 mL	25mL	240	Estándar 3
0.8 mL	25mL	320	Estándar 4
1 mL	25mL	400	Estándar 5

Estos estándares de utilizaron para realizar la linealidad del sistema.

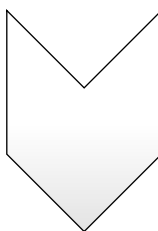
**Procedimiento para evaluar estándares sometidos a diferentes temperaturas en el baño ultrasónico.**

1. Etiquetar 6 microtubos de la siguiente manera:

25°C	80°C
STD 1	STD 4
STD 2	STD 5
STD 3	STD 6

2. Tomar una alícuota de 0.2 mL del estándar 2 (observar tabla 13), transferir al microtubo correspondiente de 2 mL y llevar a volumen con 1.9 mL de mezcla Metanol/NH<sub>4</sub>OH 5%. La concentración obtenida es de 16 ng/mL.
3. Agitar los 6 microtubos en el vortex durante 1 minuto.
4. Los microtubos con la leyenda (STD 1, STD 2, STD 3) se llevaron al ultrasonido durante 30 min a una temperatura de 25°C. Los microtubos con la leyenda (STD 4, STD 5, STD 6) se llevaron al ultrasonido durante 30 min a una temperatura de 80°C.
5. Leer las muestras en el UPLC MS/MS.

**Procedimiento para evaluar la variación en la homogenización de estándares directos a una concentración de 8ng/mL.**



• **Preparación del estándar Directo de Zilpaterol 8 ng/mL.**  
Tomar una alícuota de 0.1 mL del estándar 2 (observar tabla 13), transferir a un microtubo de 2 mL y llevar a volumen con 1.9 mL de mezcla Metanol/NH<sub>4</sub>OH 5% (50:50).

1. Etiquetar 6 microtubos de la siguiente manera:  
Microtubo 1,2,3 (STD\_ZL\_Ultrasonido 30 min).  
Microtubo 4,5,6 (STD\_ZL\_Vortex 5 min).
2. Realizar la preparación de cada estándar directo a una concentración de 8ng/mL.
3. Agitar los 6 microtubos en el vortex durante 1 minuto.

4. Los microtubos con la leyenda (STD\_ZL\_Ultrasonido 30 min.) se llevaron al ultrasonido durante 30 min a una temperatura de 25°C. Mientras que los microtubos con la leyenda (STD\_ZL\_Vortex 5 min) se agitaron durante 5 minutos más en el vortex a una velocidad constante.
5. Leer las muestras en el UPLC MS/MS.

**Procedimiento para evaluar la técnica de precipitación de proteínas utilizando diferentes agentes precipitantes.**

1. Moler la muestra utilizando un Molinex.
2. Pesar 0.25 g de hígado en cada microtubo previamente etiquetado. Adicionar 100 µL de estándar 1 (observar tabla 13).
3. Agitar en el vortex durante 30 segundos.
4. Adicionar 1.75 mL del agente precipitante correspondiente:
  - Acetonitrilo
  - Ácido tricloroacético 10%
  - Sulfato de Zinc
  - Hidróxido de Zinc 10%,20% y 7.5%
  - Sobrenadante de Hidróxido de Zinc 10%
  - Acido perclórico
  - Ácido fórmico
5. Agitar en el vortex durante 1 minuto.
6. Llevar las muestras al ultrasonido por 30min. Dejar enfriar las muestras.
7. Centrifugar muestras por 15 min. a 14000 rpm a 4 °C.
8. Extracción en Fase Sólida.
  - Acondicionar con 500 µL Metanol durante 1 min. A 15 psi
  - Acondicionar con 500 µL H<sub>2</sub>O desionizada durante 1min. A 15 psi.
  - Lavar con 500 µL de Ácido Fórmico 0.5%, durante 1 min. A 15 psi
  - Cargar con 500 µL de la muestra correspondiente, durante 2 min. A 20 psi.
  - Lavar con 500 µL de Metanol, durante 1 min. A 15 psi.
  - Eluir con 500 µL de Mezcla 50:50 de Metanol/NH<sub>4</sub>OH 5%. Durante 1 min. A 20 psi.
9. Leer las muestras en el UPLC MS/MS.

**Procedimiento para evaluar la técnica de filtración sobre las muestras de hígado.**

1. Etiquetar 6 microtubos de la siguiente manera:

Microtubo 1,2,3 (H\_M\_Filtradas).

Microtubo 4,5,6 (H\_Sin Filtrar).

2. Pesar 0.25 g de hígado en cada microtubo previamente etiquetado. Adicionar 100  $\mu$ L de estándar 1 (observar tabla 13).
3. Agitar en el vortex durante 30 segundos.
4. Adicionar 1.75 mL del agente precipitante (Ácido tricloroacético 10%).
5. Agitar en el vortex durante 1 minuto.
6. Llevar las muestras al ultrasonido por 30min. Dejar enfriar las muestras.
7. Centrifugar muestras por 15 min. a 14000 rpm a 4 °C.
8. Pasar a través de un filtro de nylon de 0.45 $\mu$ m los sobrenadantes de los microtubos etiquetados con la leyenda (H\_M\_Filtradas).
9. Realizar la Extracción en Fase Sólida a las 6 muestras.
  - Acondicionar con 500  $\mu$ L Metanol durante 1 min. A 15 psi
  - Acondicionar con 500  $\mu$ L H<sub>2</sub>O desionizada durante 1min. A 15 psi.
  - Cargar con 500  $\mu$ L de la muestra correspondiente, durante 2 min. A 20 psi.
  - Lavar con 500  $\mu$ L de Ácido Fórmico 0.5%, durante 1 min. A 15 psi
  - Lavar con 500  $\mu$ L de Metanol, durante 1 min. A 15 psi.
  - Eluir con 500  $\mu$ L de Mezcla 50:50 de Metanol/NH<sub>4</sub>OH 5%. Durante 1 min. A 20 psi.
10. Leer las muestras en el UPLC MS/MS.

**\*Nota:** Este procedimiento se realizó con el fin de limpiar la muestra de moléculas que pudieran interferir en la extracción en fase sólida y causar una deficiente cuantificación.

**Procedimiento para evaluar los tiempos de elución en el proceso de extracción en fase sólida, utilizando una mezcla 50:50 de (Metanol/NH<sub>4</sub>OH 5%) y Zn(OH)<sub>2</sub> 10%.**

1. Etiquetar 12 microtubos de la siguiente manera:  
Microtubo 1,2,3 (R\_3min\_ELU). Microtubo 4,5,6 (R\_1min\_ELU).  
Microtubo 4,5,6 (H\_3min\_ELU). Microtubo 10,11,12 (H\_1min\_ELU).
2. Pesar 0.25 g de hígado o riñón en cada microtubo previamente etiquetado. Adicionar 100  $\mu$ L de estándar 1 (observar tabla 13).
3. Agitar en el vortex durante 30 segundos.
4. Adicionar 1.75 mL del agente precipitante (Zn(OH)<sub>2</sub> 10%).
5. Agitar en el vortex durante 1 minuto.
6. Llevar las muestras al ultrasonido por 30min. Dejar enfriar las muestras.

7. Centrifugar muestras por 15 min. a 14000 rpm a 4 °C.
8. Realizar la Extracción en Fase Sólida a las 12 muestras.
  - Acondicionar con 500 µL Metanol durante 1 min. A 15 psi
  - Acondicionar con 500 µL H<sub>2</sub>O desionizada durante 1min. A 15 psi.
  - Cargar con 500 µL de la muestra correspondiente, durante 2 min. A 20 psi.
  - Lavar con 500 µL de Ácido Fórmico 0.5%, durante 1 min. A 15 psi
  - Lavar con 500 µL de Metanol, durante 1 min. A 15 psi.
  - Eluir con 500 µL de Mezcla 50:50 de Metanol/NH<sub>4</sub>OH 5%. Durante 1 min. A 20 psi. Los microtubos etiquetados con la leyenda (R\_1min\_ELU) y(H\_1min\_ELU) y durante 3 min a 20 psi Los microtubos etiquetados con la leyenda (R\_3min\_ELU) y(H\_3min\_ELU).
9. Leer las muestras en el UPLC MS/MS.

**Procedimiento para preparar el estándar directo y el estándar expuesto a SPE de Zilpaterol a una concentración de [4 ng/mL].**

**Preparación del estándar Directo de Zilpaterol 4 ng/mL.**

- Tomar una alícuota de 0.1 mL del estándar 1 (observar tabla 13), transferir a un microtubo de 2 mL y llevar a volumen con 1.9 mL de mezcla de Metanol/NH<sub>4</sub>OH 5% a la proporción correspondiente (70:30,20:80,65:35, 80:20, 50:50).

**Preparación del estándar expuesto a SPE de Zilpaterol 4 ng/mL.**

- Tomar una alícuota de 0.1 mL del estándar 1 (observar tabla 13), transferir a un microtubo de 2 mL y llevar a volumen con 1.9 mL de mezcla Metanol/NH<sub>4</sub>OH 5%.
- Realizar la extracción en fase sólida:
- Acondicionar con 500 µL Metanol durante 1 min. A 15 psi.
- Acondicionar con 500 µL H<sub>2</sub>O desionizada durante 1min. A 15 psi.
- Lavar con 500 µL de Ácido Fórmico 0.5%, durante 1 min. A 15 psi.
- Lavar con 500 µL de Metanol, durante 1 min. A 15 psi.
- Eluir con 500 µL de Mezcla de Metanol/NH<sub>4</sub>OH 5% a la proporción correspondiente (70:30,20:80,65:35, 80:20, 50:50). Durante 3 min. A 20 psi.



**Procedimiento para preparar el estándar directo y el estándar expuesto a SPE de Zilpaterol a una concentración de 8ng/mL.**

**Preparación del estándar Directo de Zilpaterol 8 ng/mL.**

- Tomar una alícuota de 0.1 mL del estándar 2 (observar tabla 13), transferir a un microtubo de 2 mL y llevar a volumen con 1.9 mL de mezcla de Metanol/NH<sub>4</sub>OH 5% a la proporción correspondiente (70:30,20:80,65:35, 80:20, 50:50).

**Preparación del estándar expuesto a SPE de Zilpaterol 8 ng/mL.**

- Tomar una alícuota de 0.1 mL del estándar 2 (observar tabla 13), transferir a un microtubo de 2 mL y llevar a volumen con 1.9 mL de mezcla Metanol/NH<sub>4</sub>OH 5%.
- Realizar la extracción en fase sólida:
- Acondicionar con 500 µL Metanol durante 1 min. A 15 psi.
- Acondicionar con 500 µL H<sub>2</sub>O desionizada durante 1min. A 15 psi.
- Lavar con 500 µL de Ácido Fórmico 0.5%, durante 1 min. A 15 psi.
- Lavar con 500 µL de Metanol, durante 1 min. A 15 psi.
- Eluir con 500 µL de Mezcla de Metanol/NH<sub>4</sub>OH 5% a la proporción correspondiente (70:30,20:80,65:35, 80:20, 50:50). Durante 3 min. A 20 psi.

**Procedimiento para evaluar la modificación en la proporción de la mezcla de elución (Metanol/NH<sub>4</sub>OH) en la extracción en fase sólida.**

1. Realizar la preparación de los estándares directos y expuestos a SPE a una concentración de 4ng/mL y 8 ng/mL.

Preparación de las muestras de Hígado y Riñón.

2. Etiquetar 10 microtubos de la siguiente manera:

**Tabla 14. Etiquetado de las muestras para evaluar la proporción de la mezcla de elución.**

		Proporción de la mezcla de elución (Metanol/NH <sub>4</sub> OH 5%)				
		70:30	80:20	65:35	50:50	20:80
# microtubo	Hígado	1	2	3	4	5
	Riñón	6	7	8	9	10

3. Pesar 0.25 g de hígado o riñón en cada microtubo previamente etiquetado. Adicionar 100 µL de estándar 1 o 2 según sea el caso (observar tabla 13).
4. Agitar en el vortex durante 30 segundos.
5. Adicionar 1.75 mL del agente precipitante (Zn(OH)<sub>2</sub> 10%).
6. Agitar en el vortex durante 1 minuto.
7. Llevar las muestras al ultrasonido por 30min a temperatura ambiente. Dejar enfriar las muestras.
8. Centrifugar muestras por 15 min. a 14000 rpm a 4 °C.
9. Realizar la Extracción en Fase Sólida a las muestras.
10. Acondicionar con 500 µL Metanol durante 1 min. A 15 psi
11. Acondicionar con 500 µL H<sub>2</sub>O desionizada durante 1min. A 15 psi.
12. Lavar con 500 µL de Ácido Fórmico 0.5%, durante 1 min. A 15 psi
13. Lavar con 500 µL de Metanol, durante 1 min. A 15 psi.
14. Eluir con 500 µL de la Mezcla (Metanol/NH<sub>4</sub>OH 5%). Durante 1 min. A 20 psi.  
Nota: La elución debe ser realizada de acuerdo a la tabla 14.
15. Leer las muestras en el UPLC MS/MS.

### Condiciones de detección UPLC MS/MS.

#### Preparación de la Fase Móvil

- Solución de Ácido Fórmico 0.2% / Metanol (95:5)

En un matraz volumétrico de 500 mL adicionar 200 mL de agua desionizada, agregar 1.15 mL de ácido fórmico al 95% adicionar agua hasta la marca de aforo y mezclar. Trasvasar 25 mL de esta solución a una probeta y volver a llevar a la marca de aforo del matraz de 500 mL con Metanol.

**Tabla 15. Composición de la Fase Móvil**

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	% A AFO O.2- Metanol 95:5	% B (Metanol)
Inicial	0.35	95	5
2		50	50
3		10	90
3.5		10	90
5		95	5
7		95	5

Tiempo de corrida: 7 minutos

Tipo de columna: ACQUITY UPLC® C18 1.7 µm de 2.1 x 50 mm

Temperatura de Columna: 30°C

**Tabla 16. Condiciones de detección del Zilpaterol en MS/MS**

Compuesto	Ion padre (m/z)	Hija (m/z)	Voltaje Cono (v)	Energía Colisión (v)	Modo de Ionización
Zilpaterol	262.20	244.20	21	13	ESI +

## RESULTADOS

**Tabla 17. Estándares sometidos a diferentes temperaturas en el baño ultrasónico.**

<b>STD_T 25°C [16ng/mL]</b>		<b>STD_T 80°C [16ng/mL]</b>	
STD 1	147166	STD 4	191759
STD 2	128599	STD 5	112926
STD 3	156193	STD 6	165262
<b>Promedio</b>	143986		156649
<b>s</b>	14069.17		40116.06
<b>%CV</b>	9.77		25.60

**Tabla 18. Variación en la homogenización de estándares.**

	<b>Promedio</b>	<b>%CV</b>	<b>%Recobro</b>
<b>STD_DIRECTO_[8ng/mL]</b>	73672	1.58	100
<b>STD_ZL_ULTRASONIDO 30min.</b>	52706	2.51	71.5414
<b>STD_ZL_VORTEX 5min.</b>	48746.3	8.92	66.1667

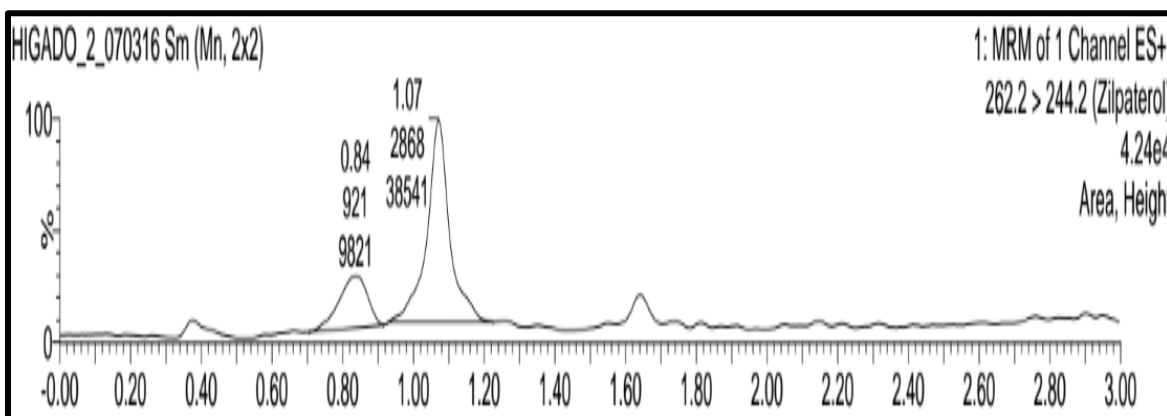
**Nota:** los estándares fueron preparados de acuerdo al numeral 1.2 del desarrollo experimental y la tabla 13.

**Tabla 19. Agentes precipitantes a utilizar para evaluar la técnica "precipitación de proteínas".**

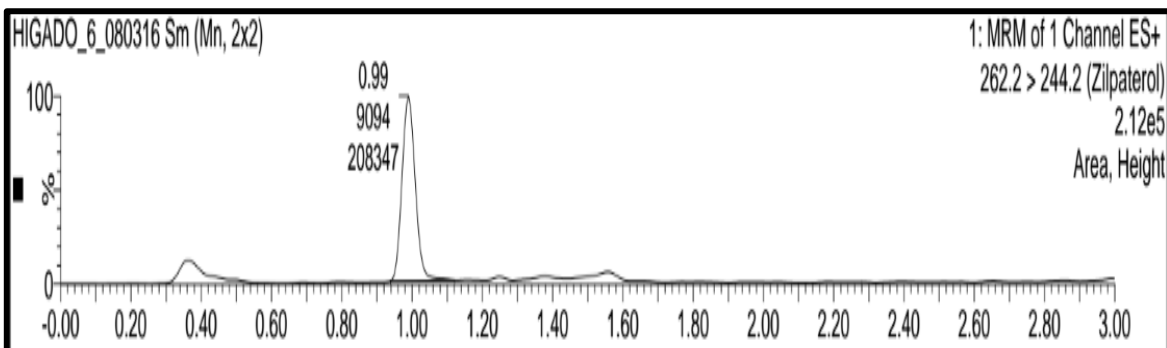
<p><b>Agente precipitante</b></p>	<p>Volumen de agente precipitante (1.75 mL)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Acetonitrilo</li> <li>• Ácido tricloroacético 10%</li> <li>• Sulfato de Zinc</li> <li>• Hidróxido de Zinc 10%,20% y 7.5%</li> <li>• Sobrenadante de Hidróxido de Zinc 10%</li> <li>• Acido perclórico.</li> <li>• Ácido fórmico</li> </ul>
-----------------------------------	---	---

**NOTA:** No se obtuvieron cromatogramas al utilizar Ácido perclórico como agente precipitante ya que al momento de llevar las muestras al ultrasonido estas se derramaban por la producción de gases que se generaban dentro del tubo.

❖ **Cromatogramas de los diferentes Agentes Precipitantes utilizados para la precipitación de proteínas.**



**Figura 21. Cromatograma de Zilpaterol [2ng/mL], precipitando proteínas con Acetonitrilo.**



**Figura 22. Cromatograma de Zilpaterol [2ng/mL], precipitando proteínas con Ácido Tricloroacético 10%.**

La tabla 18 muestra la influencia de la técnica de filtración mediante la utilización de acrodiscos 0.45  $\mu\text{m}$  de nylon y utilizando ácido tricloroacético al 10% como agente precipitante.

**Tabla 20. Sobrenadante de Muestras de Hígado filtradas con acrodiscos 0.45 $\mu\text{m}$  de Nylon y precipitando proteínas con Ácido Tricloroacético 10%.**

Muestras sin filtrar	Áreas	Muestras Filtradas	Áreas
Hígado 1	17195	Hígado 4	12572
Hígado 2	19184	Hígado 7	14789
Hígado 3	18178	Hígado 6	15244
<b>Promedio</b>	18185.67	<b>Promedio</b>	14201.67
<b>s</b>	994.52	<b>s</b>	1429.55
<b>% CV</b>	5.47	<b>% CV</b>	10.07
<b>%Recobro</b>	40.31	<b>%Recobro</b>	31.48

**Tabla 21. Recobros de Zilpaterol usando diferentes agentes precipitantes.**

	Respuesta (Área)	% Recobro Zilpaterol
<b>STD [4ng/mL]</b>	42114	100%
<b>Sobrenadante_Zn(OH)<sub>2</sub></b>	18613	44.20
<b>Mezcla (Sobrenadante Zn(OH)<sub>2</sub> 10%+AFO 5%)</b>	8051	19.12
<b>ZL_ZnOH<sub>2</sub> (10%)</b>	24006	57.00
<b>ZL_ZnSO<sub>4</sub></b>	14448	27.72

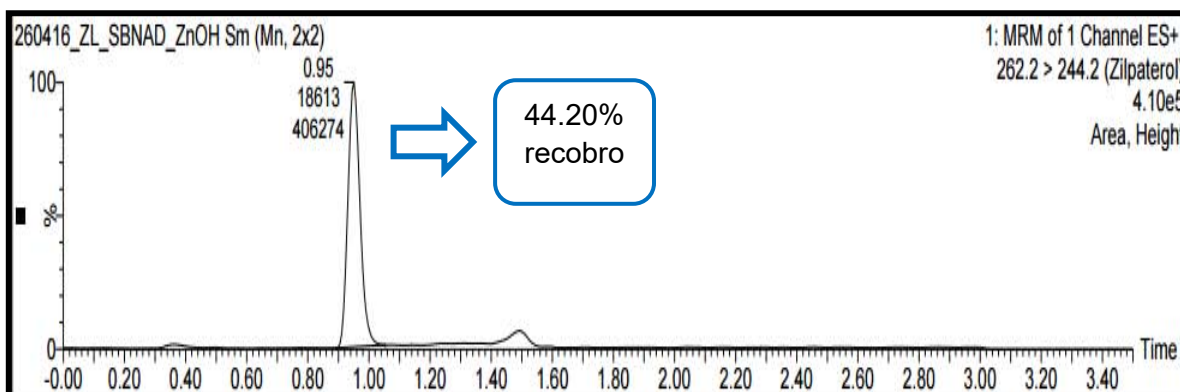


Figura 23. Cromatograma de Zilpaterol, precipitando proteínas con  $Zn(OH)_2$ .10%.

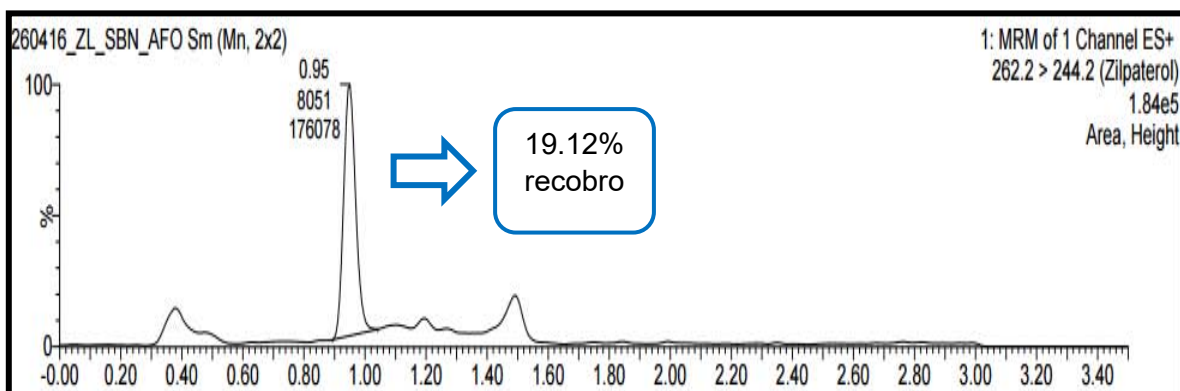


Figura 24. Cromatograma de Zilpaterol, precipitando proteínas con una mezcla (sobrenadante  $Zn(OH)_2$ .10%+ AFO 5%).

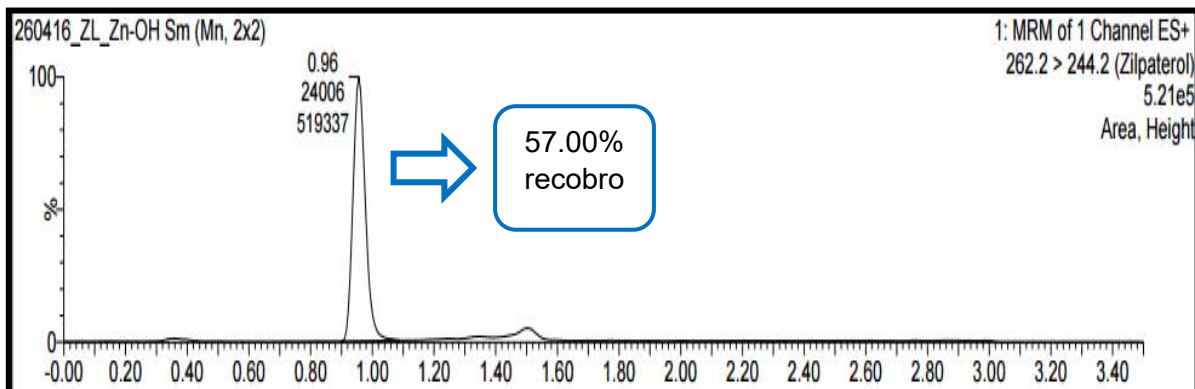
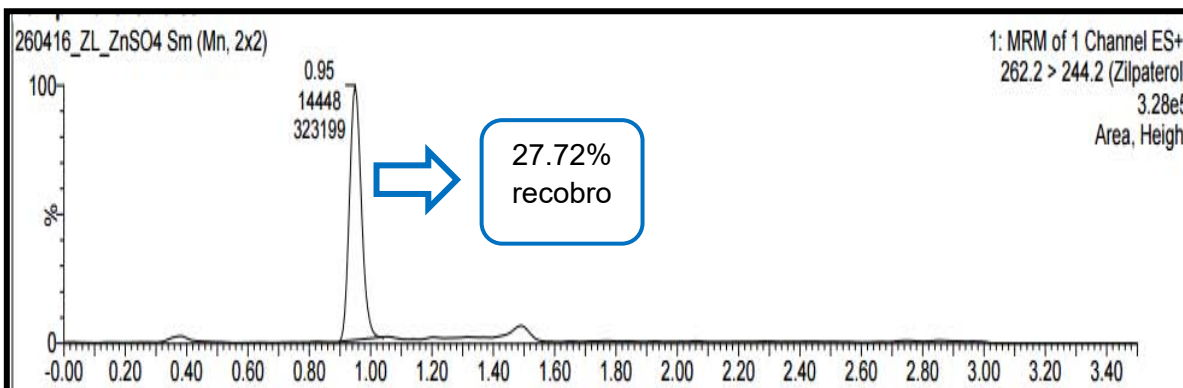


Figura 25. Cromatograma de Zilpaterol, precipitando proteínas con  $Zn(OH)_2$  10%.



**Figura 26. Cromatograma de Zilpaterol, precipitando proteínas con ZnSO<sub>4</sub>. 10%.**

**Tabla 22. Recobros de Zilpaterol utilizando diferentes concentraciones de Zn(OH)<sub>2</sub> (7.5, 10 y 20%), como agente precipitante.**

Muestra	Promedio n=3	%Recobro
STD [4ng/mL]	42114	
EXP_MEZCLA A_ Zn(OH) <sub>2</sub> al 20%	16615.33	39.45
EXP_MEZCLA B_ Zn(OH) <sub>2</sub> al 7.5%	12597.33	29.91
EXP_MEZCLA D_ Zn(OH) <sub>2</sub> al 10%	24016.33	58.03

**Tabla 23. Recobros de Zilpaterol modificando los tiempos de elución en el proceso de extracción en fase sólida, utilizando una mezcla 50:50 (Metanol/NH<sub>4</sub>OH 5%).**

	Promedio	%Recobro	%CV
STD [4ng/mL]	40301.67	100	
Riñón_3min_ELU	29734.67	73.78	0.77
Riñón_1min_ELU	27309.33	67.76	2.10
Hígado_3min_ELU	24831.01	61.62	0.81
Hígado_1min_ELU	21787.33	54.06	3.84

**Tabla 24. Recobros de Zilpaterol modificando la proporción de la mezcla de elución utilizada en la Extracción en Fase Sólida para Hígado.**



	<b>%proporción en la mezcla de elución Metanol/NH<sub>4</sub>OH</b>	<b>Respuesta (Área)</b>	<b>%Recobro</b>
<b>STD Directo [8ng/mL]</b>	70:30	107198	
<b>STD SPE [8ng/mL]</b>	70:30	105375	
<b>Hígado</b>	70:30	97480	90.93
<b>STD Directo [4ng/mL]</b>	20:80	48613	
<b>STD SPE [4ng/mL]</b>	20:80	39471	
<b>Hígado</b>	20:80	32798	67.46
<b>STD Directo [4ng/mL]</b>	65:35	102445	
<b>STD SPE [4ng/mL]</b>	65:35	97895	
<b>Hígado</b>	65:35	58476	57.08
<b>STD Directo [4ng/mL]</b>	80:20	41102	
<b>STD SPE [4ng/mL]</b>	80:20	6103	
<b>Hígado</b>	80:20	5069	12.33
<b>STD Directo [4ng/mL]</b>	50:50	41419	
<b>STD SPE [4ng/mL]</b>	50:50	37768	
<b>Hígado</b>	50:50	21434	51.74

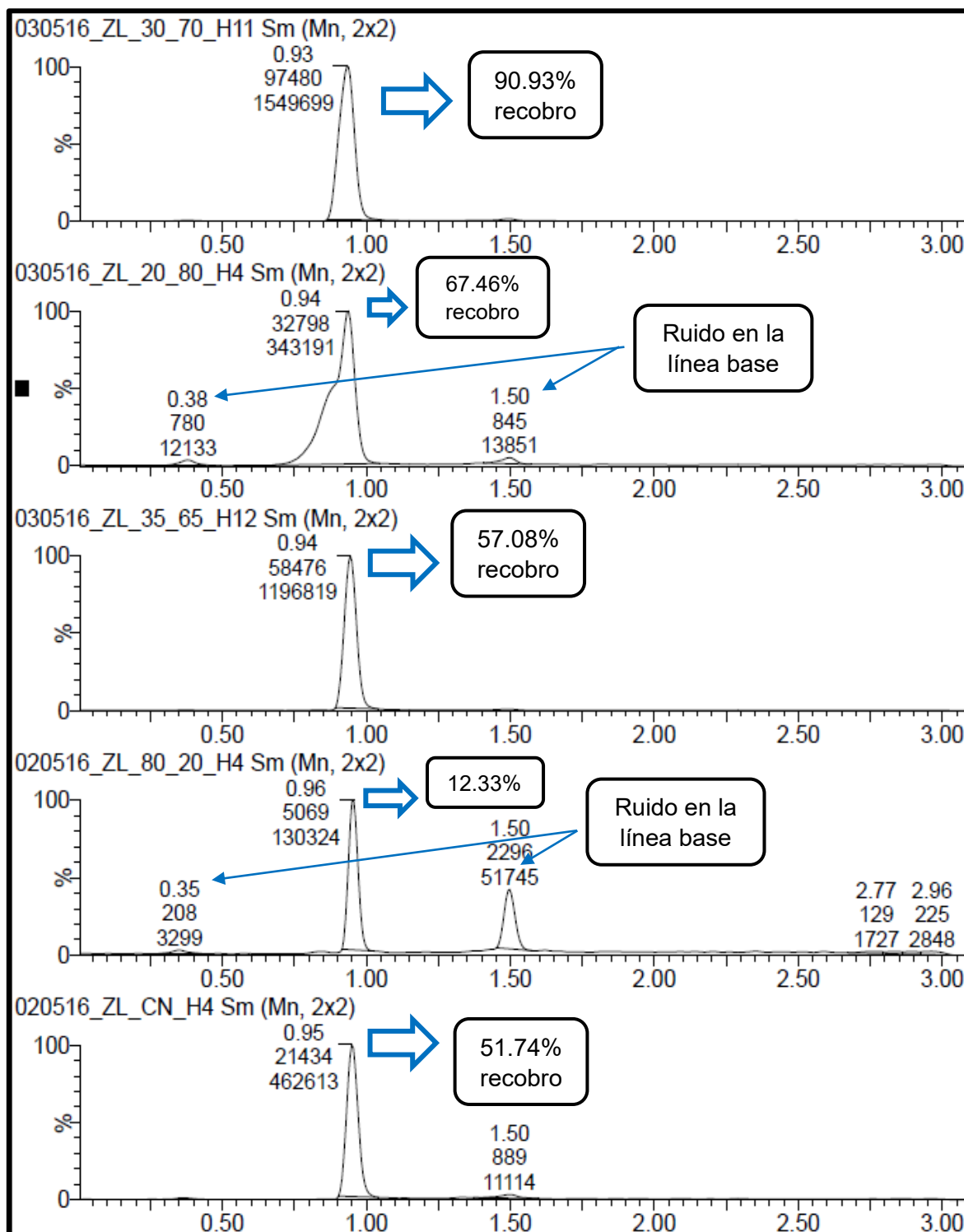


Figura 27. Cromatogramas de Zilpaterol modificando la proporción de la mezcla de elución utilizada en la Extracción en Fase Sólida para Hígado.

**Tabla 25. Recobros de Zilpaterol modificando la proporción de la mezcla de elución utilizada en la Extracción en Fase Sólida para Riñón.**

	<b>%proporción en la mezcla de elución Metanol/NH<sub>4</sub>OH</b>	<b>Respuesta (Área)</b>	<b>%Recobro</b>
<b>STD Directo [8ng/mL]</b>	70:30	107198	
<b>STD SPE [8ng/mL]</b>	70:30	105375	
<b>Riñón</b>	70:30	104084	97.09
<b>STD Directo [4ng/mL]</b>	20:80	48613	
<b>STD SPE [4ng/mL]</b>	20:80	39471	
<b>Riñón</b>	20:80	37924	67.72
<b>STD Directo [4ng/mL]</b>	65:35	102445	
<b>STD SPE [4ng/mL]</b>	65:35	97895	
<b>Riñón</b>	65:35	76584	74.76
<b>STD Directo [4ng/mL]</b>	80:20	41102	
<b>STD SPE [4ng/mL]</b>	80:20	6103	
<b>Riñón</b>	80:20	4769	11.60
<b>STD Directo [4ng/mL]</b>	50:50	41419	
<b>STD SPE [4ng/mL]</b>	50:50	37768	
<b>Riñón</b>	50:50	25284	61.04

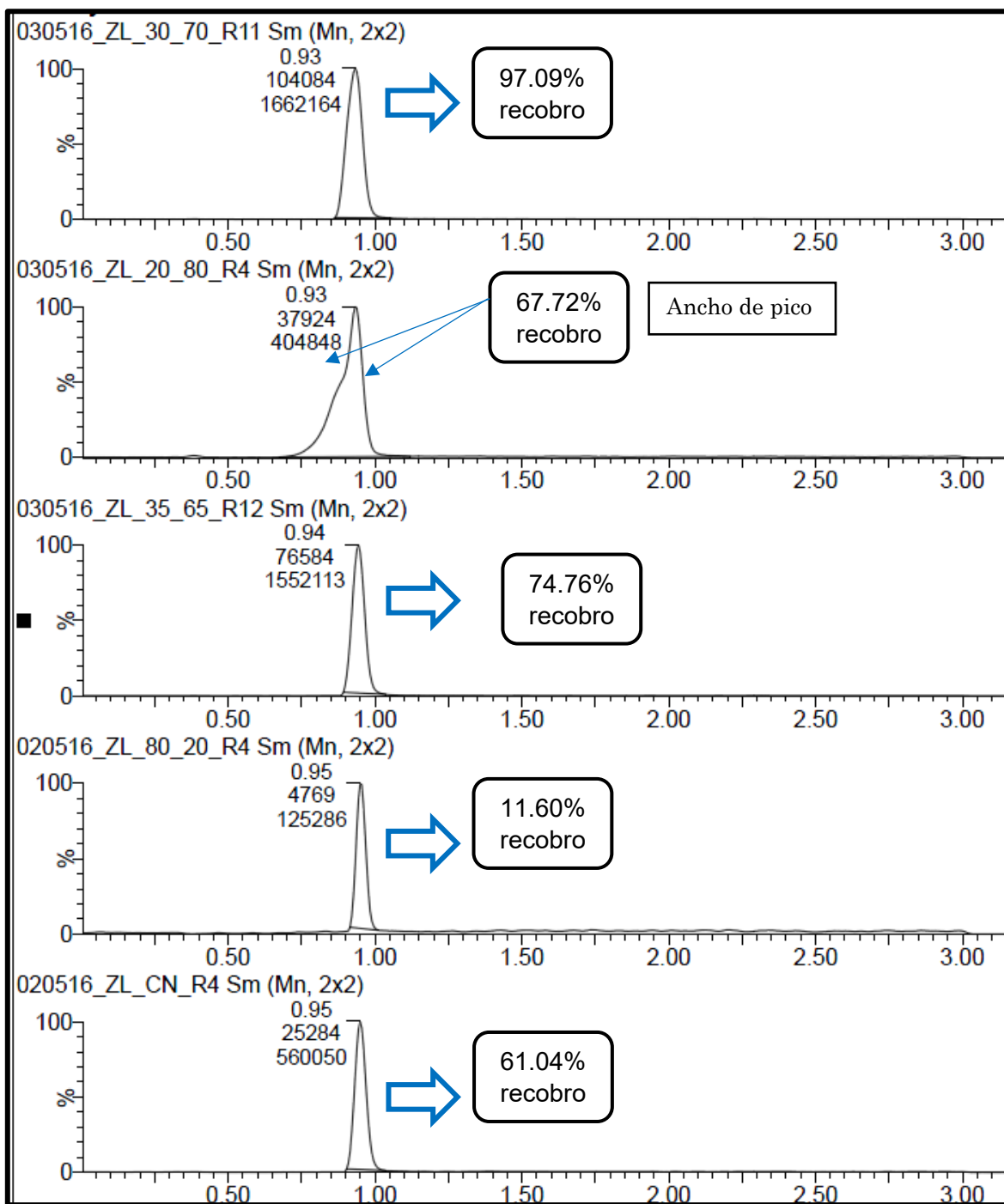
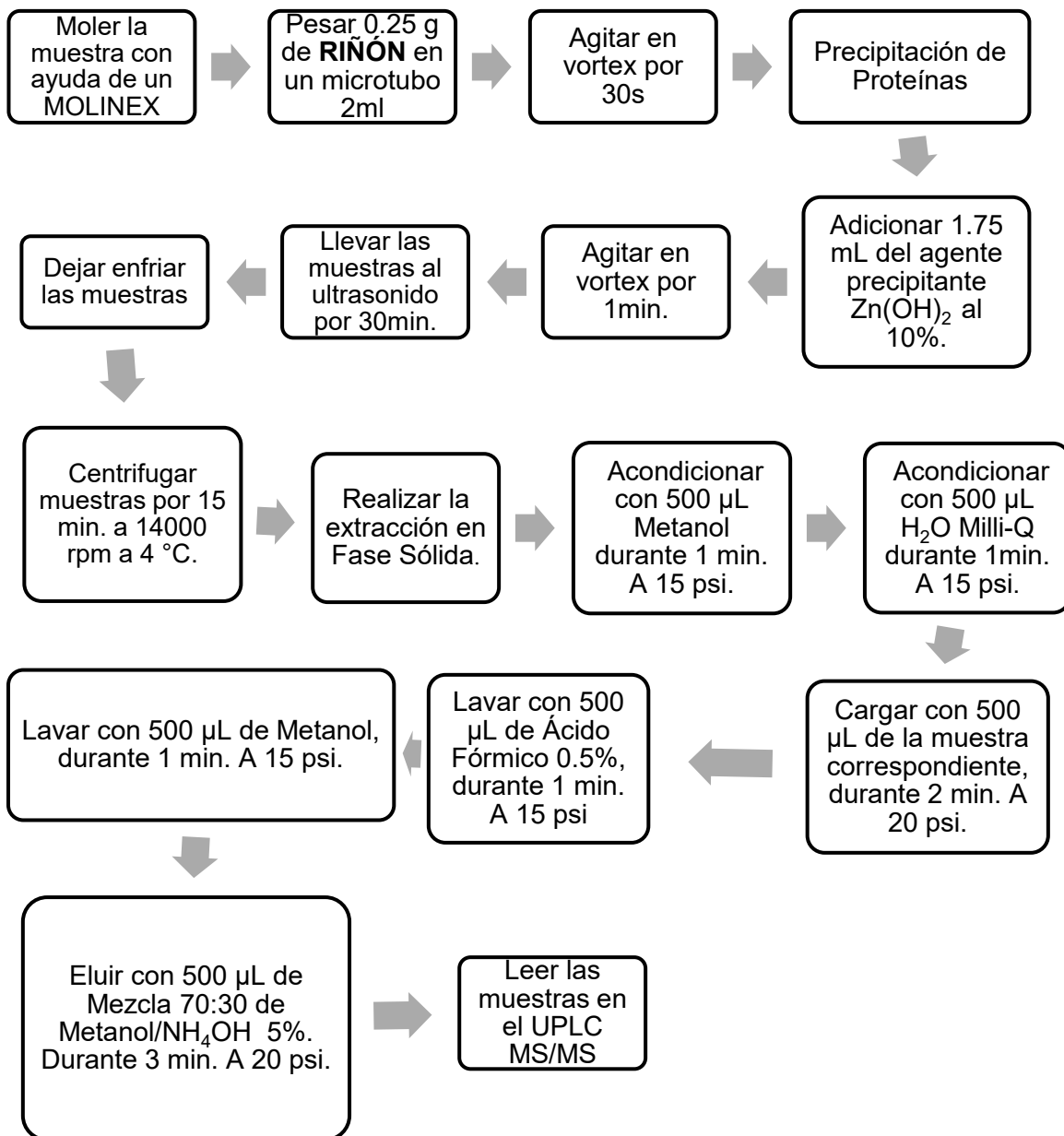
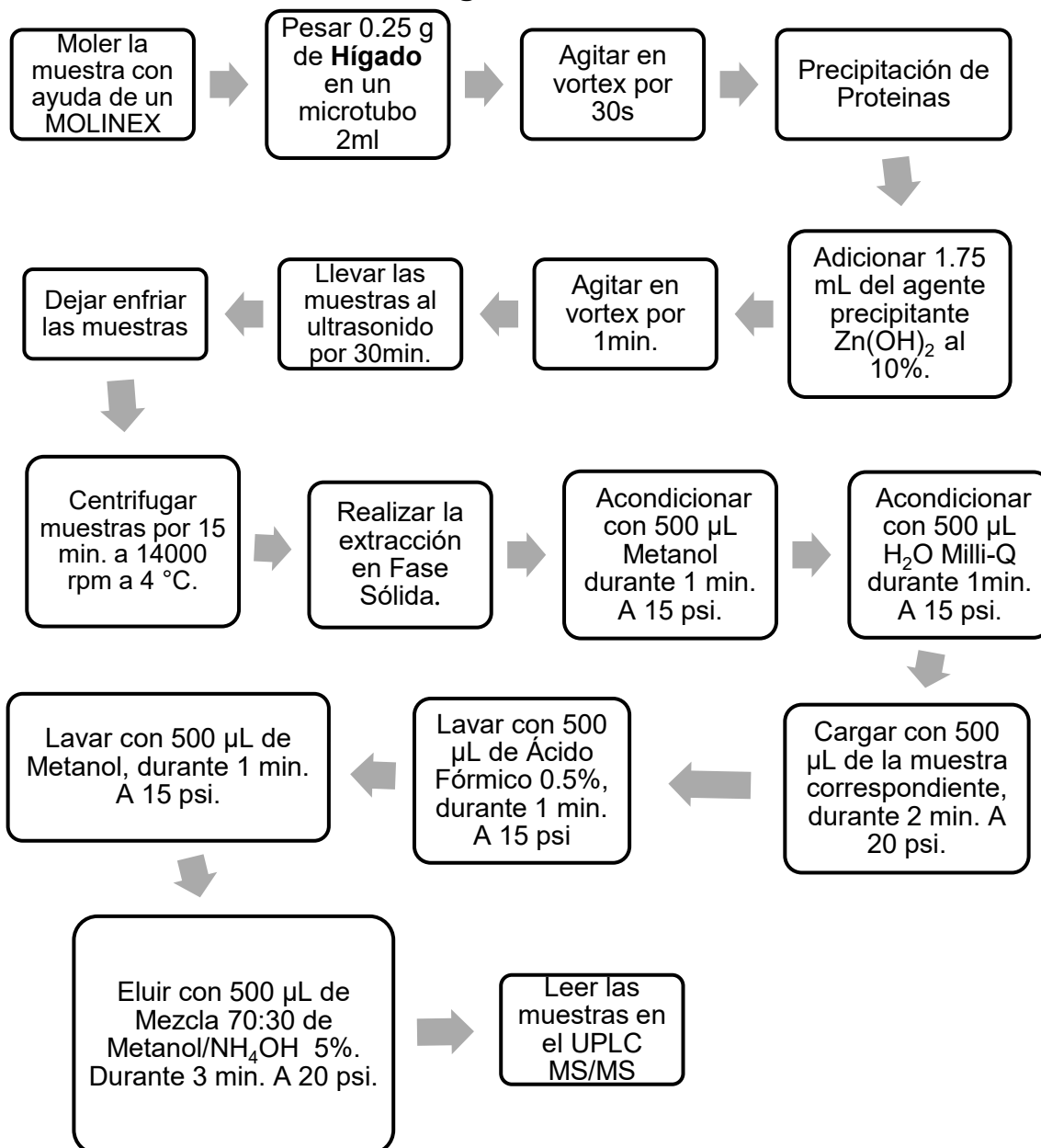


Figura 28. Cromatogramas de Zilpaterol modificando la proporción de la mezcla de elución utilizada en la Extracción en Fase Sólida para Riñón.

### Procedimiento experimental optimizado para el tratamiento de muestras de Riñón Bovino.



## Procedimiento experimental para el Tratamiento de muestras de Hígado Bovino



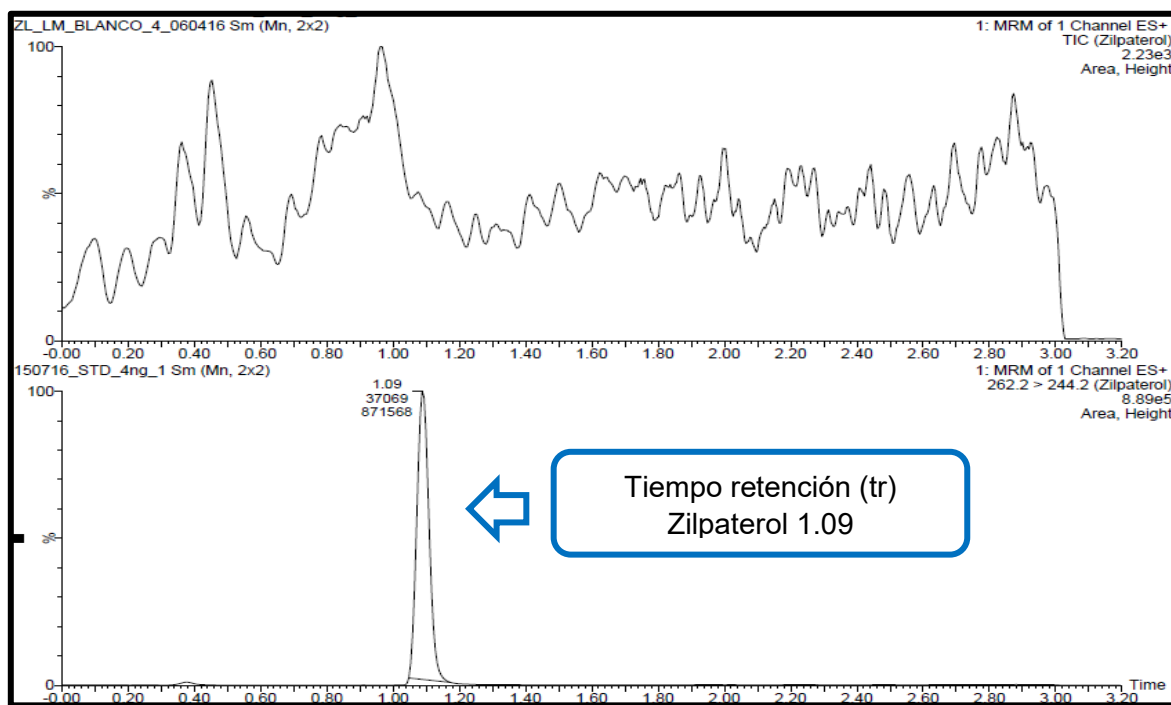
## Parámetros de desempeño evaluados del método bioanalítico.

### Selectividad

La selectividad es el grado al cual un método puede determinar un analito en particular en mezclas o matrices sin interferencias de otros componentes ((VICHGL49(R), 2015).

Para comprobar este parámetro se analizaron:

- ❖ Muestras de Hígado y Riñón de bovino adquiridas en las carnicerías de la zona, procesadas de acuerdo al ensayo.
- ❖ Estándar de Zilpaterol [4ng/ml] preparado de acuerdo al ensayo.
- ❖ Blanco, preparado con la mezcla Metanol/NH<sub>4</sub>OH 5% [70:30].



**Figura 29. Estándar de Zilpaterol [4ng/mL] abajo, Blanco preparado con mezcla Metanol/ NH<sub>4</sub>OH 5% [70:30] arriba.**

### Hígado Bovino

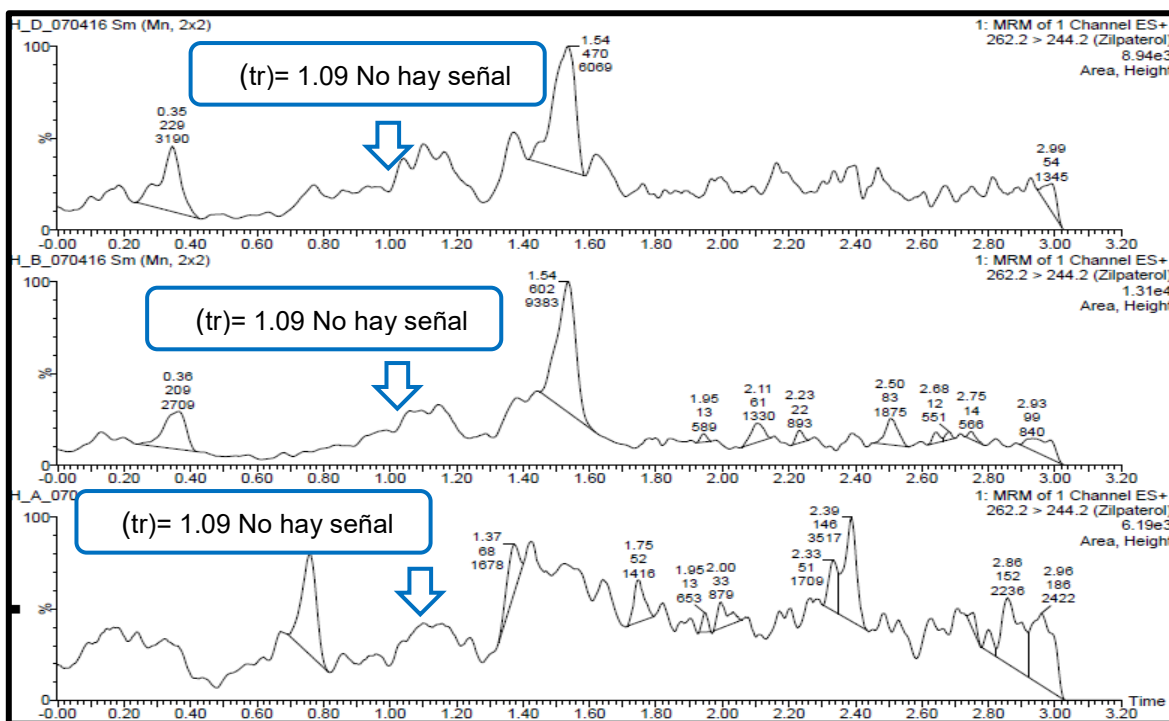


Figura 30. Muestras de Hígado Blanco A, B, D.

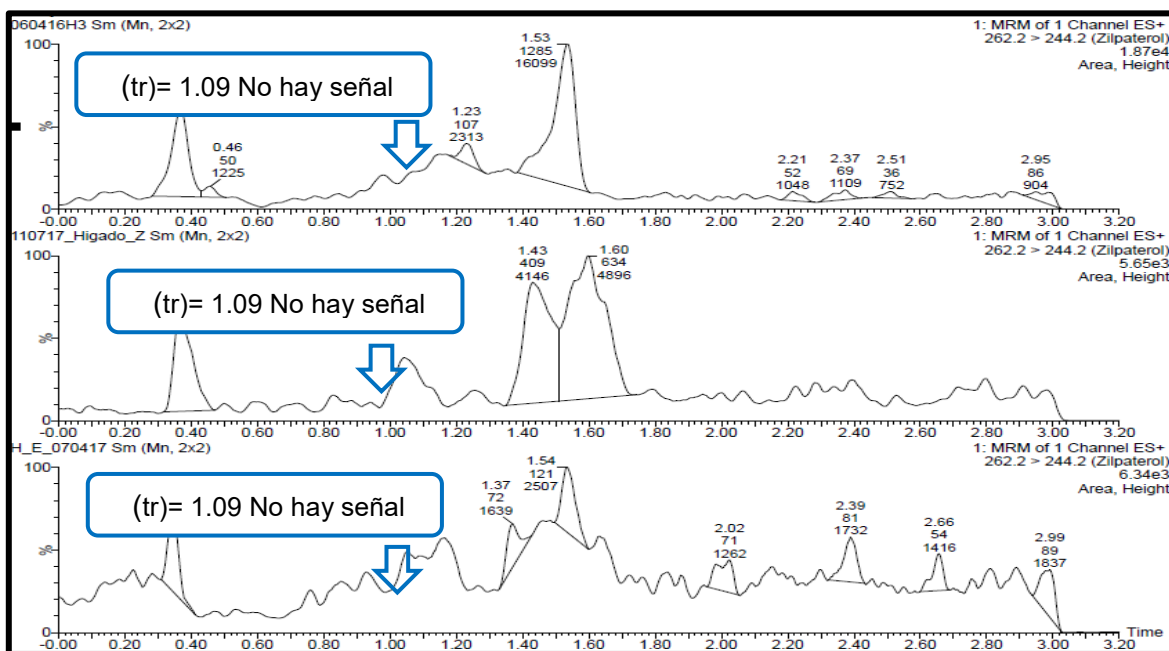


Figura 31. Muestras de Hígado Blanco E, Z, 3.

**Riñón Bovino**



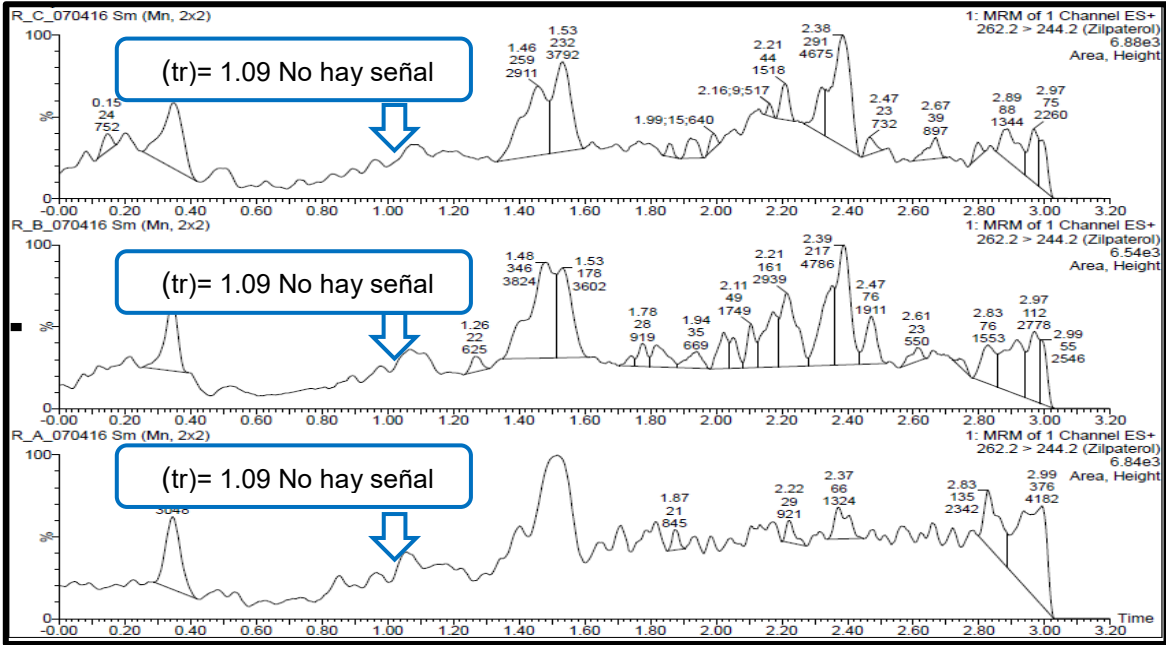


Figura 32. Muestras de Riñón Blanco A, B, C.

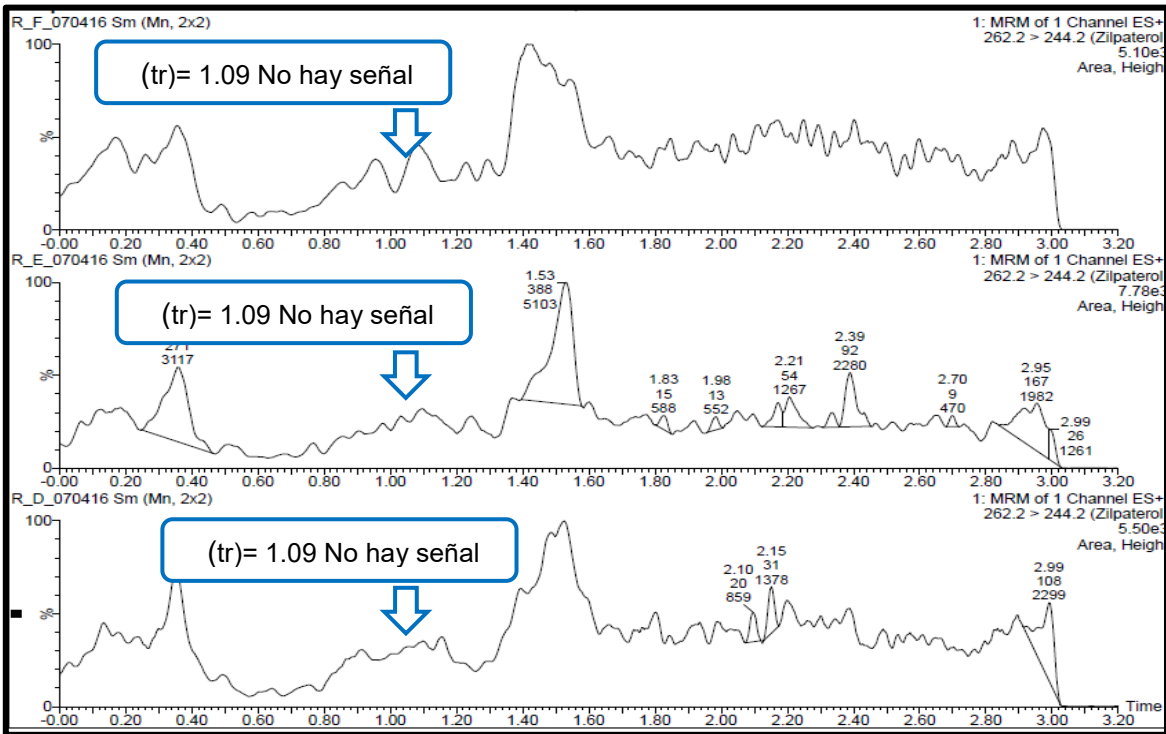
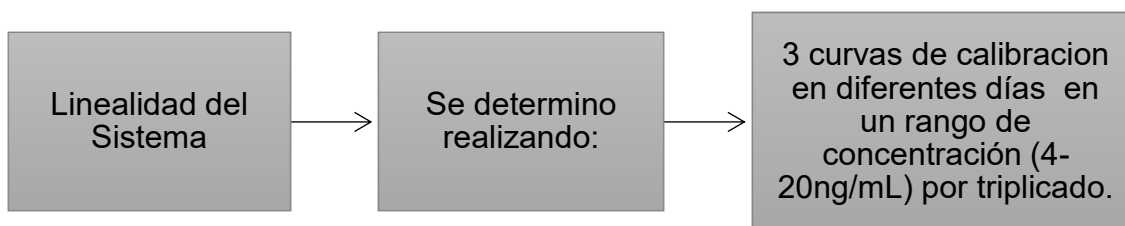


Figura 33. Muestras de Riñón Blanco D, E, F.

## Linealidad del Sistema

La linealidad de un procedimiento analítico es la capacidad de un método de análisis, dentro de un cierto intervalo, para ofrecer una respuesta instrumental o resultados proporcionales a la calidad del analito a ser determinada en la muestra del laboratorio ((VICHGL49(R), 2015).



**Nota:** Debido al rango de concentraciones en el que se trabajó y de acuerdo a lo establecido en la tabla 6 el %cv para la linealidad del sistema puede ser mayor al 2%.

**Tabla 26. Resultados obtenidos para la linealidad del Sistema**

Concentración Adicionada ng/mL	Área	Área/Concentración Adicionada
4	35665	8916.25
4	36952	9238.00
4	36330	9082.50
8	73975	9246.88
8	79591	9948.88
8	78902	9862.75
12	114524	9543.67
12	119839	9986.58
12	111138	9261.50
16	144600	9037.50
16	146664	9166.50
16	155339	9708.69
20	198253	9912.65
20	195616	9780.80
20	198593	9929.65
	<b>Promedio</b>	9508.19
	<b>s</b>	385.25
	<b>%CV</b>	4.05

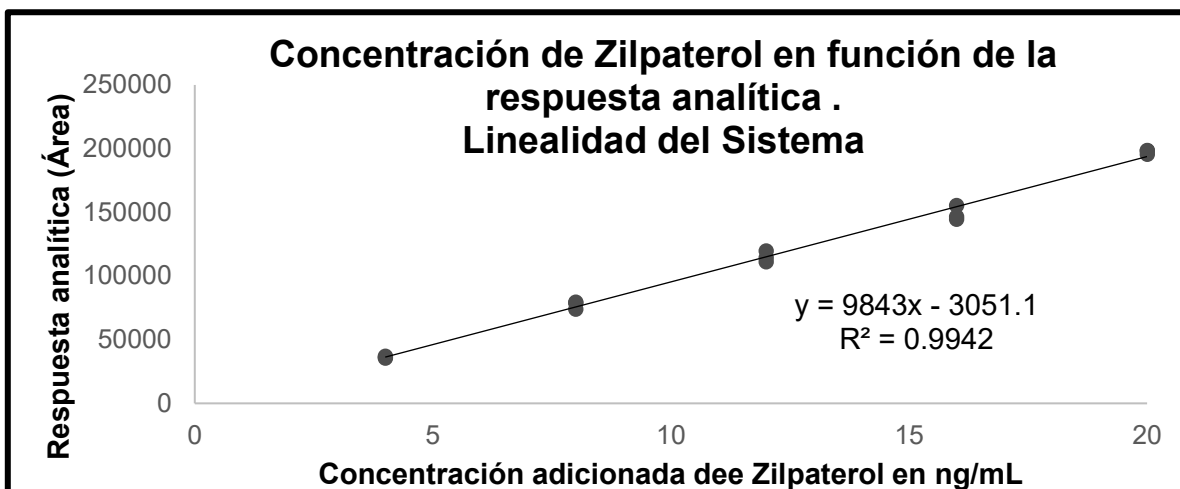


Figura 34. Linealidad del Sistema

Tabla 27. Criterios de Aceptación para Linealidad del Sistema.

	Parámetro	Especificación	Resultado	Dictamen
Linealidad del Sistema	$r^2$	$\geq 0.98$	0.9971	Cumple

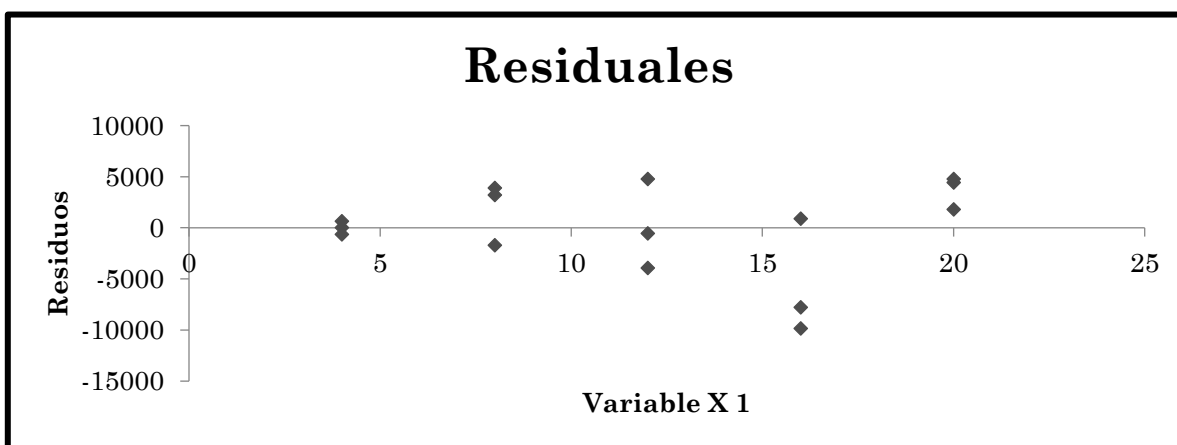
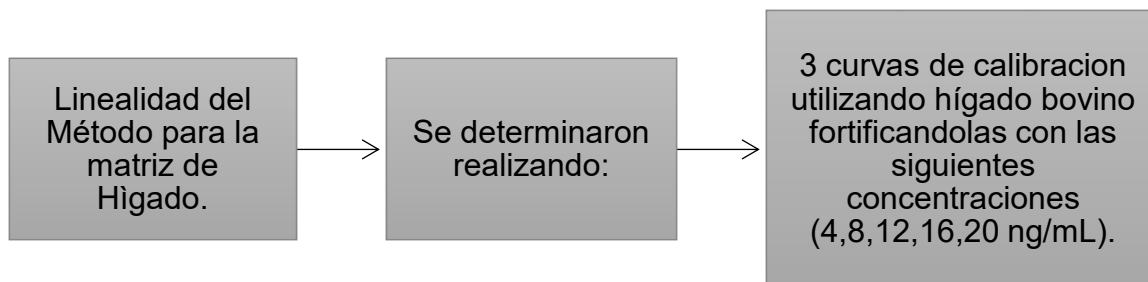


Figura 35. Gráfico de Residuales (Linealidad del Sistema).

Los residuales se consideran importantes en un análisis de varianza ya que nos proporcionan información sobre el grado de exactitud de los pronósticos por lo que entre más pequeño sea el error típico de los residuales, mejor será el ajuste de la

recta de regresión, además los residuales pueden ayudarnos a detectar puntos atípicos lo cual nos permitiría reanalizar la curva y obtener mejores resultados.

### **Linealidad del Método para la matriz de Hígado.**

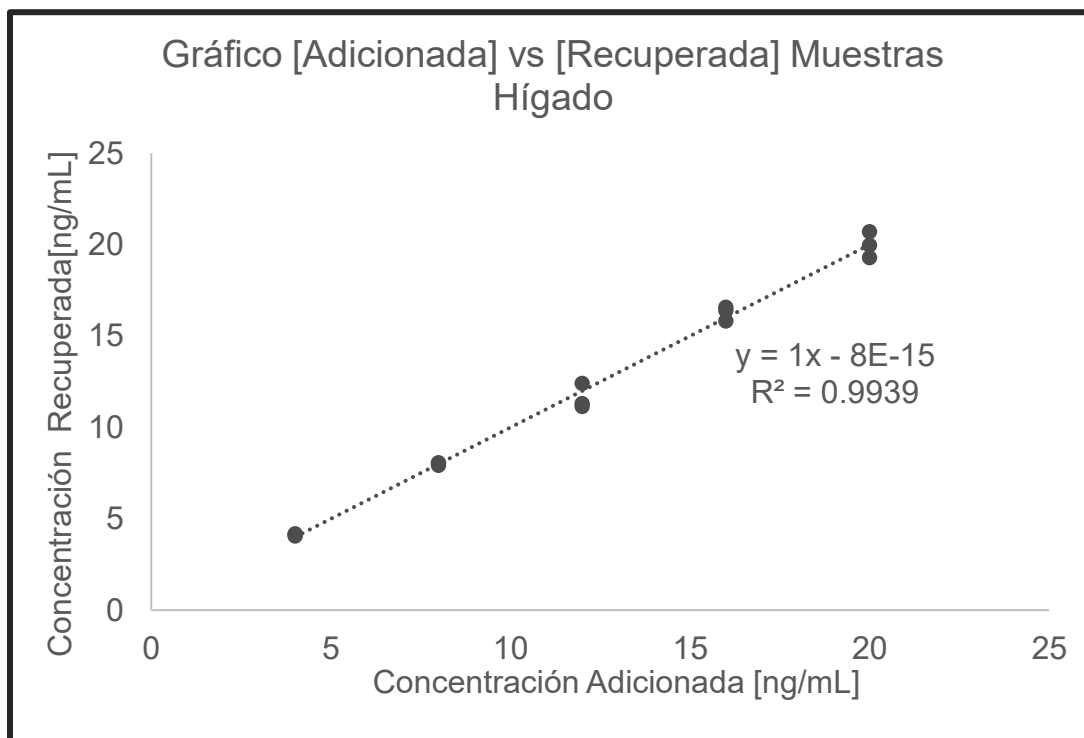


- ❖ Las tres curvas realizadas en diferentes días se procesaron de acuerdo a lo descrito en la figura 44 ubicada en el anexo B.

**Tabla 28. Resultados obtenidos para la Linealidad del Método para Hígado.**

<b>Concentración Adicionada ng/mL</b>	<b>Área</b>	<b>Concentración Recuperada ng/mL</b>	<b>Concentración Recuperada/ Concentración Adicionada</b>	<b>% C.V</b>
<b>4</b>	29269	4.06	1.02	1.39
<b>4</b>	29797	4.13	1.03	
<b>4</b>	30150	4.18	1.04	
<b>8</b>	59138	7.92	0.99	0.89
<b>8</b>	60201	8.06	1.01	
<b>8</b>	59914	8.02	1.00	
<b>12</b>	93867	12.41	1.03	5.93
<b>12</b>	84060	11.14	0.93	
<b>12</b>	85352	11.31	0.94	
<b>16</b>	124744	16.40	1.03	2.43
<b>16</b>	120216	15.82	0.99	
<b>16</b>	126045	16.57	1.04	
<b>20</b>	152426	19.98	1.00	3.55
<b>20</b>	147081	19.29	0.96	
<b>20</b>	158057	20.71	1.04	

La tabla 28, muestra el coeficiente de variación en cada nivel de concentración los cuales son < 15% por lo que se cumple con el criterio establecido en la VICH GL 49.



**Figura 36. Gráfico de Concentración adicionada vs Concentración recuperada.**

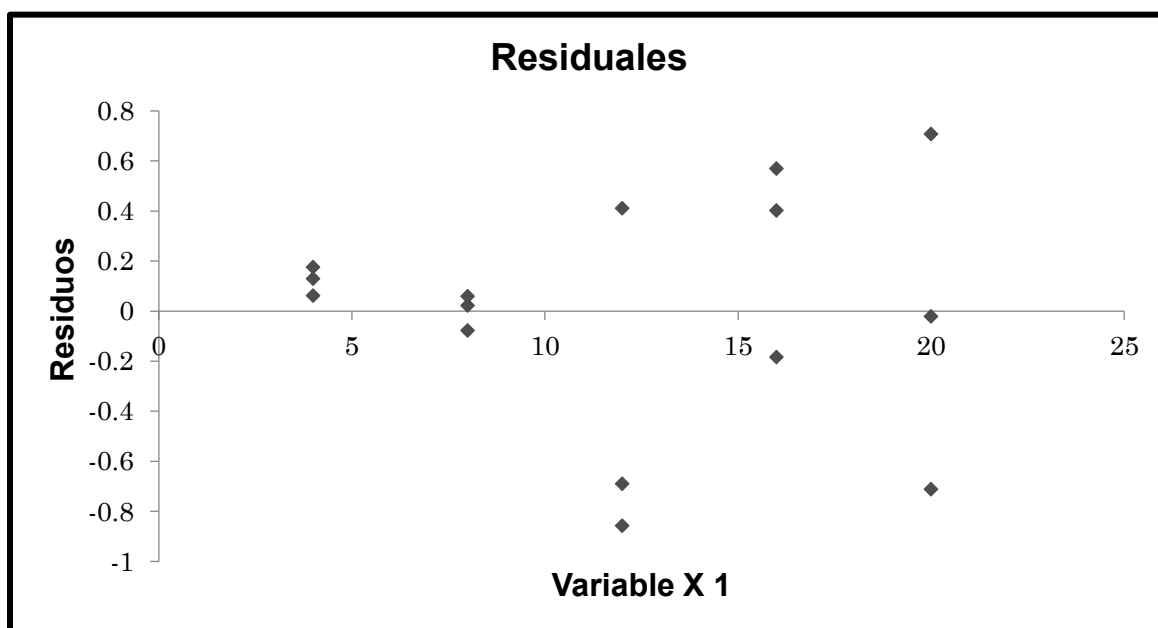
De acuerdo con la figura anterior la curva global del método analítico cumple con la especificación ya que el coeficiente de determinación obtenido fue de 0.9939.

Para evaluar los errores sistemáticos que pudieron haberse cometido durante el procedimiento experimental se realizó un análisis de varianza con un intervalo de confianza del 95% en el cual se determinó:  $r^2$ ,  $IC(\beta_1)$ ,  $IC(\beta_0)$ ,  $CV_{y/x}$  global, Residuales los datos obtenidos pueden observarse en la tabla 29.

**Tabla 29. Criterios de aceptación para la cantidad adicionada contra la cantidad recuperada.**

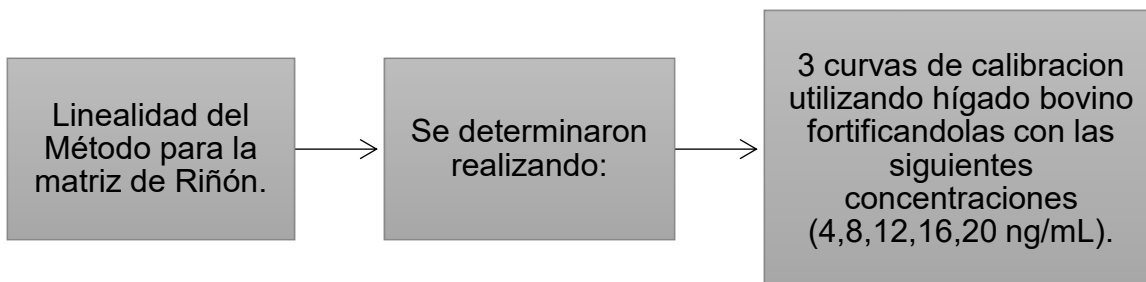
	Parámetro	Especificación	Resultado		Dictamen
<b>Linealidad del Método Hígado</b>	$r^2$	0.98	0.9939		Cumple
	$IC(\beta_1)$	Debe incluir la unidad	0.95289	1.047098	Cumple
	$IC(\beta_0)$	Debe incluir el cero	-0.602488	0.624888	Cumple
	$CV_{y/x}$ global	<15%	3.51		Cumple

Los residuales también se consideran importantes en un análisis de varianza ya que estos nos proporcionan información sobre el grado de exactitud de los pronósticos por lo que entre más pequeño sea el error típico de los residuales, mejor será el ajuste de la recta de regresión, además los residuales pueden ayudarnos a detectar puntos atípicos lo cual nos permitiría reanalizar la curva y obtener mejores resultados la figura 37 muestra los residuales obtenidos para la linealidad del método en muestras de hígado bovino.



**Figura 37. Gráfico de residuales**

### Linealidad del Método para la matriz de Riñón.

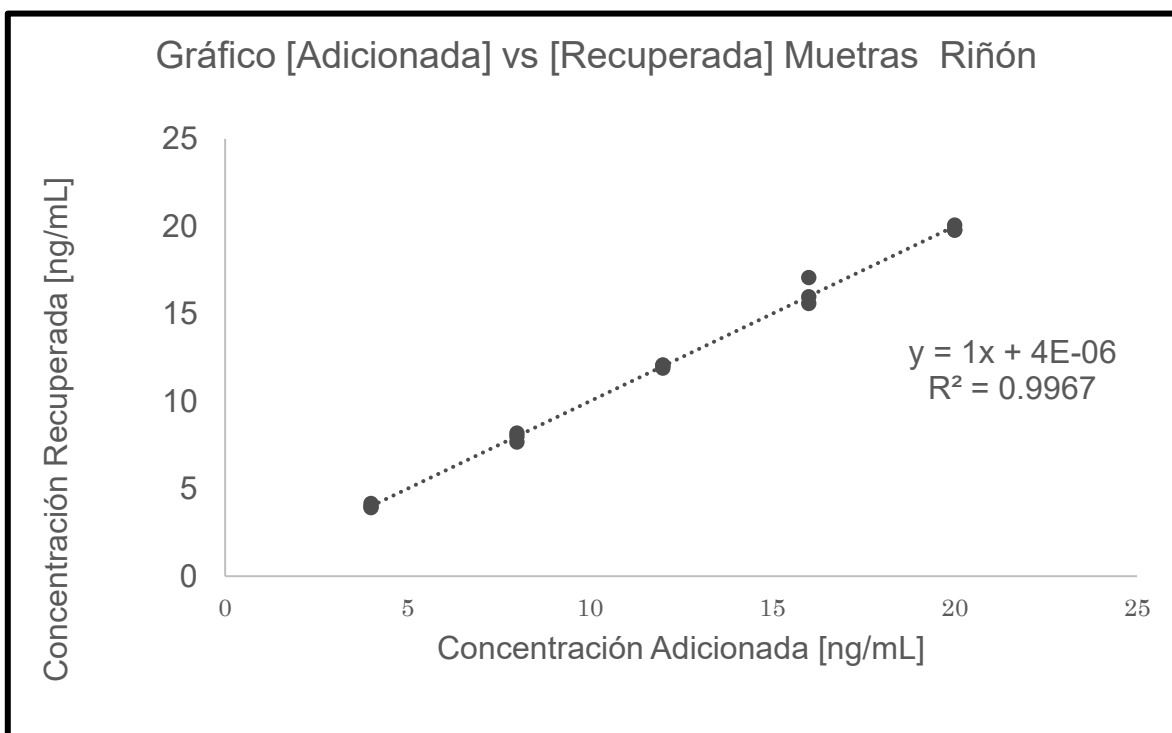


- ❖ Las tres curvas realizadas en diferentes días se procesaron de acuerdo a lo descrito en la figura 44 ubicada en el anexo B.

**Tabla 30. Resultados obtenidos para la Linealidad del Método para Riñón.**

Concentración Adicionada ng/mL	Área	Concentración Recuperada ng/mL	Concentración Recuperada/ Concentración Adicionada	%CV
4	33868	4.14	1.03	3.03
4	32036	3.91	0.98	
4	32467	3.96	0.99	
8	61579	7.65	0.96	3.33
8	65712	8.18	1.02	
8	64127	7.97	1.00	
12	96150	12.03	1.00	0.81
12	94970	11.88	0.99	
12	96401	12.06	1.01	
16	135806	17.06	1.07	4.73
16	127218	15.97	1.00	
16	124131	15.58	0.97	
20	157122	19.76	0.99	0.83
20	159491	20.06	1.00	
20	157376	19.79	0.99	

La tabla anterior muestra el coeficiente de variación en cada nivel de concentración los cuales son < 15% por lo que se cumple con el criterio establecido en la VICH GL 49.



**Figura 38. Gráfico de Concentración adicionada vs concentración recuperada.**

De acuerdo con la figura anterior la curva global del método analítico cumple con la especificación ya que el coeficiente de determinación obtenido fue de 0.9967.

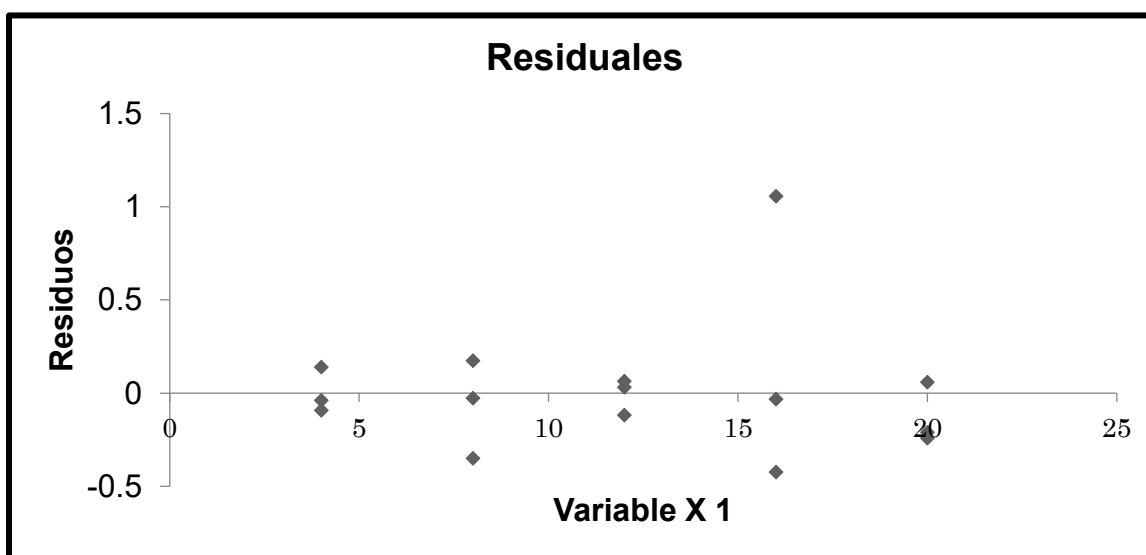
Para evaluar los errores sistemáticos que pudieron haberse cometido durante el procedimiento experimental se realizó un análisis de varianza con un intervalo de confianza del 95% en el cual se determinó:  $r^2$ ,  $IC(\beta_1)$ ,  $IC(\beta_0)$ ,  $CV_{y/x}$  global, Residuales los datos obtenidos pueden observarse en la tabla 30.



**Tabla 31. Criterios de aceptación para la cantidad adicionada contra la cantidad recuperada**

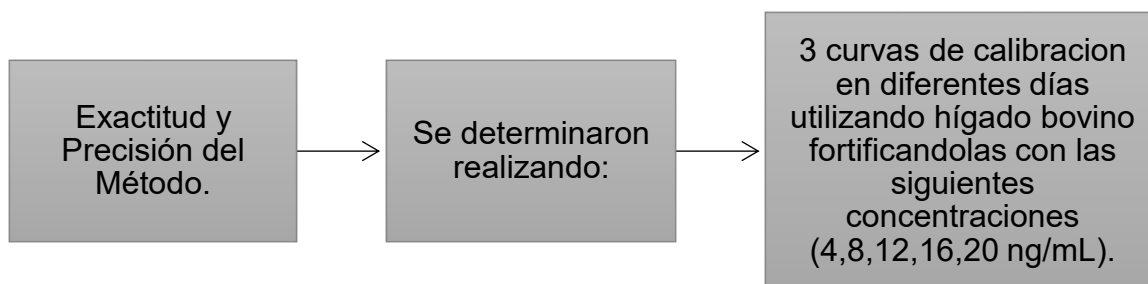
	Parámetro	Especificación	Resultado		Dictamen
<b>Linealidad del Método Riñón</b>	$r^2$	0.98	0.9964		Cumple
	$IC(\beta_1)$	Debe incluir la unidad	0.96537	1.0346	Cumple
	$IC(\beta_0)$	Debe incluir el cero	-0.459511	0.459511	Cumple
	$CV_{y/x}$	<15%	2.63		Cumple

Los residuales también se consideran importantes en un análisis de varianza ya que estos nos proporcionan información sobre el grado de exactitud de los pronósticos por lo que entre más pequeño sea el error típico de los residuales, mejor será el ajuste de la recta de regresión, además los residuales pueden ayudarnos a detectar puntos atípicos lo cual nos permitiría reanalizar la curva y obtener mejores resultados la figura 38 muestra los residuales obtenidos para la linealidad del método en muestras de riñón bovino.



**Figura 39. Gráfico de Residuales.**

## Exactitud y Precisión del Método para la matriz de Hígado.



- ❖ Las tres curvas realizadas en diferentes días se procesaron de acuerdo a lo descrito en la figura 43 ubicada en el anexo B.

**Criterio de Aceptación:** El método es exacto si el % de recobro está dentro del rango de 50-120% y de acuerdo al rango de concentraciones con el cual se trabajó será preciso si el coeficiente de variación es  $\leq 25\%$  dentro de los ensayos y si el coeficiente de variación es  $\leq 32\%$ .

**Tabla 32. Determinación de exactitud y precisión del método.**

Hígado					
Concentración adicionada ng/mL	n	Media del % de recobro	Intervalo de confianza 95%	Precisión % CV	
				Inter-corrida	Entre-corridas
4	9	108.40	104.6-112.2	3.01	2.09
8	9	97.53	95.5-99.6	2.20	1.19
12	9	95.62	91.9-99.3	1.37	4.87
16	9	101.88	99.3-104.5	1.78	2.58
20	9	100.43	98.8-102.1	1.04	1.857

Media del % de recobro relativo = **100.77%** para la matriz de Hígado.

De acuerdo a los datos obtenidos en la tabla 28 se confirma que el método es exacto ya que la media del porcentaje global relativo se encuentra dentro del intervalo de 50-120%, además el método también es preciso ya que los valores de %CV intercorridas y entrecorridas son menores al 25 y 32%. Todo esto de acuerdo a lo establecido en la (VICHGL49(R), 2015).

## Exactitud y Precisión del Método para la matriz de Riñón.



- ❖ Las tres curvas realizadas en diferentes días se procesaron de acuerdo a lo descrito en la figura 43 ubicada en el anexo B.

**Tabla 33. Determinación de exactitud y precisión del método.**

Riñón					
Concentración adicionada ng/mL	n	Media del % de recobro	Intervalo de confianza 95%	Precisión	
				Inter-corridas	Entre-corridas
4	9	96.86	92.3-101.4	3.08	3.93
8	9	100.41	96.7-104.1	4.44	5.04
12	9	101.02	98.3-103.8	4.95	3.42
16	9	100.99	98.3-103.7	2.83	2.94
20	9	99.06	96.5-101.6	4.01	3.09

Media del % de recobro relativo = **99.67%** para la matriz de Riñón.

De acuerdo a los datos obtenidos en la tabla 28 se confirma que el método es exacto ya que la media del porcentaje global relativo se encuentra dentro del intervalo de 50-120%, además el método también es preciso ya que los valores de %CV intercorridas y entrecorridas son menores al 25 y 32%. Todo esto de acuerdo a lo establecido en la (VICHGL49(R), 2015).

## ANÁLISIS DE RESULTADOS

---

La detección a nivel de cromatografía de líquidos de alto desempeño acoplado a espectrometría de masas es muy importante por lo que las condiciones de detección del Zilpaterol se pueden observar en la tabla 16. Aunado a esto la elaboración de la fase móvil es un parámetro crítico, durante un análisis por HPLC acoplado a MS/MS ya que los aditivos que la componen pueden conducir a la supresión de iones o la interacción entre los mismos componentes, y afectar la respuesta del analito, de acuerdo a la bibliografía consultada una fase acuosa que contiene ácido fórmico al 0.2% es una de las fases móviles más satisfactorias para la detección de Zilpaterol ((Suo, Zhao, Wang, & Su, 2014).

La composición de la fase móvil utilizada para la detección de Zilpaterol en hígado y riñón de bovino se muestra en la tabla 15; al utilizar el método de gradiente se buscó obtener una mejor resolución a nivel de la señal.

Para comenzar con la optimización del método primero se realizaron las variaciones durante la homogeneización y la temperatura del ultrasonido estas variaciones se evaluaron con estándares a diferentes concentraciones. Por lo que en la tabla 17 se muestran los estándares por triplicado de Zilpaterol a una concentración de 16 ng/mL; los cuales fueron sometidos a diferentes temperaturas en el baño ultrasónico, obteniendo un % cv = 25.60 cuando los estándares fueron sometidos a una temperatura de 80°C, mientras que al someterlos a una temperatura de 25°C el % cv = 9.77 por lo que se asume que a una temperatura elevada la mezcla NH<sub>4</sub>OH 5%/ Metanol puede llegar a evaporarse y causar esta variación.

Como se mencionó anteriormente otra variación evaluada para ver el comportamiento de los estándares fue durante la homogeneización de los mismos, los cuales se realizaron a una concentración de 8ng/mL el primer triplicado se expuso al ultrasonido por 30 min, y el otro triplicado se homogeneizó en el vortex durante 5 min. Los dos fueron comparados contra un estándar directo a la misma concentración (8ng/mL). La tabla 18 muestra los resultados obtenidos, observando así que la homogeneización en el ultrasonido es mejor ya que el porcentaje de recobro fue de 71.54% y la variación entre ellos es de CV=2.5% mientras que la homogeneización en vortex presenta un porcentaje de recobro de 66.17% y un CV=8.9% por lo que la variación sería mayor entre cada muestra mientras que en el ultrasonido las muestras se procesarían de manera más homogénea.

Posteriormente se procede a trabajar con la matriz de Hígado ya que esta es muy compleja por todas las proteínas que la componen (ver tabla 1).

Una de las partes importantes para poder lograr la cuantificación es la limpieza de la muestra por lo que las figuras 21 y 22 muestran la técnica de precipitación de proteínas utilizando Acetonitrilo y Ácido Tricloroacético al 10% respectivamente.

La adición de un disolvente orgánico, como acetona, alcohol o Acetonitrilo, a una solución de proteína en agua, disminuye la constante dieléctrica del disolvente, desplazando también algunas de las moléculas de agua asociadas con la proteína, y reduciendo así la concentración del agua presente en la solución (Teijon Rivera Jose Ma., 2009). Estos efectos disminuyen la solubilidad de la proteína permitiendo su precipitación.

De acuerdo a la literatura el Acetonitrilo y el Ácido Tricloroacético actúan de manera diferente si observamos la figura 21 y 22 el Acetonitrilo muestra un área más pequeña con respecto a la del TCA al 10%, además de que la línea base es mucho más ruidosa por lo que la precipitación con este solvente no es muy adecuada. Así que se decide trabajar con una solución de TCA al 10% para lograr la precipitación de proteínas. Antes de evaluar la adición de otros agentes precipitantes se realizó una filtración con la cual se buscaba limpiar o separar partículas que puedan interferir en el análisis.

La filtración es la técnica que consiste en hacer pasar la mezcla de líquidos y partículas a través de un filtro, cuyos orificios sean más pequeños que las partículas a separar (Fuster, 1986). Como lo menciona la literatura la técnica se utiliza para separar partículas pequeñas de partículas de mayor tamaño por lo que la tabla 20 muestra los resultados obtenidos después de realizar una filtración mediante acrodiscos de 0.45  $\mu\text{m}$  de nylon a las muestras de hígado las cuales presentan un % de recobro del 31.48 y un CV= 10.07% esto se atribuye a que puede ser que el principio activo molecularmente sea muy grande y se quede retenido en el filtro, por otro lado las muestras a las que no se les aplicó filtración presentaron un CV= 5.47% y un % de recobro del 40.31% por lo que se decide no filtrar las muestras ya que la variación sería demasiada entre muestra y muestra y el porcentaje de recobro sería menor.

Después de realizar las pruebas antes mencionadas no se logró obtener el porcentaje de recobro requerido por lo que se procede a realizar las siguientes modificaciones.

Otro método de separación de proteínas consiste en hacerlas interactuar con cationes de metales o aniones de ácidos. Logrando así que el compuesto resultante precipite (Silvia, 2007). La tabla 21 muestra la variación del agente precipitante y los porcentajes de recobro obtenidos. Los resultados de la tabla muestran que el mejor agente utilizado para precipitar proteínas es el  $(\text{ZnOH})_2$  al 10% presentando un porcentaje de recobro del 57.0%, mientras que el porcentaje más bajo se obtuvo utilizando el sobrenadante de  $(\text{ZnOH})_2$  al 10% mezclado con ácido fórmico al 5% el cual fue de 19.12% lo cual se le atribuye a que tal vez el sobrenadante de esta mezcla no tiene los suficientes cationes para lograr la precipitación adecuada.

De la figura 23 a la 26 podemos observar los cromatogramas correspondientes a la tabla 21 en ellos se observan gráficamente la definición del pico, se dice que para lograr la precipitación de proteínas y hacer la limpieza de las muestras a analizar y obtener un buen porcentaje de recobro se debe disminuir la solubilidad de las mismas mediante disoluciones salinas concentradas; la sal que más se ha utilizado es el sulfato de amonio, por esta razón se utilizó en los experimentos pero no presentó un porcentaje de recobro adecuado.

Ya que el agente precipitante que presentó mejor porcentaje de recobro fue el  $\text{Zn}(\text{OH})_2$  al 10%, se procedió a realizar otros experimentos ahora variando la concentración del mismo en la tabla 22 se pueden observar estas variaciones las cuales fueron de 7.5, 10 y 20% pudiera pensarse que el mejor resultado se obtendría a una concentración mayor, aunque esto no fue así ya que el mejor porcentaje de recobro se obtuvo utilizando una solución al 10% de  $\text{Zn}(\text{OH})_2$  con un porcentaje de recobro de 58.03 mientras que a una concentración de 20% el porcentaje de recobro obtenido fue de 39.45% la literatura menciona que un exceso en la concentración de iones podría causar una supresión y por esta razón el porcentaje es tan bajo.

Después de lograr la optimización del agente precipitante se procedió a realizar la optimización en la parte de Cromatografía de Extracción en Fase Sólida. Para esto analizaremos las características químicas del Zilpaterol, la fase estacionaria, y las soluciones utilizadas como fases móviles, así como el mecanismo de los cartuchos empleados.

La separación de la molécula se realizó mediante un intercambio iónico; además de que la cromatografía que se llevó a cabo fue en fase reversa por lo que la fase móvil es de naturaleza polar para que se comporte como un disolvente fuerte y pueda liberar al analito de la fase estacionaria la cual es no polar.

En la cromatografía de intercambio iónico (IEC), para que este mecanismo ocurra el analito y el sorbente deben de estar cargados de forma opuesta (Hidalgo, 2016). Por esta razón la elección del tipo de cartucho a utilizar es de suma importancia ya que cada uno cuenta con fases estacionarias cargadas con grupos funcionales diferentes.

Por esta razón y de acuerdo a las características del Zilpaterol el cual, debido a que en su estructura tiene una amina la cual le confiere valores de pka de 8.5 y generalmente superiores a 10 se considera como una base débil (Sumano, 2002), además de que esta característica permite que la molécula se encuentre de forma ionizada. Los Cartuchos que se utilizaron fueron los MCX ya que su fase estacionaria está compuesta por un sorbente el cual tiene la capacidad de intercambio catiónico fuertemente controlada, (Arsenault, 2012). El objetivo de los cartuchos es capturar analitos básicos y luego lavar interferencias, las fases de carga y de lavado deben estar a un pH bajo para obtener el máximo de captura. Por lo cual el Zilpaterol al comportarse como una base y estar ionizada presentara una carga positiva la cual interaccionara con los grupos silanol de la fase estacionaria del cartucho y facilitara su retención (ver figura 15).

Aunque la carga de la muestra es importante, no es el único paso a considerar en un protocolo SPE, los pasos de acondicionamiento y equilibrado aseguran que los poros de un sorbente se humedezcan adecuadamente para permitir que el analito sea retenido (Arsenault, 2012). Por lo que el acondicionamiento se realizó con 500  $\mu$ L de metanol durante 1 minuto seguido de 500  $\mu$ L con agua durante 1 min, estos solventes permitirán que los analitos de interés en este caso el Zilpaterol pueda acceder y así ser atraído y retenido.

Después se realizó la carga de las muestras 500  $\mu$ L a durante 1 min a 20 psi, seguido de un lavado el cual se hizo con ácido fórmico al 5% este solvente se utilizó siguiendo el protocolo SPE Waters, además de que al adicionar más cargas positivas esto ayudará a eliminar interferencias que estén ocupando espacios en la fase estacionaria. Siguiendo el protocolo de Waters para lograr una buena extracción se realiza un segundo lavado con metanol el cual es un solvente polar el cual nos permitirá deshacernos de moléculas más grandes que hayan quedado atrapadas y puedan causar interferencias con el analito.

El último paso es la Elución del analito de interés de acuerdo a lo antes mencionado sobre su naturaleza química se dice que la extracción de agonistas  $\beta$ - adrenérgicos de muestras biológicas se logra con mayor eficiencia en pH altos. Ya que, a pH alto, el mecanismo de retención de intercambio iónico se disocia debido a que el analito

se convierte en una molécula no ionizada, causando así el rompimiento de la interacción entre el Zilpaterol y los grupos silanol por lo que la mezcla de elución a utilizar fue [Metanol/ NH<sub>4</sub>OH 5%] en una proporción 50:50.

Antes de variar la proporción de la mezcla de elución, se varió el tiempo de elución de 1 a 3 minutos obteniendo como resultado que el tiempo de elución influye para obtener un mayor porcentaje de recobro (ver tabla 23). Lo cual se puede entender ya que la mezcla de elución interactúa más tiempo con la fase estacionaria permitiendo así eluir a la mayoría de las moléculas del analito.

Hasta este punto se utilizó una mezcla de elución compuesta por [Metanol/ NH<sub>4</sub>OH 5%] en una proporción 50:50, aunque aún con todas las variaciones realizadas no se obtuvo un porcentaje de recobro adecuado, por esta razón se decidió realizar un cambio en la proporción de la mezcla de elución (ver tabla 24-25), correspondiente a cada matriz. De acuerdo con los resultados la mejor mezcla de elución tanto para hígado como para riñón fue la proporción 70:30 correspondiente a [Metanol/ NH<sub>4</sub>OH], logrando porcentajes de recuperación para Hígado de 91.59% y Riñón de 97.60% (ver figuras 27-28).

Ya que la cromatografía se realizó por intercambio iónico la extracción se logró modificando la fuerza iónica y el contenido del solvente orgánico del medio, además de modificar el pH con la adición de NH<sub>4</sub>OH al 5% elevando el pH dos unidades por encima del pKa de la analito (pKa =8.7).

Una vez que se logró obtener porcentajes de recobro adecuados se analizaron algunos parámetros de validación del método analítico como:

La selectividad la cual se demostró comparando un estándar de una concentración de 4 ng/ml, un blanco y muestras (placebos) hígado, riñón las cuales no presentaron señal que pueda afectar la respuesta del Zilpaterol, (ver figuras 29-33).

Para la linealidad del sistema se obtuvieron los parámetros estadísticos como el %CV =4.05, el cual debido al rango de concentraciones en el que se trabajó y de acuerdo a lo establecido en la tabla 6 el %cv para la linealidad del sistema puede ser mayor al 2%. Además, se graficó el área contra la concentración para obtener el coeficiente de determinación el cual fue de 0.9971 así como también se obtuvieron los residuales todo esto para cumplir con la linealidad del sistema de acuerdo a la (VICHGL49(R), 2015), (ver tabla 26 y 27 así como la figura 34 y 35).

La linealidad del método para cada matriz se comprobó evaluando por triplicado muestras de placebo adicionadas correspondientes a cada concentración, preparadas de acuerdo a lo anteriormente mencionado.



Las tablas 28 y 30 muestran los coeficientes de variación en cada nivel de concentración para la matriz de hígado y riñón los cuales son < 15% por lo que se cumple con el criterio establecido en la VICH GL 49.

De acuerdo con los resultados obtenidos en las figuras 37 y 38 se dice que existe una relación entre la concentración adicionada y la concentración recuperada ya que para la matriz de hígado el  $r^2 = 0.9939$  mientras que para la matriz de riñón el  $r^2=0.9967$ . Para evaluar los errores sistemáticos que pudieron haberse cometido durante el procedimiento experimental se realizó un análisis de varianza con un intervalo de confianza del 95% en el cual se determinó:  $r^2$ ,  $IC(\beta_1)$ ,  $IC(\beta_0)$ ,  $CV_{y/x}$  global, Residuales los datos obtenidos pueden observarse en la tabla 30. Los residuales también se consideran importantes en un análisis de varianza ya que estos nos proporcionan información sobre el grado de exactitud de los pronósticos por lo que entre más pequeño sea el error típico de los residuales, mejor será el ajuste de la recta de regresión, además los residuales pueden ayudarnos a detectar puntos atípicos lo cual nos permitiría reanalizar la curva y obtener mejores resultados las figuras 38 y 39 muestran los residuales obtenidos para la linealidad del método en muestras de riñón e hígado bovino respectivamente.

De acuerdo a los datos obtenidos en las tablas 32 y 33 se confirma que el método es exacto para las matrices de Hígado y riñón de bovino ya que la media del porcentaje global relativo se encuentra dentro del intervalo de aceptación siendo para Hígado del 100.77% y para riñón de 99.67%, además el método también es preciso ya que los valores de %CV intercorridas y entrecorridas son menores al 25 y 32%. Todo esto de acuerdo a lo establecido en la (VICHGL49(R), 2015).

## CONCLUSIONES

---

- Se desarrolló un método para el tratamiento de muestras de hígado y riñón de bovino, el cual nos permitió tener una mejor detección y cuantificación de Zilpaterol por cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas.
- Se logró optimizar la técnica de Extracción en Fase Sólida (SPE) para el análisis de Zilpaterol en matrices de hígado y riñón de bovino demostrando buenos recobros usando una mezcla de elución 70:30 [Metanol/NH<sub>4</sub>OH 5%] durante tres minutos a una presión de 20 psi.
- El Zn(OH)<sub>2</sub> al 10% fue el mejor agente precipitante para el pretratamiento de hígado y riñón bovino, obteniendo recobros del 99.81% para hígado y 99.96% para riñón de bovino con un C.V. de 3.66% y 2.63% respectivamente.
- Se demostró que el método desarrollado para cuantificar Zilpaterol en hígado y riñón de bovino es
  - Selectivo para Zilpaterol en las matrices biológicas.
  - Preciso ya que presenta valores de % CV <15%
  - Exacto presentando una media de % de recobro relativo = 100.77% para la matriz de Hígado y una media de % de recobro relativo = 99.67% para la matriz de Riñón.
  - Lineal a nivel de sistema y a nivel de método en un rango de concentraciones de 4-20 ng/mL.

## PERSPECTIVAS

---

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, las perspectivas son:

- Realizar el límite de cuantificación y límite de detección experimentalmente y con esto poder comparar los resultados experimentales con los resultados teóricos para ambas matrices, así como precisión y exactitud del sistema y de esta forma se tenga la validación completa, para que se pueda demostrar el desempeño del método.
- También sería interesante realizar un ensayo a concentraciones más bajas y así poder demostrar si se pueden detectar residuos de Zilpaterol a nivel de pg/mL.
- Por falta de tiempo no se pudo probar una amplia variedad de agentes precipitantes, por lo que podría ser interesante probar la precipitación por medio de otros agentes u otras técnicas ya que este punto es importante para lograr una buena cuantificación del fármaco.
- Además de realizar algunas otras variaciones al proceso de extracción en fase sólida como el tiempo de carga con el fin de hacer más eficiente el proceso.

## REFERENCIAS

---

- Arsenault, J. (2012). *Beginner's Guide to SPE (Solid- Phase Extraction)*. USA: Waters Corporation.
- Boison J, Sander P., Chicoine A., and S. S. (2015). Zilpaterol Hydrochloride, Residue evaluation of certain veterinary drugs. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Breton Camilo A, de R. H. R. (2004). Secuenciación de proteínas por espectrometría de Masas. *Journal of Mass Spectrometry*.
- Codex Alimentarius. (2014). CXG\_071S-Directrices para el Diseño y la Implementación de Programas Nacionales Reglamentarios de Aseguramiento de Inocuidad Alimentaria. (N. I. L. Alimentos, Ed.).
- Contreras López, C. (2015). Efecto del clorhidrato de zilpaterol en las características de canal de ovinos de pelo finalizados en corral. Universidad Autónoma del Estado de México.
- 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*.
- Errecalde C., G. Prieto., Lürdes H., G. O. (2003). Fármacos B-adrenérgicos como modificadores metabólicos y su efecto en la producción, calidad carnica.
- Fuster Ortigoza, A. (1986). *Prácticas de Química General*. (Secretaría).
- Gelvez, L. D. (2016). Mundo Pecuario. Retrieved from [http://mundo-pecuario.com/tema229/rinones\\_animales/rinones\\_bovinos-1178.html](http://mundo-pecuario.com/tema229/rinones_animales/rinones_bovinos-1178.html)
- Hidalgo Reyes, C. (2016a). "Caracterización de partículas atmosféricas en ciudad universitaria, utilizando técnicas analíticas diferentes (Cromatografía de intercambio iónico y Espectrometría de masas). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química.
- Hidalgo Reyes, C. (2016b). Caracterización de partículas atmosféricas en ciudad universitaria, utilizando técnicas analíticas diferentes (cromatografía de intercambio iónico y espectrometría de masas). Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química.
- Horst Erich, König Hans, G. L. (2005). *Anatomía de los animales domésticos texto y atlas en color*. (Panamericana, Ed.) (2nd ed.). Buenos Aires.
- María Lozano, A. C., & Diana Arias, C. M. (2008). Residuos de fármacos en alimentos de origen animal: panorama actual en Colombia. *Revista Colombiana*

- de Ciencias Pecuarias, 21(1), 121–135.
- Márquez Lara, D. (2008). Residuos químicos en alimentos de origen animal: Problemas y desafíos para la inocuidad alimentaria en Colombia. *Revista Corpoica - Ciencia Y Tecnología Agropecuaria*, 9, 124–35.
- National Center for Biotechnology Information, U. S. N. L. of M. (2017). PubChem Open Chemistry Database. Retrieved from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/sildenafil#section=Information-Sources>
- NOM-177-2013. (2013). Norma Oficial Mexicana NOM-177,SSA1-2013,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 de intercambiabilidad. Requisitos p.
- Núñez Ochoa L., B. J. (2007). *Patología Clínica. Veterinaria*. México. D.F.
- Plascencia Villa, G. (2003). *Espectrometría de Masas*. UNAM. Instituto de Biotecnología.
- SAGARPA. (2015). *Panorama Agroalimentario Maíz 2015*, 0–39.
- Sanchez Garcia, M. I. (2015). *Manuales e instructivos para la operación del cromatógrafo de líquidos de ultra desempeño y espectrómetro de masas*. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.
- Silvia, Q. M. (2007). *Manual de Experimentos del Laboratorio para Bioquímica*. Costa Rica: Editorial Universidad Estatal a Distancia.
- Sumano-López, H., Ocampo-C, L., & Guitiérrez-O, L. (2002). Clenbuterol and other  $\beta$ -agonists, are they an option for meat production or a threat for public health? *Vet. Méx.*, 33(2), 137–159.
- Suo, D. C., Zhao, G. L., Wang, P. L., & Su, X. O. (2014). Simultaneous determination of  $\beta$ -Agonists and psychiatric drugs in feeds by LC-MS-MS. *Journal of Chromatographic Science*, 52(7), 604–608. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmt084>
- Teijon Rivera Jose Ma., G. P. A. (2009). *Bioquímica estructural: Conceptos y Test*. (2nd ed.). Madrid: Tebar.
- USP30. (2007). *Farmacopea de los Estados Unidos de América*. (U. P. T. S. Quality, Ed.). USA.
- VICHGL49(R). (2015). *Studies to Evaluate the Metabolism and Residue Kinetics of Veterinary Drugs in Food-Producing Animals: Validation of Analytical Methods Used in Residue Depletion Studies*. U,S Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Veterinary Medicine., #208.

## Anexo "A"

Antes de trabajar con las matrices biológicas se planteó realizar una curva de calibración para el Zilpaterol en base a los Límites máximos de residuos permitidos en riñón e hígado.

Inicialmente se planteó la curva de calibración en ácido fórmico (AFO 0.2%) para observar las áreas y ver si el rango de concentraciones al cual se trabajaría era lineal; como se puede observar en la Figura 43 el gráfico muestra que es lineal en el intervalo planteado, demostrando que tiene un coeficiente de variación de 4.47% y una  $r^2$  de 0.9958.

Posteriormente se planteó la curva de calibración en agua y se demostró que no había diferencia en las áreas de ambas curvas de calibración, obteniendo que tiene un coeficiente de variación de 3.7% y una  $r^2$  de 0.9976 (tabla 31 y figura 44). Con lo que se demostró que era lineal en el rango de trabajo usando soluciones estándar de Zilpaterol.

**Tabla 34. Curva de Calibración de estándares de Zilpaterol en Ácido Fórmico al 0.2%**

[STD ng/mL]	Respuesta [Área]	Área/ Concentración
4	33845	8461.25
8	65213	8151.63
12	97848	8154.0
16	127021	7938.81
20	149791	7489.55
	Promedio	8039.05
	Desvest	359.21
	%CV	4.47

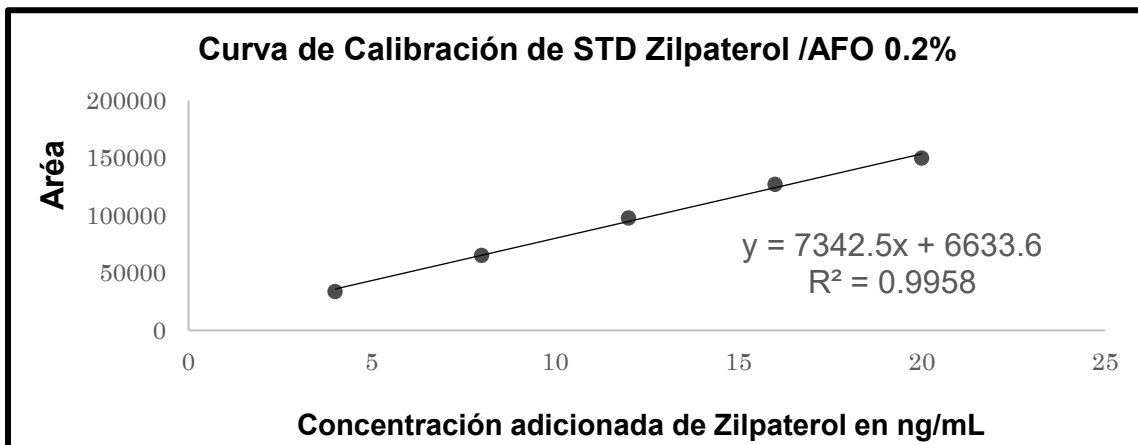


Figura 40. Curva de Calibración de estándar de Zilpaterol en Ácido Fórmico al 0.2%

Tabla 35. Curva de Calibración de estándar de Zilpaterol en Agua

[STD ng/mL]	Respuesta [Área]	Área/ Concentración
4	33380	8345
8	63416	7927
12	94002	7833.5
16	126190	7886.875
20	150426	7521.3
	Promedio	7902.735
	Desvest	294.416713
	%CV	3.7

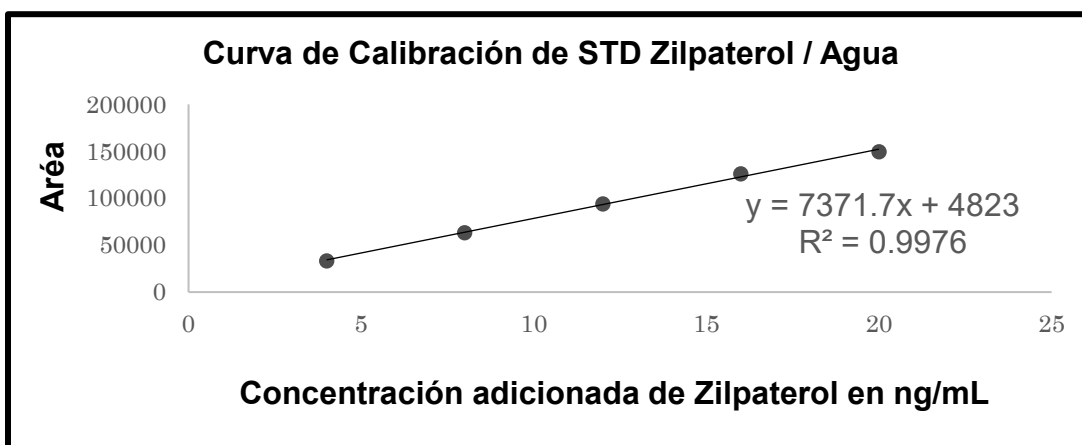


Figura 41. Curva de Calibración de estándar de Zilpaterol en Agua.

## Anexo "B"

### Preparación de la Curva de Calibración del Sistema.

Para realizar la curva de calibración tomar de cada estándar la alícuota correspondiente de acuerdo a la tabla 31 y aforar a 2mL con la mezcla de NH<sub>4</sub>OH al 5% / Metanol (70:30).

Tabla 36. Curva de Calibración del Sistema.

	Alicuota (μL)	Volumen de aforo (mL)	Concentración de Zilpaterol [ng/mL]
<b>Estándar 1</b>	100	2	4
<b>Estándar 2</b>	100	2	8
<b>Estándar 3</b>	100	2	12
<b>Estándar 4</b>	100	2	16
<b>Estándar 5</b>	100	2	20

\*La preparación de los estándares (1,2,3,4,5) se puede observar en la tabla 15.

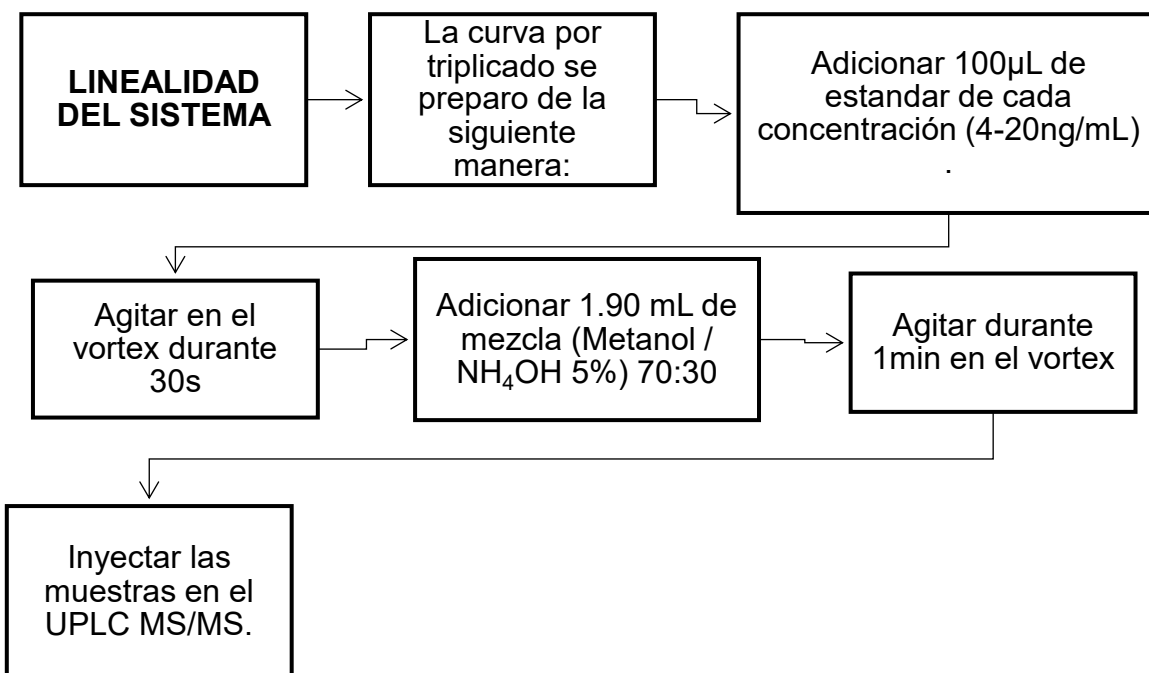


Figura 42. Procedimiento experimental para preparar la linealidad del sistema.



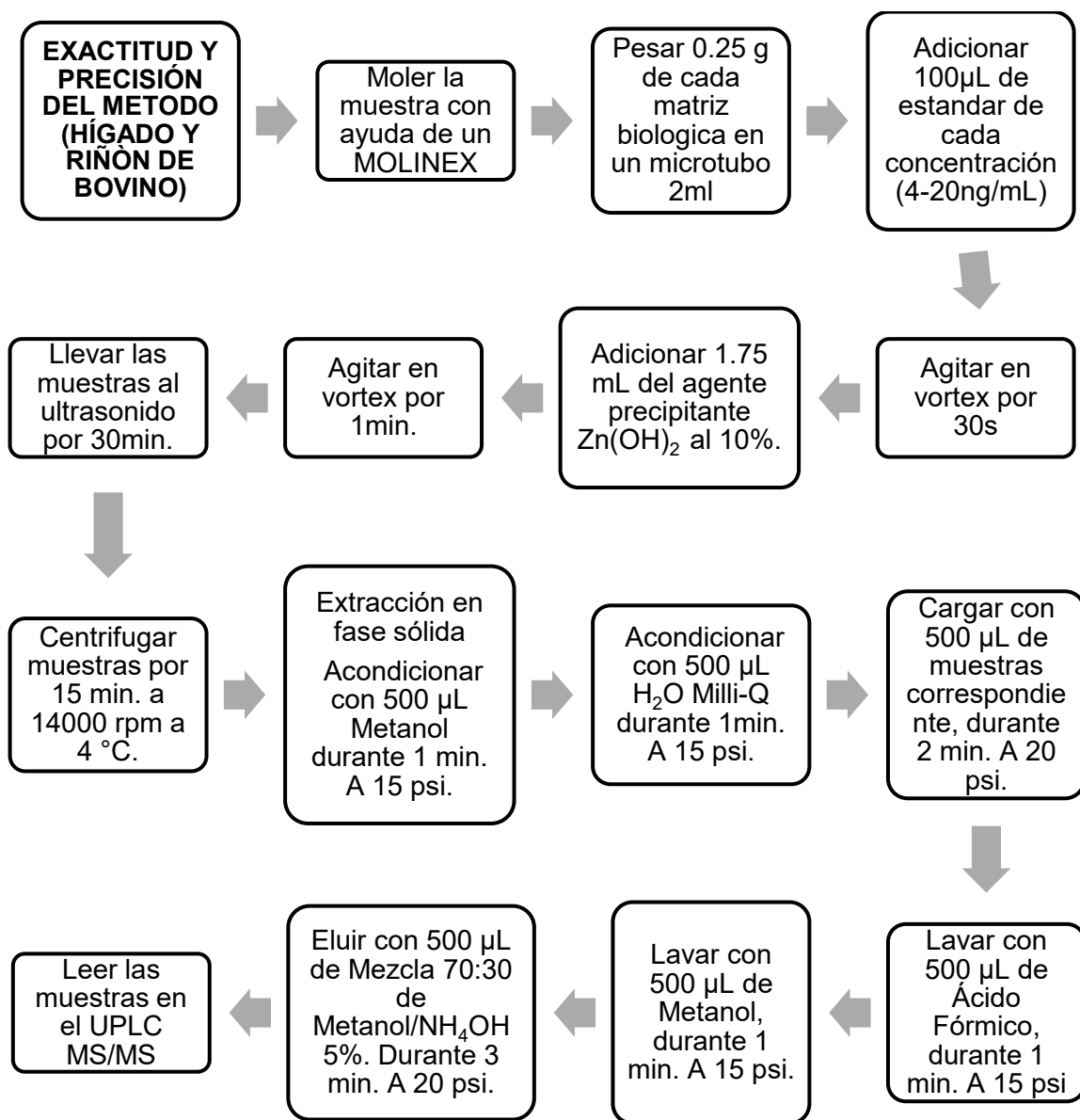


Figura 43. Procedimiento experimental para realizar exactitud y precisión del método para las matrices de hígado y riñón de bovino.

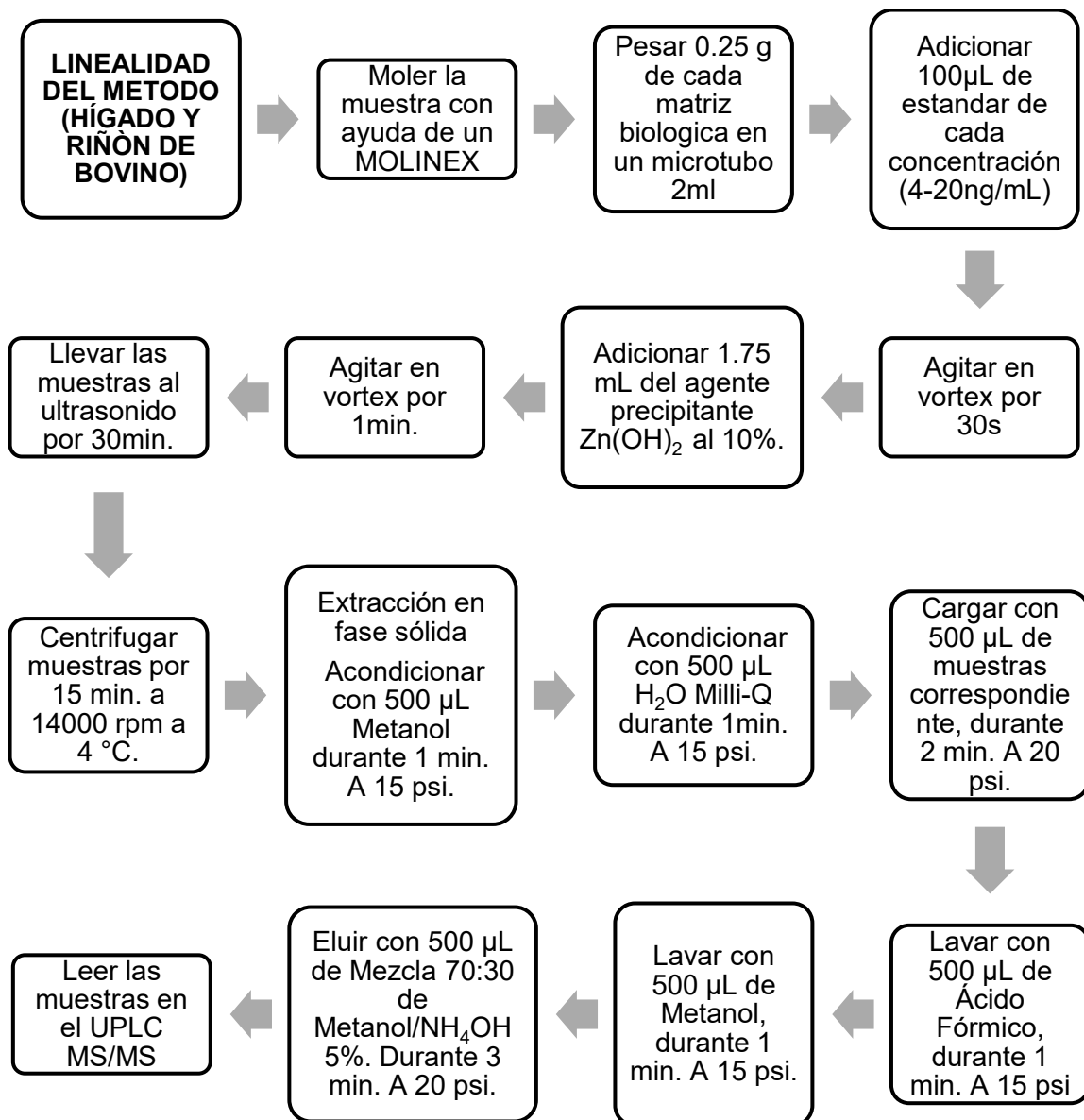


Figura 44. Procedimiento experimental para realizar Linealidad del método para las matrices de hígado y riñón de bovino

## Anexo "C"

---

### Calculo del Límite de Detección y Límite de Cuantificación Teórico para la matriz de Hígado.

Mediante la curva de calibración para la linealidad del método, se determinaron los parámetros estadísticos con los cuales se establecieron los límites de cuantificación y detección para la matriz de hígado.

De acuerdo a la (VICHGL49(R), 2015).

<b>Coefficiente de determinación (<math>r^2</math>)</b>	0.9939
<b>Pendiente (<math>b_1</math>)</b>	1
<b>Ordenada al Origen (<math>b_0</math>)</b>	-8E - 15
<b>Error típico de la regresión</b>	0.4777

Por lo tanto:  $Y = -8E - 15 + 1 * (\text{concentración})$

#### Límite de Detección

$$YLD = - (8E - 15) + (3 * 0.4777) = 1.4331$$

$$LD(\text{ng/mL}) = YLD - (- 8E - 15) / 1 = ((1.4331 + 8E - 15)) / 1 = 1.4331$$

#### Límite de Cuantificación

$$YLC = - (8E - 15) + (10 * 0.4777) = 4.7777$$

$$LC(\text{ng/mL}) = YLC - (- 8E - 15) / 1 = ((4.7777 + 8E - 15)) / 1 = 4.7777$$

**Calculo del Límite de Detección y Límite de Cuantificación Teórico para la matriz de Riñón.**

Mediante la curva de calibración para la linealidad del método, se determinaron los parámetros estadísticos con los cuales se establecieron los límites de cuantificación y detección para la matriz de riñón.

De acuerdo a la (VICHGL49(R), 2015).

<b>Coefficiente de determinación (r<sup>2</sup>)</b>	0.9967
<b>Pendiente (b<sub>1</sub>)</b>	1
<b>Ordenada al Origen (b)</b>	4E-06
<b>Error típico de la regresión</b>	0.3512

Por lo tanto:  $Y = 4E-06 + 1 * (\text{concentración})$

**Límite de Detección**

$$YLD = (4E-06) + (3 * 0.0160) = 1.0536$$

$$LD(\text{ng/mL}) = YLD - (4E-06) / 1 = ((1.053 - 4E-06)) / 1 = 1.0536$$

**Límite de Cuantificación**

$$YLC = (4E-06) + (10 * 0.0160) = 3.5120$$

$$LC(\text{ng/mL}) = YLC - (4E-06) / 1 = ((0.160 - 4E -06)) / 1 = 3.5120$$