



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Maestría en Ingeniería de Calidad y Productividad

Modelado estadístico de la detección
voltamperométrica de clenbuterol utilizando electrodos
serigrafiados sin modificaciones

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestro en Ingeniería de Calidad y Productividad

Presenta

IQ Salvador Salgado Díaz

Dirigido por

Dra. Aurora Femat Díaz

Querétaro, Qro. a abril de 2021



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Maestría en Ingeniería de Calidad y Productividad

Modelado estadístico de la detección
voltamperométrica de clenbuterol utilizando electrodos
serigrafados sin modificaciones

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestro en Ingeniería de Calidad y Productividad

Presenta
IQ Salvador Salgado Díaz

Dirigido por
Dra. Aurora Femat Díaz

Dra. Aurora Femat Díaz
Presidente

MI Ilse Vega Rivas
Secretario

MAP José Agustín Martínez Rodríguez
Vocal

Dr. Adrián Sosa Domínguez
Suplente

MI Javier García Pérez
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Abril 2021
México

Resumen

El clenbuterol es un fármaco empleado para el tratamiento de problemas respiratorios, principalmente en animales que no serán destinados a la ingesta humana. Además de facilitar la respiración, reduce la acumulación de grasa en el cuerpo y favorece el crecimiento muscular del mismo. El fármaco es utilizado por algunos productores para engordar más rápido su ganado; como este se contamina, ocasiona intoxicaciones a las personas que lo consumen. El uso del clenbuterol en la ganadería está prohibido en diversos países, incluyendo México, pero a pesar de esta prohibición se han reportado intoxicaciones. La detección del clenbuterol en México primordialmente está a cargo de la COFEPRIS y el SENASICA. Los laboratorios principalmente utilizan el método de ELISA para su cuantificación. Una alternativa a este método, es el uso de biosensores electroquímicos. Estos presentan algunas ventajas como detección simple y rápida, bajo costo, entre otras. El objetivo del presente trabajo es desarrollar un modelo matemático para la detección del clenbuterol, utilizando un análisis voltamperométrico; con el uso de electrodos serigrafiados y rangos de trabajo significativos para el pH, el potencial y la velocidad de barrido; obtenidos con un diseño óptimo de experimentos. La muestra de estudio utilizada es clenbuterol (CAS: 21898-19-1) con una pureza mayor al 95%.

Palabras clave: Clenbuterol, Electrodo serigrafiado, Voltametría cíclica.

Summary

Clenbuterol is a drug used for the treatment of respiratory problems, mainly in animals that will not be destined for human consumption. In addition to facilitating breathing, it reduces the accumulation of fat and promotes muscle growth in the body. The drug is used by some producers to fatten their cattle faster; as it is contaminated, it causes intoxications to the people who consume it. The use of clenbuterol in cattle raising is prohibited in several countries, including Mexico, but despite this prohibition, intoxications have been reported. The detection of clenbuterol in Mexico is primarily the responsibility of COFEPRIS and SENASICA. Laboratories mainly use the ELISA method for its quantification. An alternative to this method is the use of electrochemical biosensors. These have some advantages such as simple and rapid detection, low cost, among others. The objective of the present work is to develop a mathematical model for the detection of clenbuterol, using a voltammetric analysis; with the use of screen-printed electrodes and significant working ranges for pH, potential and sweep speed; obtained with an optimal design of experiments. The study sample used is clenbuterol (CAS: 21898-19-1) with a purity greater than 95%.

Keywords — Clenbuterol, Screen-printed electrode, Cyclic Voltammetry.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

A mi familia que siempre me apoya en todas mis locuras.

Agradecimientos

Debo agradecer de manera especial a la Universidad Autónoma de Querétaro, que me brindó la oportunidad para poder realizar mis estudios de maestría, a través de la Dirección de Investigación y Posgrado de la Facultad de Ingeniería.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de posgrado de tiempo completo.

Al Centro de Estudios Académicos Sobre Contaminación Ambiental (CEACA) de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, que a través del Dr. Adrián Sosa Rodríguez, me permitió el uso de sus laboratorios y equipos para desarrollar parte de la investigación.

Quiero expresar también mi más sincero agradecimiento a la Dra. Aurora Femat Díaz por la confianza, apoyo y orientación brindados para la realización de este proyecto. También, le agradezco el haberme facilitado los medios suficientes para llevar a cabo algunas de las actividades propuestas. Pero en especial, le agradezco el compartirme parte de sus conocimientos y experiencias, lo que impulsó mi desarrollo profesional.

Agradezco de manera muy especial al Dr. Adrián Sosa Domínguez por su importante aporte y participación activa en el desarrollo de este proyecto. Debo destacar, por encima de todo, su disponibilidad y paciencia que siempre mostró. Muchas gracias por permitirme vivir una experiencia tan importante para mi formación.

A cada uno de mis sinodales, MI Ilse Vega Rivas, MAP José Agustín Martínez Rodríguez y MI Javier García Pérez por contribuir al desarrollo de esta investigación con sus comentarios, revisiones y disponibilidad.

Un agradecimiento enorme a todos los profesores de la maestría, por compartirme sus conocimientos y experiencias siempre enriquecedoras.

A mis compañeros de generación Alan, David y Ricardo, muchas gracias por su incomparable amistad y por todas las aventuras vividas en estos años. Jamás olvidaré que desde las primeras semanas nos convertimos en “los chavos de atrás”, un placer haber coincidido con ustedes.

A Yuri, Edith, Carlos, Denzel y Sandy, compañeros de otras generaciones, muchas gracias por el apoyo brindado, pero sobre todo por su gran amistad y los grandes momentos que compartimos.

A Dany, mi compañera y amiga de laboratorio, con quien pasé grandes momentos; muchísimas gracias por todas esas pláticas que me hicieron más amenas esas sesiones interminables de laboratorio.

Muchas gracias a todos mis amigos, a quienes he conocido en diferentes etapas de mi vida, en verdad les agradezco los buenos deseos y el apoyo brindado.

Finalmente, el agradecimiento más profundo es para mi familia. Sin su apoyo, colaboración e inspiración habría sido imposible alcanzar esta meta. A mi madre Rosalina por su gran ejemplo de lucha y valentía; a mi hermana Brisa por su osadía; a mi hermano Diego por su audacia; a mi sobrina Brisa por su alegría; a mis abuelitos Margarita y Salvador por su infinita generosidad.

Índice General

| | |
|--|------|
| Resumen..... | i |
| Summary..... | ii |
| Dedicatoria..... | iii |
| Agradecimientos | iv |
| Índice General..... | vi |
| Índice de Tablas..... | viii |
| Índice de Figuras | ix |
| I. Introducción | 1 |
| II. Antecedentes..... | 4 |
| 2.1 Clenbuterol..... | 4 |
| 2.2 Métodos actuales de detección..... | 5 |
| 2.3 Detección electroquímica..... | 7 |
| 2.3.1 Voltamperometría cíclica..... | 9 |
| 2.3.2 Sistema de tres electrodos..... | 12 |
| 2.4 Estudios previos..... | 14 |
| 2.5 Diseño factorial | 17 |
| 2.6 Desarrollo de una metodología | 21 |
| 2.7 Costo para un electrodo serigrafado | 23 |
| III. Hipótesis..... | 24 |
| IV. Objetivos..... | 25 |
| 4.1 Objetivo general | 25 |
| 4.2 Objetivos específicos | 25 |
| V. Material y Métodos | 26 |
| 5.1 Materiales, Equipos y Reactivos: | 28 |
| 5.1.1 Reactivos: | 28 |
| 5.1.2 Equipos | 29 |
| 5.1.3 Materiales | 29 |
| 5.1.4 Equipo de protección personal..... | 29 |
| 5.2 Determinación de la solución electrolítica | 30 |

| | | |
|-------|--|----|
| 5.3 | Diseño factorial 2^3 | 31 |
| 5.4 | Curva de calibración | 32 |
| 5.5 | Soluciones de trabajo..... | 33 |
| 5.6 | Verificación del modelo matemático..... | 34 |
| 5.6.1 | Límite de detección y límite de cuantificación | 34 |
| 5.6.2 | Exactitud | 34 |
| 5.6.3 | Precisión | 34 |
| 5.6.4 | Intervalo | 35 |
| 5.7 | Manejo de residuos..... | 35 |
| VI. | Resultados y discusión | 36 |
| 6.1 | Solución amortiguadora | 36 |
| 6.2 | Diseño Factorial 2^3 | 41 |
| 6.3 | Modelo matemático (Curva de calibración)..... | 47 |
| 6.4 | Análisis de muestra problema | 53 |
| 6.5 | Verificación del modelo matemático..... | 56 |
| VII. | Conclusiones | 57 |
| VIII. | Referencias | 58 |
| IX. | Anexos..... | 67 |
| 9.1 | ANEXO 1: Datos de seguridad del clenbuterol | 67 |
| 9.2 | ANEXO 2: Calibración de la balanza analítica. | 76 |
| 9.3 | ANEXO 3: Calibración del potenciómetro. | 79 |
| 9.4 | ANEXO 4: Calibración y uso del potencióstato. | 82 |

Índice de Tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Rango lineal y límite de detección del clenbuterol en diversas investigaciones. | 17 |
| Tabla 2: Orden estándar para el diseño factorial | 19 |
| Tabla 3. Soluciones amortiguadoras 0.1 M..... | 30 |
| Tabla 4. Diseño factorial 2^3 codificado..... | 32 |
| Tabla 5. Soluciones para la curva de calibración con concentraciones finales de Clenbuterol.HCl en mg/L..... | 33 |
| Tabla 6. Lecturas máximas de las zonas de interés en los voltamperogramas. | 38 |
| Tabla 7. Diseño factorial 2^3 con los resultados obtenidos en cada corrida experimental. | 41 |
| Tabla 8. Análisis de la varianza del diseño factorial 2^3 | 42 |
| Tabla 9. Coeficientes del modelo..... | 44 |
| Tabla 10. Datos utilizados para crear la curva de calibración con los datos obtenidos de los voltamperogramas correspondientes. | 50 |
| Tabla 11. Porcentaje de recuperación de la muestra problema en el primer ciclo. | 55 |
| Tabla 12. Porcentaje de recuperación de la muestra problema en el segundo ciclo. | 56 |
| Tabla 13. Porcentaje de recuperación de la muestra problema en el tercer ciclo. . | 56 |
| Tabla 14. Resultados de las lecturas en la balanza analítica..... | 77 |

Índice de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Estructura tridimensional de la molécula del clenbuterol | 4 |
| Figura 2. Representación de un voltamperograma cíclico típico en EEUU..... | 10 |
| Figura 3. Electrodo Serigrafiado | 14 |
| Figura 4. Diferencia de comparar entre y dentro de valores. | 18 |
| Figura 5. Nomenclatura del diseño factorial..... | 19 |
| Figura 6. Mecanismo de oxidación del clenbuterol | 27 |
| Figura 7. Diagrama general para la metodología..... | 28 |
| Figura 8. Potenciostato-Galvanostato marca Bio-Logic VSP-300 conectado a la computadora..... | 29 |
| Figura 9. Lectura del potenciómetro dos soluciones amortiguadoras. | 31 |
| Figura 10. Muestra problema. | 34 |
| Figura 11. Voltamperograma cíclico de las soluciones amortiguadoras sin clenbuterol a una velocidad de barrido de 100 mV/s. | 36 |
| Figura 12. Voltamperograma cíclico a una velocidad de barrido de 100 mV/s, para las soluciones amortiguadoras con una concentración de 150 mg/L de clenbuterol. | 37 |
| Figura 13. Voltamperograma cíclico con las tres zonas de interés, para una concentración de 150 mg/L de clenbuterol. | 38 |
| Figura 14. Lecturas en el pico de oxidación de la molécula de clenbuterol (Zona A). | 39 |
| Figura 15. Lecturas del pico de reducción del dímero de clenbuterol (Zona B). | 40 |
| Figura 16. Lecturas del pico de oxidación del dímero de clenbuterol (Zona C). | 40 |
| Figura 17. Desviación estándar y media de cada corrida experimental. | 42 |
| Figura 18. Modelo lineal para los residuos..... | 43 |
| Figura 19. Gráfica de efectos principales..... | 46 |
| Figura 20. Diagrama de efectos en los factores..... | 47 |
| Figura 21. Voltamperograma cíclico con tres ciclos completos, para una concentración de 150 mg/L con una velocidad de barrido de 100 mV/s. | 48 |
| Figura 22. Voltamperogramas cíclicos del primer ciclo de las soluciones utilizadas para la curva de calibración. | 49 |
| Figura 23. Voltamperogramas cíclicos del segundo ciclo de las soluciones utilizadas para la curva de calibración. | 49 |

| | |
|---|----|
| Figura 24. Voltamperogramas cíclicos del tercer ciclo de las soluciones utilizadas para la curva de calibración. | 50 |
| Figura 25. Curva de calibración para el primer ciclo. | 51 |
| Figura 26. Curva de calibración para el segundo ciclo. | 52 |
| Figura 27. Curva de calibración para el tercer ciclo. | 53 |
| Figura 28. Voltamperogramas cíclicos con el primer ciclo de la muestra problema. | 54 |
| Figura 29. Voltamperogramas cíclicos con el segundo ciclo de la muestra problema. | 54 |
| Figura 30. Voltamperogramas cíclicos con el tercer ciclo de la muestra problema. | 55 |
| Figura 31. Ubicación de los 5 puntos en el plato de la balanza. | 77 |
| Figura 32. Resultados de las lecturas en la balanza analítica. | 78 |
| Figura 33. Primera parte del instructivo del potenciómetro | 79 |
| Figura 34. Segunda parte del instructivo del potenciómetro | 80 |
| Figura 35. Soluciones estándares utilizadas en la calibración del potenciómetro. | 80 |
| Figura 36. Lecturas de las soluciones estándares utilizadas en la calibración del potenciómetro | 81 |
| Figura 37. Manual de Bio-Logic para el modelo VMP-300. | 82 |
| Figura 38. Pantalla principal del EC-Lab V10.44 | 83 |
| Figura 39. Pestaña de los dispositivos conectados. | 83 |
| Figura 40. Estado de la conexión de los dispositivos. | 83 |
| Figura 41. Pestaña de la configuración de parámetros. | 84 |
| Figura 42. Ventana con las técnicas voltamperométricas disponibles. | 84 |
| Figura 43. Ventana con la técnica de voltametría cíclica. | 85 |
| Figura 44. Pestaña de la configuración de parámetros con la técnica insertada. | 85 |
| Figura 45. Parámetros de la técnica | 86 |
| Figura 46. Electrodo serigrafiado conectado al potencióstato. | 86 |
| Figura 47. Pantalla principal al finalizar el análisis voltamperométrico. | 87 |

I. Introducción

El clenbuterol es un fármaco que está prohibido en la producción agropecuaria de países como Estados Unidos, Canadá, China, Japón, Corea, incluida la Unión Europea, entre otros (Kuiper et al., 1998; Mitchell and Dunnavan, 1998). En el año de 1999, México en el apartado 4.11 de la NOM-061-ZOO-1999 prohibió el empleo de diversos ingredientes activos, entre los que se encuentra el clenbuterol, para la formulación de productos alimenticios destinados para el consumo por animales, que posteriormente serán utilizados para el consumo humano.

El consumo anual de carne en México, oscila en 65 kilos por persona, de acuerdo al Consejo Mexicano de la Carne (COMECARNE). La carne de ganado bovino es uno de los productos más consumidos a nivel nacional. Su alta demanda ha obligado a los ganaderos a buscar nuevos métodos para eficientar la producción de carne y así poder satisfacer la demanda; sin embargo, se ha descuidado la calidad e inocuidad de la misma (Ji et al., 2018).

Existe evidencia del uso inadecuado del clenbuterol en el desarrollo del ganado y en atletas profesionales, además, la intoxicación alimentaria derivada del clenbuterol se ha reportado en muchos países, incluyendo México (Kabiraz et al., 2018). En el Mundial Sub 17 del año 2011 celebrado en México; 109 de 208 futbolistas de 24 países que participaron en dicho evento, mostraron restos de clenbuterol en la orina, reprobando sus pruebas de dopaje; la razón fue que todos habían comido carne mexicana contaminada (Thevis et al., 2013).

Cuando una persona consume alimentos contaminados con clenbuterol, su organismo no es capaz de eliminarlo por completo porque quedan residuos en diferentes tejidos. Estos residuos pueden provocar dolor de cabeza, dolor muscular, temblores musculares, nerviosismo e intoxicación que puede ocasionar la muerte (Davis et al., 2009; Wei et al., 2018).

La Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) y el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) son agencias de gobierno que existen en nuestro país. Estas agencias se encargan de realizar diversos procedimientos de inspección y supervisión en los rastros y establecimientos industriales dedicados a producir, almacenar, sacrificar, procesar y distribuir todo tipo de carnes, así como sus derivados.

El SENASICA otorga la certificación Tipo Inspección Federal (TIF) a los establecimientos que cumplen con los requisitos establecidos. Un requisito indispensable es que la carne esté libre de clenbuterol. De acuerdo al SENASICA (junio 2020) en México existen 861 rastros donde se realiza vigilancia por parte de las entidades federativas y 468 establecimientos que cuentan con la certificación TIF. Del total de establecimientos con certificación TIF, 124 realizan sacrificios y solo 65 pueden sacrificar ganado bovino.

La NOM-EM-015-ZOO-2002 establece tres métodos para la determinación de los residuos de clenbuterol, es decir, el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA acrónimo del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), la cromatografía de gases (GC acrónimo del inglés *Gas Chromatography*) y la cromatografía de líquidos (LC acrónimo del inglés *Liquid Chromatography*).

Estos métodos tienen ciertas ventajas, como una alta sensibilidad, gran precisión y son muy específicos; pero también presentan algunas deficiencias. La GC y la LC necesitan mucho tiempo, debido a los pasos de purificación de la muestra; además de que requieren instrumentos especializados y muy costosos. Para el método ELISA, los antígenos o los anticuerpos utilizados pueden arrojar como resultado un falso positivo en algunas ocasiones.

La escasez de personal altamente capacitado e instrumentos costosos, limita la aplicación de estos métodos en áreas rurales; donde se sospecha que el clenbuterol se usa con mayor frecuencia. Implementar metodologías modernas para

dicho análisis, puede ofrecer soluciones rápidas frente a la problemática planteada. Es importante establecer una metodología estable, sensible, específica, pero sobre todo sencilla; que pueda estar disponible en todas las áreas para la detección de residuos de clenbuterol.

Por otro lado, se conoce que la familia de los β_2 agonistas adrenérgicos, a la cual pertenece el clenbuterol, contienen grupos electroactivos; por lo que se pueden detectar electroquímicamente. Específicamente para el clenbuterol, este grupo está presente en la amina primaria. Por lo que un biosensor electroquímico combinado con electrodos serigrafados, puede ser una alternativa a considerar. Esta alternativa ofrece ventajas como sencillez, bajo precio, así como, portabilidad del equipo; con la cual se podría realizar el análisis para la detección del clenbuterol fuera de un laboratorio.

II. Antecedentes

2.1 Clenbuterol

El *1-(4-amino-3,5-dicloro-fenil)-2-(tert-butilamino)etanol* y con fórmula química $C_{12}H_{18}N_2Cl_2O$ (IUPAC, 1979) se conoce comúnmente como clenbuterol. Su molécula se representa en la Figura 1. En esta imagen se pueden observar los elementos químicos que conforman la molécula indicados con diferentes colores; el carbono en negro, el oxígeno en rojo, el nitrógeno en azul, el cloro en verde y finalmente, el hidrógeno en gris.

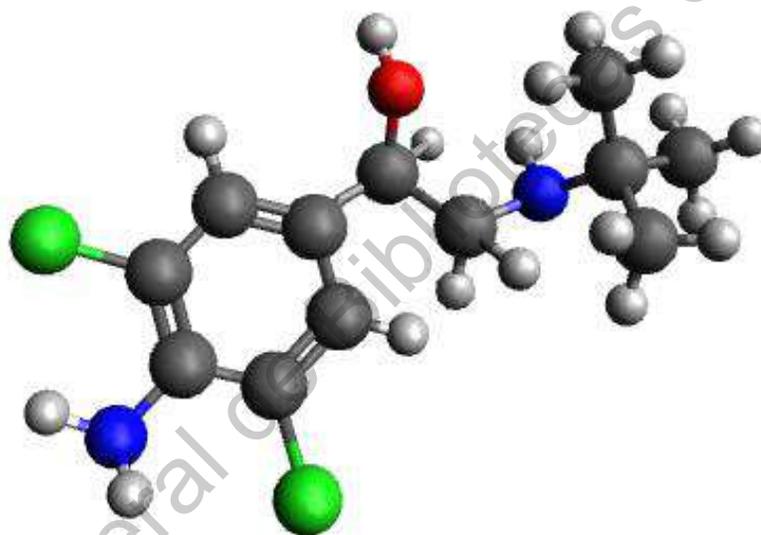


Figura 1. Estructura tridimensional de la molécula del clenbuterol (Fuente propia).

El clenbuterol es uno de los 11 fármacos pertenecientes a la familia de los β_2 agonistas adrenérgicos, al igual que el salbutamol, el fenoterol, el formoterol, entre otros. El uso principal de estos compuestos es como broncodilatadores y se utilizan en el tratamiento del asma o de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Billington et al., 2016; Huang et al., 2018). El clenbuterol estimula la liberación de mediadores inflamatorios, en especial los mastocitos, y ayuda a disminuir la producción de moco de las células caliciformes (Papich, 2016).

La dosis recomendada en la salud humana es de 10 a 20 μg de clenbuterol dos veces al día por vía oral. Los efectos de su absorción en el cuerpo comienzan a ser visibles a partir de los 30 minutos, teniendo un máximo rendimiento a las 2 horas. La eliminación del fármaco ocurre principalmente por vía renal, con una semivida de 25 a 35 horas. Cabe señalar que este fármaco tiene una LD_{50} (dosis letal media) de 80–180 mg/kg.

El clenbuterol se distingue de otros miembros de su familia porque resiste la conjugación del éster O-sulfato. Esto hace que se alargue la duración de sus efectos en el organismo que lo consume. El clenbuterol es estable y se descompone solamente a temperaturas superiores a los 172 °C (Yang et al., 2017). Su absorción provoca al mismo tiempo el desarrollo de músculo y la pérdida de grasa; que son causados por la leptina y la adiponectina que estimulan el efecto anabólico y el efecto lipolítico (Papich, 2016).

Debido al efecto de reparto que el clenbuterol provoca, se ha utilizado de manera ilegal para aumentar el peso en animales como el ganado bovino (Yan et al., 2015). Como este ganado se destina para el consumo, el uso del clenbuterol trae consecuencias en la salud de los humanos. Entre algunos de los síntomas que se presentan en su consumo se encuentran: Vómito, dolor de cabeza, dolor en el pecho, taquicardias, hipomagnesemia, hipopotasemia, hipofosfatemia, movimientos discinéticos e intoxicación, que en algunos casos puede ocasionar la muerte (Aronson, 2016; Billington et al., 2016).

2.2 Métodos actuales de detección

En los animales, el clenbuterol se concentra en diferentes tejidos; los más representativos para la toma de muestras son hígado, músculo, orina, riñón y retina (Smith and Paulson, 1997; Lv et al., 2017). Para detectar este residuo se requieren técnicas con elevada sensibilidad y selectividad (Huang et al., 2018).

Actualmente, los métodos más utilizados son el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, la cromatografía de gases y la cromatografía de líquidos. La NOM-EM-015-ZOO-2002, en su apartado 5.2, establece solamente las técnicas anteriores como los métodos analíticos oficiales para la detección de los β -agonistas. Estos métodos tienen alta sensibilidad, gran precisión y son muy específicos (Li et al., 2013).

El método de ELISA, en términos generales, es una técnica de inmunoensayo, donde un antígeno inmovilizado se detecta a través de un anticuerpo unido a una enzima; esta unión genera una característica detectable, por ejemplo, un cambio de color. La utilización de este método para la detección del clenbuterol inició a finales del siglo XX (Meyer et al., 1991; Degand et al., 1992; Hahnau and Jülicher, 1996). En los últimos años se han incorporado mejoras al procedimiento, como la combinación de la dispersión Raman mejorada en superficie, utilizando nano partículas de plata (Liang et al., 2015).

Existen en el mercado kits de ELISA para la determinación del clenbuterol. Estos son económicos, portátiles y fáciles de usar, en comparación con la cromatografía. Sin embargo, los métodos relacionados con el ELISA son susceptibles, ya que pueden presentar reacciones cruzadas inmunológicas y problemas relacionados con la temperatura y el pH; debido a sus defectos en macromoléculas biológicamente activas y respuestas inmunes (Ge et al., 2018).

Las técnicas de cromatografía separan compuestos mediante la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles; una estacionaria, en este caso sólida, y una fase móvil, líquida o gaseosa. En ambas cromatografías, el soluto se adsorbe en la superficie de las partículas sólidas y el equilibrio entre el estado adsorbido y la solución, es la causa de la separación de las moléculas del soluto (Dugheri et al., 2018).

La GC es una técnica donde la muestra se volatiliza; para llevar a cabo la elución se utiliza un gas inerte como fase móvil, por ejemplo, el helio. La fase móvil

no reacciona con las moléculas del clenbuterol, porque su única función es transportarlo a través de la columna capilar que por lo general está hecha de sílice; que es la fase fija. Finalmente, el fluido obtenido de la columna se introduce en la fuente de iones del detector selectivo de masas y con la ayuda de un software se extraen los datos del procedimiento (Jiang and Ni, 2015; Li et al., 2016).

La LC es una técnica donde la fase móvil es un líquido o una mezcla de varios líquidos; para el caso de los β agonistas, se puede utilizar una solución de acetonitrilo con ácido fórmico al 0.1% o una solución de acetato de amonio 10 mM con ácido fórmico al 0.1% (Li et al., 2015). La muestra se fija al soporte sólido debido a su afinidad electrostática, ya que se utilizan intercambiadores iónicos con sitios activos con carga negativa o positiva que separan la muestra de la mezcla (Kecskemeti and Gaspar, 2018). Los compuestos de la fase móvil, que están libres por más tiempo, avanzan rápidamente con el flujo de la misma; los que son retenidos en la fase estacionaria, avanzan menos, y tardan más en salir (Sung et al., 2015).

La GC y la LC se utilizan comúnmente en laboratorios para la detección de clenbuterol, debido a ciertas ventajas como la precisión y la selectividad (Ge et al., 2018). Sin embargo, por la complejidad de la técnica se requiere de personal especializado. La muestra requiere un pretratamiento que conlleva tediosos pasos de purificación; además, los instrumentos utilizados representan un alto costo (Wei et al., 2018).

2.3 Detección electroquímica

Se conoce que la familia de los β_2 agonistas adrenérgicos contienen grupos electroactivos, por lo que se pueden detectar electroquímicamente (Yang et al., 2014; Wong et al., 2015; Chen et al., 2016; Dou et al., 2016; Talib et al., 2016). Debido a esto, se puede considerar el uso de biosensores para su identificación. Los biosensores son dispositivos analíticos que utilizan materiales biológicos sensibles para identificar diversas moléculas. Para determinar la presencia y la

cantidad de la molécula, el biosensor utiliza una señal conveniente para su registro y evaluación (Patra et al., 2018).

Un biosensor básico cuenta con tres componentes; un elemento de reconocimiento, un transductor físico y un sistema electrónico (Korotkaya, 2014). En particular, un biosensor electroquímico es un dispositivo integrado que proporciona información analítica, ya sea cuantitativa o semicuantitativa, y utiliza una estrategia de biorreconocimiento; por ejemplo, un electrodo o un transistor de efecto de campo (Labib et al., 2016). Los biosensores electroquímicos tienen ventajas como detección simple y rápida, bajo costo, operación adecuada, y excelente sensibilidad y selectividad; por lo que se han utilizado ampliamente en el análisis de seguridad alimentaria (Lv et al., 2017; Ji et al., 2018).

Los tipos de biosensores electroquímicos para la detección del clenbuterol se clasifican de acuerdo a la magnitud de medición que representa el mensurando. En este caso son: Voltamétrico / amperométrico, impedimétrico, conductométrico, potenciométrico y basado en un transistor de efecto de campo (Labib et al., 2016). En particular, los biosensores voltamétricos / amperométricos miden la corriente proveniente de la electrólisis causada por la oxidación o reducción de especies electroactivas. Esta corriente se logra aplicando una diferencia de potencial a un electrodo de trabajo contra un electrodo de referencia. La corriente observada es proporcional al volumen de concentración de las especies electroactivas o al ritmo de su desaparición (Korotkaya, 2014).

Para las diferentes combinaciones de los parámetros electroquímicos, como diferencia de potencial, corriente, carga y tiempo; existe una larga lista de técnicas para la detección de especies electroactivas, incluido el clenbuterol, entre ellas: Voltamperometría de barrido lineal, voltamperometría de corriente alterna, voltamperometría cíclica, cronoamperometría, cronocoulometría, cronopotenciometría, métodos de pulso, voltamperometría de pulso diferencial, voltamperometría de onda cuadrada, técnicas de preconcentración y decaído,

voltamperometría de extracción anódica, voltamperometría de extracción catódica y voltamperometría de desmontaje por adsorción (Labib et al., 2016).

2.3.1 Voltamperometría cíclica

La voltamperometría cíclica (CV acrónimo del inglés *Cyclic Voltammetry*) es una técnica electroquímica muy versátil que se emplea en diferentes estudios; entre los que se encuentra la detección del clenbuterol. La CV analiza el potencial de un electrodo sumergido, inmóvil desde un potencial inicial hasta un valor final para posteriormente obtener el análisis inverso. Esto da un barrido cíclico de potencial vs corriente. El análisis se puede llevar a cabo con un ciclo parcial, un ciclo completo o una serie de ciclos (Elgrishi et al., 2017).

En un análisis de CV, el potencial aplicado entre el electrodo de referencia y el electrodo de trabajo aumenta de forma lineal con el tiempo; lo que se conoce como velocidad de barrido (v). Simultáneamente, la corriente se mide entre el electrodo de trabajo y el electrodo auxiliar, resultando datos que se trazan como corriente (i) y potencial (E).

La CV arroja como resultado característico un voltamperograma, como el que se representa en la Figura 2. Este es una representación gráfica de la variación de la corriente frente al potencial aplicado; el cual da información precisa de las propiedades electroquímicas individuales de los sistemas de reducción-oxidación (Mirceski et al., 2016). La magnitud de las corrientes de reducción-oxidación y la forma del voltamperograma, son muy dependientes de la concentración del analito y de las condiciones experimentales.

En un voltamperograma, el eje de las abscisas representa el potencial aplicado, mientras que el eje de las ordenadas es la corriente resultante. La flecha indica la dirección en la que se explora el potencial para la obtención de datos, es decir, indica el inicio y la dirección de barrido del primer segmento; a una determinada velocidad de barrido. El análisis es hacia adelante donde el potencial

es barrido negativamente desde el potencial inicial en el punto A, al potencial final en el punto D y a esto se conoce como traza catódica. La dirección de análisis se invierte y el potencial se barre positivamente al punto G; a esto se conoce como traza anódica.

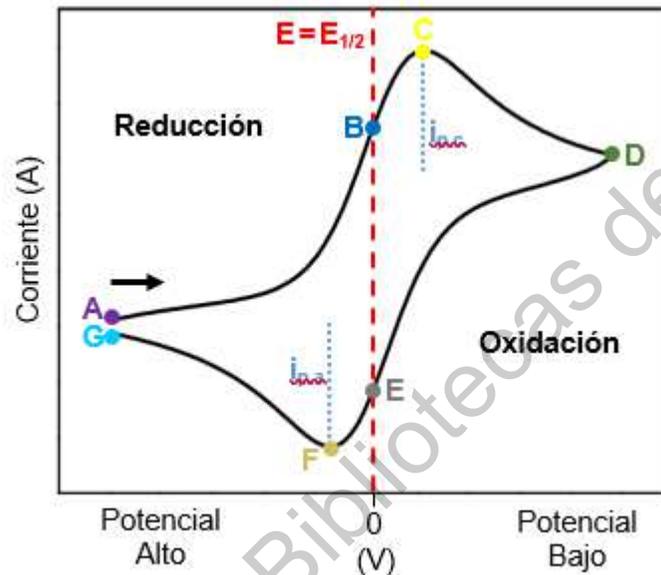


Figura 2. Representación de un voltamperograma cíclico típico en EEUU (Elgrishi et al., 2017).

El equilibrio químico mostrado en un voltamperograma se describe mediante la ecuación de Nernst (Ec. 1):

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{Ox}{Red} \quad Ec. (1)$$

La ecuación de Nernst relaciona el potencial de una célula electroquímica (E) con el potencial estándar de una especie (E^0) y las actividades relativas del analito oxidado (Ox) y reducido (Red) del sistema en equilibrio. En la ecuación, F es la constante de Faraday, R es la constante del gas universal, n es el número de electrones y T es la temperatura (Elgrishi et al., 2017; Ge et al., 2018).

El potencial formal es específico para las condiciones experimentales empleadas y suele estimarse con el valor $E_{1/2}$ determinado experimentalmente; es

decir, el potencial promedio entre los puntos F y C (Lv et al., 2017). La ecuación de Nernst proporciona una forma eficaz de predecir cómo responde un sistema, ya sea a un cambio de concentración de especies en solución o un cambio en el potencial del electrodo. Cuando un analito es analizado en potenciales negativos, se reduce en el electrodo, donde se obtiene una corriente que podemos medir.

El potencial se aplica negativamente desde el punto A al punto D, el analito se agota constantemente cerca del electrodo a medida que se reduce. En el punto C, se observa la corriente catódica máxima; la corriente es obtenida por el suministro de analito adicional a través de la difusión de la solución. El volumen de solución en la superficie del electrodo que contiene el analito reducido, se conoce como capa de difusión, que aumenta a lo largo del análisis. La capa de difusión disminuye el transporte del analito hacia abajo en el electrodo. Por lo tanto, al analizar los potenciales más negativos, la velocidad de difusión del analito de la solución a la superficie del electrodo se vuelve más lenta; lo que resulta en una disminución de la corriente a medida que continúa el análisis, este comportamiento se observa del punto C al punto D.

Cuando se alcanza el potencial final en el punto D, la dirección del análisis se invierte y el potencial se analiza en dirección positiva. Mientras que la concentración del analito en la superficie del electrodo se agotó, la concentración del analito reducido en la superficie del electrodo aumentó, cumpliendo con la ecuación de Nernst.

El analito reducido presente en la superficie del electrodo se oxida de nuevo, a medida que el potencial aplicado se vuelve más positivo. Las concentraciones de ambos en la superficie del electrodo son iguales en los puntos B y E, siguiendo la ecuación de Nernst, $E = E_{1/2}$. Esto corresponde al potencial a medio camino entre los dos picos observados en los puntos C y F. Los dos picos están separados debido a la difusión del analito hacia y desde el electrodo. La

diferencia entre los potenciales del pico anódico ($i_{p,a}$) y catódico ($i_{p,c}$) se conoce como separación pico a pico (ΔE_p).

Uno de los factores que debe tenerse en cuenta en CV es la velocidad de barrido, porque controla la rapidez con la que se analiza el potencial aplicado. Las velocidades de barrido más rápidas conducen a una disminución en el tamaño de la capa de difusión; como consecuencia, se observan corrientes más altas. Para los procesos de transferencia de electrones electroquímicamente reversibles que involucran especies redox de difusión libre, la ecuación de Randles-Sevcik (Ec. 2) describe cómo la corriente de pico i_p (A) aumenta linealmente con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido v (mV/s), donde n es el número de electrones transferidos en el evento redox, A es el área de superficie del electrodo (cm^2), D_o es el coeficiente de difusión del analito oxidado (cm^2/s) y C^o es la concentración del analito (mol/cm^3) (Ge et al., 2018).

$$i_p = 0.446nFAC^o \sqrt{\frac{nFvD_o}{RT}} \quad \text{Ec. (2)}$$

La ecuación de Randles-Sevcik proporciona información acerca de si un analito se difunde libremente en la solución. Como los analitos se pueden absorber en la superficie del electrodo, es esencial evaluar si el analito permanece homogéneo en la solución antes de analizar su reactividad (Zhai et al., 2015).

2.3.2 Sistema de tres electrodos

La técnica de CV utiliza una configuración de tres electrodos; es decir, un electrodo de trabajo, un electrodo auxiliar y un electrodo de referencia (Ji et al., 2018). Mientras la corriente fluye entre el electrodo de trabajo y el auxiliar, el electrodo de referencia se usa para medir con precisión el potencial aplicado en relación con una reacción de referencia estable.

Un electrodo de referencia tiene un potencial de equilibrio bien definido y estable. Se utiliza como un punto de referencia contra el cual se puede medir el

potencial de otros electrodos en una celda electroquímica. Algunos electrodos de referencia comunes utilizados en medios acuosos incluyen el electrodo de calomel saturado, el electrodo de hidrógeno estándar y el electrodo de Ag/AgCl.

Cuando se aplica un potencial al electrodo de trabajo de manera que pueda ocurrir una reducción u oxidación del analito, la corriente comienza a fluir. El propósito del electrodo auxiliar es completar el circuito eléctrico. La corriente se registra como flujo de electrones entre ambos electrodos. Para garantizar que la cinética de la reacción que se produce en el electrodo auxiliar no inhiba las que se producen en el electrodo de trabajo, el área de superficie del electrodo auxiliar es mayor que el área de superficie del electrodo de trabajo. Al estudiar una reducción en el electrodo de trabajo, se produce una oxidación en el electrodo auxiliar; por lo que, el electrodo auxiliar debe ser lo más inerte posible. Un alambre o disco de platino se usa típicamente como electrodo auxiliar, aunque también están disponibles a base de carbono.

El electrodo de trabajo realiza la oxidación o reducción de interés, por lo que es de suma importancia que la superficie del electrodo sea extremadamente limpia y que su área de superficie esté bien definida. Se utiliza un potencióstato para controlar el potencial aplicado del electrodo de trabajo en función del potencial del electrodo de referencia. El material del electrodo de trabajo se puede variar de un experimento a otro para reducir o promover la adsorción de la superficie de las especies de interés, así como para proporcionar diferentes ventanas potenciales, esto es, la zona útil de trabajo que permite el solvente (Cinti and Arduini, 2017).

La técnica de CV con el uso de electrodos serigrafiados, ofrecen ventajas como sencillez, versatilidad, bajo precio, mínimo volumen de muestra requerido y portabilidad del equipo, lo que permitiría realizar determinaciones en el lugar (Arduini et al., 2016; Dou et al., 2016; Talib et al., 2016). La Figura 3 muestra los diversos componentes de un electrodo serigrafiado; entre los que se encuentran un electrodo auxiliar, un electrodo de trabajo y un electrodo de referencia.

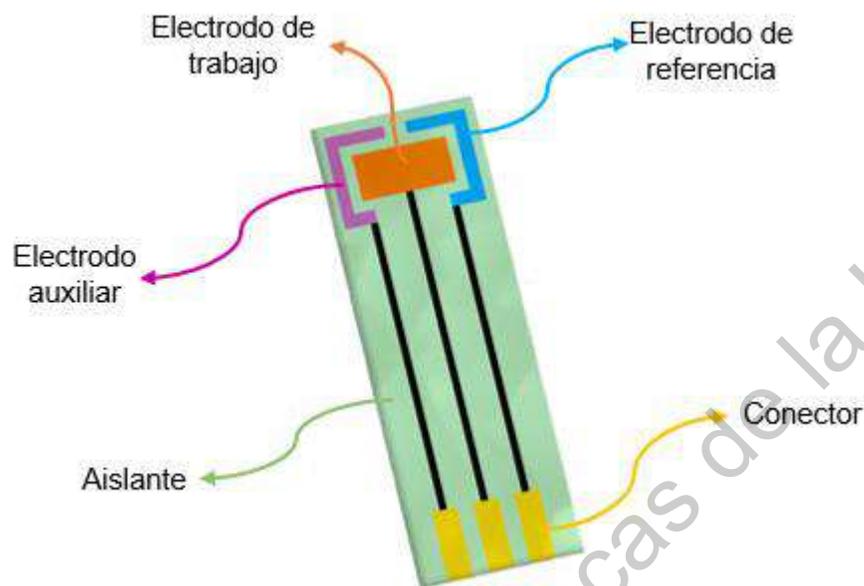


Figura 3. Electrodo Serigrafiado (Fuente propia).

2.4 Estudios previos

Diversas investigaciones (Liu et al., 2010; Liu et al., 2011; Bai et al., 2012; Fan et al., 2012; Gaichore and Srivastava, 2012; Wu et al., 2012; Bo et al., 2013; Lin et al., 2013; Miao et al., 2014; Wang et al., 2014; Yang et al., 2014; Wong et al., 2015; Zhai et al., 2015; Chen et al., 2016; Wei et al., 2016; Zhang et al., 2016; Lv et al., 2017; Yang et al., 2017; Ge et al., 2018; Ji et al., 2018) han utilizado la CV como técnica de detección del clenbuterol; acoplado un sistema de tres electrodos a una estación de trabajo electroquímica, donde la CV se lleva a cabo con diferentes parámetros.

En ciertas investigaciones (Fan et al., 2012; Bo et al., 2013; Lin et al., 2013; Miao et al., 2014; Yang et al., 2014; Wong et al., 2015; Zhai et al., 2015; Wei et al., 2016; Yang et al., 2017) el rango de potencial inicia en un valor negativo y termina en uno positivo. Un claro ejemplo es el siguiente rango: -0.2 a 0.8 V (Zhai et al.,

2015; Yang et al., 2017). Sin embargo, muy pocos han manejado únicamente potenciales positivos, es decir, un rango de potencial ubicado entre 0.6 a 1.5 V (Ge et al., 2018).

En algunos trabajos la velocidad de barrido es 100 mV/s (Liu et al., 2010; Liu et al., 2011; Bai et al., 2012; Lin et al., 2013; Miao et al., 2014; Yang et al., 2014; Zhai et al., 2015; Chen et al., 2016; Wei et al., 2016; Zhang et al., 2016; Lv et al., 2017; Ji et al., 2018), otros utilizan 50 mV/s (Gaichore and Srivastava, 2012; Bo et al., 2013; Wang et al., 2014; Wong et al., 2015; Yang et al., 2017; Ge et al., 2018) o hasta 40 mV/s (Fan et al., 2012; Wu et al., 2012).

Se han aplicado diferentes niveles de pH en distintos trabajos, algunos utilizan un pH ácido (Lin et al., 2013; Wong et al., 2015; Ge et al., 2018); otros un pH cercano a neutro (Miao et al., 2014; Yang et al., 2014; Zhai et al., 2015; Wei et al., 2016; Yang et al., 2017); sin embargo hay quienes prefieren un pH alcalino (Fan et al., 2012; Bo et al., 2013), debido a que este varía de acuerdo a la solución utilizada. La temperatura de la solución que ha sido empleada en estos trabajos (Fan et al., 2012; Bo et al., 2013; Lin et al., 2013; Miao et al., 2014; Wong et al., 2015; Zhai et al., 2015; Yang et al., 2017; Ge et al., 2018) es temperatura ambiente; otros han utilizado 35 °C (Yang et al., 2014) o hay quienes han preferido trabajar a 37 °C (Wei et al., 2016).

El electrodo de trabajo que se utiliza con mayor frecuencia en estas investigaciones es el de carbono vítreo con diversas modificaciones (Liu et al., 2010; Liu et al., 2011; Bai et al., 2012; Fan et al., 2012; Gaichore and Srivastava, 2012; Wu et al., 2012; Lin et al., 2013; Wang et al., 2014; Yang et al., 2014; Wong et al., 2015; Zhai et al., 2015; Lv et al., 2017; Yang et al., 2017; Ge et al., 2018; Ji et al., 2018). Sin embargo, en pocas investigaciones se ha utilizado oro como electrodo de trabajo (Bo et al., 2013; Miao et al., 2014; Chen et al., 2016; Wei et al., 2016; Zhang et al., 2016).

El electrodo de referencia de calomel saturado ha sido utilizado en varios trabajos (Bai et al., 2012; Fan et al., 2012; Wu et al., 2012; Bo et al., 2013; Lin et al., 2013; Wang et al., 2014; Yang et al., 2017; Ge et al., 2018; Ji et al., 2018); mientras que en otros se ha usado el de Ag/AgCl (Liu et al., 2010; Liu et al., 2011; Gaichore and Srivastava, 2012; Miao et al., 2014; Yang et al., 2014; Wong et al., 2015; Zhai et al., 2015; Chen et al., 2016; Wei et al., 2016; Zhang et al., 2016; Lv et al., 2017).

Para el electrodo auxiliar frecuentemente se emplea al Pt (Liu et al., 2011; Bai et al., 2012; Fan et al., 2012; Gaichore and Srivastava, 2012; Wu et al., 2012; Bo et al., 2013; Lin et al., 2013; Miao et al., 2014; Wang et al., 2014; Wong et al., 2015; Zhai et al., 2015; Chen et al., 2016; Zhang et al., 2016; Lv et al., 2017; Yang et al., 2017; Ge et al., 2018; Ji et al., 2018), aunque en algunas ocasiones se puede hacer uso de Ag/AgCl (Wei et al., 2016) o de carbon (Liu et al., 2010; Yang et al., 2014).

El rango lineal y los límites de detección del clenbuterol obtenidos en estas investigaciones son muy variados. Estos se pueden observar en la Tabla 1, donde se indican en la primera y segunda columna respectivamente. El límite de detección más representativo es igual a 0.0027 ppb (Miao et al., 2014); mientras que el límite con menor sensibilidad es apenas de 27.71 ppb (Liu et al., 2010). En el caso del rango lineal, el rango más significativo cuenta con una detección entre 0.0027 – 27.72 ppb (Miao et al., 2014); por otro lado el rango menos específico es de 221.75 – 2,772 ppb (Lin et al., 2013).

Tabla 1. Rango lineal y límite de detección del clenbuterol en diversas investigaciones.

| Límite de detección (ppb) | Rango Lineal (ppb) | Referencia |
|---------------------------|--------------------|---------------------------------|
| 0.0027 | 0.0027 – 27.72 | (Miao et al., 2014) |
| 0.0035 | 0.01 – 5 | (Chen et al., 2016) |
| 0.0055 | 0.01 – 10 | (Zhang et al., 2016) |
| 0.0068 | 0.1 – 10 | (Bai et al., 2012) |
| 0.0069 | 0.01 – 100 | (Ji et al., 2018) |
| 0.02 | 0.1 – 1,000 | (Wei et al., 2016) |
| 0.1 | 1.0 – 20.0 | (Liu et al., 2011) |
| 0.22 | 0.5 – 200 | (Yang et al., 2014) |
| 0.383 | 5.516 – 13,194.24 | (Gaichore and Srivastava, 2012) |
| 0.51 | 7 – 1,000 | (Wong et al., 2015) |
| 0.64 | 1.0 – 26 | (Lin et al., 2013) |
| 1.025 | 16.63 – 6,650 | (Ge et al., 2018) |
| 1.28 | 2.77 – 1,390 | (Zhai et al., 2015) |
| 1.663 | 2.77 – 1,663.14 | (Lv et al., 2017) |
| 1.92 | 10 – 2,000 | (Yang et al., 2017) |
| 6.09818 | 20.789 – 6,929.75 | (Wang et al., 2014) |
| 10 | 20 – 4,000 | (Fan et al., 2012) |
| 12.18 | 2.77 – 22.17 | (Bo et al., 2013) |
| 15 | 25 – 1,000 | (Wu et al., 2012) |
| 27.71 | 221.75 – 2,771.9 | (Liu et al., 2010) |

2.5 Diseño factorial

Todas las investigaciones mencionadas principalmente se enfocan en una variable, la superficie de trabajo, la cual modifican con nanopartículas o nanocompuestos para incrementar el límite de detección. Pero, ¿qué pasaría si en lugar de modificar la superficie de trabajo, se experimentara con las otras variables involucradas? Para lograr esto se puede emplear una metodología que permite estudiar el efecto individual y de interacción de dos o más factores (X) sobre una o más variables de respuesta (Y), la cual se conoce como diseño factorial (Gutiérrez and Vara, 2009).

En la industria, así como en la investigación es frecuente realizar pruebas con el objetivo de resolver un problema, realizar mejoras o validar una idea. Por ejemplo, se pueden realizar cambios en los materiales, métodos o condiciones de operación de un proceso, o en el diseño de un nuevo producto. El diseño de experimentos es la forma más eficaz de realizar pruebas, con la finalidad de obtener datos que, al analizarlos estadísticamente, aporten información objetiva que ayude a resolver las interrogantes planteadas y así lograr la solución de problemas o alcanzar mejoras.

El diseño factorial más utilizado es el que tiene k factores cada uno a dos niveles y estos niveles pueden ser cuantitativos o cualitativos. Una réplica completa de tal diseño requiere $2 \times 2 \times 2 \times \dots \times 2 = 2^k$ observaciones. Como cada factor en el experimento tiene 2 niveles comúnmente se les conoce como nivel bajo y nivel alto (Motgomery, 2013). El diseño más pequeño en este tipo de experimento es el que tiene 2 factores. Es importante realizar réplicas de cada tratamiento o combinación en el experimento ya que esto permite comparar entre valores (datos obtenidos en los diferentes niveles de un factor fijando los demás) y dentro de valores (datos obtenidos de una misma combinación), como se puede apreciar en la Figura 4.

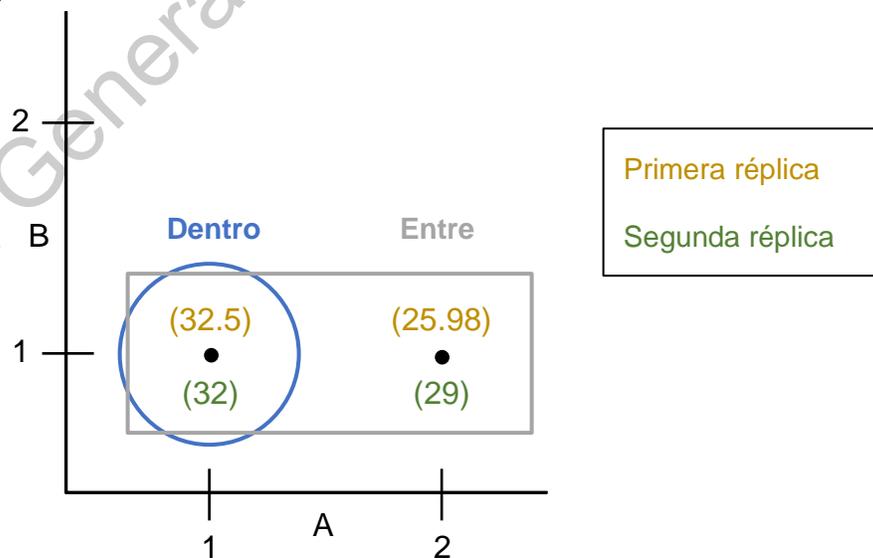


Figura 4. Diferencia de comparar entre y dentro de valores.

También es importante que el orden en que se realizan las corridas sea aleatorio. Muchas veces resulta conveniente escribir los datos en orden descendente de las combinaciones de los tratamientos, como se indica en la Tabla 2. A esta forma de tabular se le conoce como el orden estándar.

Tabla 2: Orden estándar para el diseño factorial

| A | B | Combinación de Tratamientos | Nomenclatura de Tratamientos |
|---|---|-----------------------------|------------------------------|
| - | - | A bajo, B bajo | $a^0b^0 = (1)$ |
| + | - | A alto, B bajo | $a^1b^0 = a$ |
| - | + | A bajo, B alto | $a^0b^1 = b$ |
| + | + | A alto, B alto | $a^1b^1 = ab$ |

Cuando el factor está en su nivel bajo, su exponente es 0; y cuando el factor está en su nivel alto, su exponente es 1 (Montgomery, 2013). Gráficamente esta nomenclatura se representa como en la Figura 5.

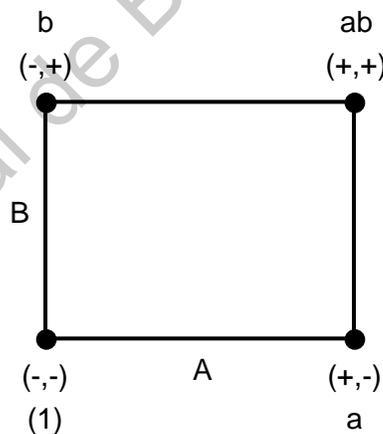


Figura 5. Nomenclatura del diseño factorial.

En un diseño factorial 2^k es fácil expresar los resultados del experimento en términos de un modelo de regresión. Aunque para este tipo de experimentos se pueden usar modelos de efectos como de promedios, el modelo de regresión es

mucho más natural e intuitivo. Un modelo de regresión lineal se puede expresar mediante la ecuación:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \varepsilon \quad \text{Ec. (3)}$$

Donde se expresa un modelo de regresión múltiple con dos factores, el modelo describe un plano en el espacio bidimensional x_1, x_2 . El parámetro β_0 establece la intersección del plano con el eje de las coordenadas. β_1 y β_2 se definen como los coeficientes de regresión parcial. β_1 mide el cambio esperado en y para cada cambio unitario de x_1 cuando x_2 permanece constante. β_2 mide el cambio esperado en y para cada cambio unitario de x_2 cuando x_1 permanece constante (Montgomery, 2013). De forma general, la variable de respuesta y se expresa en relación a k factores. Este modelo es llamado modelo de regresión lineal múltiple:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k + \varepsilon \quad \text{Ec. (4)}$$

A los parámetros $\beta_j = 0, 1, \dots, k$ se les llama coeficientes de regresión. En modelos más complejos es necesario incorporar uno o varios términos de interacción entre los factores considerados, por ejemplo, el modelo de primer orden con dos factores se establece de la siguiente manera:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_{12} x_1 x_2 + \varepsilon \quad \text{Ec. (5)}$$

Antes de considerar los factores dentro del modelo de regresión, es necesario verificar que dichos factores y las interacciones entre las mismas, tengan un peso significativo sobre la variable independiente. Esto se puede establecer en el ANOVA resultante del diseño, considerando el valor de α elegido, que generalmente es igual a 0.05.

Considerando el valor absoluto de los coeficientes de regresión se puede establecer el peso de cada factor; a mayor valor de un coeficiente, mayor peso tiene y viceversa. El signo de dichos coeficientes es un indicador del sentido del cambio en la variable independiente, su valor puede disminuir o aumentar.

Otro criterio a considerar en la calidad del modelo es que para que un modelo de regresión sea aceptable el valor de R^2 debe ser mayor o igual a 0.8 para poder emplearse como un modelo predictivo. Si el valor de R^2 se ubica entre el intervalo de 0.6 a 0.79 el modelo es descriptivo. Si es menor a 0.6 se considera como un modelo inaceptable. Otro criterio a considerar es que los valores de R^2 y $R^2_{ajustada}$ deben ser cercanos entre sí, la diferencia entre los parámetros no debe ser mayor a 1.0. Si los valores son muy distantes entre sí, es un indicador de que el modelo mantiene factores o interacciones de primer orden o de orden superior no significativas; lo cual no es aceptable (Montgomery, 2013).

Finalmente, el valor de p del modelo de regresión debe ser menor al valor de α elegido para considerarse como un modelo aceptable.

2.6 Desarrollo de una metodología

Este proyecto no pretende validar el modelo matemático obtenido, pero es importante mencionar todos los requerimientos necesarios para la obtención de la metodología. Su desarrollo consta de 4 etapas. Primero, realizar una búsqueda bibliográfica; después, definir las condiciones del equipo, de los reactivos y del muestreo; luego, estandarizar el método, es decir, encontrar las condiciones óptimas en las que se desarrolla el experimento; y finalmente, validar el experimento (Andreasson et al., 2015).

Las condiciones óptimas en las cuales se desarrolla un experimento, se pueden determinar mediante el uso de un diseño factorial; porque se perfila como una herramienta válida para implementarse en procesos de manufactura estocásticos, en los que intervienen procesos biológicos (Sánchez-Brenes et al., 2016). La validación consiste en la confirmación, mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del método cumplen con los requisitos particulares para un uso específico. Dichas características son: Linealidad, selectividad, límite de detección, límite de cuantificación, precisión y exactitud (Andreasson et al., 2015).

El límite de cuantificación es la menor cantidad de analito en una muestra que puede determinarse con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones del experimento establecidas. El límite de detección es la mínima cantidad del analito que puede detectarse en una muestra, aunque no necesariamente se puede cuantificar, bajo las condiciones del experimento indicadas. El análisis de muestras con concentraciones conocidas del analito, se puede utilizar para establecer la concentración mínima a la cual el analito puede detectarse o cuantificarse en forma confiable (Shrivastava and Gupta, 2011).

La selectividad en un método analítico, se define como la capacidad de evaluar de manera inequívoca al analito en presencia de otros componentes como pueden ser impurezas. La linealidad de un método analítico es su capacidad para obtener resultados que sean proporcionales de manera directa, o determinados mediante una ecuación matemática apropiada, para la concentración del analito en muestras con un intervalo establecido (Moein et al., 2016).

La exactitud representa el porcentaje de analito recuperado por la diferencia entre el valor obtenido y el valor real. Una manera de determinar este parámetro es mediante el estudio de una solución de referencia; es decir, una muestra a la cual se le agrega una cantidad conocida del analito. La precisión nos indica el grado de coincidencia entre los resultados de las muestras individuales obtenidas de una muestra homogénea. La precisión debe evaluarse utilizando el intervalo de cuantificación especificado en el método, incluyendo todas las fuentes de variación desde la preparación de la muestra hasta el redondeo del resultado final de la prueba (Kadian et al., 2016).

El intervalo de un método analítico es el rango entre el nivel superior y el nivel inferior del analito. Este se determina con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad, mediante el método establecido. La repetibilidad es la coincidencia dentro de un periodo corto para el mismo analista con la misma

instrumentación. La reproducibilidad nos indica la coincidencia en los resultados entre laboratorios (Andreasson et al., 2015).

2.7 Costo para un electrodo serigrafiado

En el mercado existen distintos fabricantes de electrodos serigrafiados. Debido a esto se puede encontrar una gran variedad de modelos con diversos costos. Los costos se ven afectados por el sustrato en el cual se elaboran, el área de la superficie de los electrodos, pero principalmente por la tinta (carbono, plata, platino, oro, entre otros) empleada en la serigrafía.

La tinta es el punto clave al momento de elegir un electrodo serigrafiado, porque es quien determina la sensibilidad y selectividad del mismo. Aunque, es posible modificar la superficie del electrodo de trabajo adicionando otros elementos; principalmente, metales, polímeros, enzimas y nanocompuestos.

En los electrodos serigrafiados se encuentran los tres electrodos requeridos para un análisis; estos son un electrodo de trabajo, un electrodo de referencia y un electrodo auxiliar. Al tener el sistema de tres electrodos en un solo dispositivo, conlleva a una disminución en el volumen de la muestra para cada experimento. Por otro lado, el desarrollo de los electrodos serigrafiados ha permitido disminuir los costos de producción, en comparación con un electrodo convencional.

Su principal ventaja contra un electrodo convencional es que al ser desechable se elimina el periodo de preparación de las superficies de cada uno de los electrodos. Los electrodos convencionales se deben limpiar perfectamente después de cada experimento. Además, si esta limpieza no se realiza de manera adecuada, la siguiente lectura estará comprometida.

III. Hipótesis

El clenbuterol se detecta con una sensibilidad de 10 mg/L, parametrizando el pH, el potencial y la velocidad de barrido del análisis voltamperométrico, utilizando electrodos serigrafiados con carbono sin modificaciones.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

IV. Objetivos

4.1 Objetivo general

Generar un modelo matemático para la detección de clenbuterol, por medio de un análisis voltamperométrico con el uso de electrodos serigrafiados y rangos de trabajo significativos para el pH, el potencial y la velocidad de barrido; obtenidos con un diseño óptimo de experimentos.

4.2 Objetivos específicos

Identificar los procesos electroquímicos de oxidación y reducción del clenbuterol mediante una técnica de voltamperometría cíclica utilizando un electrodo serigrafiado sin modificaciones superficiales.

Determinar el rango de trabajo del pH en la solución, la velocidad de barrido y la ventana de potencial aplicados en la obtención del voltamperograma cíclico.

Evaluar el impacto que tiene la ventana de potencial, la velocidad de barrido y el pH, en la corriente generada de la reacción anódica del clenbuterol mediante el uso del diseño factorial 2^k .

Establecer el modelo matemático de cada ciclo voltamperométrico utilizando solo un electrodo serigrafiado.

Estimar un porcentaje de recuperación con el modelo matemático propuesto con base en los parámetros establecidos.

V. Material y Métodos

Todos los reactivos y productos químicos que se utilizaron en esta investigación fueron de grado analítico. La acumulación de clenbuterol en la superficie del electrodo se realizó mediante la aplicación de un análisis voltamperométrico. Específicamente se utilizó la técnica de voltamperometría cíclica.

El sistema de tres electrodos consistió en un electrodo serigrafiado; el cual tuvo dos superficies de carbono una como electrodo de trabajo y la otra como electrodo auxiliar, el electrodo de referencia fue una superficie de plata. Los experimentos electroquímicos se llevaron a cabo en una estación de trabajo electroquímica, es decir, un potenciostato.

La concentración en la superficie del electrodo de trabajo, se debió a la interacción electrostática entre los grupos hidrófilos cargados negativamente en la estructura del compuesto y el grupo amino del clenbuterol. El comportamiento electroquímico del clenbuterol se puede observar en la Figura 6; donde la molécula del clenbuterol (1) se oxida de manera irreversible en el pico del potencial más alto en el voltamperograma, perdiendo un electrón y formando un catión radical (2). Posteriormente dos cationes radicales (2) reaccionan a través del acoplamiento cabeza a cabeza para formar un intermedio de difenilamina (3). Debido a la igualdad de electrones y protones, el proceso químico subsiguiente implica una reacción redox de dos electrones y dos protones formando una molécula de dímero de clenbuterol (4) por un enlace azo mediante un potencial bajo, que muestra un par de pico de reducción y pico de oxidación (Lv et al., 2017).

La primera variable de estudio fue el pH, para esto se prepararon siete soluciones amortiguadoras en un rango de 4 a 10. En este análisis se mantuvo constante la concentración de clenbuterol, el electrodo serigrafiado, la velocidad de barrido y la ventana de potencial, con esta combinación se determinaron las dos soluciones amortiguadoras para la siguiente etapa.

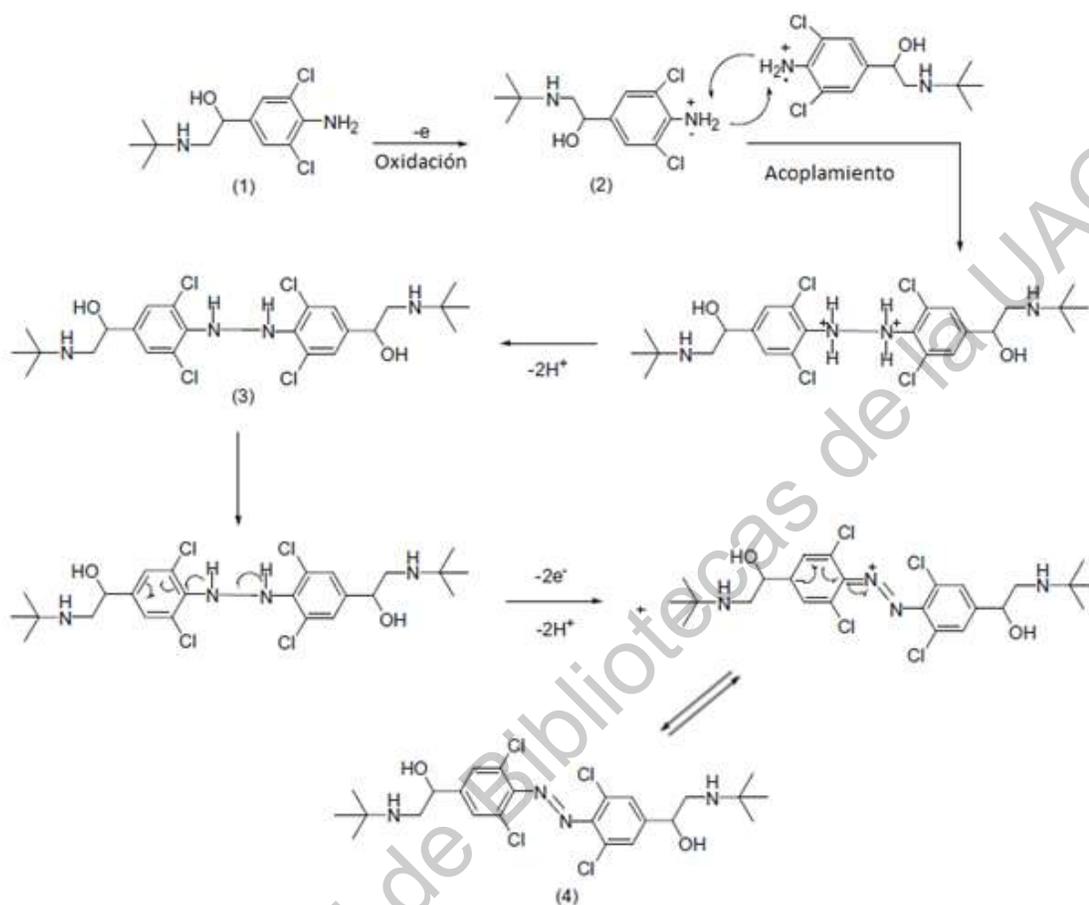


Figura 6. Mecanismo de oxidación del clenbuterol (Lv et al., 2017).

Una vez obtenidos los valores del pH para la solución amortiguadora, se definieron el valor máximo y el valor mínimo para las otras dos variables que son la velocidad de barrido y el potencial aplicado. Se procedió a realizar la corrida experimental de acuerdo al diseño factorial propuesto, manteniendo constante la concentración de clenbuterol. Con el análisis de los resultados en esta etapa se obtuvieron los valores óptimos para las tres variables.

Después, se realizó la curva de calibración con seis concentraciones de clenbuterol distintas, para obtener el modelo matemático. Posterior a esto se

preparó la solución de trabajo la cual se analizó y finalmente se estimó el porcentaje de recuperación.

Los pasos que se llevaron a cabo en esta investigación, se pueden ver en la Figura 7, donde de manera general se aprecian las siete etapas correspondientes a esta sección.

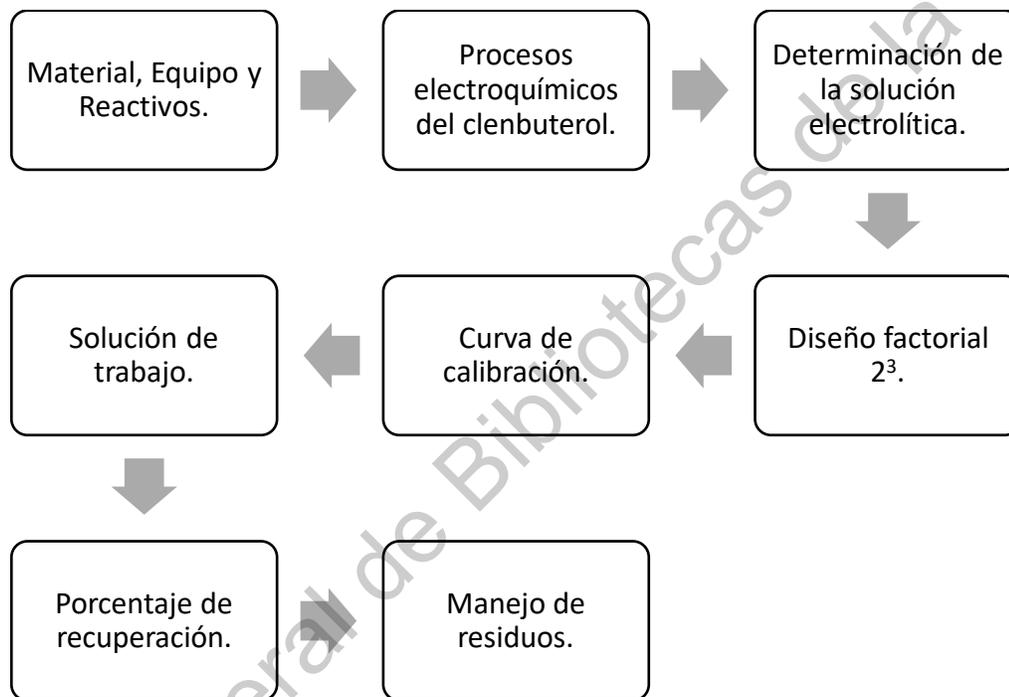


Figura 7. Diagrama general para la metodología.

5.1 Materiales, Equipos y Reactivos:

5.1.1 Reactivos:

Clenbuterol.HCl con una pureza mayor al 98% marca Sigma-Aldrich (CAS: 21898-19-1). Fosfato monosódico monohidrato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) con una pureza mayor al 98% marca Sigma-Aldrich (CAS: 7782-85-6). Fosfato disódico heptahidrato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) con una pureza mayor al 98% marca Sigma-Aldrich (CAS: 10049-21-5). Agua destilada.

5.1.2 Equipos

Potenciostato-Galvanostato marca Bio-Logic modelo VSP-300, el cual lo podemos ver en la Figura 8. Potenciómetro portátil marca Apera modelo PC60. Balanza analítica marca A&D Weighing modelo HR-200 con sensibilidad de 0.0001 g (0.1 mg). Refrigerador. Computadora.



Figura 8. Potenciostato-Galvanostato marca Bio-Logic VSP-300 conectado a la computadora.

5.1.3 Materiales

Electrodos serigrafiados modelo DRP-110-U75 marca METROHM. Matraces aforados con capacidad de 10 mL y 50 mL. Piceta. Pipetas graduadas de 1.0mL/0.01mL, 5.0mL/0.05mL, y 10mL/0.1mL. Propipeta. Vaso de precipitado de vidrio de 10mL/2mL. Espátula. Contenedor para residuos tóxicos.

5.1.4 Equipo de protección personal

Guantes de caucho nitrilo con una espesura mínima de capa de 0.11 mm. Lentes de seguridad o careta de protección. Bata de laboratorio contra productos químicos.

5.2 Determinación de la solución electrolítica

Se prepararon las soluciones amortiguadoras colocando fosfato monosódico monohidrato y fosfato disódico heptahidrato, como se muestran en la Tabla 3. Estas sales se colocaron en un matraz volumétrico aforado de 50 mL, donde se agregó agua destilada hasta el aforo y se obtuvo una solución amortiguadora 0.1 M.

Tabla 3. Soluciones amortiguadoras 0.1 M.

| pH | Fosfato monosódico, monohidrato (g) | Fosfato disódico, heptahidrato (g) | Volumen agua (mL) | M |
|----|-------------------------------------|------------------------------------|-------------------|-----|
| 4 | 0.6889 | 0.0021 | 50 | 0.1 |
| 5 | 0.6792 | 0.0211 | 50 | 0.1 |
| 6 | 0.5947 | 0.1852 | 50 | 0.1 |
| 7 | 0.2651 | 0.8253 | 50 | 0.1 |
| 8 | 0.4050 | 1.2614 | 50 | 0.1 |
| 9 | 0.0043 | 1.3317 | 50 | 0.1 |
| 10 | 0.0045 | 1.3392 | 50 | 0.1 |

Se verifico el pH de cada una de las soluciones amortiguadoras a una temperatura de 25 °C, con ayuda del potenciómetro previamente calibrado como se indica en el Anexo 3. En la Figura 9 podemos observar la lectura para la solución amortiguadora con pH 5 y 6.

Posteriormente, se definió el rango de potencial que fue aplicado y la velocidad de barrido. Se inició el análisis voltamperométrico para asegurarse de que no hay ninguna impureza en la solución amortiguadora. Un sistema limpio no tiene ningún evento redox. Si la muestra está contaminada el material de vidrio deberá limpiarse, la solución amortiguadora se tiene que volver a preparar y el electrodo serigrafiado removido y desechado. Para un buen manejo del potencióstato ver el Anexo 4.



Figura 9. Lectura del potenciómetro dos soluciones amortiguadoras.
(Fuente propia).

Al tener las siete soluciones amortiguadoras libres de impurezas, se pesó 0.0015 g de clenbuterol colocándolo en un matraz volumétrico aforado de 10 mL y se agregó una solución amortiguadora; con la cual se obtiene una concentración final de 150 mg/L.

Finalmente, se realizaron corridas experimentales para cada una de las soluciones amortiguadoras por triplicado. Determinando las dos soluciones amortiguadoras con las que se trabajó posteriormente, basándose en la corriente de oxidación del dímero de clenbuterol obtenida en la reacción de óxido-reducción del clenbuterol.

5.3 Diseño factorial 2^3

Para llevar a cabo el diseño factorial, se seleccionaron la variable dependiente y las variables independientes involucradas en el proceso. La variable de respuesta es la corriente obtenida en la reacción redox. Las variables

independientes son el pH de la solución, la ventana de potencial y la velocidad de barrido. En este caso la concentración de clenbuterol se mantiene constante en 100 mg/L.

Se identificó el valor máximo y el valor mínimo para cada una de las variables independientes, para realizar el codificado de los valores para cada una de las variables, que se pueden apreciar en la Tabla 4. Las corridas experimentales descritas en dicha tabla se realizaron por triplicado.

Finalmente, se analizaron los datos obtenidos de las tres corridas experimentales y se eligieron los valores óptimos para cada una de las variables independientes.

Tabla 4. Diseño factorial 2^3 codificado.

| Corrida | pH | Potencial | Velocidad |
|---------|----|-----------|-----------|
| 1 | -1 | -1 | -1 |
| 2 | 1 | -1 | -1 |
| 3 | -1 | 1 | -1 |
| 4 | 1 | 1 | -1 |
| 5 | -1 | -1 | 1 |
| 6 | 1 | -1 | 1 |
| 7 | -1 | 1 | 1 |
| 8 | 1 | 1 | 1 |

5.4 Curva de calibración

Al tener el pH de la solución amortiguadora, se procedió a realizar una curva de calibración con 6 puntos (incluyendo el blanco) partiendo de una solución madre de clenbuterol, con sus respectivas disoluciones.

El proceso para preparar la solución madre, es el siguiente: Se pesó 0.0010 g de clorhidrato de clenbuterol en un matraz aforado de 10 mL y se añadió la solución amortiguadora; con la que se obtiene una concentración final de

100 mg/L. En la Tabla 5, se observa la cantidad a tomar de la solución madre para obtener las disoluciones utilizadas en la elaboración de la curva de calibración.

Tabla 5. Soluciones para la curva de calibración con concentraciones finales de Clenbuterol.HCl en mg/L.

| Numero de disolución (10 mL) | Volumen a tomar de la solución madre (mL) | Concentración final del Clenbuterol.HCl (mg/L) |
|-------------------------------------|--|---|
| 1 | 1.25 | 12.5 |
| 2 | 1.00 | 10.0 |
| 3 | 0.75 | 7.5 |
| 4 | 0.50 | 5.0 |
| 5 | 0.25 | 2.5 |

Al tener las soluciones preparadas, se realizó el respectivo análisis voltamperométrico por triplicado, para cada una de dichas soluciones. Posteriormente, se recabaron los datos de las corrientes obtenidas en cada corrida experimental, donde se acoplaron todos los espectros obtenidos a 0 V en el voltamperograma. Finalmente, se obtuvo el modelo matemático que representa el comportamiento del clenbuterol en la reacción de óxido-reducción con las especificaciones de las variables propuestas.

5.5 Soluciones de trabajo

Se decidió trabajar con una solución amortiguadora con una concentración, cercana al límite inferior de la curva de calibración, la cual se aprecia en la Figura 10.

Se realizó el análisis voltamperométrico por duplicado, utilizando los valores óptimos para la ventana de potencial, el pH de la solución y la velocidad de barrido. Finalmente, se obtuvo el porcentaje de recuperación de acuerdo al modelo matemático propuesto para cada ciclo.



Figura 10. Muestra problema.

5.6 Verificación del modelo matemático

Una vez que se obtuvieron los parámetros óptimos para el experimento, la siguiente etapa es la verificación; que consistió en la confirmación de las características de desempeño del método, es decir, que cumplan con los requisitos particulares para un uso específico.

5.6.1 Límite de detección y límite de cuantificación

Se realizó un análisis voltamperométrico con muestras menores a los 2.5 mg/L, para establecer la concentración mínima a la cual el clenbuterol puede cuantificarse en forma confiable, con los parámetros óptimos establecidos.

5.6.2 Exactitud

Este parámetro se obtuvo con las soluciones de trabajo propuestas en el punto 5.5, tomando en cuenta la recuperación del clenbuterol.

5.6.3 Precisión

Este parámetro se obtuvo con las soluciones de trabajo propuestas en el punto 5.5, considerando la recuperación del clenbuterol.

5.6.4 Intervalo

Para definir un rango, es decir, el nivel superior y el nivel inferior donde se detecta de manera inequívoca el clenbuterol; se utilizaron los resultados obtenidos de la curva de calibración.

5.7 Manejo de residuos

Para un correcto manejo de los residuos, se utilizó un contenedor de residuos tóxicos, perfectamente identificado con una etiqueta que contenía el nombre de los reactivos: Clenbuterol clorhidrato, solución amortiguadora. Además, se colocaron los pictogramas de seguridad correspondientes.

Después de cada corrida experimental se recolectaba la solución utilizada en el contenedor; el cual siempre se mantuvo completamente cerrado en un lugar seguro, bajo llave.

Finalmente se llevó el contenedor, los residuos procedentes de la experimentación, las soluciones no utilizadas, el sobrante y el recipiente que contiene el clenbuterol al almacén de residuos del CEACA.

VI. Resultados y discusión

6.1 Solución amortiguadora

La primera variable a analizar fue el pH de la solución. La concentración molar de iones hidrógeno de una solución afecta de manera directa la variable de interés de este proyecto (corriente generada de la reacción de óxido-reducción del clenbuterol). Se puede pensar en un principio que un pH con mayor acidez obtendrá una mayor corriente en dicha reacción, pero no sólo depende de esto. Otra variable muy importante es el sistema de 3 electrodos utilizados en la técnica voltamperométrica. La superficie de trabajo y la superficie auxiliar está compuesta de carbono y la superficie de referencia es de plata.

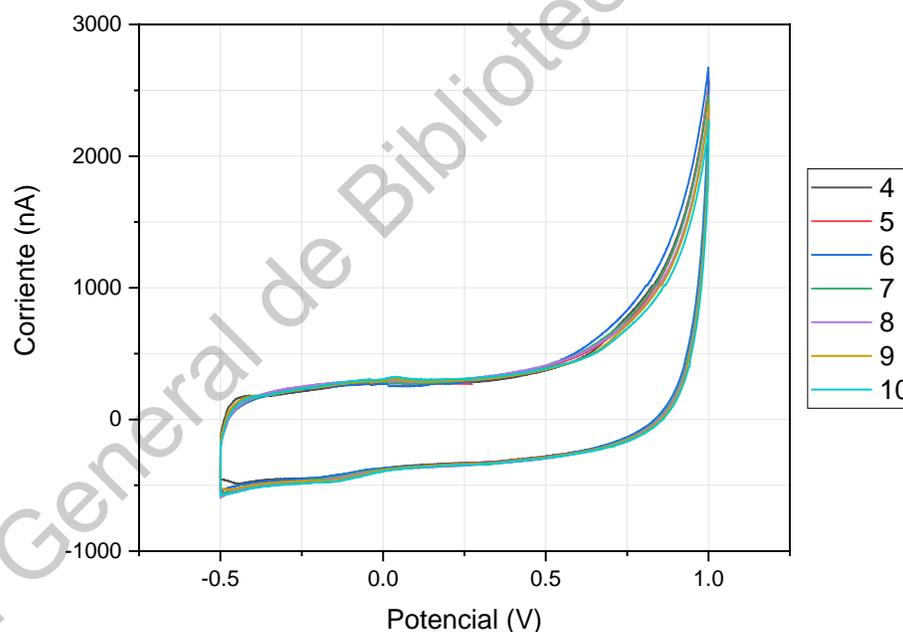


Figura 11. Voltamperograma cíclico de las soluciones amortiguadoras sin clenbuterol a una velocidad de barrido de 100 mV/s.

Una vez preparadas las 7 soluciones amortiguadoras, se procedió a verificar el valor del pH de cada una con ayuda del potenciómetro. Antes de agregar el clenbuterol a dichas soluciones, se verificó que no presentaran ningún proceso electroquímico. Empleando voltametría cíclica con una velocidad de

barrido = 100 mV/s y una ventana de potencial que va de -0.5 a 1 V; se obtuvo un voltamperograma cíclico para cada solución. Estos se pueden apreciar en la Figura 11, donde se puede observar que ninguna solución presenta algún proceso electroquímico.

Los rangos anteriores para la obtención del voltamperograma cíclico se definieron de acuerdo a la literatura. La oxidación de la molécula de clenbuterol está alrededor de los 0.8 V. La reacción de óxido-reducción se presenta aproximadamente a los 0.2 V en la oxidación y a los -0.2 V en la reducción.

Posteriormente, se agregó clenbuterol a cada una de las soluciones obteniendo una concentración de 150 mg/L. Esta concentración se decidió utilizar para iniciar las pruebas, porque de acuerdo a la literatura un electrodo sin modificaciones en la superficie detecta sin problemas los 100 mg/L de un analito. Los voltamperogramas de este análisis los podemos ver en la Figura 12, donde todos están acoplados a los 0 V.

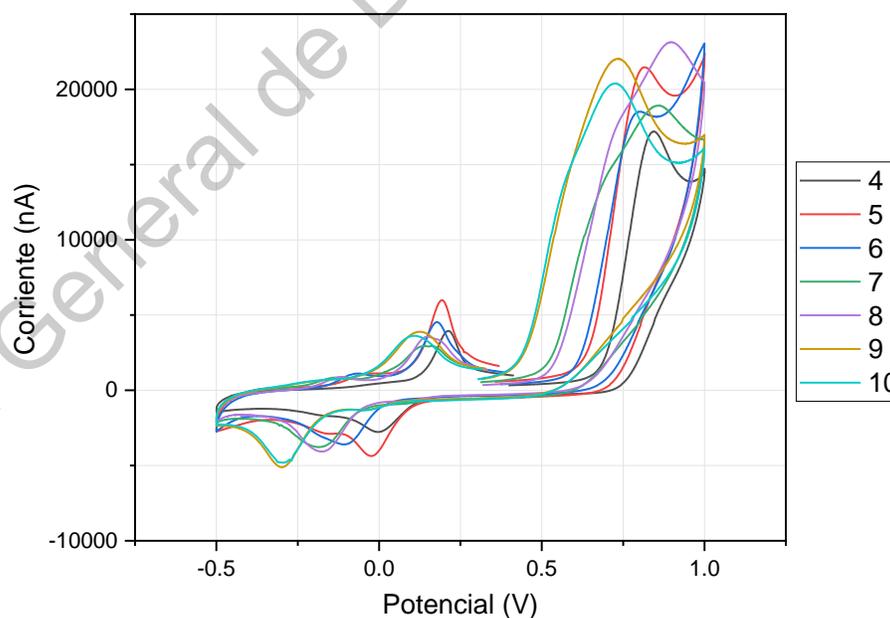


Figura 12. Voltamperograma cíclico a una velocidad de barrido de 100 mV/s, para las soluciones amortiguadoras con una concentración de 150 mg/L de clenbuterol.

Para un mejor análisis de los resultados, se presentan en la Tabla 6 los puntos máximos obtenidos en las tres zonas de interés; las cuales son la oxidación de la molécula de clenbuterol, la reducción del dímero de clenbuterol y la oxidación del dímero de clenbuterol. Estas están representadas por las letras A, B y C, respectivamente en la Figura 13.

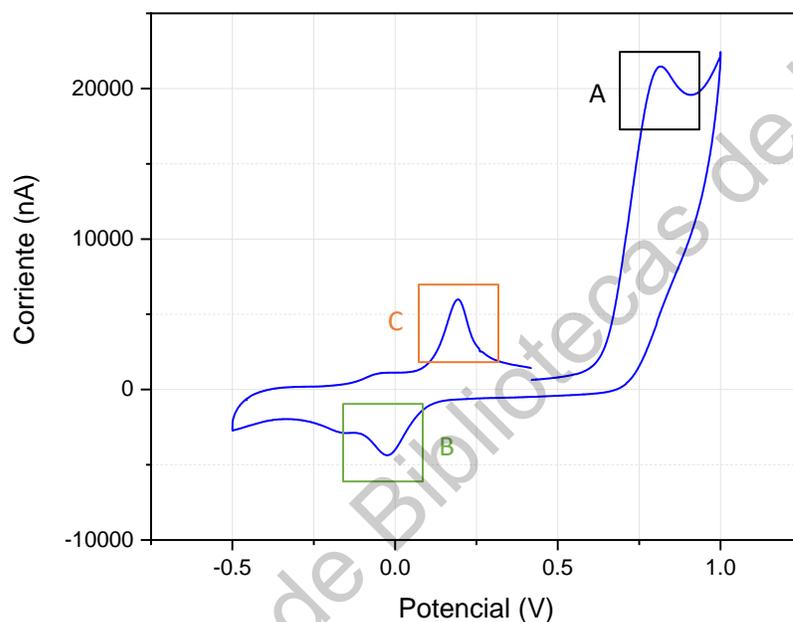


Figura 13. Voltamperograma cíclico con las tres zonas de interés, para una concentración de 150 mg/L de clenbuterol.

Tabla 6. Lecturas máximas de las zonas de interés en los voltamperogramas.

| pH de la solución | Clenbuterol | | Dímero de clenbuterol | | | |
|-------------------|---------------|----------------|-----------------------|----------------|---------------|----------------|
| | Oxidación | | Oxidación | | Reducción | |
| | Potencial (V) | Corriente (nA) | Potencial (V) | Corriente (nA) | Potencial (V) | Corriente (nA) |
| 4 | 0.8424 | 17207.20 | 0.2132 | 3950.05 | -0.0019 | -2773.04 |
| 5 | 0.8157 | 21467.63 | 0.1925 | 5984.48 | -0.0232 | -4370.09 |
| 6 | 0.8000 | 18514.97 | 0.1779 | 4527.91 | -0.1109 | -3595.93 |
| 7 | 0.8621 | 18930.06 | 0.1472 | 2943.99 | -0.1849 | -3777.46 |
| 8 | 0.8993 | 23147.10 | 0.1410 | 3564.49 | -0.1799 | -4074.12 |
| 9 | 0.7334 | 22047.70 | 0.1251 | 3892.52 | -0.2998 | -5112.39 |
| 10 | 0.7235 | 20396.90 | 0.1083 | 3627.85 | -0.2956 | -4813.97 |

Primero analicemos la señal generada por la molécula de clenbuterol en su oxidación en cada solución, las cuales las podemos ver de manera gráfica en la Figura 14. La solución cuyo pH es igual a 8 es la que presenta una corriente más alta, seguida por las soluciones con pH de 9, 5, 10, 7, 6 y 4. Además, podemos observar que la posición del pico de oxidación cambia sin un determinado patrón.

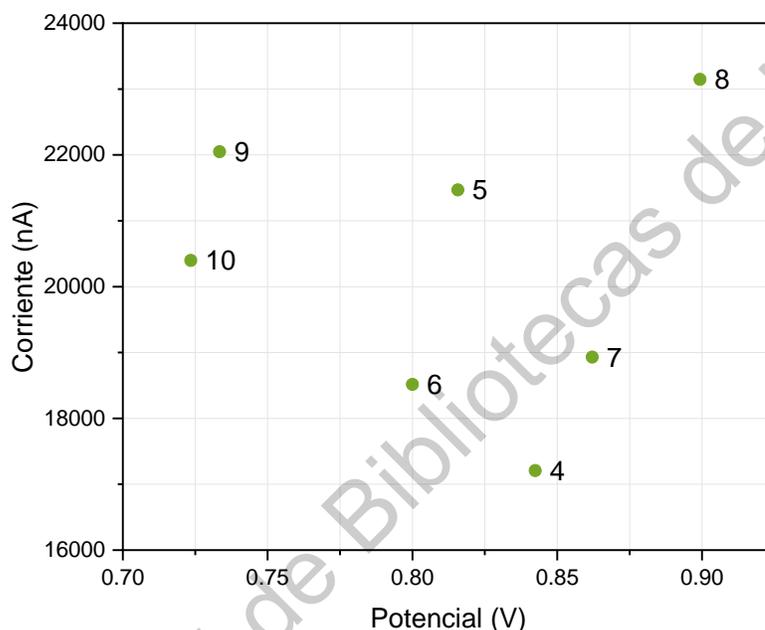


Figura 14. Lecturas en el pico de oxidación de la molécula de clenbuterol (Zona A).

La segunda señal que aparece en el voltamperograma es la reducción del dímero de clenbuterol, dichas señales las observamos en la Figura 15. Donde la solución que presenta la mayor corriente es cuyo pH es igual a 9, seguida por las soluciones con pH de 10, 5, 8, 7, 6 y 4. Además, podemos observar que al igual que la señal anterior la posición de este pico también no sigue un patrón.

Finalmente, en la Figura 16 podemos observar la última señal en aparecer en el voltamperograma, que es la oxidación del dímero de clenbuterol. La solución con la corriente generada más alta es la solución con un pH igual a 5, seguida por las soluciones con pH de 6, 4, 9, 10, 8 y 7. En este caso, la ubicación del punto más

alto en el pico se desplaza de izquierda a derecha al aumentar la acidez en la solución amortiguadora.

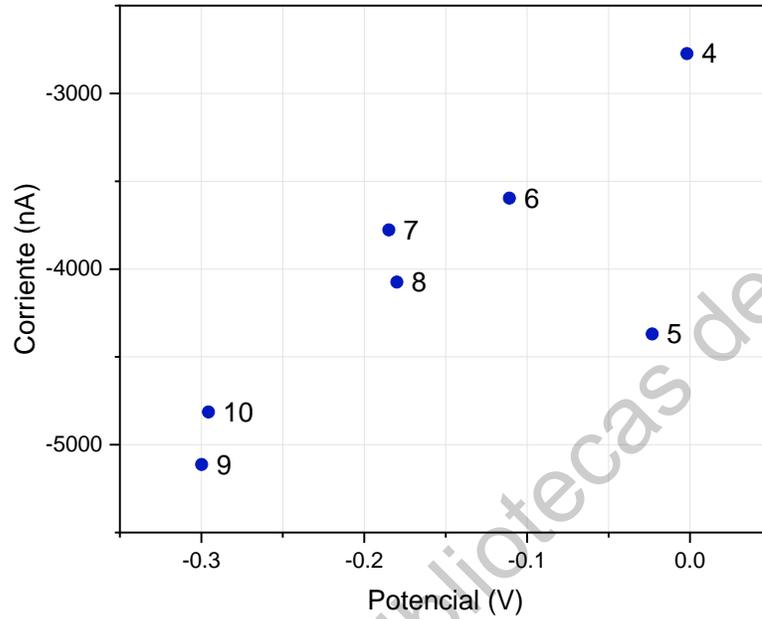


Figura 15. Lecturas del pico de reducción del dímero de clenbuterol (Zona B).

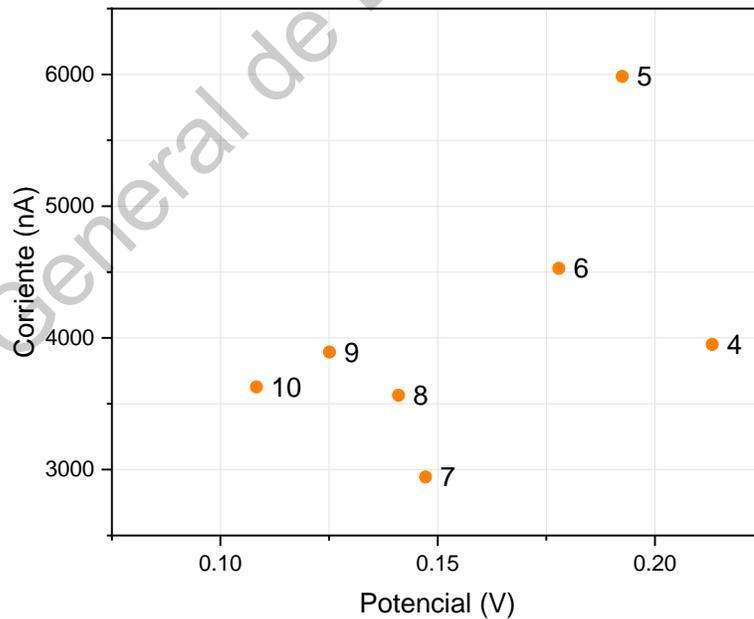


Figura 16. Lecturas del pico de oxidación del dímero de clenbuterol (Zona C).

Después de analizar el comportamiento y la forma del pico en las 3 zonas anteriormente descritas; se decidió trabajar con la señal resultante en la zona de oxidación del dímero. Por lo tanto, las dos soluciones amortiguadoras para seguir trabajando son las que tienen un pH 5 y 6.

6.2 Diseño Factorial 2³

Al definir los 2 valores para el pH de la solución en la sección anterior, se procedió a elaborar las dos soluciones con una concentración de 100 mg/L de clenbuterol. Los valores para la velocidad de barrido y la ventana del potencial se obtuvieron de acuerdo a la literatura. El diseño factorial 2³ se realizó de manera aleatoria, para obtener dicha aleatorización de las corridas experimentales se utilizó el software RStudio. En la Tabla 7, se presentan los resultados obtenidos en todas las corridas experimentales de manera secuencial por razones de formato.

Tabla 7. Diseño factorial 2³ con los resultados obtenidos en cada corrida experimental.

| N° de corrida | pH de la solución | Ventana Potencial (V) | Velocidad (mV/s) | Corriente (nA) | | |
|---------------|-------------------|-----------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | | | | Primera replica | Segunda replica | Tercera replica |
| 1 | 6 | -0.5 a 1 | 50 | 1430.86 | 1468.62 | 1572.76 |
| 2 | 5 | -0.5 a 1 | 50 | 2824.96 | 3095.61 | 2930.90 |
| 3 | 6 | -0.8 a 1.3 | 50 | 1333.80 | 1240.71 | 1197.97 |
| 4 | 5 | -0.8 a 1.3 | 50 | 2405.98 | 2347.03 | 2393.01 |
| 5 | 6 | -0.5 a 1 | 100 | 2699.70 | 2498.81 | 2610.65 |
| 6 | 5 | -0.5 a 1 | 100 | 4910.40 | 4865.11 | 4877.53 |
| 7 | 6 | -0.8 a 1.3 | 100 | 2104.21 | 2051.08 | 2035.23 |
| 8 | 5 | -0.8 a 1.3 | 100 | 3768.31 | 3659.57 | 3734.27 |

Un pequeño análisis para las tres replicas donde se compara la desviación estándar y la media entre cada corrida experimental, lo podemos observar en la Figura 17. Las condiciones experimentales de la corrida numero 6 presentan la menor desviación estándar igual a 23.40 y la mayor media de la corriente generada igual a 4884.35 nA. Por otro lado, la desviación estándar más alta la presenta la

corrida experimental número 2 con un valor de 136.38, mientras que la media de la corriente generada más baja de 1257.49 nA se obtiene con la corrida experimental número 3.

| N° Corrida | Corriente (nA) | |
|---------------|---------------------|---------|
| | Desviación estándar | Media |
| 1 | 73.49 | 1490.75 |
| 2 | 136.38 | 2950.49 |
| 3 | 69.45 | 1257.49 |
| 4 | 30.97 | 2382.01 |
| 5 | 100.66 | 2603.05 |
| 6 | 23.40 | 4884.35 |
| 7 | 36.12 | 2063.51 |
| 8 | 55.62 | 3720.72 |

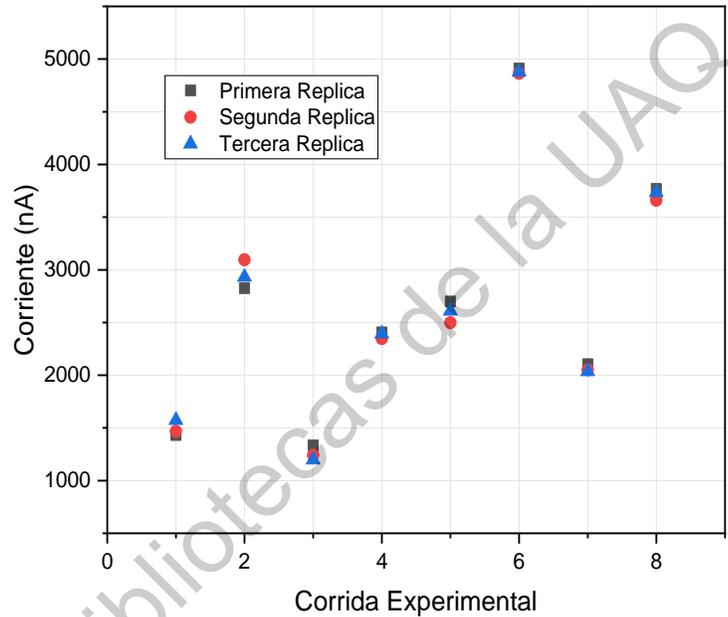


Figura 17. Desviación estándar y media de cada corrida experimental.

Tabla 8. Análisis de la varianza del diseño factorial 2³

| | Grados de libertad | Suma de Cuadrados | Cuadrados Medios | Valor F | Valor p | |
|---|--------------------|-------------------|------------------|-----------|-----------|-----|
| pH | 1 | 15954924 | 15954924 | 2845.0493 | < 2.2e-16 | *** |
| Potencial | 1 | 2352976 | 2352976 | 419.5778 | 6.62E-13 | *** |
| Velocidad | 1 | 10104460 | 10104460 | 1801.8064 | < 2.2e-16 | *** |
| pH: Potencial | 1 | 345103 | 345103 | 61.538 | 7.15E-07 | *** |
| pH: Velocidad | 1 | 687749 | 687749 | 122.638 | 6.52E-09 | *** |
| Potencial: Velocidad | 1 | 304719 | 304719 | 54.3369 | 1.58E-06 | *** |
| pH: Potencial: Velocidad | 1 | 31291 | 31291 | 5.5797 | 0.03118 | * |
| Error | 16 | 89727 | 5608 | | | |

Significancia: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Al realizar un análisis de la varianza de los resultados obtenidos en el diseño factorial descrito anteriormente, el cual se puede ver en Tabla 8, se puede determinar si existe una asociación entre la variable de respuesta (corriente generada) y cada una de las variables descritas en el modelo.

Para conocer su significancia estadística, se compara el valor p de cada variable con el nivel de significancia para evaluar la hipótesis nula; dicha hipótesis es que no existe una asociación entre la respuesta y la variable analizada. Para este estudio, un nivel de significancia de 0.05 funciona a la perfección; con este nivel se toma el riesgo del 5% de concluir que existe una asociación cuando no la hay. Al comparar el valor p obtenido en el análisis con el nivel de significancia, se puede concluir que existe una asociación estadísticamente significativa de todas las variables, así como su interacción.

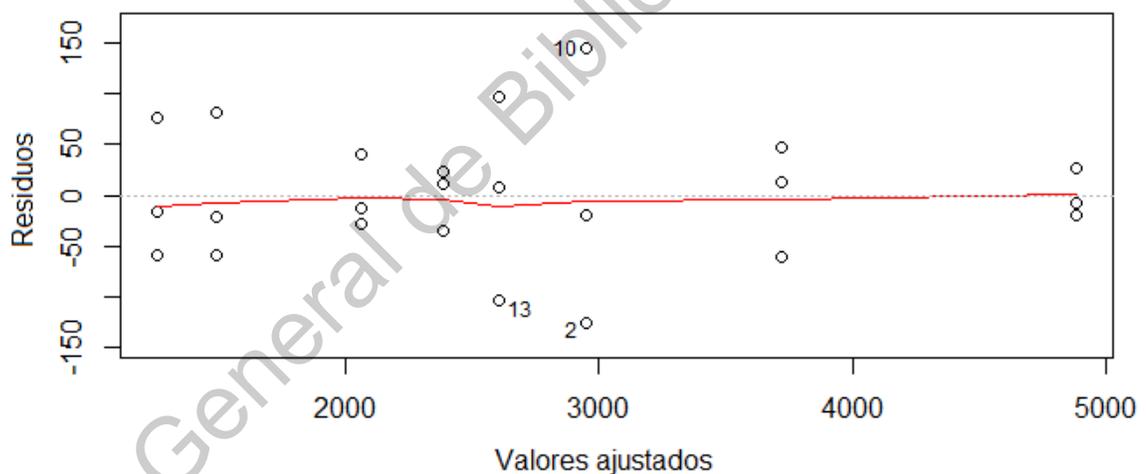


Figura 18. Modelo lineal para los residuos.

El siguiente elemento de la salida del modelo habla de los residuos, que son la diferencia entre los valores de respuesta observados reales y los valores de respuesta que predijo el modelo. En este caso los resultados obtenidos son: Mínimo = -125.30, Primer cuartil = -29.952, Segundo cuartil = -9.618, Tercer cuartil = 29.715 y Máximo = 145.118. Para poder evaluar qué tan bien se ajusta el

modelo a los datos, se debe buscar una distribución simétrica entre estos puntos en el valor medio cero (0), como se muestra en la Figura 18, donde podemos ver que la distribución de los residuos parece ser fuertemente simétrica. Esto significa que el modelo predijo ciertos puntos que caen muy cerca de los puntos observados reales.

La siguiente sección del resultado del modelo son los coeficientes del modelo, los cuales se muestran en la Tabla 9. En teoría, en la regresión lineal simple, los coeficientes son dos constantes desconocidas que representan los términos de intersección y pendiente en el modelo lineal.

Tabla 9. Coeficientes del modelo.

| | Estimación | Error estándar | Valor t | Pr (> t) | |
|--|------------|----------------|---------|----------|-----|
| Intersección | 2669.04 | 15.29 | 174.606 | < 2e-16 | |
| pH1 | 815.35 | 15.29 | 53.339 | < 2e-16 | *** |
| Potencial1 | -313.11 | 15.29 | -20.484 | 6.62E-13 | *** |
| Velocidad1 | 648.86 | 15.29 | 42.448 | < 2e-16 | *** |
| pH1: Potencial1 | -119.91 | 15.29 | -7.845 | 7.15E-07 | *** |
| pH1: Velocidad1 | 169.28 | 15.29 | 11.074 | 6.52E-09 | *** |
| Potencial1: Velocidad1 | -112.68 | 15.29 | -7.371 | 1.58E-06 | *** |
| pH1: Potencial1: Velocidad1 | -36.11 | 15.29 | -2.362 | 0.0312 | * |

Significancia: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Después, tenemos el error estándar residual que es una medida de la calidad de un ajuste de regresión lineal. Teóricamente, se supone que cada modelo lineal contiene un término de error (E). Debido a la presencia de este término, no somos capaces de predecir perfectamente nuestra variable de respuesta (Corriente) a partir de las variables de predicción (pH, Potencial y Velocidad). El error estándar

residual es la cantidad promedio que la Corriente se desviará de la línea de regresión verdadera. En nuestro estudio, la corriente generada de la reacción puede desviarse de la línea de regresión real en aproximadamente 74.89 nA, en promedio. También vale la pena señalar que el error estándar residual se calculó con 16 grados de libertad.

Otro resultado obtenido del análisis es el coeficiente de determinación (R^2) que proporciona una medida de qué tan bien se ajusta el modelo a los datos reales. En nuestro caso R^2 es una medida de la relación lineal entre nuestras variables independientes (pH, Velocidad y Potencial) y nuestra variable de respuesta/dependiente (Corriente). El resultado obtenido es de 0.9970 o 99.70%. Por otro lado, en configuraciones de regresión múltiple, el R^2 siempre aumentará a medida que se incluyan más variables en el modelo. Es por eso que el R^2 ajustado es la medida preferida, ya que se ajusta al número de variables consideradas, el R^2 ajustado para este análisis es igual a 0.9957 o 99.57%, y este resultado representa una regresión que explica bien la varianza en la variable de respuesta.

Finalmente, el estadístico F es un buen indicador de si existe una relación entre nuestras variables independientes y la variable dependiente. En nuestro estudio este valor es igual a 758.6, sabemos que cuanto más lejos esté el estadístico F de 1, mejor será. Por lo cual existe evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula.

Una vez confirmado que la corriente generada de la reacción de oxidación del dímero de clenbuterol se ve afectada directamente por las variables analizadas. Se realizó un gráfico para ver el efecto de dichas variables en la media de la corriente, la cual podemos observar en la Figura 19.

Los valores analizados para el pH son los que tienen un mayor impacto en la variable de respuesta. Después sigue el impacto de la velocidad de barrido en la corriente generada, en la cual podemos comprobar que una velocidad más rápida conduce a una disminución en el tamaño de la capa de difusión y como

consecuencia, se observan corrientes más altas. Finalmente, la ventana del potencial aplicado no tiene tanto impacto en la corriente generada.

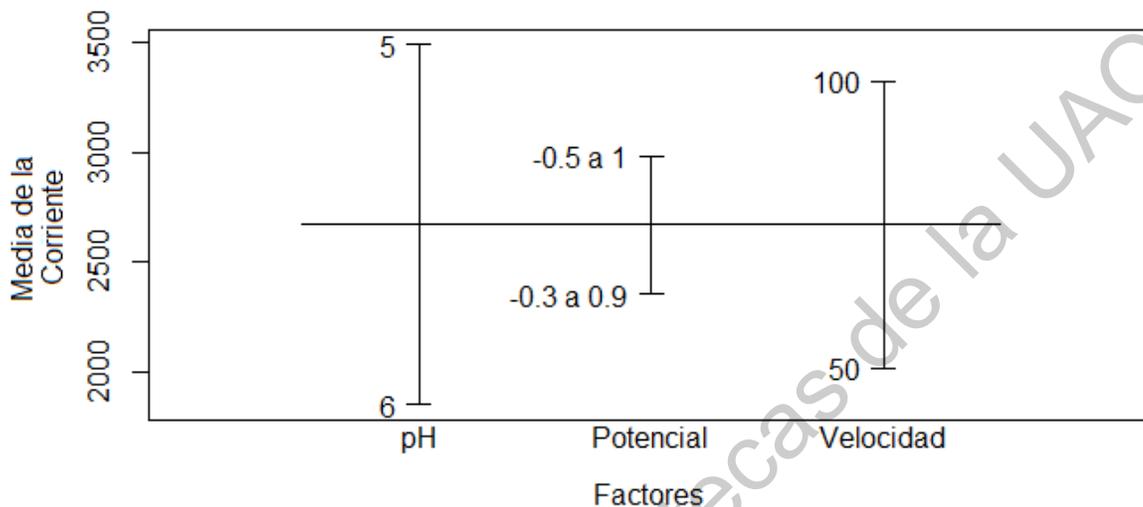


Figura 19. Gráfica de efectos principales.

Para comprobar la información anterior, se realizó una gráfica para evaluar el efecto de cada combinación entre las variables, la cual se muestra en la Figura 20. Se puede apreciar que la combinación del pH igual a 6, con la velocidad de barrido igual a 50 mV/s, independientemente de la ventana de potencial, es la que tiene el peor desempeño para obtener una corriente. Las mejores opciones tienen en común un pH igual a 5, con la velocidad de barrido igual a 100 mV/s, pero la que presenta mayor desempeño en la corriente generada es la ventana de potencial de -0.5 a 1 V.

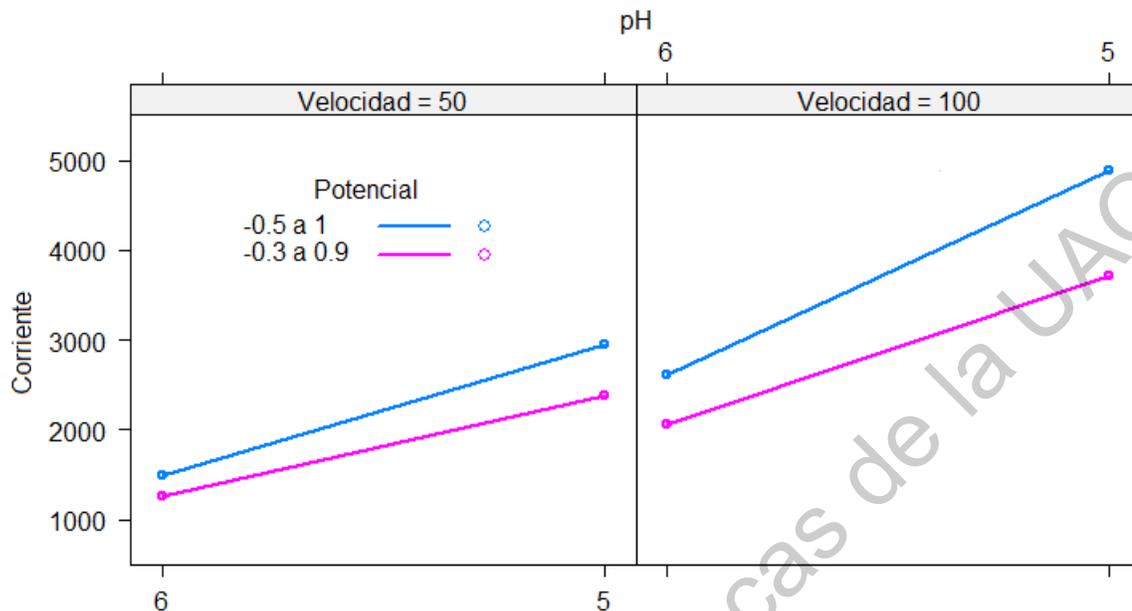


Figura 20. Diagrama de efectos en los factores.

6.3 Modelo matemático (Curva de calibración)

Para la elaboración de la curva de calibración se tomó como punto de partida el valor propuesto en la hipótesis, el cual es de 10 mg/L. Los rangos de trabajo para la elaboración de dicha curva son una ventana de potencial aplicado de -0.5 a 1 V, una velocidad de barrido de 100 mV/s y una solución amortiguadora con pH igual a 5.

El modelo matemático original plantea la idea que el electrodo serigrafado sólo se utiliza para obtener un ciclo completo con la técnica de voltamperometría cíclica. Otra característica buscada con la elaboración de este proyecto es el bajo costo de la detección, por lo que se propone un modelo matemático basándose en el uso del mismo electrodo serigrafado, con la variante de realizar tres ciclos completos en el mismo análisis. Estos ciclos servirán como corridas de confirmación para la primera lectura.

En la Figura 21, se muestra un voltamperograma cíclico con tres ciclos completos para una concentración de 150 mg/L de clenbuterol. Se observa que

cuando se termina el primer ciclo, automáticamente se inicia el segundo y así sucesivamente hasta obtener el último ciclo requerido.

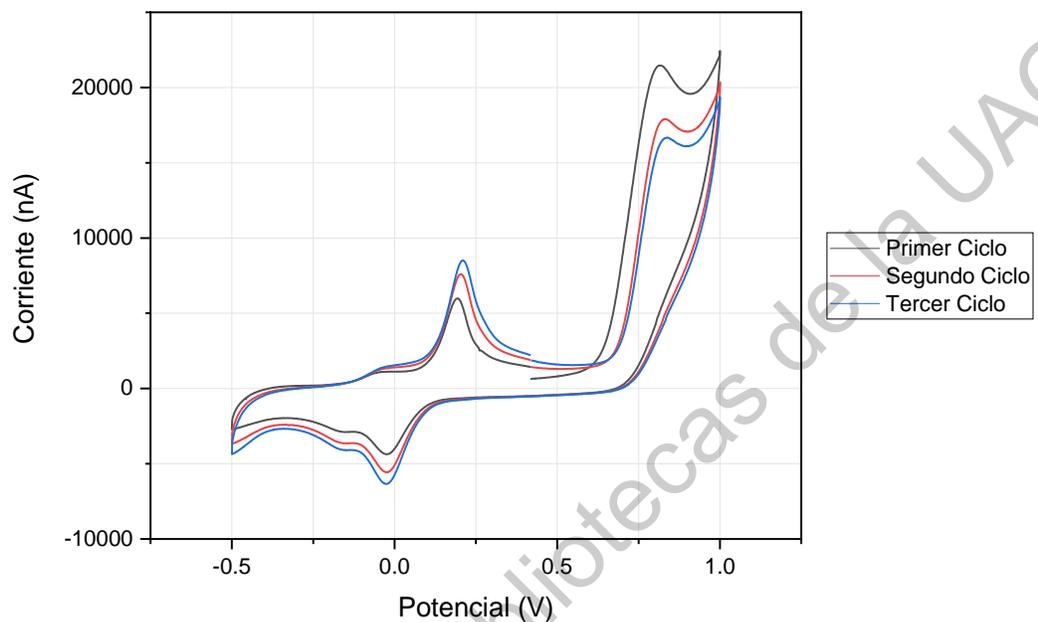


Figura 21. Voltamperograma cíclico con tres ciclos completos, para una concentración de 150 mg/L con una velocidad de barrido de 100 mV/s.

Dicho lo anterior, las soluciones para la elaboración de la curva de calibración se analizaron por triplicado; cada replica con 3 ciclos. En la Figura 22 podemos observar los voltamperogramas obtenidos para el primer ciclo. La Figura 23 muestra los voltamperogramas resultantes del segundo ciclo. Finalmente, en la Figura 24 se aprecian los voltamperogramas correspondientes al tercer ciclo.

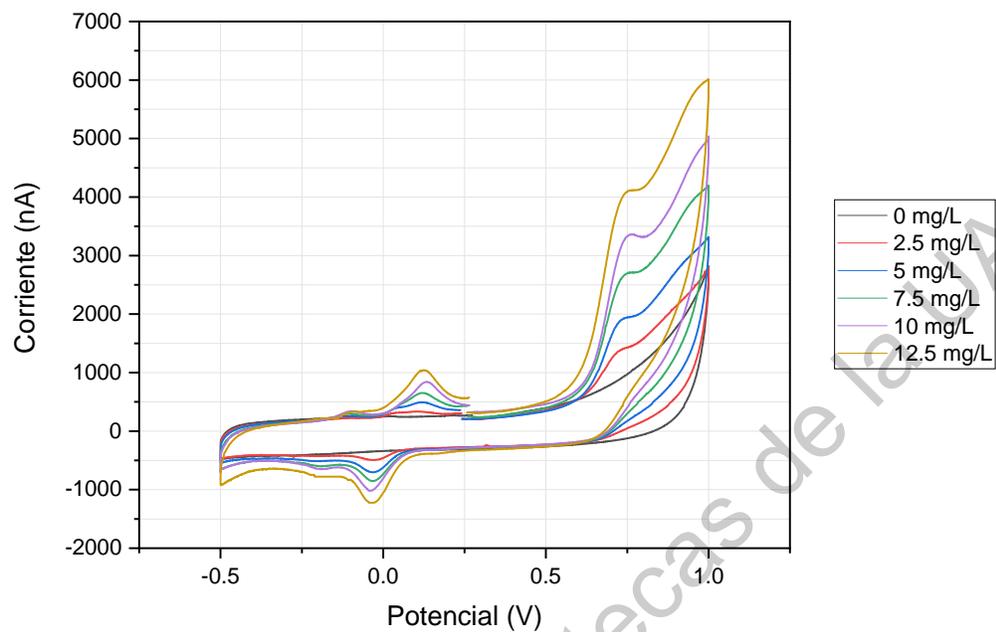


Figura 22. Voltamperogramas cíclicos del primer ciclo de las soluciones utilizadas para la curva de calibración.

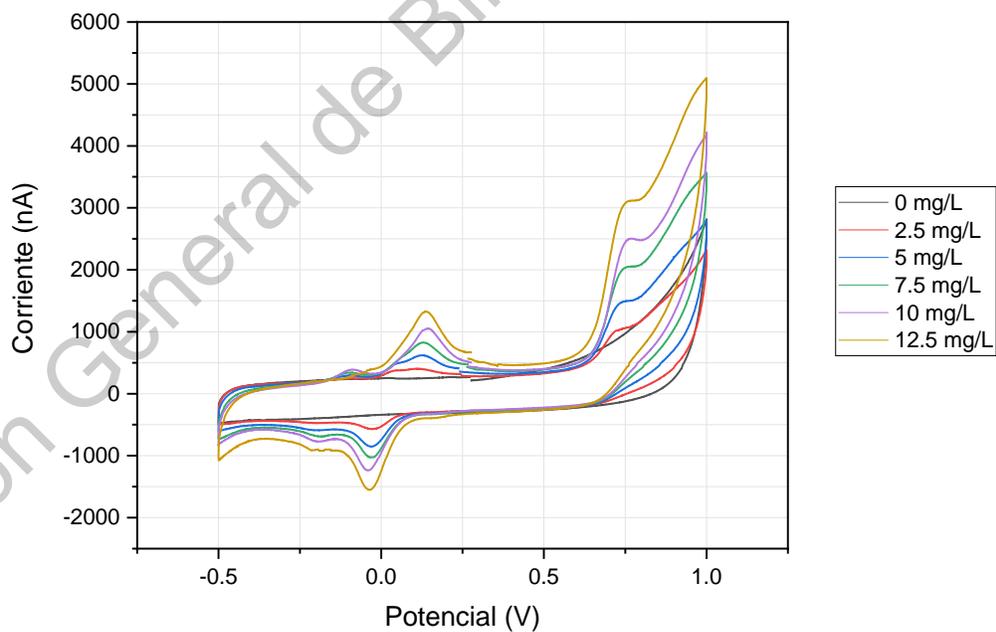


Figura 23. Voltamperogramas cíclicos del segundo ciclo de las soluciones utilizadas para la curva de calibración.

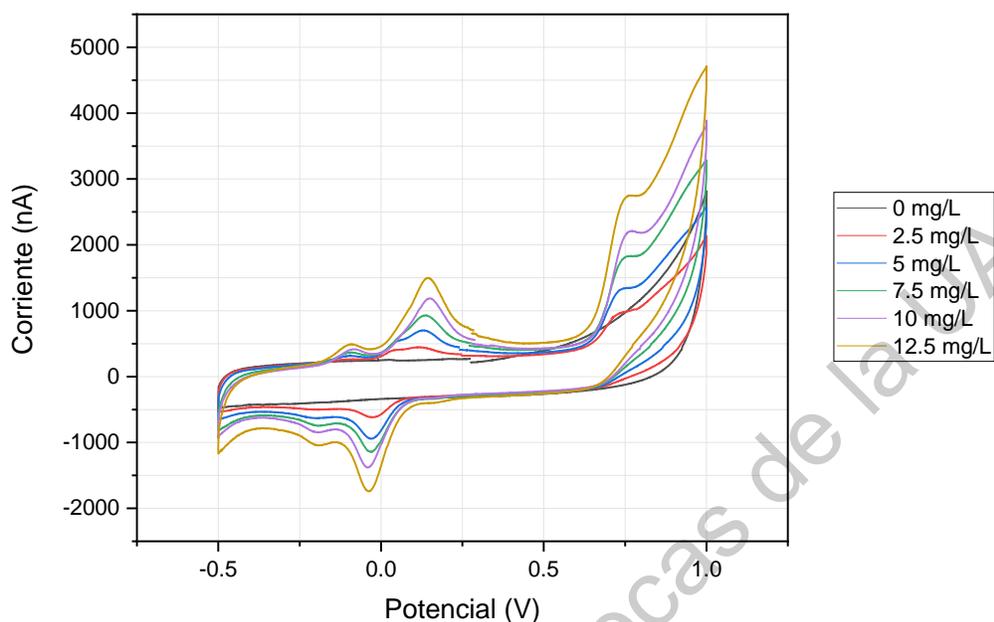


Figura 24. Voltamperogramas cíclicos del tercer ciclo de las soluciones utilizadas para la curva de calibración.

Recordemos, que el modelo matemático está planeado para la señal que se presenta en la oxidación del dímero de clenbuterol. En la Tabla 10 se pueden apreciar todas las señales que se obtuvieron en el análisis de cada solución en los tres ciclos para cada una. Estos resultados son los que se utilizaron para obtener la ecuación correspondiente, para el cálculo de la concentración de clenbuterol partiendo de una corriente encontrada.

Tabla 10. Datos utilizados para crear la curva de calibración con los datos obtenidos de los voltamperogramas correspondientes.

| Concen- tración (mg/L) | Primer Ciclo | | Segundo Ciclo | | Tercer Ciclo | |
|------------------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|
| | Potencial (V) | Corriente (nA) | Potencial (V) | Corriente (nA) | Potencial (V) | Corriente (nA) |
| 0.0 | 0.09255 | 147.13 | 0.08644 | 221.65 | 0.09544 | 264.89 |
| 2.5 | 0.10642 | 336.23 | 0.10834 | 404.80 | 0.11430 | 448.56 |
| 5.0 | 0.12807 | 494.95 | 0.12418 | 620.51 | 0.13320 | 705.58 |
| 7.5 | 0.11999 | 654.10 | 0.12808 | 826.57 | 0.13998 | 931.56 |
| 10.0 | 0.12372 | 843.50 | 0.14378 | 1053.54 | 0.14985 | 1188.71 |
| 12.5 | 0.13459 | 1043.13 | 0.13690 | 1326.16 | 0.14290 | 1499.15 |

El modelo matemático propuesto para el primer ciclo se puede apreciar en la Figura 25, la cual presenta la siguiente ecuación lineal:

$$y = 0.014178 x - 2.065305 \quad \text{Ec. (6)}$$

Dónde: y es la concentración de clenbuterol en mg/L, x es la corriente generada en nA.

La ecuación 6 para una concentración de clenbuterol en el rango de 0 a 12.5 mg/L, tiene un coeficiente de correlación de Pearson (R) igual a 0.9991, mientras que el coeficiente de determinación (R^2) es igual a 0.9982.

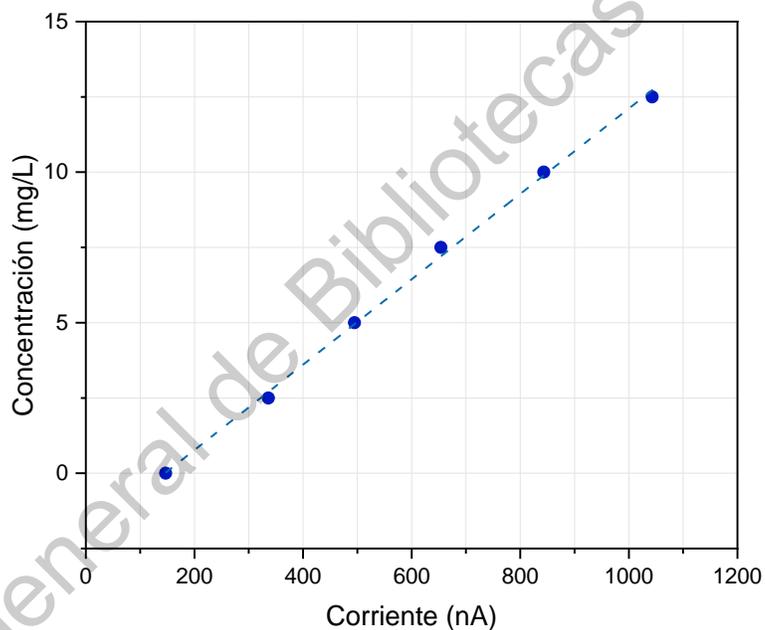


Figura 25. Curva de calibración para el primer ciclo.

El modelo matemático propuesto para el segundo ciclo se puede apreciar en la Figura 26, la cual presenta la siguiente ecuación lineal:

$$y = 0.011358 x - 2.179684 \quad \text{Ec. (7)}$$

Dónde: y es la concentración de clenbuterol en mg/L, x es la corriente generada en nA.

La ecuación 7 para una concentración de clenbuterol en el rango de 0 a 12.5 mg/L, tiene un coeficiente de correlación de Pearson (R) igual a 0.9981, mientras que el coeficiente de determinación (R^2) es igual a 0.9962.

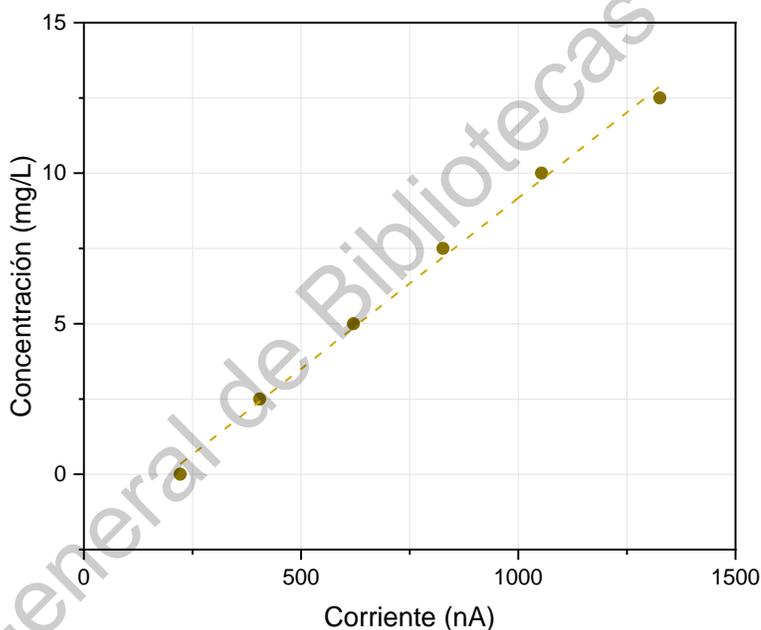


Figura 26. Curva de calibración para el segundo ciclo.

El modelo matemático propuesto para el primer ciclo se puede apreciar en la Figura 25, la cual presenta la siguiente ecuación lineal:

$$y = 0.010100 x - 2.231759 \quad \text{Ec. (8)}$$

Dónde: y es la concentración de clenbuterol en mg/L, x es la corriente generada en nA.

La ecuación 8 para una concentración de clenbuterol en el rango de 0 a 12.5 mg/L, tiene un coeficiente de correlación de Pearson (R) igual a 0.9974, mientras que el coeficiente de determinación (R^2) es igual a 0.9948.

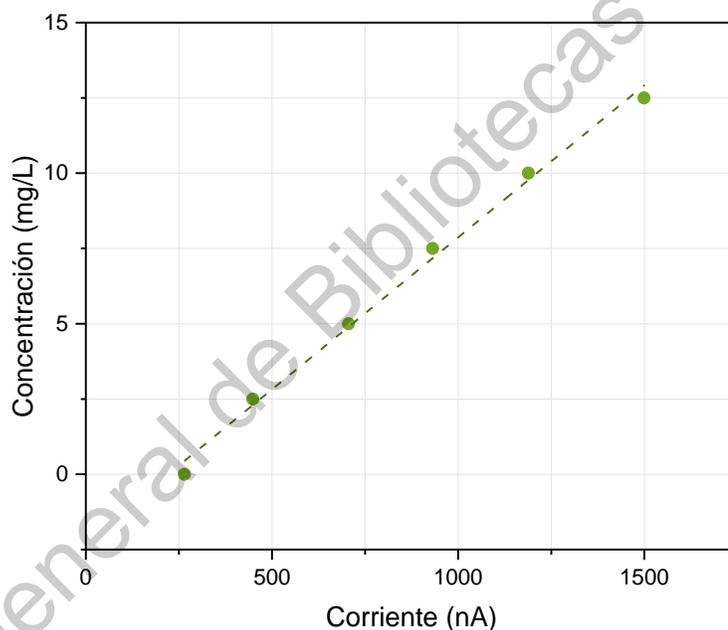


Figura 27. Curva de calibración para el tercer ciclo.

6.4 Análisis de muestra problema

La muestra problema analizada fue una solución libre de impurezas con una concentración de clenbuterol de 4 mg/L. Los voltamperogramas correspondientes a este análisis y a la corrida de confirmación se pueden apreciar en las Figuras 28, 29 y 30; para el primer, segundo y tercer ciclo, respectivamente.

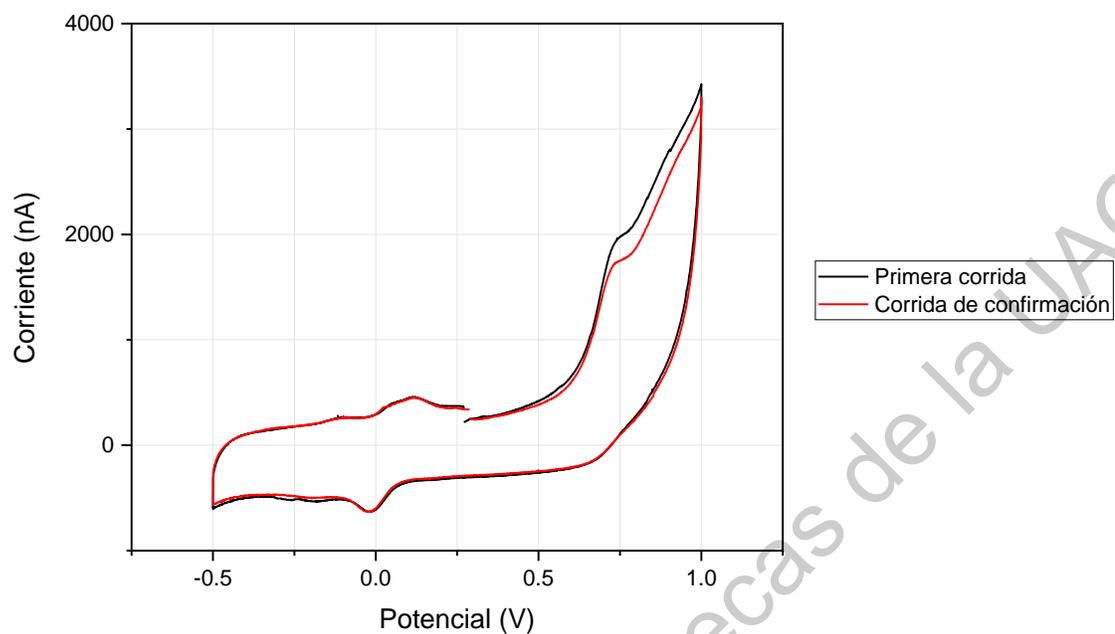


Figura 28. Voltamperogramas cíclicos con el primer ciclo de la muestra problema.

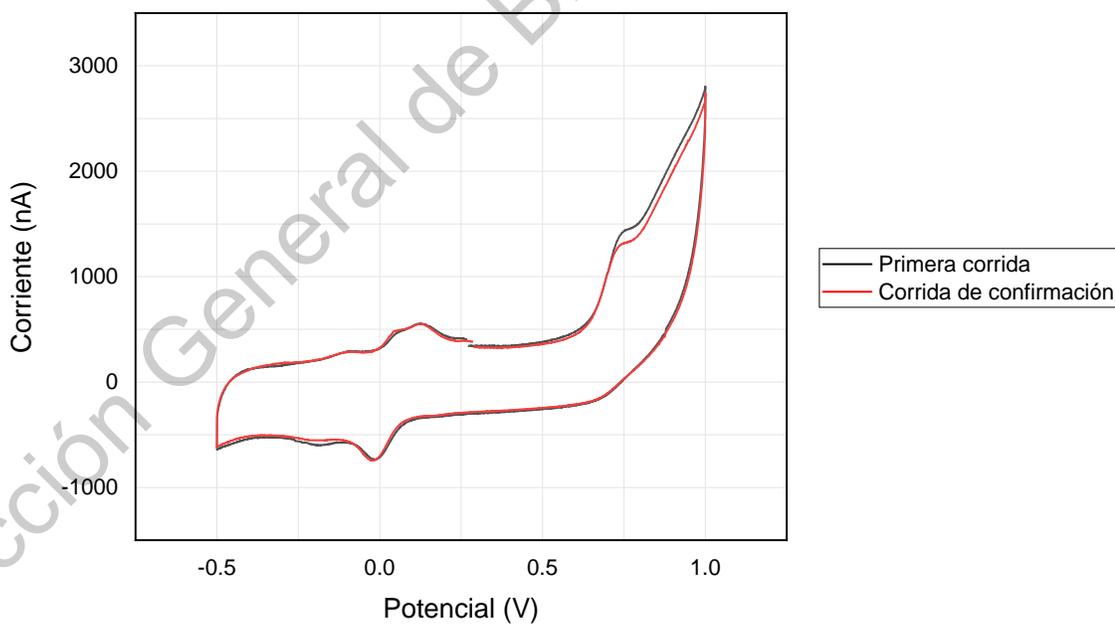


Figura 29. Voltamperogramas cíclicos con el segundo ciclo de la muestra problema.

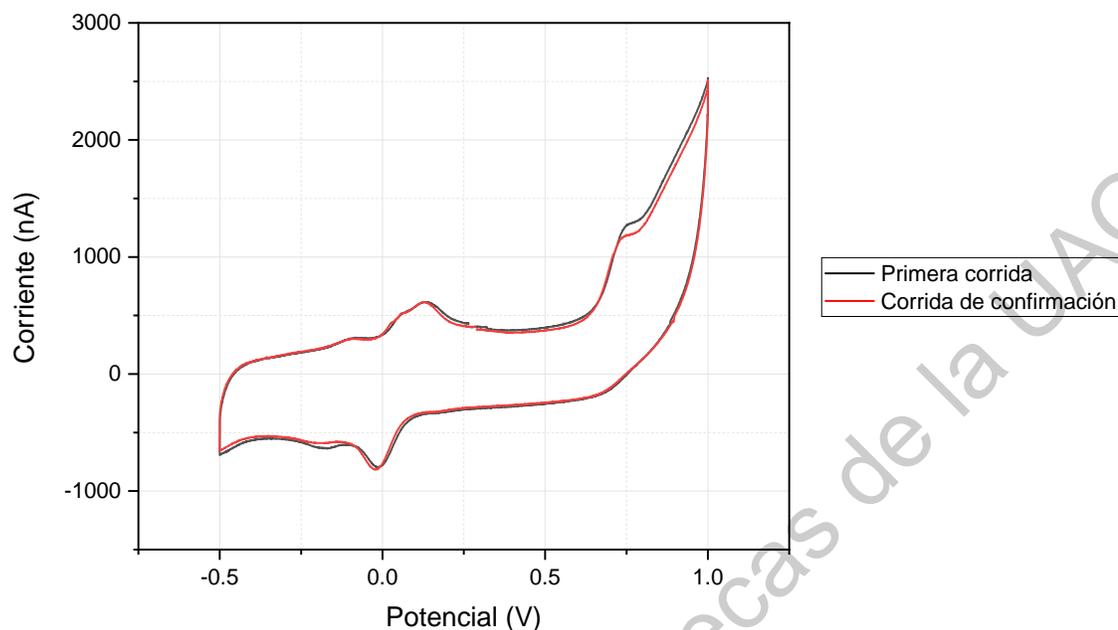


Figura 30. Voltamperogramas cíclicos con el tercer ciclo de la muestra problema.

En las Tablas 11, 12 y 13 se pueden apreciar los porcentajes de recuperación para cada corrida experimental en sus tres ciclos. Comprobando que el modelo matemático propuesto para utilizar solamente un electrodo serigrafiado para los tres análisis funciona perfectamente. El porcentaje de recuperación para la primera repetición en el primer ciclo es de un 102.57%, para el segundo ciclo es igual al 101.41% y finalmente para el tercer ciclo se obtiene un 100.26%. Estos porcentajes tienen solamente una desviación estándar de 1.15.

Tabla 11. Porcentaje de recuperación de la muestra problema en el primer ciclo.

| Primer Ciclo (4 mg/L) | | | | |
|------------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------------|--------------------------|
| Repetición | Potencial (V) | Corriente (nA) | Concentración (mg/L) | % de recuperación |
| Primera | 0.12354 | 434.989 | 4.103 | 102.57 |
| Segunda | 0.12336 | 435.4208 | 4.109 | 102.72 |

Tabla 12. Porcentaje de recuperación de la muestra problema en el segundo ciclo.

| Segundo Ciclo (4 mg/L) | | | | |
|-------------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------------|--------------------------|
| Repetición | Potencial (V) | Corriente (nA) | Concentración (mg/L) | % de recuperación |
| Primera | 0.12366 | 548.960 | 4.057 | 101.41 |
| Segunda | 0.12269 | 547.638 | 4.041 | 101.04 |

Tabla 13. Porcentaje de recuperación de la muestra problema en el tercer ciclo.

| Tercer Ciclo (4 mg/L) | | | | |
|------------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------------|--------------------------|
| Repetición | Potencial (V) | Corriente (nA) | Concentración (mg/L) | % de recuperación |
| Primera | 0.12494 | 618.018 | 4.010 | 100.26 |
| Segunda | 0.12293 | 617.941 | 4.009 | 100.24 |

6.5 Verificación del modelo matemático

El límite de cuantificación de clenbuterol para los tres modelos matemáticos propuestos es de 2.5 mg/L, ya que se analizó una solución con concentración igual a 1 mg/L de clenbuterol la cual no presenta ninguna señal visible en el voltamperograma.

La exactitud de estos modelos quedó clara con los porcentajes de recuperación obtenidos en la muestra problema analizada, la concentración real es de 4.00 mg/L y se recuperó en promedio 4.055 mg/L del clenbuterol presente, es decir el 101.37%. Respecto a la precisión del modelo se obtuvo una desviación estándar promedio de 0.0435 para los tres ciclos.

Finalmente, la linealidad de este método funciona porque se obtienen resultados determinados mediante las ecuaciones matemáticas para cada ciclo, en un intervalo establecido, el cual se presenta de 2.5 a 12.5 mg/L de clenbuterol.

VII. Conclusiones

Mediante la técnica de voltamperometría cíclica es posible detectar clenbuterol en una concentración menor a los 10 mg/L; utilizando electrodos serigrafiados sin modificaciones superficiales en el electrodo de trabajo (carbono).

Las variables involucradas en la voltamperometría cíclica, es decir, pH de la solución, velocidad de barrido y ventana de potencial aplicado, presentan efectos significativos en su interacción. Lo cual nos permite identificar con mayor facilidad el valor adecuado para cada una de ellas, dichos valores son: pH igual a 5, velocidad de barrido igual a 100 mV/s y la ventana de potencial va de -0.5 a 1 V.

Dicho lo anterior, el modelo matemático propuesto cuenta con un límite de cuantificación igual a 2.5 mg/L, mientras que el rango lineal en su espectro menor es igual a 2.5 a 12.5 mg/L.

Este modelo tiene un coeficiente de correlación de Pearson y un coeficiente de determinación mayor o igual a 0.995, lo que significa que las variables (Concentración y Corriente) se correlacionan directamente en los tres ciclos utilizando el mismo electrodo serigrafiado.

Por otro lado, las muestras analizadas presentaron un porcentaje de recuperación en el rango de 100.24% a 102.72% con el modelo propuesto. Finalmente, al realizar las 2 corridas de confirmación con el mismo electrodo serigrafiado se obtendrá un ahorro del 66.6%.

VIII. Referencias

- Andreasson, U., A. Perret-Liaudet, L. J. C. Van-Waalwijk, K. Blennow, D. Chiasserini, and S. Engelborghs. 2015. A practical guide to immunoassay method validation. *Front. Neurol.* 6:1–8. doi:10.3389/fneur.2015.00179.
- Arduini, F., L. Micheli, D. Moscone, G. Palleschi, S. Piermarini, F. Ricci, and G. Volpe. 2016. Trends in Analytical Chemistry Electrochemical biosensors based on nanomodified screen-printed electrodes: Recent applications in clinical analysis. *Trends Anal. Chem.* 79:114–126. doi:10.1016/j.trac.2016.01.032. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2016.01.032>
- Aronson, J. K. 2016. Clenbuterol. *Meyler's Side Eff. Drugs.* 403. doi:10.1016/B978-0-444-53717-1.00514-X. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978044453717100514X>
- Bai, J., Y. Lai, D. Jiang, Y. Zeng, Y. Xian, F. Xiao, N. Zhang, J. Hou, and L. Jin. 2012. Ultrasensitive electrochemical immunoassay based on graphene oxide-Ag composites for rapid determination of clenbuterol. *Analyst.* 137:4349–4355. doi:10.1039/c2an35473j.
- Billington, C. K., R. B. Penn, and I. P. Hall. 2016. β 2 Agonists. *Handb. Exp. Pharmacol.* 237:23–40. doi:10.1007/164_2016_64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mpmmed.2015.12.019>
- Bo, B., X. Zhu, P. Miao, D. Pei, B. Jiang, Y. Lou, Y. Shu, and G. Li. 2013. Talanta An electrochemical biosensor for clenbuterol detection and pharmacokinetics investigation. *Talanta.* 113:36–40. doi:10.1016/j.talanta.2013.03.056. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2013.03.056>
- Chen, D., M. Yang, N. Zheng, N. Xie, D. Liu, C. Xie, and D. Yao. 2016. Biosensors and Bioelectronics A novel aptasensor for electrochemical detection of ractopamine , clenbuterol , salbutamol , phenylethanolamine and procaterol. *Biosens. Bioelectron.* 80:525–531. doi:10.1016/j.bios.2016.01.025. Available

from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2016.01.025>

- Cinti, S., and F. Arduini. 2017. Biosensors and Bioelectronics Graphene-based screen-printed electrochemical (bio) sensors and their applications : Efforts and criticisms. *Biosens. Bioelectron.* 89:107–122. doi:10.1016/j.bios.2016.07.005. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2016.07.005>
- Davis, J. L., G. W. Smith, R. E. Baynes, L. A. Tell, A. I. Webb, and J. E. Riviere. 2009. Update on drugs prohibited from extralabel use in food animals Jennifer. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 235:1–7. doi:10.2460/javma.235.5.528. Available from: <https://doi.org/10.2460/javma.235.5.528>
- Degand, G., A. Bernes-Duyckaerts, and G. Maghuin-Rogister. 1992. Determination of Clenbuterol in Bovine Tissues and Urine by Enzyme Immunoassay. *J. Agric. Food Chem.* 40:70–75. doi:10.1021/jf00013a014.
- Dou, Y., Z. Jiang, W. Deng, J. Su, S. Chen, H. Song, A. Aldabahi, X. Zuo, S. Song, J. Shi, and C. Fan. 2016. Portable detection of clenbuterol using a smartphone-based electrochemical biosensor with electric field-driven acceleration. *J. Electroanal. Chem.* 781:339–344. doi:10.1016/j.jelechem.2016.04.022. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jelechem.2016.04.022>
- Dugheri, S., N. Mucci, A. Bonari, G. Marrubini, G. Cappelli, D. Ubiali, M. Campagna, M. Montalti, and G. Arcangeli. 2018. Solid phase microextraction techniques used for gas chromatography: A review. *Acta Chromatogr.* 1–9. doi:10.1556/1326.2018.00579.
- Elgrishi, N., K. J. Rountree, B. D. Mccarthy, E. S. Rountree, T. T. Eisenhart, and J. L. Dempsey. 2017. A Practical Beginner ' s Guide to Cyclic Voltammetry. doi:10.1021/acs.jchemed.7b00361.
- Fan, G., J. Huang, X. Fan, S. Xie, Z. Zheng, Q. Cheng, and P. Wang. 2012. Enhanced oxidation and detection of toxic clenbuterol on the surface of

acetylene black nanoparticle-modified electrode. *J. Mol. Liq.* 169:102–105. doi:10.1016/j.molliq.2012.02.013. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molliq.2012.02.013>

- Gaichore, R. R., and A. K. Srivastava. 2012. Multiwalled carbon nanotube-4-tert-butyl calix[6]arene composite electrochemical sensor for clenbuterol hydrochloride determination by means of differential pulse adsorptive stripping voltammetry. *J. Appl. Electrochem.* 42:979–987. doi:10.1007/s10800-012-0466-5.
- Ge, Y., M. B. Camarada, L. Xu, M. Qu, H. Liang, E. Zhao, and M. Li. 2018. A highly stable black phosphorene nanocomposite for voltammetric detection of clenbuterol. *Microchim. Acta.* 185:566. doi:10.1007/s00604-018-3084-z. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00604-018-3084-z>
- Hahnau, S., and B. Jülicher. 1996. Evaluation of commercially available ELISA test kits for the detection of clenbuterol and other β 2-agonists. *Food Addit. Contam.* 13:259–274. doi:10.1080/02652039609374408.
- Huang, Q., T. Bu, W. Zhang, L. Yan, M. Zhang, and Q. Yang. 2018. An improved clenbuterol detection by immunochromatographic assay with bacteria @ Au composite as signal amplifier. 262:48–55. doi:10.1016/j.foodchem.2018.04.085.
- IUPAC. 1979. *Nomenclature of Organic Chemistry. Sections A, B, C, D, E, F and H.* Pergamon Press, Oxford.
- Ji, R., S. Chen, W. Xu, Z. Qin, and J. F. Qiu. 2018. A voltammetric immunosensor for clenbuterol based on the use of a MoS₂-AuPt nanocomposite. *Microchim. Acta.* 185:209. doi:10.1007/s00604-018-2746-1. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00604-018-2746-1>
- Jiang, Y., and Y. Ni. 2015. Automated headspace solid-phase microextraction and on-fiber derivatization for the determination of clenbuterol in meat products by

gas chromatography coupled to mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* 38:418–425. doi:10.1002/jssc.201400634.

Kabiraz, D. C., K. Morita, K. Sakamoto, and M. Takahashi. 2018. Highly sensitive detection of clenbuterol in urine sample by using surface plasmon resonance immunosensor. *Talanta*. 186:521–526. doi:10.1016/j.talanta.2018.04.011. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.04.011>

Kadian, N., K. Siva, R. Raju, M. Rashid, Y. Malik, I. Taneja, and M. Wahajuddin. 2016. Comparative assessment of bioanalytical method validation guidelines for pharmaceutical industry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* doi:10.1016/j.jpba.2016.03.052. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2016.03.052>

Kecskemeti, A., and A. Gaspar. 2018. Particle-based liquid chromatographic separations in microfluidic devices - A review. *Anal. Chim. Acta.* 1021:1–19. doi:10.1016/j.aca.2018.01.064. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.01.064>

Korotkaya, E. V. 2014. STANDARDIZATION , CERTIFICATION , QUALITY , AND SAFETY BIOSENSORS : DESIGN , CLASSIFICATION , AND APPLICATIONS IN THE FOOD INDUSTRY. 2. doi:10.12737/5476.

Kuiper, H. A., M. Y. Noordam, R. Schilt, and A. H. Roos. 1998. Illegal Use of β -Adrenergic Agonists: European Community. *Am. Soc. Anim. Sci.* 76:195–207. doi:10.2527/1998.761195x. Available from: <https://doi.org/10.2527/1998.761195x>

Labib, M., E. H. Sargent, and S. O. Kelley. 2016. Electrochemical Methods for the Analysis of Clinically Relevant Biomolecules. doi:10.1021/acs.chemrev.6b00220.

Li, C., W. Luo, H. Xu, Q. Zhang, H. Xu, Z. P. Aguilar, W. Lai, H. Wei, and Y. Xiong. 2013. Development of an immunochromatographic assay for rapid and

quantitative detection of clenbuterol in swine urine. *Food Control*. 34:725–732.
doi:10.1016/j.foodcont.2013.06.021. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.06.021>

Li, G., Y. Fu, X. Han, X. Li, and C. Li. 2016. Metabolomic investigation of porcine muscle and fatty tissue after Clenbuterol treatment using gas chromatography/mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*. 1456:242–248.
doi:10.1016/j.chroma.2016.06.017. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2016.06.017>

Li, Z., X. Wang, J. Cao, P. He, and T. Li. 2015. Broad screening and identification of β -agonists in feed and animal body fluid and tissues using ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-orbitrap high resolution mass spectrometry combined with spectra library search. *Food Chem*. 192:188–196.
doi:10.1016/j.foodchem.2015.06.104. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.104>

Liang, J., H. Liu, C. Huang, C. Yao, Q. Fu, X. Li, D. Cao, Z. Luo, and Y. Tang. 2015. Aggregated silver nanoparticles based surface-enhanced raman scattering enzyme-linked immunosorbent assay for ultrasensitive detection of protein biomarkers and small molecules. *Anal. Chem*. 87:5790–5796.
doi:10.1021/acs.analchem.5b01011.

Lin, X., Y. Ni, and S. Kokot. 2013. A novel electrochemical sensor for the analysis of β -agonists: The poly (acid chrome blue K)/ graphene oxide-nafion / glassy carbon electrode. *J. Hazard. Mater*. 260:508–517.
doi:10.1016/j.jhazmat.2013.06.004. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.06.004>

Liu, G., H. Chen, H. Peng, S. Song, J. Gao, J. Lu, M. Ding, L. Li, S. Ren, Z. Zou, and C. Fan. 2011. Biosensors and Bioelectronics A carbon nanotube-based high-sensitivity electrochemical immunosensor for rapid and portable detection of

clenbuterol. Biosens. Bioelectron. 28:308–313.
doi:10.1016/j.bios.2011.07.037. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2011.07.037>

Liu, L., H. Pan, M. Du, W. Xie, and J. Wang. 2010. Glassy carbon electrode modified with Nafion-Au colloids for clenbuterol electroanalysis. *Electrochim. Acta.* 55:7240–7245. doi:10.1016/j.electacta.2010.06.078. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2010.06.078>

Lv, C., Y. Xun, Z. Cao, J. Xie, D. Li, G. Liu, and L. Yu. 2017. Sensitive Determination of Toxic Clenbuterol in Pig Meat and Pig Liver Based on a Carbon Nanopolymer Composite. 2252–2261. doi:10.1007/s12161-017-0796-3.

Meyer, H. H. D., L. Rinke, and I. Dürsch. 1991. Residue screening for the β -agonists clenbuterol, salbutamol and cimaterol in urine using enzyme immunoassay and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 564:551–556. doi:10.1016/0378-4347(91)80523-F.

Miao, P., K. Han, H. Sun, J. Yin, J. Zhao, B. Wang, and Y. Tang. 2014. Melamine Functionalized Silver Nanoparticles as the Probe for Electrochemical Sensing of Clenbuterol. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 6:8667–8672. doi:10.1021/am501473m. Available from: <https://doi.org/10.1021/am501473m>

Mirceski, V., D. Guziejewski, M. Bozem, and I. Bogeski. 2016. Characterizing electrode reactions by multisampling the current in square-wave voltammetry. *Electrochim. Acta.* doi:10.1016/j.electacta.2016.07.128. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2016.07.128>

Mitchell, G. A., and G. Dunnavan. 1998. Illegal Use of β -Adrenergic Agonists in the United States. *Am. Soc. Anim. Sci.* 76:208–211. doi:10.2527/1998.761208x. Available from: <https://doi.org/10.2527/1998.761208x>

Moein, M. M., A. El Beqqali, and M. Abdel-rehim. 2016. Bioanalytical method development and validation : critical concepts and strategies. *J. Chromatogr.*

- B. doi:10.1016/j.jchromb.2016.09.028. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.09.028>
- Montgomery, D. C. 2013. Design and Analysis of Experiments (8th ed.). Arizona, USA; John Wiley & Sons, Inc.
- NOM-EM-015-ZOO-2002. 2002. NOM-EM-015-ZOO-2002.
- Papich, M. G. 2016. Clenbuterol. Saunders Handb. Vet. Drugs. 167–169. doi:10.1016/B978-0-323-24485-5.00165-0. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323244855001650>
- Patra, J. K., D. K. Mahato, and P. Kumar. 2018. Biosensor Technology—Advanced Scientific Tools, With Special Reference to Nanobiosensors and Plant- and Food-Based Biosensors. Elsevier Inc. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-811488-9.00014-7>
- Sánchez-Brenes, A., C. Alvarado-Ulloa, and R. Solís-Blanco. 2016. Application of Markov Chain in a production process of in vitro plants. 29.
- Shrivastava, A., and V. B. Gupta. 2011. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. 2:21–25. doi:10.4103/2229-5186.79345.
- Smith, D. J., and G. D. Paulson. 1997. Distribution, Elimination , and Residues of Clenbuterol HCl in Holstein Calves. Am. Soc. Anim. Sci. 75:454–461. doi:10.2527/1997.752454x. Available from:
<https://doi.org/10.2527/1997.752454x>
- Sung, I. K., S. J. Park, K. Kang, M. Y. Kim, and S. Cho. 2015. Development and Application of a Method for Rapid and Simultaneous Determination of Three β -agonists (Clenbuterol , Ractopamine , and Zilpaterol) using Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry. Korean Soc. Food Sci. Anim. Recources. 35:121–129. doi:10.5851/kosfa.2015.35.1.121. Available from:

<http://dx.doi.org/10.5851/kosfa.2015.35.1.121>

- Talib, N. A. A., S. Abidin, F. Salam, and Y. Sulaiman. 2016. Clenbuterol Immunosensors Based Poly(3,4-ethylenedioxythiophene)/ Multiwall Carbon Nanotube (PEDOT/MWCNT) Hybrid Composite. *Procedia Chemistry*. 20:29–32. doi:10.1016/j.proche.2016.07.004.
- Thevis, M., L. Geyer, H. Geyer, S. Guddat, J. Dvorak, A. Butch, S. Sterk, and W. Schänzer. 2013. Adverse analytical findings with clenbuterol among U-17 soccer players attributed to food contamination issues. doi:10.1002/dta.1471.
- Wang, L., R. Yang, J. Chen, J. Li, L. Qu, and P. De B. Harrington. 2014. Sensitive voltammetric sensor based on isopropanol-Nafion-PSS-GR nanocomposite modified glassy carbon electrode for determination of clenbuterol in pork. *Food Chem*. 164:113–118. doi:10.1016/j.foodchem.2014.04.052.
- Wei, L., L. Liu, H. Kang, S. Liu, G. Wang, X. Hu, and C. Wang. 2016. Development of a Disposable Label-Free Impedance Immunosensor for Direct and Sensitive Clenbuterol Determination in Pork. 1781–1788. doi:10.1007/s12161-015-0361-x.
- Wei, L., T. Wang, Y. Liu, C. Wang, and J. Zhang. 2018. Label-free Microcantilever Immunosensor Based on a Competitive Immunoassay for the Determination of Clenbuterol. *Anal. Lett*. 51:2240–2251. doi:10.1080/00032719.2017.1415919. Available from: <https://doi.org/10.1080/00032719.2017.1415919>
- Wong, C., Y. Chen, J. Chang, and J. Zen. 2015. Electrochemistry Communications Biomolecule-free , selective detection of clenbuterol based on disposable screen-printed carbon electrode. *Electrochem. commun*. 60:163–167. doi:10.1016/j.elecom.2015.09.007. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.elecom.2015.09.007>
- Wu, C., D. Sun, Q. Li, and K. Wu. 2012. *Sensors and Actuators B: Chemical* Electrochemical sensor for toxic ractopamine and clenbuterol based on the

enhancement effect of graphene oxide. *Sensors Actuators B. Chem.* 168:178–184. doi:10.1016/j.snb.2012.03.084. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2012.03.084>

Yan, F., Y. Zhang, S. Zhang, and J. Zhao. 2015. Carboxyl-modified graphene for use in an immunoassay for the illegal feed additive clenbuterol using surface plasmon resonance and electrochemical impedance spectroscopy. 855–862. doi:10.1007/s00604-014-1399-y.

Yang, X., F. Wu, D. Chen, and H. Lin. 2014. Sensors and Actuators B : Chemical An electrochemical immunosensor for rapid determination of clenbuterol by using magnetic nanocomposites to modify screen printed carbon electrode based on competitive immunoassay mode. *Sensors Actuators B. Chem.* 192:529–535. doi:10.1016/j.snb.2013.11.011. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2013.11.011>

Yang, Y., H. Zhang, C. Huang, D. Yang, and N. Jia. 2017. Electrochemical non-enzyme sensor for detecting clenbuterol (CLB) based on MoS₂-Au-PEI-hemin layered nanocomposites. *Biosens. Bioelectron.* 89:461–467. doi:10.1016/j.bios.2016.04.019. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2016.04.019>

Zhai, H., Z. Liu, Z. Chen, Z. Liang, Z. Su, and S. Wang. 2015. Sensors and Actuators B : Chemical A sensitive electrochemical sensor with sulfonated graphene sheets / oxygen-functionalized multi-walled carbon nanotubes modified electrode for the detection of clenbuterol. *Sensors Actuators B. Chem.* 210:483–490. doi:10.1016/j.snb.2014.12.121.

Zhang, Z., F. Duan, L. He, D. Peng, F. Yan, M. Wang, W. Zong, and C. Jia. 2016. Electrochemical clenbuterol immunosensor based on a gold electrode modified with zinc sulfide quantum dots and polyaniline. *Microchim. Acta.* 183:1089–1097. doi:10.1007/s00604-015-1730-2.

IX. Anexos

9.1 ANEXO 1: Datos de seguridad del clenbuterol

1 IDENTIFICACIÓN DEL PRODUCTO Y DE LA COMPAÑÍA

1.1 Identificadores del producto

Nombre del producto: Clenbuterol, clorhidrato

Referencia: C5423

Marca: Sigma

No. CAS: 21898-19-1

1.2 Usos pertinentes identificados de la sustancia o de la mezcla y usos desaconsejados

Usos identificados: Reactivos para laboratorio, Fabricación de sustancias

1.3 Datos del proveedor de la ficha de datos de seguridad

Compañía: Sigma-Aldrich Química, S. de R.L. de C.V

Parque Industrial Toluca 2000

Calle 6 Norte No. 107

50200 TOLUCA

MÉXICO

Teléfono: +52 (0)1-800-007-5300

Fax: +52 (0)1-800-712-9920

1.4 Teléfono de emergencia

Teléfono de Urgencia: 01-800-00-214-00 (SETIQ)

01(55) 55-59-15-88

2. IDENTIFICACIÓN DE LOS PELIGROS

2.1 Clasificación de la sustancia o de la mezcla

Clasificación SGA de acuerdo con 29 CFR 1910 (OSHA HCS).

Toxicidad aguda, Oral (Categoría 3), H301

Para el texto íntegro de las Declaraciones-H mencionadas en esta sección, véase la Sección 16.

2.2 Elementos de las etiquetas del SGA, incluidos los consejos de prudencia



Pictograma

Palabra de advertencia Peligro

Indicación(es) de peligro

H301 Tóxico en caso de ingestión.

Declaración(es) de prudencia

P264 Lavarse la piel concienzudamente tras la manipulación.

P270 No comer, beber ni fumar durante su utilización.

P301 + P310 EN CASO DE INGESTIÓN: Llamar inmediatamente a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico.

P321 Se necesita un tratamiento específico (véase las instrucciones suplementarias de primeros auxilios en esta etiqueta).

P330 Enjuagarse la boca.

P405 Guardar bajo llave.

P501 Eliminar el contenido/ el recipiente en una planta de eliminación de residuos aprobada.

2.3 Peligros no clasificados de otra manera - ninguno(a)

3. COMPOSICIÓN/INFORMACIÓN SOBRE LOS COMPONENTES

3.1 Sustancias

Sinónimos: 4-Amino- α -(t-butylaminomethyl)-3,5-dichlorobenzyl alcoholhydrochloride

Formula: $C_{12}H_{18}Cl_2N_2O \cdot HCl$

Peso molecular: 313.65 g/mol

No. CAS: 21898-19-1

No. CE: 244-643-7

Componentes peligrosos

Componente: **4-Amino- α -[(tert-butylamino)methyl]-3,5-dichlorobenzyl alcohol monohydrochloride**

Clasificación Acute Tox. 3; H301

Concentración - Para el texto íntegro de las Declaraciones-H mencionadas en esta sección, véase la Sección 16.

4. PRIMEROS AUXILIOS

4.1 Descripción de los primeros auxilios

Recomendaciones generales. Consultar a un médico. Mostrar esta ficha de seguridad al doctor que esté de servicio. Retire a la persona de la zona peligrosa.

Si es inhalado. Si aspiró, mueva la persona al aire fresco. Si ha parado de respirar, hacer la respiración artificial. Consultar a un médico.

En caso de contacto con la piel. Eliminar lavando con jabón y mucha agua. Llevar al afectado en seguida a un hospital. Consultar a un médico.

En caso de contacto con los ojos. Lavarse abundantemente los ojos con agua como medida de precaución.

Si es tragado. Nunca debe administrarse nada por la boca a una persona inconsciente. Enjuague la boca con agua. Consultar a un médico.

4.2 Principales síntomas y efectos, agudos y retardados

Los síntomas y efectos más importantes conocidos se describen en la etiqueta (ver sección 2.2) y / o en la sección 11

4.3 Indicación de toda atención médica y de los tratamientos especiales que deban dispensarse inmediatamente

Sin datos disponibles

5. MEDIDAS DE LUCHA CONTRA INCENDIOS

5.1 Medios de extinción

Medios de extinción apropiados. Usar agua pulverizada, espuma resistente al alcohol, polvo seco o dióxido de carbono.

5.2 Peligros específicos derivados de la sustancia o la mezcla

Óxidos de carbono, óxidos de nitrógeno (NOx), Gas cloruro de hidrógeno

5.3 Recomendaciones para el personal de lucha contra incendios

Si es necesario, usar equipo de respiración autónomo para la lucha contra el fuego.

5.4 Otros datos

Sin datos disponibles

6. MEDIDAS EN CASO DE VERTIDO ACCIDENTAL

6.1 Precauciones personales, equipo de protección y procedimientos de emergencia

Usar protección respiratoria. Evite la formación de polvo. Evitar respirar los vapores, la neblina o el gas. Asegúrese una ventilación apropiada. Evacuar el personal a zonas seguras. Evitar respirar el polvo. Equipo de protección individual, ver sección 8.

6.2 Precauciones relativas al medio ambiente

Impedir nuevos escapes o derrames si puede hacerse sin riesgos. No dejar que el producto entre en el sistema de alcantarillado.

6.3 Métodos y material de contención y de limpieza

Recoger y preparar la eliminación sin originar polvo. Limpiar y traspalar. Guardar en contenedores apropiados y cerrados para su eliminación.

6.4 Referencia a otras secciones

Para eliminación de desechos ver sección 13.

7. MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO

7.1 Precauciones para una manipulación segura

Evítese el contacto con los ojos y la piel. Evítese la formación de polvo y aerosoles. Debe disponer de extracción adecuada en aquellos lugares en los que se forma polvo. Disposiciones normales de protección preventivas de incendio.

Ver precauciones en la sección 2.2

7.2 Condiciones de almacenamiento seguro, incluidas posibles incompatibilidades

Conservar el envase herméticamente cerrado en un lugar seco y bien ventilado.

Temperatura de almacenaje recomendada: 2 - 8 °C

7.3 Usos específicos finales

Aparte de los usos mencionados en la sección 1.2 no se estipulan otros usos específicos

8. CONTROLES DE EXPOSICIÓN/ PROTECCIÓN INDIVIDUAL

8.1 Parámetros de control

Componentes con valores límite ambientales de exposición profesional.

No contiene sustancias con valores límites de exposición profesional.

8.2 Controles de la exposición

Controles técnicos apropiados

Evitar el contacto con la piel, ojos y ropa. Lávense las manos antes de los descansos e inmediatamente después de manipular la sustancia.

Protección personal

Protección de los ojos/ la cara. Caretas de protección y gafas de seguridad. Use equipo de protección para los ojos probado y aprobado según las normas gubernamentales correspondientes, tales como NIOSH (EE.UU.) o EN 166 (UE).

Protección de la piel. Manipular con guantes. Los guantes deben ser inspeccionados antes de su uso. Utilice la técnica correcta de quitarse los guantes (sin tocar la superficie exterior del guante) para evitar el contacto de la piel con este producto. Deseche los guantes contaminados después de su uso, de conformidad con las leyes aplicables y buenas prácticas de laboratorio. Lavar y secar las manos.

Sumersión

Material: Caucho nitrilo

espesura mínima de capa: 0.11 mm

Tiempo de perforación: 480 min

Material probado: Dermatril® (KCL 740 / Aldrich Z677272, Talla M)

Salpicaduras

Material: Caucho nitrilo

espesura mínima de capa: 0.11 mm

Tiempo de perforación: 480 min

Material probado: Dermatril® (KCL 740 / Aldrich Z677272, Talla M)

Origen de datos: KCL GmbH, D-36124 Eichenzell, Teléfono +49 (0)6659 87300, e-mail sales@kcl.de, Método de prueba: EN374. Si es utilizado en solución, o mezclado con otras sustancias, y bajo condiciones diferentes de la EN 374, ponerse en contacto con el proveedor de los guantes aprobados CE. Esta recomendación es meramente aconsejable y deberá ser evaluada por un responsable de seguridad e higiene industrial familiarizado con la situación específica de uso previsto por nuestros clientes. No debe interpretarse como una aprobación de oferta para cualquier escenario de uso específico.

Protección Corporal. Traje de protección completo contra productos químicos. El tipo de equipamiento de protección debe ser elegido según la concentración y la cantidad de sustancia peligrosa al lugar específico de trabajo.

Protección respiratoria. Donde el asesoramiento de riesgo muestre que los respiradores purificadores de aire son apropiados, usar un respirador que cubra

toda la cara tipo N99 (EEUU) o tipo P2 (EN 143) y cartuchos de repuesto para controles de ingeniería. Si el respirador es la única protección, usar un respirador suministrado que cubra toda la cara. Usar respiradores y componentes testados y aprobados bajo los estándares gubernamentales apropiados como NIOSH (EEUU) o CEN (UE).

Control de exposición ambiental. Impedir nuevos escapes o derrames si puede hacerse sin riesgos. No dejar que el producto entre en el sistema de alcantarillado.

9. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS

9.1 Información sobre propiedades físicas y químicas básicas

- a) Aspecto Forma: sólido
- b) Olor sin datos disponibles
- c) Umbral olfativo sin datos disponibles
- d) pH sin datos disponibles
- e) Punto de fusión/ punto de congelación sin datos disponibles
- f) Punto inicial de ebullición e intervalo de ebullición sin datos disponibles
- g) Punto de inflamación sin datos disponibles
- h) Tasa de evaporación sin datos disponibles
- i) Inflamabilidad (sólido, gas) sin datos disponibles
- j) Inflamabilidad superior/inferior o límites explosivos sin datos disponibles
- k) Presión de vapor sin datos disponibles
- l) Densidad de vapor sin datos disponibles
- m) Densidad relativa sin datos disponibles
- n) Solubilidad en agua sin datos disponibles
- o) Coeficiente de reparto n-octanol/agua sin datos disponibles
- p) Temperatura de autoinflamación sin datos disponibles
- q) Temperatura de descomposición sin datos disponibles
- r) Viscosidad sin datos disponibles
- s) Propiedades explosivas sin datos disponibles
- t) Propiedades sin datos disponibles
comburentes

9.2 Otra información de seguridad

sin datos disponibles

10. ESTABILIDAD Y REACTIVIDAD

10.1 Reactividad

Sin datos disponibles

10.2 Estabilidad química

Estable bajo las condiciones de almacenamiento recomendadas.

10.3 Posibilidad de reacciones peligrosas

Sin datos disponibles

10.4 Condiciones que deben evitarse

Sin datos disponibles

10.5 Materiales incompatibles

Agentes oxidantes fuertes

10.6 Productos de descomposición peligrosos

Otros productos de descomposición peligrosos - sin datos disponibles

En caso de incendio: véase sección 5

11. INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA

11.1 Información sobre los efectos toxicológicos

Toxicidad aguda DL50 Oral - rata - 159 mg/kg

Observaciones: Conducta: Somnolencia (depresión general de la actividad)

Conducta: Convulsiones o efectos en el umbral de colapso. Conducta: Ataxia.

Inhalación: sin datos disponibles. Cutáneo: sin datos disponibles

Corrosión o irritación cutáneas. Sin datos disponibles

Lesiones o irritación ocular graves. Sin datos disponibles

Sensibilización respiratoria o cutánea. Sin datos disponibles

Mutagenicidad en células germinales. Sin datos disponibles

Carcinogenicidad. IARC: No component of this product present at levels greater than or equal to 0.1% is identified as probable, possible or confirmed human carcinogen by IARC.

ACGIH: No se identifica ningún componente de este producto, que presente niveles mayores que o el igual a 0,1% como cancerígeno o como carcinógeno potencial por la ACGIH.

NTP: En este producto no se identifica ningún componente, que presente niveles mayores que o iguales a 0.1%, como agente carcinógeno conocido o anticipado por el (NTP) Programa Nacional de Toxicología.

OSHA: No se identifica ningún componente de este producto, que presente niveles mayores que o el igual a 0,1% como cancerígeno o como carcinógeno potencial por la (OSHA) Administración de Salud y Seguridad Ocupacional.

Toxicidad para la reproducción

Los experimentos del laboratorio han mostrado efectos teratogenic.

Toxicidad específica en determinados órganos - exposición única

sin datos disponibles

Toxicidad específica en determinados órganos - exposiciones repetidas

sin datos disponibles

Peligro de aspiración

sin datos disponibles

Información Adicional

RTECS: DN3180000

12. INFORMACIÓN ECOLÓGICA

12.1 Toxicidad Sin datos disponibles

12.2 Persistencia y degradabilidad Sin datos disponibles

12.3 Potencial de bioacumulación Sin datos disponibles

12.4 Movilidad en el suelo Sin datos disponibles

12.5 Resultados de la valoración PBT y mPmB La valoración de PBT / mPmB no está disponible ya que la evaluación de la seguridad química no es necesaria / no se ha realizado

12.6 Otros efectos adversos Sin datos disponibles

13. CONSIDERACIONES RELATIVAS A LA ELIMINACIÓN

13.1 Métodos para el tratamiento de residuos

Producto

Ofertar el sobrante y las soluciones no-aprovechables a una compañía de vertidos acreditada. Para la eliminación de este producto, dirigirse a un servicio profesional autorizado. Disolver o mezclar el producto con un solvente combustible y quemarlo en un incinerador apto para productos químicos provisto de postquemador y lavador.

Envases contaminados

Eliminar como producto no usado.

14. INFORMACIÓN RELATIVA AL TRANSPORTE

DOT (US)

Número ONU: 2811 Clase: 6.1 Grupo de embalaje: III

Designación oficial de transporte de las Naciones Unidas: Toxic solids, organic, n.o.s. (4-Amino- α -[(tertbutylamino)methyl]-3,5-dichlorobenzyl alcohol monohydrochloride)

Contaminante marino: No

Riesgo de intoxicación por inhalación: No

IMDG

Número ONU: 2811 Clase: 6.1 Grupo de embalaje: III EMS-No: F-A, S-A

Designación oficial de transporte de las Naciones Unidas: TOXIC SOLID, ORGANIC, N.O.S. (4-Amino- α -[(tertbutylamino) methyl]-3,5-dichlorobenzyl alcohol monohydrochloride)

Contaminante marino: No

IATA

Número ONU: 2811 Clase: 6.1 Grupo de embalaje: III

Designación oficial de transporte de las Naciones Unidas: Sólido tóxico, orgánico, n.e.p. (4-Amino- α -[(tertbutylamino)methyl]-3,5-dichlorobenzyl alcohol monohydrochloride)

15. INFORMACIÓN REGLAMENTARIA

SARA 302 Componentes

SARA 302: Este material no contiene productos químicos sujetos a los requisitos reportados por SARA Título III, sección 302.

SARA 313 Componentes

SARA 313: Este material no contiene ningún componente químico con los conocidos números CAS que exceden el umbral de los niveles reportados (De Minimis) establecidos por SARA título III, sección 313.

SARA 311/312 Peligros

Peligro Agudo para la Salud, Peligro para la Salud Crónico

Massachusetts Right To Know Componentes

No hay componentes sujetos al Acta de Derecho a Saber de Massachusetts.

Pennsylvania Right To Know Componentes

4-Amino- α -[(tert-butylamino)methyl]-3,5-dichlorobenzyl alcohol monohydrochloride
No. CAS 21898-19-1

New Jersey Right To Know Componentes

4-Amino- α -[(tert-butylamino)methyl]-3,5-dichlorobenzyl alcohol monohydrochloride
No. CAS 21898-19-1

Prop. 65 de California Componentes

Este producto no contiene ninguna sustancia química conocida para el Estado de California que pueden causar cáncer, defectos de nacimiento, o cualquier otro daño reproductivo.

16. OTRA INFORMACIÓN

Texto íntegro de las Declaraciones-H referidas en las secciones 2 y 3.

Acute Tox. Toxicidad aguda
H301 Tóxico en caso de ingestión.

Clasificación HMIS/NFPA

Peligro para la salud: 2
Peligro Crónico para la Salud: *
Inflamabilidad: 0
Peligro Físico 0

Clasificación NFPA

Peligro para la salud: 2
Peligro de Incendio: 0
Peligro de Reactividad: 0

Otros datos

Copyright 2014 Sigma-Aldrich Co. LLC.

La información indicada arriba se considera correcta pero no pretende ser exhaustiva y deberá utilizarse únicamente como orientación. La información contenida en este documento está basada en el presente estado de nuestro conocimiento y es aplicable a las precauciones de seguridad apropiadas para el producto. No representa ninguna garantía de las propiedades del producto. La Corporación Sigma-Aldrich y sus Compañías Afiliadas, no responderán por ningún daño resultante de la manipulación o contacto con el producto indicado arriba. Dirijase a www.sigma-aldrich.com y/o a los términos y condiciones de venta en el reverso de la factura o de la nota de entrega.

Información suministrada por

Corporación Sigma-Aldrich

Product Safety – Americas Region

1-800-521-8956

Versión: 5.3 Fecha de revisión: 06/29/2014

Fecha de impresión: 04/12/2019

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

9.2 ANEXO 2: Calibración de la balanza analítica.

Los procesos de calibración se pueden dividir en dos grandes grupos. El primero de ellos es el proceso directo que es aquel en el que el valor de referencia se expresa en la misma magnitud en la cual mide el equipo. Mientras que, en el segundo proceso llamado indirecto, el equipo mide una magnitud que no es igual al material de referencia certificado.

Ambas calibraciones se pueden llevar a cabo por diferentes métodos, por ejemplo, el método de comparación directa con un patrón, el método de reproducción de la definición de la magnitud, el método de punto cero, y finalmente, el método de sustitución que será el que utilizaremos.

En el método de sustitución se utiliza un instrumento o equipo auxiliar, con el que se mide inicialmente el patrón o la referencia y posteriormente este mismo patrón se mide en el instrumento a calibrar. Por ejemplo, la calibración de una balanza analítica mediante otra balanza analítica calibrada (equipo auxiliar) con objetos patrón.

Los objetos patrón utilizados para esta calibración son: Un vaso de precipitado de vidrio de 10 mL cuyo peso de referencia es 8.3091 g, un vaso de precipitado de vidrio de 25 mL cuyo peso de referencia es 36.0912 g, un vaso de precipitado de vidrio de 50 mL cuyo peso de referencia es 59.4120 g.

Para iniciar el proceso de calibración se verificó que la balanza esté en buen estado, limpia, ubicada en una superficie libre de vibraciones (para lo cual se puede utilizar el indicador de nivel, si este está centrado la balanza esta nivelada).

El plato de la balanza se divide en 4 partes para generar 5 puntos, su ubicación se puede apreciar en la Figura 31, en los cuales posteriormente se deben de colocar los patrones para su lectura.

Una vez obtenido el peso en cada punto, se procede a calcular el promedio de ellos. Con este último dato se calcula la desviación de la balanza mediante una

resta del valor de referencia menos el valor promedio. La desviación calculada debe estar en un rango de ± 1 mg.

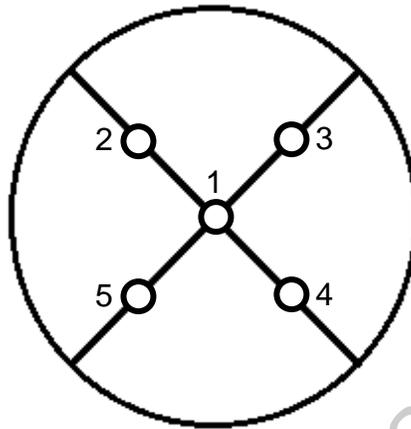


Figura 31. Ubicación de los 5 puntos en el plato de la balanza.

Los resultados obtenidos de este procedimiento se pueden ver en la Tabla 14, y en la Figura 32 se aprecia la posición del matraz en cada uno de los cinco puntos.

Tabla 14. Resultados de las lecturas en la balanza analítica.

| | 1 ^{er} matraz | 2 ^{do} matraz | 3 ^{er} matraz |
|-------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Punto | Lectura (g) | Lectura (g) | Lectura (g) |
| 1 | 8.3091 | 36.0912 | 59.4120 |
| 2 | 8.3091 | 36.0913 | 59.4120 |
| 3 | 8.3091 | 36.0913 | 59.4121 |
| 4 | 8.3090 | 36.0911 | 59.4121 |
| 5 | 8.3091 | 36.0912 | 59.4120 |
| Promedio | 8.30908 | 36.09122 | 59.41204 |
| Desviación | 0.00002 | -0.00002 | -0.00004 |

Con los resultados anteriores se puede concluir que la balanza analítica se encuentra en excelentes condiciones de operación.

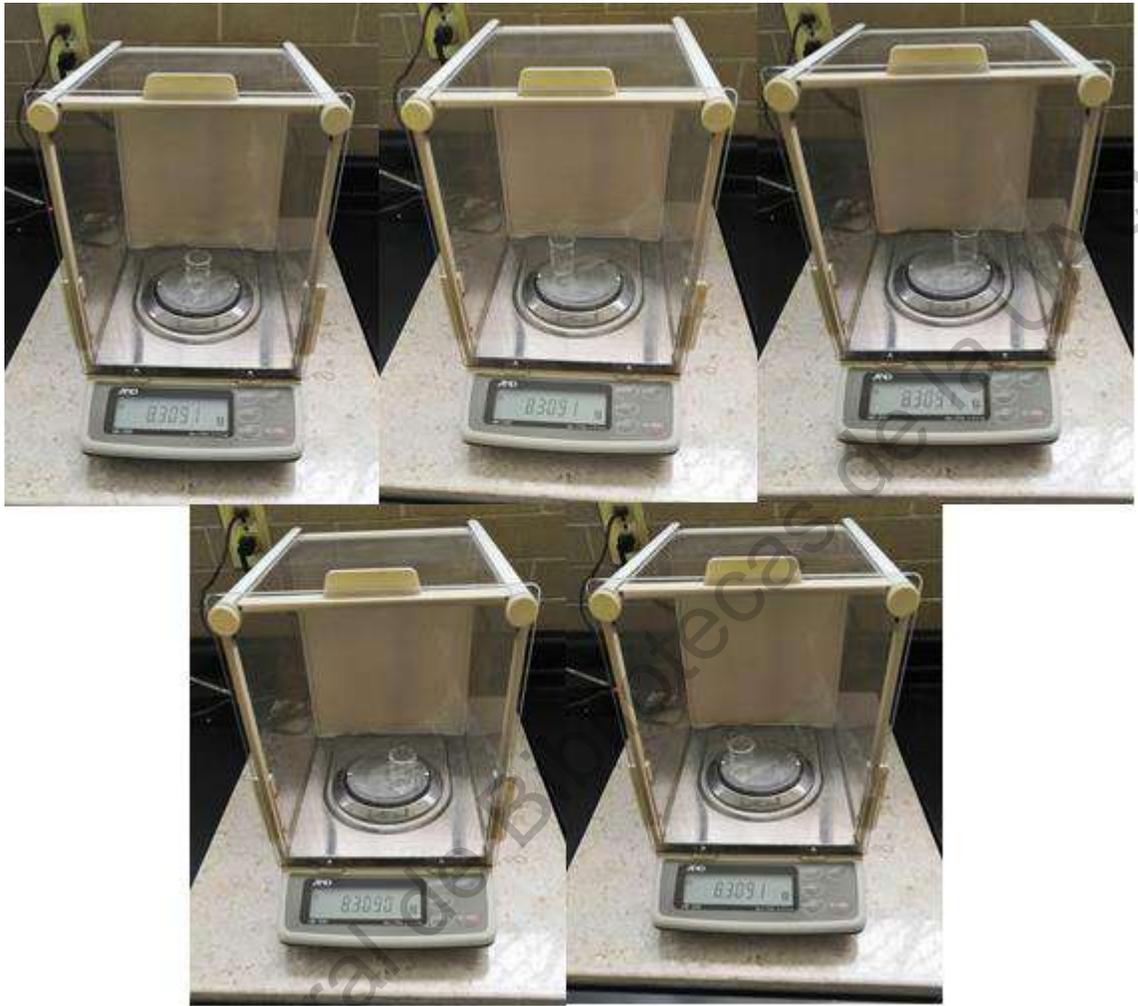


Figura 32. Resultados de las lecturas en la balanza analítica.

9.3 ANEXO 3: Calibración del potenciómetro.

Para la calibración y uso del potenciómetro se siguió paso a paso la guía que proporcionó el fabricante y podemos ver en la Figura 33 y en la Figura 34. La Figura 35 muestra las soluciones estándares de referencia y finalmente en la Figura 36 se observan las lecturas de estas soluciones.

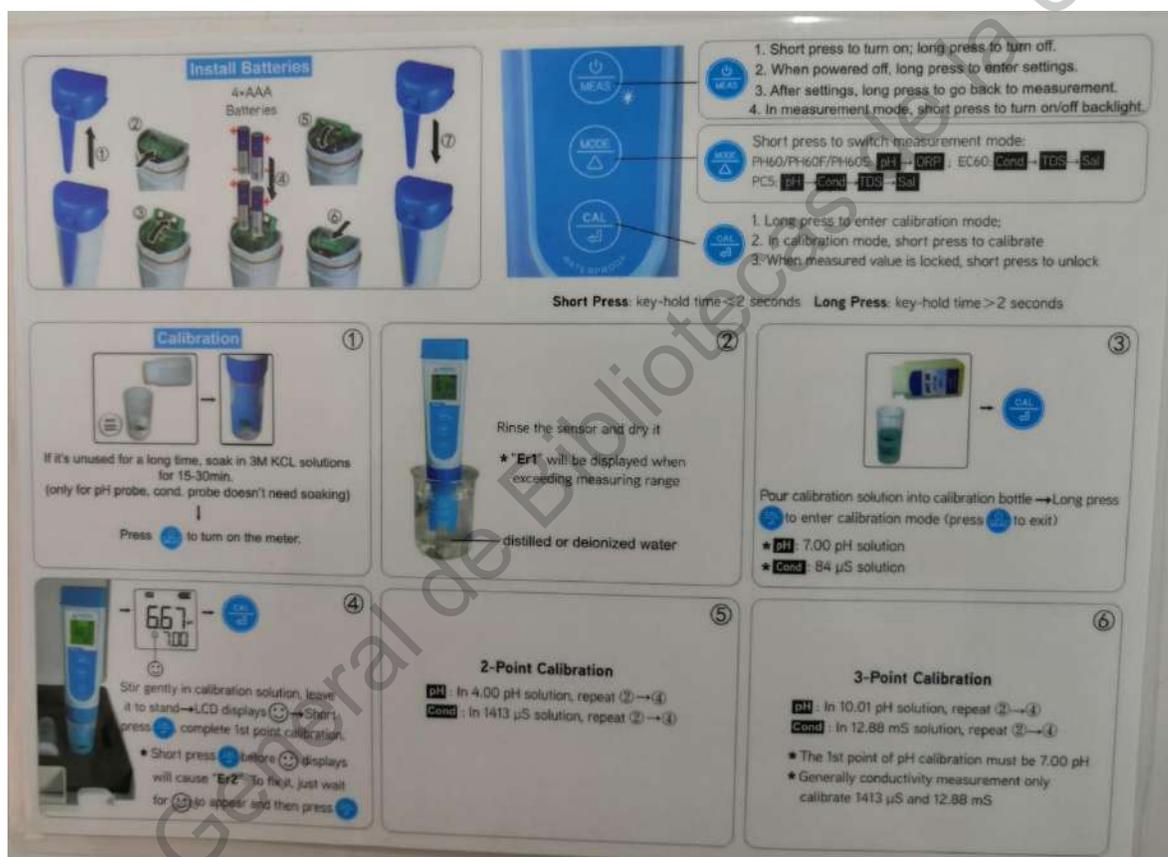


Figura 33. Primera parte del instructivo del potenciómetro

Measurement

① Short press **ON/OFF** to turn on meter → Rinse the sensor and dry it
 • "Er1" will be displayed when exceeding measuring range
 distilled or deionized water

② Stir gently in sample solution and leave it to stand → Get reading after **SM** stays on

③ Long press **ON/OFF** to turn meter off → Clean the sensor → Put on electrode cap.

Setup When meter is turned off, long press **ON/OFF** to enter menu → Short press **MEM** to switch P1-P2... → Short press **MEM** to enter parameter selection mode → Short press **MEM** to select parameter → Short press **MEM** to confirm → Long press **ON/OFF** to return to measurement mode.

| | PH60 / PH60F (Flat) / PH60S (Spear) | EC60 | PC60 |
|----|---|---|---|
| P1 | Select pH buffer (USA - NIST) | Select automatic lock (Off - On) | Select pH buffer (USA - NIST) |
| P2 | Low value measuring alarm (0 - 14.00 pH) | Select backlight (Off - 1 - On) | Select automatic lock (Off - On) |
| P3 | High value measuring alarm (0 - 14.00 pH) | Select temperature coefficient (0.00-4.00%) | Select backlight (Off - 1 - On) |
| P4 | Select automatic lock (Off - On) | Select TDS factor (0.40-1.00) | Select temperature coefficient (0.00 - 4.00%) |
| P5 | Select backlight (Off - 1 - On) | Select salinity unit (ppt - g/L) | Select TDS factor (0.40 - 1.00) |
| P6 | Select temperature unit (°C - °F) | Select temperature unit (°C - °F) | Select salinity unit (ppt - g/L) |
| P7 | Restore to factory default (No - Yes) | Restore to factory default (No - Yes) | Select temperature unit (°C - °F) |
| P8 | | | Restore to factory default (No - Yes) |

Instruction: The red-colored text is the factory default value; pH measuring alarm: default minimum value 0.00 pH and maximum value 14.00 pH on alarm; Select backlight: "Off"-always off, "On"-always on, "1"-factory defaults 1 minute; default value of TDS factor is 0.71; default value of temperature coefficient is 2.00%

| Model | Range | Resolution | Accuracy | Calibration | Calibration Solution | ATC | Function |
|------------------------|---|--|---------------------------------|--------------|--|------------|---|
| PH60 PH60F PH60S | pH: -2.00 - 16.00 pH mV: ±1000 mV Temp: 0 - 50.0°C | 0.01 pH 1 mV 0.1°C | ±0.01 pH ±0.2% F.S ±0.5°C | 1 - 3 points | 1.68/4.00/7.00/ 10.01/12.45 pH | 0 - 50.0°C | 1. to 6. Same as below 7. pH measuring value alarm (red backlight displays) |
| EC60 | Cond: 0.1 µS - 20.00 mS TDS: 0.1 ppm - 10.00 ppt Sal: 0 - 10.00 ppt, Temp: 0 - 50.0°C | 0.1/1 µS, 0.01 mS; 0.1/1 ppm, 0.01 ppt, 0.1°C | ±1% F.S ±0.5°C | 1 - 3 points | 84/1413 µS/ 12.88 mS | 0 - 50.0°C | 1. Indication of calibration point: MEM 2. Measuring stability indication: SM 3. Automatic lock indication: HOLD |
| PC60 | pH: -2.00 - 16.00 pH Cond: 0.1 µS - 20.00 mS TDS: 0.1 ppm - 10.00 ppt Sal: 0 - 10.00 ppt, Temp: 0 - 50.0°C | 0.01 pH 0.1/1 µS, 0.01 mS; 0.1/1 ppm, 0.01 ppt, 0.1°C | ±0.01 pH ±1% F.S ±0.5°C | 1 - 3 points | 1.68/4.00/7.00/ 10.01/12.45 pH 84/1413 µS/ 12.88 mS | 0 - 50.0°C | 4. Self-diagnosis information: Er1, Er2 5. Low voltage alarm: LOW (flickering) 6. Auto-Off in 8 minutes if no operation |

Figura 34. Segunda parte del instructivo del potenciómetro



Figura 35. Soluciones estándares utilizadas en la calibración del potenciómetro.



Figura 36. Lecturas de las soluciones estándares utilizadas en la calibración del potenciómetro

9.4 ANEXO 4: Calibración y uso del potencióstato.

De acuerdo al manual “Installation and Configuration Manual for VMP-300-based* Instruments and Boosters” (*VMP300-based instruments are: SP-200, SP-240, SP-300, VSP-300 and VMP-300) de Bio-Logic del año 2016, el potencióstato no requiere calibración como se puede leer en la Figura 37.

Manual for VMP300-based instruments

9. Maintenance

WARNING Before performing any maintenance power down the unit then disconnect the power cord and all test cables.

9.1 Calibration

9.1.1 SP-200/SP-240/SP-300/VSP-300/VMP-300

Our instruments do not require specific maintenance. Each channel board is calibrated at the factory before it is delivered to the customer. Due to the temperature differences between winter and summer, we recommend adjustment of the gains and offsets of the channel boards twice a year, especially if the instrument is not in an air-conditioned room.

Figura 37. Manual de Bio-Logic para el modelo VMP-300.

Para el correcto uso y funcionamiento del potencióstato, de manera general se dará una pequeña guía con los pasos a seguir hasta la obtención de un voltamperograma. El software utilizado por el potencióstato es EC-Lab en su versión 10.44, la pantalla principal se puede apreciar en la Figura 38, mediante esta herramienta es que se pueden realizar diversas técnicas voltamperométricas. Los parámetros para cada una de estas técnicas también se colocan con ayuda de este programa.

El primer paso es activar la conexión del potencióstato con el programa antes mencionado, para ello ubicamos el recuadro de los dispositivos (Devices) y al dar clic en la herramienta conectar, observamos después de unos segundos que la viñeta a la izquierda del nombre del dispositivo cambio de color rojo a verde, como

se puede apreciar en la Figura 39. Por otro lado, en la parte inferior de la pantalla principal observamos que el estado de la conexión “Off line” pasó al modo “USB” como vemos en la Figura 40.

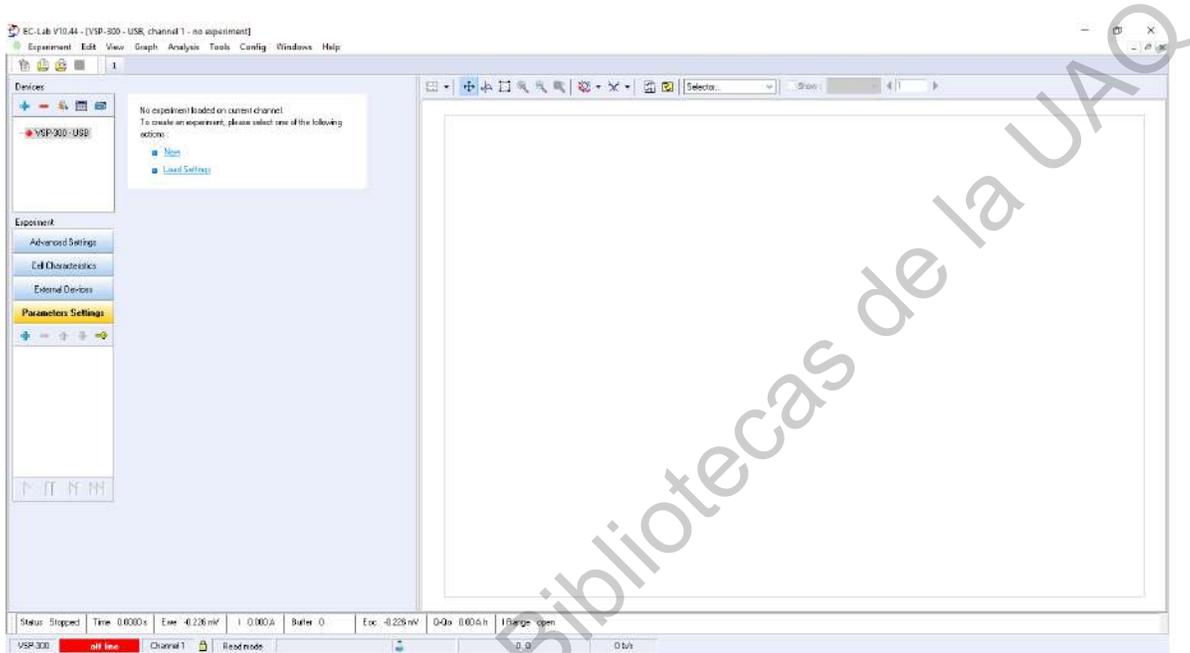


Figura 38. Pantalla principal del EC-Lab V10.44

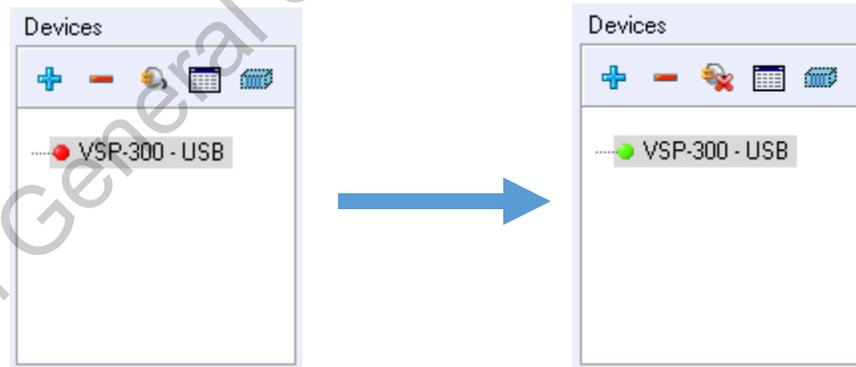


Figura 39. Pestaña de los dispositivos conectados.



Figura 40. Estado de la conexión de los dispositivos.

Después, ubicamos el apartado de la configuración de parámetros (Parameters Settings), insertamos una nueva técnica con la ayuda del icono (cruz color azul) la cual podemos apreciar en la Figura 41. Al dar clic en dicho icono, automáticamente se despliega una ventana con las técnicas disponibles para insertar, ver la Figura 42.

En este caso de estudio se utilizó una técnica voltamperométrica, por lo cual se da clic en la carpeta que contiene dichas técnicas. Específicamente se utilizó la voltametría cíclica, que al seleccionar esta opción se despliega una pequeña descripción de la técnica, la cual podemos ver en la Figura 43. Una vez finalizada la lectura de la técnica se da clic en el botón “OK” para insertarla.



Figura 41. Pestaña de la configuración de parámetros.

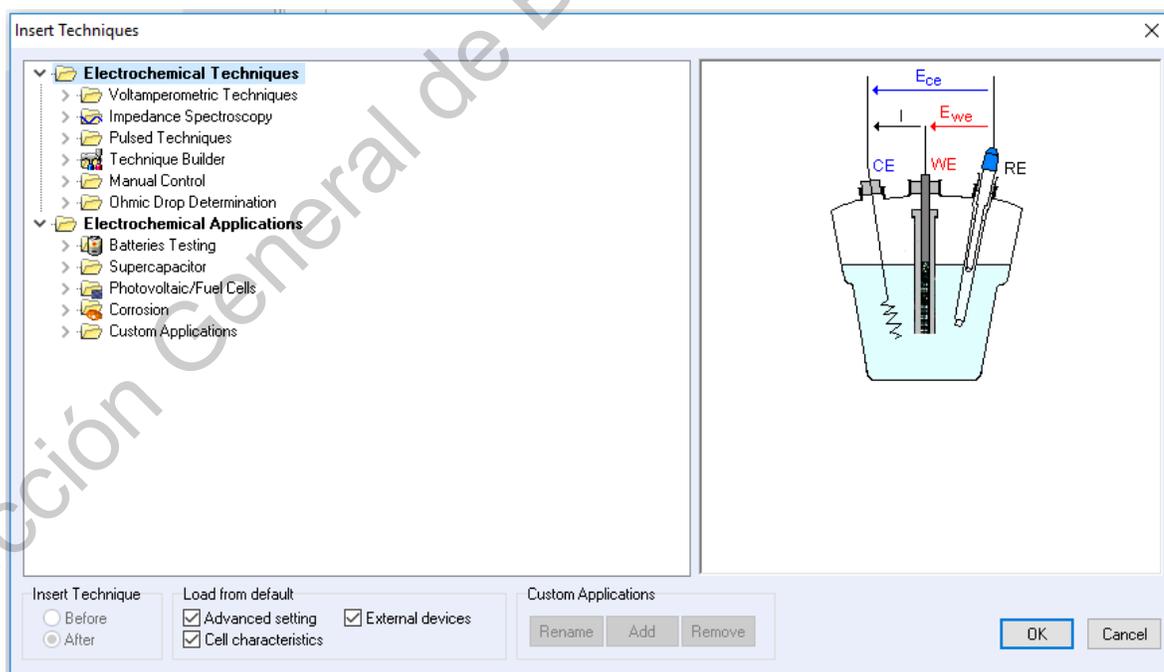


Figura 42. Ventana con las técnicas voltamperométricas disponibles.

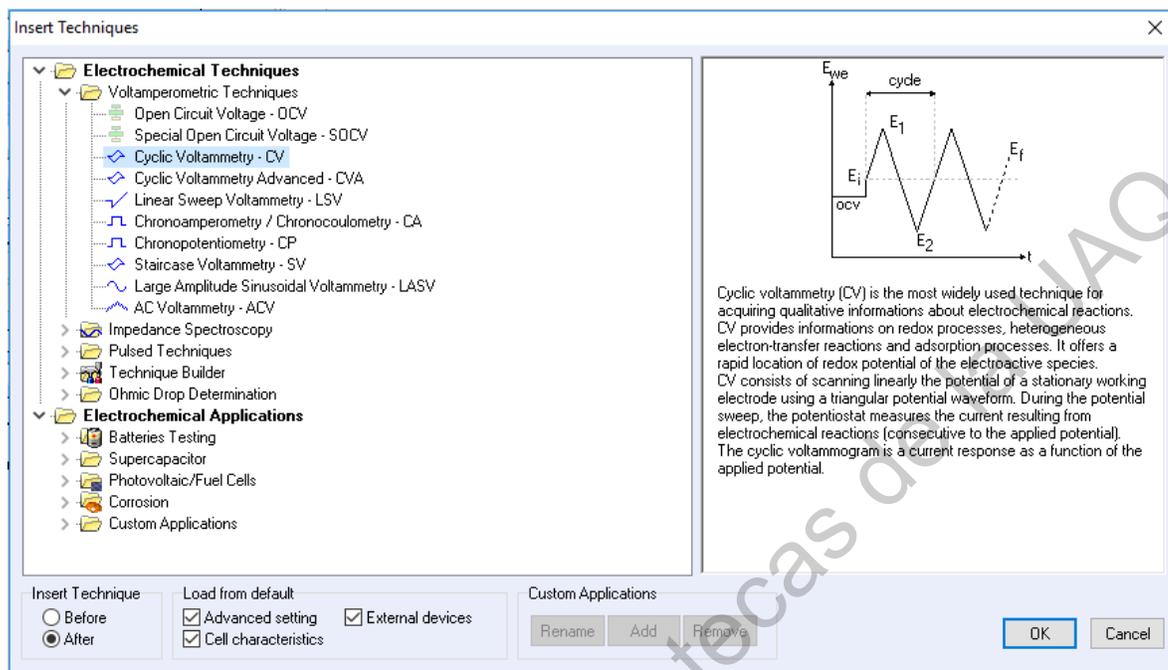


Figura 43. Ventana con la técnica de voltametría cíclica.

Al insertar la técnica, esta aparece en un listado en la pestaña de configuración de parámetros, la cual se puede ver en la Figura 44. Para definir los rangos de trabajo de las variables involucradas, utilizamos la opción de modificar (icono con la llave color amarillo) la cual nos despliega la ventana para poder colocar los valores para la velocidad de barrido, el potencial y el número de ciclos, estos valores se observan en la Figura 45. Al finalizar la captura de los valores, nuevamente se da clic en el icono de modificar parámetros para que estos se guarden en la configuración del experimento.

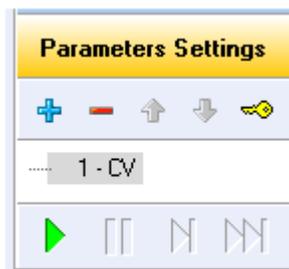


Figura 44. Pestaña de la configuración de parámetros con la técnica insertada.

| | | |
|--------------------------------|--------------------------------------|--|
| Scan E_{we} with $dE/dt =$ | <input type="text" value="100.000"/> | <input type="text" value="mV/s"/> |
| to vertex potential $E_1 =$ | <input type="text" value="1.000"/> | V vs. <input type="text" value="Ref"/> |
| Reverse scan to vertex $E_2 =$ | <input type="text" value="-0.500"/> | V vs. <input type="text" value="Ref"/> |
| Repeat $n_c =$ | <input type="text" value="3"/> | time(s) |

Figura 45. Parámetros de la técnica

Una vez realizado todo este procedimiento, se conecta el electrodo serigrafiado al equipo y se coloca la muestra a analizar en la superficie de los electrodos, como se aprecia en la Figura 46. Se inicia el análisis dando clic en el icono (triángulo color verde) que aparece en la configuración de parámetros, al hacer esto se despliega una ventana para indicar la ubicación de donde se guardará el archivo que resulta del análisis, así como definir el nombre de dicho archivo; dando clic en el botón "OK" el análisis comienza. Una vez finalizados los ciclos solicitados, se obtiene un voltamperograma como el que se muestra en la Figura 47.



Figura 46. Electrodo serigrafiado conectado al potenciostato

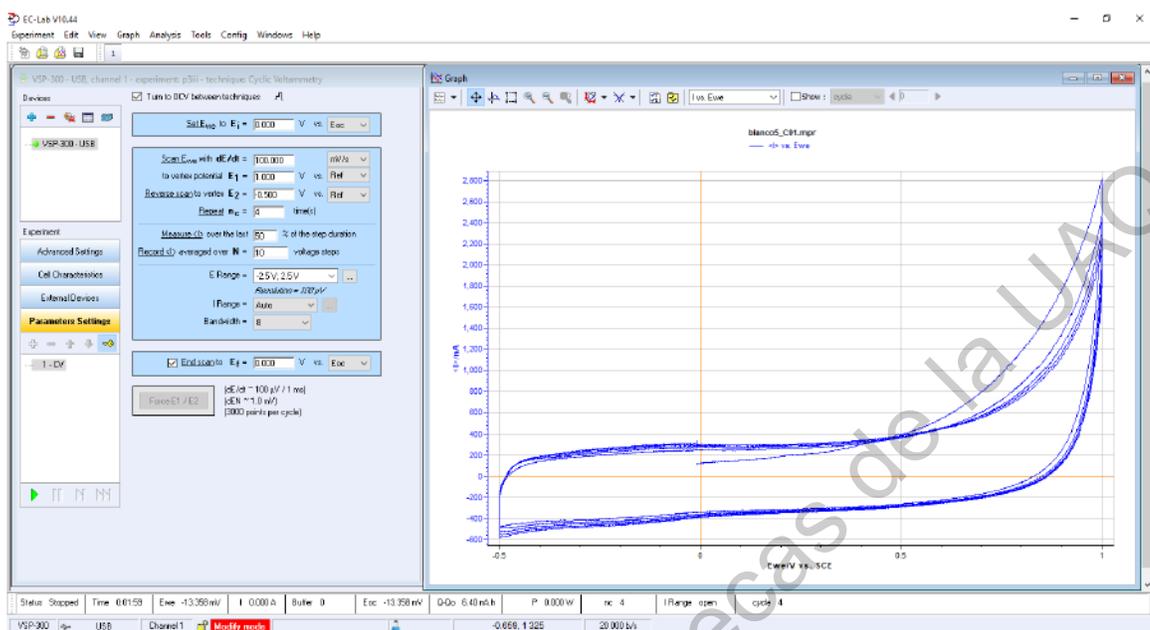


Figura 47. Pantalla principal al finalizar el análisis voltamperométrico.