

BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS NANOESTRUCTURADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ULTRA TRAZAS DE DROGAS ANABÓLICAS EN MUESTRAS DE ORIGEN BOVINO

ELECTROCHEMICAL NANOSTRUCTURED BIOSENSORS FOR DETERMINATION OF ULTRA-TRACE ANABOLIC DRUGS IN BOVINE SAMPLES

Matías Regiart (Instituto de Química San Luis [INQUISAL, CONICET], Departamento de Química, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis [UNSL]), **Sirley V. Pereira** (Instituto de Química San Luis [INQUISAL, CONICET], Departamento de Química, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis [UNSL]), **Germán Alejandro Messina** (Instituto de Química San Luis [INQUISAL, CONICET], Departamento de Química, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis [UNSL]), **Martín Fernández Baldo** (Instituto de Química San Luis [INQUISAL, CONICET], Departamento de Química, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis [UNSL]), **Viviana G. Spotorno** (Instituto de Recursos Biológicos [IRB, CIRN], Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria [INTA], **Franco A. Bertolino** (Instituto de Química San Luis [INQUISAL, CONICET], Departamento de Química, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis [UNSL]) y **Julio Raba** (Instituto de Química San Luis [INQUISAL, CONICET], Departamento de Química, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis [UNSL]) - Argentina.

Resumen

Los anabólicos son drogas capaces de incrementar la retención de nitrógeno aumentando la acumulación de proteínas en los animales, son utilizados en producción agropecuaria y entrañan un serio problema para la salud pública (FAO/OMS, Roma, 1975). Entre estos compuestos se encuentran los β -agonistas, los cuales empleados en dosis bajas presentan usos terapéuticos, mientras que utilizados en altas dosis muestran su función anabolizante, generan residuos cuya acumulación representa un peligro para los consumidores. Debido al reporte de serias intoxicaciones, fue prohibida su utilización como promotores del crecimiento.

El análisis de dichos residuos en muestras de origen animal requiere elevada sensibilidad y selectividad. Las metodologías usadas para su determinación son la cromatografía líquida y gaseosa con detección por espectroscopia de masas y técnicas inmunológicas como ELISA y RIA. Alternativamente, y debido a que los β -agonistas y otros anabólicos como el zeranol contienen grupos electroactivos, la detección electroquímica representa una estrategia para ser considerada. Esta detección combinada con el uso de electrodos de láminas impresas ofrece ventajas como sencillez, versatilidad, bajo precio, mínimo volumen de muestra requerido y portabilidad del sistema, lo que permite realizar ensayos *in situ*.

La incorporación de nanomateriales (nanopartículas metálicas, nanotubos de carbono, etc.) en la superficie de dichos electrodos posibilita mejorar la sensibilidad

Abstract

Anabolic, drugs able to increase nitrogen retention by increasing the accumulation of proteins in animals have been used in livestock production and involve a serious problem for public health (FAO/OMS, Rome 1975). Within these compounds include β -agonists, which have therapeutic uses, but to express its anabolic function require high doses, which generate waste whose accumulation represents a danger for consumers. Since the report of serious food poisoning their use as growth promoter was banned.

The analysis of such residues in animal samples should be performed with high sensitivity and selectivity. The most widely used methods are techniques of liquid chromatography and gas chromatography with mass spectroscopy detection, but can also be used immunological techniques such as ELISA and RIA. Alternatively, and because the β -agonists containing electroactive groups, electrochemical detection should be considered. This detection combined with the use of screen printed carbon electrodes provides many advantages such as simplicity, versatility, low price, minimum sample volume required and portability system, which allows "in situ" determinations.

Another strategy to improve sensitivity over traditional methods is the incorporation of nanomaterials (metal nanoparticles, carbon nanotubes, etc.). These materials represent a tool for sensors construction because they provide an increased surface area, high conductivity, electrocatalytic properties, as well as an excellent biocompatibility; therefore can be used as supports

en comparación con los métodos tradicionales. Dichos materiales se emplean en la construcción de sensores, pues ofrecen un aumento en el área superficial, conductividad y propiedades electrocatalíticas, así como también una excelente biocompatibilidad por lo que pueden utilizarse como soportes para la inmovilización de biomoléculas en reacciones inmunológicas y/o enzimáticas.

Palabras clave: biosensores, electroquímica, nanomateriales, drogas anabólicas, muestra bovina.

for biomolecule immobilization on immunological and/or enzymatic reactions.

Keywords: biosensors, electrochemical, nanomaterials, anabolic drugs, bovine samples.

Introducción

La seguridad de los alimentos se ha convertido en una prioridad fundamental para los consumidores, los productores y los organismos públicos debido a ciertos acontecimientos relevantes como la enfermedad de la vaca loca, la contaminación de carne con dioxinas, la utilización inadecuada de hormonas, antibióticos, derivados transgénicos, etcétera. Todos estos sucesos demandaron un mayor control por parte de los entes reguladores, como también mejores sistemas de producción y tecnologías aplicadas en los alimentos. Esto generó reformas en la legislación alimentaria con una política dirigida hacia la vigilancia como mecanismo de prevención. Como consecuencia de esto la normativa ha sido reformada, para otorgar un mayor nivel de protección a los consumidores (Brambilla *et al.*).

La contaminación alimentaria se puede definir como la introducción o la presencia de contaminantes en los alimentos o en la cadena alimentaria que suponen un riesgo para la salud humana (Codex alimentarius, 1999). La Organización Mundial de la Salud (OMS) define como “residuo” a cualquier sustancia química que persiste en un medio tras haber sido introducida en él voluntariamente o no y cuya presencia es cuantitativa o cualitativamente anormal. Su origen puede estar en el ambiente, en la aplicación de promotores del crecimiento o de medicamentos de uso veterinario, en los aditivos incorporados en los alimentos o bien en sustancias procedentes de transformaciones tecnológicas o tratamientos culinarios (Kuiper *et al.*).

En ganadería, los procedimientos zootécnicos, profilácticos y terapéuticos son causa frecuente del ingreso de contaminantes químicos en la cadena alimentaria, son capaces de producir intoxicaciones.

Esto supone un problema importante para la salud pública, ya que se originan residuos en los alimentos procedentes de los animales tratados. Dentro del amplio grupo de residuos derivados del uso de tratamientos veterinarios se incluyen los compuestos antibacterianos, antimicóticos y antiparasitarios que se emplean en la profilaxis, en el tratamiento de diferentes enfermedades animales y como promotores del crecimiento (tranquilizantes, compuestos de acción tireostática y de acción hormonal) (Mersmann *et al.*).

El uso inadecuado de sustancias tales como los β -agonistas y otras drogas anabólicas ha demostrado efectos cancerígenos. Algunas de estas sustancias pasaron de ser usadas de forma terapéutica o profiláctica, a ser utilizados en dosis que potencian el crecimiento de los animales (Smith *et al.*).

El empleo de drogas veterinarias representa una herramienta importante en la producción de alimentos en nuestro país, por lo que existe un creciente interés en medidas de control más eficaces, dado que cualquier episodio puede conllevar la pérdida de confianza por parte de los mercados internacionales. Entre las sustancias consideradas peligrosas que deben controlarse, se encuentra la familia de los β -agonistas, que incluye compuestos como el clenbuterol (CL), zinterol (ZIN), entre otros, junto con anabólicos de acción hormonal directa como el zeranol (ZEN) (Izquierdo-Lorenzo *et al.*). Estas drogas fueron originalmente utilizadas para el tratamiento de patologías respiratorias en el ganado debido a su potente acción broncodilatadora. Sin embargo su uso fue extendido para incrementar la retención de nitrógeno, aumentando así la acumulación de proteínas en los animales (FAO/OMS, Roma, 1975) con el fin de lograr una mayor producción en menor

tiempo. El uso de estos compuestos ha sido prohibido, pues la acumulación, larga vida media y estabilidad de sus residuos afectan la salud humana y deben ser cuidadosamente monitoreados (Mitchell *et al.*).

Por las razones antes mencionadas, dichos compuestos son controlados como residuos de medicamentos veterinarios en el ámbito de la seguridad alimentaria mediante varios métodos analíticos en diversas muestras biológicas, que incluyen Ultra cromatografía líquida de alto rendimiento - Espectrometría de masas (UHPLC-MS) (Nicoli *et al.*), Cromatografía de gas - Espectrometría de masas (GC-MS) (Yang *et al.*), Cromatografía líquida - Espectrometría de masa (LC-MS) (Crescenzi *et al.*), Raman scattering (SERS) (Zhu *et al.*), Electroforesis capilar (CE) (Wang *et al.*), Enzimoimmunoensayo (ELISA) (Pleadin *et al.*) e Inmunosensores (Gao *et al.*). Aunque la determinación de drogas anabólicas por estos métodos ha sido ampliamente utilizada en diferentes muestras debido a su alta selectividad y sensibilidad, presenta algunas desventajas como un elevado costo, complejos pretratamientos de la muestra y prolongados tiempos de análisis. El desarrollo de un biosensor electroquímico facilitaría dichas determinaciones y permitiría un control más exhaustivo y económico sin perder sensibilidad, y con alta selectividad analítica (Regiart *et al.*).

Durante los últimos años, se han desarrollado diversas técnicas de inmunoanálisis para la determinación de analitos, y los investigadores han enfocado su mirada en el desarrollo de inmunosensores con detección electroquímica (He *et al.*). Esto se debe principalmente a su elevada sensibilidad y buena compatibilidad con las nuevas tecnologías, permitiendo además la miniaturización y la incorporación de diferentes nanomateriales como plataforma de reactivos inmunológicos específicos a través de un proceso de inmovilización adecuada. Asimismo, posibilitan el diseño de capas de reconocimiento con excelentes propiedades: biocompatibilidad, buena reversibilidad, estabilidad, transferencia electrónica y una elevada superficie de reacción que permite el incremento en la sensibilidad de las determinaciones, debido a una mayor eficacia en las interacciones entre muestras y reactivos (Guo *et al.*).

Relevancia y justificación

Existe un creciente interés en el campo de la seguridad alimentaria respecto del control de sustancias utilizadas en animales destinados al consumo humano. Entre los elementos considerados peligrosos, se encuentra la familia de los β -agonistas, que incluye compuestos tales como el CL, ZIN y anabólicos de acción hormonal directa como ZEN.

Se han reportado varios casos de intoxicación alimentaria humana con síntomas como taquicardia, temblores, náuseas, diarrea, fiebre, mialgias, astenia e hipertensión. Su uso en la producción agropecuaria está prohibido en la Argentina como en la mayoría de los países, incluida la Unión Europea. La presencia de estos residuos afecta negativamente la exportación de productos comestibles de origen animal, pudiendo causar importantes pérdidas económicas para nuestro país.

Por las razones ya mencionadas, los residuos de tales compuestos deben ser controlados en el ámbito de la seguridad alimentaria mediante muestras biológicas. Los métodos empleados actualmente para la determinación de residuos presentan ciertas desventajas (elevado costo, pretratamientos complejos de muestra y prolongados tiempos de análisis, etc.), por tanto el impulso de metodologías modernas de análisis que ofrezcan soluciones innovadoras frente a la problemática planteada reviste gran importancia.

Este proyecto plantea el desarrollo de biosensores acoplados a sistemas de detección electroquímica, que incorporarán materiales nanoestructurados aplicados a la detección de residuos de drogas anabólicas presentes en muestras de interés provenientes de la actividad agropecuaria. Es llevado a cabo por el grupo de Bioanalítica, Electroquímica y Nanotecnología dirigido por el Dr. Julio Raba en el Instituto de Química de San Luis (INQUISAL), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Universidad Nacional de San Luis (UNSL), en conjunto con la Dra. Viviana Spotorno del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), en el marco de los Premios Senasa 2014-2015 a la Investigación y Transferencia de equipos consolidados, en su modalidad Calidad e Inocuidad Agroalimentarias.



Figura 1. Novillo tratado con β -agonistas (Unión Ciclista Internacional [UCI], 2014).

Objetivos

Objetivo general

Desarrollo de biosensores electroquímicos que incorporan materiales nanoestructurados aplicados a la determinación de ultra trazas de drogas anabólicas en muestras bovinas.

Objetivos específicos

- Utilización de nanomateriales en sistemas de preconcentración y modificación de electrodos empleados para la detección y cuantificación de los analitos de interés.
- Estudio de las propiedades electroanalíticas de electrodos modificados con nanopartículas metálicas, nanotubos de carbono, entre otros, con el fin de mejorar la sensibilidad y especificidad en las determinaciones.
- Evaluación y optimización de parámetros experimentales que afectan las estrategias de detección electroquímica.
- Estudio de las propiedades electroactivas de los diferentes β -agonistas, tales como CL, ZEN y ZIN mediante técnicas voltamperométricas.
- Utilización de biomoléculas (antígenos, anticuerpos, proteínas) inmovilizadas por diferentes técnicas y en distintos soportes, con el fin de obtener nuevas plataformas de inmovilización.
- Desarrollo de sensores enzimáticos y/o inmunológicos, con sistemas de detección electroquímica, a través de la utilización de diferentes tipos de electrodos que permitan la cuantificación de analitos en muestras biológicas tales como pelo, orina y suero bovino, entre otras.

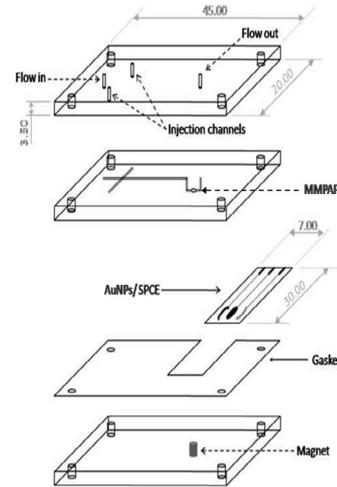


Figura 2: Representación esquemática de un inmunosensor. SPCE: electrodo de láminas impresas de grafito. Todas las medidas fueron realizadas en milímetros (Messina, 2010).

Metodología

Actividades principales

1. Se realizará una búsqueda bibliográfica extensiva de los temas relacionados con el plan de trabajo propuesto.
2. Se profundizará el aprendizaje y entrenamiento en el manejo del instrumental electroquímico y las diferentes técnicas electroanalíticas aplicadas.
3. Desde el punto de vista electroquímico, se estudiarán las propiedades electroactivas de diferentes compuestos, como catecol, ter-butilcatecol, hidroquinona y p-aminofenol, para ser utilizados como mediadores detectados sobre electrodos desnudos y modificados con diferentes nanomateriales.
4. Se estudiarán las ventajas de la amplificación enzimática y comportamiento electroquímico de los electrodos modificados.
5. Se utilizarán distintas técnicas de modificación química de diferentes matrices, lo que permitirá la inmovilización de antígenos o anticuerpos, como elementos biológicamente activos incorporados en los sensores desarrollados.
6. Los sistemas desarrollados serán aplicados a la determinación de CL, ZEN y ZIN, entre otros, en muestras bovinas.
7. La evaluación del sistema analítico desarrollado se realizará por medio de cifras de mérito tales como: límites de detección y cuantificación, precisión, exactitud, frecuencia de análisis, entre otras.

Ventajas de los biosensores miniaturizados

- Reducidos volúmenes de muestra.
- Menor consumo de reactivos.
- Mínimos tiempos de análisis.
- Múltiples procesos integrados en el mismo dispositivo (portátiles).
- Automatización (confiabilidad y sensibilidad).

Tabla 1. Ventajas de los biosensores miniaturizados (Fernández-Baldo, 2011).

Tratamiento de los animales

En el experimento, se utilizaron tres novillos holando-argentino de entre 2,5 a 3 años de edad y aproximadamente 450 kg. De acuerdo con el fenotipo, estos animales tienen pelaje blanco con amplias regiones de pelaje negro. Dos de ellos fueron tratados con una inyección intravenosa yugular de 10 mL de un formulado veterinario que contiene 0,03 mg mL⁻¹ (0,3 mg por animal) de β-agonista, según las instrucciones del protocolo. Treinta y ocho días posteriores a la primera inyección, a estos dos animales se les aplicó una dosis mayor, de 65 mL (1,95 mg por animal) en dos veces, por la mañana y por la tarde. Los tres animales fueron alimentados a pasto con libre acceso al agua de bebida. Cada semana posterior a las aplicaciones se tomaron muestras de pelo de la misma región del animal (de manera que siempre fuera el pelo recién crecido) y de orina que se conservaron a 4 °C hasta su análisis. Los días siguientes a las inyecciones se tomaron muestras de sangre, que se centrifugaron en el día para la separación del suero y se guardaron a -20 °C hasta su análisis.

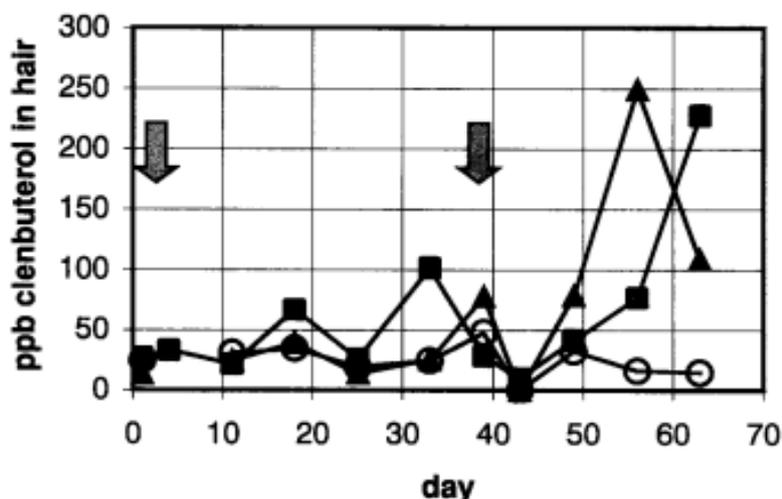


Figura 3: Promedio de concentración de CL en pelo en dos animales tratados (▲, ■) y en un tercer animal utilizado como control (○) cuantificado por ELISA. Las flechas indican el tiempo de inyección al día 1 y día 39, respectivamente (Spotorno, 2008).

Desarrollo

El desarrollo de los biosensores propuestos se basa en el empleo de electrodos de láminas impresas con electrodos de trabajo de diferentes materiales (oro, grafito, con y sin modificaciones) como sistema de detección electroquímica. Sobre los electrodos de trabajo se incorporarán nanomateriales para llevar a cabo la inmovilización o detección según corresponda. Entre los posibles nanomateriales para incorporar cabe mencionar: nanopartículas metálicas (Pt, Au, Cu) y/o paramagnéticas, nanotubos de carbono y grafeno. Los electrodos modificados con materiales nanoestructurados servirán como plataformas para la incorporación de elementos de reconocimiento biológico (inmunorreactivos) que permitan la detección de manera selectiva de las drogas anabólicas antes mencionadas. Se estudiarán las condiciones operativas óptimas de estas metodologías para la determinación de niveles extremadamente bajos de analitos en las muestras de interés. Las aplicaciones se centrarán en forma preferencial en analitos con propiedades terapéuticas pero ilegalmente utilizados como anabólicos en animales. Algunos de los analitos propuestos para su correspondiente estudio son: CL, ZEN y ZIN, entre otros. Para este fin se usarán técnicas electroquímicas asociadas a metodologías de separación/preconcentración. La optimización se realizará mediante herramientas quimiométricas, siguiendo los lineamientos clásicos de la estadística. La validación de los resultados se hará comparándolos con patrones certificados o utilizando metodologías estándares.



Figura 4: Plataforma BAS C-3 conteniendo la celda para las experiencias voltamperométricas. Electrodo de trabajo: carbono vítreo (negro), electrodo de referencia: Ag/AgCl/3M NaCl (blanco) y como contraelectrodo: platino (rojo) (Bertolino, 2011).

1. Caracterización del sistema de trabajo

El comportamiento electroquímico de los diferentes compuestos y sus derivados se estudiará empleando voltamperometría cíclica (VC) y técnicas de pulso modernas, como voltamperometría de pulso diferencial (VPD) y voltamperometría de onda cuadrada (VOCO) y utilizando concentraciones de sustrato del orden de 10^{-4} M o menores. También se emplearán métodos auxiliares, como Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) para la caracterización de materiales heterogéneos, películas delgadas y sistemas multicapas, y Espectrometría Dispersiva en Energía (EDE) o en Longitudes de Onda (EDLO), según corresponda, para cuantificar elementos metálicos y no metálicos que se apliquen en la modificación de la superficie de electrodos, haciendo uso del microanálisis como técnica no destructiva.

2. Elección de las condiciones de trabajo

Se estudiarán las condiciones adecuadas de concentración, preconcentración, el medio de trabajo –ya sea acuoso (ácido, neutro o básico) o no acuoso–, posibles interferentes, etcétera. Para soluciones no acuosas los estudios se orientarán a la búsqueda de un solvente y electrolito soporte adecuado.

3. Estudio fisicoquímico de las variables que afectan al sistema

Se estudiará el efecto de la variación del pH, particularmente para los sistemas biológicos, el tiempo de contacto entre los reactivos inmovilizados y la muestra, la cinética de las reacciones involucradas, la fuerza iónica, la velocidad de barrido y concentración inicial de reactivos. Se evaluará el potencial de pico (E_p) y la intensidad de la corriente de pico (I_p), al igual que las modificaciones del E_p y del I_p por la adición de el/los analitos de interés.

4. Estudio de los mecanismos enzimáticos e inmunológicos

Se estudiarán los sistemas enzimáticos y/o inmunológicos en forma práctica mediante ensayos colorimétricos con detección espectrofotométrica con el fin de comprobar su aplicabilidad a los sistemas desarrollados. Asimismo, se evaluarán distintos

mediadores para ser utilizados con el propósito de seleccionar aquellos que resulten acordes a los fines de obtener una señal óptima para el sistema de detección electroquímica.

5. Estudio de las distintas técnicas de inmovilización

Se ensayarán técnicas de inmovilización sobre diferentes soportes adaptables a los sistemas en estudio como vidrio de porosidad controlada modificado con grupos 3-amino propilo, nanotubos de carbono activados, superficies de carbono, oro y nanopartículas magnéticas modificadas con grupos amino o carboxilo.

6. Construcción de biosensores con sistema de detección electroquímico incorporado

Se diseñarán biosensores con detección electroquímica que usarán electrodos de láminas impresas de grafito, platino u oro (con y sin modificaciones) como plataformas para la incorporación de inmunorreactivos y/o enzimas.

7. Análisis de resultados

Se realizará mediante los lineamientos clásicos de la estadística (Currie *et al.*) y la constatación de los resultados en muestras de patrones certificados (CRM) o a través de estudios de recuperación. Para llevar a cabo la cuantificación, se utilizarán los datos obtenidos de VOCO, VPD o amperometría. La precisión de las técnicas desarrolladas se evaluará a través de determinaciones en muestras biológicas y/o sintéticas, además de su constatación con métodos estándares.

8. Aplicación de las metodologías desarrolladas

Los biosensores electroquímicos nanoestructurados serán aplicados en la detección de anabólicos en muestras de interés biológico (suero, orina, pelo) mediante la evaluación de los parámetros estadísticos de estas.

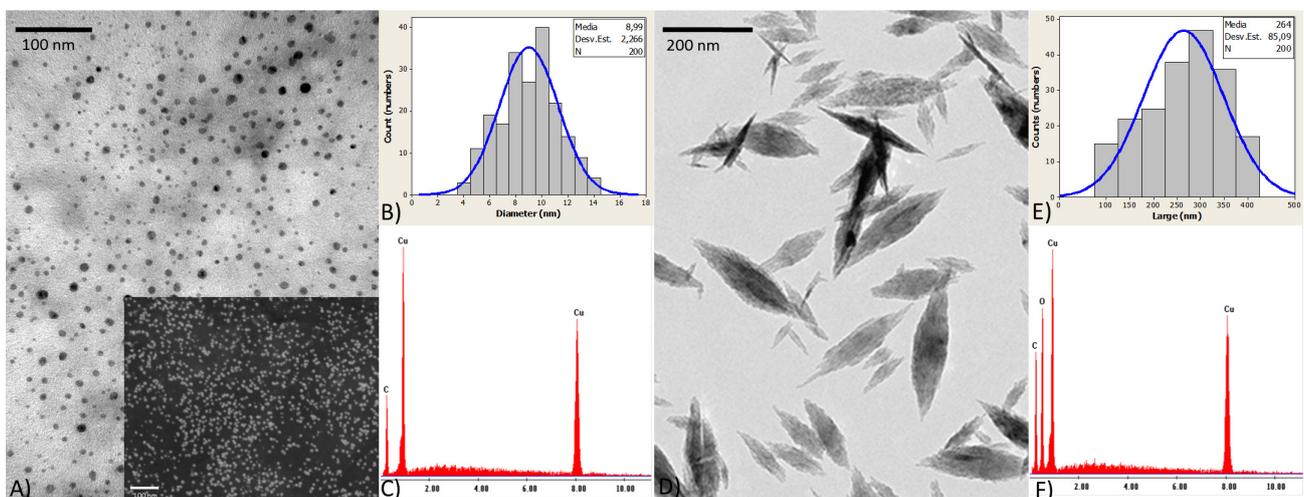


Figura 5: Caracterización de nanopartículas de cobre y óxido de cobre. A) La morfología de las nanopartículas de cobre fue estudiada por microscopía electrónica de transmisión y barrido; B) Histograma de distribución de tamaño de las nanopartículas de cobre; C) Composición elemental de las nanopartículas de cobre; D) La morfología de las nanopartículas de óxido de cobre fue estudiada por microscopía electrónica de transmisión; E) Histograma de distribución de tamaño de las nanopartículas de óxido de cobre; F) Composición elemental de las nanopartículas de óxido de cobre (Regiart, 2015).

Conclusión

La presencia de residuos provenientes de drogas anabólicas en productos comestibles de origen animal puede afectar negativamente la salud de los consumidores, disminuir la exportación de dichos productos y causar importantes pérdidas económicas. Por esto, la relevancia de desarrollar biosensores electroquímicos de alta sensibilidad y

confiabilidad para la determinación de ultra trazas de drogas anabólicas de abuso en muestras biológicas. Se generaría, de este modo, un gran aporte de la Química Analítica para la seguridad agroalimentaria.

El grupo de investigación posee una extensa trayectoria en el impulso de metodologías basadas en electroanalítica, tratamiento de biosensores inmunológicos y enzimáticos, sistemas microfluidos y nanotecnología aplicada. Además, cuenta con numerosas publicaciones en revistas de prestigio internacional que avalan el avance científico con respecto a esta temática.

Bibliografía

- Bai, J., Lai Y., Jiang D., Zeng Y., Xian Y., Xiao F., Zhang N., Hou J. Y L. Jin (2012), "Ultrasensitive electrochemical immunoassay based on graphene oxide-Ag composites for rapid determination of clenbuterol", *Analyst* 137, pp. 4349-4355.
- Bo, B., Zhu X., Miao P., Pei D., Jiang B., Lou Y., Shu Y. Y G. Li (2013), "An electrochemical biosensor for clenbuterol detection and pharmacokinetics investigation", *Talanta* 113, pp. 36-40.
- Brambilla, G., Loizzo A., Fontana L., Strozzi M., Guarino A., Soprano V. y L. Tollefson (1997), "Food poisoning following consumption of clenbuterol-treated veal in Italy", *Journal of the American Medical Association* 278, p. 635.
- Crescenzi, C. , Bayouhdh S., Cormack P.A.G., Klein T. y K. Ensing (2001), "Determination of clenbuterol in bovine liver by combining matrix solid-phase dispersion and molecularly imprinted solid-phase extraction followed by liquid chromatography/electrospray ion trap multiple-stage mass spectrometry", *Analytical Chemistry* 73, pp. 2171-2177.
- Currie, L. A. (1995), "Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995)", *Pure Applied Chemistry* 67, pp. 1699-1723.
- Gaichore, R. R. y 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", *Journal of Applied Electrochemistry* 42, pp. 979-987.
- Gao, L.J., Gan N., Hu F.T., Cao Y.T. y L. Zheng (2011), "An amperometric immunosensor based on a polyelectrolyte/nano gold particle layer-by-layer assembly modified electrode for the determination of clenbuterol in meat", *Advance Materials Research* 1793, pp. 217-218.
- Guo, R.; Xu, Q.; Wang, D. y X. Hu (2008), "Trace determination of clenbuterol with an MWCNT-Nafion nanocomposite modified electrode", *Microchimica Acta* 161, pp. 265-272.
- He, P.; Wang, Z.; Zhang, L. y W. Yang (2009), "Development of a label-free electrochemical immunosensor based on carbon nanotube for rapid determination of clenbuterol", *Food Chemistry* 112, pp. 707-714.
- Izquierdo-Lorenzo, I.; Sanchez-Cortes, S. y J.V. Garcia-Ramos (2010), "Adsorption of beta-adrenergic agonists used in sport doping on metal nanoparticles: A detection study based on surface-enhanced raman scattering", *Langmuir* 26, pp. 14663-14670.
- Kuiper, H. A., Noordam M. Y., Van Dooren-Flipsen M. M. H., Schilt R. y A. H. Roos (1998), "Illegal use of β -adrenergic agonists: European community", *Journal of Animal Science* 76, pp. 195-207.
- McGrath, G. J.; O'Kane, E.; Smyth, W. F. y F. Tagliaro (1996), "Investigation of the electrochemical oxidation of clenbuterol at a porous carbon electrode, and its application to the determination of this β -agonist in bovine hair by liquid chromatography with coulometric detection", *Analytica Chimica Acta* 322, pp. 159-166.

- Mersmann, H. J. (1998), "Overview of the effects of β -adrenergic receptor agonists on animal growth including mechanisms of action", *Journal of Animal Science* 76, pp. 160-172.
- Mitchell G. A. y G. Dunnavan (1998), "Illegal use of β -adrenergic agonists in the United States", *Journal of Animal Science* 76, pp. 208-211.
- Nicoli R., Petrou M., Badoud F., Dvorak J., Saugy M. y Baume (2013), "Quantification of clenbuterol at trace level in human urine by ultra-high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry", *Journal of Chromatography A* 1292, pp. 142-150.
- Pleadin, J., Vulić A., Perši N., Terzić S., Andrišić M. y ŽarkovićI (2013), "Rapid immunoassay method for the determination of clenbuterol and salbutamol in blood", *Journal of Analytical Toxicology* 37, pp. 241-245.
- Regiart, M., Fernandez-Baldo M. A., Spotorno V. G., Bertolino F. A. y J. Raba (2013), "Ultra sensitive microfluidic immunosensor for determination of clenbuterol in bovine hair samples using electrodeposited gold nanoparticles and magnetic microparticles as bio-affinity platform", *Biosensors and Bioelectronics* 41, pp. 211-217.
- Regiart, M., Pereira S. V., Spotorno V. G., Bertolino F. A. y J. Raba (2013), "Nanostructured voltammetric sensor for ultra-trace anabolic drugdetermination in food safety field", *Sensors and Actuators B* 188, pp. 1241-1249.
- Smith, D. J. (1998), "The pharmacokinetics, metabolism, and tissue residues of β -adrenergic agonists in livestock", *Journal of Animal Science* 76, pp. 173-194.
- Wang, W., Zhang Y., Wang J., Shi X. Y J. Ye. (2010), "Determination of β -agonists in pig feed, pig urine and pig liver using capillary electrophoresis with electrochemical detection", *Meat Science* 85, pp. 302-305.
- Yang S., Liu X., Xing Y., Zhang D., Wang S., Wang X., Xu Y., Wu M., He Z. y J. Zhao (2013), "Detection of clenbuterol at trace levels in doping analysis using different gas chromatographic-mass spectrometric techniques", *Journal of Chromatography Science* 51, pp. 436-445.
- Zhao, C., Jin G.P., Chen L.L., Li Y. y B. Yu (2011), "Preparation of molecular imprinted film based on chitosan/nafion/nano-silver/poly quercetin for clenbuterol sensing", *Food Chemistry* 129, pp. 595-600.
- Zhu, G.; Hu, Y.; Gao, J. y L. Zhong (2011), "Highly sensitive detection of clenbuterol using competitive surface-enhanced Raman scattering immunoassay", *Analytica Chimica Acta* 697, pp. 61-66.