

### Clenbuterol y otros $\beta$ -agonistas, ¿una opción para la producción pecuaria o un riesgo para la salud pública?

### Clenbuterol and other $\beta$ -agonists, are they an option for meat production or a threat for public health?

Héctor Sumano L.\*  
Luis Ocampo C.\*  
Lilia Gutiérrez O.\*

---

#### Abstract

The correct assessment of each so-called  $\beta$ -adrenergic agonist, motivated the authors to carry out this review of the scientific literature. In Mexico, as in many countries worldwide, some  $\beta$ -adrenergic agonists are used to improve carcass performance in various domestic species. From this group, chemically classified as phenethanolamine derivatives, clenbuterol, ractopamine and zilpaterol, stand out. In this review, chemical and pharmacological differences among these latter agents are emphasized; in particular those aspects that concern public health. Derived from references and information compiled, it becomes evident that clenbuterol is capable of enhancing carcass performance in cattle and other species. However its use may jeopardize, to some extent, public health. But above all, at present, the use of clenbuterol to improve performance in food producing animals must be viewed as an illegal act; hence, liable to legal punishment. It is only fair to state that clenbuterol is neither carcinogenic, nor mutagenic, and only embryotoxic at very high doses. This drug is dangerous to human beings in terms of the cardiovascular stimulatory effects that may derive from the consumption of meat products from animals in which a 4-week withdrawal period was not observed. At present, no fatalities have been related to this drug. In contrast, ractopamine and zilpaterol produce extremely weak pharmacological actions in man, and are so rapidly metabolized and cleared from the animal's body, that it is virtually impossible to regard them as potential causes of drug poisoning in human beings, even after consuming meat products derived from animals medicated with these drugs and were no withdrawal time was enforced.

**Key words: CLENBUTEROL, RACTOPAMINE, ZILPATEROL,  $\beta$ -ADRENERGIC AGONIST, DRUG-RESIDUES, PUBLIC HEALTH.**

#### Resumen

Este trabajo ubica al clenbuterol y otros fármacos agonistas  $\beta$ -adrenérgicos, en la dimensión farmacológica que les corresponde. En el ámbito internacional el uso de estos últimos se está incrementando para mejorar el rendimiento en canal de varias especies domésticas. Destacan el clenbuterol, zilpaterol y la ractopamina, entre otros, del grupo de las fenetanolaminas. Se puntualizan en esta revisión las diferencias químicas y farmacológicas de los compuestos citados, destacando los puntos que impactan en la salud pública. Del análisis de la

---

Recibido el 31 de enero de 2002 y aceptado el 5 de abril de 2002.

\* Departamento de Fisiología y Farmacología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

información resulta evidente que el clenbuterol es capaz de aumentar el rendimiento de las canales de los bovinos y otras especies. Empero, es un tanto peligroso para la salud pública y representa un acto ilegal y, por tanto, reprobable y punible. No obstante, debe destacarse que este principio activo no es potencialmente oncogénico ni mutagénico y es embriotóxico sólo a grandes dosis. Únicamente representa un peligro para la salud pública en términos de la estimulación cardiovascular que se deriva de la ingestión de productos cárnicos provenientes de animales tratados con clenbuterol y en los que no se observó un retiro de rastro de cuatro semanas. A la fecha no existen informes que documenten fatalidades. En contraparte la ractopamina y el zilpaterol son tan débiles farmacológicamente en el ser humano que se biotransforman y depuran con rapidez en los animales, tanto que es imposible considerar que induzcan efectos cardiovasculares adversos o de otra índole, aun consumiendo productos de origen animal provenientes de bovinos y cerdos en los que no se guardó ningún periodo de retiro.

**Palabras clave: CLENBUTEROL, RACTOPAMINA, ZILPATEROL,  $\beta$ -ADRENÉRGICOS, RESIDUOS, SALUD PÚBLICA.**

## Introduction

In many species clenbuterol, the  $\beta$ -agonist drug (CB), is considered as a potent bronchodilator, anabolic and lipolytic agent.<sup>1-3</sup> It is also called a partitioning agent because it foments protein production and reduces fat. Internationally it is banned for use as a production enhancer. However, and as a consequence of the gain of important profits in the carcass yield, it is known to be used illegally in beef cattle. The use of clenbuterol is an illegal procedure and it should be punished severely; but it only merits administrative penalties in Mexico, such as fines and the closing down of establishments. The public health consequences of clenbuterol consumption in food animal products (FAP) are, in the best case, uncertain and most likely dangerous because of its cardiovascular activity. Therefore, the importance of clarifying the actual situation of clenbuterol was considered and, consequently, were the other available agonists in the market, such as zilpaterol and ractopamine.

## Relationship between $\beta$ -adrenergic agonist (*b*-AR) structure and activity

It is important to point out that even if a drug is toxic or hazardous, or leaves residues in animal tissues for long periods, this doesn't mean that all its analogs are necessarily the same. For example, ciprofloxacin differs from enrofloxacin in just one ethyl radical, however, such a change is enough to produce a drug with a poor pharmacokinetic behavior in veterinary medicine, in the first case and one of excellent characteristics in the second.<sup>4</sup> Chloramphenicol differs from tiamphenicol in just one nitrogen, which is substituted by a sulfur. In the first case,

## Introducción

Se considera al fármaco  $\beta$ -agonista o clenbuterol (CB) como un potente broncodilatador, anabólico y agente lipolítico en muchas especies.<sup>1-3</sup> También se le denomina agente de repartición en virtud de que fomenta la producción de proteína y reduce la de grasa. En el ámbito internacional está prohibido su uso como promotor de la producción. Sin embargo, y como consecuencia que se obtienen importantes ganancias en el rendimiento en canal, se sabe de su uso clandestino en el ganado de engorda. El uso del clenbuterol de la manera dicha es ante todo un procedimiento ilegal y como tal reprobable y debería ser severamente castigado; empero sólo alcanza penalidades administrativas en México, como multas y clausura de establecimientos. Las consecuencias para la salud pública del consumo de clenbuterol en productos de origen animal (POA) son, en el mejor de los casos, inciertas y más seguramente peligrosas por su actividad cardiovascular. Por tanto, se consideró de importancia aclarar la situación real del clenbuterol y, por extensión, de otros agonistas disponibles en el mercado, como el zilpaterol y la ractopamina.

## Relación entre estructura y actividad de los agonistas *b*-adrenérgicos (*b*-AR)

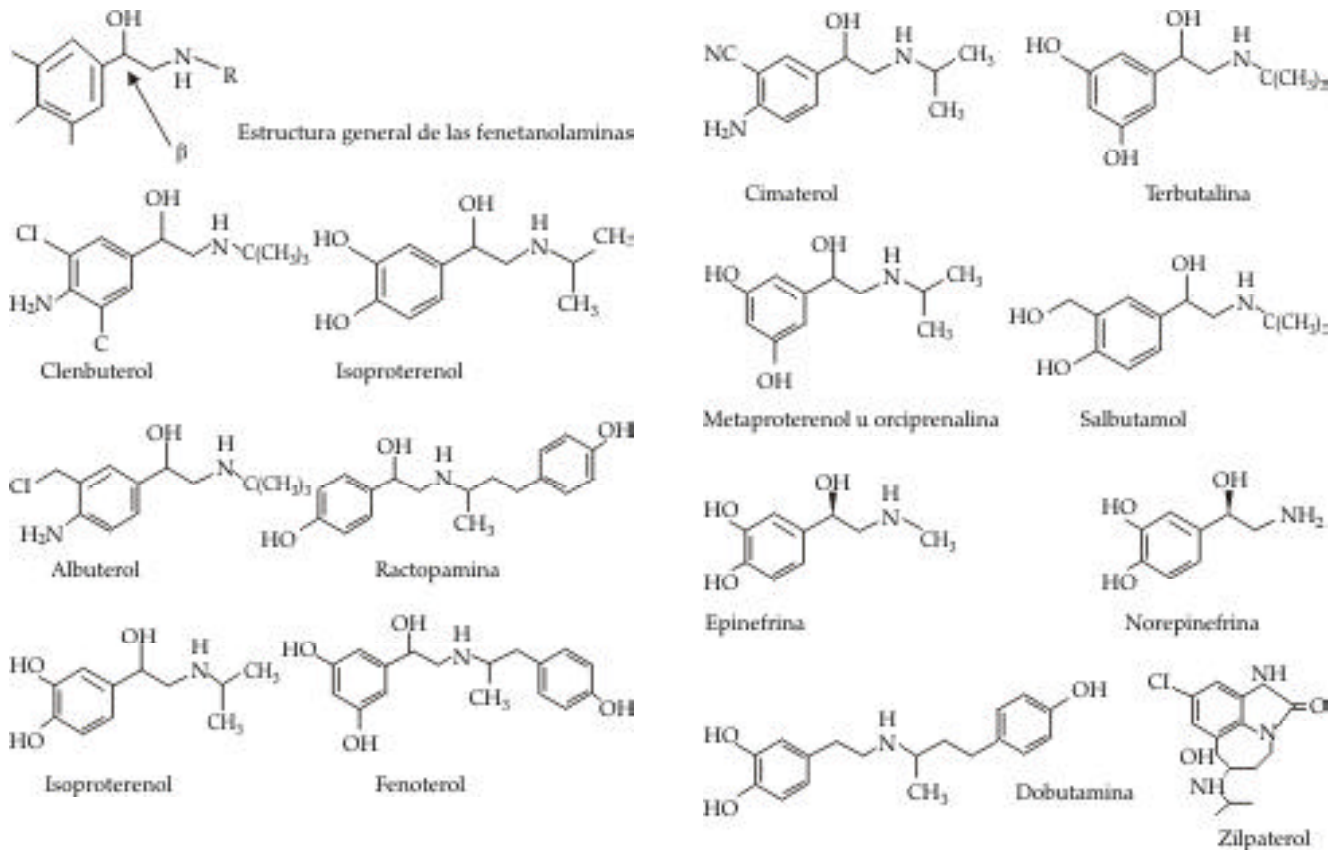
Es importante destacar que el hecho de que aun cuando un medicamento es tóxico o perjudicial, o deje residuos en los tejidos animales por largos periodos, esto no necesariamente hace a todos los análogos iguales. Por ejemplo, la ciprofloxacina difiere de la enrofloxacina en tan sólo un radical etilo; sin embargo, dicho cambio es suficiente para tener un fármaco de mal comportamiento farmacocinético en veterinaria, en el primer caso, y de excelentes características, en el segundo.<sup>4</sup> El cloranfeni-

the danger for public health is reactive aplastic anemia induction, reason for its ban in veterinary medicine since 1992, whereas tiamphenicol does not generate the above mentioned reaction, which depends on the nitrogen.<sup>5</sup> Steroids differ amongst themselves because of one hydroxyl; however, it is evident that testosterone effects are very different to estradiol effects.<sup>6</sup> In the same way, the pharmacological characteristics of clenbuterol are not totally shared with all the  $\beta$ -AR agonist analogs.

Clenbuterol is a member of the so-called phenethanolamines, drugs that, as a group, require the presence of an aromatic ring with an hydroxyl group in the  $\beta$  position of the aliphatic group to show activity. The presence of the nitrogen group and the substitution of R by a voluminous group, often cyclic, non-aliphatic, makes the molecule more specific to the  $\beta$ -adrenergic receptors as in the case of the dobutamine (Figure 1). With the exception of this last substitute, the natural catecholamines of the organism (epinephrine and norepinephrine) are very similar to the  $\beta$ -AR agonists. However, both clenbuterol as well as the other  $\beta$ -AR agonists show important differences in intrinsic activities, due to the characteristics of the substitute groups. In the same way,

col difiere del tianfenicol en un solo nitrógeno, sustituido por un azufre. En el primer caso, el peligro para la salud pública por inducir anemia aplásica reactiva en el ser humano, motivó su prohibición en el ámbito veterinario en 1992, mientras que el tianfenicol no genera la reacción comentada dependiente del nitrógeno.<sup>5</sup> Los esteroides difieren entre sí tan sólo por un hidroxilo; sin embargo, es evidente que los efectos de la testosterona son muy distintos a los del estradiol.<sup>6</sup> De la misma forma, las características farmacológicas del clenbuterol no son compartidas en su totalidad necesariamente por todos los análogos agonistas  $\beta$ -AR.

El clenbuterol constituye un miembro de las denominadas fenetanolaminas, medicamentos que, como grupo, requieren la presencia de un anillo aromático con un grupo hidroxilo en la posición  $\beta$  del grupo alifático para mostrar actividad. La presencia del grupo nitrogenado y la sustitución de R por un grupo voluminoso, a menudo cíclico, no alifático, hace más específica a la molécula por los receptores  $\beta$ -adrenérgicos como en el caso de la dobutamina (Figura 1). Con excepción de este último sustituyente, las catecolaminas naturales del organismo (epinefrina y norepinefrina) son muy similares a los agonistas  $\beta$ -AR. Empero, tanto el clenbuterol como todos los agonistas  $\beta$ -AR muestran importantes diferencias en las activi-



the different substitutions allow different pharmacokinetic characteristics. At the same time, the different capacities of distribution and permanence in the organism determine the magnitude of the  $\beta$ -AR agonist and the persistence of residues in animal tissues.<sup>7</sup> For example, the bronchodilator effect of clenbuterol is much more potent than the effect of salbutamol, but the later has very little cardiovascular activity making it the preferred treatment for asthmatic conditions in humans.<sup>8-20</sup>

For the  $\beta$ -AR agonists, the substitutions of the aromatic ring are important in order to obtain a defined biological activity. For example, salbutamol is inactivated by the reaction of glucuronic acid (hepatic glucuronidation) on the OH- radical of the ring.<sup>21-23</sup> Similarly, some compounds are biotransformed and inactivated readily by the tissue catechol-O-methyltransferases (COMT), which methylate the hydroxyls in the aromatic ring, such is the case of isoproterenol and dobutamine.<sup>3,9</sup> In contrast, ractopamine, salmeterol and salbutamol are not substrates for COMT, and are only biotransformed by hepatic glucuronidation. When the OH- are substituted by a halogen as in the case of clenbuterol (chloride), biotransformation is avoided by the COMT enzymes at a tissue level and hepatic biotransformation is slowed.<sup>22</sup> At the same time, the presence of chloride in clenbuterol makes it more liposoluble than its analogs and, thus, tends to diffuse deeper in tissues and in animal fat.<sup>7,24-26</sup> However, it is necessary to clarify that all the  $\beta$ -AR derivatives mentioned previously would be more liposoluble if they did not have an amine that is protonated at a physiological pH or lower, such as in the stomach. This amine gives pKa values, of at least 8.5, and usually higher than 10.<sup>27-33</sup> With these characteristics they are not soluble in organic solvents at a physiological pH and most of them are soluble in water or methanol.<sup>27,34,35</sup> According to this situation, the extraction of  $\beta$ -AR agonists referred here from biological samples is achieved with a greater efficiency in a pH of 10 whether in an ether, ethylacetate or methylene chloride matrix.<sup>29,36</sup> A notable exception is salmeterol, which is very liposoluble and fixes to the cells for longer periods of time, perhaps for this reason it hasn't been used in veterinary medicine.

In Figure 1 the  $\beta$ -AR compounds present a lateral chain (named b). This could be levorotatory or dextrorotatory. The commercial compounds present both stereoisomers; therefore, they will have a variable activity depending on the chirality ratio. For some compounds as clenbuterol, ractopamine, fenoterol, isoproterenol, zilpaterol and terbutaline the active part is levorotatory<sup>8-20</sup> although there are experimental compounds whose dextrorotatory form is the functional one.

dades intrínsecas, ello se debe a las características de los grupos sustituyentes. Asimismo, las diferentes sustituciones propician a distintas características farmacocinéticas; a su vez, las diferentes capacidades de distribución y permanencia en el organismo determinan la magnitud del efecto del agonista  $\beta$ -AR y la persistencia de residuos en los tejidos animales.<sup>7</sup> Por ejemplo, el efecto broncodilatador del clenbuterol es mucho más potente que el del salbutamol, pero este último tiene poca actividad cardiovascular, por ello es preferido para el tratamiento de condiciones asmáticas en el hombre.<sup>8-20</sup>

Para los agonistas  $\beta$ -AR, las sustituciones en el anillo aromático son importantes para obtener una actividad biológica definida. Por ejemplo, el salbutamol se inactiva por reacción con el ácido glucurónico (glucuronidación hepática) en el radical OH- del anillo.<sup>21-23</sup> Asimismo, algunos compuestos se biotransforman e inactivan rápidamente por las catecol-O-metiltransferasas (COMT) tisulares que metilan los hidroxilos en el anillo aromático, tal es el caso del isoproterenol y la dobutamina.<sup>3,9</sup> En contraparte, la ractopamina, el salmeterol y el salbutamol no son sustratos para la COMT, y sólo son biotransformados por glucuronidación hepática. Cuando los OH- son sustituidos por un halógeno como en el caso del clenbuterol (cloro), se evita la biotransformación por las enzimas COMT a nivel tisular y se hace lenta la biotransformación hepática.<sup>22</sup> Al mismo tiempo, la presencia del cloro en el clenbuterol lo hace más liposoluble que sus análogos y, por ende, tiende a difundir más profundamente en los tejidos y la grasa animal.<sup>7,24-26</sup> Sin embargo, es necesario aclarar que todos los derivados  $\beta$ -AR mencionados serían más liposolubles de no ser porque la amina que todos tienen se encuentra protonada a pH fisiológico o menor, como el del estómago. Esta amina les confiere valores de pKa de, por lo menos, 8.5 y generalmente superiores a 10.<sup>27-33</sup> Con estas características no son solubles en solventes orgánicos a pH fisiológico y la mayoría son solubles en agua o metanol.<sup>27,34,35</sup> En esta tesitura, la extracción de agonistas  $\beta$ -AR del tipo aquí referido de muestras biológicas se logra con mayor eficiencia en pH 10 en una matriz de éter, etilacetato o cloruro de metileno.<sup>29,36</sup> Una notable excepción a lo dicho es el salmeterol, que es muy liposoluble y se fija a las células por tiempo prolongado, quizá por esta razón no se le ha utilizado en veterinaria.

En la Figura 1 los compuestos  $\beta$ -AR presentan una cadena lateral (señalada como  $\beta$ ). Ésta puede ser levógira o dextrógira. Los compuestos comerciales presentan ambos estereoisómeros; por tanto, tendrán actividad variable dependiendo de su proporción quiral. Para algunos compuestos como clenbuterol, ractopamina, fenoterol, isoproterenol, zilpaterol y terbutalina la parte activa es la levorrotada<sup>8-20</sup> aunque existen compuestos experimentales que funcionan con la parte dextrorrotada.

## Effects of clenbuterol and *b*-AR analog antagonists

In cattle, clenbuterol induces when given in low doses, when it is considered as a productive performance enhancer: a increase in blood pressure,<sup>3,37</sup> a temporary increase in heart rate during approximately 24 hours, an increase in the metabolic rate and it has been reported that there is an increase in lameness rate.<sup>38</sup> There are no reports documented about the effects of a clenbuterol overdose in this species, but they should not differ from previous situations, except in their magnitude. At production doses, the problem in the illegal use of clenbuterol is centered mainly on the risks it represents for the consumer of food animal products contaminated by this drug.<sup>39</sup> This problem does not apply to the other  $\beta$ -agonists that are licensed for sale (ractopamine, zilpaterol) due to their lower bronchodilator or cardiovascular potency in comparison with clenbuterol and even with salbutamol. For example, the cardiostimulative activity of clenbuterol is approximately 2,000 times higher than zilpaterol\*.

Clenbuterol represents a drug that offers the benefit of inducing noticeable bronchodilation in man at a dose of 10, 20 and up to 40 mg/adult and of 0.8 mg/kg in bovines and equines.<sup>40-42</sup> Also, in a similar way to what occurs in women at risk of experiencing premature childbirth in cases where other  $\beta$ -AR agonists are used,<sup>43,44</sup> clenbuterol is a drug capable of delaying parturition in mares, ewes and cows in at dose of 300-450 mg/animal.<sup>45-48</sup> A review in the main information banks (CAD, VET-CD, MEDLINE, BIOLOGICAL ABSTRACTS, etc.) since 1966 did not show any note to correlate clenbuterol with a genotoxic, embryotoxic, teratogenic, nor mutagenic effect. So, the potential problem in public health is likely due to a matter of clenbuterol concentrations in consumed food and not accumulative genomic toxicity or any other kind previously mentioned. In the same way, there is no data suggesting that a  $\beta$ -AR derivative presents the above mentioned toxicities.

It is important to mention that in the case of clenbuterol there have been reports of the following effects derived from the consumption of food products of animal origin that have contained this drug, such as: hand numbness, muscle tremors, nervousness, headache and muscle pain. In extreme acute overdoses, not derived from drug residues in consumed products, but rather with an accidental or purposeful overdose of pharmaceutical products for human consumption which contain clenbuterol, there is marked tachycardia, numbness, nervousness, tremors and there can even be myocardial necrosis due to diminished blood perfusion generated by a decrease in the diastole, a stage in which the myocardium receives irrigation

## Efectos del clenbuterol y análogos agonistas *b*-AR

En bovinos el clenbuterol induce a dosis bajas, consideradas como promotoras del rendimiento productivo: Aumento de la presión sanguínea,<sup>3,37</sup> incremento transitorio de la frecuencia cardíaca durante 24 horas aproximadamente, incremento de la tasa metabólica, se ha informado que aumenta la tasa de cojeras.<sup>38</sup> No se tienen documentados los efectos de una sobredosis de clenbuterol en esta especie, pero no deben diferir de lo anterior más que en su magnitud. A dosis promotoras de la producción o superiores, el problema del uso ilegal del clenbuterol se centra mayormente en los riesgos que representa para el consumidor la ingesta de productos de origen animal contaminados con este fármaco.<sup>39</sup> Este problema no se hace extensivo a los otros  $\beta$ -agonistas que tienen autorizada su venta (ractopamina, zilpaterol) debido a que su potencia broncodilatadora, vaso o cardioactiva, es mucho menor que la del clenbuterol y aun que la del salbutamol. Por ejemplo, la actividad cardioestimuladora del clenbuterol es aproximadamente 2 000 veces superior a la del zilpaterol.\*

El clenbuterol representa un medicamento que ofrece el beneficio de inducir una notoria broncodilatación en el hombre a dosis de 10, 20 y hasta 40 mg/adulto y de 0.8 mg/kg en bovinos y equinos.<sup>40-42</sup> También, de manera similar a lo que sucede con la mujer que tiene una amenaza de parto prematuro y en la que se usan otros agonistas  $\beta$ -AR,<sup>43,44</sup> el clenbuterol es un medicamento capaz de retardar el proceso de parto en yeguas, ovejas y vacas a dosis de 300-450 mg/animal.<sup>45-48</sup> Una revisión en los principales bancos informáticos (CAD, VET-CD, MEDLINE, BIOLOGICAL ABSTRACTS, etc.) de 1966 a la fecha no arrojó una sola cita en la que se correlacione al clenbuterol con un efecto genotóxico, embriotóxico, teratogénico ni mutagénico. De tal suerte que el problema potencial en salud pública se debe posiblemente a una cuestión de concentraciones del clenbuterol en los alimentos ingeridos y no a una toxicidad genómica acumulable o de otra de las índoles ya referidas. De la misma manera, no hay datos que sugieran que algún derivado  $\beta$ -AR presente las toxicidades comentadas.

Es importante señalar que solamente en el caso del clenbuterol se han documentado los siguientes efectos derivados de la ingesta del fármaco incluido en productos de origen animal: Adormecimiento de las manos, temblores musculares, nerviosismo, dolor de cabeza y dolores musculares. En sobredosis agudas-extremas, no derivadas de la ingesta de productos con residuos

\* Hoechst-Roussel Vet S.A. 102 route de Noisy 93235 Romainville Cedex, France.

from the coronary arteries.<sup>49</sup> There are no reports of toxic effects with ractopamine or zilpaterol in overdosed cattle and, evidently, less in humans, given that these products are for veterinary use only and up until now there has not been any suspicion of a toxic effect due to the consumption of meat products produced using these agents.

In this sense, it is worthy mentioning that the drug or drug metabolite maximum residue concentration (MRL = maximal residue limit) in tissues or in milk is calculated from the admissible daily intake (ADI), using as a daily intake food factor a total of 300 g of meat, 300 g of fat, 300 g of internal organs, two eggs and one liter of milk.<sup>50-53</sup> The ADI value of clenbuterol is of 0.04 µg/kg/day,<sup>50</sup> an equivalent of 2.4 µg/day for a 60 kg person. To obtain the ADI value, clenbuterol's no effect level (NOEL) of 2.4 mg per day was first determined.<sup>54</sup> The ADI value is further reduced to 250 ng/day for safety reasons (approximately 10 times less);<sup>54</sup> that is, 4.1 ng/kg/day, considering a 60 kg human. If 2 kg of meat products and fat per day are eaten, then the MRL value will be the equivalent of 125 ng/kg of food (125 ppb); that is: each kg of food of animal origin may contain 125 ng of active clenbuterol with no adverse reactions.

For ractopamine, the ADI through the IV route is 230 times greater than that of clenbuterol, this is estimated from oral administration and considering a 100% bioavailability. In other words, 57.5 µg of ractopamine could be administered through an IV route to obtain a NOEL similar to that of clenbuterol. But, if a 60% bioavailability is considered,<sup>55,56</sup> then even more ractopamine would be needed to reach a NOEL similar to that of clenbuterol. In the same way, to obtain a slight cardiostimulatory and bronchodilatory effect with zilpaterol, assuming that one dose of just 20 mg of clenbuterol for a human adult achieves the same effects, 40 mg of zilpaterol would be needed; that is, 2,000 times more given that zilpaterol is much less potent than clenbuterol in man in achieving the bronchodilatory effects and the previously mentioned cardiostimulatory effects. It is important to mention, however, that organizations such as the Codex Alimentarius, from the FAO, have not yet approved the MRL\* for clenbuterol. Evidently, while defining it the tacit understanding is that it can be used, this implies risks for the consumer given that in many countries the follow-up systems for residues in slaughter houses are not yet in place, and neither are concrete punishments for those veterinarians and producers responsible of taking animals to slaughter without following the proper withdrawal period. However, as a starting point, the Mixed Committee of FAO/WHO of Experts in Feed Additives\*\* recommended the following MRL's for clenbuterol in cattle: 0.2 mg/kg in muscle and fat, 0.6 mg/kg

del fármaco, sino producto de una sobredosis accidental o no de productos farmacéuticos de la línea humana que contienen clenbuterol, se acentúa la taquicardia, el adormecimiento, el nerviosismo, los temblores y puede haber necrosis del miocardio por disminución de la perfusión generada por el acortamiento de la diástole, etapa en la que se lleva a cabo la irrigación del miocardio por las coronarias.<sup>49</sup> No se han documentado efectos tóxicos de la ractopamina ni del zilpaterol en bovinos sobredosificados y, evidentemente, menos en el ser humano, ya que estos productos son de uso veterinario exclusivo y a la fecha no se ha sospechado de un efecto tóxico por la ingesta de productos cárnicos derivados del uso de estos agentes.

En este sentido, vale la pena señalar que la concentración de residuos máxima (MRL = *maximal residue limit*, por sus siglas en inglés) en tejidos o en leche de un medicamento y sus metabolitos se calcula a partir de la ingesta diaria admisible (ADI = *admissible daily intake*, por sus siglas en inglés), utilizando como factor de alimento diario ingerido un total de 300 g de carne, 300 g de grasa, 300 g de vísceras, dos huevos y un litro de leche.<sup>50-53</sup> El valor de la ADI del clenbuterol es de 0.04 µg/kg/día,<sup>50</sup> lo que equivale 2.4 mg/día para una persona de 60 kg. Para llegar al valor del ADI previamente se determinó para el clenbuterol el denominado nivel de no efecto (NOEL = *no effect level*, por sus siglas en inglés) del compuesto en 2.4 µg por día.<sup>54</sup> El valor del ADI por seguridad adicional se reduce a 250 ng/día (aproximadamente 10 veces menos);<sup>54</sup> esto es, 4.1 ng/kg/día, considerando un humano de 60 kg. Si se toman como ingesta 2 kg de productos cárnicos y grasa por día, entonces el valor de MRL será equivalente a 125 ng/kg de alimento (125 ppb); esto es, cada kg de producto de origen animal puede contener 125 ng de clenbuterol activo y no se presentarán reacciones adversas en el hombre.

Para el caso de la ractopamina, el ADI por vía IV es 230 veces mayor que el del clenbuterol, calculado este último a partir de su administración oral y considerando una biodisponibilidad del 100%. En otras palabras, se pueden administrar 57.5 µg de ractopamina por vía IV para obtener el nivel de no efecto (NOEL) similar al del clenbuterol. Pero, si se considera una biodisponibilidad del 60%,<sup>55,56</sup> entonces se requerirá aún más ractopamina para lograr un NOEL similar al del clenbuterol. De la misma manera, para obtener un efecto ligeramente cardioestimulador y broncodilatador del zilpaterol, asumiendo que una dosis de tan sólo 20 µg de clenbuterol por ser humano adulto logra los efectos referidos, se requerirán 40 mg de zilpaterol; esto es, 2 000 veces más en virtud de que el zilpaterol es mucho menos potente que el clenbuterol en el hombre para lograr los efectos broncodilatadores y ligeramente cardioestimuladores ya referidos.

in the liver and kidneys and 0.05 mg/liter of milk. Considering the MRL values, the maximum daily intake would be that of 0.235 mg, considering a daily food intake of 300 g of muscle, 100 g of liver, 50 g of kidney and fat and 1.5 l of milk.

For the case of clenbuterol, zilpaterol and ractopamine, the parent drug is the marker residue and constitutes the only residue of health importance. Therefore what is found is considered to be 100% of the total residues found in muscle, fat and milk and 60% of the total residues in the liver and kidney of cattle.<sup>49,55</sup> Something similar happens in other species, e.g., ractopamine in turkey.<sup>56,57</sup> Regarding the ractopamine residues in liver with a zero days withdrawal period (actually 12 h), it has been reported that it is the same or lower than 0.013 ppm. This value is lower than the MRL, which is of 0.15 ppm<sup>\*\*\*</sup>. It's important to add that there are some ways to detect these products in biological samples and of distinguishing between them.<sup>58,59</sup>

### Mode of action

The  $\beta$ -AR agonists are organic molecules that bind to the  $\beta$ -AR receptors, giving place to the agonist-receptor complex, which at the same time activates the Gs protein. The  $\alpha$  subunit of the Gs protein activates adenilate-cyclase, an enzyme that produces cyclic adenosine monophosphate (cAMP), one of the main molecules of intracellular signaling. This molecule, produces its effects by binding to the regulatory subunit of the protein kinase A, to release the catalytic subunit that phosphorylates a good number of intracellular proteins. These proteins have vital roles for a great variety of functions that range from allowing the entrance of  $Ca^{++}$  into the cell, and up to the mediation of protein synthesis which is key for cell function.<sup>2,3,24</sup>

The physiological  $\beta$ -AR agonists are norepinephrine and epinephrine. The first constitutes a catecholamine from the group of phenethanolamines, also considered a neurotransmitter of the sympathetic nervous system, biosynthesized from tyrosin and circulating in serum in relatively high concentrations. The second is from the same group and is synthesized and secreted in the adrenal medulla; it circulates in lower concentrations than norepinephrine in most mammals, but in stress situations it responds in a higher proportion than norepinephrine.<sup>60</sup> Norepinephrine is more selective of  $\alpha$  receptors and epinephrine acts on both, with a higher selectivity to  $\beta$ , but with a more dominant  $\alpha$  effect. The physiological responses are produced when these  $\beta$ -AR agonists bind to the receptors and in our area of interest, the  $\beta$  adrenergic receptor. The oral administration of some synthetic  $\beta$ -AR agonists modifies growth by increasing muscle mass and decreasing fat accumulation. The  $\beta$ -AR receptors are present in

Es importante señalar, sin embargo, que organismos como el *Codex Alimentarius*, de la FAO, aún no han aprobado cuál es el MRL\* para el clenbuterol. Evidentemente, al definirlo se está aceptando tácitamente que se le puede utilizar, lo que implicaría un riesgo para el consumidor en virtud de que en muchos países aún no se tienen instrumentados sistemas de seguimiento de los residuos en rastro ni hay penalizaciones concretas bien definidas, para aquellos veterinarios y productores responsables de llevar al rastro animales que no hayan observado el periodo de retiro adecuado. Sin embargo, como punto de partida, el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios\*\* recomendó los siguientes MRL de clenbuterol para los bovinos: 0.2  $\mu$ g/kg en el músculo y la grasa, 0.6  $\mu$ g/kg en el hígado y los riñones y 0.05  $\mu$ g/litro de leche. A partir de estos valores de MRL, la ingesta diaria máxima sería de 0.235  $\mu$ g, sobre una base de consumo diario de alimento de 300 g de músculo, 100 g de hígado, 50 g de riñón y grasa y 1.5 l de leche.

Para el caso del clenbuterol, el zilpaterol y la ractopamina, el fármaco original es el residuo marcador y constituye el único residuo de importancia sanitaria, por lo que se considera a lo encontrado como el 100% de los residuos totales en el músculo, la grasa y la leche y 60% de los residuos totales en el hígado y riñón de los bovinos,<sup>49,55</sup> algo similar sucede en otras especies, v.g. la ractopamina en el pavo.<sup>56,57</sup> En lo referente a los residuos de ractopamina en hígado con un tiempo de retiro, denominado "cero" (que en realidad es 12 h), se ha informado que es igual o inferior a 0.013 ppm. Este valor es inferior al MRL, que es de 0.15 ppm.<sup>\*\*\*</sup> Es importante añadir que se cuenta con algunas formas de detectar estos productos en muestras biológicas, distinguiéndolos entre ellos.<sup>58,59</sup>

### Mecanismo de acción

Los agonistas  $\beta$ -AR son moléculas orgánicas que se unen a los receptores  $\beta$ -AR, dando lugar al complejo agonista-receptor, que a su vez activa a la proteína Gs. La subunidad  $\alpha$  de la proteína Gs activa a la adenilato-ciclase, enzima que produce el monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), una de las principales moléculas de señalización intracelular. Esta molécula produce sus efectos al unirse a la subunidad reguladora de la cinasa proteínica A, para liberar la subunidad catalítica que fosforila a un buen número de proteínas intracelulares. Estas proteínas tienen papeles funcionales vitales para una variada gama de funciones que van desde permitir la entrada de  $Ca^{++}$  a la célula, hasta

\* *Codex Alimentarius* 1999.

\*\* <http://www.fao.org/docrep/U5900t/u5900t0b.htm>

\*\*\* <http://www.fda.gov/cvm/efoi/section2/141172051401.html>

most mammalian cells, though the subtype distribution ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ) and the proportion of each, varies between tissues in a given species.<sup>60</sup> In general, the  $\beta_1$  receptors predominate in the heart stimulating its inotrophism (contractile force) and in the intestinal smooth muscle inducing relaxation,<sup>3</sup> while the  $\beta_2$  are located in bronchi and in uterine muscle, inducing relaxation in both cases. Evidently, the magnitude of the physio-pharmacological activity of a  $\beta$ -AR agonist or partial agonist, will depend on its intrinsic activity at the receptor and its distribution in the target tissues.<sup>55</sup>

In 1965, data indicating the possibility of modifying growth in mammals supplying these agonists was presented.<sup>60</sup> It was suggested that they could directly or indirectly increase body weight by changing the intracellular concentration of cAMP. At the beginning of the 1980's, some researchers from Cyanamid Laboratories, published some data about the growth modulation in animals using clenbuterol.<sup>61</sup> Similarly, they showed that the oral administration of this agonist to cattle, birds, pigs and sheep increased the muscle mass and decreased body fat. In Mexico, similar results were obtained using clenbuterol, supplying it in feed to both pigs and birds.<sup>62</sup> However, in birds it required up to five times the yield promoting dose used in other species, in order to obtain tangible results. Following these findings, a few years later, copies of other  $\beta$ -agonists emerged such as cimaterol,<sup>63</sup> ractopamine,<sup>64</sup> zilpaterol,<sup>65</sup> salbutamol,<sup>66,67</sup> applied to different species, obtaining variable results, but most with favorable reports of yield increase.<sup>68</sup>

According to different authors,<sup>12,69,70</sup> the effects of the  $\beta$ -AR agonists are not as pronounced in birds as in sheep; in pigs the effect is qualified as intermediate and in cattle the response is good, similar to that seen in sheep. The possible explanation for these differences could be that some species have been selected so intensely for their speed of growth that they have less potential to increase growth since they are very close to the maximum biological growth rate. Other possible mechanisms include the agonist's affinity for  $\beta$  receptors, the binding of the complex agonists-receptor to the signal transducer system, both being factors that influence the drug's transport to the receptor site and, finally, it is possible that certain species may have a limited number of  $\beta$ -AR receptors in target tissues, thus reducing the response to the agonist.<sup>60</sup> Besides the bronchodilator and the weight gain effects, it has been demonstrated that, at low doses, clenbuterol given in feed to broiler chickens from day up to the fourth week of age, significantly reduces their mortality due to ascitic syndrome.<sup>71,72</sup> Table 1 details the effects of clenbuterol on productive parameters in different species.

One of the most obvious effects derived from the  $\beta$ -AR agonists oral administration in cattle, swine and sheep, is the increase in muscle mass.<sup>55</sup> In physiological conditions

mediar la síntesis de proteínas clave para el funcionamiento celular.<sup>2,3,24</sup>

Los agonistas fisiológicos  $\beta$ -AR son la norepinefrina y la epinefrina. La primera constituye una catecolamina del grupo de las fenetanolaminas, también es considerada como un neurotransmisor del sistema nervioso simpático, que se biosintetiza a partir de la tirosina y circula en el suero en concentraciones relativamente elevadas. La segunda del mismo grupo se sintetiza y secreta en la médula adrenal; circula en menores concentraciones que la norepinefrina en la mayoría de los mamíferos, pero en situaciones de estrés responde en mayor proporción que la norepinefrina.<sup>60</sup> La norepinefrina es más selectiva de receptores  $\alpha$  y la epinefrina actúa sobre ambos, con mayor selectividad por  $\beta$ , pero con un efecto  $\alpha$  más dominante. Las respuestas fisiológicas se producen cuando estos agonistas  $\beta$ -AR se unen a los receptores y para el caso que nos ocupa, al receptor  $\beta$  adrenérgico. La administración oral de algunos agonistas  $\beta$ -AR sintéticos, modifica el crecimiento por aumento de la masa muscular y disminución de la acumulación de grasa. Los receptores  $\beta$ -AR están presentes en la mayoría de las células de los mamíferos, aunque la distribución de los subtipos ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ) y la proporción de cada uno, varía entre tejidos en una especie dada.<sup>60</sup> Por lo general, los  $\beta_1$  predominan en el corazón estimulando su inotropismo (fuerza de contracción) y en el músculo liso intestinal induciendo relajación,<sup>3</sup> mientras que a los  $\beta_2$  se les localiza en los bronquios y músculo uterino, induciendo relajación en ambos casos. Evidentemente, la magnitud de la actividad fisio-farmacológica de un agonista o agonista-parcial  $\beta$ -AR, dependerá de su denominada actividad intrínseca en el receptor y distribución en los tejidos blanco.<sup>55</sup>

En 1965 se presentaron datos que indicaban la posibilidad de modificar el crecimiento de los mamíferos al suministrar estos agonistas.<sup>60</sup> Se sugirió que directa o indirectamente podrían lograr el incremento en peso corporal al cambiar la concentración intracelular del AMPc. En los inicios de la década de los ochenta, investigadores de los Laboratorios Cyanamid publicaron algunos datos sobre la modulación del crecimiento en animales utilizando el clenbuterol.<sup>61</sup> Asimismo, demostraron que la administración oral de este agonista al ganado, aves, cerdos y ovejas aumentaba la masa muscular y disminuía la cantidad de grasa corporal. En México se obtuvieron resultados similares con el clenbuterol, suministrado en el alimento tanto a cerdos como a aves.<sup>62</sup> Sin embargo, en aves se requirió hasta cinco veces la dosis promotora del rendimiento usada en otras especies, para obtener resultados tangibles. A estos hallazgos siguieron, algunos años después, réplicas con otros  $\beta$  agonistas como el cimaterol,<sup>63</sup> ractopamina,<sup>64</sup> zilpaterol,<sup>65</sup> salbutamol,<sup>66,67</sup> aplicados a diferentes especies, obteniéndose resultados variados, pero la gran mayoría con informes de promoción del rendimiento.<sup>68</sup>



the post-birth growth of skeletal muscle is the primary result of hypertrophy and it is generally recognized that an increase in the synthesis of muscle protein and a decrease in the breakdown of muscle protein or a combination of both produces an increase in muscle mass.<sup>73</sup> The application of  $\beta$ -AR agonists amplifies these effects, the treatment of mammals with  $\beta$ -AR agonists causes a rise in the amount of tRNA for several skeletal muscle proteins. Within this context, after the treatment, there is a rise in: mRNA for light chain myosin;<sup>74</sup> the mRNA of  $\alpha$ -actin<sup>75</sup> and in the inhibitor of the calpain calpastatine protease.<sup>76</sup> The  $\beta$ -AR agonists may increase blood flow to certain regions of the body. This increase allows the hypertrophy in muscle by transporting more substrates and energy sources for protein synthesis.

Another of the main actions of the oral  $\beta$ -AR agonists is a decrease in the amount of fat in the carcass. *In vitro*, triacylglycerol degradation in adipocytes has been demonstrated as well as the inhibition of fatty acids and triacylglycerol.<sup>77,78</sup> In some cases, though not all, after the chronic administration of an agonist, the adipose tissue in animals presents increased lipolytic activity, decreased lipogenic activity, or both.<sup>79-82</sup> The rise of the plasmatic concentration of non-esterified fatty acids after the  $\beta$ -AR agonists administration, confirms the lipolytic activity which occurs in the adipocytes.<sup>81,83,84</sup>

### The problem of residues of $\beta$ -adrenergic agonists in animal food products

The optimum growth promotor dose of clenbuterol in cattle is approximately 0.8 mg/kg body weight.<sup>3,85,86</sup>

De acuerdo con diferentes autores,<sup>12,69,70</sup> los efectos de los agonistas  $\beta$ -AR no son tan pronunciados en aves como en los ovinos; en cerdos el efecto es calificado como intermedio y en el ganado bovino la respuesta es buena y similar a la del ovino. La probable explicación de estas diferencias se puede deber a que algunas especies se han seleccionado de manera tan intensiva en su velocidad de crecimiento que tendrán menor potencial para incrementar el crecimiento debido a que están muy próximas a la velocidad de crecimiento máximo biológico. Otros posibles mecanismos incluyen la afinidad del agonista por los receptores  $\beta$ , el acoplamiento del complejo agonista-receptor al sistema transductor de señales, factores que influyen el transporte del fármaco a los sitios del receptor y, finalmente, es posible que determinada especie tenga un número limitado de receptores  $\beta$ -AR en tejidos blanco, reduciendo la respuesta al agonista.<sup>60</sup> Además del efecto broncodilatador y de ganancia de peso, se ha demostrado que pequeñas dosis de clenbuterol en pollo de engorda administradas en el alimento desde un día de edad hasta la cuarta semana, reducen de manera significativa la mortalidad debida al síndrome ascítico.<sup>71,72</sup> En el Cuadro 1 se presentan los efectos del clenbuterol en las variables productivas en diferentes especies.

Uno de los efectos más obvios derivado de la administración oral de los agonistas  $\beta$ -AR en el ganado, cerdos y ovinos, es el aumento en la masa muscular.<sup>55</sup> En condiciones fisiológicas el crecimiento posnatal del músculo esquelético es el resultado primario de una hipertrofia y se reconoce que un aumento de la síntesis proteínica muscular y una disminución en la degrada-

**Cuadro 1**  
INFLUENCIA DEL CLENBUTEROL SOBRE ALGUNOS PARÁMETROS PRODUCTIVOS EN DIFERENTES ESPECIES  
INFLUENCE OF CLENBUTEROL ON SOME PRODUCTIVE PARAMETERS IN DIFFERENT SPECIES

Animal	Ganancia de peso	Consumo de alimento	Ganancia/Alimento	Músculo	Grasa
Animal	Weight gain	Feed intake	Gain/Feed	Muscle	Fat
Bovinos	+10	-5	+15	+10	-30
Aves *	ND	ND	ND	+2	-7
Cerdos	+4	-5	-5	+4	-8
Ovinos	+15	+2	+15	+25	-25

Los valores se expresan como porcentaje de cambio.<sup>60,112</sup>

\* Efecto profiláctico vs síndrome ascítico.

ND = no determinado.

The values are expressed as a percentual change.<sup>60,112</sup>

\* Prophylactic effect vs ascitic syndrome.

ND = not determined.

However, as it has been shown that the carcass yield can be further improved, it is not rare for producers to give five or even ten times the mentioned dose.<sup>3</sup> The increase in carcass yield does not increase linearly with dosage increases, at higher dose the animal's welfare and health are impaired, so this practice is not justifiable and the reasoning behind it is rather primitive.

In order to have a better control over the illegal use of this drug, several analytical methods have been developed using several tissue samples, such as liver, kidney, muscle, and body fluids such as plasma, urine and bile.<sup>87,88</sup>

In a study done by Sauer *et al.*,<sup>87</sup> clenbuterol was administered orally at ten times the therapeutic dose (10 mg/kg body weight every 12 hours during 21 days) in Holstein-Friesian calves and the main pharmacokinetic variables as well as the clearance pattern for residues in organs and common tissues were determined, as well as in several eye compartments and body fluids. Residues were determined at six hours and on days one, two, four, eight and sixteen after the treatment was finished. Clenbuterol concentrations were higher in liver than in kidney, bile and urine, from day two following withdrawal. However, the concentration in choroid/retina were ten times higher than in liver at all times after the treatment was finished. Furthermore, clenbuterol concentrations in eye tissues were as follows, from highest to lowest: choroid, retina, cornea, sclera, aqueous humor, vitreous humor. Given the weight of these substructures, it is absurd to think that accumulation at this level could represent a real danger. However, its accumulation in retina and in choroid may be useful to obtain relevant information about the use of clenbuterol in animals sent to slaughter. According to this criteria of zero residues, Elliot<sup>88</sup> recommends a withdrawal period of four weeks when a conventional dose is used to improve carcass yield. However, there is no reference to the time needed when using other doses. The melanin is the eye component responsible for the accumulation of clenbuterol,<sup>89</sup> a fact which was demonstrated in albino rats and control rats, where both presented the same amount of clenbuterol residues, whereas the rats with pigmented eyes showed a clear evidence of accumulation. The residue data for clenbuterol in the tissues and fluids of cattle is presented in Table 2.

The residue situation is different for both ractopamine and zilpaterol. In both cases, their clearance is much faster, because of the, already mentioned, absence of chloride in the cyclic group, which facilitates their biotransformation and excretion.<sup>90</sup> In the case of ractopamine, it has been estimated than in only 24-48 hours the drug concentration and its metabolites are reduced to levels below the ADI, being biotransformed through glucuronid conjugation mainly.<sup>90</sup> However,

ción de proteína muscular o una combinación de ambos produce aumento de la masa muscular.<sup>73</sup> La aplicación de agonistas  $\beta$ -AR amplifica estos efectos, el tratamiento de los mamíferos con agonistas  $\beta$ -AR causa incremento en la cantidad ARNt para varias proteínas del músculo esquelético. En este contexto, después del tratamiento con  $\beta$ -AR se incrementan: El ARNm para la miosina de cadena ligera;<sup>74</sup> el ARNm de la  $\alpha$ -actina<sup>75</sup> y el inhibidor de la proteasa calpaína calpastatina.<sup>76</sup> Los agonistas  $\beta$ -AR pueden incrementar el flujo sanguíneo a ciertas regiones del cuerpo. Este aumento permite el proceso de hipertrofia en el músculo esquelético al transportar mayores cantidades de sustratos y fuentes de energía para la síntesis de proteína.

Otra de las principales acciones de los agonistas  $\beta$ -AR orales es la disminución en la cantidad de grasa de la canal. Se ha demostrado *in vitro* la degradación de triacilglicérols en adipositos y la inhibición de la síntesis de ácidos grasos y de triacilglicérol.<sup>77,78</sup> En algunos casos, aunque no en todos, después de la administración crónica de un agonista, el tejido adiposo de los animales presenta una actividad lipolítica aumentada, una actividad lipogénica disminuida, o ambas.<sup>79-82</sup> La elevación de la concentración plasmática de ácidos grasos no esterificados después de la administración de un agonista  $\beta$ -AR, confirma la actividad lipolítica que ocurre en los adipositos.<sup>81,83,84</sup>

### Problemática de los residuos de agonista $\beta$ -adrenérgicos en productos de origen animal

La dosis promotora del crecimiento óptima del clenbuterol en el ganado bovino, es aproximadamente de 0.8  $\mu$ g/kg de peso.<sup>3,85,86</sup> Empero, como se ha visto que se pueden mejorar aún más los rendimientos de las canales, no es raro que los productores administren al ganado bovino de cinco hasta diez veces la dosis mencionada.<sup>3</sup> El incremento en el rendimiento en canal no es lineal al incremento en la dosis, se afecta a dosis elevadas el bienestar (*animal welfare*) del animal y se puede afectar su salud, por lo que esta práctica no es justificable y el razonamiento es más bien primitivo.

Con el fin de tener un mejor control sobre el uso ilegal de este fármaco, se han desarrollado varios métodos analíticos utilizando diversas muestras de tejido como hígado, riñón, músculo, fluidos corporales como el plasma, orina y bilis.<sup>87,88</sup>

En un estudio realizado por Sauer *et al.*<sup>87</sup> se administró clenbuterol vía oral a diez veces la dosis terapéutica (10  $\mu$ g/kg de peso cada 12 horas durante 21 días) en becerros Holstein-Friesian y se determinaron las principales variables farmacocinéticas y el patrón de eliminación de los residuos en los órganos y tejidos habituales, así como en varios compartimentos del ojo y fluidos

during ractopamine medication there are concentrations in urine of 44-473 ng/ml and these are still detected two weeks after the end of the treatment.<sup>90</sup> In spite of this, the FDA has given a zero day withdrawal because the NOEL, derived from toxicity studies, is very high.<sup>90,91</sup> For zilpaterol, the authorized withdrawal period is that of 48-72 hours depending on the country,<sup>91,92</sup> However, it is just as safe as ractopamine, having a very high NOEL. Perhaps the decision of having this long withdrawal period was not because of a safety factor (ADI, NOEL, MRL) but because of the toxicity caused by clenbuterol which has a negative influence on the option of having a shorter withdrawal period or even a zero day withdrawal period. Regardless, it is a mistake to compare clenbuterol with zilpaterol or ractopamine given their differences in toxicity induction potential, as is presented in Table 3.

Only the residues generated by clenbuterol are related to some incidents of intoxication in humans that ate contaminated by-products, but there are no fatalities documented.<sup>49,93,94</sup> Until today there are no intoxication reports due to ractopamine or zilpaterol residues. The Mixed Committee of FAO/WHO of Experts in Feed Additives,<sup>91,92</sup> examined the data concerning acute and short term toxicity, reproductive toxicity, teratogenicity, genotoxicity and carcinogenicity, as well as the results of pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of clenbuterol in cattle and in man. The Committee concluded that clenbuterol is moderately toxic in mouse and rat after oral administration, with

corporales. Se determinaron residuos a las seis horas y a los uno, dos, cuatro, ocho y dieciséis días después de terminado el tratamiento. Las concentraciones del clenbuterol, fueron más elevadas en el hígado que en el riñón, bilis y orina, a partir del día dos del retiro. Sin embargo, las concentraciones en la coroides/retina fueron diez veces mayores que en el hígado en todos los tiempos después de terminado el tratamiento. Asimismo, las concentraciones de clenbuterol en los tejidos del ojo fueron en el siguiente orden, de más a menos: Coroides, retina, córnea, esclerótica, humor acuoso, humor vítreo. Dado el peso de estas estructuras, es absurdo pensar que su acumulación a este nivel puede representar un peligro real. Sin embargo, su acumulación en retina y coroides puede ser útil para proporcionar información relevante sobre el uso del clenbuterol en animales enviados a rastro. Con base en el criterio de cero residuos, Elliot<sup>88</sup> recomienda un tiempo de retiro de cuatro semanas cuando se utiliza una dosis convencional para mejorar el rendimiento en canal. Sin embargo, no hace referencia al tiempo requerido utilizando otras dosificaciones. La melanina es el componente ocular responsable de la fijación del clenbuterol,<sup>89</sup> lo cual se demostró en residuos oculares de ratas albinas y ratas testigo ya que ambas presentaron la misma cantidad de residuos de clenbuterol, mientras que las ratas con ojos pigmentados mostraron clara evidencia de acumulación. Los datos de residuos de clenbuterol en tejidos y fluidos en bovinos se reproducen en el Cuadro 2.

**Cuadro 2**

CONCENTRACIONES EN DIVERSOS TEJIDOS Y FLUIDOS DE BOVINOS DE CLENBUTEROL (mg/kg O mm/1 O ppb) DURANTE VARIOS DÍAS DE RETIRO EN BOVINOS TRATADO A DOSIS PROMOTORAS DEL RENDIMIENTO (1.6 mg/kg DE PESO/DÍA, EN ALIMENTO DURANTE SIETE DÍAS)

CLENBUTEROL CONCENTRATIONS IN SEVERAL TISSUES AND FLUIDS OF BOVINES (mg/kg OR mg/1 OR ppb) DURING SEVERAL WITHDRAWAL DAYS IN BOVINES TREATED AT A YIELD PROMOTOR DOSE (1.6 mg/kg BODY WEIGHT/DAY, IN FEED DURING SEVEN DAYS)

Órgano fluido Organ-fluid	Días de retiro Withdrawal days		
	14	28	42
Hígado <sup>1</sup>	< 0.2	< 0.2	< 0.2
Ojo	37.4	3.1	6.3
Riñón	0.2	< 0.2	< 0.2
Cerebro	< 0.2	< 0.2	< 0.2
Útero	< 0.2	< 0.2	< 0.2
Orina	< 0.2	< 0.2	< 0.2

<sup>1</sup> Datos obtenidos por cromatografía de gases/espectrometría de masas.<sup>50</sup>

<sup>1</sup> Data obtained by gas chromatography/mass spectrometry.<sup>50</sup>

LD50 values between 80-175 mg/kg. It resulted less toxic in the dog (LD50 = 400-800 mg/kg). Its toxicity is greater with parenteral administration (LD50 = 30-85 mg/kg). The main signs of toxicity are sleepiness, tremors, tachycardia and tonic-clonic convulsions. The observed effects in studies of fast administration and excessive administration are the same, but tachycardia is marked and there is myocardial necrosis due to a decrease in myocardial blood flow during diastole.

In studies of repeated administration of clenbuterol during 30 days in the mouse and rat, a NOEL of 2.5 and 1.0 mg/kg body weight/day, respectively, was identified based mainly on structural changes and cardiac lesions. Furthermore, it was reported that in an oral administration study performed in mice over a two year period, using doses of up to 25 mg/kg body weight/day, there were no signs of carcinogenicity. On the other hand, in Sprague-Dawley rats receiving the same dose for the same length of time, there were records of an increase in the incidence of meso-ovarian leiomyomas; lower doses did not generate any change. After a series of both in vitro and in vivo studies, the Mixed Committee of FAO/WHO concluded that the tumors were due to adrenergic stimulation, and not to a genotoxic mechanism.<sup>91,92</sup> A bronchodilating clenbuterol dose did not have any effect on fertility in reproductive toxicity studies in rats. But, all the pups born from dams receiving high doses were either stillborn or died shortly thereafter. This phenomenon has not yet been explained. In yet another toxicity study of rats administered 1.3 1.5-15 mg of clenbuterol/kg of body weight to both males and females during 70 and 14 days, respectively, before breeding, no adverse effects over reproduction were found. In three studies in rabbits using a dose between 30 mg/kg/day and 50 mg/kg/day fetotoxicity signs were observed. In particular, there was a delay in ossification and cleft palates, but only in high doses. Also, the activity of four of clenbuterol's metabolites detected in the kidneys of treated animals was investigated, only one of which showed cardiovascular activity. However, only of 20% of that could be attributed to the action of clenbuterol.<sup>91,92</sup>

It is evident that the doses used in these cases were very high and do not correspond to the 5 ng/g of tissue that are obtained from a product of a zero day withdrawal period in animals treated for an increase in their productive efficiency where clenbuterol is administered in low doses as a growth promotor (Table 4). However, it is important to repeat that intoxication in humans with animal food products containing clenbuterol residues is more feasible than with other  $\beta$ -AR agonists. In fact, emphasis is made that there are no toxicity data with the consumption of animal food products treated with ractopamine or with zilpaterol. This is predictable, for example in order to achieve a

La situación de los residuos es distinta, tanto para ractopamina como para zilpaterol. En ambos casos, su eliminación es mucho más rápida, por la ya mencionada ausencia del cloro en el grupo cíclico, que facilita su biotransformación y excreción.<sup>90</sup> Se ha calculado para ractopamina que en tan sólo 24-48 horas se reducen las concentraciones del fármaco y metabolitos a niveles inferiores a la ADI, siendo la conjugación glucurónida la principal forma de biotransformación.<sup>90</sup> Sin embargo, durante la medicación con ractopamina se encuentran en la orina concentraciones de 44-473 ng/ml y se les sigue detectando hasta las dos semanas posteriores al final de la medicación.<sup>90</sup> A pesar de esto último la FDA le ha concedido un tiempo de retiro de cero días en virtud del NOEL tan alto que se ha derivado de estudios de toxicidad.<sup>90,91</sup> Para el caso del zilpaterol, el tiempo de retiro señalado es de 48-72 horas dependiendo del país.<sup>91,92</sup> Empero, goza de la misma seguridad que la ractopamina, con un NOEL muy elevado. Es posible que se haya optado por este tiempo tan largo, no en función de un factor de seguridad (ADI, NOEL, MRL) sino porque los casos de toxicidad debida a clenbuterol influyeron negativamente en la decisión de optar por un retiro aún más corto o de cero días para el zilpaterol. No obstante, es un error comparar clenbuterol con zilpaterol o ractopamina dado el potencial inductor de toxicidad tan distinto entre estos fármacos, como se muestra en el Cuadro 3.

Solamente a los residuos generados por el clenbuterol se les ha asociado con algunos incidentes de intoxicación en humanos que consumieron subproductos contaminados, pero no se han documentado casos fatales.<sup>49,93,94</sup> A la fecha no existe un solo informe de intoxicación por residuos de ractopamina ni de zilpaterol. El Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios,<sup>91,92</sup> examinó datos sobre toxicidad aguda y a corto plazo, toxicidad reproductiva, teratogenicidad, genotoxicidad y carcinogenicidad, así como los resultados de estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos del clenbuterol en el ganado y en el hombre. El Comité concluyó que el clenbuterol es moderadamente tóxico en el ratón y la rata tras la administración oral, con valores de DL 50% comprendidos entre 80-175 mg/kg. Resulta menos tóxico en el perro (DL 50% = 400-800 mg/kg). Su toxicidad es mayor si la administración es parenteral (DL 50% = 30-85 mg/kg). Los principales signos de toxicidad son somnolencia, temblores, taquicardia y convulsiones tónico-clónicas. Los efectos observados en los estudios de la administración rápida y excesiva son los mismos, pero con taquicardia marcada y necrosis del miocardio por disminución del riego miocárdico durante la diástole.

En estudios de administración repetida del clenbuterol durante 30 días en ratón y rata, se identificó un NOEL de 2.5 y 1.0 mg/kg de peso/día, respectivamente, basados

**Cuadro 3**

COMPARACIÓN DEL NIVEL DE RESIDUOS Y CONSUMO TEÓRICO CLENBUTEROL Y ZILPATEROL A PARTIR DE PRODUCTOS DE ORIGEN ANIMAL  
RESIDUE LEVEL COMPARISON AND THEORETICAL CLENBUTEROL AND ZILPATEROL CONSUMPTION FROM ANIMAL FOOD PRODUCTS

<i>Residuos en retina a los cero días</i>	<i>Clenbuterol*</i>	<i>Zilpaterol**</i>
	128.0 ng/g	92 ng/g
<i>Retinal residues at zero days</i>	<i>Clenbuterol*</i>	<i>Zilpaterol**</i>
	128.0 ng/g	92 ng/g
Residuos en músculo a los cero días	5.6ng/g	4.0ng/g
Proporción retina/músculo	23 veces más	23 veces más (valor teórico basado en el clenbuterol)
Dosis broncodilatadora para humano	20 µg/70 kg	1.4 mg/70 kg
Número de retinas para llegar a dosis terapéutica broncodilatadora ***	78 retinas	7 608 retinas
Número de ojos completos, asumiendo una concentración media de β- agonistas de 10 ng/g	400 ojos	2 800 ojos
Consumo de carne para dosis broncodilatadora	3.6 kg de carne	Imposible de lograr.
Dosis cardiotóxica†	Una cantidad absurda	Imposible de lograr.

\* Con base en estudios de residuos<sup>50,55,110</sup> y asumiendo que se administró una dosis promotora de rendimiento normal.

\*\* Con base en los estudios de residuos de Moody *et al.*<sup>113</sup>

\*\*\* Considerando un peso del ojo del bovino promedio de 50 g y un peso de la retina del bovino de 2 g.

† Asumiendo una dosis letal de 400 mg/kg de peso que se presenta en el perro.

\* Based upon residue studies<sup>50,55,110</sup> and assuming that a normal dose for increase yield was administered.

\*\* Based upon residue studies by Moody *et al.*<sup>112</sup>

\*\*\* Considering a bovine eye average weight of 50 g and a retina weight of 2 g.

† Assuming a lethal dose of 400 mg/kg body weight seen in dogs.

bronchodilating dose (non-toxic) with clenbuterol it is recommended to use a dose of 10 to 20 mg/adult twice a day and the estimated NOEL is that of 2.5 mg/day.<sup>95</sup> According to Table 5, there are 39 mg of clenbuterol/kg of liver at zero day withdrawal, in cases where a cow is feed a yield enhancer dose (5 mg/kg b.w./day). Therefore, an individual would have to eat approximately 125-250 g of liver to achieve a bronchodilating dose, assuming a bioavailability of a 100% in humans, which is not possible. If this same case is applied to salbutamol, then a bronchodilating dose of 2 000 to 4 000 µg/adult will be needed and, although there is no data of residues in bovine liver, it is known that the maximum plasma concentration achieved with daily doses of 78 mg/kg of body weight/day is of 6 ng/ml.<sup>96</sup> If this was the concentration that was achieved in the liver (that is 6 ng/g of liver), several hundred kilograms of salbutamol/liver would be needed to achieve the bronchodilating dose. Something similar occurs with the β-AR agonists derivatives specialized for animal use, such as zilpaterol and ractopamine (Table 3). So, it is evident

principalmente en cambios estructurales y lesiones cardíacas. Asimismo, se informa que en un estudio de administración oral a ratones durante dos años, con dosis de hasta 25 mg/kg de peso al día, no se observó indicio alguno de carcinogenicidad. En cambio, en ratas Sprague-Dawley que recibieron la misma dosis y en el mismo lapso, se registró un aumento en la incidencia de leiomiomas meso-ováricos; dosis menores no generaron cambio alguno. Tras una serie de estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, el Comité Mixto FAO/OMS llegó a la conclusión de que esos tumores se deben a la estimulación adrenérgica y no a un mecanismo genotóxico.<sup>91,92</sup> El clenbuterol a dosis broncodilatadoras tampoco ejerció efecto alguno sobre la fecundidad en estudios de toxicidad reproductiva en ratas. Empero, todas las crías nacidas de madres sometidos a dosis muy altas o nacieron muertas o murieron poco después de su nacimiento. Se desconoce la causa de este fenómeno. En otro estudio de toxicidad reproductiva en la rata en la que se administraron 1.5-15 mg de clenbuterol/kg de peso al día a machos y hembras durante 70 y 14 días, respectivamente, antes

that the use of clenbuterol will bring about dangerous situations if long withdrawal periods are not respected (more than 30 days). This is especially true if excessive doses of this agent are being used trying to increase yields or because of poor management of the active ingredient in premixes with pharmaceutically poor designs, however this criteria is not applicable to zilpaterol nor to ractopamine.

### β-adrenergic agonists pharmacokinetics

Given that they share physico-chemical properties, their behavior within an organism is similar in certain aspects. They reach the maximum plasma concentrations (C<sub>pmax</sub>) in 1-3 hours in domestic animals and in man.<sup>22,97</sup> There are reports in calves<sup>22</sup> that the initial peak level of clenbuterol starts after one dose of 5 mg/kg/day, considered as a yield enhancer, was of 0.5 ng/ml 2-7 hours after the treatment. After 21 days, the peak level reaches 1.1 ng/ml four hours after dosage, probably due to the so-called stable state reached with a slight level of accumulation. In dairy cows with a chronic clenbuterol dose of 5 mg/kg every 12 hours, a

del apareamiento, no se observaron efectos adversos sobre la reproducción. En tres estudios en el conejo con dosis entre 30 µg/kg/día y 50 mg/kg/día se observaron signos de fetotoxicidad, en particular retraso de la osificación y paladar hendido solamente a las dosis altas. También se investigó la actividad de cuatro metabolitos del clenbuterol detectados en riñón de animales tratados y sólo uno de ellos mostró actividad cardiovascular. Sin embargo, esta actividad sólo fue del 20% de la ejercida por el clenbuterol.<sup>91,92</sup>

Es evidente que las dosis utilizadas en estos casos fueron muy elevadas y no corresponden a los 5 ng/g de tejido que se tienen como producto de cero días de retiro en animales tratados para aumentar su eficiencia productiva cuando se administra clenbuterol a dosis bajas promotoras del crecimiento (Cuadro 4). Sin embargo, es importante reiterar que la intoxicación del ser humano con productos de origen animal conteniendo residuos de clenbuterol es mucho más factible que con otros agonistas β-AR. De hecho, se hace énfasis aquí que no existen datos de toxicidad debida a consumo de productos de origen animal tratados con ractopamina o zilpaterol. Esto era prede-

**Cuadro 4**  
EXCRECIÓN DE ALGUNOS AGONISTAS β EN DIFERENTES ESPECIES  
EXCRETION OF SOME β AGONISTS IN DIFFERENT SPECIES

<i>Compuesto y animal</i>	<i>Dosis</i>	<i>Vía</i>	<i>Tiempo,<sup>a</sup> h</i>	<i>Excreción,<sup>b</sup> h</i>	<i>% de absorción<sup>c</sup></i>	<i>Referencia</i>
<i>Compound and animal</i>	<i>Doses</i>	<i>Route</i>	<i>Time,<sup>a</sup> h</i>	<i>Excretion,<sup>b</sup> h</i>	<i>% of absorption<sup>c</sup></i>	<i>Reference</i>
Clenbuterol						
Bovino	3mg/kg	Oral	48	Orina	76	Smith y Poulson
Perro	2.5mg/kg	Oral	72	Orina	74	113-115
Humano	20 µg	Oral	96	Orina	80	113-115
Conejo	2.5mg/kg	Oral	96	Orina	92	113-115
Rata	2.0mg/kg	Oral	72	Heces	19	116
Rata	2.0mg/kg	Oral	72	Orina	67	116
Ractopamina						
Rata	7.7mg/kg	Oral	24	Orina	29	102
Rata	7.7mg/kg	Oral	24	Bilis	59	102
Cerdo	40 mg	Oral	168	Orina	88	56
Pavo	6.7mg/kg	Oral	48	Orina	52	57

<sup>a</sup> Horas después de efectuada la observación; <sup>b</sup> Matriz en la que se excretó la radioactividad; <sup>c</sup> Absorción aparente (como porcentaje de biodisponibilidad de la dosis administrada); <sup>d</sup> Radioactividad urinaria y de la canal.

<sup>a</sup> Hours after the observation is done; <sup>b</sup> Matrix in which the radioactivity was excreted; <sup>c</sup> Apparent absorption (as bioavailability percentage of the administered dose); <sup>d</sup> Urinary radioactivity and carcass radioactivity.

maximum plasma level was reached of 5-5.5 ng/ml 5-7 days after its administration.<sup>98</sup> In another study with calves<sup>85,87</sup> which received 10 mg/kg/day of clenbuterol, the maximum plasma level was reached after ten days of treatment.

Clenbuterol's total bioavailability could only be estimated by subtracting the urinary radioactivity excretion, after the oral administration of the  $\beta$ -agonist, which has been marked radioactively. One study indicates that there is a 76 percent absorption in cattle.<sup>99</sup> For ractopamine the bioavailability is that of 88% in pigs.<sup>100</sup> In Table 5 there are some absorption percentages and elimination routes listed following clenbuterol and ractopamine administration in different species.<sup>55,57,101-103</sup> Regarding cattle residues, it is well recognized that these are higher when animals are treated with multiple doses, for example, a dose of 0.8 mg/kg twice/day during 5.5-10.5 days yielded more residues, than those obtained in cattle treated with only one application.

Salbutamol and terbutaline present similar absorption patterns as clenbuterol, when using excessive doses for clenbuterol (50-78 mg/kg body weight).<sup>104</sup> Something similar occurs with the use of terbutaline in cattle and in hens. In both cases, the clearance rate is faster than that of clenbuterol.<sup>96,105</sup>

As previously mentioned,  $\beta$ -AR agonists have an aromatic ring, in some it is halogenated as such as in clenbuterol. All are metabolized by oxidation and microsomal conjugation. Clenbuterol, in particular, has a long half life, while the  $\beta$ -AR agonists with non-halogenated aromatic hydroxylated rings, are metabolized purely by conjugation and have plasma half-lives which are relatively short (Table 6).

In bovine cattle, clenbuterol is excreted through milk, at an average concentration of 12.5 ng/ml (range: 5.5 to 22.5 ng/ml). Stoffel and Meyer,<sup>98</sup> administered clenbuterol to cows at a dose of 10 mg/kg body weight, detecting a milk concentration of 3-9 ng/ml. In other studies in lactating cow receiving clenbuterol [C14] orally, IM and IV, it was observed that the majority of the dose (50%-85%) was excreted through urine, feces and a small part, 0.9-3%, through milk.<sup>87,106</sup> Milk quality is not appreciably altered, but neither is it an important production enhancer.<sup>106</sup>

In clenbuterol's plasma elimination curves in cattle, there are two phases: one with a 10 h half life and a second half life of approximately 120 hours, which results in residue accumulation in a broad variety of tissues.<sup>50,88,94,107</sup>

Table 6 lists the plasma half life of some of the  $\beta$  agonists both in animals and in humans. From this information, it is clear that the halogenated  $\beta$ -AR agonists, like clenbuterol, have a longer plasma half life than that of the other  $\beta$ -AR agonists who share

cible; por ejemplo, para lograr una dosis broncodilatadora (no tóxica) con clenbuterol se recomiendan y usan cotidianamente 10 a 20 mg/adulto dos veces al día y se tiene un NOEL calculado de 2.5  $\mu$ g/día.<sup>95</sup> De acuerdo con el Cuadro 5, se tienen 39  $\mu$ g de clenbuterol/kg de hígado a los cero días de retiro, cuando se alimentó un bovino con una dosis promotora del rendimiento (5  $\mu$ g/kg de peso/día). Entonces, un individuo deberá consumir aproximadamente 125-250 g de hígado para lograr una dosis broncodilatadora, asumiendo una biodisponibilidad del 100% en el ser humano, lo cual no es posible. Si se aplica este caso para el salbutamol, entonces se requerirá una dosis broncodilatadora de 2 000 a 4 000  $\mu$ g/adulto y aunque no hay datos de sus residuos en hígado de bovino, se sabe que la concentración plasmática máxima que logra con dosis diarias de 78  $\mu$ g/kg de peso/día es de 6 ng/ml.<sup>96</sup> Si esta fuera la concentración que alcanza en hígado (esto es 6 ng/g de hígado), se requerirían varios cientos de kilogramos de hígado contaminado con salbutamol para lograr la dosis broncodilatadora. Algo similar sucede con derivados agonistas  $\beta$ -AR especializados para su uso en animales, tales como el zilpaterol y la ractopamina (Cuadro 3). Es entonces evidente que el uso del clenbuterol conlleva peligros si no se respetan largos periodos de retiro (más de 30 días), en particular si se utilizan dosis excesivas de este agente con el ánimo de incrementar ganancias o por mal manejo del principio activo en premezclas mal diseñadas farmacéuticamente, pero este criterio no es aplicable al zilpaterol ni a la ractopamina.

## Farmacocinética de los agonistas $\beta$ -adrenérgicos

Como comparten propiedades fisicoquímicas, su comportamiento es similar dentro de los organismos en ciertos aspectos. Alcanzan concentraciones plasmáticas máximas ( $C_{pmax}$ ) en 1-3 horas tanto en animales domésticos como en el hombre.<sup>22,97</sup> Se ha documentado en becerros<sup>22</sup> que el nivel pico inicial de clenbuterol después de una dosis de 5  $\mu$ g/kg/día, considerada como promotora del rendimiento, fue de 0.5 ng/ml a las 2-7 horas después del tratamiento. Después de 21 días, el nivel pico llega a 1.1 ng/ml cuatro horas después de la dosificación debido probablemente a que se ha alcanzado el denominado estado estable con un ligero nivel de acumulación. En vacas lactantes dosificadas de manera crónica con clenbuterol a razón de 5  $\mu$ g/kg cada 12 horas, se alcanzó un nivel plasmático máximo de 5-5.5 ng/ml de 5-7 días después de su administración.<sup>98</sup> En otro estudio con becerros<sup>85,87</sup> a los que se les suministraron 10  $\mu$ g/kg/día de clenbuterol, se alcanzó el nivel plasmático máximo después de diez días de tratamiento.

hydroxyl groups in their aromatic rings. The terminal plasma half life in phase b ( $T_{1/2b}$ ) of clenbuterol is of more than 20-30 h in all the species. But, in the same way as has been described for other drugs, like aminoglicosides,<sup>108,109</sup> it presents a very long half life and residue clearance ( $T_{1/2g}$ ) estimated at 120 hours.<sup>86,87</sup> Therefore, there are always two  $t_{1/2}$  numbers for clenbuterol. For example, clenbuterol's half life in cattle is estimated from the urinary excretion of the drug as 18 h for  $T_{1/2b}$  and 65 h for  $T_{1/2g}$ .<sup>110</sup> Another study<sup>111</sup> estimated the  $T_{1/2g}$  of clenbuterol in cattle as 36 h.

La biodisponibilidad total de clenbuterol sólo se puede estimar restando la excreción de su radioactividad urinaria, después de la administración oral del  $\beta$ -agonista radiactivamente marcado. Un estudio indica que el porcentaje de absorción es de 76 en bovinos.<sup>99</sup> Para la ractopamina la biodisponibilidad es de 88% en cerdos.<sup>100</sup> En el Cuadro 5 se listan los porcentajes de absorción y vías de eliminación después de la administración del clenbuterol y la ractopamina en diferentes especies.<sup>55,57,101-103</sup> Se reconoce, en relación con los residuos en el bovino, que éstos son superiores cuando se les trata con dosis múltiples; por ejemplo, a dosis de 0.8  $\mu\text{g}/\text{kg}$  dos veces/día

**Cuadro 5**  
COMPARACIÓN DE RESIDUOS DEL CLENBUTEROL Y RACTOPAMINA EN TEJIDO DE BOVINO Y CERDOS, RESPECTIVAMENTE  
CLENBUTEROL AND RACTOPAMINE RESIDUE COMPARISON IN BOVINE AND SWINE TISSUE, RESPECTIVELY

		<i>Concentración (ppb excepto donde se especifique)</i> <i>Concentration (ppb except where specified)</i>				
<i>Dosis y duración del tratamiento</i> <i>Dose and treatment duration</i>	<i>Tiempo retiro (días)</i> <i>Withdrawal period (days)</i>	<i>Higado</i> <i>Liver</i>	<i>Riñón</i> <i>Kidney</i>	<i>Ojo</i> <i>Eye</i>	<i>Referencia</i> <i>Reference</i>	
<i>Clenbuterol en bovinos</i> <i>Clenbuterol in bovines</i>						
3 mg/kg	48 h	5.04/2.23* ppm	5.90/3.71* ppm	ND	103	
	0	85.9		16.71 <sup>a</sup>	50,90	
16 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$	16	3.0		181		
30 d	39	0.7		116		
	56	0.4		89		
	0	39.0	32.7	118 <sup>b</sup>	110	
5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$	3.5	1.6	1.2	57.5		
21 d	14.0	0.6	< 0.1	15.1		
<i>Ractopamina en cerdos</i> <i>Ractopamine in pigs</i>						
20 mg/kg	24 h	0.106/0.015* ppm	0.116/0.032* ppm	ND	100	
	48 h	0.073/0.004* ppm	0.048/0.008* ppm	ND		
	72 h	0.056/0.002* ppm	0.036/0.003* ppm	ND		
<sup>a</sup> Residuos de clenbuterol presentes en la retina o retina/coroides del ojo; <sup>b</sup> Residuos de clenbuterol presentes en el homogeneizado del ojo completo. * Residuos totales/residuos del compuesto sin biotransformar <sup>a</sup> Clenbuterol residues present in retina or retina/choroid in the eye; <sup>b</sup> Residues of clenbuterol present in whole, homogenized eye. * Total residues/compound residue without biotransformation.						



## Conclusions

Regardless of whether clenbuterol may or may not affect public health, it is quite evident that the use of a product banned by a country's authorities, for any purpose whatsoever in livestock production, represents a crime, and as such has to be typified and punished. But, it is too simplistic to pretend that all the drugs in the  $\beta$ -AR agonist family have the same destiny as clenbuterol. Under a similar focus, there would be very few available drugs for clinical use in veterinary medicine. So, ractopamine and zilpaterol must be treated independently and with considerations made based on the studies done on them.

It is the veterinarian's duty to promote production of high quality animal food products which includes the surveillance of drug residue levels according to international standards (*Codex Alimentarius*, FDA, European Community, etc). In this sense, clenbuterol is a drug predisposed to improper use due to the interaction between its efficacy for productive yield enhancement and its slow speed of clearance. However, it is fair to clarify that clenbuterol is not especially dangerous for humans, in fact it is used as a bronchodilator in children and adults. Clenbuterol hepatic residues remain in a range of ppb between days 16-39 after the treatment is finished (16 mg/kg body weight) and in a range of ppt until 56 days after withdrawal,<sup>50,107</sup> so with an adequate withdrawal period clenbuterol residues stop being a danger. There are drugs in veterinary and human medicine that are much more dangerous and have a huge toxic potential; for example: Nitrofurantoin in humans induces severe skin reactions, as well as neurological alterations, and it can even generate severe pulmonary edema. In veterinary medicine, carbadox and olaquinox have been implicated in carcinogenicity reactions and there are no programs for the detection of these substances or that of their metabolites in slaughter plants. So, as commonly happens with drugs, the problem is not the use, but the abuse which is motivated by ignorance and ambition. Currently, the effects of the abuse of clenbuterol affect not only animal welfare, but also public health.

On the other hand, there is concern that the alimentary habits of Mexicans will make them more susceptible to receive an overdose of some of the  $\beta$ -AR agents in use. At the recommended manufacturer's dose ractopamine and zilpaterol this is impossible, even with the zero day withdrawal period. It is less probable to see any effect even if there is an animal overdose. However, in the case of clenbuterol, there could be some side effects in the consumer if the withdrawal period of at least two weeks or preferably a month, is not observed. In this sense, the liver is the most danger-

durante 5.5-10.5 días se tuvieron más residuos, que en los bovinos tratados con una sola aplicación.

El salbutamol y la terbutalina presentan patrones de absorción similares al del clenbuterol utilizando dosis excesivas de lo recomendado para el clenbuterol (50-78  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso).<sup>104</sup> Algo similar sucede con el uso de terbutalina en bovinos y gallinas. En ambos casos, su tasa de depuración es mucho más rápida que la del clenbuterol.<sup>96,105</sup>

Como se detalló anteriormente, los agonistas  $\beta$ -AR tienen un anillo aromático, algunos de ellos halogenados como el clenbuterol. Todos se metabolizan por oxidación y conjugación microsomal. El clenbuterol en particular posee una vida media prolongada, mientras que los agonistas  $\beta$ -AR que tienen anillos aromáticos hidroxilados, no halogenados, sólo se metabolizan por conjugación y tienen vidas medias plasmáticas relativamente cortas (Cuadro 6).

En el ganado bovino, el clenbuterol se excreta por la leche, a concentración promedio de 12.5 ng/ml (rango: 5.5 a 22.5 ng/ml). Stoffel y Meyer,<sup>98</sup> se administraron clenbuterol a vacas a dosis de 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso, detectándose una concentración en leche de 3-9 ng/ml de leche. En otros estudios en ganado bovino a los que se le administró clenbuterol [C14] por vía oral, IM e IV, se observó que la mayor parte (50%-85%) de la dosis se excreta en la orina por las heces y una pequeña parte, 0.9%-3% por la leche en las vacas lactantes.<sup>87,106</sup> No se altera notablemente la calidad de la leche, pero tampoco es un promotor importante de su producción.<sup>106</sup>

En las curvas de eliminación plasmática del clenbuterol en el ganado, se distinguen dos fases: Una primera con vida media de aproximadamente 10 h y una segunda de aproximadamente 120 horas, lo cual resulta en la acumulación de residuos en una amplia gama de tejidos.<sup>50,88,94,107</sup>

En el Cuadro 6 se listan las vidas medias plasmáticas de algunos  $\beta$  agonistas tanto en animales como en el humano. Con base en esta información, resulta evidente que el agonista  $\beta$ -AR halogenado, el clenbuterol posee vidas medias plasmáticas más prolongadas que los agonistas  $\beta$ -AR que comparten grupos hidroxilo en sus anillos aromáticos. La vida media plasmática terminal de la fase  $\beta$  ( $T_{1/2\beta}$ ) del clenbuterol es de más de 20-30 h en todas las especies. Pero, al igual que se ha descrito para otros fármacos, como los aminoglicósidos,<sup>108,109</sup> presenta una vida media  $\gamma$  de eliminación de residuos muy prolongada ( $T_{1/2\gamma}$ ) y que ha sido estimada en 120 horas.<sup>86,87</sup> Por tanto, existen siempre dos datos de  $t_{1/2}$  para el clenbuterol. Por ejemplo, la vida media del clenbuterol en el ganado estimado a partir de la excreción urinaria del fármaco va de 18 h para la  $T_{1/2\beta}$  a 65 h para la  $T_{1/2\gamma}$ .<sup>110</sup> Otro estudio<sup>111</sup> estimó la  $T_{1/2\gamma}$  del clenbuterol en el bovino en 36 h.



**Cuadro 6**  
VIDAS MEDIAS PLASMÁTICAS DE ALGUNOS  $\beta$  AGONISTAS EN DIFERENTES ESPECIES  
PLASMA HALF LIFE OF SOME  $\beta$ AGONISTS IN DIFFERENT SPECIES

		<i>T ½ horas</i>		
		<i>T ½ hours</i>		
<i>Compuesto y animal</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>g</i>	<i>Referencia</i>
<i>Compound and animal</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>g</i>	<i>Reference</i>
<i>Clenbuterol</i>				
<i>Clenbuterol</i>				
Bovinos	18	55		98
Bovinos	19	57		55
Equino		10 <sup>a</sup>	120	117
Humano	0.9	33.9		114, 115
Conejo		9		118
Rata	3.6	26.6		118
Bovinos	-	Zilpaterol 11.9 - 13**		
<i>Cimaterol</i>				
<i>Cimaterol</i>				
Bovinos	0.04	0.91		119
Ractopamina				
Cerdos		Se calcula menor a 45 minutos*		

<sup>a</sup> Fase de eliminación:  $\alpha$  = distribución inicial;  $\beta$  = posdistribución (fase de depuración inicial);  $\gamma$  = fase de depuración de residuos fijados a tejidos.  
\*<http://www.fda.gov/cvm/efoi/section2/141172051401.html>  
\*\* Informe técnico. Pharmacokinetics of RU42173-C14 ROUSSEL/UCLAF, marzo 1986. De acuerdo con este estudio se necesitan menos de 48 horas para obtener residuos muy por debajo del ADI.  
<sup>a</sup> Elimination phase:  $\alpha$  = initial distribution;  $\beta$  = post-distribution (initial clearance phase);  $\gamma$  = clearance phase of fixed residues in tissues.  
\*<http://www.fda.gov/cvm/efoi/section2/141172051401.html>  
\*\* Technical report. Pharmacokinetics of RU42173-C14 ROUSSEL/UCLAF, March 1986. According to this study less than 48 hours are needed to obtain residues below ADI.

ous organ and although the concentration in eye is very high, it is very improbable that someone may eat the necessary amount of these organs to reach dangerous levels. However, it is evident that the illegal use of clenbuterol is closely related to residues that are well over the MRL. There is little control in dose and there is no rational use or supervision by veterinarians; these factors, sooner or later, will cause a problem in susceptible individuals.

If it is true that clenbuterol concentration decreases more slowly in eye, hair or feathers<sup>105</sup> and, that its accumulation is higher in pigmented eye tissue or in

## Conclusiones

Independientemente de si el clenbuterol puede o no afectar la salud pública, es evidente que el uso de un fármaco prohibido por las autoridades de un país, para cualquier fin en la producción pecuaria representa un delito y como tal deberá tipificarse y castigarse. Empero, resulta simplista pretender que todos los medicamentos de la familia de los agonistas  $\beta$ -AR tengan el mismo destino que el clenbuterol. Bajo un enfoque similar, quedarían pocos medicamentos disponibles para uso clínico en veterinaria. Por tanto, la ractopami-



pigmented hair, more so than in adipose tissue, one must remember that neither hair nor feathers are consumed as food and the weight of the retina makes it very difficult to consider this tissue as a problem.

Finally, it is a matter of a chain of adjustments in a national reality in which these seem a utopia. For example, clenbuterol could be used responsibly to promote productive yield if there were a precisely defined dose and the proper pharmaceutical formulation which could guarantee the efficiency of the mix. Laws would need to be restructured in order to detail and enforce withdrawal times. There should be follow-up in the levels of residues in final products (e.g. eyes) at slaughter plants and before sacrifice by testing the animal's hair. Currently it is shocking that law-breakers are not sanctioned. Strict penal sanctions should be established and enforced against law-breakers who use clenbuterol, or for that matter, any forbidden drug which is used to increase farm production.

na y el zilpaterol deben ser tratados independientemente y con consideraciones propias a los estudios realizados en ellos.

Es obligación del veterinario procurar la producción de productos de origen animal de alta calidad, lo que incluye la vigilancia de un nivel de residuos de fármacos acorde a los estándares internacionales (*Codex Alimentarius*, FDA, Comunidad Europea, etc.). En este sentido, el clenbuterol es un medicamento que se presta al mal uso por la interacción entre su eficacia promotora del rendimiento productivo y su lenta velocidad de depuración. No obstante, es justo aclarar que el clenbuterol no es especialmente peligroso para el ser humano, de hecho se le usa como medicamento broncodilatador en niños y adultos. Los residuos hepáticos del clenbuterol permanecen en un rango de ppb entre los días 16-39 después de terminado el tratamiento (16  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso) y en el rango de ppt hasta 56 días después del retiro,<sup>50,107</sup> de manera tal que con un retiro adecuado los residuos de clenbuterol<sup>00</sup> dejan de ser un peligro. Existen medicamentos utilizados en medicina veterinaria y en medicina humana mucho más peligrosos y con un enorme potencial tóxico; por ejemplo, la nitrofurantoína en el ser humano induce a menudo reacciones cutáneas severas, así como alteraciones neurológicas, incluso puede generar edema pulmonar severo. En medicina veterinaria, se ha implicado al carbadox y al olaquinox en reacciones de cancerogenicidad y no se tienen programas de detección en rastros de estas sustancias y sus metabolitos. Así, pues, como a menudo sucede con los medicamentos, el problema no sería su uso sino el abuso motivado por ignorancia y ambición. En la actualidad el abuso del clenbuterol repercute tanto en el bienestar del animal como en la salud pública.

Por otro lado, existe la preocupación de que los hábitos alimentarios del mexicano lo hagan más susceptible a padecer una sobredosis de alguno de los agentes  $\beta$ -AR en uso. A las dosis recomendadas por los fabricantes de ractopamina y zilpaterol esto es imposible, aun con cero días de retiro. Más aún, es poco probable que se observe efecto alguno aun si sobredosifican a los animales. Sin embargo, en el caso del clenbuterol, sí se pueden inducir algunos efectos colaterales en el consumidor si no se respetan los tiempos de retiro señalados de cuando menos dos semanas y de preferencia un mes. En este sentido, el hígado es el órgano más peligroso y aunque la concentración en ojo es muy elevada, es realmente improbable que alguien consuma la cantidad necesaria de estos órganos para lograr una dosis peligrosa. Sin embargo, es evidente que el uso ilegal del clenbuterol está relacionado estrechamente con residuos que sobrepasaran en gran medida los MRL. Existe poco control en la dosis y no se cuenta con un uso racional y supervisado por el vete-



rinario; estos factores, tarde o temprano, causarán un problema en individuos susceptibles.

Si bien es cierto que las concentraciones de clenbuterol disminuyen más lentamente del ojo y del pelo o plumas<sup>105</sup> y, por ende, su acumulación es más alta en el tejido ocular pigmentado o en el pelo pigmentado, más que en el tejido adiposo, ni el pelo ni la pluma se consumen como alimento y el peso de la retina hace muy difícil que se le considere como tejido problema.

Finalmente, es cuestión de una cadena de ajustes en una realidad nacional en la que estos últimos parecen una utopía. Por ejemplo, el clenbuterol se podría utilizar responsablemente para fines de promoción del rendimiento productivo si se definieran con exactitud dosis, forma de dosificación y formulación farmacéutica correcta que garantizara eficiencia de mezclado. Se requeriría reestructurar las normas para detallar y hacer respetar el tiempo de retiro y se deberían realizar seguimientos en rastro de niveles de residuos en los productos finales (v.g., ojo) y antes del sacrificio en el pelo del animal. Por el momento es alarmante que no se reglamenten las sanciones a los transgresores de la ley. Deben establecerse e instrumentarse sanciones penales severas a aquellos que transgredan la ley y utilicen el clenbuterol o, para el caso, cualquier medicamento prohibido para fomentar la producción pecuaria.

## References

1. Scott JS, Berney CE, Derksen FJ, Robinson NE. Beta-adrenergic receptor activity in ponies with recurrent obstructive pulmonary disease. *Am J Vet Res* 1991;52:1416-1422.
2. Sillence MN, Mathews ML, Badran TW, Pegg GG. Effects of clenbuterol on growth in underfed cattle. *Austr J Agric Res* 2000;51:401-406.
3. Peters AR.  $\beta$ -agonists as repartitioning agents: a review. *Vet Rec* 1989;124:417-420.
4. Sumano LH. Quinolonas y fluoroquinolonas en medicina veterinaria. *Vet Méx* 1993;2:24-28.
5. Ocampo CL, Sumano LH, Paez ED. Farmacocinética y eficacia clínica del tianfenicol en pollo de engorda. *Vet Méx* 2000;31:89-93.
6. Sumano LH, Ocampo CL. *Farmacología veterinaria*. 2a ed. México (DF): McGraw Hill/Interamericana, 1997.
7. Martin LE, Hobson JC, Page JA, Harrisson AC. Metabolic studies of Salbutamol-3H: a new bronchodilator in rat, rabbit, dog, and man. *Eur J Pharmacol* 1971;14: 183-199.
8. Morgan DJ. Clinical pharmacokinetics of beta-agonists. *Clin Pharmacocinet* 1990;18:270-294.
9. Murphy PJ, Williams TL, Kau DLK. Disposition of dobutamine in the dog. *G Pharmacol Exp Ther* 1976;199:423-431.
10. Wallis CJ. Salbutamol, salmeterol—a chemist's perspective. *Chim Ther* 1993;20:265-291.
11. Nazzal CA. The clinical pharmacology of clenbuterol. *South-West Vet* 1985;36:121-125.
12. Witkamp RF, Van Miert A. Pharmacology and therapeutic use of  $\beta_2$  - agonists. *Thessaloniki* 1992;8:75-88.
13. Witkamp RF. Pharmacological and toxicological properties of  $\beta$ -adrenergic agonists. In: Enne G, Kuiper HA, Valentini A, editors. *Residues of veterinary drugs and mycotoxins in animal products: new methods for risk assessment and quality control*. Memorias de la conferencia vía Internet (Listserver Meatqual); 1994, 15 abril - 31 agosto; Wageningen Pers, Wageningen, Netherlands, 1996:113-123.
14. Moffat AC, Jackson JV, Moss MS, Widdop B. *Clarkson isolation and identification of drugs*. 2nd ed. London (UK): The Pharmaceutical Press, 1986.
15. Tariq M, Al-Badr AA. Isoproterenol. *Profiles Drug Subst* 1985;14:391-422.
16. Turberg MP, Macy TD, Lewis JJ, Coleman MR. Determination of raptopamine hydrochloride in swine and turkey tissues by liquid chromatography with colourmetric detection. *J Am Org Anal Chem* 1995;78:1394-1402.
17. Lund W. *The pharmaceutical codex*. 12th ed. London (UK): The Pharmaceutical Press, 1994.
18. Ahuja S, Ashman J. Terbutaline sulfate. *Profiles Drug Subst* 1990;19:601-625.
19. Carlström D, Bergin R, Falkenberg G. Molecular characteristics of biogenic monoamines and their analogs. *Q Rev Biophys* 1973;6:257-310.
20. Hieble JP, Bondinell WE, Ruffolo RR.  $\alpha$  and  $\beta$ -adrenoceptors: from the gene to the clinic. 1. Molecular biology and adrenoceptor subclassification. *J Med Chem* 1995;38:3415-3444.
21. Reynolds EF, Parfitt K, Parsons AV, Sweetman S, Martindale C. *The extra pharmacopoeia*. London (UK): The Pharmaceutical Press, 1989.
22. Courtheyn D, Moermans R, Schilt R, Boenke A. Beta-agonists in animal feed. II. Optimization of the extraction. *Food Additives Contam* 1996;13:493-509.
23. Wilson RT, Groneck JM, Holland KP, Henry AC. Determination of clenbuterol in cattle, sheep, and swine tis-



- sues by electron ionization gas chromatography/mass spectrometry. *J Am Org Anal Chem* 1994;77: 917-924.
24. Ruffolo RE. Chirality in  $\alpha$  and  $\beta$ -adrenoceptor agonists and antagonists. *Tetrahedron* 1991;47:9953-9980.
  25. Martín R, Hernández PE, Sanz B. Revisión: residuos de tratamientos veterinarios y salud pública. *Rev Esp Cienc Aliment* 1992;32:5.
  26. Waldeck B, Widmark E. Steric aspects of agonism and antagonism at  $\beta$ -adrenoceptors: experiments with the enantiomers of clenbuterol. *Pharmacol Toxicol* 1995;56:221-227.
  27. Kaiser G, Wiemer G, Kremer G, Dietz J, Palm D. Identification and quantification of  $\beta$ -adrenoceptor sites in red blood cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1978;305:41-51.
  28. Mersmann HJ, McNeel RL. Ligand binding to the porcine adipose tissue beta-adrenergic receptor. *J Anim Sci* 1992;70:787-797.
  29. Mazzoni L, Naef R, Chapman ID, Morley J. Hyperresponsiveness of the airways following exposure of Guinea-pigs to racemic mixtures and distomers of  $\beta$ -selective sympathomimetics. *Pulm Pharmacol* 1994;7:367-376.
  30. Thompsom MJ, Huss P, Unverferth DV, Fasola A, Leier CV. Hemodynamic effects of intravenous butopamine in congestive heart failure. *Clin Pharmacol Ther* 1980;28:324-334.
  31. Yen TT, Anderson DB, Veehuizen EL. Phenethanolamines: reduction of fat and increase of muscle from mice to pigs. In: Lardy H, Stratman, editor. *Hormones, thermogenesis, and obesity*. New York: Elsevier, 1989:455-464.
  32. Ricke EA, Larson GL, Smith DJ, Feil VJ, Caton JS. Influence of intraperitoneal administration of ractopamine HCl stereoisomers on growth, protein retention, and carcass composition in rats fed commercial diets. *J Anim Sci* 1996;74:210.
  33. Jeppson AB, Johansson U, Wldeck B. Steric aspect of agonism and antagonism at beta-adrenoceptors: experiments with the enantiomers of terbutaline and pindolol. *Pharmacol Toxicol* 1984;54:285-291.
  34. Shaw WN, Schmiegel KK, Yen TT, Toomey RE, Meyers DB, Mills J. LY977A novel compound for weight control. *Life Sci* 1981;29:2091-2101.
  35. Yen TT, McKee MM, Stamm NB, Bemis KG. Stimulation of cyclic AMP and lipolysis in adipose tissue of normal and obese Auy / a mice by LY / ), a phenethanolamine and stereoisomers. *Life Sci* 1983;32:1515-1522.
  36. Johnson M. Salmeterol. *Med Res Rev* 1995;15:225-257.
  37. Herbert F, Hovell FD, Reeds PJ. Beta-agonists and their effects on animal growth. *Nutr Soc* 1985; 44:5.
  38. Jones RW, Easter RA, McKeith FK, Dalrymple RH, Maddock HM, Bechtel PJ. Beta-agonists. *J Anim Sci* 1985;61:905.
  39. Kuiper HA, Noordam MY, Dooren-Flipsen MMH, Van Schilt R., Roos AH. Illegal use of beta-adrenergic agonists. *J Anim Sci* 1998;76:195-202.
  40. Slocombe RF, Covelli G, Baylay WM. Respiratory mechanics of horses during stepwise treadmill exercise tests, and the effect of clenbuterol pretreatment on them. *Austr Vet J* 1992;69:221-225.
  41. Dodam JR, Moor RE, Olson NC, Exposito AJ, Fawcett TA, Huang YC, et al. Effects of clenbuterol hydrochloride on pulmonary gas exchange and hemodynamics in anesthetized horses. *Am J Vet Res* 1993;54:776-782.
  42. Reinhold P. Oscillatory measurements, blood gas analysis and clinical observations after intravenous clenbuterol administration in healthy and acutely pneumonic calves. *Vet Res* 1993;17:143-151.
  43. Meinen K, Rominger KL, Hermer M, Rahn M, Kanitz T. Oral tocolytic therapy with clenbuterol-determination of the plasma level. *Ztschr Geburtshilfe Perinatol* 1988;192:158-162.
  44. Yeagley C, Caritis SN, Ruzycky AL. Contraction inhibition by beta-agonists progressively decreases before labor in the rat myometrium. *Am J Obstetr Gynecol* 1996;174:1637-42.
  45. Gastal MO, Gastal EL, Torres CAA, Ginther OJ. Effect of oxytocin, prostaglandin F2 alpha, and clenbuterol on uterine dynamics in mares. *Theriogenology* 1998;50:521-553.
  46. Meredith S, Kiesling DO. The effect of flumethasone, clenbuterol and oxytocin on time of lambing in crossbred ewes. *J Dairy Sci* 1989;72:383-384.
  47. Gastal MO, Gastal EL, Torres CAA, Ginther OJ. Effect of oxytocin, prostaglandin F2 alpha, and clenbuterol on uterine dynamics in mares. *Theriogenology* 1998;50:521-534.
  48. Plant JW, Bowler JK. Controlled parturition in sheep using clenbuterol hydrochloride. *Aust Vet J* 1988;65:91-93.
  49. Mitchell GA, Glora D. Illegal use of ( $\beta$ -adrenergic agonists in the United States. *J Anim Sci* 1998; 76:208-211.
  50. Elliot CT, McCaughey WJ, Crooks SR, McEvoy JD, Kennedy DG. Residues of clenbuterol in cattle receiving therapeutic doses: implications for differentiating between legal and illegal use. *Vet Q* 1995;17:100-102.
  51. De Wasch K, De Brabander H, Courtheyn D. LC-MS-MS to detect and identify four beta-agonists and quantify clenbuterol in liver. *Analyst* 1998;123:2701-2705.
  52. Hooijerink H, Schilt R, Van Bennekom EO, Huf FA. Determination of beta-sympathomimetics in liver and urine by immunoaffinity chromatography and gas chromatography-mass-selective detection. *J Chrom B* 1994;660:303-313.
  53. Cerni L, Biancotto G, Tondolo A, Bogoni P. Dexamethasone and clenbuterol detection by enzyme immunoassay in bovine liver tissue: a new multiresidue extraction procedure. *Food Agr Immun* 1998;10:307-315.
  54. Boenisch B, Quirke JF. Safety assessment of  $\beta$ -agonists. In: Kuiper HA, Hoogenboom LAP, editors. *In vitro toxicological studies and real time analysis of residues in food*. Wageningen, The Netherlands: RIKILT-DLO-Wageningen, 1992:102-124.
  55. Smith DJ. The pharmacokinetics, metabolism, and tissue residues of beta-adrenergic agonists in livestock. *J Anim Sci* 1998;76:173-194.
  56. Dalidowicz JE, Thomson TD, Babbitt GE, Hutson DH. Ractopamine hydrochloride, a phenethanolamine re-partitioning agent: metabolism and tissue residues. *Xenobiotics Food Producing Ann* 1992;503:234-243.
  57. Smith DJ, Feil VJ, Huwe JK, Paulson GD. Metabolism and disposition of ractopamine hydrochloride by turkey poults. *Drug Metabol Disposit* 1993;21:624-633.
  58. Poletini A, Montagna M, Hogendoorn EA, Dijkman E, Van Zoonen P, Van Ginkel LA. Applicability of coupled-column liquid chromatography to the analysis of beta-agonists in urine by direct sample injection I. Development of a single-residue reversed-phase liquid chromatography-UV method for clenbuterol and selection of chromatographic conditions suitable for multi-residue analysis. *J Chroma* 1995;695:19-31.
  59. Anonymous. Evaluation of certain veterinary drug residues in food. *World Health Organization Technical Report Series* 1993; Issue 832:1-62.
  60. Mersmann HJ. Overview of the effects of  $\beta$ -adrenergic receptor agonist on animal growth including mechanisms of action. *J Anim Sci* 1998;76:160-172.

61. Ricks CA, Baker PK, Dalrymple RH. Use of repartitioning agents to improve performance and body composition of meat animals. *Reciprocal Meat* 1984;37:5-11.
62. Ornelas GJJ. Evaluación del isoproterenol sobre el comportamiento productivo y calidad de la canal de cerdos en finalización (tesis de maestría) México (DF): Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1992.
63. Vanbelle M, Teller E. The use of beta-agonists for meat production: considerations, results and reflections [clenbuterol, cimaterol, salbutamol, ractopamine]. *Louvain-la-Neuve* 1991;56:37.
64. Mejía GCA, Menéndez TM, Cuaron IJA. Ractopamine en dieta para cerdas: desarrollo y crecimiento. *Vet Méx* 1995;26:374-376.
65. Moody DE, Hanock DL, Anderson DB. Phenethanolamine repartitioning agents. Research and development. Indianapolis, IN: Elanco Animal Health, 1999.
66. Penny RH, Guise HJ, Rolph TP, Tait JA, Johnston AM, Kempson SA, Gettinby G. Influence of the beta-agonist salbutamol on claw horn lesions and walking soundness in finishing pigs. *Vet Rec* 1994;35:374-381.
67. Hansen JA, Yen JT, Klindt J, Nelssen JL, Goodband RD. Effects of somatotropin and salbutamol in three genotypes of finishing barrows: blood hormones and metabolites and muscle characteristics. *J Anim Sci* 1997;75:1810-1821.
68. Hanrahan LP. Beta agonists and their effects on animal growth and carcass quality. *Am Chem Soc* 1992;503:234-243.
69. Rehfeldt C, Schadereit R, Weikard R, Reichel K. Effect of clenbuterol on growth, carcass and skeletal muscle characteristics in broiler chickens. *Br Poultry Sci* 1997;38:366-373.
70. Buhr BL, Hayenga ML. Evaluation of the economic impacts of growth promoters in the U.S. livestock and meat sector. *Rev Agric Econ* 1994;16:159-173.
71. Ocampo L, Cortez U, Sumano H, Avila E. Use of low doses of clenbuterol to reduce incidence of ascites syndrome in broilers. *Poultry Sci* 1998;77:1297-1299.
72. Cortes PU, Avila GE, Ocampo CL, Sanchez RS, Cortes CC. The effect of clenbuterol on broiler growth and prevention of ascites syndrome. Reunión Nacional de Investigación Pecuaria; 1996 2-4 diciembre; Cuernavaca (Morelos) México. Cuautitlán, Edo. de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Facultad de Estudios Superiores, Cuautitlán/Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, 1996:56-64.
73. Yang YT, McElligott MA. Multiple actions of  $\beta$ -adrenergic agonists on skeletal muscle and adipose tissue. *Biochemistry* 1989;261:1-10.
74. Smith SB, Gracia DK, Anderson DB. Elevation of a specific mRNA in longissimus muscle of steers fed ractopamine. *J Anim Sci* 1989;67:3495-3520.
75. Helferich WG, Jump DB, Anderson DB, Skjaerlund DM, Merkel RA, Bergen WG. Skeletal muscle  $\alpha$ -actin synthesis is increased pretranslational in pig fed the phenethanolamine ractopamine. *Endocrinology* 1990;126:3096-3100.
76. Higgins JA, Lasslett YV, Bardsley RG, BATTERY PJ. The relation between dietary restriction or clenbuterol treatment on muscle growth and calpain proteinase (EC 3.4.22.17) and calpastain activities in lambs. *Br J Nutr* 1988;60:645-652.
77. Adeola O, McBride BW, Young LG. Metabolic responses induced by isoproterenol in ractopamine-fed pigs. *J Nutr* 1992;122:1280-1286.
78. Preitner F, Muzzin P, Revelli JP, Seydoux J, Galitzky J, Berlan M, *et al.* Metabolic response to various beta-adrenoceptor agonists in beta 3-adrenoceptor knockout mice: evidence for a new beta-adrenergic receptor in brown adipose tissue. *Br J Pharm* 1998;124:1684-1688.
79. MacNeel RL, Mersmann HJ.  $\beta$ -adrenergic receptor subtype transcripts in porcine adipose tissue. *J Anim Sci* 1995;73:1962-1971.
80. Mersmann HJ. Acute metabolic effects of adrenergic agents in swine. *Am J Physiol* 1987;252:85-95.
81. Mersmann HJ. Evidence of classic  $\beta_3$ -adrenergic receptors in porcine adipocytes. *J Anim Sci* 1996;74:984-992.
82. Mersmann HJ. Acute changes in blood flow in pigs infused with  $\beta$ -adrenergic agonists. *J Anim Sci* 1989a;67:2913-2920.
83. Mersmann HJ. Influence of infused  $\beta$ -adrenergic agonists on porcine blood metabolites and catecholamines. *J Anim Sci* 1989b;67:2633-2645.
84. Mersmann HJ. Species variation in mechanisms for modulation of growth by beta-adrenergic receptors. *J Nutr* 1995;125:1777-1782.
85. Sauer MJ, Dave M, Lake BG, Manchee GR, Howells LC, Coldham NG. Beta2-agonist abuse in food producing animals: use of *in vitro* liver preparations to assess biotransformation and potential target residues for surveillance. *Xenobiotic* 1999;29:483-497.
86. Moloney A, Allen P, Joseph R, Tarrant V. Influence of beta-adrenergic agonists and similar compounds on growth. New York: Elsevier Science Publishing, 1991:455-513.
87. Sauer MJ, Anderson SPL. *In vitro* and *in vivo* studies of drug residue accumulation in pigmented tissues. *Analyst* 1994;119:2553-2556.
88. Sauer MJ, Pickett RJH, Limer S, Dixon SN. Distribution and elimination of clenbuterol in tissues and fluids following prolonged oral administration at a growth promoting dose. *J Vet Pharmacol Ther* 1995;18:81-86.
89. Howells L, Godfrey M, Sauer MS. Melanine as an absorbent for drug residues. *Analyst* 1994;119:2691-2693.
90. Elliott CT, Thompson CS, Arts CJM, Crooks SRH, Baak MJ, Van Verheij ER, *et al.* Screening and confirmatory determination of ractopamine residues in calves treated with growth promoting doses of the beta-agonist. *Analyst* 1998;123:1103-1107.
91. FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Evaluation of certain veterinary drug residues in food. Fortieth report of the Joint World Health Organization. WHO-Technical-Report-Series. New York: WHO, 1993:832-862.
92. FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Residues of some veterinary drugs in animals and foods. Monographs prepared by the Fourth Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives; 1992; June 8-18; Geneva, Switzerland. Geneva, Switzerland: Food and Agriculture Organization, 1992:614-621.
93. Martinez-Navarro JF. Food poisoning related to the consumption of illicit beta-agonist in livers. *Lancet* 1990;336:1311.
94. Pulse C, Lamison D, Keck G, Bosvironnais C, Nicolas J, Descotes J. Collective human poisonings by clenbuterol residues in veal liver. *Vet Hum Toxicol* 1991;33:480-481.
95. Prather ID, Brown DE, North P, Wilson JR. Clenbuterol: a substitute for anabolic steroids? *Med Sci Sports Exerc* 1994;27:1118-1121.
96. Von Ahnen S. Analytische Untersuchungen über Nährstoffumverteilende Wachstums promotoren beim Rind (Ph. D. dissertation). München, Germany: Universität München, 1994.

97. Meyer HHD. The illegal practice and resulting risks vs the controlled use of licensed drugs: views in the present situation in Germany. *Ann Rech Vet* 1991;22:299-304.
98. Stoffel B, Meyer HHD. Effects of the  $\beta$ -adrenergic agonist clenbuterol in cows: lipid metabolism, milk production, pharmacokinetics, and residues. *J Anim Sci* 1993;71:1875-1881.
99. Smith DJ, Paulson GD. Identification and stereochemical composition of ractopamine (RAC) glucuronides excreted in turkey bile. *J Anim Sci* 1993;71:202.
100. Dalidowicz JE, Thomson TD, Babbitt GE. Ractopamine hydrochloride, a phenethanolamine repartitioning agent: metabolism and residues. In: Hutson DH, Hawkins DR, Paulson GD, Struble CB, editors. *Xenobiotics and food-producing animals*. Washington (DC): American Chemical Society, 1992:234-243.
101. Smith DJ, Giddings JM, Feil VJ, Paulson GD. Identification of ractopamine hydrochloride metabolites excreted into rat bile. *Xenobiotica* 1995;25:511-520.
102. Smith DJ, Paulson GD. Growth characteristics of rats receiving ractopamine hydrochloride and the metabolic disposition of ractopamine hydrochloride after oral or intraperitoneal administration. *J Anim Sci* 1994;72:404-414.
103. Smith DJ, Paulson GD. Distribution, elimination, and residues of [C] clenbuterol HCl in Holstein calves. *J Anim Sci* 1997;75:454-461.
104. Pou K, Adam A, Lamothe P, Gravel P, Messier J, Gravel A, Ong H. Serum and urinary levels of salbutamol after chronic oral administration in a calf. *Can Vet J* 1992;33:467-468.
105. Malucelli A, Ellendorff F, Meyer HHD. Tissue distribution and residues of clenbuterol, salbutamol and terbutaline in tissues of treated broiler chickens. *J Anim Sci* 1994;72:1555-1560.
106. Gleixner A. Probenecid markedly reduces urinary excretion of ethinylestradiol and trimethoprim slightly reduces urinary excretion of clenbuterol. *Food Addit Contamin* 1998;15:415-420.
107. Elliot CT, McEvoy JD, Shortt HD, Crooks SRH. Effective laboratory monitoring and the abuse of the beta agonist clenbuterol in cattle. *Analyst* 1993;118:447-448.
108. Sumano LH, Ocampo CL. Bases farmacológicas de la vigilancia de residuos de fármacos en veterinaria. *Vet Méx* 1995;26:175-182.
109. Sumano LH, Brumbaugh GW. Farmacología clínica de los aminoglicósidos y los aminociclitolos en medicina veterinaria. *Vet Méx* 1995;26:1-15.
110. Meyer HHD, Rinke LM. The pharmacokinetics and residues of clenbuterol in veal calves. *J Anim Sci* 1991;69:4538-4544.
111. Hooijerink H, Schilt R, Haasnootnd W, Courtheijn D. Determination of clenbuterol in urine of calves by high performance liquid chromatography with in series ultraviolet and electrochemical detection. *J Pharm Biomed A* 1991;9:485-492.
112. Moloney A. Beta agonists. *Feedstuffs* 1983;11:13.
113. Moody DE, Hancock DL, Anderson DB. Phenethanolamine repartitioning agents. *Farm animal metabolism and nutrition*. Wallingford (UK): CAB Publishing, 2000:65-96.
114. Zimmer VA. Ein Malapplikation, Mehrfachapplikation und Metabolitenmuster von Clenbuterol beim Menschen. *Arzneim Forsch* 1976;12:1445-1450.
115. Zimmer VA. Pharmakokinetik und Metabolitenmuster von Clenbuterol beim Kaninchen und beim Hund. *Arzneim Forsch* 1976;12:1442-1445.
116. Kopitar VZ, Zimmer A. Pharmakokinetik und Metabolitenmuster von Clenbuterol bei der Ratte. *Arzneim Forsch* 1976;26:1435-1441.
117. Kallings PC, Ingvast-Larsson S, Persson-Appelgren LE, Forster HJ, Rominger KL. Clenbuterol plasma concentrations after repeated oral administration and its effects on cardio-respiratory and blood lactate responses to exercise in healthy Standardbred horses. *J Vet Pharmacol Ther* 1991;14:243-249.
118. Yamamoto I, Iwata K, Nakashima M. Pharmacokinetics of plasma and urine clenbuterol in man, rat, and rabbit. *J Pharmacobiol Dynamics* 1995;8:335-391.
119. Byrem TM, Robinson TF, Boisclair YR, Bell AW, Schwark WS, Beermann DH. Analysis and pharmacokinetics of cimaterol in growing Holstein steers. *J Anim Sci* 1992;70:3812-3819.