

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora Alejandra Rodríguez por la oportunidad brindada para el desarrollo de este trabajo así como para el crecimiento de mi carrera a través del apoyo constante a mi formación.

A mi cotutor David González por su apoyo académico y durante la corrección del trabajo.

A los miembros del tribunal por haber accedido a ser parte del mismo y realizar sus aportes para la mejora continua de este trabajo.

A todos mis compañeros del Instituto Polo Tecnológico por sus aportes, críticas y apoyo tanto de materiales como equipos que precisara.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por la financiación de la beca de maestría y de un proyecto Fondo María Viñas. A PEDECIBA por el apoyo económico recibido durante el posgrado para la compra de insumos y financiación de congresos. A OPCW por la financiación de una beca de tres meses para estudiar en Rhodes University, Sudáfrica.

A Rhodes University, a través del Prof. Dr. Nelson Torto y PhD Samuel Chigome por su colaboración durante la pasantía en su Laboratorio en el Departamento de Química.

A mis compañeros de laboratorio principalmente, Natalia Berta, María Fernanda Llorente, Rafael González, Alejandra Bado por las discusiones que me hicieron crecer, aprender y resolver problemas cada día. A mi "super amiga" Mage por haber leído toda la tesis y haberme ayudado en la corrección de la misma.

Final y principalmente a mi familia... por bancar mi humor, por su apoyo alentándome a dar cada día lo mejor de mí. Especialmente a mis padres Silvia y Gerardo y a mi esposo Esteban por estar siempre ahí.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	2
ÍNDICE GENERAL	3
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	7
ÍNDICE DE TABLAS	10
I. RESUMEN	11
II. INTRODUCCIÓN	12
A. CONTROL DE DOPING EN DEPORTES EQUINOS	14
1. ANÁLISIS DE DROGAS VETERINARIAS EN MATRICES BIOLÓGICAS	16
2. MÉTODOS DE SCREENING	17
3. MÉTODOS CONFIRMATORIOS	17
4. VALIDACIÓN DE MÉTODOS	21
B. SUSTANCIAS SELECCIONADAS	26
1. FLUNIXINA	26
2. BETAMETASONA Y DEXAMETASONA	27
3. CLEMBUTEROL, SALBUTAMOL Y FENOTEROL	30
4. SILDENAFIL	32
C. DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS Y QUÍMICA VERDE	34
1. TENDENCIAS EN LA PREPARACIÓN DE MUESTRA	36
2. ESTRATEGIAS VERDES PARA PREPARACIÓN DE MUESTRA	37
3. ESTRATEGIAS PARA CROMATOGRAFÍA "VERDE"	46
D. DETECCIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASA TÁNDEM	47
1. ACOPLAMIENTO HPLC-MS	47
2. ESPECTROMETRÍA DE MASA TÁNDEM EN EL TIEMPO	51
3. ESPECTROMETRÍA DE MASA TÁNDEM EN EL ESPACIO	56

4.	MODOS DE ADQUISICIÓN DE DATOS EN ESPECTROMETRÍA DE MASA TÁNDEM	59
5.	DESARROLLO DE MÉTODOS CON DETECCIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASA TÁNDEM	61
E.	ESTRATEGIAS ANALÍTICAS PARA MÉTODOS CONFIRMATORIOS.....	65
III.	OBJETIVOS	66
A.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	66
IV.	SECCIÓN EXPERIMENTAL	67
A.	MATERIALES.....	67
1.	REACTIVOS	67
2.	ESTÁNDARES ANALÍTICOS	67
3.	SOLUCIONES ESTÁNDAR.....	68
4.	MUESTRAS DE ORINA.....	68
5.	INSTRUMENTOS.....	68
B.	PREPARACIÓN DE MUESTRA	69
1.	MÉTODO DE INYECCIÓN DIRECTA (FLUNIXINA).....	69
2.	MÉTODO DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA CON MICROFIBRAS DE POLIESTIRENO (BETAMETASONA Y DEXAMETASONA)	69
3.	MÉTODO DE EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO (DEXAMETASONA Y BETAMETASONA).....	71
4.	MÉTODO DE EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO (BRONCODILADORES Y SILDENAFIL)	71
5.	FABRICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MICROFIBRAS DE POLIESTIRENO.....	72
6.	EFICIENCIA DE EXTRACCIÓN DE LAS FIBRAS EN BATCH.....	72
7.	FABRICACIÓN DE DISPOSITIVOS DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.....	73
8.	CURVAS DE VOLUMEN DE CORTE EN MICRO COLUMNAS	73
C.	CONDICIONES CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA - ESPECTROMETRÍA DE MASA	74
1.	CURVAS DE ENERGÍA EN ESPECTROMETRÍA DE MASA TÁNDEM	76
D.	DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE MÉTODOS PARA CONTROL DE DOPING	77
1.	EFFECTO MATRIZ.....	77

2.	ESPECIFICIDAD, LÍMITE DE DETECCIÓN, PRECISIÓN INTERMEDIA Y REPETIBILIDAD	77
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	79
A.	DETECCIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASA	79
1.	FLUNIXINA	80
2.	BETAMETASONA Y DEXAMETASONA	83
3.	CLEMBUTEROL, SALBUTAMOL Y FENOTEROL	91
4.	SILDENAFIL.....	100
B.	MÉTODO DE INYECCIÓN DIRECTA: MÉTODO CONFIRMATORIO PARA FLUNIXINA EN ORINA EQUINA.....	105
1.	DESARROLLO DEL MÉTODO	106
2.	VALIDACIÓN DEL MÉTODO	110
3.	APLICACIÓN EN CONTROL DE DOPING.....	114
C.	MÉTODO DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA CON MICROFIBRAS DE POLIESTIRENO: MÉTODO CONFIRMATORIO PARA DEXAMETASONA Y BETAMETASONA EN ORINA HUMANA.....	116
1.	DESARROLLO DEL MÉTODO	117
2.	VERIFICACIÓN DEL MÉTODO	127
3.	APLICACIÓN EN CONTROL DE DOPING.....	128
D.	MÉTODO DE EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO: MÉTODO DE SCREENING PARA CLEMBUTEROL, SALBUTAMOL, FENOTEROL Y SILDENAFIL EN ORINA EQUINA	130
1.	DESARROLLO DEL MÉTODO	130
2.	MÉTODO EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO A ESCALA REDUCIDA.....	131
3.	APLICACIÓN EN CONTROL DE DOPING.....	133
4.	USO DE SOLVENTES ALTERNATIVOS EN LA EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO.....	134
VI.	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	136
VII.	BIBLIOGRAFÍA.....	139
VIII.	ANEXOS.....	145
ANEXO I.	LÍMITE DE DETECCIÓN PARA SUSTANCIAS PROHIBIDAS REQUERIDOS POR AORC	145

ANEXO II. ESTRUCTURAS DE LAS MOLÉCULAS	146
ANEXO III. ANÁLISIS REALIZADOS PARA DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE INYECCIÓN DIRECTA: FLUNIXINA	147
ANEXO IV. PRESENTACIONES Y PUBLICACIONES.....	149
PUBLICACIONES	149
PRESENTACIONES.....	149

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

ILUSTRACIÓN 1. NÚMERO DE ARTÍCULOS CON LA EXPRESIÓN "GREEN CHEMISTRY" COMO PALABRA CLAVE. (DATOS OBTENIDOS DE SCOPUS A TRAVÉS DEL PORTAL TIMBÓ, HTTP://WWW-SCOPUS-COM.PROXY.TIMBO.ORG.UY:443/HOME.URL . ÚLTIMO ACCESO 20/08/2013.	13
ILUSTRACIÓN 2. SUSTANCIAS MAYORITARIAMENTE DETECTADAS EN CARRERAS DE CABALLOS, AÑO 2010. REPORTE IFHA, MUESTRAS TOMADAS ANTES O DESPUÉS DE LAS CARRERAS. HTTP://WWW.HORSERACINGINTFED.COM/RESOURCES/2010ANNUALREPORTPROHIBITEDSUBSTANCES.PDF	15
ILUSTRACIÓN 3. ESTRUCTURA DE FLUNIXINA.....	26
ILUSTRACIÓN 4. ESTRUCTURA DE BETAMETASONA Y DEXAMETASONA. BETAMETASONA ORIENTACIÓN B DEL GRUPO METILO C16 Y DEXAMETASONA, ORIENTACIÓN A DEL GRUPO METILO C16.....	27
ILUSTRACIÓN 5. ESTRUCTURA DE CLEMBUTEROL, SALBUTAMOL Y FENOTEROL.....	30
ILUSTRACIÓN 6. ESTRUCTURA DE SILDENAFIL.	32
ILUSTRACIÓN 7. ESQUEMA DE LOS COMPONENTES BÁSICOS PARA ELECTROSPINNING [75].	40
ILUSTRACIÓN 8. SÍNTESIS DE 2-METILTETRAHIDROFURANO. 1- HIDROGENACIÓN DE FURFURAL PARA OBTENER 2-METILFURANO QUE SE PURIFICA POR DESTILACIÓN. 2- HIDROGENACIÓN PARA DAR LUGAR A 2-METHF QUE SE DESTILA PARA OBTENER EL PRODUCTO PURO. HTTP://ES.WIKIPEDIA.ORG/WIKI/2-METILTETRAHIDROFURANO	44
ILUSTRACIÓN 9. SÍNTESIS DE CICLOPENTIL METIL ÉTER [94].....	45
ILUSTRACIÓN 10. DIAGRAMA DE UN SISTEMA DE HPLC-MS CON ANALIZADOR DE TRAMPA DE IONES Y ESQUEMA DEL PROCESO DE IONIZACIÓN POR ELECTROSPRAY. TOMADO DE BRUKER DALTONICS USER MANUAL, VOLUME 1, VERSIÓN 1.2.1.....	55
ILUSTRACIÓN 11. RUTA DE LOS IONES A TRAVÉS DEL ESPECTRÓMETRO DE MASA QQ-TOF. TOMADO DE BRUKER DALTONICS MICROTOF-Q II USER MANUAL, VOLUME 1, VERSIÓN 1.0.....	57
ILUSTRACIÓN 12. PATRÓN DE FRAGMENTACIÓN DE FLUNIXINA. ANALIZADOR DE TRAMPA DE IONES, ENERGÍA DE FRAGMENTACIÓN 1.05V, MODO DE ADQUISICIÓN <i>PRODUCT ION SCAN</i> PARA EL ION PRECURSOR M/Z 297.	80
ILUSTRACIÓN 13. CURVAS DE ENERGÍA DE COLISIÓN PARA FLUNIXINA. ESPECTRÓMETRO DE MASA CON ANALIZADOR DE TRAMPA DE IONES (ARRIBA) O CON ANALIZADOR QQ-TOF (ABAJO).....	81
ILUSTRACIÓN 14. PATRÓN DE FRAGMENTACIÓN DE FLUNIXINA Y ESTRUCTURA DE LOS IONES FRAGMENTO OBTENIDOS. ANALIZADOR QQ-TOF, ENERGÍA EN LA CELDA DE COLISIÓN DE 21 eV.	82
ILUSTRACIÓN 15. CURVAS DE FRAGMENTACIÓN PARA DEXAMETASONA Y BETAMETASONA EN QQ-TOF. SE MUESTRAN LOS IONES PARA LOS CUALES SE OBSERVARON LAS MAYORES DIFERENCIAS EN ABUNDANCIAS RELATIVAS.	85
ILUSTRACIÓN 16. CURVAS DE FRAGMENTACIÓN PARA DEXAMETASONA Y BETAMETASONA EN TRAMPA DE IONES. SE MUESTRAN LOS IONES PARA LOS CUALES SE OBSERVARON LAS MAYORES DIFERENCIAS EN ABUNDANCIAS RELATIVAS.	86
ILUSTRACIÓN 17. CURVAS DE FRAGMENTACIÓN PARA DEXAMETASONA Y BETAMETASONA EN QQ-TOF. SE MUESTRAN LOS IONES PARA LOS CUALES NO SE OBSERVARON DIFERENCIAS IMPORTANTES EN LAS ABUNDANCIAS RELATIVAS.	87
ILUSTRACIÓN 18. CURVAS DE FRAGMENTACIÓN PARA DEXAMETASONA Y BETAMETASONA EN TRAMPA DE IONES. SE MUESTRAN LOS IONES PARA LOS CUALES NO SE OBSERVARON DIFERENCIAS IMPORTANTES EN LAS ABUNDANCIAS RELATIVAS.	88
ILUSTRACIÓN 19. ESTRUCTURA DE LOS IONES FRAGMENTO OBTENIDOS PARA DEXAMETASONA O BETAMETASONA.	89

ILUSTRACIÓN 20. PATRÓN DE FRAGMENTACIÓN DE DEXAMETASONA (ARRIBA) Y BETAMETASONA (ABAJO) EN QQ-TOF. ENERGÍA DE FRAGMENTACIÓN DE 11 eV.	90
ILUSTRACIÓN 21. PATRÓN ISOTÓPICO DE CLEMBUTEROL. ARRIBA: EXPERIMENTAL OBTENIDO EN QQ-TOF SIN FRAGMENTACIÓN, ABAJO TEÓRICO.	92
ILUSTRACIÓN 22. ESTRUCTURA DE LOS IONES FRAGMENTO OBTENIDOS PARA CLEMBUTEROL. ION PRECURSOR ³⁵ CL O ³⁷ CL.	93
ILUSTRACIÓN 23. PATRÓN DE FRAGMENTACIÓN PARA CLEMBUTEROL. ESPECTRO OBTENIDO A 8 eV EN QQ-TOF CON M/z 277 Y 279 COMO IONES PRECURSORES (VENTANA DE AISLAMIENTO DE 10 M/z).....	93
ILUSTRACIÓN 24. CURVAS DE FRAGMENTACIÓN PARA CLEMBUTEROL EN TRAMPA DE IONES. IONES PRECURSORES M/z 277 Y M/z 279.....	94
ILUSTRACIÓN 25. ESPECTRO OBTENIDO A 0.50 V DURANTE LOS ENSAYOS DE FRAGMENTACIÓN EN LA TRAMPA DE IONES, LUEGO DE REALIZAR LA OPTIMIZACIÓN PARA EL AISLAMIENTO DEL ION PRECURSOR M/z 277.	94
ILUSTRACIÓN 26. CURVAS DE FRAGMENTACIÓN PARA CLEMBUTEROL EN QQ-TOF. IONES PRECURSORES M/z 277 Y M/z 279.	96
ILUSTRACIÓN 27. ESTRUCTURA DE LOS IONES FRAGMENTO OBTENIDOS PARA SALBUTAMOL. ION PRECURSOR M/z 240.	97
ILUSTRACIÓN 28. ESTRUCTURA DE LOS IONES FRAGMENTO OBTENIDOS PARA FENOTEROL. ION PRECURSOR M/z 304.	97
ILUSTRACIÓN 29. CURVAS DE FRAGMENTACIÓN EN QQ-TOF PARA FENOTEROL, ESPECTRO A 11 eV.	98
ILUSTRACIÓN 30. CURVAS DE FRAGMENTACIÓN EN QQ-TOF PARA SALBUTAMOL, ESPECTRO A 9 eV.	99
ILUSTRACIÓN 31. ESTRUCTURA DE LOS IONES FRAGMENTO OBTENIDOS PARA SILDENAFIL.	101
ILUSTRACIÓN 32. GRÁFICOS DE FRAGMENTACIÓN PARA SILDENAFIL EN TRAMPA DE IONES.	102
ILUSTRACIÓN 33. GRÁFICOS DE FRAGMENTACIÓN PARA SILDENAFIL EN QQ-TOF.	102
ILUSTRACIÓN 34. PATRÓN DE FRAGMENTACIÓN DE SILDENAFIL EN QQ-TOF A 26 eV.	103
ILUSTRACIÓN 35. GRÁFICOS DE EFICIENCIA DEL PROCESO DE CID (<i>COLLISION INDUCED DISSOCIATION</i>) EN QQ-TOF PARA SILDENAFIL. EFICIENCIA DE COLECCIÓN DE IONES (E _c), FRACCIÓN DEL ION PRECURSOR QUE ES COLECTADA LUEGO DE CID, YA SEA COMO ION PRECURSOR O IONES PRODUCTO. EFICIENCIA DE FRAGMENTACIÓN DE IONES (E _f), FRACCIÓN DE LOS IONES PRESENTES LUEGO DE CID COMO IONES PRODUCTO. EFICIENCIA TOTAL (E _{CAD}), FRACCIÓN DEL ION PRECURSOR QUE ES CONVERTIDO EN IONES PRODUCTO QUE LLEGAN AL DETECTOR.	104
ILUSTRACIÓN 36. DIAGRAMA DEL MÉTODO DE INYECCIÓN DIRECTA PARA FLUNIXINA. LA PREPARACIÓN DE MUESTRA REQUIERE DILUCIÓN CON AGUA LUEGO DEL AJUSTE A PH 3.	105
ILUSTRACIÓN 37. CROMATOGRAMA CON DETECCIÓN EN MODO FULL SCAN. MUESTRA DE ORINA BLANCO FORTIFICADA CON FLUNIXINA, ESPECTRO PARA EL TIEMPO DE RETENCIÓN DE FLUNIXINA.	107
ILUSTRACIÓN 38. EVALUACIÓN DEL EFECTO MATRIZ. ENSAYO DE DOBLE INYECCIÓN. VERDE: ESTÁNDAR 200 NG/ML DE FLUNIXINA. ROJO: ESTÁNDAR 200 NG/ML DE FLUNIXINA EN PRESENCIA DEL EFLUENTE PROVENIENTE DEL CROMATÓGRAFO LÍQUIDO DE UNA MUESTRA DE ORINA EQUINA BLANCO (CÓDIGO VEQ 66).	108
ILUSTRACIÓN 39. EVALUACIÓN DEL EFECTO MATRIZ. ENSAYO DE DOBLE INYECCIÓN TRABAJANDO CON UNA DILUCIÓN DE LA MATRIZ BLANCO DE 1/10 (ROSADO); 1/5 (AZUL); 1/2 (VERDE). ESTÁNDAR DE FLUNIXINA 200 NG/ML (MARRÓN).	109
ILUSTRACIÓN 40. ESPECTRO CARACTERÍSTICO DE UNA MATRIZ BLANCO. ESPECTRO OBTENIDO MEDIANTE DETECCIÓN EN MODO <i>PRODUCT ION SCAN</i> DEL ION PRECURSOR M/z 297.	111
ILUSTRACIÓN 41. DETERMINACIÓN DEL LÍMITE DE DETECCIÓN. SE TRABAJÓ CON 4 MATRICES BLANCO DIFERENTES PARA LA DETERMINACIÓN DEL MISMO. SE MUESTRA PARA CADA UNA EL PORCENTAJE DE MUESTRAS POSITIVAS EN CADA NIVEL DE CONCENTRACIÓN (N=6 PARA CADA NIVEL DE CONCENTRACIÓN).	112

ILUSTRACIÓN 42. CROMATOGRAMA DE IONES EXTRAÍDOS (EIC) PARA FLUNIXINA. MS/MS PARA EL ION PRECURSOR M/Z 297 Y EIC PARA LAS TRANSICIONES A M/Z 279, 264 Y 259. QQ-ToF ENERGÍA DE COLISIÓN 21 eV.	112
ILUSTRACIÓN 43. MUESTRA POSITIVA PARA FLUNIXINA (CÓDIGO VEQ 88). ROSADO: CON TRATAMIENTO ENZIMÁTICO PREVIO. CELESTE: SIN TRATAMIENTO ENZIMÁTICO.....	114
ILUSTRACIÓN 44. RESULTADOS DE UN ANÁLISIS CONFIRMATORIO. ESPECTRO DE MASA PARA UN CONTROL POSITIVO (ARRIBA) Y MUESTRA REAL (ABAJO).	115
ILUSTRACIÓN 45. DIAGRAMA DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA CON MICROFIBRAS DE POLIESTIRENO. LA PREPARACIÓN DE MUESTRA REQUIERE 200 µL DE METANOL.....	116
ILUSTRACIÓN 46. SEPARACIÓN DE LOS EPÍMEROS BETAMETASONA Y DEXAMETASONA. RT1: 12.1 MIN BETAMETASONA; RT2: 12.9 MIN DEXAMETASONA, OBTENIDO EN COLUMNA C18 (4.6 x 150 MM; 5 µM) CON FASE MÓVIL (A) 70% ÁCIDO FÓRMICO 10MM (B) 30% ACETONITRILO. INSTRUMENTO TRAMPA DE IONES, DETECCIÓN EN MODO <i>PRODUCT ION SCAN</i> DEL ION PRECURSOR M/Z 393.....	118
ILUSTRACIÓN 47. DETERMINACIÓN DEL EFECTO MATRIZ PARA DEXAMETASONA Y BETAMETASONA. MONITOREO EN MODO <i>PRODUCT ION SCAN</i> DEL ION PRECURSOR M/Z 393.	119
ILUSTRACIÓN 48. MICROSCOPIA DE ESCANEO ELECTRÓNICO DE LAS FIBRAS SINTETIZADAS. A: POLIESTIRENO 15%; B: POLIESTIRENO 20%; C: POLIESTIRENO 25%; D: POLIESTIRENO 30%; E: POLIESTIRENO 35%. ESCALA 100 µM.	121
ILUSTRACIÓN 49. MICROSCOPIA DE INFRARROJO PARA CARACTERIZACIÓN DE LAS FIBRAS DE POLIESTIRENO.	122
ILUSTRACIÓN 50. EFECTO DEL DIÁMETRO DE FIBRAS DE POLIESTIRENO EN LA EFICIENCIA DE EXTRACCIÓN. ...	123
ILUSTRACIÓN 51. MICROSCOPIA DE ESCANEO ELECTRÓNICO (SEM) DE FIBRAS DE POLIESTIRENO SINTETIZADAS CON DIÁMETRO PROMEDIO DE 1.3 µM. SOLUCIÓN DE POLIESTIRENO 20%WT.	123
ILUSTRACIÓN 52. CURVAS DE VOLUMEN DE CORTE Y PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS PARA FIBRAS DE PS EMPAQUETADAS EN MICRO COLUMNAS. PROMEDIO PARA N=3. CUADRADOS BLANCOS: BETAMETASONA; CUADRADOS GRISES: DEXAMETASONA. V _B : VOLUMEN DE CORTE; V _R : VOLUMEN DE RETENCIÓN; σ _V : DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE LA CURVA DERIVADA; N: NÚMERO DE PLATOS TEÓRICOS.	126
ILUSTRACIÓN 53. RECUPERACIONES EN MUESTRAS DE ORINA HUMANA. BARRAS BLANCAS: BETAMETASONA; BARRAS GRISES: DEXAMETASONA. BARRAS DE ERROR: RSD DE LA RECUPERACIÓN (%).	126
ILUSTRACIÓN 54. COMPARACIÓN DE LA SEÑAL OBTENIDA PARA UN FORTIFICADO A 10 NG/ML. TRATADO MEDIANTE LA METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO CLÁSICA UTILIZADA EN EL LABORATORIO (ARRIBA) Y CON EL MÉTODO DESARROLLADO UTILIZANDO MICRO COLUMNAS DE SPE CON MICROFIBRAS DE POLIESTIRENO (ABAJO).	129
ILUSTRACIÓN 55. SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE SALBUTAMOL, FENOTEROL, CLEMBUTEROL Y SILDENAFIL. SALBUTAMOL RT ₁ DE 3.5 MIN; FENOTEROL 6.8 MIN RT ₂ ; CLEMBUTEROL 8.3 MIN RT ₃ ; SILDENAFIL 10.5 MIN RT ₄	131
ILUSTRACIÓN 56. RECUPERACIÓN EN EXTRACCIONES CON 3 ML DE ÉTER ETÍLICO. BARRAS DE ERROR: RSD DE LA RECUPERACIÓN (%).	132
ILUSTRACIÓN 57. ANÁLISIS DE MUESTRA POSITIVA PARA CLEMBUTEROL. ARRIBA: EXTRACCIÓN UTILIZANDO 15 ML DE Et ₂ O, ABAJO: 3 ML DE Et ₂ O. ESPECTRO OBTENIDO CON DETECCIÓN EN MODO <i>PRODUCT ION SCAN</i> PARA ION PRECURSOR M/Z 277 EN TRAMPA DE IONES.	133
ILUSTRACIÓN 58. RECUPERACIONES OBTENIDAS CON 2-METILTETRAHIDROFURANO COMO DISOLVENTE DE EXTRACCIÓN. BARRAS DE ERROR: RSD DE LA RECUPERACIÓN (%).	135

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. MÁXIMO NIVEL DE TOLERANCIA DE INTENSIDADES RELATIVAS DE IONES PARA ASEGURAR LA IDENTIFICACIÓN A UN NIVEL DE CONFIANZA APROPIADO.	20
TABLA 2. RELACIÓN ENTRE DIVERSOS TIPOS DE ANÁLISIS Y PUNTOS DE IDENTIFICACIÓN OBTENIDOS SEGÚN 2002/657/CE.	21
TABLA 3. CLASIFICACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS SEGÚN ICH.	22
TABLA 4. COMPARACIÓN DE LAS DIFERENTES TÉCNICAS PARA LA PRODUCCIÓN DE FIBRAS POLIMÉRICAS.	42
TABLA 5. COMPARACIÓN DE PROPIEDADES FÍSICAS DE DIETILÉTER (Et ₂ O) CON CPME Y 2-METHF [94].	45
TABLA 6. MÉTODOS PARA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA.	75
TABLA 7. PARÁMETROS PARA DETECCIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASA TÁNDEM EN MODO POSITIVO.	76
TABLA 8. COMPARACIÓN DE RANGOS DE TOLERANCIA WADA PARA BETAMETASONA Y DEXAMETASONA. FRAGMENTACIÓN EN QQ-TOF, CON ENERGÍA DE COLISIÓN DE 11 eV O EN TRAMPA DE IONES CON ENERGÍA DE COLISIÓN DE 1.2 V. LA DETERMINACIÓN DE LOS RANGOS DE TOLERANCIA WADA SE REALIZÓ CON LOS VALORES DE INTENSIDADES RELATIVAS DE DEXAMETASONA.	83
TABLA 9. MUESTRAS DE ORINA EQUINA BLANCO UTILIZADAS EN EL DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE FLUNIXINA.	108
TABLA 10. DETERMINACIÓN DE ESPECIFICIDAD. RANGOS AORC DETERMINADOS UTILIZANDO MUESTRAS FORTIFICADAS CON FLUNIXINA. DIFERENTES MATRICES FORTIFICADAS CON MIX 1 O MIX 2. MATRIZ 1: ORINA DE HEMBRA. MATRIZ 2: ORINA DE MACHO. MATRIZ 3: ORINA DE MACHO TRATADO CON FUROSEMIDE.	111
TABLA 11. ANÁLISIS DE UNA MUESTRA PRESUNTA POSITIVA PARA FLUNIXINA. RANGOS AORC Y WADA DETERMINADOS UTILIZANDO UNA MUESTRA FORTIFICADA CON FLUNIXINA.	115
TABLA 12. CONDICIONES DE ELECTROSPINNING Y CARACTERÍSTICAS DE LAS FIBRAS OBTENIDAS.	122
TABLA 13. RECUPERACIONES DE BETAMETASONA Y DEXAMETASONA EN MUESTRAS DE AGUA FORTIFICADA (N=3). SOLUCIÓN DE 5 µG/ML USANDO DOS CONFIGURACIONES DE DISPOSITIVOS DIFERENTES. ESQUEMA DE CADA UNO DE LOS DISPOSITIVOS UTILIZADOS.	124

I. RESUMEN

El proyecto de Maestría propone desarrollar y validar estrategias analíticas para el análisis confirmatorio de medicamentos veterinarios en muestras biológicas de origen equino para su uso en control de doping. Estas estrategias incluyen el desarrollo de nuevos métodos de extracción para el tratamiento de muestra en matrices biológicas de acuerdo a los principios de química verde y el estudio y optimización de patrones de fragmentación en experimentos de espectrometría de masa tándem para la detección de los analitos de interés. Los métodos desarrollados deberán cumplir con los requerimientos para la identificación de sustancias prohibidas en matrices biológicas de acuerdo a normativas aceptadas en control de doping.

El trabajo fue desarrollado en el Instituto Polo Tecnológico de Pando de la Facultad de Química, cuya misión es la realización de proyectos I+D+i con distintos sectores de la industria. De manera de adaptarse a los requerimientos del usuario, los métodos desarrollados deben cumplir con el propósito de ser adecuados al uso (*fit for purpose*), incorporando adicionalmente los factores de la reducción del impacto ambiental sobre la salud humana y ser económicamente viables.

En la preparación de muestra, se trabajó en la reducción en los tiempos de procesamiento, disminución de los volúmenes de solventes orgánicos y de muestra utilizados y la utilización de solventes ambientalmente amigables. En cuanto al análisis cromatográfico con detección por espectrometría de masa, se buscó la utilización de columnas más cortas, con menor tamaño de partícula o diámetro interno. Cada una de las moléculas seleccionadas para el trabajo representa una clase de compuestos buscados en control de doping. Los métodos desarrollados, pueden además tener aplicaciones en estudios farmacocinéticos para el monitoreo de drogas veterinarias y en el análisis de residuos para asegurar la calidad de productos alimenticios de origen animal.

II. INTRODUCCIÓN

Al igual que en el caso de la detección de residuos de medicamentos veterinarios en alimentos, la detección en muestras biológicas para control de doping requiere métodos analíticos muy sofisticados para asegurar inequívocamente su presencia. Una de las tecnologías más utilizadas para esto es la espectrometría de masa, generalmente acoplada a una separación cromatográfica previa, donde el método desarrollado deberá cumplir con los requerimientos de normativas internacionalmente aceptadas para métodos confirmatorios.

Los métodos analíticos más modernos son capaces de detectar trazas de moléculas orgánicas en matrices complejas pero a menudo implican sucesivos pasos de extracción y *clean up* con solventes orgánicos en cantidades económica- y ambientalmente inaceptables. El auge de la Química Verde (Ilustración 1), impacta actualmente en los laboratorios analíticos y se ha desarrollado un interés creciente en métodos de análisis que resulten menos agresivos para el entorno utilizando muy pequeñas cantidades de muestra y de disolventes no acuosos o incluso eliminando estos últimos. Anastas y Warner definieron en 1998, doce principios que guían el trabajo hacia una "química ambientalmente amigable" [1]. A finales de los años noventa, J. Namiesnik acuñó el término química analítica verde, que fue definido por L.H. Lawrence como el uso de técnicas y metodologías de química analítica que reduzcan o eliminen disolventes, reactivos, conservantes y otros productos químicos peligrosos para la salud humana o el ambiente llevando a la generación de análisis más rápidos y eficientes energéticamente, sin comprometer su rendimiento [2].

Debido al creciente número de muestras para análisis, el control de doping en diferentes deportes en este caso, en carreras de caballos representa una oportunidad para el desarrollo de métodos analíticos más verdes.

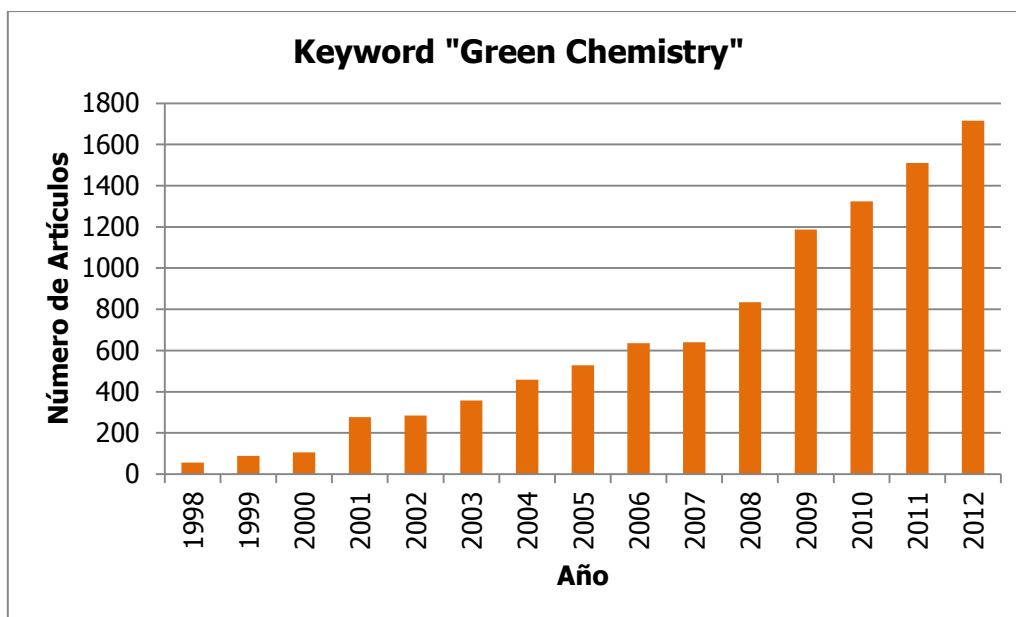


Ilustración 1. Número de artículos con la expresión "Green Chemistry" como palabra clave. (Datos obtenidos de Scopus a través del portal Timbó, <http://www-scopus-com.proxy.timbo.org.uy:443/home.url>. Último acceso 20/08/2013.

A. CONTROL DE DOPING EN DEPORTES EQUINOS

Las carreras de caballos son un deporte ampliamente difundido en el mundo. Como en todos los deportes, el uso de sustancias que alteren el rendimiento de los atletas se encuentra prohibido, por lo que se realizan análisis toxicológicos luego de las carreras para la detección de drogas de uso veterinario. Los animales que participan en competencias deportivas no pueden ser sometidos a tratamientos veterinarios que provoquen una alteración no autorizada de su rendimiento. Cuando se detectan medicamentos veterinarios en muestras biológicas obtenidas después de las carreras (o incluso obtenidas durante los entrenamientos), los caballos son sancionados y su participación en futuras carreras se ve limitada [3, 4].

Las drogas y medicamentos en carreras de caballos han sido analizadas desde 1903, por lo que son los ensayos más antiguamente establecidos y los que se realizan dentro de marcos regulatorios más exigentes [5]. Idealmente, los métodos de detección en deportes equinos deben cubrir un amplio rango de drogas, ser rápidos, fácilmente automatizables y tener límites de detección acordes a las concentraciones esperadas de las respectivas drogas en muestras reales¹. Adicionalmente, deberían ser capaces de adaptarse fácilmente a la detección de nuevas drogas [6]. El análisis de residuos cumple un rol muy importante en los deportes, donde los resultados analíticos son sometidos al escrutinio no solo de los técnicos especializados sino también de los demás actores involucrados en el deporte. Los métodos analíticos deben cumplir entonces con estrictos requerimientos científicos de manera de garantizar un mínimo de falsos positivos y determinar, dentro de márgenes de incertidumbre previamente aceptados, la presencia inequívoca de las sustancias prohibidas en las matrices biológicas.

¹ Muestra Real: muestra recolectada bajo estricta cadena de seguridad antes o después de una competencia equina para el análisis de doping.

Según el reporte anual de la *International Federation of Horseracing Authorities* (IFHA), de la cual Uruguay es miembro, las 14 sustancias mayoritariamente detectadas durante el año 2010 (Ilustración 2), representaron el 68% de todas las sustancias detectadas durante ese año. Los datos fueron relevados por las autoridades hípicas de 28 países, analizándose un total de 308.329 muestras en un total de 175.335 carreras, siendo un 0.46% de las muestras positivas para sustancias prohibidas [7]. Tres de las sustancias seleccionadas para este estudio (flunixin, dexametasona y clenbuterol) se encuentran entre las 5 sustancias más detectadas en 2010. La cuarta sustancia, sildenafil, es una droga de reciente aparición en controles de doping en deportes equinos, siendo detectada por primera vez en Malasia en 2003 [8].

Cada una de las moléculas seleccionadas representa una clase de compuestos que son analizados en los controles de doping. Desde el punto de vista químico, representan diferentes desafíos para el desarrollo de métodos analíticos para su determinación.

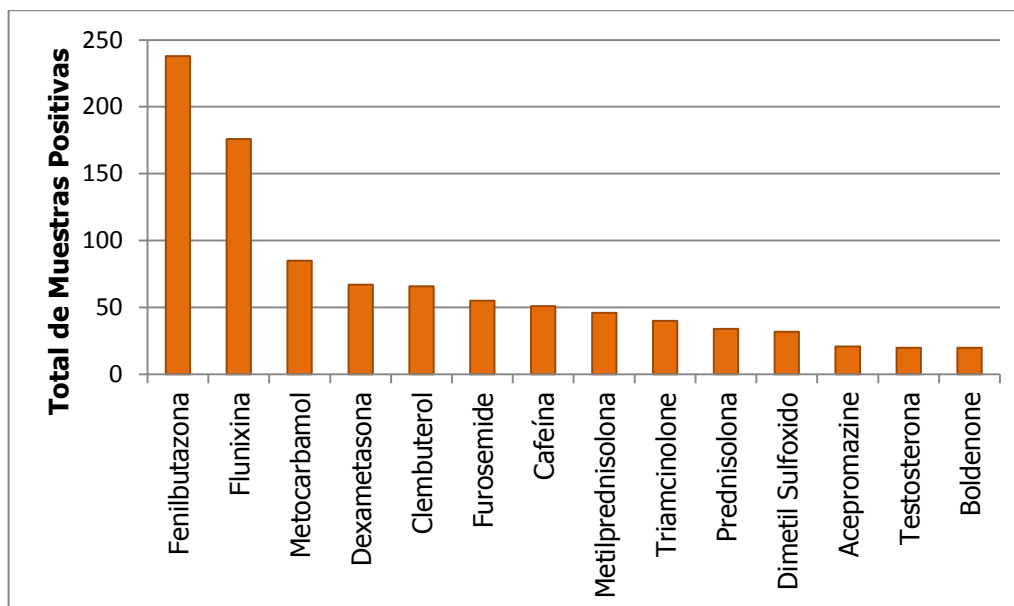


Ilustración 2. Sustancias mayoritariamente detectadas en carreras de caballos, año 2010. Reporte IFHA, muestras tomadas antes o después de las carreras. <http://www.horseracingintfed.com/resources/2010ANNUALREPORTPROHIBITEDSUBSTANCES.pdf>

1. ANÁLISIS DE DROGAS VETERINARIAS EN MATRICES BIOLÓGICAS

Los métodos analíticos utilizados para el monitoreo de drogas veterinarias son esenciales para la protección de la salud humana y animal, para reducir el impacto de las mismas sobre el medio ambiente y para apoyar los esfuerzos de las regulaciones en esta materia. Otros factores importantes a controlar son por ejemplo, la aparición de microorganismos patógenos resistentes a antibióticos o las propiedades de disrupción endócrina de residuos en los alimentos.

El desempeño de los métodos de análisis se ha visto incrementado en los últimos años debido principalmente al uso más generalizado del análisis multidimensional por espectrometría de masa, que permite mayor grado de certeza en la identificación y cuantificación [9]. Por otro lado, los instrumentos con analizadores de alta resolución como el tiempo de vuelo (ToF) [10], han llevado al desarrollo de análisis multiresiduo que superan los 100 analitos en casos de pesticidas y drogas veterinarias [11]. También hay una tendencia en realizar análisis de full scan en lugar de los modos específicos de adquisición, lo que permite un análisis retrospectivo sin necesidad de re-inyección de la muestra. Los límites de sensibilidad alcanzados con estos instrumentos, representan una poderosa técnica para la identificación de analitos que no han sido previamente incluidos en análisis de rutina. La identificación confiable de analitos en mezclas complejas necesariamente requiere de espectrómetros de masa robustos con alto poder de resolución, exactitud en la determinación de la masa, sensibilidad y rango dinámico [9, 12].

Para muchas drogas veterinarias u otros contaminantes, existen ensayos inmunológicos muy sensibles para su detección en matrices biológicas o alimentos. Estos métodos se utilizan únicamente para tamizado (screening) de muestras con el fin de determinar presuntos casos positivos, ya que carecen de la suficiente especificidad para diferenciar sustancias similares entre sí. Para la confirmación de las estructuras moleculares, se utilizan métodos

cromatográficos, ya sea cromatografía gaseosa o líquida, acopladas a espectrometría de masa como detector específico.

2. MÉTODOS DE SCREENING

Son métodos utilizados para detectar la presencia de un determinado analito o clase de analito, sin confirmar su estructura. Estos métodos generalmente tienen la capacidad de analizar un gran número de muestras de manera rápida y económica. Están diseñados para minimizar los resultados falsos negativos [12] y requieren un análisis confirmatorio posterior en las muestras presuntas positivas.

3. MÉTODOS CONFIRMATORIOS

Son métodos analíticos que permitan asegurar inequívocamente la presencia de la droga, la mayor parte de las veces presente en cantidades traza. Una de las tecnologías más utilizadas en este campo es la detección por espectrometría de masa, acoplada a una separación cromatográfica previa donde el método desarrollado debe cumplir con normativas internacionales de referencia para métodos confirmatorios. Debido a la especificidad y selectividad única asociada a las técnicas de cromatografía líquida o cromatografía gaseosa con detección por espectrometría de masa, estos métodos por si solos son adecuados para su utilización como métodos confirmatorios [13-16].

Los requerimientos de los métodos confirmatorios son estrictos y existen distintos organismos internacionales que publican guías para su desarrollo y validación. En el caso de métodos por espectrometría de masa tándem, se especifican el número de iones fragmento necesarios, sus abundancias relativas, la variación permitida en los tiempos de retención cromatográfica, entre otras especificaciones [14, 17, 18].

Dos organismos internacionales importantes en el control de doping son la *World Anti Doping Agency* (WADA) que es la organización que promueve la salud, igualdad y justa competencia entre atletas a lo largo del mundo mediante la puesta en marcha de programas anti-doping efectivos a nivel internacional y la *Association of Official Racing Chemists* (AORC) cuyo objetivo es favorecer el avance y la investigación de la ciencia aplicada a la detección de drogas en materiales biológicos, lograr altos estándares técnicos, éticos y de rendimiento en las carreras, así como educación en este ámbito a través de la cooperación de los miembros entre sí y con las agencias oficiales. Estos organismos publican y actualizan directrices para el trabajo. Algunos de los puntos más importantes que deben considerarse durante el desarrollo de una técnica confirmatoria se detallan en la siguiente sección.

a. CRITERIOS DE WORLD ANTI-DOPING AGENCY (WADA)

Para cromatografía líquida de alta performance, los tiempos de retención (RT) del analito no deben diferir más de 2% o +/- 0.1 minutos (el que sea el intervalo menor) del RT de la misma sustancia en una muestra fortificada de orina, muestras de referencia o material de referencia analizadas en la misma corrida. En el caso de los métodos de "dilución e inyección" utilizados en LC/MS o LC/MS/MS, es recomendada la utilización de un estándar interno marcado isotópicamente, debido al potencial de supresión o potenciación de la matriz [16].

Los datos de espectrometría de masa tándem pueden ser adquiridos en modo Full Scan o por Monitoreo de Reacción Seleccionada (SRM). La combinación de la selección de la masa del ion precursor seguido de un patrón de fragmentación potencialmente único y selección de masa o barrido de los iones producto le da a la espectrometría de masa tándem incrementada especificidad. En general es necesario monitorear dos transiciones; pero en casos

documentados donde una transición sea suficientemente única, la misma puede bastar por si sola para la identificación. Las intensidades relativas de cualquiera de los iones seleccionados respecto de los valores obtenidos para una muestra de referencia no deben diferir más de lo mostrado en la Tabla 1. La relación señal/ruido (S/N) del ion diagnóstico menos intenso debe ser mayor a 3:1.

La abundancia relativa de un ion diagnóstico debe ser determinada preferiblemente del área o altura del pico de la integración del cromatograma de ion extraído (EIC). Para asegurar que el ion precursor y el ion producto no son el resultado de compuestos co-eluyentes en el cromatograma, un espectro en full scan en el tiempo de retención del pico de interés debe ser adquirido. El propósito de este scan no es la identificación sino el documentar la ausencia de otras sustancias que pudieran contribuir a la intensidad de la señal de la transición precursor-producto. La estimación de la concentración se realiza mediante comparación del área o altura de pico con un estándar interno y luego con el área o altura de un material de referencia. Una única transición es suficiente para la determinación de la concentración, mientras que el resto pueden ser utilizadas para la confirmación de la identidad [16].

b. CRITERIOS DE ASSOCIATION OF OFFICIAL RACING CHEMISTS (AORC)

El criterio para la variación en el tiempo de retención en cromatografía líquida es de +/- 2% o 12 segundos (el intervalo mayor).

Un mínimo de 3 iones deben ser utilizados para la comparación de las abundancias relativas y sus señales deben ser significativamente mayores que el *background* (típicamente una relación S/N mayor a 3:1) [13]. Las máximas diferencias permitidas para las abundancias relativas de los iones son las detalladas en la Tabla 1.

No es necesaria la similitud en concentración del material de referencia con la muestra, sin embargo es necesario tener en cuenta las posibles variaciones en el espectro de masa y datos cromatográficos debido a las concentraciones o efectos de la matriz.

La secuencia de inyección para un set confirmatorio sugerida es (1) Control Negativo (2) Blanco de sistema (3) Muestra a ser confirmada (4) Blanco de reactivo o control negativo (5) Muestra de referencia [13].

Tabla 1. Máximo nivel de tolerancia de intensidades relativas de iones para asegurar la identificación a un nivel de confianza apropiado.

ABUNDANCIA RELATIVA (%) DEL ION EN EL ESPECTRO DE REFERENCIA	LC/MS ⁿ WADA	FULL SCAN MS/MS AORC
> 50%	+/- 10% (Absoluto)	20% Absoluto o 40% Relativo (el intervalo mayor)
25% a 50%	+/- 20% (Relativo)	
5% a < 25%	+/- 5% (Absoluto)	
< 5%	+/- 50% (Relativo)	
Tiempo de Retención LC	2% o +/- 0.1 min (el intervalo menor)	+/-2% o 12 seg (el intervalo mayor)

C. CRITERIOS DE COMUNIDADES EUROPEAS (CE)

La confirmación de la presencia de sustancias prohibidas en alimentos u otras matrices biológicas de acuerdo a lo establecido en la Decisión de la Unión Europea 2002/657/EC, debe tener al menos 4 "puntos de identificación" (Tabla 2). El fundamento de los puntos de identificación está asociado con la selectividad de las distintas tecnologías utilizadas para la detección de sustancias químicas y permite establecer criterios para la confirmación de la presencia de una determinada sustancia en la muestra problema [14]. Los "puntos de identificación" asociados a la técnica (LC-MS/MS) pueden ser utilizados como guía para desarrollar los métodos.

Tabla 2. Relación entre diversos tipos de análisis y puntos de identificación obtenidos según 2002/657/CE.

TÉCNICA DE MS	PUNTOS DE IDENTIFICACIÓN OBTENIDOS POR ION
Espectrometría de masa de baja resolución (LR)	1.0
Ion precursor LR-MSn	1.0
Productos de transición LR-MSn	1.5
HRMS	2.0
Ion precursor HR-MSn	2.0
Productos de transición HR-MSn	2.5
CL-MS-MS 1 ion precursor y 2 de segunda generación	4.0

4. VALIDACIÓN DE MÉTODOS

Un método debería ser validado siempre que sea necesario verificar que sus parámetros de actuación son adecuados para el uso propuesto. La extensión de la validación requerida dependerá de la naturaleza del método desarrollado. Incluso cuando se utilizan métodos estándar y previamente caracterizados, es necesario cierto nivel de validación para determinar su desempeño en un laboratorio en particular. A su vez, la revalidación de un método es necesaria cuando se incorporan mejoras en el método previamente validado, cuando los controles de calidad indican que el método está variando con el tiempo, cuando hay un cambio en la instrumentación utilizada, etc. [19].

La guía de la *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH) presenta los cuatro tipos más comunes de procedimientos analíticos y una discusión de las características que deben ser consideradas para la validación de los mismos y como parte de las solicitudes para el registro en países como Japón, Estados Unidos y Unión Europea. Estos son (1) test de identificación, deben asegurar la identidad de un determinado analito en una muestra, normalmente realizado por comparación de una determinada propiedad con un

estándar de referencia; test de impurezas, que pueden ser (2) test cuantitativos o (3) test de límite de detección de la impureza en la muestra, enfocados en reflejar las características de pureza de la muestra; (4) test de análisis, que están enfocados en determinar cuantitativamente el analito en una muestra [20]. La Tabla 3 muestra las cifras de mérito que deben ser determinadas en la validación según el tipo de procedimiento con el que se está trabajando.

Tabla 3. Clasificación de métodos analíticos según ICH.

TIPO DE PROCEDIMIENTO ANALÍTICO	IDENTIFICACIÓN	TEST DE IMPUREZAS		ENSAYOS CUANTITATIVOS DE COMPONENTE MAYORITARIO
		CUANTITATIVO	LÍMITE	
Exactitud	-	+	-	+
Precisión:				
Repetibilidad	-	+	-	+
Precisión Intermedia	-	+	-	+
Especificidad	+	+	+	+
Límite de Detección	-	-	+	-
Límite de Cuantificación	-	+	-	-
Linealidad	-	+	-	+
Rango	-	+	-	+

a. ESPECIFICIDAD

Es la habilidad de determinar inequívocamente el analito en presencia de componentes que se espera normalmente se encuentren presentes en la muestra; típicamente esto incluye impurezas, la propia matriz, etc. El procedimiento adoptado en cada caso va a depender del objetivo del análisis y

la elección de los componentes potencialmente presentes debe tener fundamento científico. Por ejemplo, un test de identificación debería ser capaz de discriminar entre compuestos con estructuras similares o relacionadas que pudieran estar presentes en las muestras reales. Dependiendo de cómo sea establecida la identidad del analito, las interferencias pueden inhibir la confirmación, subestimar o sobrestimar la concentración del analito [19, 20].

b. LÍMITE DE DETECCIÓN

Es la menor cantidad de analito en una muestra que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada exactamente. Esta determinación se puede realizar de varias maneras, (1) basados en la evaluación visual, tanto en métodos instrumentales como no instrumentales, analizando muestras con concentraciones conocidas del analito y estableciendo el nivel mínimo donde el analito puede ser detectado con confianza; (2) basado en la relación señal/ruido (S/N), comparando las señales medidas para muestras con concentraciones bajas y conocidas del analito con las señales medidas para el blanco y estableciendo la mínima concentración a la que el analito puede ser detectado con confianza (normalmente relaciones 3:1 o 2:1); (3) basado en la desviación estándar de la respuesta y la pendiente de la curva de calibración. En algunos casos los valores determinados pueden ser dependientes de la matriz blanco ² de trabajo y si el límite de detección es utilizado para la toma de decisiones críticas, este debe ser verificado regularmente [19].

Para medidas cualitativas, existe un valor de concentración debajo del cual la especificidad se vuelve no confiable y este puede ser utilizado para el cálculo del límite de detección [19].

² Matriz Blanco: matriz que no contienen el analito de interés, estos materiales son necesarios para estimar la interferencia que puede ser encontrada en el análisis de las muestras reales.

c. PRECISIÓN

Expresa el grado de concordancia entre una serie de medidas obtenidas de múltiples procesamientos de una misma muestra, homogénea y genuina, bajo condiciones determinadas. Pueden ser considerados tres niveles diferentes: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad. Se expresa usualmente como la varianza, desviación estándar o coeficiente de variación de una serie de medidas [20]

i. REPETIBILIDAD

Expresa la precisión bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo [20].

ii. PRECISIÓN INTERMEDIA

Expresa las variaciones dentro de un mismo laboratorio como por ejemplo, diferentes analistas, días de análisis, etc. La extensión en la validación de este parámetro dependerá de las circunstancias bajo las cuales se aplica el procedimiento [20].

iii. REPRODUCIBILIDAD

Expresa la precisión entre laboratorios. Debería ser considerada en el caso de la estandarización de procedimientos analíticos [20].

d. ROBUSTEZ

Es una medida de la capacidad del método analítico para mantenerse inafectado ante pequeñas y deliberadas variaciones en los parámetros del método, provee un indicador de su confianza durante el uso normal. La robustez debe ser evaluada durante la fase de desarrollo del método. Si las medidas son susceptibles a variaciones en las condiciones analíticas, éstas

deberán ser cuidadosamente controladas. En el caso de la cromatografía líquida, ejemplos de variaciones típicas son: influencia de la variación del pH en la fase móvil, influencia de la variación en la composición de la fase móvil, diferentes columnas, temperatura o flujo [20].

e. RECUPERACIÓN

Es una medida de la eficiencia de un método para determinar todo el analito de interés presente en una muestra. Debido a que, usualmente esta cantidad es desconocida de antemano, es difícil poder determinar la capacidad del método analítico en extraerlo a partir de la matriz de trabajo. Una de las maneras más utilizadas para calcular la recuperación, es fortificar muestras blanco a diferentes niveles de concentración conocida del analito, realizar la extracción a partir de la muestra y comparar la respuesta obtenida (por ejemplo, área de pico cromatográfico) con la de una solución preparada en solvente a la misma concentración. Sin embargo, en el trabajo con matrices de origen biológico (orina, sangre, etc.) es importante tener en cuenta que este cálculo podría no ser correcto, ya que no toma en cuenta el efecto matriz de supresión o potenciación de la señal que puede influenciar enormemente esta relación. El cálculo según (1) permite obtener una recuperación "real" (RE) que no se encuentra afectada por el efecto matriz [19, 21].

(1) $RE (\%) = (\text{Señal de muestra fortificada antes de la extracción} / \text{Señal de muestras fortificadas después de la extracción}) \times 100$

B. SUSTANCIAS SELECCIONADAS

Cada una de las moléculas seleccionadas representa una clase de compuestos que son analizados en los controles de doping. Desde el punto de vista químico, representan diferentes desafíos para el desarrollo de métodos analíticos para su determinación.

1. FLUNIXINA

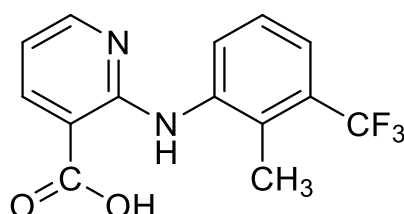


Ilustración 3. Estructura de Flunixin.

Las drogas antiinflamatorias no-esteroides (NSAID) son extensamente utilizadas en medicina veterinaria. Su principal efecto es la reducción en la síntesis de prostaglandinas, actuando, la mayoría de ellas, como inhibidores no selectivos de la enzima ciclooxigenasa (COX-1 y COX-2) que cataliza la formación de prostaglandinas y tromboxanos desde el ácido araquidónico. Estructuralmente presentan una gran variabilidad de manera que se clasifican por la selectividad en la inhibición de la ciclooxigenasa en inhibidores COX no selectivos e inhibidores COX-2 selectivos. Todos los NSAIDs son compuestos ácidos con un pKa en el rango de 3-5. El grupo ácido es esencial para la actividad inhibidora de la COX y para su inactivación principalmente como glucurónidos [22].

La flunixin (Ilustración 3) se utiliza en equinos para el tratamiento de lesiones inflamatorias del aparato locomotor, artritis y alivio del dolor [23-25]. Es un

medicamento prohibido en caballos de carrera en el momento de las competencias, por lo que está entre el grupo de sustancias analizadas en control de doping en el deporte. Las especificaciones actuales de la AORC (a partir de 2013) establecen los límites permitidos para esta sustancia por debajo de 50 ng/mL [26]. Puede ser detectada en forma libre o conjugada en forma de glucuronato. En algunos métodos reportados en la literatura se utilizan estrategias de tratamiento de la muestra con enzimas capaces de romper este enlace, de tal manera de determinar la droga libre.

Debido a su naturaleza polar, la fuente de electrospray es particularmente adecuada para su detección por espectrometría de masa, pudiendo ser detectados en modo positivo o negativo debido a la protonación o desprotonación del grupo ácido [27-29]. La fragmentación de flunixinina en modo positivo implica la pérdida de agua dando un ion m/z 279, subsecuente pérdida de grupo metilo dando un ion m/z 264 y m/z 239 por pérdida de monóxido de carbono o pérdida de fluoruro de hidrógeno dando el ion m/z 259 [23].

2. BETAMETASONA Y DEXAMETASONA

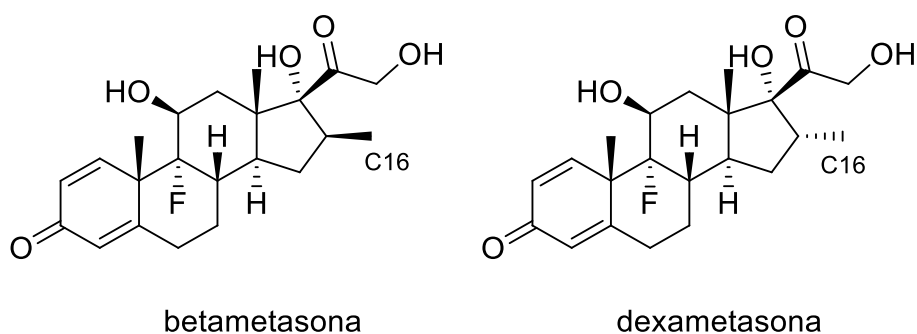


Ilustración 4. Estructura de Betametasona y Dexametasona. Betametasona orientación β del grupo metilo C16 y Dexametasona, orientación α del grupo metilo C16.

A fines de 1950 [30], los derivados sintéticos de cortisona, llamados corticoesteroides, eran utilizados para fines terapéuticos. Estos productos ingresaron rápidamente en el mundo de los deportes, principalmente por sus propiedades antiinflamatorias, encontrándose actualmente dentro del grupo de sustancias prohibidas.

Los corticoesteroides naturales, son hormonas secretadas por la corteza adrenal. Las propiedades antiinflamatorias que presentan los mismos han llevado a la síntesis de corticoesteroides artificiales más activos. Pueden ser divididos en dos grupos con respecto a su actividad; glucocorticoides (metabólico) o mineralocorticoides (regulación de electrolitos). Comúnmente los glucocorticoides son conocidos como productos antiinflamatorios muy potentes y también son utilizados en el tratamiento de síntomas crónicos de asma. Son frecuentemente utilizados por atletas en deportes debido a su capacidad para mejorar el rendimiento por sus efectos relacionados al metabolismo energético, euforia y supresión del dolor [31, 32]. Al mismo tiempo estos compuestos incrementan la ganancia de peso por retención de grasa y agua y tienen un efecto sinérgico cuando se combinan con moléculas como β -agonistas o esteroides anabólicos. Están prohibidos como promotores de crecimiento en ganado, pero algunos de ellos se encuentran autorizados para tratamientos terapéuticos estableciéndose niveles máximos de residuos en leche y músculo [9, 12].

La preparación de muestra para el screening de estos compuestos en orina humana usualmente se basa en la extracción en fase sólida, seguido de una hidrólisis enzimática y a veces una extracción adicional para una mejor purificación. Los métodos confirmatorios han estado basados en técnicas de cromatografía gaseosa, ocasionalmente acoplada con espectrometría de masa isotópica para poder distinguir ciertos corticoesteroides endógenos de los presentes por administración exógena. Algunas dificultades relacionadas al análisis de estos compuestos es su baja volatilidad y el ser térmicamente

lábil, siendo además el paso de derivatización previo al análisis por cromatografía gaseosa difícil de optimizar [33].

Dexametasona y Betametasona (Ilustración 4) son glucocorticoides epiméricos sintéticos, frecuentemente utilizados como drogas antipiréticas, antiinflamatorias y antialérgicas. También son ampliamente utilizadas como promotores del crecimiento en la producción de ganado y animales acuáticos. Sin embargo, estas hormonas pueden causar efectos adversos en la salud humana, incluida la hipertensión, obesidad, osteoporosis y otras enfermedades. En consecuencia, la Unión Europea y China han prohibido estas drogas como promotores de crecimiento y han establecido límites máximos para estos residuos. También se encuentran prohibidos por la WADA y AORC ya que pueden mejorar el rendimiento de los atletas [34, 35].

Si bien la única diferencia estructural de estos compuestos es la orientación del grupo metilo en C16, se producen diferencias reproducibles y distinguibles en su patrón de fragmentación de masa tándem, bajo determinadas condiciones experimentales. Podrían ser entonces, potencialmente identificados en base a su patrón de fragmentación único. Los iones comúnmente observados en la ionización en modo positivo son el m/z 373 (pérdida de HF), 355 (pérdida de HF y H₂O), 337 (pérdida de HF y 2 H₂O), 319 (pérdida de HF y 3 H₂O) y dos fragmentos pequeños 279 y 237 que contienen solo la estructura del núcleo esteroide. Las dos diferencias características entre los espectros son (1) la abundancia relativa del ion m/z 237 es mayor para la dexametasona que para la betametasona; (2) la intensidad del ion m/z 279 es mayor en la betametasona [36]. La posición axial del grupo metilo C16 en betametasona favorece la formación de un anillo de seis miembros permitiendo que el ion fragmento m/z 279 formado sea más estable en betametasona que en dexametasona [37, 38]. Además m/z 161 es característico de dexametasona y m/z 121 de betametasona [4, 31, 36, 39].

Los antecedentes en el procesamiento de muestra para estos analitos son variados, implicando en algunos casos la extracción líquido-líquido, extracción en fase sólida (SPE) o microondas con solventes orgánicos como tertbutil metil éter, dietiléter o acetato de etilo, trabajando a pH neutro o alcalino y en algunos casos con la utilización de tratamientos enzimáticos. Las separaciones cromatográficas de los isómeros fueron alcanzadas en columnas de HPLC de fase reversa. Las matrices de trabajo reportadas van desde leche bovina a orina humana [31, 34, 35, 40-46].

3. CLEMBUTEROL, SALBUTAMOL Y FENOTEROL

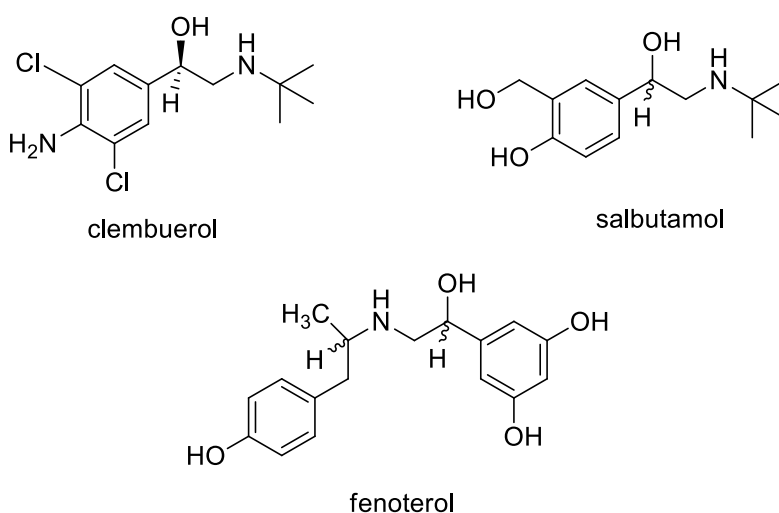


Ilustración 5. Estructura de Clembuterol, Salbutamol y Fenoterol.

El Fenoterol (Ilustración 5) pertenece al grupo de compuestos β -antagonistas o β -bloqueantes usados en el manejo de arritmias cardíacas y cardioprotección luego de infartos de miocardio o hipertensión. Al reducir la hipertensión y temblores, su uso se encuentra prohibido por la WADA. Tienen una estructura general de 1-alkilamino-3-fenoxipropan-2-ol, con el grupo alquilo siendo isopropil, tertbutil u otro. El comportamiento general en la fragmentación por

MS/MS en modo positivo implica la pérdida de agua y clivaje a los lados de la función amino con retención de carga en cualquiera de los lados. Esta retención de carga lleva a series de iones complementarios caracterizados por valores m/z de la forma $[M+H]^+ + 1$. Clivajes adicionales en el enlace éter pueden ser observados con la retención de la carga a nivel de la parte 1-(alquilamino)-propan-2-ol de la molécula. Puede haber además fragmentaciones específicas de cada compuesto a nivel de los sustituyentes del anillo aromático [28].

Los agonistas β -adrenérgicos son similares en estructura a los β -bloqueantes. Estas drogas pueden generar la relajación de los músculos bronquiales y son utilizadas para el tratamiento del asma y de enfermedades crónicas obstructivas pulmonares, siendo el clenbuterol (Ilustración 5) el más efectivo de su clase. La administración de clenbuterol y otras drogas de esta clase como salbutamol, produce un incremento de la capacidad aeróbica, presión sanguínea y transporte de oxígeno, estimulación del sistema nervioso central, incremento del músculo esquelético y disminución de la grasa corporal por sus propiedades anabólicas, razones por las cuales se encuentran dentro del grupo de sustancias prohibidas por la WADA y AORC. El nivel máximo permitido para clenbuterol se encuentra por debajo de 2 ng/mL y para salbutamol por debajo de 5 ng/mL en muestras de orina según AORC. La estructura general de estos compuestos es de 1-alquilamino-3-fenilpropan-2-ol, siendo el grupo alquilo predominantemente el tertbutil. La fragmentación del clenbuterol implica la pérdida de agua dando un ion m/z 259, subsecuente pérdida de C_4H_8 dando un ion m/z 203 y de Cl^\bullet y HCl dando los iones m/z 168 y 132, respectivamente. Esta fragmentación es en parte muy parecida a la de los bloqueadores β [28, 47-49].

El control de los β -agonistas recibió particular atención debido a casos de intoxicación por alimentos en 1990 en España (con hígado bovino) y en China en 2008-2009. Mientras que el tratamiento terapéutico de ganado con problemas respiratorios se encuentra permitido, su uso como promotores de crecimiento se encuentra regulado en la Unión Europea y Estados Unidos [9,

12]. A pesar de esto, hay países en los cuales no hay una regulación y en los que el consumo de carne podría llevar a la presencia de residuos de clenbuterol (principalmente) en muestras de orina humana. En noviembre de 2011 WADA advirtió a los atletas que había sido colectada suficiente información como para advertir riesgos de contaminación en algunos países. También en 2011 la FIFA detectó varios casos positivos para clenbuterol de atletas viviendo en México [49].

4. **SILDENAFIL**

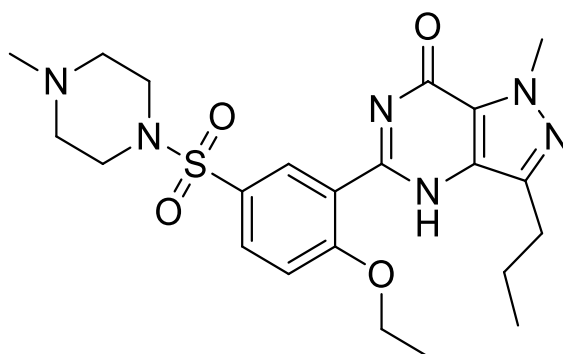


Ilustración 6. Estructura de Sildenafil.

El sildenafil (Ilustración 6) es un vasodilatador inhibidor-5-fosfodiesterasa (inhibidores PDE-5), que es utilizado principalmente para el tratamiento de la disfunción eréctil. Tanto el sildenafil como otros compuestos relacionados (vardenafil y tadalafil) son frecuentemente encontrados como adulterantes en las medicinas herbales naturales y suplementos dietarios. Los estudios farmacológicos indican que la interacción entre inhibidores PDE-5 y ciertas drogas que contienen nitratos, pueden disminuir drásticamente la presión sanguínea. Las medicinas con nitratos son usualmente consumidas por pacientes con diabetes y/o hipertensión, los cuales son pacientes blanco de consumo de medicina alternativa para el tratamiento de la disfunción eréctil [8,

50, 51]. En el caso del deporte equino, fue detectada por primera vez en el año 2003 en Malasia [8].

La fragmentación en modo positivo del sildenafil en cualquiera de los dos lados del grupo SO_2 (pérdida de ácido sulfínico 1-metilpiperazina) da un fragmento de m/z 311. La retención de la carga en la parte piperazina de la molécula genera fragmentos de carga m/z 99, 100 y 163. La pérdida del grupo C_2H_4 a partir del fragmento m/z 311 da lugar a un ion con m/z 283. La pérdida del grupo piperazina genera el ion fragmento m/z 377 que muestra una fragmentación secundaria con un rearrreglo en el grupo SO_2 , resultando en un ion fragmento m/z 329 y subsecuente pérdida de C_2H_6 a un ion fragmento m/z 299. La fragmentación secundaria en el anillo 1-metilpiperazina genera el ion m/z 58 [28, 52, 53].

C. DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS Y QUÍMICA VERDE

En 1987 la Comisión de Medio Ambiente y Desarrollo de Naciones Unidas elaboró el informe Brundtland ("Nuestro Futuro Común"), donde se definió el concepto de Desarrollo Sostenible: satisfacer las necesidades del presente sin comprometer la capacidad de las generaciones futuras para desarrollarse. En 1990 se aprueban la Ley de Prevención de la Contaminación en Estados Unidos y de Ecoeficiencia por el Consejo Mundial para el Desarrollo Sustentable. En 1991, la OPPT (*Office of Pollution Prevention and Toxics*, EPA) puso en marcha el programa modelo de subvenciones a la investigación "Rutas Sintéticas Alternativas para la Prevención de la Contaminación". Así apareció la Química Verde, cuyo objetivo principal es reducir los problemas medioambientales generados por la producción química atacando el problema de raíz: utilizando procesos químicos que no produzcan residuos [54]. La química verde es una nueva perspectiva en la forma de hacer química y está llamada a ser incorporada a todas las ramas de la química. En su libro *Green Chemistry: Theory and Practice*, Paul Anastas y John Warner [1] enunciaron 12 principios que definen la Química verde:

- (1) Prevenir la creación de residuos
- (2) Diseñar productos y compuestos seguros
- (3) Diseñar síntesis químicas menos peligrosas
- (4) Usar materias primas renovables
- (5) Usar catalizadores
- (6) Evitar derivados químicos
- (7) Maximizar la economía atómica
- (8) Usar disolvente y condiciones de reacciones seguras

(9) Incrementar la eficiencia energética (reacciones a temperatura y presión ambientes)

(10) Diseñar productos biodegradables

(11) Analizar en tiempo real los procesos químicos para evitar la contaminación

(12) Minimizar los riesgos de accidentes

La emergencia de la química verde impacta a la química analítica no solo como herramienta de control de los procesos de síntesis industrial (principio 11), sino que también llama a minimizar el impacto ambiental de los métodos analíticos en sí mismos. En particular los métodos de análisis de trazas suelen ser intensivos en el uso de disolventes y generar una importante masa de residuos por análisis realizado. Si se considera el continuo aumento en el número de análisis requeridos entre otros, para control de doping, se aprecia que es relevante buscar estrategias analíticas que sin comprometer la precisión, exactitud y especificidad, disminuyan el impacto ambiental de la técnica.

En este último tiempo ha habido un interés creciente en el desarrollo de métodos analíticos o bioanalíticos verdes, a través de una selección de componentes orgánicos de la fase móvil (ej. reemplazo de acetonitrilo por etanol), elección de los procesos de extracción (ej. microextracción en fase sólida), reducción del tamaño de muestra (ej. *dried blood spot*), apuntando a la reducción en la generación de residuos, siendo la cromatografía de fluidos supercríticos y UHPLC de las mayores contribuciones a la química verde bioanalítica [55-57].

De manera general podemos decir que el impacto ambiental de las metodologías analíticas puede ser reducido en tres maneras diferentes: 1- la reducción en las cantidades de solventes requeridos en el tratamiento de muestra. 2- reducción en la cantidad y toxicidad de solventes y reactivos utilizados en la etapa de medida, especialmente mediante la automatización y

miniaturización. 3- desarrollo de metodologías analíticas directas alternativas que no requieren solventes ni reactivos.

1. TENDENCIAS EN LA PREPARACIÓN DE MUESTRA

El avance de la espectrometría de masa como método de detección en análisis regulatorios ha tenido consecuencias importantes en el trabajo analítico, incluida la preparación de muestra. Por un lado, fueron formulados requerimientos nuevos y más exigentes por las agencias regulatorias. Por otro lado, debido a la alta sensibilidad y selectividad de la espectrometría de masa en combinaciones como GC-MS/MS y LC-MS/MS, la preparación de muestra puede ser simplificada y miniaturizada.

Las técnicas que eliminan o reducen la cantidad de solvente consumido en la preparación de muestra han sido desarrolladas en los últimos años. Sin embargo, la implementación en los laboratorios no siempre es directa y frecuentemente es obstaculizada por directivas regulatorias y el consumo de tiempo en la (re)validación de los métodos. La implementación de estos nuevos desarrollos en los laboratorios de análisis de rutina, es un paso importante en la química analítica verde [2].

La preparación de muestra tiende hacia la utilización de menores tamaños de muestra, métodos de extracción con mayor especificidad o selectividad, reducción o eliminación de solventes orgánicos. En esta línea, la extracción líquido-líquido convencional, está siendo desplazada por técnicas basadas en sorbentes, que tienen su mayor ventaja en la gran variedad de sorbentes para distintas aplicaciones. La necesidad de manejar menores volúmenes de muestra, llevó al desarrollo de configuraciones de extracción en fase sólida (SPE) con menor masa de sorbente empaquetado.

Desde la década de los 80' han evolucionado métodos para tratamiento de muestra, y en particular, la miniaturización de los métodos de extracción ha sido extensamente investigada. Luego de la introducción de *solid-phase microextraction* (SPME) [58] le siguieron el desarrollo de varias técnicas como *liquid-phase microextraction* (LPME) [59] en sus dos modalidades que son *single-drop microextraction* (SDME) [60, 61] y *liquid-liquid-liquid microextraction* (LLLME); *dispersive liquid-liquid microextraction* (DLLME) [62], que ofrece altos factores de concentración para analitos en muestras acuosas; *microwave-assisted extraction* (MAE) [46, 63], que es eficiente y rápido desde el punto de vista energético para la digestión de muestras; *supercritical fluid extraction* (SFE) [64] para la extracción a partir de muestras sólidas; *pressurized fluid extraction* (PFE) permite una mejor penetración del solvente en la muestra logrando una alta eficiencia de extracción con menores volúmenes de solvente y menores tiempos de extracción; *stir-bar sorptive extraction*, donde la fase de extracción se encuentra recubriendo una barra magnética (SBSE) [65]. A esto debe sumarse el desarrollo de superficies modificadas para hacer más selectivas las extracciones a partir de diferentes matrices [66-68].

2. ESTRATEGIAS VERDES PARA PREPARACIÓN DE MUESTRA

a. MÉTODOS *SOLVENT-FREE*

Los métodos analíticos directos cumplen con el requerimiento básico de la química analítica verde que es el de minimizar el impacto ambiental, mediante la disminución de la generación de residuos y el uso de solventes, reactivos y energía en la preparación de muestra. Al minimizar el procesamiento se evita la contaminación de la muestra, pérdida de componentes volátiles y disminuyen los riesgos asociados con el manejo de químicos peligrosos, además de ser métodos simples y rápidos. En cromatografía líquida se hace referencia a estos

métodos incluso cuando solo se realizan pasos de dilución y filtrado de las muestras, de manera de proteger la columna cromatográfica de la contaminación y prolongar su uso.

En este campo se ha reportado, por ejemplo, la determinación de herbicidas y grasas en residuos de agua [69]. Para el caso de matrices complejas, el efecto matriz debe ser correctamente caracterizado. Hay reportados trabajos en orina equina con identificación y cuantificación de diferentes drogas como ácido salicílico [40, 70-73].

b. NANO Y MICROFIBRAS COMO SORBENTES PARA SPE

El advenimiento de la nanotecnología posibilita nuevas clases de materiales que pueden ser aplicados en SPE. Debido a una gran área superficial específica, estos materiales permiten la utilización de una masa de sorbente reducida para alcanzar altas eficiencias de extracción y así facilitan la miniaturización de la SPE [74].

El uso de fibras con diámetro de escala micro o nano permite un incremento en el área superficial específica, comparado con las micropartículas actualmente disponibles en sorbentes de SPE, haciendo posible una reducción en la masa del lecho del sorbente y la aplicación de flujos más rápidos y eficientes a través de la fase sólida. Otro factor importante en la eficiencia de una SPE es la forma de empaquetado (disco o cartucho) de la fase sólida. Los discos presentan una mayor área superficial por unidad de masa respecto de los cartuchos y su mayor área transversal permite mayores flujos de muestra.

La interacción efectiva de un analito con un número determinado de finas nanofibras puede reducir enormemente el volumen de la fase sólida y del solvente de desorción. Muchas aplicaciones recientes nos revelan que las nanofibras tienen gran potencial analítico como sorbentes efectivos para la

extracción en fase sólida de drogas en fluidos biológicos [75] debido a la gran área superficial de las mismas que facilita la captura de las moléculas de interés. Así, una menor cantidad de fase sólida es suficiente para la extracción, el volumen de solvente de elución puede ser reducido enormemente y el paso de evaporación podría incluso ser evitado debido a que el método de preparación de muestra deja a los analitos en un volumen lo suficientemente pequeño de solvente, que puede ser directamente inyectado en un instrumento analítico [76, 77].

i. FABRICACIÓN DE NANO Y MICROFIBRAS

Las nanofibras poliméricas pueden ser producidas por varias técnicas como *Drawing*, *Template Synthesis*, *Phase Separation*, *Self-Assembly* y *Electrospinning*, (Tabla 4). Introducido en 1930 [78], el *electrospinning* se ha convertido actualmente en una técnica simple, versátil y útil para la fabricación de nanofibras a partir de una gran variedad de materiales. Típicamente, un alto voltaje es aplicado a una aguja metálica que se encuentra conectada a un reservorio conteniendo una solución de polímero con viscosidad, conductividad y tensión superficial adecuada. El voltaje aplicado debe ser tal que permita sobrepasar la tensión superficial de la solución del polímero, permitiendo la formación de finos hilos que son eyectados por el campo. La hebra simple formada inicialmente es dividida en múltiples filamentos mediante repulsiones de carga radiales, un proceso conocido como *splaying*, que da lugar a la formación de fibras solidificadas (Ilustración 7). Mediante la regulación de los parámetros del proceso y la composición del polímero, el *electrospinning* puede ser ajustado para controlar las propiedades físicas, químicas y morfológicas de las fibras (diámetro, forma, porosidad). Las fibras producidas por esta técnica tienen una gran área superficial, fuerza mecánica y flexibilidad [78]. La morfología de la superficie de las fibras generadas, está gobernada por varios parámetros que incluyen el voltaje aplicado, velocidad de eyección de la solución, diagrama de fases y propiedades de la solución de polímero como la

viscoelasticidad, temperatura y la competencia entre la tasa de separación de fases y la evaporación del solvente [79].

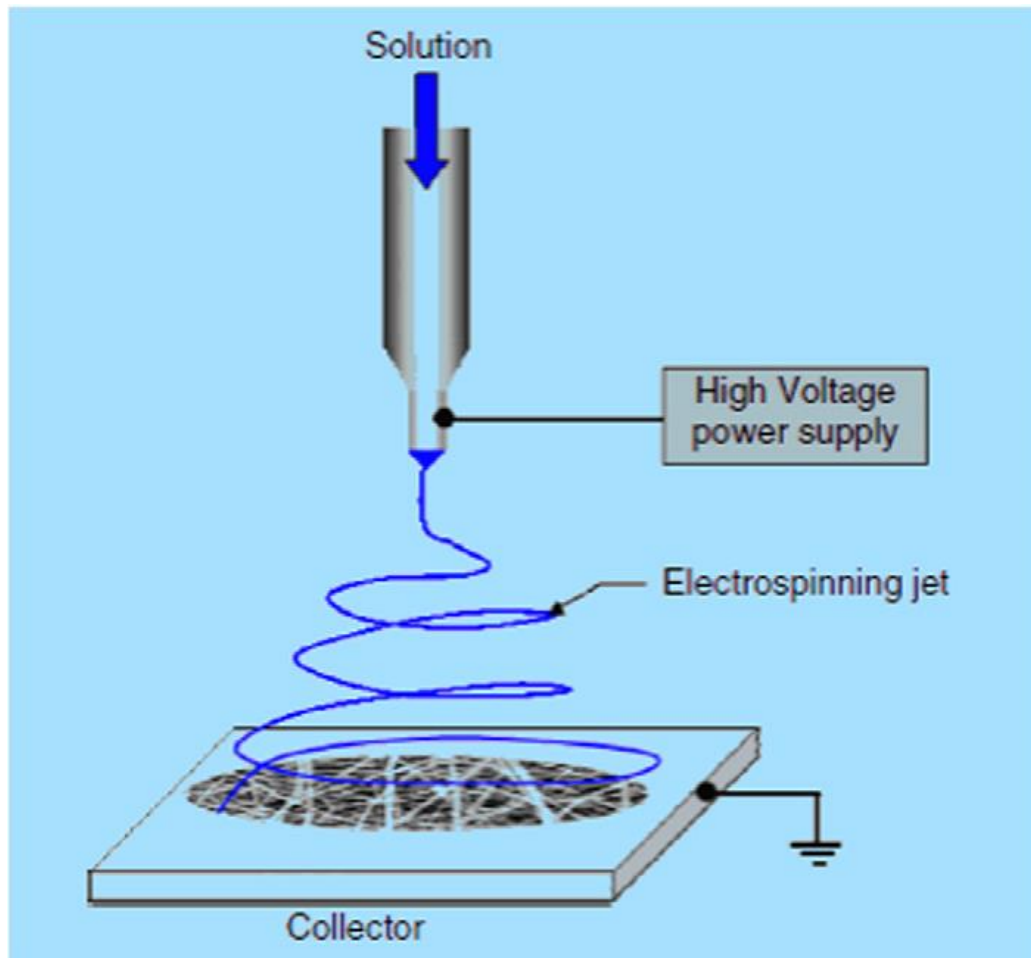


Ilustración 7. Esquema de los componentes básicos para electrospinning [75].

Mediante la variación de la arquitectura del polímero y los parámetros de procesamiento, también se pueden generar fibras con superficies porosas (mediante el control de la humedad durante el *electrospinning*, combinado con el uso de solventes volátiles) para mejorar la relación superficie-volumen, además de ser beneficioso en aplicaciones como catálisis, filtración, absorción, células solares, baterías, liberación de drogas e ingeniería de tejidos. La mayoría de los polímeros con peso molecular lo suficientemente elevado

pueden generar fibras con superficies funcionalizadas acorde a las características de las muestras, lo cual tiene no solo un efecto positivo en la eficiencia de la extracción sino también en la selectividad de SPE. Debido a su diámetro de nanoescala, alta relación superficie-volumen, configuración controlada de la superficie y variada composición, las nanofibras producidas por *electrospinning* se anticipa que serán uno de los mejores materiales de SPE, que podrán resolver problemas de los materiales de SPE comerciales como su baja selectividad y sensibilidad, proceso complejo y alto costo [77, 80-84].

Para la utilización de la técnica de electrospinning hay que tener en cuenta algunas consideraciones como son, tener el solvente adecuado que permita la dilución del polímero, que la presión de vapor del mismo sea la adecuada de manera que se evapore rápidamente para que la fibra mantenga su identidad cuando alcanza el blanco pero no demasiado rápido para que la fibra no solidifique antes de alcanzar el rango nanométrico. La viscosidad y la tensión superficial del solvente nunca deben ser muy grandes como para impedir la formación de los "hilos de solución" ni demasiado pequeñas para permitir que la solución de polímero gotee libremente de la pipeta. La corriente debe ser adecuada para sobrepasar la viscosidad y la tensión superficial de la solución del polímero. La distancia entre la pipeta y la superficie no debe ser muy pequeña como para crear chispas entre los electrodos pero debe ser suficiente como para que el solvente se evapore a tiempo para que se formen las fibras. Cualquier cambio menor en los parámetros de *electrospinning* como pequeñas variaciones en la solución de polímero y/o parámetros experimentales pueden resultar en variaciones significativas en la morfología final de las fibras. Además no es siempre fácil obtener fibras reproducibles para las condiciones de *electrospinning* optimizadas, por ejemplo por cambios en la conductividad de diferentes lotes de solventes [85-89].

El poliestireno (PS) amorfo es un material transparente y rígido, con una alta resistencia eléctrica y baja pérdida dieléctrica. Las fibras de PS generadas por

electrospinning tienen aplicaciones interesantes en áreas como la ingeniería de tejidos, filtración, intercambio de iones, inmovilización de enzimas, sensores, inmovilización de catálisis, etc. [78].

Tabla 4. Comparación de las diferentes técnicas para la producción de fibras poliméricas.

PROCESO	¿EL PROCESO PUEDE SER ESCALADO?	REPETITIVIDAD	CONTROL DE LAS DIMENSIONES DE LAS FIBRAS
DRAWING	X	√	X
TEMPLATE SYNTHESIS	X	√	√
PHASE SEPARATION	X	√	X
SELF-ASSEMBLY	X	√	X
ELECTROSPINNING	Con potencial para procesos industriales	√	√

ii. CARACTERIZACIÓN DE SISTEMAS SPE

En la selección del sistema de extracción es muy importante el conocimiento de las potenciales interacciones entre los compuestos aislados, el sorbente y solventes de elución, que afectarán la eficiencia de la extracción. Las características físicas de los sorbentes así como su capacidad, el volumen de muestra cargado, la naturaleza y volumen de los solventes de acondicionamiento y elución, también son importantes en la caracterización del sistema. Algunos de los parámetros críticos de SPE son: El volumen de corte (*Breakthrough volume*, V_B), volumen de lavado, volumen de elución, que dependen de las propiedades cinéticas del lecho de SPE, el volumen de retención (V_R) y el factor de retención [90].

El volumen de corte (V_B) es el volumen de muestra que puede ser cargado en el lecho del sorbente sin la pérdida de analito; el máximo volumen de muestra que puede ser aplicado con una recuperación teórica de 100%. Depende de

parámetros cinéticos del sorbente y de los parámetros de retención (número de platos teóricos) así como del flujo de la muestra, concentración del analito en la solución cargada y temperatura de trabajo. Los experimentos de SPE muestran que hay un flujo óptimo en el cual el V_B alcanza valores máximos. El mismo puede ser determinado experimentalmente de varias maneras, utilizando métodos *on-line* u *off-line*, incluyendo cromatografía frontal o de elución. En la cromatografía frontal un soluto es aplicado continuamente a la columna hasta que alguno de los analitos comienza a aparecer en el efluente de la columna, el V_B ocurre cuando la capacidad del sorbente se ha alcanzado. La dependencia entre la concentración de analito en el efluente y el volumen de la muestra pasado a través del sorbente da las curvas de volumen de corte. Bajo condiciones ideales la misma tiene una forma bilogarítmica y los parámetros cromatográficos pueden ser determinados a partir de la curva, donde el punto de inflexión corresponde al volumen de retención del analito y V_B se define como el volumen de fase móvil que corresponde al 1% de la máxima concentración del analito en el efluente [90].

C. DISOLVENTES ALTERNATIVOS

El 2-metiltetrahidrofurano (2-MeTHF) es un éter heterocíclico (anillo de 5 miembros con un átomo de oxígeno) con un grupo metilo en posición alfa que se presenta como líquido incoloro. Puede ser fácilmente obtenido a partir de una gran variedad de subproductos agrícolas como caña de azúcar o mazorcas de maíz. Mediante una reacción de ciclodeshidratación de pentosas se obtienen furfural y luego mediante hidrogenación de furfural se obtiene el 2-MeTHF (Ilustración 8). Se utilizan como precursores principales en la síntesis, el 2-furaldehído y furfural (provenientes de celulosa, hemicelulosa y lignina por deshidratación de pentosas) o el ácido levulínico (tratamiento ácido de hexosas derivadas de azúcares presentes en el almidón o en el material lignocelulósico, o partiendo de pentosas o de residuos provenientes de la industria papelera).

Las principales aplicaciones del 2-MeTHF han sido como solvente polar en reacciones organometálicas, bifásicas, biotransformaciones, siendo una alternativa sostenible a otros disolventes convencionales como tetrahidrofurano, dietiléter o diclorometano. Un gran número de industrias también han comenzado a utilizarlo en procedimientos sintéticos. Como la mayoría de los éteres que actúan como disolventes, el 2-MeTHF tiende a formar peróxidos explosivos en presencia de oxígeno, por lo cual se comercializa con BHT como estabilizante [91, 92].

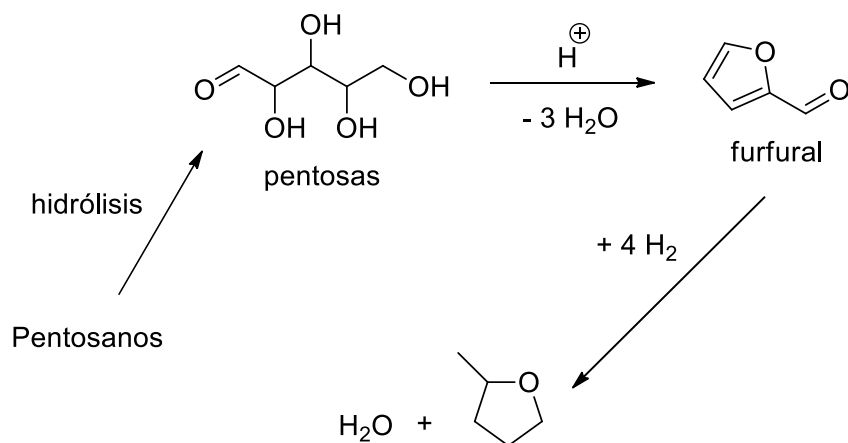


Ilustración 8. Síntesis de 2-metiltetrahidrofurano. 1- Hidrogenación de furfural para obtener 2-metilfurano que se purifica por destilación. 2- Hidrogenación para dar lugar a 2-MeTHF que se destila para obtener el producto puro. <http://es.wikipedia.org/wiki/2-Metiltetrahidrofurano>

El ciclopentil metil éter (CPME) se genera por metilación a partir de ciclopentanol o por reacción de adición de metanol al ciclopenteno, que es la ruta más sustentable debido a que no hay generación de subproductos (Ilustración 9). De acuerdo a investigaciones recientes el CPME presenta una toxicidad subcrónica, irritación moderada a severa en ojos y piel y mutagénesis, genotoxicidad y sensibilidad cutánea negativas [93]. Se encuentra disponible en cantidades comerciales desde noviembre de 2005. Algunas de las características físicas ventajosas respecto de otros éteres son el bajo nivel de

formación de peróxidos, alta hidrofobicidad, estabilidad relativa bajo condiciones ácidas y básicas y baja solubilidad de sales; estas características, entre otras, lo hacen adecuado para su utilización como disolvente de reacción, cristalización y extracciones. Se ha reportado su uso con reactivos organometálicos, reacciones catalíticas, enantioselectivas o como disolvente en procesos de producción farmacéutica [94-96] y como solvente para deshidratación selectiva de xilosa a furfural [97].

La Tabla 5 muestra una comparación de las principales propiedades físicas de estos dos nuevos solventes con dietiléter que es el disolvente de referencia utilizado en las extracciones líquido-líquido en nuestro laboratorio.

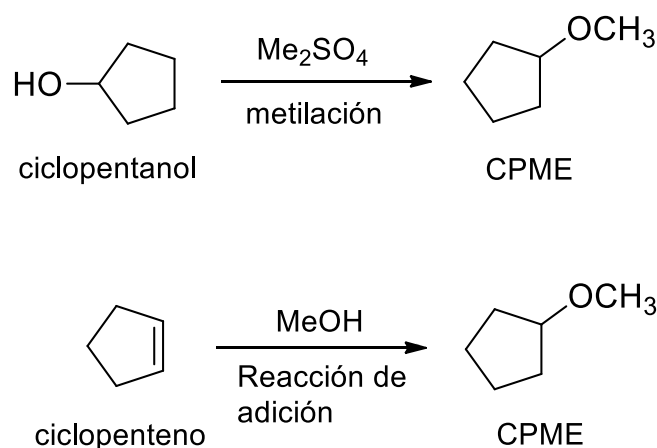


Ilustración 9. Síntesis de ciclopentil metil éter [94].

Tabla 5. Comparación de propiedades físicas de dietiléter (Et_2O) con CPME y 2-MeTHF [94].

	Et₂O	CPME	2-MeTHF
Densidad (20°C) (g/cm³)	0.71	0.86	0.85
Pto. Ebullición	34.6	106	80
Tensión Superficial (20°C)(mN/m)	17.3	25.17	---
Solubilidad en agua (g/100g)	6.5	1.1 (23°C)	14
Solubilidad de agua en el solvente (g/100g)	1.2	0.3 (23°C)	4.4

Generalmente estos solventes se han utilizado como sustitutos de tetrahidrofurano, diclorometano, dietiléter, 1,2-dimetoxietano y dioxano, que son solventes con desventajas como bajos punto de ebullición, formación de peróxidos, solubilidad en agua; y de metiltertbutil éter que presenta baja solubilidad, bajo *flash point* e inestabilidad bajo condiciones ácidas [94].

3. ESTRATEGIAS PARA CROMATOGRAFÍA "VERDE"

En cuanto a los métodos cromatográficos, la reducción del diámetro interno y utilización de columnas más cortas y con menor tamaño de partícula, pueden lograr un ahorro de hasta un 90% de consumo de solvente. También se puede recurrir a la utilización de flujos menores en columnas más eficientes. La eficiencia de la columna (N) es dependiente del largo de la columna y el tamaño de partícula. La disminución del diámetro interno, sin embargo, puede generar un incremento en la sensibilidad, esto como consecuencia directa de la reducción de la dilución de los solutos en la fase móvil y las bandas más concentradas que llegan al detector. Este incremento en la sensibilidad se aprecia en detectores de UV, fluorescencia e ionización por electrospray.

En cuanto a solventes cromatográficos, tanto el agua como acetona y etanol pueden ser considerados ambientalmente amigables. El acetonitrilo es hoy en día el solvente más utilizado en cromatografía líquida por sus propiedades como la de disolución de un gran número de solutos, baja acidez, mínima reactividad química, bajo *cut-off* para UV y compatibilidad con detectores de masa [2].

D. DETECCIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASA TÁNDEM

La detección de analitos por espectrometría de masa tándem es una de las técnicas más utilizadas para el análisis de trazas en matrices complejas. Dado que se utilizan dos o más pasos de espectrometría de masa secuenciales, la detección de una sustancia es altamente específica.

La espectrometría de masa tándem puede realizarse mediante dos configuraciones de instrumentos: los que permiten realizar experimentos tándem en el tiempo (trampa de iones) y los que permiten realizar experimentos tándem en el espacio (cuadropolos triples e instrumentos híbridos).

1. ACOPLAMIENTO HPLC-MS

Los sistemas de cromatografía líquida pueden acoplarse a detectores de espectrometría de masa mediante interfases que permiten la ionización de las moléculas a presión atmosférica (API), tanto mediante el proceso de electrospray (ESI) como de ionización química a presión atmosférica (APCI).

Los principales componentes de esta interfase son la cámara de spray y la región de transporte y enfocado de iones (*skimmer*, octapolos y lentes). Mientras la cámara de spray está a presión atmosférica, los componentes de transporte y enfocado de iones se encuentran localizados dentro de la región de vacío (Ilustración 10). Hay cuatro zonas de vacío distintas establecidas por las bombas del instrumento que crean un flujo desde la zona a presión atmosférica hacia el interior del espectrómetro de masa y aseguran la transmisión y detección eficiente de iones. [98].

a. PROCESO DE IONIZACIÓN POR ELECTROSPRAY (ESI-API)

El proceso de ionización por electrospray puede ser resumido en cuatro pasos; (1) Formación de iones (2) Nebulización (3) Desolvatación (4) Evaporación de iones, Ilustración 10.

i. FORMACIÓN DE IONES

La formación de iones en ESI puede ocurrir por más de un mecanismo. Si la química de los analitos, solventes y buffers son las adecuadas, los iones pueden ser generados en solución incluso antes de la nebulización. Aunque tener los iones preformados en solución no es indispensable para el proceso, para aquellos analitos que se ionizan en solución, ESI generalmente es simple y altamente sensible tanto para iones positivos como negativos. Estos iones son fácilmente evaporados de las gotas y presentan alta abundancia. Las moléculas que no se disocian fácilmente o que no se protonan en presencia de campos eléctricos fuertes pueden a veces ser ionizadas a través de la formación de aductos [98].

ii. NEBULIZACIÓN

La solución compuesta por muestra y solvente es introducida en la cámara de spray a través de una bomba de jeringa o un cromatógrafo líquido, pasando por una fina aguja metálica. La aguja reside en el interior de un tubo concéntrico que adiciona gas nebulizador (usualmente nitrógeno a una temperatura entre 120° C y 365° C y un flujo entre 1 a 12 L/min) al flujo de muestra. Un electrodo ("endplate") en forma de disco de metal pulido con un voltaje alto se encuentra alrededor de la entrada del capilar de vidrio y ayuda en la generación del gradiente electrostático en la cámara de spray. El gradiente electrostático de alto voltaje dentro de la cámara junto con la fuerza generada por el gas nebulizador favorece la formación de gotas e iones. Como resultado, la muestra es simultáneamente cargada y dispersada en un fino spray. Las gotas cargadas

contienen analito, solvente e iones tanto positivos como negativos. El tipo de iones formados dependerá de la composición de la solución [98].

iii. DESOLVATACIÓN

El solvente debe ser removido para la generación de iones. Un flujo a contra corriente de gas de secado neutro y caliente, típicamente nitrógeno, evapora el solvente, disminuyendo el diámetro de la gota y forzando a los iones de igual carga a acercarse. Cuando la fuerza de la repulsión coulombica iguala la tensión superficial de la gota (Límite de Rayleigh), ésta explota produciendo gotas más pequeñas cargadas que se encuentran expuestas a otro ciclo de evaporación. A medida que el proceso se repite se van generando gotas con una densidad superficie-carga mayor. Cuando esta densidad de carga alcanza aproximadamente 108 V/cm^3 , ocurre la evaporación de los iones. La elección de solvente y buffers es una fundamental para la ionización satisfactoria por electrospray. Los solventes como metanol tienen baja capacidad calórica, tensión superficial y constante dieléctrica, lo que promueve la nebulización y desolvatación. La desolvatación requiere un gran consumo de energía y esto permite que la temperatura de las gotas y de los analitos permanezca baja de manera que la ionización por ESI no descompone térmicamente a la mayoría de los analitos. [98].

iv. EVAPORACIÓN DE IONES

Existen diferentes opiniones en cuanto al proceso físico específico. Según el modelo aceptado por Fenn (1989) [99] y descrito por Iribiarne y Thomson (1976) [100], los iones son emitidos directamente desde las gotas cargadas a la fase gaseosa. A medida que el solvente se evapora de las gotas en presencia de un campo eléctrico fuerte, la superficie de la gota se vuelve fuertemente cargada. Cuando el campo creado por los iones en la superficie de la gota excede la tensión superficial, los iones del analito son emitidos directamente desde la gota. La energía de hidratación de una muestra en un solvente dicta la

facilidad de desorción de los iones hacia la fase gaseosa. En general, cuanto menor es la hidratación (mas hidrofóbico) de una muestra en un solvente (pero aun siendo soluble en el mismo), mejor pueden ser desorbidos los iones a la fase gaseosa. El gradiente electrostático y la diferencia de presión guían a los iones hacia el capilar de vidrio. La optimización en la generación del spray incluye la variación en el gradiente de voltaje electrostático, la temperatura, el flujo del gas de secado y la presión del gas nebulizador. La mayor parte del solvente es sacado de la cámara de spray y nunca llega al interior del capilar debido al diseño ortogonal del flujo rociador [98].

v. ANÁLISIS DE IONES POSITIVOS

Se utiliza para el análisis de analitos con características básicas. Las moléculas de la muestra toman protones del solvente más ácido. Las soluciones que contienen ácidos débiles como fórmico, acético o ácido propiónico, generalmente funcionan mejor que los ácidos fuertes ya que los aniones ácidos se acoplan con los cationes de los analitos, reduciendo la abundancia de los mismos. Los analitos que presentan sitios básicos como ser nitrógenos básicos, usualmente muestran alta sensibilidad en soluciones levemente ácidas [98].

vi. ANÁLISIS DE IONES NEGATIVOS

Los analitos con carácter más ácido son analizados generalmente bajo este modo. Las moléculas de la muestra ceden los protones a una base en solución, de manera que para tener una alta sensibilidad en el análisis en modo negativo, es importante tener una base en solución. El amonio y otras bases volátiles funcionan bien y aquellos analitos con grupos funcionales que se desprotonan fácilmente, como los ácidos carboxílicos, muestran buena sensibilidad. El intercambio de carga es otro mecanismo que puede ocurrir en modo negativo y resulta en iones tipo $[M]^-$. Generalmente en ESI este modo de ionización es menos sensible que el positivo [98], aunque por otro lado la relación S/R es alta ya que suele presentar menor ruido químico.

2. ESPECTROMETRÍA DE MASA TÁNDEM EN EL TIEMPO

La instrumentos del tipo trampa de iones permiten realizar experimentos tándem en el tiempo, tanto en el modo MS-MS (MS^2) como en el modo MS^n .

a. TRANSPORTE Y ENFOCADO DE IONES EN EL ANALIZADOR DE TRAMPA DE IONES

Un diagrama típico de un instrumento trampa de iones se muestra en la Ilustración 10. El capilar tiene dos funciones principales, (1) un orificio de muestra que transfiere iones de la cámara de spray a la región de vacío del espectrómetro de masa (2) actúa como una barrera de separación entre la región de presión atmosférica y la región de vacío. En el modo de iones positivos la entrada al capilar se encuentra entre -2kV y -6kV relativo a la aguja. El gradiente electrostático creado por los voltajes en el interior de la cámara apoya la producción de gotas cargadas y las ayuda a migrar hacia la entrada del capilar. Una vez cerca de la entrada, los iones del analito son empujados a través del capilar por el gradiente de presión entre la cámara de spray y el primer estadio de bombeo. La salida del capilar se encuentra típicamente en un rango de 80 a 280 V. A medida que los iones salen del capilar, son llevados electrostáticamente a través del primer lente (*skimmer*) que se encuentra a menor voltaje. Debido a las dimensiones del capilar y al gradiente de presión, los iones emergen del final del capilar en un flujo de chorro subsónico [98].

El *skimmer* remueve la mayor parte del gas de secado y los iones pasan hacia un octapolo que los enfoca y transporta desde una posición de presión relativamente alta directamente detrás del *skimmer* hacia los lentes de enfoque y salida uniendo la región de transporte de iones con la trampa de iones. Estos componentes ayudan en la concentración y enfocado. Los voltajes establecidos para estos componentes ópticos determinan la eficiencia de transporte de iones así como el nivel de *background* [98].

b. CAPTURA Y ACUMULACIÓN DE IONES EN ANALIZADOR DE TRAMPA DE IONES

La trampa de iones consiste en un electrodo en forma de anillo entre dos electrodos a modo de tapas que presentan agujeros en el centro, lo que permite el pasaje de iones hacia adentro y hacia fuera de la trampa. La forma de la superficie interna de estos tres electrodos sigue un perfil tridimensional casi hiperbólico. Un potencial de voltaje de radio frecuencia (RF) alto se aplica al anillo mientras que las tapas se encuentran a tierra. La diferencia de potencial establecida entre el anillo y las tapas forman un campo cuadrupolar que, dependiendo del nivel del voltaje RF, puede atrapar iones de un rango de masa específico (Ilustración 10) [98].

Para asegurarse que la nube de iones esté comprimida en un pequeño lugar en el centro de la trampa, los iones son acumulados y enfriados mediante colisiones con gas helio. Este mecanismo permite evitar la pérdida de iones por colisiones con los electrodos e incrementa la resolución porque todos los iones permanecen en un espacio pequeño, en el centro de la trampa, donde la imperfección del campo es mínima. Sin la utilización de este gas, los iones tienden a incrementar el radio del movimiento debido a las repulsiones electrostáticas de partículas igualmente cargadas. Algunos parámetros adicionales que afectan la eficiencia de captura incluyen la energía del haz de iones que ingresa, el valor de m/z del ion, el valor del campo cuadrupolar y la fase actual del voltaje RF para cualquier ion particular en el punto de inyección [98].

Debido a que la trampa actúa como dispositivo de almacenamiento, es posible acumular señales débiles durante un periodo de tiempo, pudiendo incrementarse hasta 1 s para analitos traza. Cuando la señal del ion es fuerte el tiempo de acumulación puede ser tan corto como 10 μ s. Para una buena resolución y exactitud el número de iones en la trampa debe ser controlado, ya que existen límites espaciales de carga dentro de la misma. Estos se alcanzan cuando se acumulan demasiados iones en la trampa y el movimiento armónico

de los iones comienza a verse afectado produciendo el ensanchamiento de los picos y el corrimiento de la escala de m/z .

Una vez que los iones son acumulados, pueden ser sujetos al aislamiento de iones precursores, *collision induced dissociation* (CID) o análisis de masa.

En el instrumento disponible en el laboratorio (Esquire 6000), el detector utilizado en el sistema está basado en un dinodo de conversión que permite una detección de alta sensibilidad tanto de iones positivos como negativos [98].

C. FRAGMENTACIÓN EN LA TRAMPA DE IONES

Para la inducción de la fragmentación, la energía del ion de interés es incrementada mediante excitación por resonancia. La excitación comprende una pequeña frecuencia por encima y por debajo de la frecuencia de resonancia propia de ion. Los iones precursores resonantes comienzan a colisionar con el helio presente en la trampa lo que genera que los mismos se disocien creando espectros de masa predecibles y reproducibles. El tiempo del proceso de excitación y la colisión inducida por disociación es de alrededor de 20-60 ms. En masa tándem (MSn) en la trampa de iones, solo los iones precursores son activados por varias colisiones con el gas presente en el *background* pero luego de la fragmentación un poco de energía permanece en los iones fragmento lo cual puede resultar en la fragmentación subsecuente. Con la trampa actuando como reservorio, se puede dar paso a la generación de un espectro de masa en full scan o realizar una nueva secuencia de aislamiento y fragmentación, lo que hace de la trampa de iones una poderosa herramienta para la elucidación estructural. Los experimentos de fragmentación en instrumentos como la trampa de iones se denominan masa tándem en el tiempo, para diferenciarlo de aquellos instrumentos en los cuales la fragmentación se produce en diferentes regiones espaciales (masa tándem en el espacio). La optimización de un experimento de MSn en la trampa de iones implican el manejo de variables

como: ancho de la ventana de aislamiento, amplitud del voltaje y el tiempo de la fragmentación [98].

En la práctica, la característica de la trampa de iones de acumular iones para luego analizarlos y la necesidad de limitar el número de iones presentes en la misma debido a los efectos espaciales de las cargas, lleva a ciertas limitaciones inherentes que hacen que no sea adecuada su utilización en análisis cuantitativo de trazas debido a su incapacidad de alcanzar altos niveles de precisión y exactitud. Los tiempos de acumulación de iones varían a lo largo del pico cromatográfico a medida que la proporción de iones derivados del analito (relación analito:matriz) incrementa o disminuye dando una precisión pobre en la integración [101].

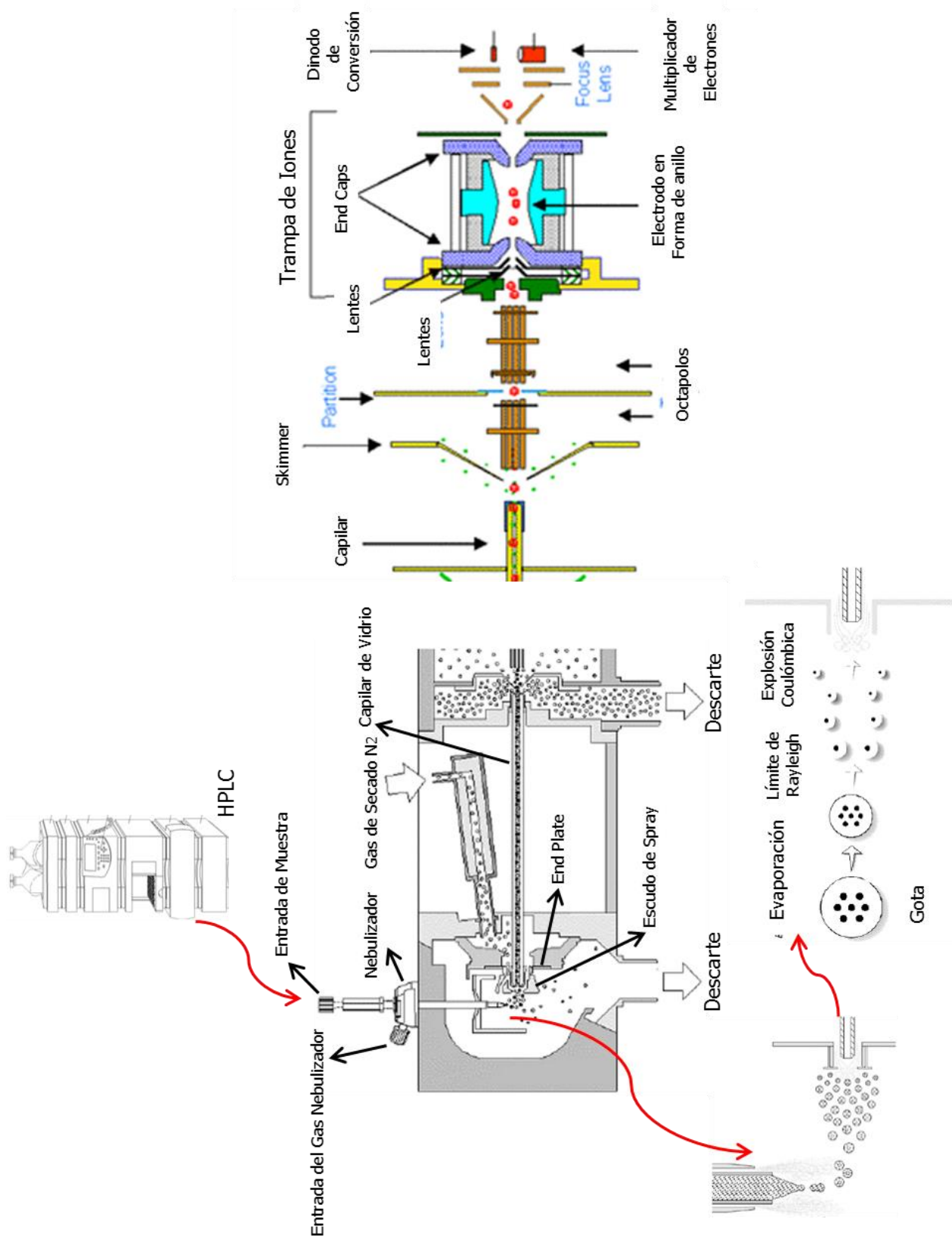


Ilustración 10. Diagrama de un sistema de HPLC-MS con analizador de trampa de iones y esquema del proceso de ionización por electrospray. Tomado de Bruker Daltonics User Manual, Volume 1, Versión 1.2.1.

3. ESPECTROMETRÍA DE MASA TÁNDEM EN EL ESPACIO

Los instrumentos para realizar experimentos tándem en el espacio pueden ser del tipo cuadrupolo triple o híbridos (con diferentes analizadores acoplados). La espectrometría de masa tándem utiliza dos o más etapas de análisis por espectrometría de masa, donde a través de cada analizador se puede seleccionar, escanear o transmitir todos los iones. Entre dos de los analizadores, los iones pueden ser sometidos a diferentes acciones como colisión con gases neutrales o reactivos, colisión con superficies, interacción con luz, aceleración, desaceleración y descomposición, entre otras acciones. La selección de un barrido o no en esta primera etapa de análisis y las diferentes acciones sobre los iones entre los analizadores dan lugar a una gran variedad de experimentos de masa tándem [102].

a. INSTRUMENTO HÍBRIDO CUADRUPOLO-TIEMPO DE VUELO

El diagrama de un instrumento híbrido Qq-ToF se muestra en la Ilustración 11. Dado que el sistema de ionización es a presión atmosférica (ESI o APCI), luego de realizado el proceso en la cámara de ionización, los iones son transferidos a través de un capilar de vidrio hacia la región de transferencia de los primeros tres sistemas de vacío. La función de esta región de transferencia es la de transmitir iones de analito, con la menor pérdida posible y libres de gas de secado y solvente, hacia la región del cuadrupolo. Las dos primeras estaciones de vacío contienen guías de iones en forma de embudos (*funnel*) formados a partir de anillos apilados, que enfocan el haz de iones en su centro y a través de un gradiente, dirigen los iones hacia la salida del embudo. Las partículas no cargadas, como el gas, de secado serán bombeadas fuera del sistema a través de los huecos entre los anillos del *funnel*. Luego de los dos *funnel*, un hexapolo se utiliza para el transporte y enfocado de iones.



Ilustración 11. Ruta de los iones a través del espectrómetro de masa Qq-ToF.
Tomado de Bruker Daltonics MicroToF-Q II User Manual, Volume 1, Versión 1.0.

El aislamiento y fragmentación de iones, previos al análisis de masa con el espectrómetro de masa ToF, se realiza en la región Q-q que consiste en un cuadrupolo analítico y una celda de colisión. El cuadrupolo analítico es el primer analizador de masa y puede ser utilizado como un filtro para un ion particular o un rango de masas. En la celda de colisión, los iones precursores aislados pueden ser fragmentados mediante la utilización de un gas neutro de colisión como nitrógeno o argón, proceso que se denomina *Collision Induced Dissociation* (CID). Los iones fragmento son acumulados y luego transferidos a la región de ToF. Debido a las colisiones con el gas, la energía traslacional de los iones se convierte en excitación interna; si esta energía interna supera a la energía de disociación, entonces se generan los fragmentos. La celda de colisión también puede ser utilizada únicamente como guía de iones manteniéndose baja la energía de manera de mantener baja la excitación interna del ion y evitar la fragmentación [103].

El segundo analizador es del tipo Tiempo de Vuelo (ToF). La idea inicial de medir la masa de un ion mediante su tiempo de vuelo fue propuesta por Stephens en 1946 [104]. El principio básico de funcionamiento de un espectrómetro de masa ToF involucra medir el tiempo de vuelo de un ion a través de una región espacial libre de campos eléctricos. Los iones son separados como resultado de sus relaciones m/z . Esta separación es consecuencia de iones con valores de energía cinética fija y diferentes valores de m/z , de manera que son acelerados a diferentes velocidades. El tiempo de vuelo, junto con valores de voltaje de aceleración y largo de la región de vuelo, permite la extrapolación del valor m/z del ion.

Como debe haber señales definidas de inicio y final para poder realizar las medidas, la entrada del ion debe ser pulsada. Esto requiere la introducción de algún dispositivo de pulso para convertir el flujo continuo de un sistema como el de cromatografía líquida con ionización ESI a una serie discreta de paquetes de iones. Usualmente esto es llevado a cabo enfocando el haz de iones

ortogonal al tubo de vuelo y utilizando un campo eléctrico pulsado para introducir los iones al analizador ToF.

La introducción de un reflector en el tubo de vuelo y el uso de técnicas de inyección ortogonal mejoraron la resolución de la espectrometría de masa por control de la distribución espacial y de las diferentes energías iniciales de los iones. Estos instrumentos son capaces de proveer alta resolución y rápida velocidad de adquisición de datos.

El detector presente en el equipo disponible en nuestro laboratorio (microToFQ) es un *microchannel*, un núcleo sólido con millones de pequeños poros (cada uno de los cuales funciona como un multiplicador de electrones) que se encuentran internamente unidos por una lámina semi-conductora [103].

El *screening* en muestras biológicas de drogas de uso terapéutico, de abuso, toxinas y análisis de tipo forense y toxicológico, pueden implicar la utilización de instrumentos ToF de alta resolución permitiendo determinaciones de masa con alta exactitud. La identificación en estos casos se basa en la búsqueda de la fórmula calculada a través de la masa exacta contra una base de datos de compuestos relevantes así como de metabolitos conocidos de las mismas. Esta técnica permite la búsqueda de drogas y compuestos relacionados sin la necesidad de contar con estándares de referencia como es el caso frecuente para drogas callejeras o nuevas drogas [28, 102].

4. MODOS DE ADQUISICIÓN DE DATOS EN ESPECTROMETRÍA DE MASA TÁNDEM

a. PRODUCT ION SCAN.

Este es uno de los métodos de barrido más utilizados en masa tándem. El primer analizador se utiliza para seleccionar un ion (precursor), al cual se le administra energía en una región de reacción para inducir la fragmentación. El método más común es el de hacer colisionar al ion precursor con un gas inerte

que es introducido en la celda de colisión (CID). Los iones excitados se rompen en una o más partes neutras y fragmentos cargados (iones producto) que son transferidos al siguiente filtro de masa donde se escanea en el rango m/z de interés y luego se lleva a cabo la detección [102].

b. *PRECURSOR ION SCAN.*

El primer analizador se utiliza en modo barrido, mientras que el segundo analizador se encuentra fijo a un determinado valor de m/z . De esta manera lo que se detectan son los iones precursores de un ion producto que fue seleccionado en el analizador 2 [102].

c. *PÉRDIDA NEUTRA CONSTANTE.*

Los dos analizadores son escaneados con una diferencia de masa fija (con la masa en el analizador 1 mayor que la del 2); solamente los iones que pierden esa diferencia de masa en la celda de colisión serán detectados. Esta técnica provee una oportunidad para la detección de productos de una clase específica que contengan características estructurales similares [102].

d. *SINGLE/MULTIPLE REACTION MONITORING.*

Se fija el analizador 1 en un determinado valor de m/z . De esta manera, prácticamente todos los iones de interés serán detectados mientras que en la técnica común de scan muchos de ellos se pierden. Luego de la fragmentación, se puede seleccionar el ion producto característico del ion de interés eliminando interferencias adicionales. De esta manera se obtiene una alta selectividad y sensibilidad. Cuando se seleccionan dos o más iones característicos hablamos de *multiple reaction monitoring* (MRM) [102].

5. DESARROLLO DE MÉTODOS CON DETECCIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASA

TÁNDEM

El estudio de las mejores condiciones de detección de los analitos puede sistematizarse tomando en cuenta dos aspectos fundamentales que influyen en el proceso: la fragmentación de los iones y el efecto matriz.

a. CURVAS DE ENERGÍA (*ENERGY-RESOLVED GRAPHS*)

Cuando se lleva a cabo *Collision Induced Dissociation* (CID) en un rango de energías o de presión del gas de colisión, el registro del espectro de los iones fragmento da lugar a curvas de fragmentación que pueden permitir la identificación de compuestos individuales [105]. Los procesos de fragmentación pueden ser monitoreados mediante la evaluación de la eficiencia de fragmentación (E_f), de colección (E_c) y la eficiencia total de CID (E_{cad}). Las mismas implican medir la intensidad del ion precursor previo a CID, el precursor remanente luego de CID y el ion fragmento generado. Estas eficiencias se encuentran afectadas por la energía de colisión y la presión del gas de colisión las cuales pueden ser variadas para maximizar la eficiencia de CID para un ion precursor particular [106].

El monitoreo de la fragmentación de un ion bajo diferentes condiciones experimentales puede ayudar a determinar las condiciones óptimas para MS tándem en análisis confirmatorios a nivel de trazas. El incremento de la energía de colisión permite colisiones más energéticas, mientras que incrementar la presión del gas incrementa el número de colisiones que cada ion experimenta. Cualquiera de las dos aproximaciones incrementa la cantidad de energía depositada en el ion precursor y aumenta así la eficiencia de la fragmentación. Sin embargo, un incremento en la energía de colisión o presión también generará una pérdida de iones (por scattering y neutralización por intercambio de carga), disminuyendo así la eficiencia de colección de iones. La eficiencia

general de CID, vista como el producto de la eficiencia de fragmentación y colección, típicamente crece primero y luego se mantiene o incluso disminuye a medida que la energía de colisión o presión se incrementan [107]. Los resultados se expresan como gráficos de abundancia relativa del ion producto (%) vs energía (o presión) de colisión y gráficos de degradación del ion precursor $[M+H]^+$ [105, 107, 108].

b. EFECTO MATRIZ

El fenómeno de efecto matriz en detección con ionización electrospray fue descrito por primera vez por Kebarle y Tang en 1993 [109]. Sin embargo, la importancia del efecto matriz en el desarrollo de métodos bioanalíticos empezó a ser reconocida y tratada tiempo después. En las recomendaciones de la *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) en su *Guidance for Industry on Bioanalytical Method Validation* [110], claramente se indica la necesidad del estudio del efecto matriz durante el desarrollo y validación de los métodos de HPLC-MS/MS para asegurar que la precisión, selectividad, recuperación, exactitud y sensibilidad no se verán comprometidas. Este documento no describe los métodos para evaluar el efecto matriz. Algunas de las primeras aproximaciones al respecto aparecieron en el trabajo de Bonfiglio et al. para métodos cualitativos [111] y en el trabajo de Matuszewski et al. para métodos cuantitativos [21].

Estos efectos están relacionados con la presencia de compuestos diferentes al analito de interés en la solución del extracto que es inyectada en el cromatógrafo, pudiendo ser endógenos (presentes originalmente en la matriz y extraídos con el analito) o exógenos (introducidos en la solución durante la preparación de muestra, ej. compuestos provenientes de los tubos plásticos). Hablamos de interferencias directas cuando un compuesto que co-eluye tiene una señal que coincide o solapa con la señal utilizada para monitorear la

concentración del analito. En cambio las interferencias indirectas son más sutiles y no implican el solapamiento de señales. En espectrometría de masa, la sola presencia del compuesto junto con el analito en la fuente de iones suprime o potencia la eficiencia de la ionización de una manera impredecible. La supresión de la eficiencia de ionización es importante cuando la capacidad total de ionización de la técnica de ionización es limitada, de manera que hay una competición por la ionización entre los compuestos que se encuentran simultáneamente en la fuente de iones. Es un efecto importante en técnicas de ionización por electrospray e ionización química a presión atmosférica (APCI). La potenciación de la eficiencia de ionización de un analito por compuestos co-eluyentes es menos frecuente y en general no se conoce el mecanismo por el cual ocurre [112].

En espectrometría de masa, este efecto puede ser eliminado o disminuido mediante la mejora del procedimiento de extracción y *clean up* con la desventaja del incremento del tiempo de análisis, disminución del rendimiento de la muestra, etc. Otras alternativas *fit for purpose* implican cambios en las condiciones cromatográficas de manera de evitar la co-elución de los componentes de la matriz responsables de la supresión/potenciación. El enfoque más utilizado para su evaluación es el monitoreo continuo de la señal de MS específica para el analito que es continuamente introducido mediante conexión en T entre el cromatógrafo y el espectrómetro de masa. Un extracto de una muestra de matriz blanco es inyectado en la columna, de manera que la desviación de la señal específica del analito de su nivel pre-inyección es atribuida a la matriz por componentes extraídos en la misma. Así se determina si es necesario variar o no las condiciones cromatográficas. En el caso de gradientes los *hot spots* para el efecto matriz, se encuentran al comienzo y al final del mismo (elución de compuestos no retenidos y fuertemente retenidos, respectivamente) [111, 112].

El efecto matriz relativo se refiere a la comparación de los valores del efecto matriz obtenidos utilizando diferentes fuentes de matrices blanco, en particular cuando se trabaja con matrices complejas, donde la variación entre las características de las mismas puede llegar a ser importante. La precisión y exactitud general de cualquier método bioanalítico, son dependientes de varios factores incluyendo el rendimiento general del sistema cromatográfico, reproducibilidad en la respuesta del detector, reproducibilidad en la preparación de la muestra, coherencia en la recuperación de los analitos desde diferentes fuentes de un biofluido y ausencia de efecto matriz en la cuantificación. Cuando la validación se realiza utilizando solo un lote de biofluido, las potenciales diferencias en la recuperación en diferentes biofluidos, y el potencial del efecto matriz no son tomados en cuenta. La presencia de un efecto matriz absoluto o relativo para un determinado analito, no indica necesariamente que el método analítico no sea válido. Matuszewski et al. recomiendan la utilización de al menos 5 lotes de matrices diferentes para que los resultados tengan validez estadística [21].

E. ESTRATEGIAS ANALÍTICAS PARA MÉTODOS CONFIRMATORIOS

La estrategia de esta investigación constó de tres ejes: la exploración de varios métodos de extracción de los analitos de la matriz de origen, el estudio y optimización de técnicas de espectrometría de masa tándem para detectar inequívocamente las sustancias y la incorporación de estrategias de química verde en los procesos analíticos desarrollados.

Para la detección de flunixinina en orina equina se desarrolló y validó un método de inyección directa por LC/Qq-ToF, en donde la preparación de muestra eliminó los pasos de extracción con solventes orgánicos.

Para la detección de dexametasona y betametasona en orina se desarrolló un método utilizando tratamiento de muestra con extracción en fase sólida (SPE) con microfibras de poliestireno (PS) obtenidas por *electrospinning*.

Para la detección de clenbuterol, salbutamol, fenoterol y sildenafil en orina equina se evaluó la posibilidad de realizar el tratamiento de muestra a escala reducida y/o con solventes "verdes".

El reglamento de carreras de la actividad hípica que se desarrolla en el Hipódromo Nacional de Maroñas establece que las sustancias prohibidas no deben encontrarse presentes al momento de las carreras a ninguna concentración. Se requiere únicamente un análisis confirmatorio cualitativo (usualmente por espectrometría de masa) para confirmar la presencia o ausencia de la sustancia y no es requerida la cuantificación de la misma. La IFHA al igual que AORC establecen niveles mínimos de performance de los métodos analíticos para los límites de detección que deberían ser considerados [26, 113]. Solamente se establecen niveles umbrales para aquellas sustancias endógenas en el equino; aquellas que surgen de las plantas de la dieta tradicional del equino o de la contaminación de las mismas en su etapa de cultivo, proceso, tratamiento, almacenamiento y transporte.

III. OBJETIVOS

Desarrollar y validar estrategias analíticas para el análisis confirmatorio de medicamentos veterinarios en muestras de origen equino para uso en control de doping, con un enfoque de química analítica verde en la etapa de preparación de muestra y análisis cromatográfico.

A. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desarrollar nuevos métodos de extracción de residuos de medicamentos veterinarios en matrices biológicas, con énfasis en métodos analíticos verdes.
- Separación de los analitos de interés mediante cromatografía líquida, incorporando estrategias de química verde en esta parte del proceso.
- Optimizar la detección de los analitos de interés en experimentos de espectrometría de masa tándem, tanto en trampa de iones como en cuadrupolo-tiempo de vuelo.
- Desarrollar método(s) analítico(s) para diferenciar los epímeros dexametasona y betametasona en orina equina, mediante separaciones cromatográficas y espectrometría de masa tándem.
- Validar el (los) método(s) desarrollados de acuerdo a las normativas y las buenas prácticas del área.
- Demostrar la capacidad del laboratorio de aplicar métodos sustentables que pueden ser validados de acuerdo a normativas internacionales y que cumplen con las especificaciones del cliente.

IV. SECCIÓN EXPERIMENTAL

A. MATERIALES

1. REACTIVOS

Se utilizaron reactivos químicos de grado analítico y solventes para cromatografía calidad HPLC.

El ácido Fórmico de grado analítico fue obtenido de Dorwil Analytical Chemistry (San Isidro, Bs.As., Argentina) o de Merck (Pty) Ltd. (259 Davidson Rd, Wadeville Gauteng, South Africa). El acetonitrilo y metanol calidad HPLC fueron obtenidos de Merck KGaA (64271 Darmstadt, Germany). N,N-Dimetilformamida (DMF), Tetrahidrofurano (THF), Diclorometano (DCM) fueron obtenidos de Merck (Pty) Ltd. (259 Davidson Rd, Wadeville Gauteng, South Africa). 2-metiltetrahidrofurano (anhidro, $\geq 99.0\%$, 250 ppm BHT) y ciclopentil-metil-éter (anhidro, $\geq 99.0\%$, 50 ppm BHT) obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). El polímero de poliestireno fue comprado en Sigma-Aldrich Chemistry.

Para la obtención de agua de calidad ultrapura se utilizó un equipo Millipore Academic A10 Milli-Q (Billerica, MA, USA).

2. ESTÁNDARES ANALÍTICOS

Los estándares analíticos de flunixin, isoxsuprina, glicopirrolato, fenilbutazona y diclofenac fueron adquiridos de USP (Rockville, MD, USA). Estricnina (Valparaíso 1122, Montevideo-Uruguay). Cafeína (Fluka, lote 1292770). Lidocaína y clenbuterol Sigma (St. Louis, MO, USA). Betametasona, dexametasona, sildenafil Celsius S.A. (Montevideo-Uruguay). Clorpromazina, dipirona, fenoterol, salbutamol y teobromina fueron donaciones de laboratorios farmacéuticos uruguayos.

3. SOLUCIONES ESTÁNDAR

Soluciones Stock (SS) (1 mg/mL) de cada uno de los analitos fueron preparadas mediante disolución de la cantidad apropiada de estándar en metanol. Soluciones de Trabajo (ST) fueron obtenidas mediante dilución en metanol de la SS correspondiente, concentración final 10 µg/mL y utilizadas para fortificar muestras de orina blanco. Almacenamiento a -20°C. Mix 1 ST: diclofenac, dipirona, clorpromazina, sildenafil y lidocaína. Mix 2 ST: fenoterol, salbutamol, clenbuterol, isoxsuprina y dexametasona. Mix 3 ST: dexametasona, betametasona, flunixin, isoxsuprina, glicopirrolato, fenilbutazona, cafeína, sildenafil, estricnina y teobromina.

4. MUESTRAS DE ORINA

Las muestras de orina equina fueron recolectadas de machos y hembras en una facilidad de entrenamiento militar, al comienzo de la temporada de entrenamiento, bajo supervisión veterinaria. Para machos, en algunos casos, se utilizó furosemide como diurético para facilitar la toma de muestra. Muestras presuntas positivas fueron adquiridas a partir del sistema de control de doping de carreras de caballos nacionales. Todas las muestras se conservaron en freezer a -20°C hasta su utilización.

Orina humana liofilizada fue obtenida de Seronorm (Billingstad, Noruega), reconstituida en 5mL de agua ultrapura y filtrada con PVDF 0.45 µm

5. INSTRUMENTOS

- HPLC Agilent 1200 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) equipado con un desgasificador de vacío G1379B, un autosampler G1367B, detector de arreglo

de diodos G1315B, bomba binaria G1312A y un horno termostizador de columna G1316A.

- Espectrómetro de masa con analizador cuadrupolo - tiempo de vuelo (micrOTofQ, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany).
- Espectrómetro de masa con analizador de trampa de iones (Esquire 6000, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany).
- HPLC Agilent 1100 (Agilent 1100, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA).
- Espectrofotómetro Perkin Elmer Precisely Lambda 25 UV/Vis.
- Microscopio de escaneo electrónico INCAPentaFETx3.
- Espectrofotómetro infrarrojo Perkin Elmer 100 FT-IR.
- Bomba de jeringa (Pump Systems Inc. Model No. NE-300).

B. PREPARACIÓN DE MUESTRA

1. MÉTODO DE INYECCIÓN DIRECTA (FLUNIXINA)

Una alícuota de 1 mL de orina equina fue ajustada a pH 3 con ácido clorhídrico 1N. Luego de 15 min, la muestra fue diluida 1:1 con agua ultrapura. La muestra diluida fue filtrada con filtro de 0.45 µm a viales de HPLC e inyectada directamente en un sistema HPLC-MS.

2. MÉTODO DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA CON MICROFIBRAS DE POLIESTIRENO (BETAMETASONA Y DEXAMETASONA)

Las soluciones de trabajo de dexametasona y betametasona fueron utilizadas para fortificar muestras de orina humana y de agua ultrapura a concentraciones

de 5, 10, 100, 125, 250, 500 ng/mL. El Mix 3 fue utilizado para fortificar muestras de orina humana a una concentración de 200 ng/mL.

a. MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE ORINA CON MICRO DISPOSITIVOS

Los dispositivos de micro columnas (microextracción en fase sólida) fueron acondicionados y equilibrados con 100 μ L de metanol y 100 μ L de agua ultrapura, seguido de una carga de 100 μ L de la muestra correspondiente. El paso de lavado fue realizado con 100 μ L de agua ultrapura y la elución con 100 μ L de metanol.

En todos los casos el control del flujo se realizó manualmente. El eluido fue analizado mediante HPLC con detección UV a 240 nm, con un flujo de 0.800 mL/min y fase móvil ácido fórmico 10 mM y acetonitrilo (65:35, v/v) en modo isocrático. La separación fue alcanzada utilizando una columna C8 (Zorbax Eclipse Plus C8 100 mm x 4.6 mm, 3.5 μ m), mantenida a 40°C. Con este procedimiento se determinaron las recuperaciones para ambos analitos en muestras de orina equina humana a tres niveles de concentración trabajando con los dispositivos en micro columna (500, 250 y 125 ng/mL) y recuperaciones en muestras de agua fortificadas con los dispositivos de micro columnas y discos (con solución acuosa 5 μ g/mL de dexametasona y betametasona).

Para la evaluación del método para análisis de control de doping, las micro columnas de SPE fueron cargadas con 1000 μ L de muestras de orina fortificadas y eluidas con 100 μ L de metanol, logrando una concentración de 1 en 10 del eluido.

3. MÉTODO DE EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO (DEXAMETASONA Y BETAMETASONA)

Las muestras de orina equina son descongeladas en baño de agua a 50°C.

Una alícuota de 5 mL se transfiere a tubo falcón y se fortifica al nivel de concentración deseado. Se controla el pH inicial de las muestras y se agregan pequeñas alícuotas de HCl 1 N hasta llevar a pH 3; se agita durante 10 minutos. Se agregan 5 mL de solvente de extracción diclorometano y se agita en rocker durante 1 min.

Luego se centrifuga a 3500 rpm durante 10 min para la separación de la capa orgánica que se transfiere a un tubo falcon limpio.

Se repite esta extracción dos veces más. La fase orgánica se evapora a sequedad en baño de agua a 40°C en atmósfera de nitrógeno. Se reconstituye el extracto en 500 µL de fase móvil (Ácido Fórmico 10 mM:Acetonitrilo, 70:30). La muestra reconstituida es filtrada con filtro de 0.45 µm a viales de HPLC e inyectada en HPLC-MS.

4. MÉTODO DE EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO (BRONCODILADORES Y SILDENAFIL)

Las muestras de orina equina son descongeladas en baño de agua a 50°C.

Una alícuota de 5 mL se transfiere a tubo falcón y se fortifica al nivel de concentración deseado. Se agregan 500 µL de buffer acetato y 20 µL de enzima β-glucuronidasa y se incuba en baño de agua a 50°C durante 1 h para que proceda la hidrólisis. Luego de transcurrida 1h la muestra se deja enfriar a temperatura ambiente y se adicionan 250 µL de hidróxido de potasio 5 M. Se lleva la muestra a pH 9 con buffer carbonato/bicarbonato y luego se adiciona

una espátula de cloruro de sodio. Se agregan 5 mL de solvente de extracción dietiléter y se agita en rocker durante 5 min.

Luego se centrifuga a 3500 rpm durante 10 min para la separación de la capa orgánica y la misma es transferida a un tubo falcon limpio.

Se repite esta extracción dos veces más. La fase orgánica se evapora a sequedad en baño de agua a 40°C en atmósfera de nitrógeno. Se reconstituye el extracto en 500 µL de fase móvil (Ácido Fórmico 10 mM:Acetonitrilo, 90:10). La muestra reconstituida es filtrada con filtro de 0.45 µm a viales de HPLC e inyectada en HPLC-MS.

5. FABRICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MICROFIBRAS DE POLIESTIRENO

Las microfibras de poliestireno fueron fabricadas mediante electrospinning. Se utilizaron soluciones de diferentes concentraciones (%wt) de poliestireno en N,N-dimetilformamida:Tetrahidrofurano (3:7) que fueron colocadas en una jeringa de 25 mL con una aguja de acero inoxidable conectada al ánodo de una fuente de alto voltaje. Un colector rotatorio forrado en papel aluminio fue utilizado para la recolección de las fibras, con una distancia de la aguja al colector de 15 cm y un voltaje de +15 kV (aguja) y -5 kV (colector).

Las fibras obtenidas fueron caracterizadas utilizando microscopia de escaneo electrónico y espectroscopia infrarrojo.

6. EFICIENCIA DE EXTRACCIÓN DE LAS FIBRAS EN BATCH

10 mg de fibras de poliestireno de diferentes diámetros fueron introducidos en 5 mL de una solución 5 µg/mL de dexametasona durante 10 min con agitación. La absorbancia de la solución acuosa de dexametasona fue medida a 240 nm antes y después de la adición de las fibras del polímero.

7. FABRICACIÓN DE DISPOSITIVOS DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

Se fabricaron dos tipos de dispositivos: micro columnas en tips y discos. Estos dispositivos fueron fabricados *In-house* como ya ha sido descrito previamente [82, 114].

Brevemente, para las micro columnas en tips, 10 mg de microfibras fueron empaquetadas manualmente en tips de micropipeta de 200 μL , presionando hasta 1 cm de lecho de fase estacionaria.

Para el formato de columna de SPE, las microfibras fueron comprimidas para formar un disco de 1 mm de espesor y 5 mm de diámetro. Los discos fueron empaquetados estrechamente con fritas a ambos lados en la base de columnas de polipropileno para SPE.

8. CURVAS DE VOLUMEN DE CORTE EN MICRO COLUMNAS

Las curvas de volumen de corte fueron obtenidas por cromatografía frontal llevada a cabo mediante la carga de los dispositivos de SPE con una solución acuosa a 500 ng/mL de dexametasona o betametasona, utilizando una bomba de jeringa con un flujo de 0.080 mL/min. Se colectaron alícuotas desde 100 μL a 5000 μL y fueron analizadas mediante HPLC con detección UV a 240 nm.

Los parámetros clave fueron determinados mediante ajuste de los puntos experimentales a una curva sigmoidea con el programa Origin 6.1. VR es dado por el punto de inflexión de la curva y σV es la desviación estándar de la curva derivada. La interpolación en el grafico a 5% permite obtener VB. El número de platos teóricos fue determinado usando la ecuación $N = \frac{VR(VR - \sigma V)}{\sigma^2 V}$

C. CONDICIONES CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA - ESPECTROMETRÍA DE MASA

Los análisis fueron llevados a cabo utilizando un instrumento HPLC Agilent 1200, acoplado a un espectrómetro de masa cuadrupolo - tiempo de vuelo o una trampa de iones, según condiciones resumidas en las Tablas 6 y 7.

Para la detección de la flunixinina se utilizó un espectrómetro de masa micrOTofQ en modo de iones positivos con las siguientes condiciones para la fuente de electrospray: endplate off-set voltage = -500 V, capillary voltage = 4500 V, nebulizer = 0.4 bar, dry gas flow = 4.0 L/min, dry gas temperature = 180°C. El nitrógeno es utilizado como gas de secado y de nebulización. Se realizó diariamente una calibración externa con una solución de calibrado (Tuning Mix, Agilent, USA) en modo cuadrático lineal. Los iones fueron detectados en modo MS/MS con una energía de colisión de 21 eV (ion precursor 297 m/z).

La detección de betametasona y dexametasona en el espectrómetro Esquire 6000, en modo de iones positivo, utilizó la fuente de electrospray con las siguientes condiciones: endplate off-set voltage = -500 V, capillary voltage = 4000 V, nebulizer = 40 psi, dry gas flow = 9.0 L/min, dry gas temperature = 365°C. El nitrógeno es utilizado como gas de secado y de nebulización. La energía de colisión utilizada fue de 0.65 V (ion precursor m/z 393).

Para el clenbuterol en Esquire 6000, en modo de iones positivo, se utilizó la fuente de electrospray con endplate off-set voltage = -500 V, capillary voltage = 4000 V, nebulizer = 40 psi, dry gas flow = 9.0 L/min, dry gas temperature = 365°C. El nitrógeno es utilizado como gas de secado y de nebulización. La energía de colisión fue ajustada a 0.50 V (ion precursor 277 m/z); para el salbutamol y fenoterol se utilizaron las mismas condiciones de la fuente, con energías de colisión de 0.50V (ion precursor 240 m/z) y 0.55 V (ion precursor 304 m/z) respectivamente.

Para el sildenafil se utilizó detección en modo positivo y fuente de electrospray con endplate off-set voltage = -500 V, capillary voltage = 4000 V, nebulizer = 40 psi, dry gas flow = 9.0 L/min, dry gas temperature = 365°C. Nitrógeno es utilizado como gas de secado y de nebulización. Los iones fueron detectados en modo positivo con una energía de colisión de 0.85 V (ion precursor 475 m/z).

El análisis y la adquisición de datos se realizó con el software Bruker Compass Data Analysis 4.0 SP1 (versión 1.2 SR1, Buker Daltonik GmbH).

Tabla 6. Métodos para separación cromatográfica.

SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA		
ANALITO	COLUMNA	CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS
FLUNIXINA	(2.1 x 30 mm; 3.5 µm), C18 Horno 40° C Vol. de inyección 5 µL 0.300 mL/min	Isocrático 72% 10mM Ácido Fórmico: 28% Acetonitrilo
BETAMETASONA Y DEXAMETASONA	(4.6 x 150 mm; 5 µm), C18 Horno 40° C Vol. de inyección 5 µL 0.800 mL/min	Isocrático 70% 10mM Ácido Fórmico: 30% Acetonitrilo
CLEMBUTEROL Y SILDENAFIL	(3.0 x 100 mm; 3 µm), C18 Horno 40° C Vol. de inyección 2 µL 0.300 mL/min	Gradiente, 5 a 55% (B) en 10 min; se mantiene en 55% (B) hasta 12 min y luego baja a 5% (B) en tres minutos. (A) 10mM Ácido Fórmico (B) Acetonitrilo.

Tabla 7. Parámetros para detección por espectrometría de masa tándem en modo positivo.

INSTRUMENTO	ESQUIRE 6000						MICROToF _Q						
	Ion Precursor (m/z)	Energía de Colisión(V)	Iones Producto (m/z)				Ion Precursor (m/z)	Energía de Colisión(eV)	Iones Producto (m/z)				
BETAMETASONA	393	0.60	373	355	337	319							
DEXAMETASONA	393	0.60	373	355	337	319							
CLEMBUTEROL	277 y 279	0.50	259	261	203	205							
SALBUTAMOL	240	0.50	222	166	148								
FENOTEROL	304	0.55	286	152	135								
SILDENAFIL	475	0.85	377	311	283	163							
FLUNIXINA							297	21	279	264	259	239	239

1. CURVAS DE ENERGÍA EN ESPECTROMETRÍA DE MASA TÁNDEM

Luego de la optimización de las condiciones de detección para el aislamiento del ion precursor correspondiente en cada caso (tanto en la trampa de iones como en el cuadrupolo-tiempo de vuelo), se llevó a cabo la optimización de las condiciones de fragmentación. Dicha optimización se realizó mediante la variación de las energías de colisión en la celda de colisión de cada instrumento, manteniendo la presión del gas como parámetro constante.

Para la obtención de las curvas de energía, se grafica la abundancia relativa de los iones fragmento obtenidos en función de la energía aplicada en la celda de colisión. Otra manera de interpretación de los resultados es a través de gráficos de degradación del ion precursor $[M+H]^+$ en función de la energía, mediante la evaluación de la eficiencia de fragmentación (E_f), eficiencia de colección de iones (E_c) y eficiencia global del proceso (E_{CID}):

$$E_f = \sum D_i / (P + \sum D_i)$$

$$E_c = P + \sum D_i / P_0$$

$$E_{CID} = \sum Di/P_0$$

Donde $\sum Di$ son las intensidades de los iones fragmento obtenidos luego del proceso de CID, P es la intensidad del ion precursor luego de CID y P_0 es la intensidad del ion precursor previo a CID.

D. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE MÉTODOS PARA CONTROL DE DOPING

1. EFECTO MATRIZ

Se determinó el efecto matriz utilizando un ensayo de doble inyección [111]. Utilizando un conector en T, una solución de analito fue introducida directamente en el espectrómetro de masa simultáneamente con el efluente de una corrida cromatográfica de un blanco de orina equina (método flunixinina) o humana (método dexametasona y betametasona). La señal MS/MS para el ion precursor correspondiente al analito fue monitoreada.

2. ESPECIFICIDAD, LÍMITE DE DETECCIÓN, PRECISIÓN INTERMEDIA Y REPETIBILIDAD

Una muestra es considerada positiva para la presencia de una droga en particular cuando la relación S/N del pico cromatográfico para la transición mayoritaria es mayor a 3 y el área del mismo mayor a 10000 [101], la relación S/N en el espectro de masa para la transición menos intensa es mayor a 3 y se cumple el criterio AORC para las abundancias relativas de los iones en el espectro y para el tiempo de retención en el cromatograma. El límite de detección en todos los casos es definido como la concentración de trabajo a la cual el 100% de las muestras analizadas son positivas utilizando este criterio.

Para la validación del "Método de Inyección Directa (Flunixinina)" se llevaron a cabo ensayos de laboratorio para la determinación de la selectividad, límite de detección, precisión intermedia y repetibilidad del método y del instrumento. Se utilizaron muestras de orina equina fortificadas en ocho niveles de concentración de flunixinina diferentes (10, 20, 50, 75, 100, 200, 500 and 1000 ng/mL; n=6 para cada nivel); utilizando tres matrices de orina blanco, en tres días de trabajo diferentes. Para la evaluación de la selectividad, se trabajó con tres matrices diferentes y se prepararon muestras de orina fortificadas con un mix de drogas (Mix 1 and Mix 2) comúnmente buscadas en control de doping, a una concentración de 500 ng/mL, y muestras de orina control (fortificadas únicamente con flunixinina).

En el caso del "Método de Extracción en Fase Solida con Microfibras (betametasona y dexametasona)", se realizó una verificación del método desarrollado. Para determinar la selectividad del método, se analizaron muestras de orina fortificadas con el Mix 3 y muestra de orina control (fortificadas únicamente con las drogas de interés). El límite de detección del método fue evaluado a 5 y 10 ng/mL por triplicado.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. DETECCIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASA

Debido a las diferencias en las configuraciones de los espectrómetros de masa disponibles para el trabajo en el laboratorio y a las diferentes energías accesibles para la fragmentación de iones en cada uno ellos, la fragmentación para un analito dado, debe ser verificada en cada instrumento.

En este trabajo, la fragmentación del ion precursor correspondiente al analito debe ser tal que permita cumplir los requerimientos de métodos confirmatorios de detección de sustancias prohibidas (al menos tres iones diagnóstico). En caso de que los mismos no se cumplieran, se deberán buscar estrategias alternativas para obtener un patrón de fragmentación adecuado, como la derivatización del analito, el uso de otro instrumento tándem con diferente rango de energías de colisión o mayores pasos de fragmentación, como por ejemplo MS³ en la trampa de iones.

Las curvas de energía (*energy resolved curves*) son una buena aproximación para la determinación de la/s energía/s de fragmentación adecuadas durante el desarrollo de un método de análisis de drogas. El patrón de fragmentación de un analito puede depender de su concentración y de la matriz en la cual se encuentra presente, por lo que el valor de energía óptimo obtenido a través de estas curvas debe ser posteriormente verificado en las condiciones reales del análisis.

1. FLUNIXINA

El patrón de fragmentación de flunixinina obtenido en experimentos MS/MS con el ion precursor m/z 297 en la trampa de iones se muestra en la Ilustración 12. Se observa un único ion fragmento con elevada intensidad (m/z 279), lo que no es adecuado para el análisis confirmatorio de esta sustancia. El estudio de las curvas de energía, en un rango lo suficientemente amplio (0.70 a 1.2 V), permitió verificar que en ningún caso, bajo las condiciones ensayadas, es posible obtener tres iones fragmento (Ilustración 13). En todos los casos se observó el ion m/z 279 como mayoritario, una estrategia alternativa en caso de disponer solamente de este detector, hubiera sido la fragmentación adicional de m/z 279 en análisis MS^3 .

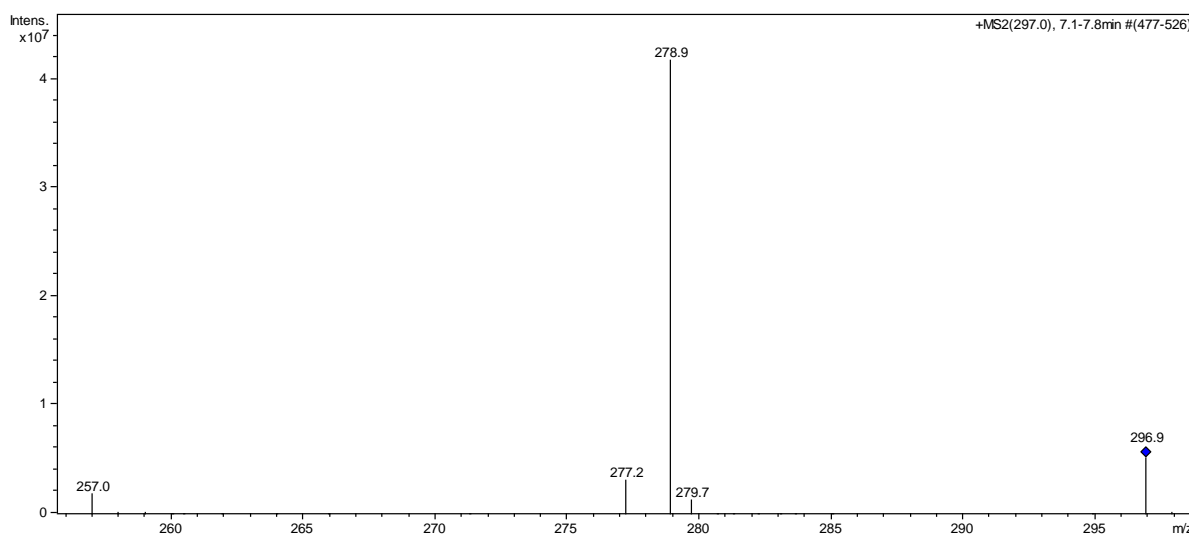


Ilustración 12. Patrón de Fragmentación de Flunixinina. Analizador de trampa de iones, energía de fragmentación 1.05V, modo de adquisición *product ion scan* para el ion precursor m/z 297.

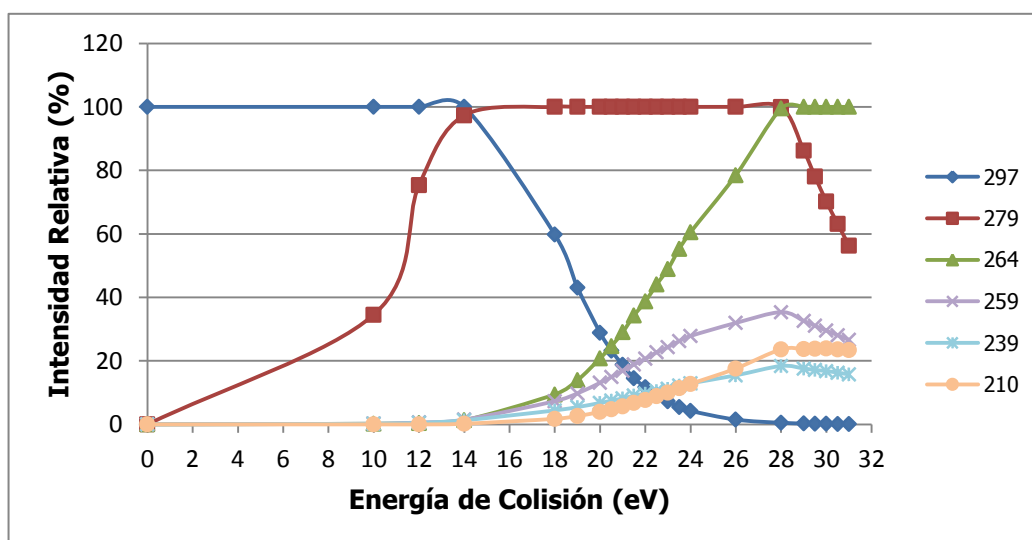
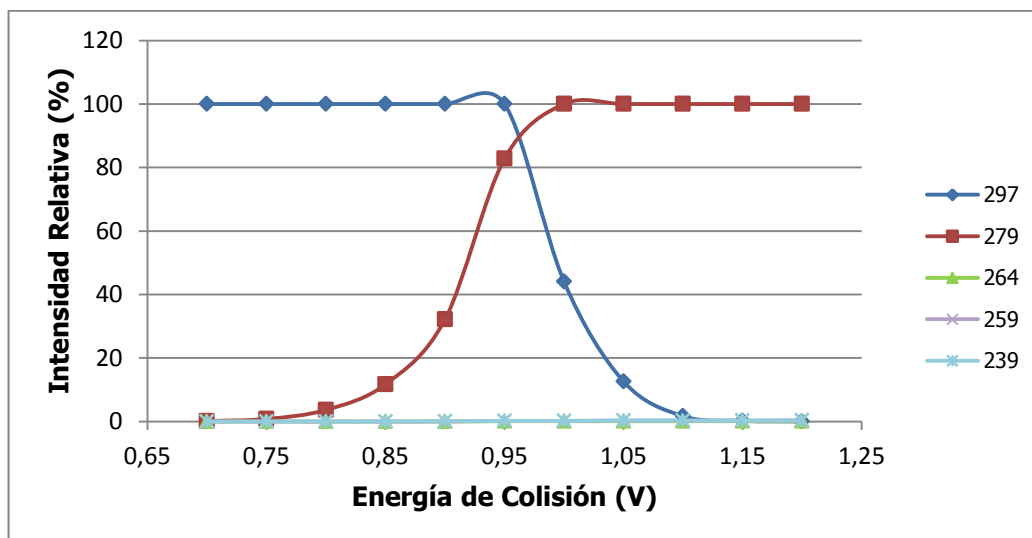


Ilustración 13. Curvas de Energía de Colisión para Flunixinina. Espectrómetro de masa con analizador de trampa de iones (arriba) o con analizador Qq-ToF (abajo).

El detector híbrido Qq-ToF permitió la obtención de un patrón MS/MS de fragmentación con varios iones que pueden ser utilizados en análisis confirmatorios, tanto para la cuantificación como para la confirmación de la identidad del analito (Ilustración 13). La Ilustración 14 muestra un espectro obtenido utilizando este detector y las estructuras de los iones fragmento que se obtienen. Se seleccionó el valor de 21 eV en el Qq-ToF, de tal manera de mantener una abundancia detectable para el ion precursor m/z 297 y una buena señal de los iones m/z 279, m/z 264 y m/z 259.

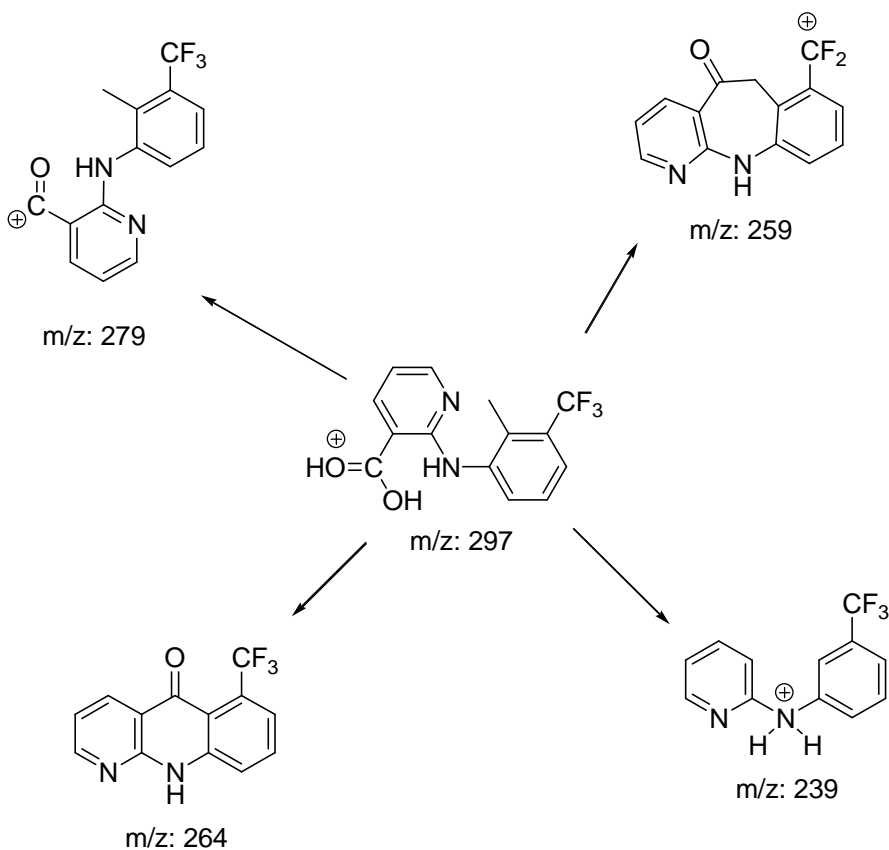
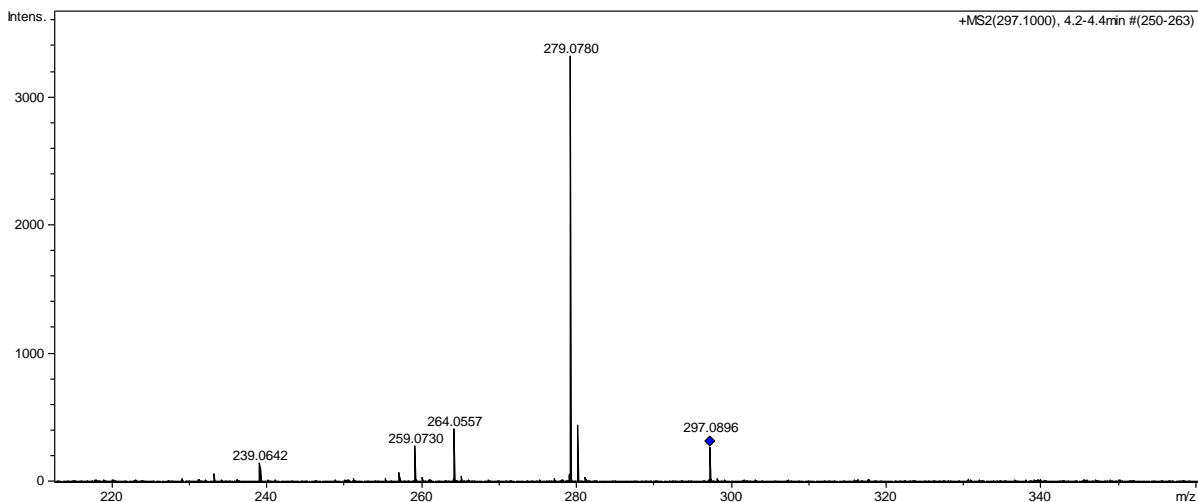


Ilustración 14. Patrón de Fragmentación de Flunixin y Estructura de los Iones Fragmento Obtenidos. Analizador Qq-ToF, energía en la celda de colisión de 21 eV.

2. **BETAMETASONA Y DEXAMETASONA**

Para el estudio sistemático de los patrones de fragmentación de betametasona y dexametasona en espectros de masa del tipo ion precursor-iones producto se realizaron las curvas de energía correspondientes con los analizadores de trampa de iones y Qq-ToF (en todos los casos n=3). Las Ilustraciones 15 y 16 permiten comparar visualmente aquellos iones y valores de energía para los cuales se obtuvieron diferencias importantes en las abundancias relativas entre isómeros, en ambos instrumentos, siempre trabajando a la misma concentración. La Tabla 8, muestra los rangos WADA calculados en base a las intensidades relativas de los iones producto del estándar de dexametasona; el criterio de la *World Anti Doping Agency* es en cierta manera más estricto que el de *Association of Official Racing Chemists (AORC)*, de manera tal que nos permite obtener rangos de tolerancia que no se solapan para 6 de los 8 iones fragmento reportados para estos epímeros (m/z 337, 319, 307, 279, 237, 161). Este criterio de identificación puede ser utilizado de manera rutinaria para el análisis de muestras, complementario a la identificación a través del tiempo de retención cromatográfico.

Tabla 8. Comparación de Rangos de Tolerancia WADA para Betametasona y Dexametasona. Fragmentación en Qq-ToF, con energía de colisión de 11 eV o en Trampa de Iones con energía de colisión de 1.2 V. La determinación de los rangos de tolerancia WADA se realizó con los valores de intensidades relativas de dexametasona.

Qq-ToF	337	319	307	279	237	161
Betametasona	46.9	29.9	11.0	56.4	20.9	8.9
Rangos WADA	50.2 - 70.2	36.7 - 55.0	36.9 - 55.4	20.8 - 31.1	31.3 - 46.9	20.6 - 30.8
Trampa de Iones	337	319	307	279	237	161
Betametasona	25.4	13.7	4.2	13.8	3.5	1.5
Rangos WADA	46.6 - 66,6	32,6 - 48,9	7,7 - 17,7	8,0 - 18,0	10,4 - 20,4	2,0 - 6,0

A 11 eV trabajando en el instrumento Qq-ToF se obtienen diferencias de prácticamente el doble de intensidad en los iones m/z 237 y 279 para dexametasona y betametasona respectivamente y presencia del ion m/z 161 en mayor abundancia para dexametasona (Ilustración 15). También se observa una diferencia importante para el ion m/z 307. A 8 eV se observan diferencias significativas en las abundancias relativas de los iones m/z 337 y 319, siendo ambos mayoritarios en dexametasona, pero al incrementarse la energía estas diferencias se hacen poco importantes.

Esto es visible también en la Tabla 8 donde las intensidades de estos iones para betametasona se encuentran levemente por debajo del rango de tolerancia establecido con dexametasona.

Para el caso de la trampa de iones a partir de una energía de colisión de 0.8 V se comienzan a ver diferencias significativas en las intensidades relativas de m/z 337 y 319 en todos los casos con mayores intensidades para dexametasona, y también a partir de esta energía hay presencia del ion m/z 237 para la dexametasona. No se observa una diferencia importante para m/z 279 y 307 como en el caso del Qq-ToF y el ion m/z 161 característico de dexametasona prácticamente es detectable (Ilustración 16).

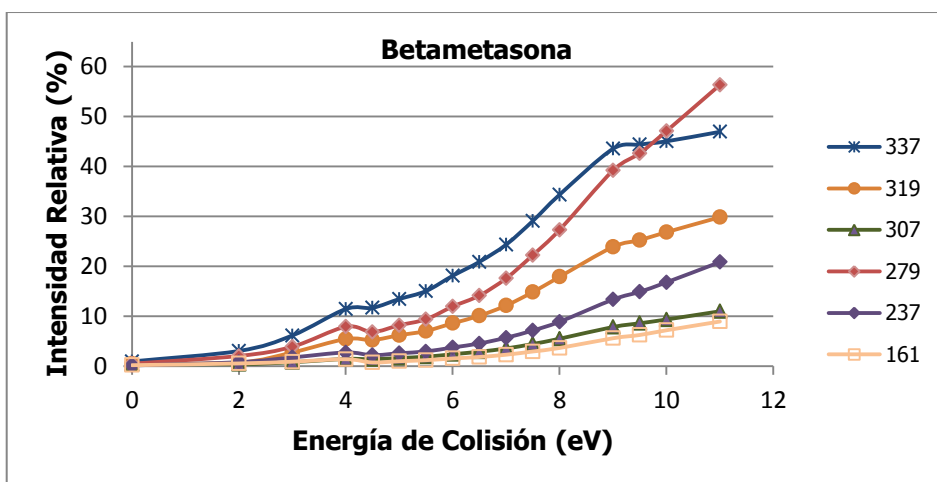
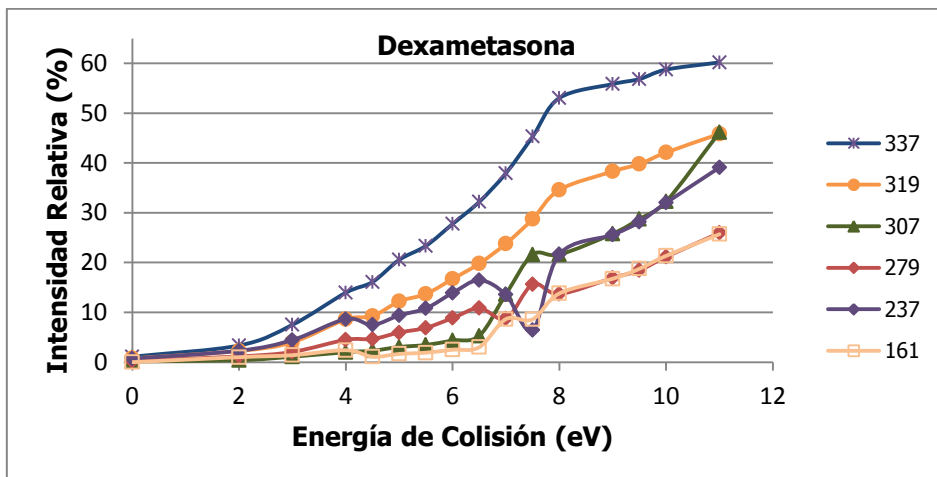


Ilustración 15. Curvas de Fragmentación para Dexametasona y Betametasona en Qq-ToF. Se muestran los iones para los cuales se observaron las mayores diferencias en abundancias relativas.

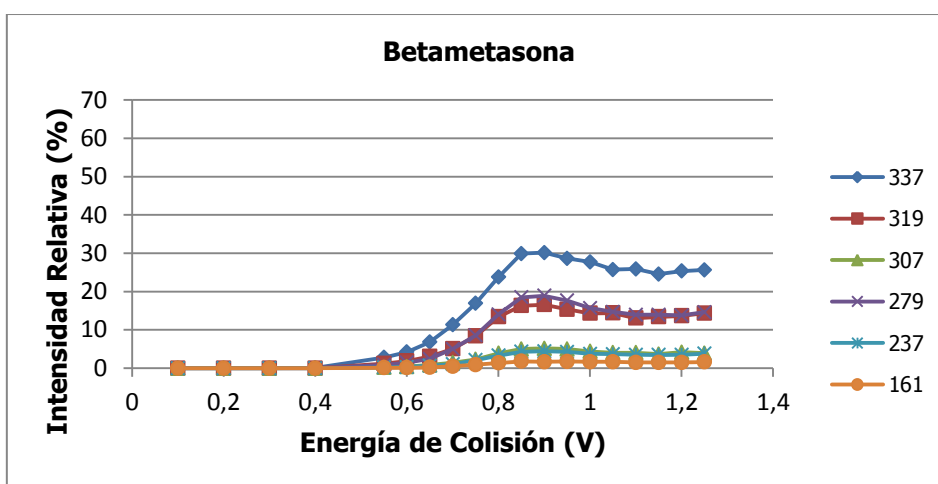
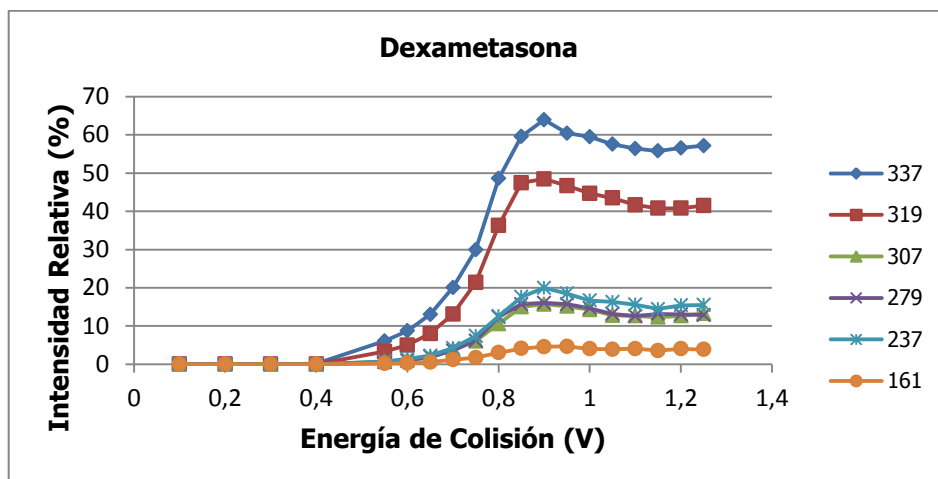


Ilustración 16. Curvas de Fragmentación para Dexametasona y Betametasona en Trampa de Iones. Se muestran los iones para los cuales se observaron las mayores diferencias en abundancias relativas.

Las Ilustraciones 17 y 18 muestran aquellos iones para los cuales no se obtuvieron diferencias significativas en sus abundancias en ninguno de los instrumentos de masa. A partir de 9 eV en el Qq-ToF puede observarse que el ion fragmento mayoritario es el m/z 355 y hay presencia del ion precursor m/z 393; el ion mayoritario debe ser tenido en cuenta para el caso de la determinación del área del pico cromatográfico. Si bien el ion m/z 373 no aporta en la diferenciación de los isómeros, puede ser utilizado para el *matching* según WADA y AORC.

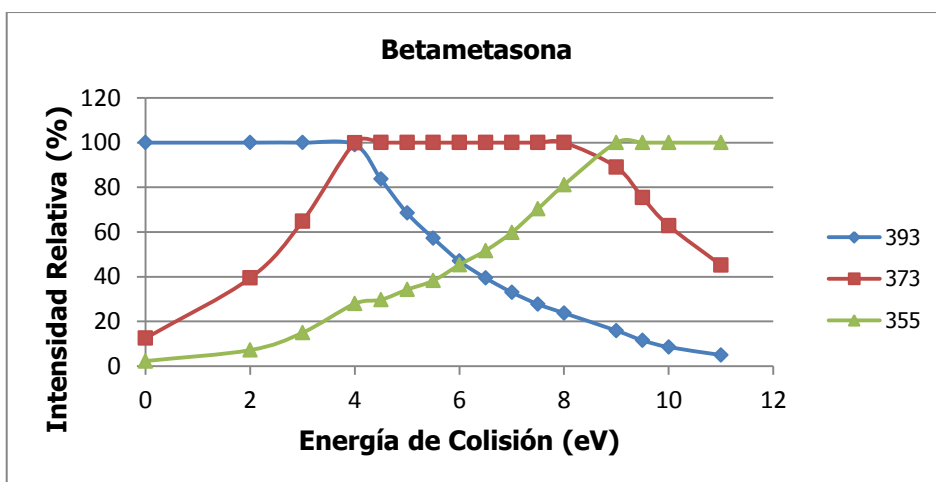
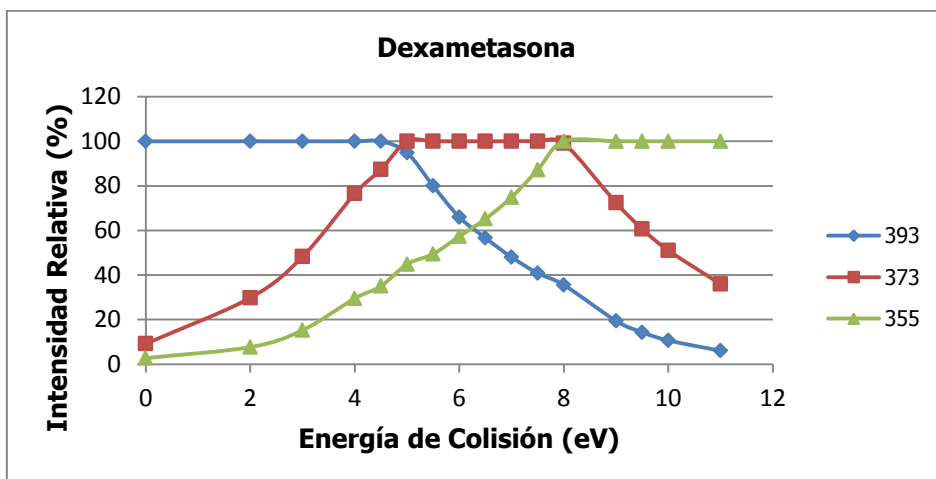


Ilustración 17. Curvas de Fragmentación para Dexametasona y Betametasona en Qq-ToF. Se muestran los iones para los cuales no se observaron diferencias importantes en las abundancias relativas.

A partir de 0.8 V en la trampa de iones, el ion mayoritario es el m/z 373 pero ya no hay presencia del ion precursor m/z 393, una de las razones por la cual la detección en el Qq-ToF podría ser mejor.

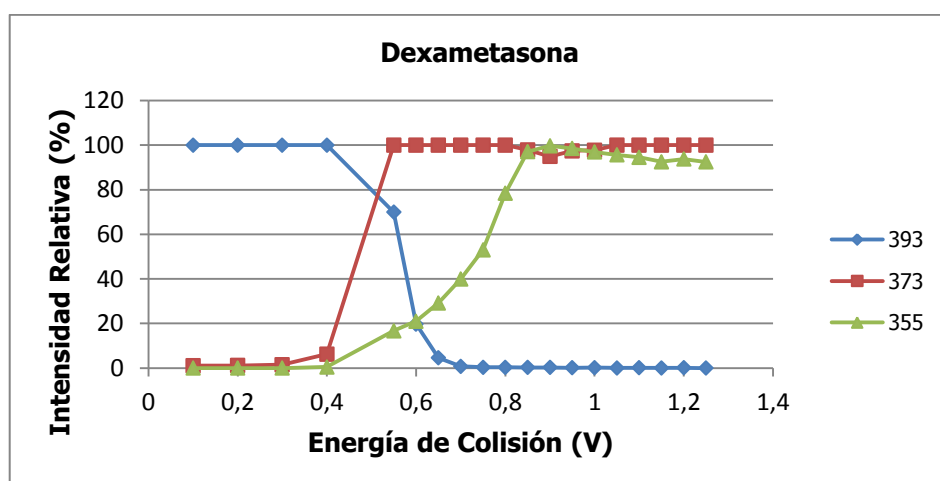
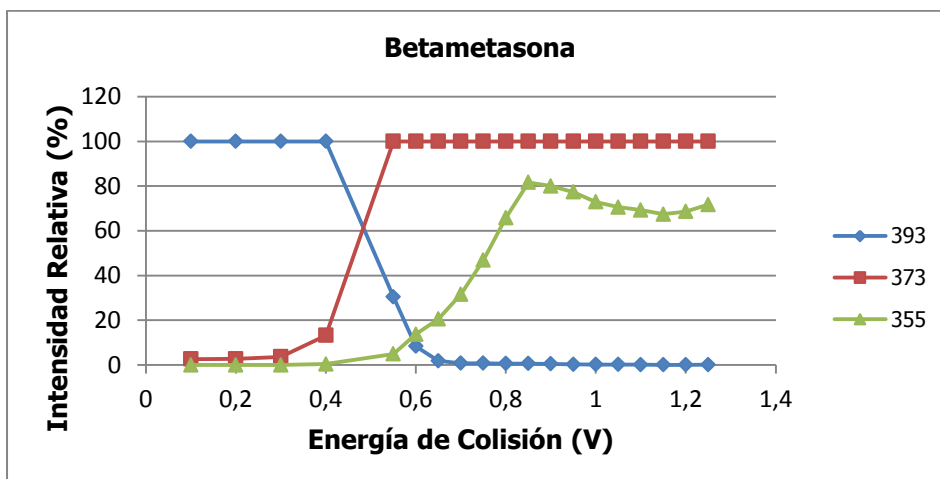


Ilustración 18. Curvas de Fragmentación para Dexametasona y Betametasona en trampa de iones. Se muestran los iones para los cuales no se observaron diferencias importantes en las abundancias relativas.

La ilustración 19 muestra las estructuras de los iones fragmento y el ion precursor para ambos isómeros. La Ilustración 20 muestra un espectro obtenido en Qq-ToF donde se pueden observar las diferencias encontradas y descritas en el análisis de las curvas de fragmentación.

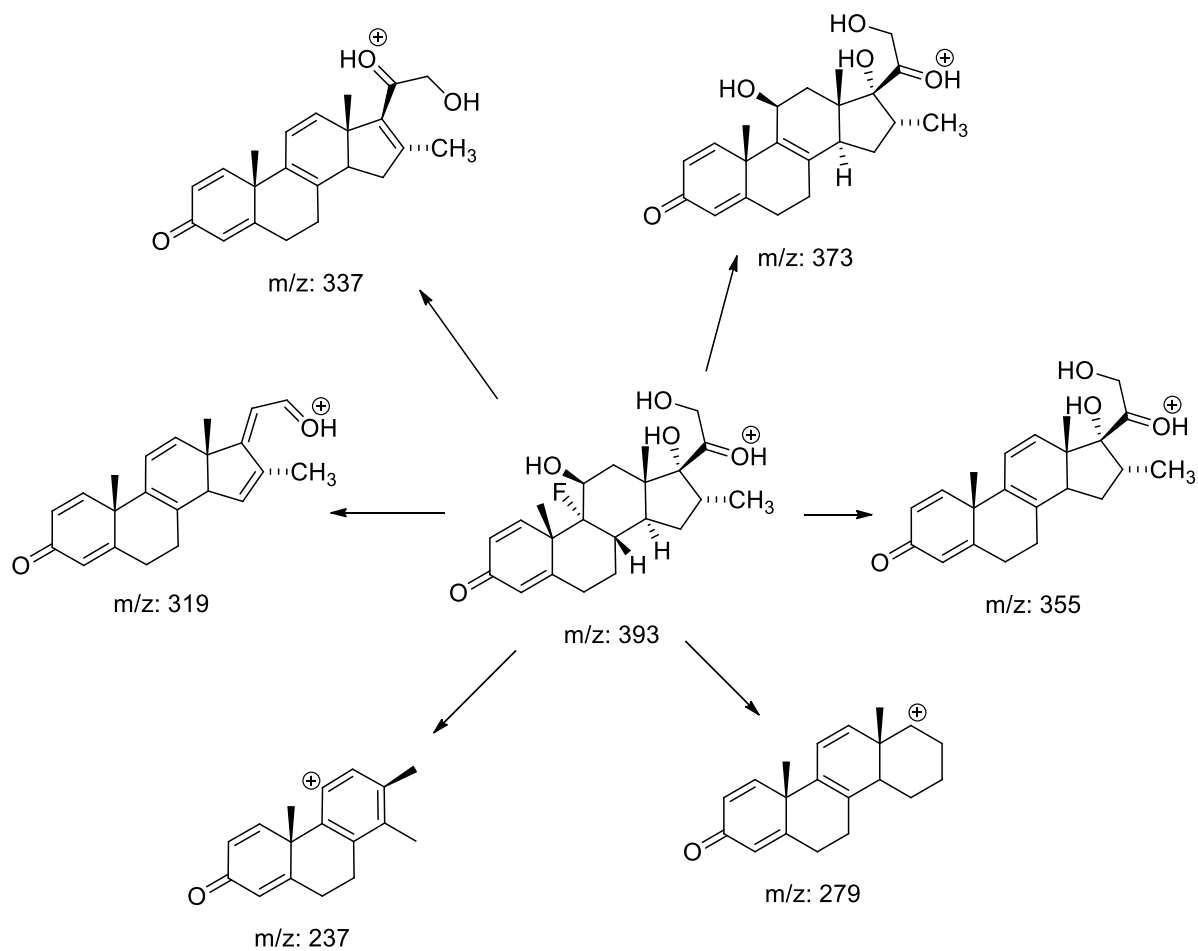


Ilustración 19. Estructura de los iones fragmento obtenidos para dexametasona o betametasona.

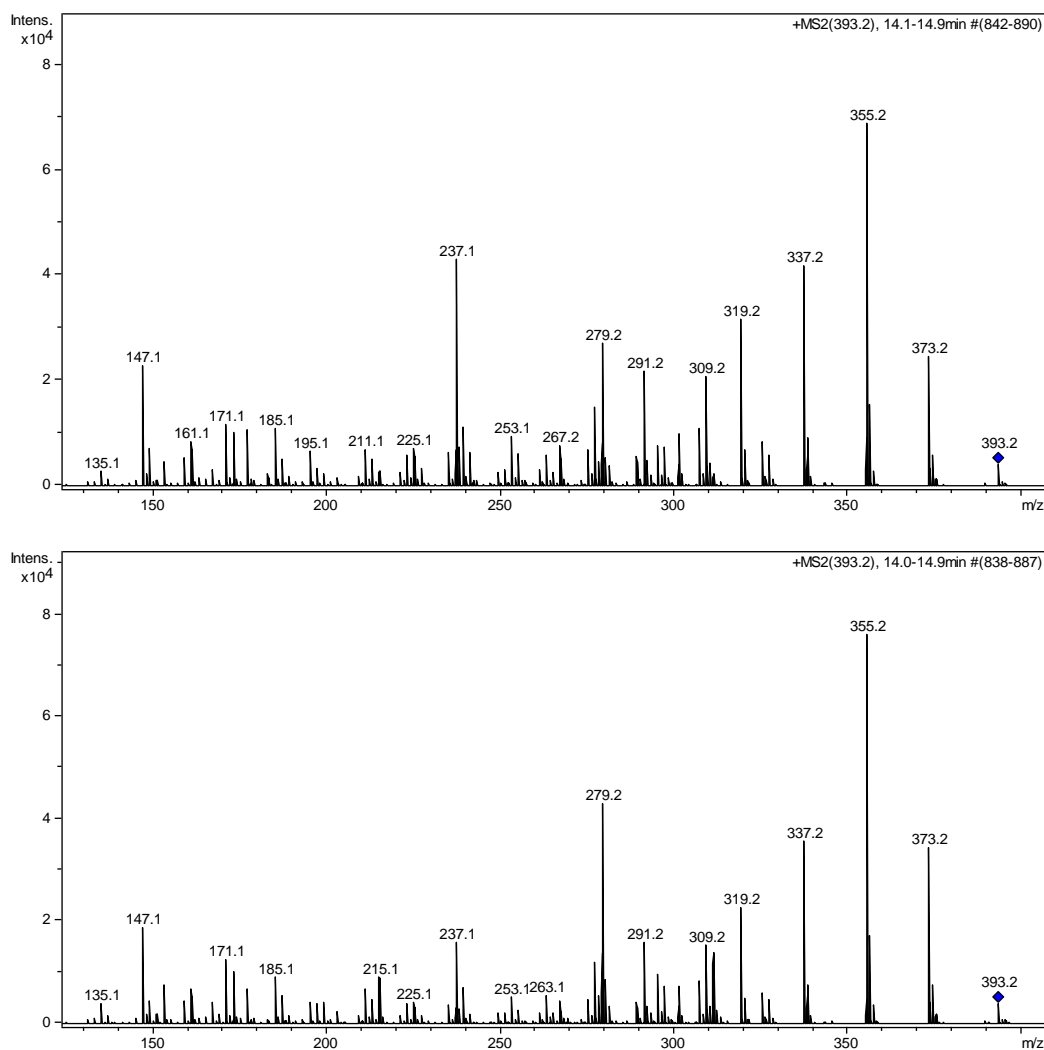


Ilustración 20. Patrón de fragmentación de dexametasona (arriba) y betametasona (abajo) en Qq-ToF. Energía de fragmentación de 11 eV.

3. CLEMBUTEROL, SALBUTAMOL Y FENOTEROL

La molécula de clenbuterol presenta dos átomos de cloro en su estructura, lo que le confiere un patrón particular de distribución isotópica de ^{35}Cl - y ^{37}Cl -, con una relación de intensidades relativas de 9:6:1 para los iones m/z 277, 279, 281 (Ilustración 21). Para el estudio del patrón de fragmentación se seleccionaron los iones m/z 277 y 279 como iones precursores en ambos equipos, de manera de obtener un número adecuado de iones fragmento para los requerimientos de un método confirmatorio (Ilustración 22). En este caso hay reportados en literatura 4 iones fragmentos, dos de los cuales (m/z 132 y 168) no se observan fácilmente en los instrumentos disponibles (Ilustración 23), por lo cual se debe recurrir al patrón particular brindado por los átomos de cloro.

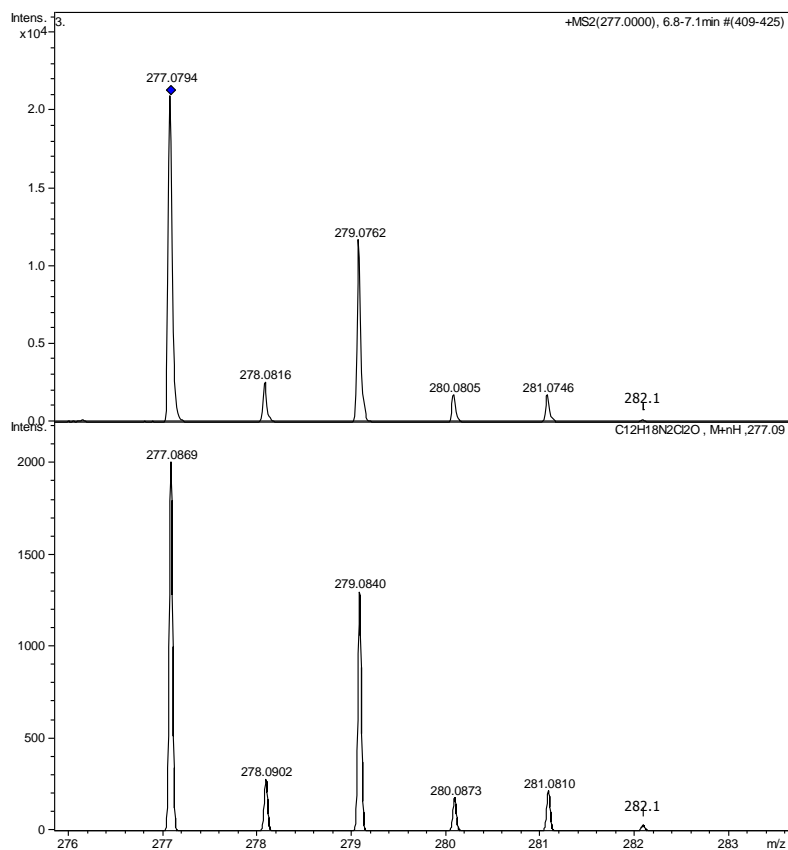


Ilustración 21. Patrón isotópico de clembuterol. Arriba: experimental obtenido en Qq-ToF sin fragmentación, abajo teórico.

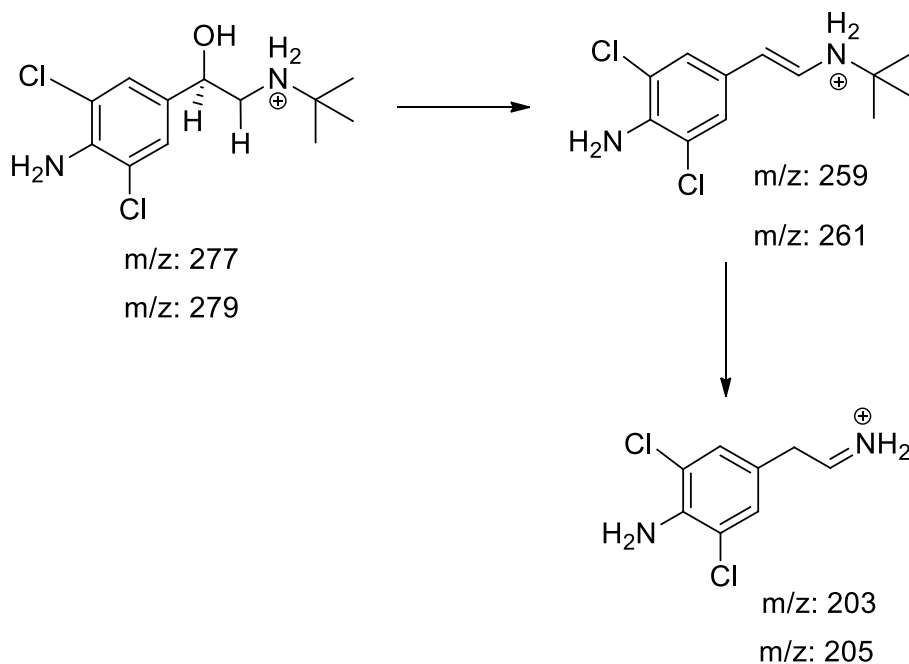


Ilustración 22. Estructura de los iones fragmento obtenidos para clenbuterol. Ion precursor ^{35}Cl o ^{37}Cl .

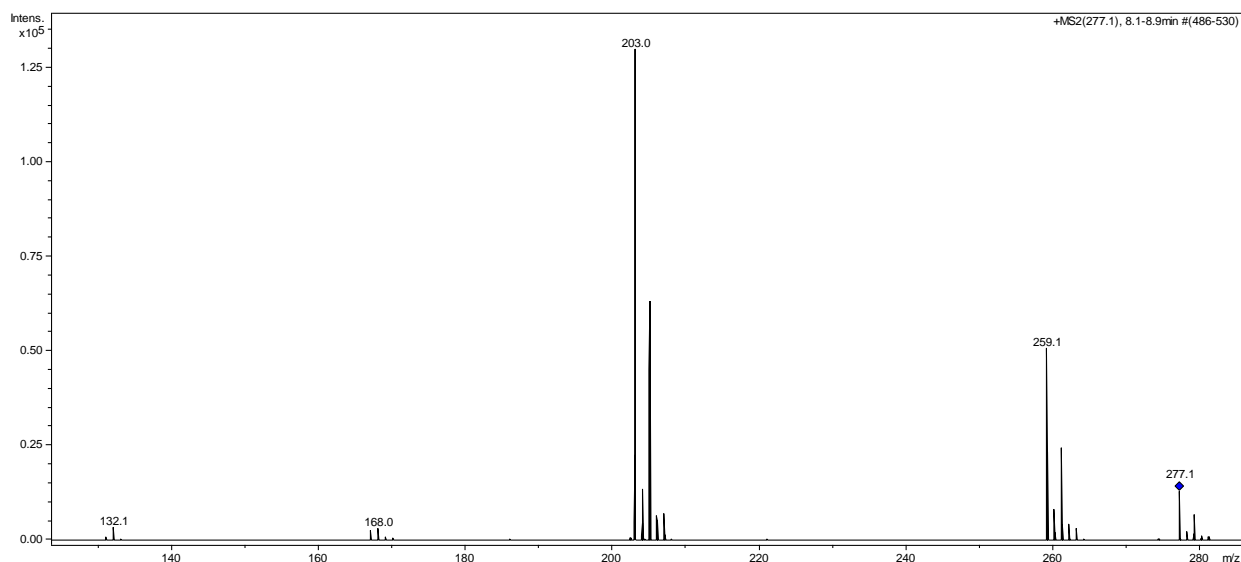


Ilustración 23. Patrón de fragmentación para Clenbuterol. Espectro obtenido a 8 eV en Qq-ToF con m/z 277 y 279 como iones precursoros (ventana de aislamiento de 10 m/z).

Para el trabajo en la trampa de iones, se realizó una optimización de los componentes ópticos del sistema para la transmisión hacia el analizador del ion de interés, m/z 277. Esto se logra mediante la utilización de la herramienta *expert parameter setting* que permite el ajuste automático de los voltajes del capilar, skimmer, trap drive, octapolos y lentes, mientras se inyecta un flujo constante de la solución del analito de interés, en este caso, clenbuterol a 1 µg/mL en ácido fórmico y acetonitrilo (90:10). Estos ajustes permiten obtener una buena señal para el ion m/z 277 y una resolución de una unidad desde el ion m/z 277 a m/z 281; si bien el poder de resolución de un equipo está limitado en parte por su diseño, este puede ser ajustado hasta cierto punto para una detección en particular. El estudio del patrón de fragmentación se realizó con energías que variaron de 0 a 0.75 V. Únicamente hay presencia de dos iones fragmento con intensidades relativas mayores a 10% (m/z 261 y 259)

y que no pueden ser considerados como transiciones diferentes (Ilustración 24 y 25).

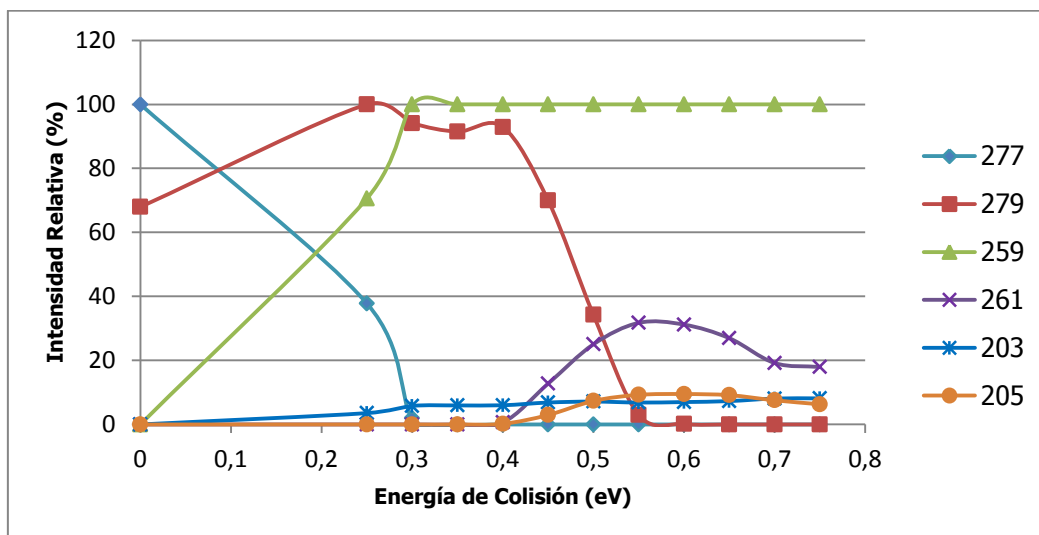


Ilustración 24. Curvas de Fragmentación para clenbuterol en trampa de iones. Iones precursores m/z 277 y m/z 279.

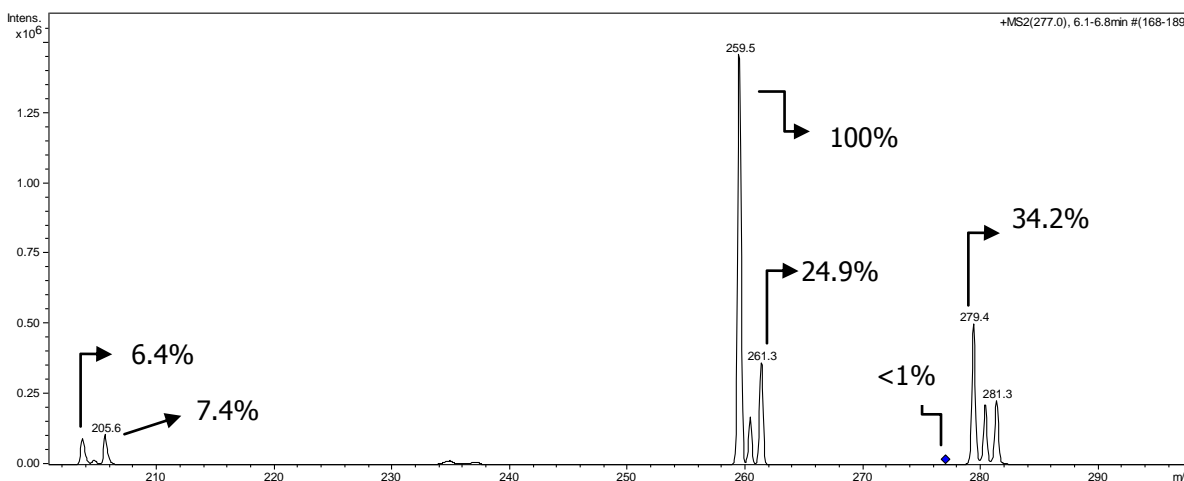


Ilustración 25. Espectro obtenido a 0.50 V durante los ensayos de fragmentación en la trampa de iones, luego de realizar la optimización para el aislamiento del ion precursor m/z 277.

La fragmentación utilizando el detector de cuadrupolo-tiempo de vuelo en cambio, proporciona un número adecuado de iones para la confirmación de la identidad de la molécula considerando las transiciones: m/z 277 a 259 y 203 y m/z 279 a 261 y 205.

Para la determinación de las energías óptimas de fragmentación se utilizó la herramienta *tune collision energy* en el instrumento Qq-ToF, que brinda una primera aproximación del rango de energía en el cual trabajar. Utilizando una solución con flujo constante en la fuente de ionización ESI se optimiza la energía de colisión para obtener 3 iones fragmento y, en una segunda modalidad, se fija la abundancia relativa del ion precursor a un valor mayor a 15%, trabajando en ambos casos en rangos de energía de 0-20 eV. De esta manera se obtuvieron valores optimizados de 10.2 eV y 9.8 eV respectivamente. A partir de estos valores de energía se realizó la curva de fragmentación, en la cual se determinó como el mejor valor de energía de fragmentación 8 eV (Ilustración 26). Para este valor de energía, el ion fragmento mayoritario es el m/z 203 y también hay presencia de los iones 205, 259 y 261 m/z . Además, pueden observarse los iones precursores 277 y 279 m/z y otros iones fragmento de menor abundancia m/z 168 y m/z 132.

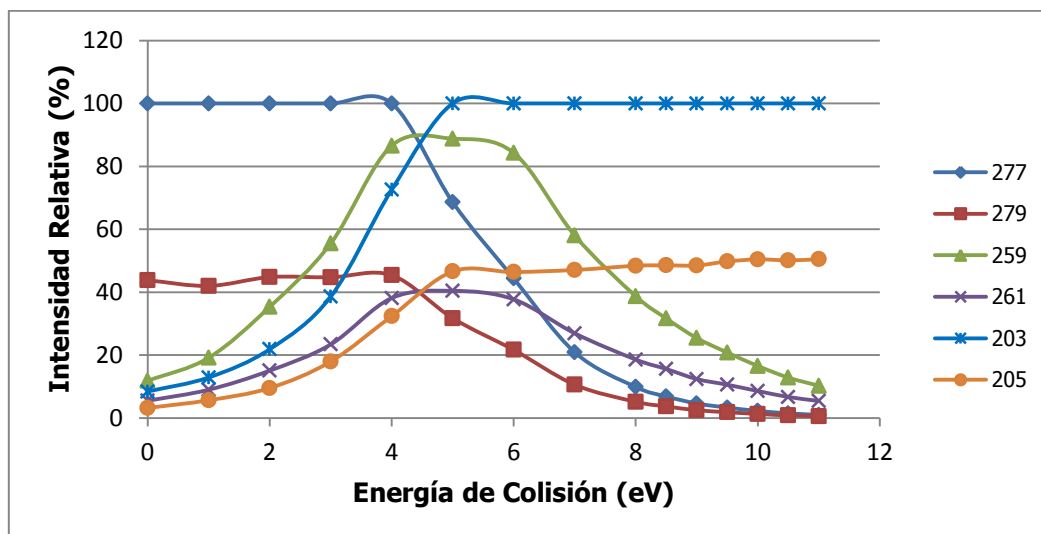


Ilustración 26. Curvas de Fragmentación para clenbuterol en Qq-ToF. Iones precursor m/z 277 y m/z 279.

Para las moléculas salbutamol y fenoterol, la estructura de los fragmentos se muestra en las Ilustraciones 27 y 28. La detección en la trampa de iones presenta las mismas características que para el clenbuterol (número de iones diagnóstico insuficientes). En el instrumento Qq-ToF, se logran espectros MS/MS con tres iones con abundancias relativas adecuadas para análisis confirmatorios (Ilustraciones 29 y 30).

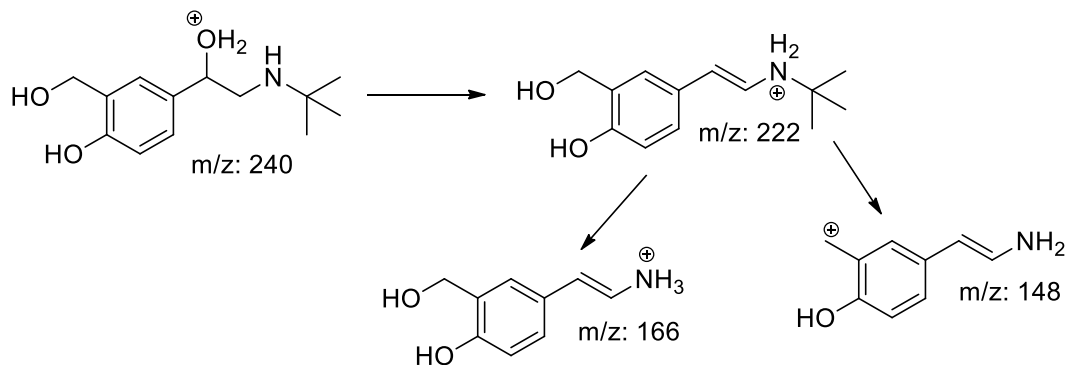


Ilustración 27. Estructura de los iones fragmento obtenidos para salbutamol. Ion precursor m/z 240.

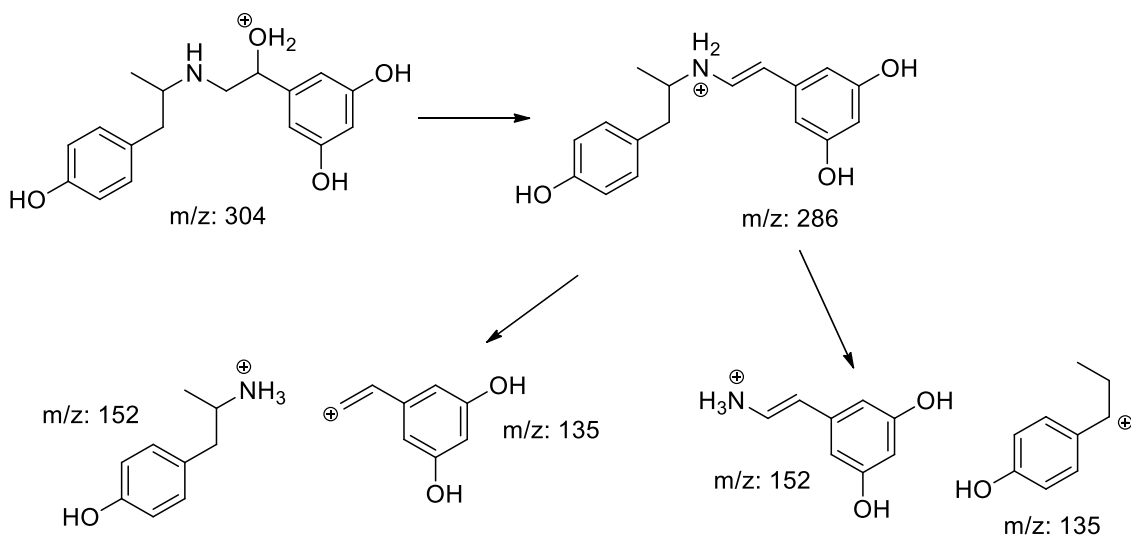


Ilustración 28. Estructura de los iones fragmento obtenidos para fenoterol. Ion precursor m/z 304.

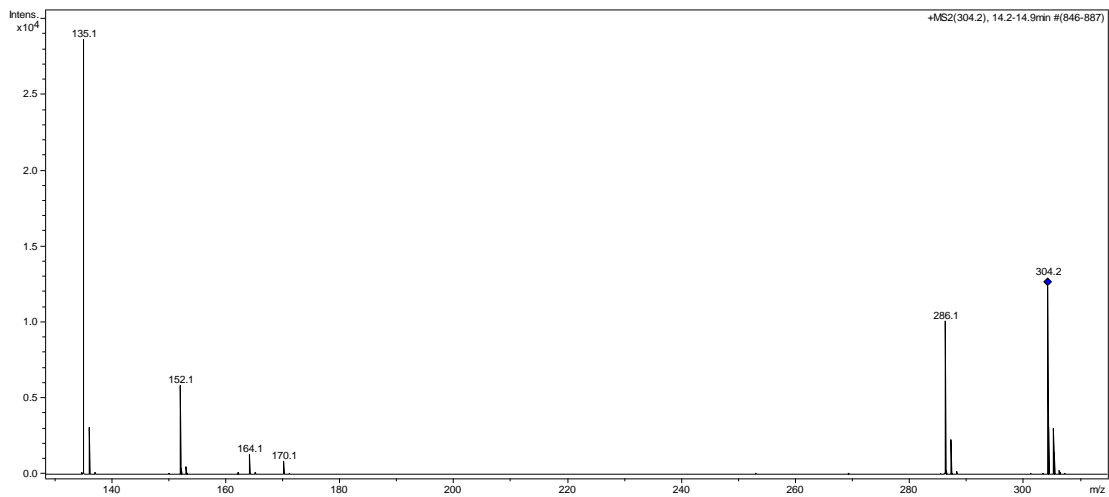
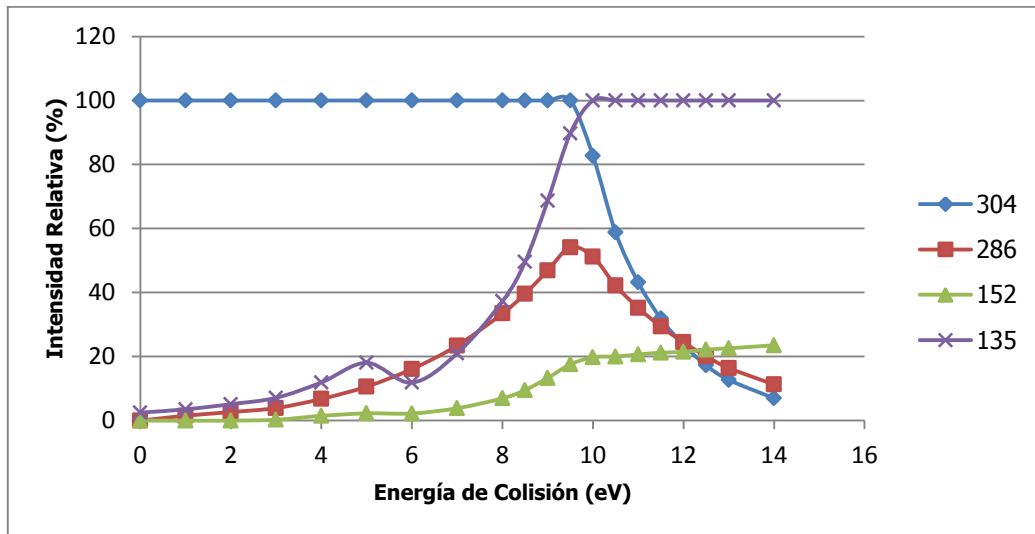


Ilustración 29. Curvas de Fragmentación en Qq-ToF para fenoterol, espectro a 11 eV.

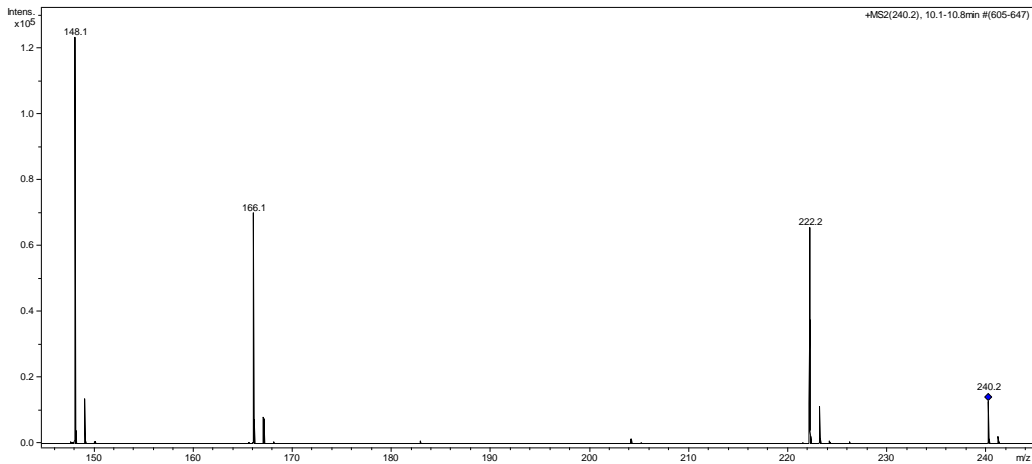
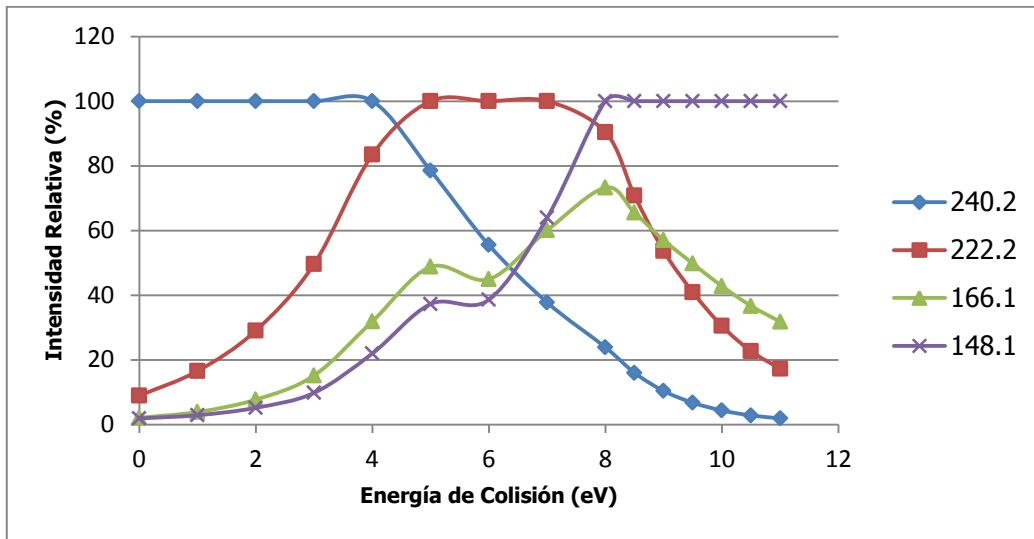


Ilustración 30. Curvas de Fragmentación en Qq-ToF para salbutamol, espectro a 9 eV.

4. **SILDENAFIL**

Para el sildenafil, la estructura de los iones fragmento se muestra en la Ilustración 31. En la trampa de iones se generan varios iones fragmento característicos de sildenafil (m/z 283, 311 y 377), pero en condiciones en las cuales el ion precursor m/z 475 no es observable (Ilustración 32). La detección en el instrumento Qq-ToF, muestra los mismos fragmentos pero en diferentes relaciones, donde para valores de energía mayores a 27 eV, tenemos 3 iones fragmento mayoritarios (m/z 283, 299 y 311) con presencia del ion precursor (lo que asegura la procedencia de los fragmentos). El análisis del gráfico de la Ilustración 33 nos muestra que en el rango de energías de 27.0 a 30 eV, es posible trabajar para obtener una detección adecuada para un método confirmatorio. También son observables otros fragmentos asociados al patrón del sildenafil que aportan en la elucidación de la estructura m/z 163, 377 y 329, como se observa en la Ilustración 34.

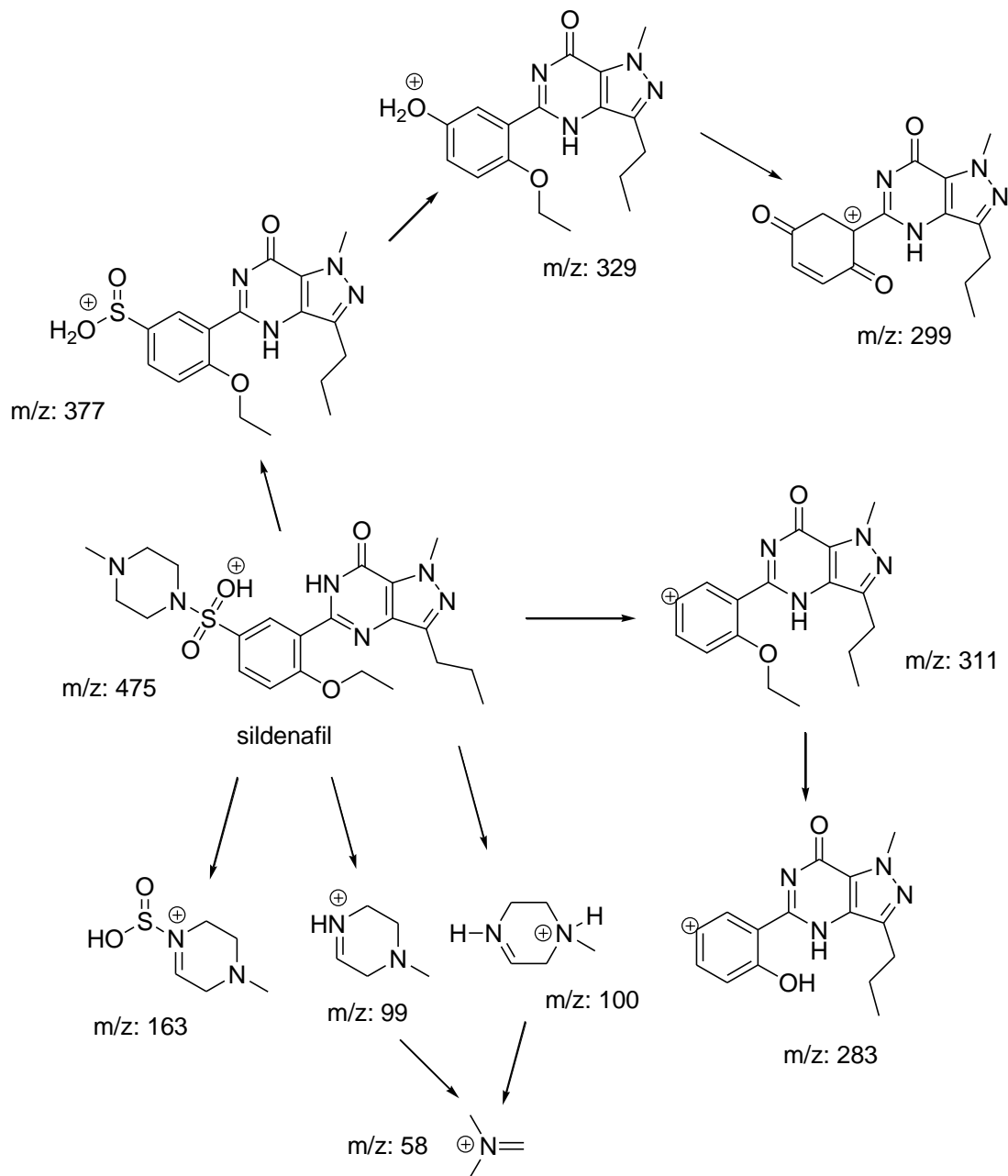


Ilustración 31. Estructura de los iones fragmento obtenidos para sildenafil.

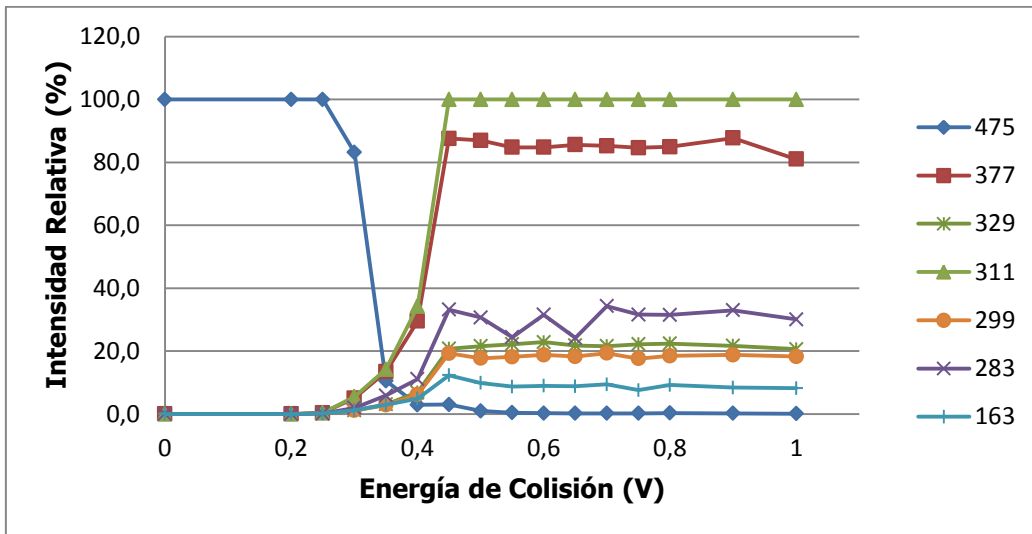


Ilustración 32. Gráficos de fragmentación para sildenafil en trampa de iones.

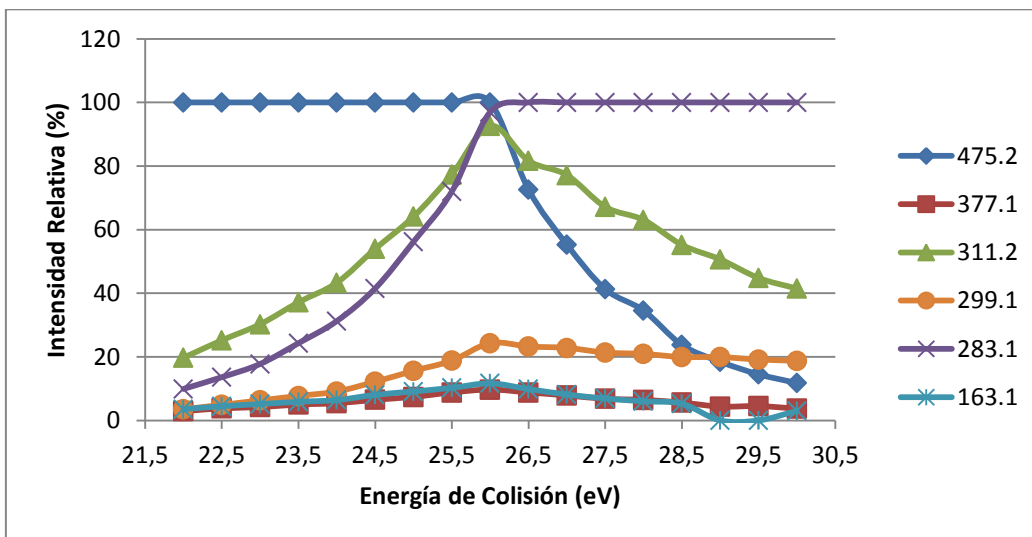


Ilustración 33. Gráficos de fragmentación para sildenafil en Qq-ToF.

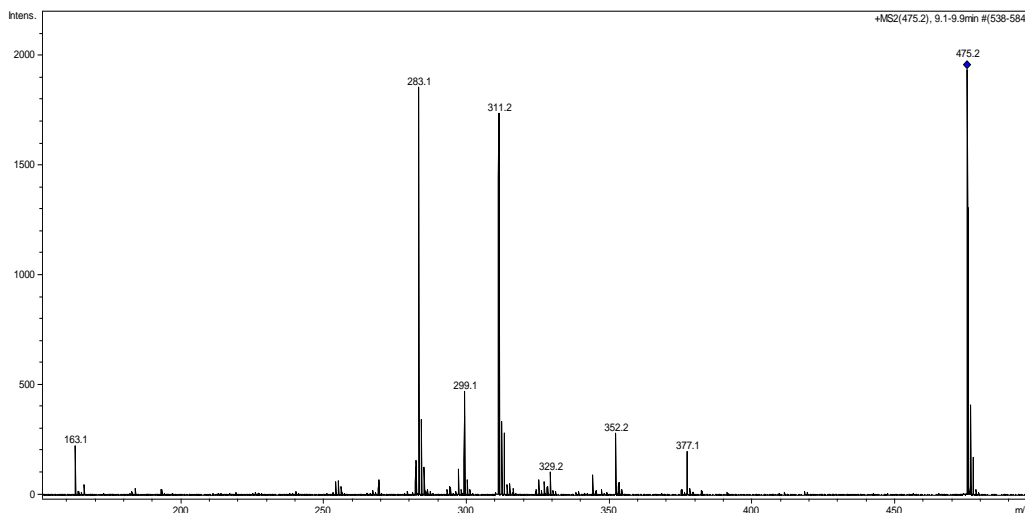


Ilustración 34. Patrón de fragmentación de sildenafil en Qq-ToF a 26 eV.

Otro parámetro importante en el análisis de la fragmentación, es la determinación de la eficiencia del proceso. Considerando la pérdida de iones desde la fuente de ionización al detector, que generalmente se incrementa a medida que aumenta la energía de colisión, es deseable tener una óptima relación de fragmentación con la menor pérdida de sensibilidad posible necesaria en el análisis de trazas. Esto puede ser medido a través de la eficiencia total del proceso de CID (E_{CAD}), eficiencia de la fragmentación (E_f) y eficiencia de la colección de iones (E_C) en función de la energía de colisión en este caso para el ion precursor m/z 475 de sildenafil. Estas curvas muestran el efecto de la variación de la energía del gas de colisión en la cámara de colisión del instrumento Qq-ToF. La eficiencia de fragmentación es deseable que sea mayor a 80% [107] lo cual se alcanza para valores superiores a 26 eV. La eficiencia de colección de iones sin embargo, disminuye a valores menores a 50% a partir de estos valores de energía, por lo cual no es deseable trabajar con energías de fragmentación muy superiores a 26 eV. La eficiencia total del proceso de fragmentación por CID, se mantiene relativamente constante a 40%, que es un valor adecuado que contribuye a la sensibilidad total del proceso (Ilustración 35).

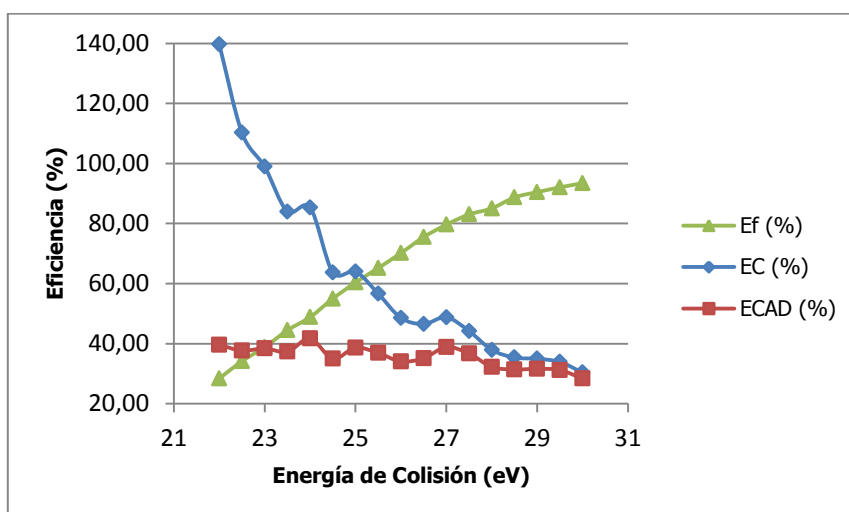


Ilustración 35. Gráficos de eficiencia del proceso de CID (*collision induced dissociation*) en Qq-ToF para sildenafil. Eficiencia de colección de iones (Ec), fracción del ion precursor que es colectada luego de CID, ya sea como ion precursor o iones producto. Eficiencia de fragmentación de iones (Ef), fracción de los iones presentes luego de CID como iones producto. Eficiencia total (ECAD), fracción del ion precursor que es convertido en iones producto que llegan al detector.

B. MÉTODO DE INYECCIÓN DIRECTA: MÉTODO CONFIRMATORIO PARA FLUNIXINA EN ORINA EQUINA

Para la detección de flunixinina en orina equina se desarrollo y se valido un método de inyección directa por LC/Qq-ToF, cuya principal ventaja radica en la supresión de los pasos de extracción con solventes orgánicos. La utilización de una columna corta de HPLC de alta eficiencia (C18, 2.1X30mm, 3.5µm) para la separación cromatográfica de componentes polares y no polares de las muestras de orina y la resolución del pico de flunixinina, hicieron factible el método de inyección directa de las muestras, tratadas únicamente mediante dilución 1:1 con agua ultrapura. El esquema del método desarrollado se muestra en la Ilustración 36.

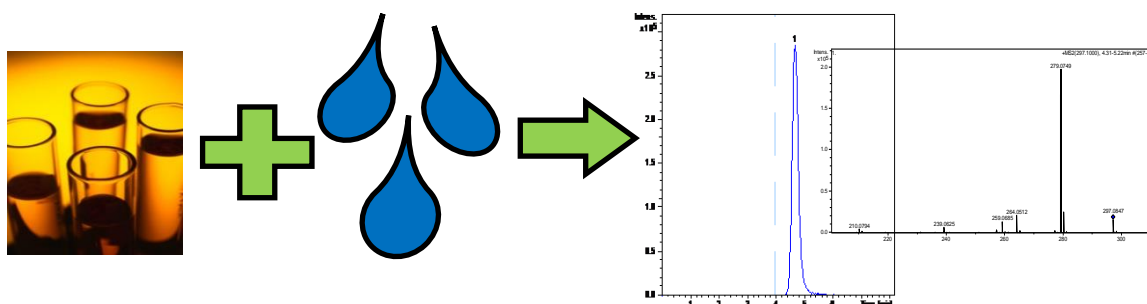


Ilustración 36. Diagrama del Método de Inyección Directa para Flunixinina. La preparación de muestra requiere dilución con agua luego del ajuste a pH 3.

Se realizó la validación del método de acuerdo a los lineamientos para métodos confirmatorios cualitativos. Para ello, se determinaron las cifras de mérito especificidad, límite de detección, repetibilidad del método y del instrumento y precisión intermedia para los diferentes días de analisis. El método analítico fue aplicado al análisis de muestras reales para control de doping, presuntas positivas para flunixinina.

1. DESARROLLO DEL MÉTODO

a. PREPARACIÓN DE MUESTRA Y SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA

En el abordaje de preparación de muestra utilizado para flunixinina, las muestras de orina equina fueron diluidas con agua ultrapura, luego del ajuste a pH 3 (de manera de facilitar la ionización en modo positivo durante la detección). Se inyectaron las muestras para el análisis por HPLC sin posteriores tratamientos.

El método cromatográfico fue una corrida isocrática con bajo contenido de solvente orgánico, en una columna C18 de 2.1 x 30 mm con 3.5 µm de diámetro de partícula. Esta cromatografía permitió la separación inicial de los componentes más polares de la orina y la resolución del pico de flunixinina. Incluso cuando es posible la utilización de corridas más cortas, la separación cromatográfica en este método, puede ser considerada como una etapa de *clean up* para descartar los componentes presentes en la muestra que eluyen tempranamente. La Ilustración 37 muestra un cromatograma de una muestra de orina blanco fortificada con flunixinina con detección por espectrometría de masa en full scan, donde se puede observar que no hay presencia de picos co-eluyentes en el tiempo de retención de flunixinina (aproximadamente 4 min). Esto permite suponer que no habrán interferencias en la detección de flunixinina, además de asegurar que la presencia de los iones fragmento característicos de la flunixinina no se encuentran presentes previo a la fragmentación.

En este método, la separación cromatográfica se realizó en 10 minutos utilizando un volumen total de fase móvil de 3 mL por muestra. Dado que la fase móvil contiene un 28% de acetonitrilo, el volumen de solvente orgánico utilizado fue de 0.9 mL en cada corrida.

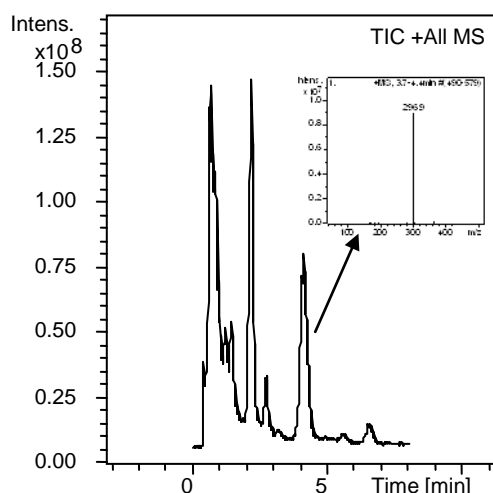


Ilustración 37. Cromatograma con detección en modo Full Scan. Muestra de orina blanco fortificada con flunixin, espectro para el tiempo de retención de flunixin.

b. EFECTO MATRIZ

La Ilustración 38 muestra que no hay un efecto matriz de supresión o potenciación de la ionización significativo al tiempo de retención de la flunixin, lo que indicaría un comportamiento similar para el analito cuando está presente en orina equina. Sin embargo, debido a la gran variabilidad de las matrices complejas como los fluidos biológicos, según algunos autores [21], al menos 5 matrices diferentes deben ser estudiadas para verificar el efecto matriz del método. En este desarrollo, se obtuvieron resultados similares para todas las matrices blanco ensayadas (n=5), Tabla 9.

Tabla 9. Muestras de Orina Equina Blanco utilizadas en el desarrollo y validación del método de flunixina.

Código VEQ	Origen
VEQ 65	Hembra
VEQ 66	Hembra
VEQ 75	Macho tratado con Furosemide
VEQ 77	Macho tratado con Furosemide
VEQ 78	Hembra obtenido por sondaje
VEQ 95	Macho

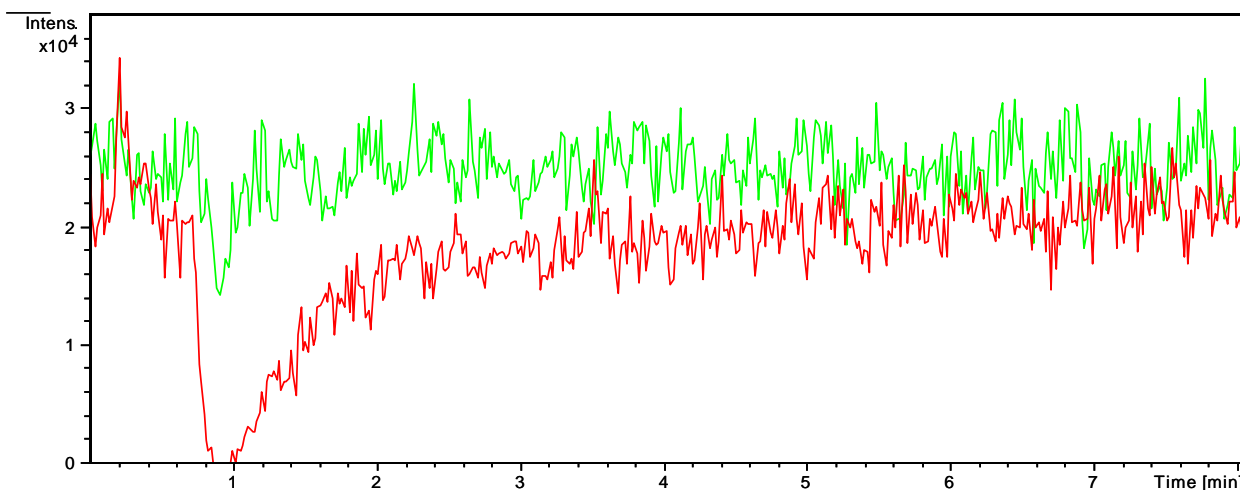


Ilustración 38. Evaluación del Efecto Matriz. Ensayo de doble inyección. Verde: Estándar 200 ng/mL de flunixina. Rojo: Estándar 200 ng/mL de flunixina en presencia del efluente proveniente del cromatógrafo líquido de una muestra de orina equina blanco (Código VEQ 66).

Una de las formas de disminuir el efecto matriz es una mayor dilución de la muestra, lo que también mejora la señal para el analito por espectrometría de masa. La ilustración 39, muestra los ensayos obtenidos para el efecto matriz trabajando con diluciones de las muestras a 1:5 y 1:10, en donde se observa que, si bien el efecto de supresión de señal es mínimo para la dilución 1:1, el efecto es menor aún para la dilución 1:10. Sin embargo, la detección del analito en muestras diluidas a 1:5 y 1:10 no fue óptima, obteniéndose señales que no siempre cumplen con los requerimientos del método respecto a las abundancias

mínimas de los iones diagnóstico. Se seleccionó entonces la dilución 1:1 de las muestras con agua ultrapura para continuar el desarrollo del presente método.

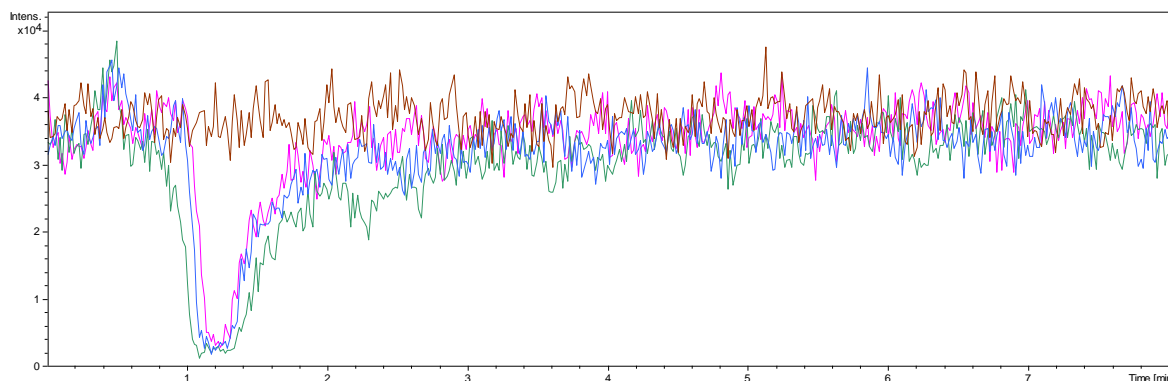


Ilustración 39. Evaluación del efecto matriz. Ensayo de doble inyección trabajando con una dilución de la matriz blanco de 1/10 (rosado); 1/5 (azul); 1/2 (verde). Estándar de flunixinina 200 ng/mL (marrón).

En el año 2013 los nuevos lineamientos por parte de la AORC [26] indican que el límite de recomendado para la flunixinina disminuyó a 50 ng/mL en lugar de 200 ng/mL (que fue el valor utilizado en este desarrollo) [115]. Parte del futuro trabajo con este método implica la disminución del límite de detección y el uso de mayores diluciones de la muestra, es una de las estrategias a considerar. El efecto matriz disminuye con una mayor dilución de la muestra pero la detección y fragmentación de los iones del analito debe ser optimizada. Si bien son límites sugeridos y cada laboratorio de control de doping debe establecer sus propios protocolos de funcionamiento, es deseable cumplir las recomendaciones de AORC. Es así que en futuros trabajos, el método debe ser actualizado para esta cifra de mérito.

2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Para el método desarrollado para la confirmación de flunixinina en muestras de orina equina, la determinación de la especificidad se llevó a cabo mediante el análisis de muestras de orina equina fortificadas con una mezcla de drogas comúnmente buscadas en control de doping (fortificadas a un nivel de 500 ng/mL) y muestras de orina equina blanco. Los datos obtenidos de la confirmación de flunixinina fueron comparados con los datos obtenidos de muestras fortificadas únicamente con flunixinina (fortificadas a 500 ng/mL) y corridas en el mismo set de muestras. Se analizaron también muestras blanco que reflejaran las diferentes características que pueden presentar las matrices con las que se trabaja (orina equina de macho, macho tratado con furosemide y hembra). La identificación de la droga de interés fue inequívoca en todos los casos y no se detectó presencia de la señal de interés en las muestras de matriz blanco. La Tabla 10 muestra las intensidades relativas de los iones fragmentos obtenidos para las muestras y sus respectivos rangos AORC calculados en base a las muestras fortificadas solo con flunixinina. En todos los casos la relación S/N para las transiciones mostradas fueron mayores a 3. La Ilustración 40 muestra el espectro de masa generalmente obtenido para una matriz blanco.

Tabla 10. Determinación de especificidad. Rangos AORC determinados utilizando muestras fortificadas con flunixinina. Diferentes matrices fortificadas con Mix 1 o Mix 2. Matriz 1: Orina de hembra. Matriz 2: Orina de macho. Matriz 3: Orina de macho tratado con furosemide.

		TIEMPO DE RETENCIÓN (MIN)		INTENSIDAD RELATIVA DE LOS IONES FRAGMENTO (%) OBTENIDOS Y RANGOS AORC (%)					
		RT (MIN)	RANGO AORC	279 m/z	RANGO AORC	264 m/z	RANGO AORC	259 m/z	RANGO AORC
MATRIZ 1	Mix 1	4.3	4.1 -4.5	100	60-100	9.8	0-29.7	5.6	0-25.9
	Mix 2	4.3		100		9.2		5.6	
MATRIZ 2	Mix 1	4.4	4.1 -4.5	100	60-100	12.4	0-31.4	6.3	0-26.5
	Mix 2	4.4		100		12.1		6.3	
MATRIZ 3	Mix 1	4.4	4.2-4.6	100	60-100	11.5	0-30.7	6.9	0-26.8
	Mix 2	4.4		100		10.6		6.9	

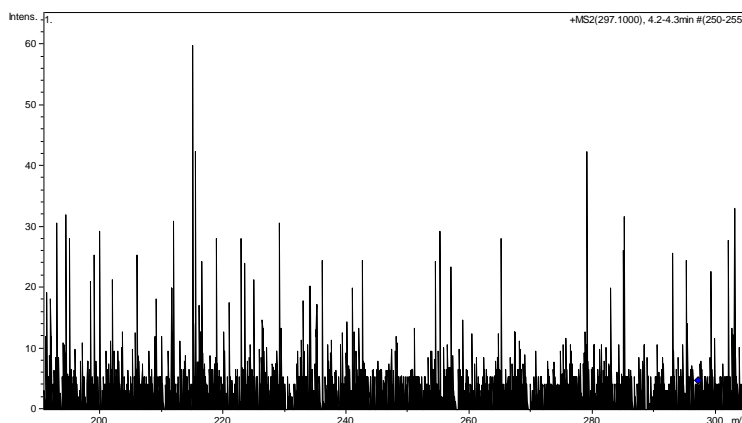


Ilustración 40. Espectro característico de una matriz blanco. Espectro obtenido mediante detección en modo *product ion scan* del ion precursor m/z 297.

El límite de detección fue de 75 ng/mL, determinado como la menor concentración a la cual el 100% de las muestras analizadas fueron positivas (Ilustración 41), tomando en cuenta la relación S/N del pico cromatográfico mayor a 3, el área de la transición m/z 297 a 279 mayor a 10000 y la relación

S/N mayor a 3 para la transición m/z 297 a 259 que es la transición minoritaria (Ilustración 42).

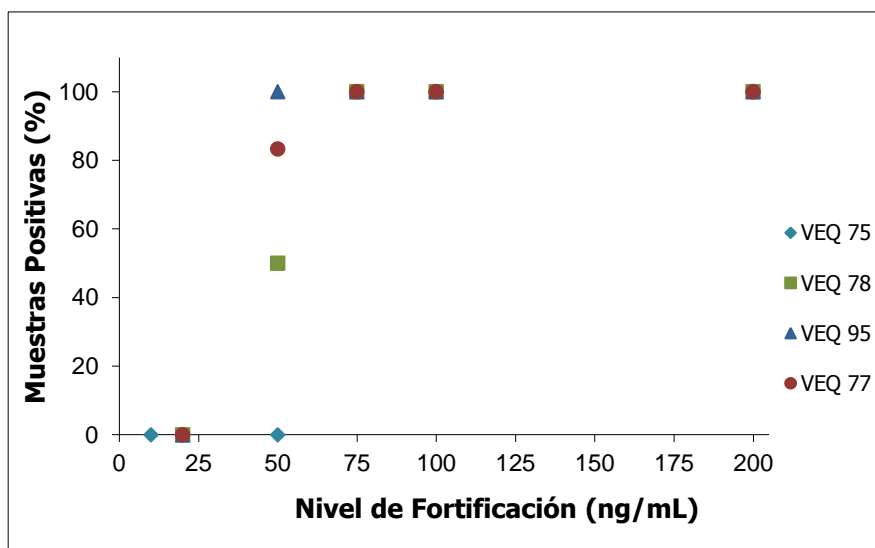


Ilustración 41. Determinación del Límite de Detección. Se trabajó con 4 matrices blanco diferentes para la determinación del mismo. Se muestra para cada una el porcentaje de muestras positivas en cada nivel de concentración (n=6 para cada nivel de concentración).

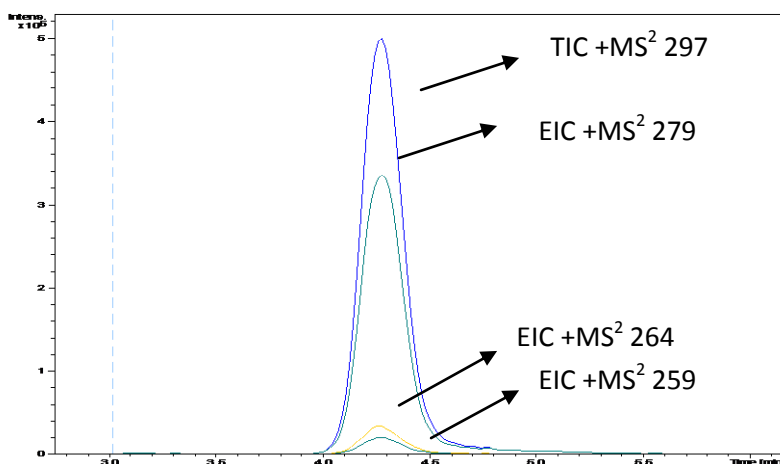


Ilustración 42. Cromatograma de iones extraídos (EIC) para flunixin. MS/MS para el ion precursor m/z 297 y EIC para las transiciones a m/z 279, 264 y 259. Qq-ToF energía de colisión 21 eV.

La repetibilidad del instrumento fue evaluada mediante inyecciones de una misma muestra (n=5) y determinada en 2.4% de desviación estándar relativa (RSD). La repetibilidad del método analítico fue determinada en 4.6% RSD evaluada a una concentración de 200 ng/mL; se trabajó a esta concentración ya que era el límite establecido por AORC para la droga en el año 2011 y así poder ver el comportamiento del método a este nivel. La precisión intermedia para los diferentes días de análisis fue de 6.2% RSD, también trabajando a una concentración de 200 ng/mL (test estadístico de ANOVA, 95% de confianza). Aun cuando los valores de desviación estándar son altos, es importante notar que estamos trabajando con un método cualitativo y que tampoco utiliza estándar interno.

La mayoría de los métodos desarrollados para la determinación de flunixinina llevan a cabo un paso de hidrólisis enzimática para la liberación de la droga conjugada. Durante el desarrollo de este método se probaron diferentes condiciones de tratamiento enzimático (enzima β -glucuronidasa, 50°C y pH 5, incubación 1h u *overnight*). Los resultados obtenidos muestran un incremento en la señal respecto de las muestras no tratadas (Ilustración 43). Sin embargo, en todas las muestras reales positivas analizadas para flunixinina los valores detectados se encuentran muy por encima del límite de detección del método y del límite establecido por AROC. De manera que el criterio adoptado para la utilización de tratamiento enzimático fue que, solo en caso de muestras positivas durante *screening* y que fueran dudosas en el análisis confirmatorio, se repetirían con tratamiento enzimático. Los blancos utilizados para el desarrollo del método si fueron tratados con enzima.

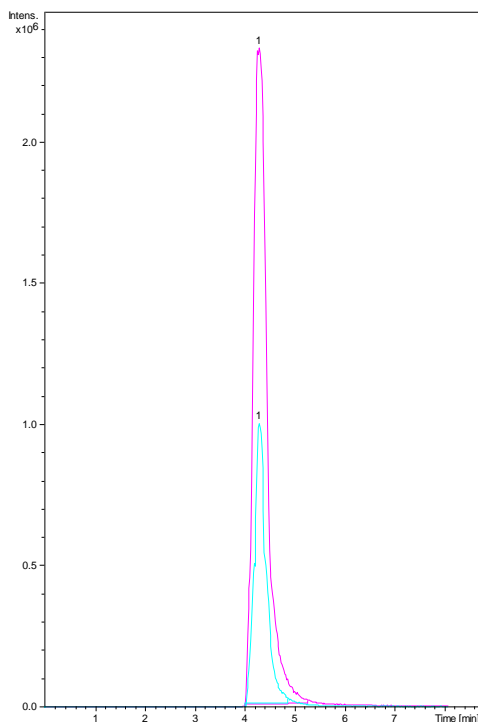


Ilustración 43. Muestra Positiva para flunixinina (código VEQ 88). Rosado: con tratamiento enzimático previo. Celeste: sin tratamiento enzimático.

3. APLICACIÓN EN CONTROL DE DOPING

La Ilustración 44 muestra los espectros de masa obtenidos en el análisis de una muestra control positiva y de una muestra real que resultó ser positiva para la presencia de flunixinina. El tratamiento que se le da a los datos resultantes de los análisis de un control positivo (fortificado) y la muestra "problema" se resume en la Tabla 11.

A partir de la misma se puede establecer el "matching" de las intensidades relativas de los iones para la muestra problema con los rangos de tolerancia AORC determinados con el control positivo cumpliéndose con los requerimientos establecidos para considerar la muestra como positiva para la presencia de flunixinina. Se muestran adicionalmente los rangos WADA que son más estrictos y son normalmente chequeados en nuestro laboratorio previo al informe definitivo de la muestra.

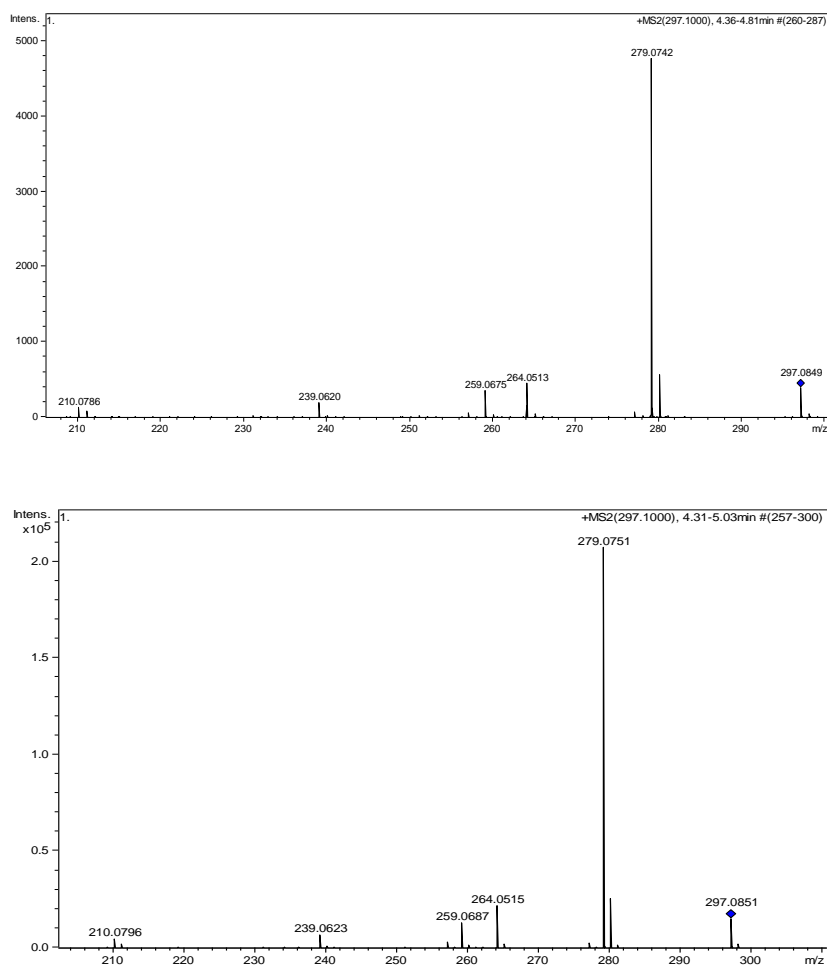


Ilustración 44. Resultados de un análisis confirmatorio. Espectro de Masa para un Control Positivo (Arriba) y Muestra Real (Abajo).

Tabla 11. Análisis de una muestra presunta positiva para flunixinina. Rangos AORC y WADA determinados utilizando una muestra fortificada con flunixinina.

	TIEMPO DE RETENCIÓN (MIN)		INTENSIDAD RELATIVA DEL ION PRECURSOR Y FRAGMENTOS (%) OBTENIDOS Y RANGOS AORC (%)							
	RT (MIN)	RANGO AORC	297 m/z	RANGO AORC	279 m/z	RANGO AORC	264 m/z	RANGO AORC	259 m/z	RANGO AORC
MUESTRA	4.3	4.1 - 4.5	7.9	0 - 28.3	100	60-100	11.8	0 - 32.1	6.9	0 - 27.6
	RT (MIN)	RANGO WADA	297 m/z	RANGO WADA	279 m/z	RANGO WADA	264 m/z	RANGO WADA	259 m/z	RANGO WADA
MUESTRA	4.3	4.2 - 4.4	7.9	0 - 18.3	100	85 - 100	11.8	2.1 - 22.1	6.9	0 - 17.6

C. MÉTODO DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA CON MICROFIBRAS DE POLIESTIRENO: MÉTODO CONFIRMATORIO PARA DEXAMETASONA Y BETAMETASONA EN ORINA HUMANA

Para la detección de dexametasona y betametasona en orina humana o equina se desarrolló un método utilizando tratamiento de muestra con extracción en fase sólida (SPE) con microfibras de poliestireno (PS) obtenidas por electrospinning. El uso de fibras de pequeño diámetro de escala nano a micro como sorbentes para SPE hace el proceso muy eficiente, permitiendo la reducción de la cantidad de solvente utilizada en el proceso de extracción e incluso pudiendo realizarse la inyección directa del eluido obtenido, suprimiendo el paso de evaporación y reconstitución del mismo. El esquema del método desarrollado se muestra en la Ilustración 45.

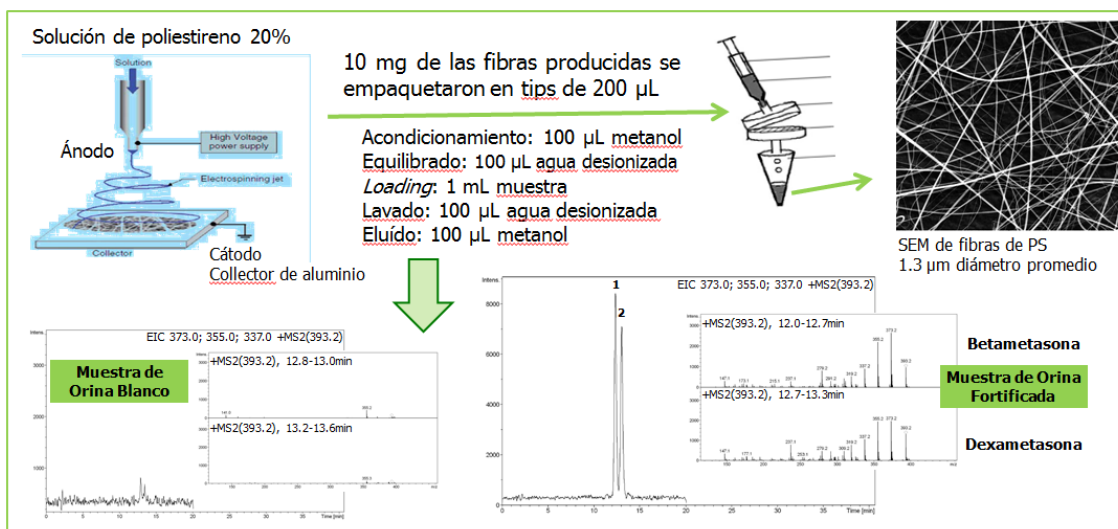


Ilustración 45. Diagrama del Método de Extracción en Fase Sólida con Microfibras de Poliestireno. La preparación de muestra requiere 200 µL de metanol.

De manera de verificar que se cumple con la finalidad adecuada al propósito, se evaluó el límite de detección y selectividad del método desarrollado y se lo comparó con el método analítico utilizado de rutina en el laboratorio para el control de doping de muestras presuntas positivas para dexametasona o betametasona.

1. DESARROLLO DEL MÉTODO

a. SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE LOS EPÍMEROS

Los epímeros betametasona y dexametasona fueron separados cromatográficamente en una columna C18 (4.6 x 150 mm; 5 µm) a 40°C, en modo isocrático (70% Ácido Fórmico 10mM y 30% acetonitrilo) con un flujo de 0.800 mL/min. Los tiempos de retención fueron de 12.1 y 12.9 min respectivamente, con una resolución de picos de 1.1, la cual es adecuada para los objetivos de este trabajo.

Para el estudio de la separación de los isómeros se utilizaron tres tipos de columnas de fase estacionaria reversa con características diferentes y acetonitrilo y ácido fórmico 10 mM como fase móvil, solventes frecuentemente utilizados en columnas de fase reversa y para estos analitos [43].

Como primera aproximación, se utilizó una columna C18 de 30 mm de largo y de tamaño de partícula de 3.5 µm, donde los ensayos en modo isocrático o en gradiente lineal no permitieron la separación a línea de base de los epímeros; la elución de los compuestos era demasiado rápida como para permitir la separación de los isómeros. Ensayos posteriores implicaron la utilización de una columna C18 de mayor largo (150 mm), donde se logra una separación a línea de base con un porcentaje de acetonitrilo de 30% como máximo. Si este porcentaje aumenta, la elución de los isómeros es más rápida y no se alcanza la separación entre los mismos. La combinación de una elución lenta, regulada

por el porcentaje de acetonitrilo, con el mayor largo de la columna permite la separación de los epímeros a línea de base entre los 12 y 14 minutos (Ilustración 46).

Las condiciones desarrolladas con la columna anterior fueron probadas en una columna con diferente fase estacionaria y más larga C8 (250 mm X 4.6 mm; 5 μ m). Esta fase estacionaria retiene menos a los epímeros debido a las cadenas más cortas de hidrocarburos unidas a la sílica. Sin embargo, el mayor largo de la columna parece compensar este efecto y se logra una separación a línea de base de las moléculas pero a tiempos de retención ligeramente superiores (comenzando a los 16 minutos). Con una columna C8 de menor largo (100 mm) y menor tamaño de partícula (3.5 μ m), se obtuvieron las condiciones más eficientes de separación. Si bien se reduce el largo disponible para la separación, esto se ve compensado con el menor tamaño de partícula utilizado. Bajo estas condiciones los tiempos de retención obtenidos fueron de RT1 5.4 min y RT2 5.7 min para betametasona y dexametasona, respectivamente. El porcentaje de acetonitrilo pudo ser aumentado a 35%.

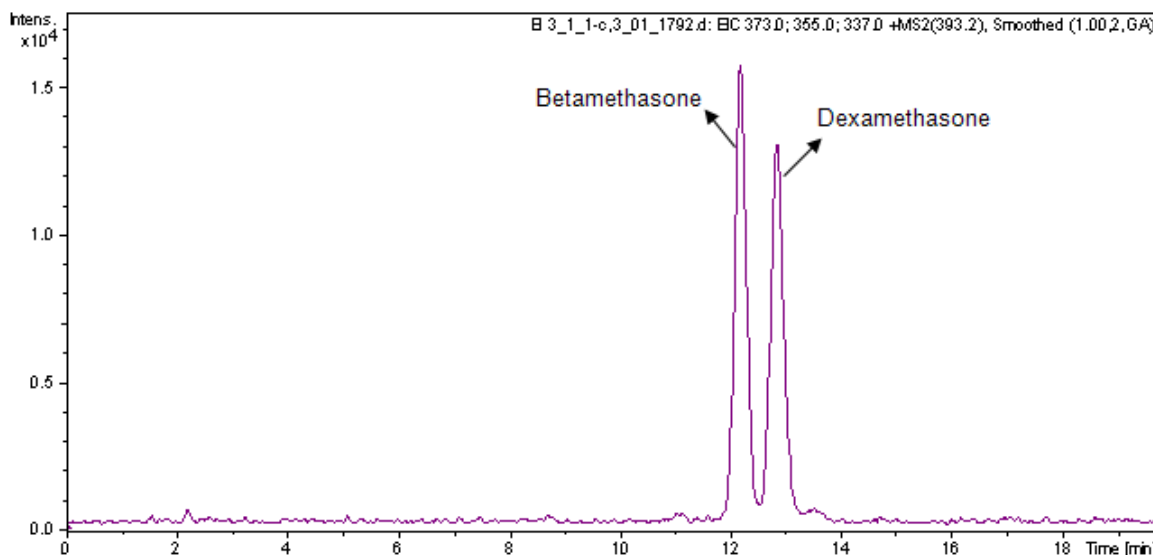


Ilustración 46. Separación de los epímeros betametasona y dexametasona. RT1: 12.1 min betametasona; RT2: 12.9 min dexametasona, obtenido en columna C18 (4.6 x 150 mm; 5 μ m) con fase móvil (A) 70% Ácido Fórmico 10mM (B) 30% acetonitrilo. Instrumento trampa de iones, detección en modo *product ion scan* del ion precursor m/z 393.

b. EFECTO MATRIZ

Se monitoreo la señal en full scan para MS/MS del ion precursor m/z 393.

No se detectó una supresión o potenciación relevante para el tiempo de retención de cada analito, Ilustración 47.

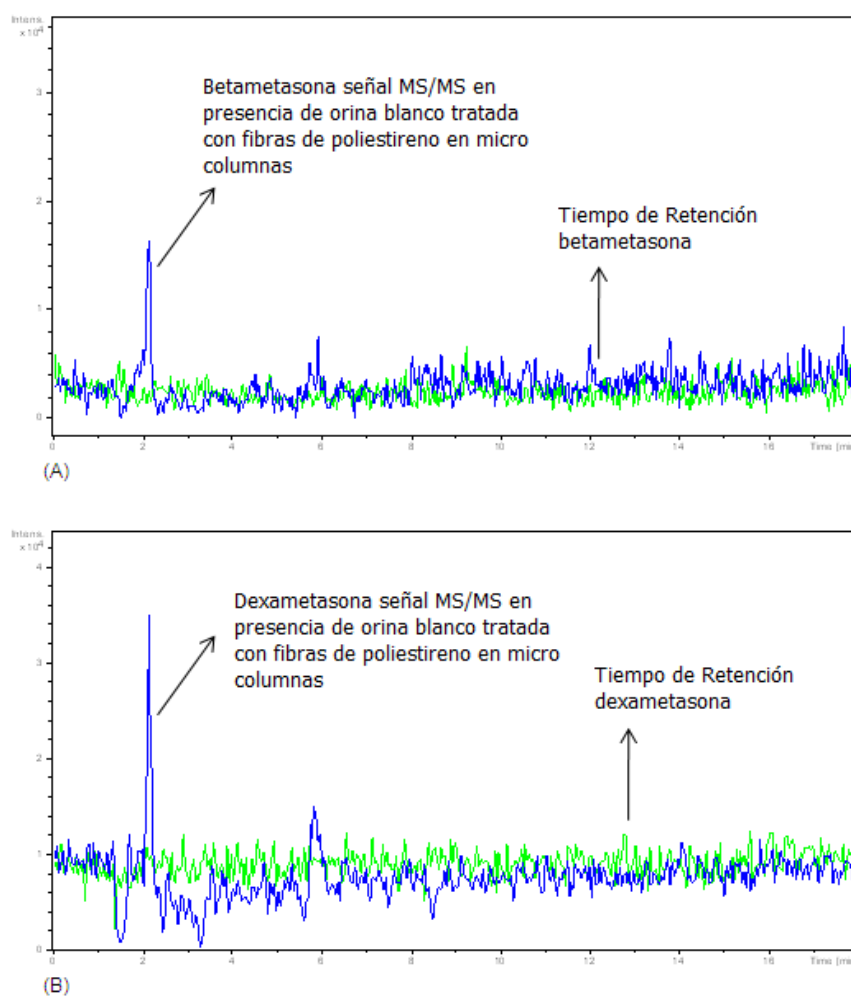


Ilustración 47. Determinación del efecto matriz para dexametasona y betametasona. Monitoreo en modo *product ion scan* del ion precursor m/z 393.

C. PREPARACIÓN DE MUESTRAS

El método de preparación de muestra para estas dos moléculas fue desarrollado en base al trabajo de Chigome et al. [114], donde se utilizaron dispositivos miniaturizados de extracción en fase sólida con una fase estacionaria de microfibras producidas por electrospinning. En este trabajo, la fase estacionaria particulada normalmente utilizada en los dispositivos SPE fue sustituida por microfibras de poliestireno. Este polímero es capaz de retener los analitos de interés por interacciones π - π [77].

También fueron sintetizadas fibras a partir de otros polímeros como acetato de celulosa (diámetro promedio 1.8 μm) y polisulfona (diámetro promedio 1.3 μm). Las fibras de celulosa se utilizaron como control negativo, ya que no se espera retención de los analitos en las mismas. Con fibras de polisulfona, los ensayos preliminares mostraron curvas de volumen de corte donde no se detectó presencia de los analitos luego de 4 mL de volumen de elución, por lo cual se espera que las mismas tengan mayor volumen de carga que las de poliestireno.

El método desarrollado requiere únicamente 200 μL de metanol por muestra y puede realizarse en aproximadamente 15 minutos. En contraste, el método actualmente en uso en el laboratorio para el análisis confirmatorio de estas drogas en matriz de orina equina, consta de tres pasos de extracción líquido-líquido con diclorometano, utilizando 15 mL de solvente e insumiendo aproximadamente 40 minutos por muestra.

d. FIBRAS PRODUCIDAS POR ELECTROSPINNING

Las fibras de poliestireno obtenidas por electrospinning fueron preparadas para la utilización como sorbentes en extracción en fase sólida y sus características morfológicas y diámetro promedio determinadas mediante microscopía de escaneo electrónico (Ilustración 48) se encuentran resumidas en la Tabla 12. La

integridad de la estructura del polímero luego del proceso de electrospinning fue confirmada por espectroscopia infrarrojo, Ilustración 49.

Ensayos preliminares de eficiencia de extracción utilizando las fibras de diferentes diámetros (obtenidas a partir de soluciones de diferente concentración de poliestireno) fueron realizados en solución con detección por espectroscopia ultravioleta (240 nm). Los resultados en la Ilustración 50 muestran que la eficiencia de extracción mejora cuando el diámetro de las fibras disminuye. En base a estos resultados y a la capacidad de controlar el proceso de electrospinning (ej. temperatura, humedad ambiente, etc. [85-89]), se procedió a la síntesis de fibras con una solución de poliestireno 20% wt en cantidades suficientes para la caracterización del proceso en SPE. El diámetro promedio de las fibras obtenidas fue de 1.3 μm (Ilustración 51).

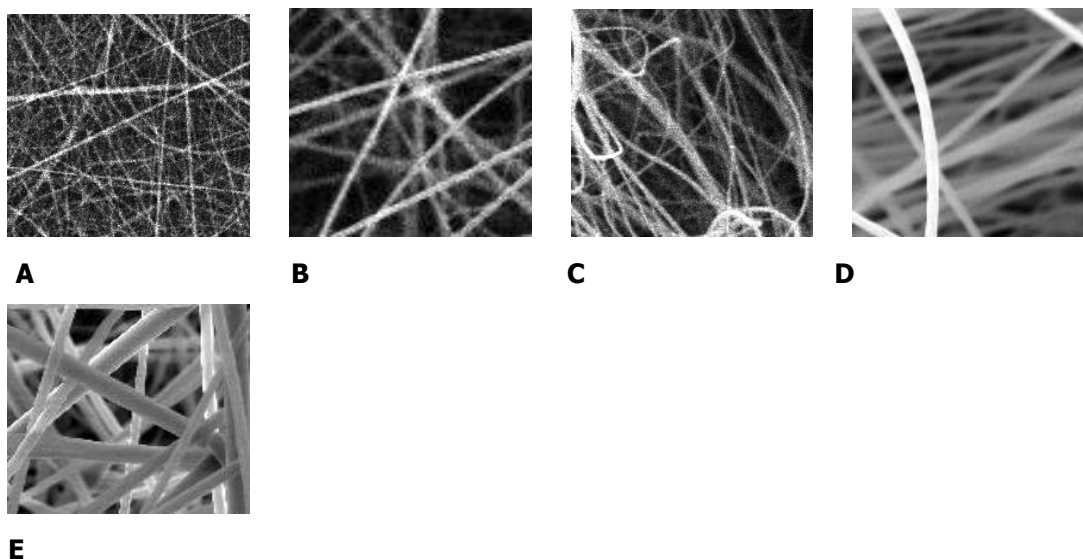


Ilustración 48. Microscopia de escaneo electrónico de las fibras sintetizadas. A: Poliestireno 15%; B: Poliestireno 20%; C: Poliestireno 25%; D: Poliestireno 30%; E: Poliestireno 35%. Escala 100 μm .

Tabla 12. Condiciones de electrospinning y características de las fibras obtenidas.

CONCENTRACIÓN POLIESTIRENO	SOLVENTE (v/v)	FLUJO (mL/h)	MORFOLOGÍA DE FIBRAS	DIÁMETRO (nm)
15	DMF/THF (3:7)	0.05	Suave	716
20	DMF/THF (3:7)	0.05	Suave	1343
25	DMF/THF (4:1)	0.01	Suave	980
30	DMF/THF (3:7)	0.12	Suave	2338
35	DMF/THF (3:7)	0.12	Suave	3213

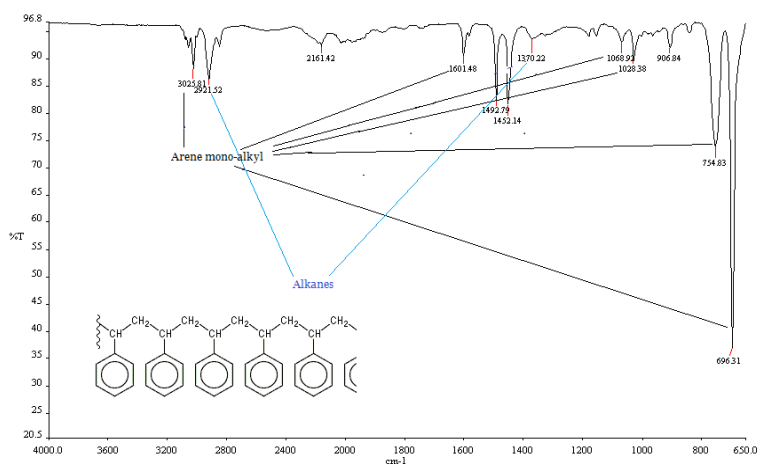


Ilustración 49. Microscopia de infrarrojo para caracterización de las fibras de poliestireno.

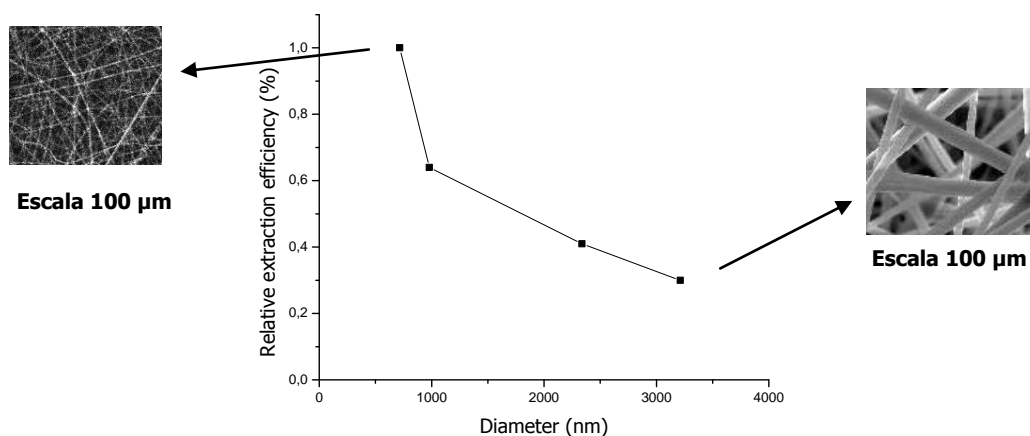


Ilustración 50. Efecto del diámetro de fibras de poliestireno en la eficiencia de extracción.

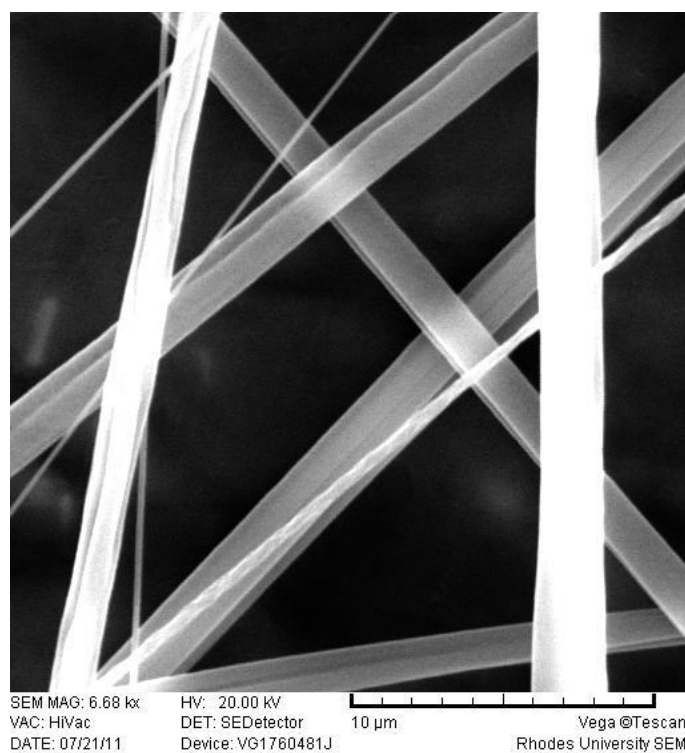


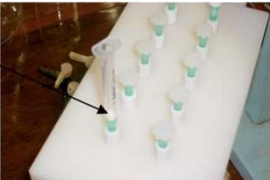
Ilustración 51. Microscopía de Escaneo Electrónico (SEM) de fibras de poliestireno sintetizadas con diámetro promedio de 1.3 μm. Solución de poliestireno 20%wt.

e. DISPOSITIVOS DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA EMPAQUETADOS CON MICROFIBRAS DE POLIESTIRENO


Para evaluar el uso de las fibras como sorbentes para SPE, se evaluaron dos configuraciones de empaquetado diferentes, micro columnas y discos. La performance de los sistemas de empaquetado fue determinada mediante la evaluación de las recuperaciones de ambos analitos a partir de soluciones acuosas. El sistema de micro columnas permitió elevadas recuperaciones (betametasona 90.9 +/- 2.7% y dexametasona 89.3 +/- 2.2%), mientras que en el caso del formato en discos, las grandes variaciones en las recuperaciones probablemente indican el empaquetado poco homogéneo de los mismos y el menor número de platos del sistema (Tabla 13). De esta manera, las micro columnas fueron seleccionadas para posterior caracterización y desarrollo del método de preparación de muestra.

Tabla 13. Recuperaciones de betametasona y dexametasona en muestras de agua fortificada (n=3). Solución de 5 µg/mL usando dos configuraciones de dispositivos diferentes. Esquema de cada uno de los dispositivos utilizados.

DISPOSITIVO DE SPE		
	DISCOS	
	RECUPERACIÓN (%)	RSD (%)
BETAMETASONA	62,1	40,8
DEXAMETASONA	28,5	26



DISPOSITIVO DE SPE		
	MICRO COLUMNAS	
	RECUPERACIÓN (%)	RSD (%)
BETAMETASONA	90,9	2,7
DEXAMETASONA	89,3	2,2



f. DISPOSITIVOS MICRO COLUMNA

Para determinar los parámetros cromatográficos relacionados con el sorbente y la configuración de empaquetado elegida, se realizaron curvas de volumen de corte que fueron obtenidas por cromatografía frontal utilizando una solución de 500 ng/mL de dexametasona o betametasona en agua y un flujo de 0.080 mL/min, Ilustración 52. Los parámetros cromatográficos [82] fueron determinados mediante ajuste de los datos experimentales a una curva sigmoidea [90]. El volumen de corte (V_b) es un indicador de la capacidad de carga del sistema para cada analito. Si bien su determinación depende de los parámetros utilizados (flujo y concentración de la solución), estos valores son una aproximación al comportamiento del sistema bajo diferentes condiciones. Los resultados obtenidos, 1350 μ L (dexametasona) y 1100 μ L (betametasona) indicarían que, para los volúmenes de carga utilizados para la extracción a partir de muestras (1000 μ L), debería poder alcanzarse un 100% de recuperación de los analitos. Ya que la concentración en las muestras, se anticipa que debería ser menor a 500 ng/mL, debería de ser posible utilizar estos dispositivos para pre-concentración y/o para análisis de trazas como se requiere en el caso de control de doping. Ya que no se espera que estos dispositivos permitan la separación de sustancias similares, debido a la no selectividad de la fase de SPE utilizada y al bajo número de platos teóricos en este tipo de dispositivos, los parámetros cromatográficos determinados fueron similares para ambas sustancias.

El comportamiento de las micro columnas con una matriz compleja fue también investigado mediante la determinación de la recuperación de ambos analitos en muestras de orina humana fortificadas a tres concentraciones diferentes (500, 250 y 125 ng/mL), Ilustración 53.

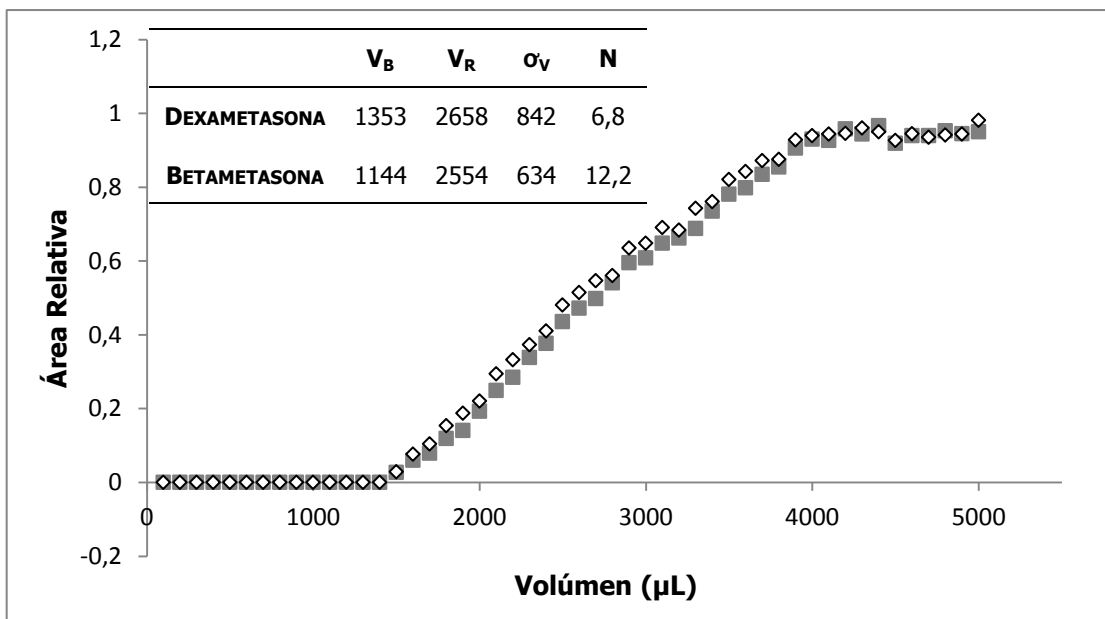


Ilustración 52. Curvas de volumen de corte y parámetros cromatográficos para fibras de PS empaquetadas en micro columnas. Promedio para n=3. Cuadrados blancos: betametasona; Cuadrados grises: dexametasona. V_B : volumen de corte; V_R : volumen de retención; σ_V : desviación estándar de la curva derivada; N: número de platos teóricos.

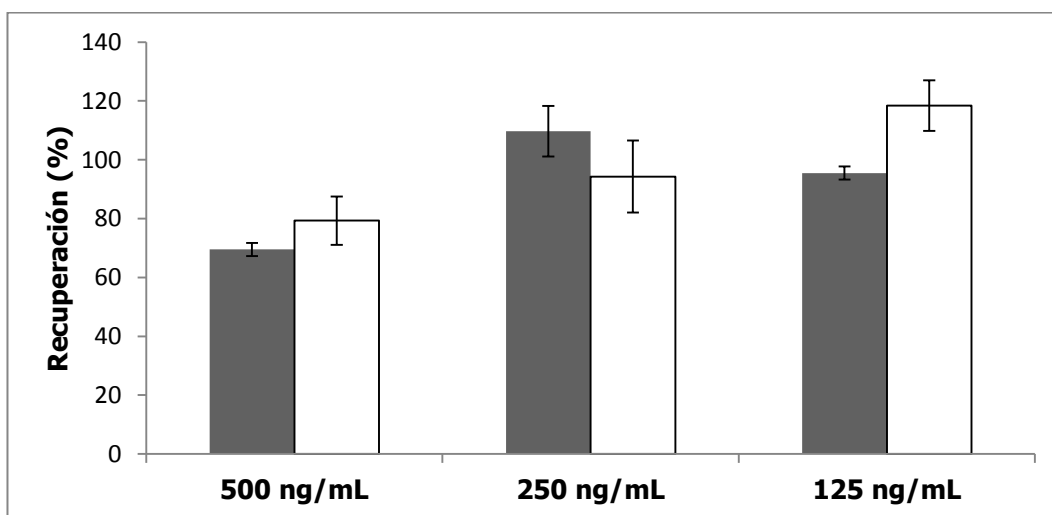


Ilustración 53. Recuperaciones en muestras de orina humana. Barras blancas: betametasona; Barras grises: dexametasona. Barras de error: RSD de la recuperación (%).

2. VERIFICACIÓN DEL MÉTODO

Se verificaron las cifras de mérito para un método cualitativo, evaluándose la selectividad y el límite de detección, de manera de verificar que se cumple con la finalidad *fit for purpose*.

Para la evaluación de la especificidad del método, un blanco de orina fue fortificado con una mix de drogas comúnmente buscadas en control de doping (mix 3) a una concentración de 200 ng/mL y analizado para detectar dexametasona y betametasona. Ambos analitos fueron detectados y confirmados en presencia de otras drogas; las intensidades relativas de los iones y el tiempo de retención de los analitos fueron concordantes con los requerimientos de WADA y AORC para la identificación al ser comparados con muestras fortificadas únicamente con dexametasona y betametasona. Las muestras blanco analizadas no mostraron presencia de las señales de interés.

Se evaluó la capacidad de detectar la presencia de los analitos a concentraciones menores a los límites establecidos por AROC para estas drogas (establecido en 10 ng/mL para el año 2011) trabajando a 5 ng/mL y 10 ng/mL. Todas las muestras fortificadas a 10 ng/mL fueron positivas para dexametasona y betametasona, mientras que únicamente el 30% de las muestras fueron positivas para 5 ng/mL, estimándose de esta manera que es posible tener un límite de detección de 10 ng/mL. Las recuperaciones obtenidas en todos los casos fueron variables pero superiores a 58% para ambas drogas; los ensayos fueron realizados por triplicado y en tres días de análisis diferente.

Los datos obtenidos permiten suponer que bajo condiciones controladas de empaquetado de la fase estacionaria para obtener valores de recuperaciones reproducibles en las micro columnas de SPE, es posible alcanzar límites más bajos de detección que permitan cumplir con la reglamentación actual de 5 ng/mL.

Además de la mejora en la consistencia del empaquetado de las fibras, una producción a nivel comercial que permita disminuir su diámetro y mejorar la reproducibilidad en la síntesis, serían parámetros adicionales que conjuntamente podrían aumentar la capacidad de carga de estos dispositivos, permitiendo mayor pre concentración. Otro punto importante sería el control del flujo y el ajuste del mismo para la óptima interacción entre analitos y fase estacionaria.

3. APLICACIÓN EN CONTROL DE DOPING

La Ilustración 54 muestra una comparación de los cromatogramas obtenidos del tratamiento de dos fortificados de dexametasona y betametasona a 10 ng/mL con preparación de muestra mediante el método clásico de extracción líquido-líquido utilizado en el laboratorio y el método de preparación de muestra desarrollado con micro columnas. Aun cuando las condiciones para las micro columnas no fueron optimizadas, por ejemplo, en cuanto a solvente y volúmenes utilizados en la extracción y en el lavado, y tomando en cuenta lo dicho en el punto anterior, se observa que las intensidades en las señales son similares así como también sus espectros.

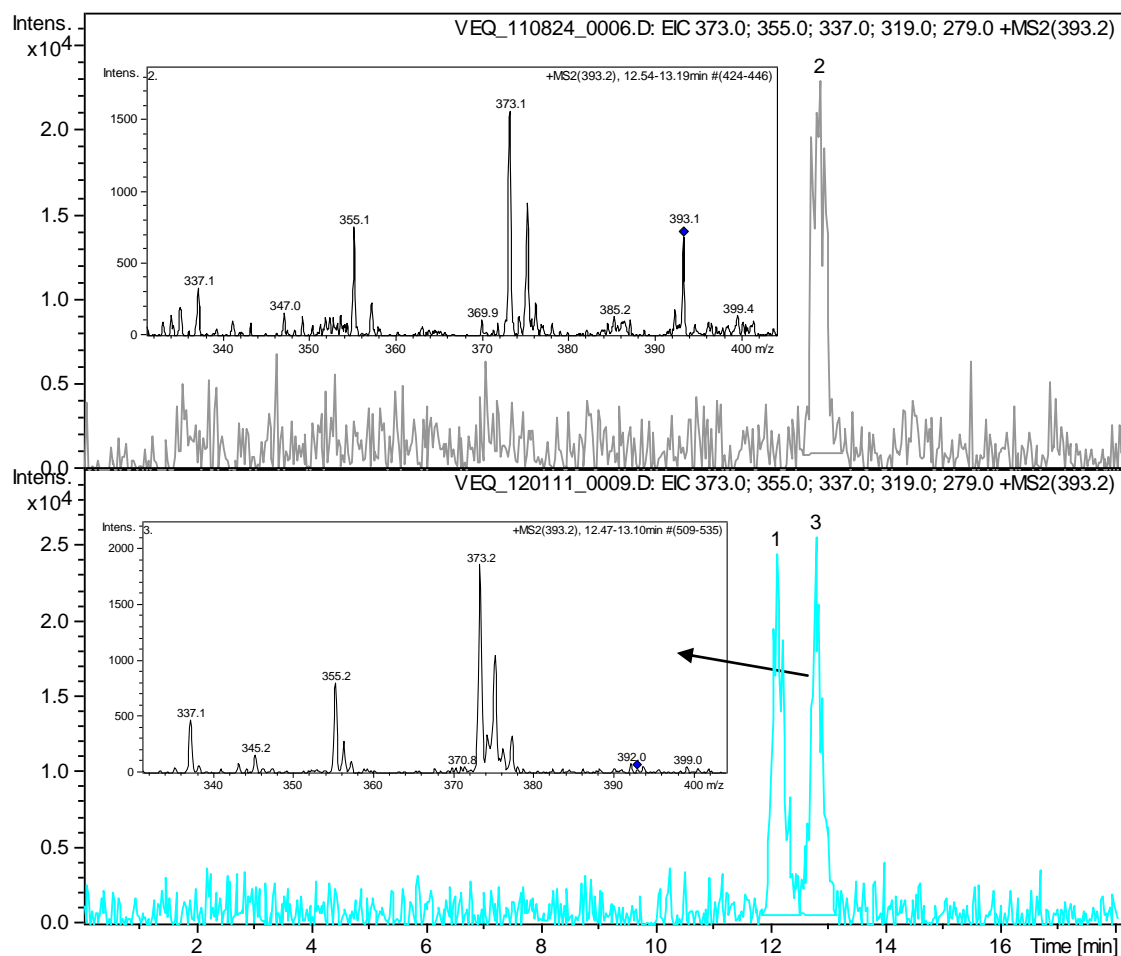


Ilustración 54. Comparación de la señal obtenida para un fortificado a 10 ng/mL. Tratado mediante la metodología de extracción líquido-líquido clásica utilizada en el laboratorio (arriba) y con el método desarrollado utilizando micro columnas de SPE con microfibras de poliestireno (abajo).

D. MÉTODO DE EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO: MÉTODO DE SCREENING PARA CLEMBUTEROL, SALBUTAMOL, FENOTEROL Y SILDENAFIL EN ORINA EQUINA

Para la detección de clenbuterol, salbutamol, fenoterol y sildenafil en orina equina se buscó reducir el impacto ambiental de las metodologías analíticas disponibles mediante la reducción en la cantidad de solvente requerido para el tratamiento de muestra. Para comprobar la aplicabilidad de este método analítico (extracción líquido-líquido con volumen de solvente reducido) en controles de doping, se analizó una muestra positiva para clenbuterol y se comparó con el método de rutina utilizado en el laboratorio. En una segunda etapa también se evaluó el comportamiento de dos solventes obtenidos a partir de recursos renovables como 2-metiltetrahidrofurano (2-MeTHF) y ciclopentil metil éter (CPME).

1. DESARROLLO DEL MÉTODO

a. SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA

Se optimizó la separación cromatográfica de los compuestos estudiando varios parámetros (fase móvil, largo y tamaño de partícula de la columna). El método final utilizó una columna de fase reversa C18 de 100 X 3.00 mm y 3 µm de tamaño de partícula, con un gradiente de elución con ácido fórmico 10 mM (A) y acetonitrilo (B), flujo de 0.300 mL/min y 20 minutos de corrida. El consumo total de solvente es de 6 mL por corrida para la separación de los 4 compuestos (Ilustración 55).

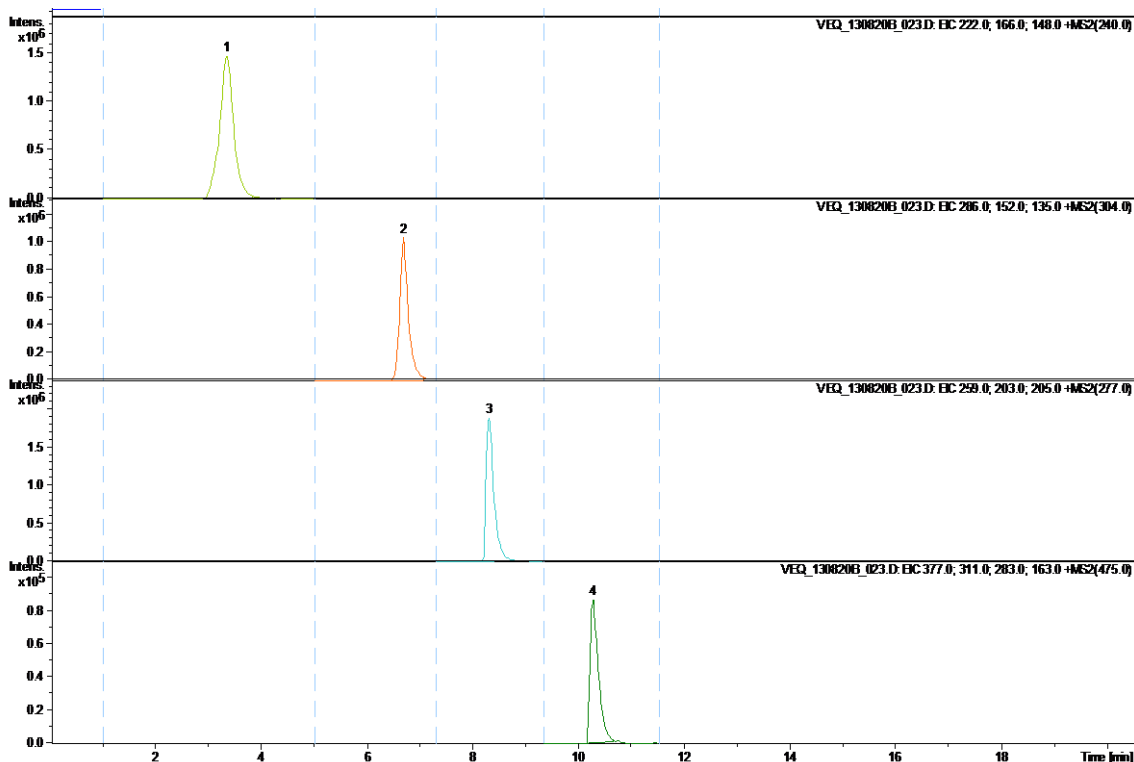


Ilustración 55. Separación cromatográfica de Salbutamol, Fenoterol, Clembuterol y Sildenafil. Salbutamol RT₁ de 3.5 min; fenoterol 6.8 min RT₂; clembuterol 8.3 min RT₃; sildenafil 10.5 min RT₄.

De manera de disminuir el efecto matriz relacionado con el trabajo en matrices complejas, se ajustó la cromatografía para obtener tiempos de retención mayores a 2 min, ya que previo a este tiempo se ha observado en los casos anteriores la elución de los compuestos polares presentes en la orina.

2. MÉTODO EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO A ESCALA REDUCIDA

a. PREPARACIÓN DE MUESTRA

El lineamiento verde utilizado en la preparación de muestra consistió en la reducción de los volúmenes de muestra y de solvente orgánico para la extracción líquido-líquido. El método de referencia utilizado en el laboratorio

involucra el uso de muestras de 5 mL de orina y extracción líquido-líquido con 15 mL de éter etílico (Et₂O) por muestra.

El trabajo con volúmenes reducidos fue llevado a cabo con 1 mL de muestra y un volumen de extracción total de 3 mL de éter etílico. Se suprimió el secado en atmósfera de nitrógeno ya que el bajo punto de ebullición del disolvente, permite el secado casi completo por evaporación a temperatura ambiente entre cada paso de extracción de fase orgánica (1 mL cada vez). La reconstitución se realizó utilizando 100 µL de fase móvil de corrida. Los ensayos de recuperación a tres concentraciones diferentes, muestran altas recuperaciones para los analitos, excepto para salbutamol, Ilustración 56.

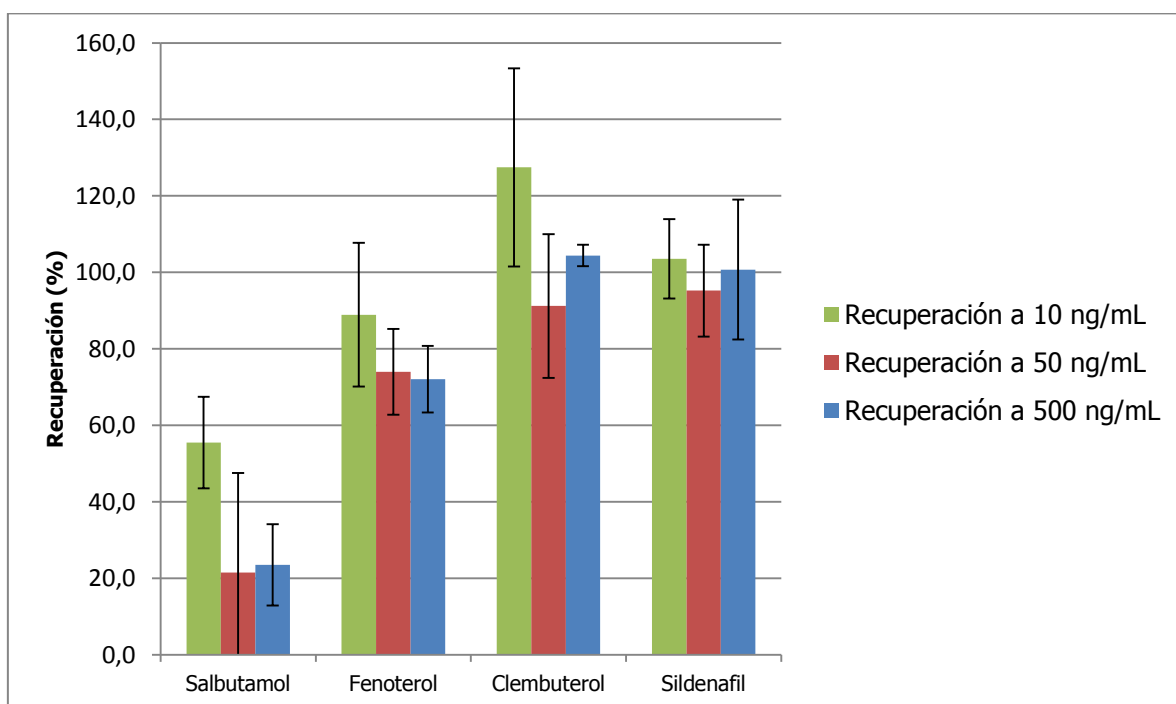


Ilustración 56. Recuperación en extracciones con 3 mL de éter etílico. Barras de error: RSD de la recuperación (%).

3. APLICACIÓN EN CONTROL DE DOPING

La Ilustración 57 muestra el análisis de una muestra positiva para clenbuterol (código VEQ 29). Se utilizó el método de rutina del laboratorio y el método de extracción líquido-líquido con volúmenes reducidos de éter etílico. Tanto el pico cromatográfico como los espectros obtenidos no muestran diferencias y esto es un paso adicional para confirmar la utilidad del método.

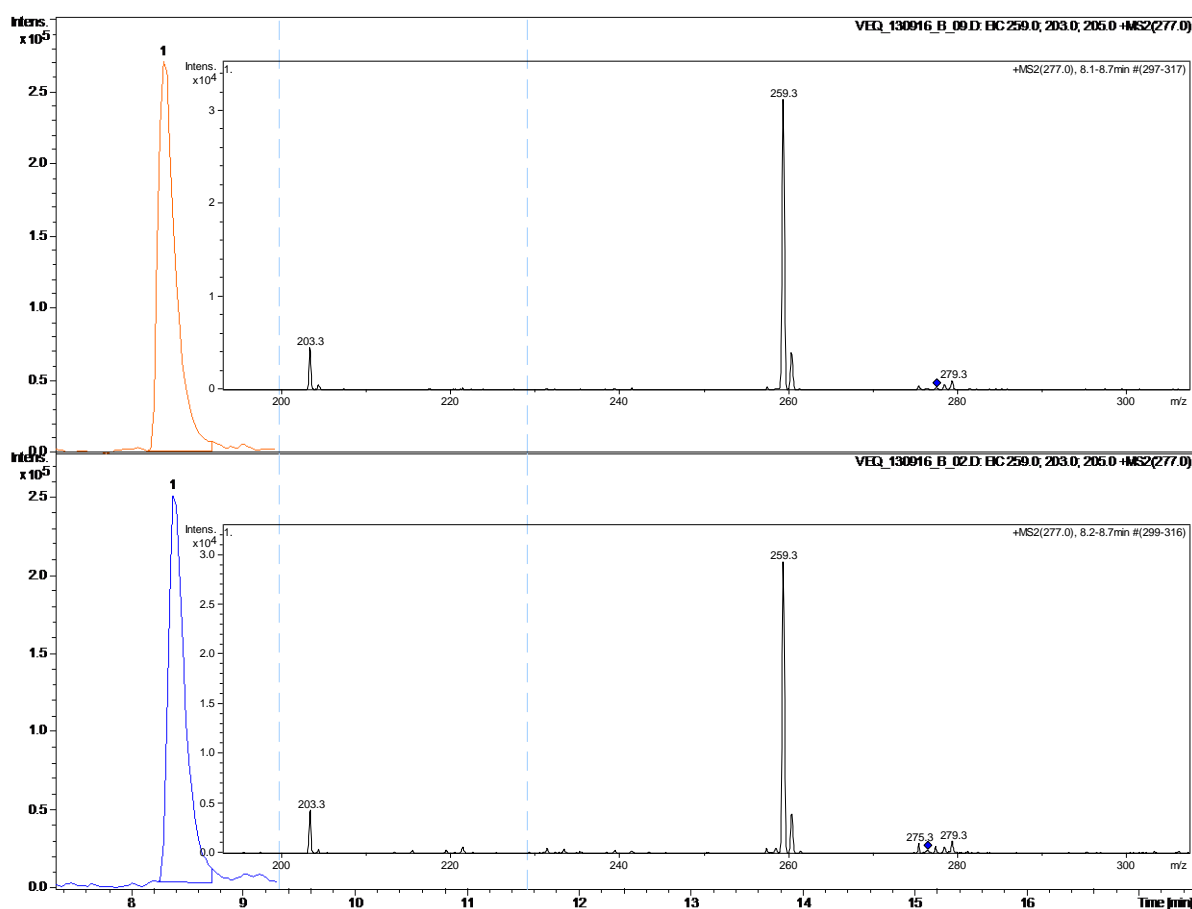


Ilustración 57. Análisis de muestra positiva para clenbuterol. Arriba: extracción utilizando 15 mL de Et₂O, Abajo: 3 mL de Et₂O. Espectro obtenido con detección en modo *product ion scan* para ion precursor m/z 277 en trampa de iones.

4. USO DE SOLVENTES ALTERNATIVOS EN LA EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO

La segunda aproximación fue la evaluación de dos solventes fabricados a partir de fuentes renovables y que se encuadran dentro de la línea de los llamados solventes verdes (2-metiltetrahidrofurano y ciclopentil metil éter).

El trabajo con ciclopentil metil éter (CPME) a tres niveles de concentración diferentes dio recuperaciones bajas y datos no reproducibles. La utilización de este solvente requiere de rotaevaporación (baño de agua a 50°C, 10 min) para la posterior reconstitución del extracto obtenido.

Para el caso del 2-metiltetrahidrofurano (2-MeTHF), también se requiere una evaporación en baño de agua pero trabajando a 35°C debido a la potencial formación de peróxidos (si bien el solvente contiene BHT como estabilizante).

Los datos obtenidos son aún insuficientes para la comparación mediante análisis estadístico con las recuperaciones obtenidas al trabajar con volúmenes reducidos de Et₂O pero se anticipa serán comparables a los mismos, según se detalla en la Ilustración 58.

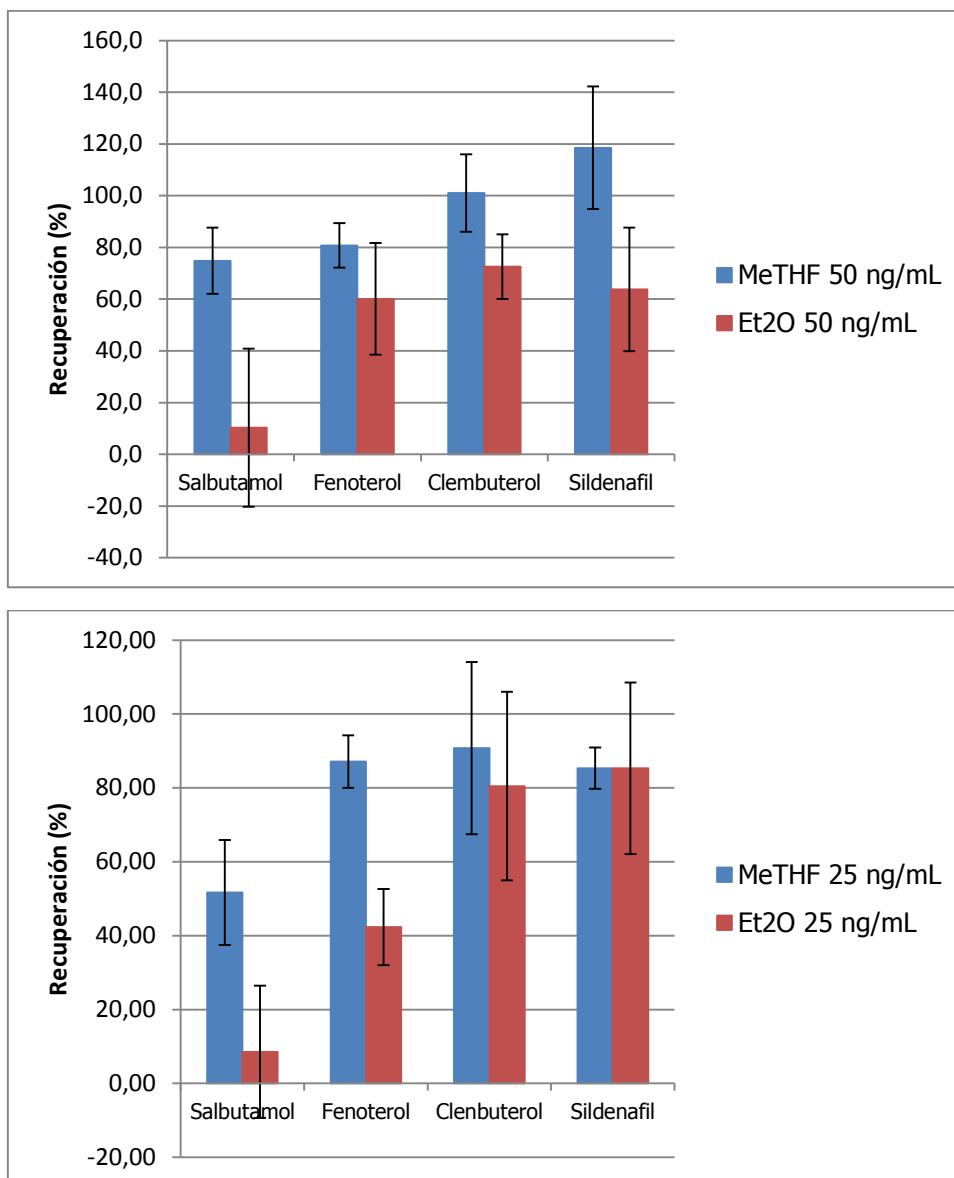


Ilustración 58. Recuperaciones obtenidas con 2-metiltetrahidrofurano como disolvente de extracción. Barras de error: RSD de la recuperación (%).

De los solventes utilizados, el metiltetrahidrofurano es el que dio lugar a mejores resultados preliminares. Este solvente es de más fácil manejo que el dietiléter debido a la menor tensión superficial, además de que proviene de fuentes renovables. Entre sus desventajas se encuentran el requerimiento energético para la rotaevaporación debido al elevado punto de ebullición y el ser un solvente de más difícil acceso (costos, proceso de importación), ya que recién está comenzando a generalizarse su uso.

VI. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

A. FLUNIXINA

Se desarrolló y validó un método para el análisis confirmatorio de muestras de orina equina donde se sospecha la presencia del antiinflamatorio no esteroideo flunixinina. Es un método de características muy simples y totalmente adecuadas al propósito. La dilución de la muestra en agua de calidad ultrapura permitió eliminar la utilización de solventes, trabajar bajo condiciones más seguras y evitar la generación de residuos orgánicos. La utilización de una columna cromatográfica eficiente, de tamaño de partícula pequeño, permitió reducir los tiempos de corrida y junto con la utilización de un instrumento de masa de alta resolución permitieron aumentar la eficiencia del proceso.

El método fue validado de acuerdo a normativas internacionales siendo el límite de detección de 75 ng/mL. Se aplicó con éxito en el análisis de muestras presuntas positivas que normalmente llegan a laboratorio.

B. DEXAMETASONA Y BETAMETASONA

Se desarrolló un método de preparación de muestra para el análisis de los corticoesteroides dexametasona y betametasona que utiliza únicamente 200 µL de metanol por muestra y puede realizarse en aproximadamente 15 minutos. Este tratamiento de muestra es una modificación de la extracción en fase sólida convencional, donde en lugar de la utilización de una fase estacionaria particulada, se utilizaron microfibras de poliestireno (diámetro promedio 1.3 µm) sintetizadas mediante *electrospinning*.

El método analítico resultante es al mismo tiempo *fit for purpose* (cumpliendo con los estrictos requerimientos internacionales de control de doping), simple (utilizando micro columnas basadas en tips) y tiene su "huella verde" (utilizando

pequeñas cantidades de solventes orgánicos y de muestra). En contraste, el método actualmente en uso en el laboratorio para el análisis confirmatorio de estas drogas en matriz de orina equina, consta de tres pasos de extracción líquido-líquido con diclorometano, utilizando 15 mL e insumiendo aproximadamente 40 minutos por muestra.

Hoy en día las desventajas de esta técnica y donde se debe realizar mayor hincapié en la investigación para su potencial comercialización, es a nivel del control preciso del empaquetado de las fibras (uniformidad en la densidad del empaquetado, orientación de las fibras y altura de lecho para la consistencia en las características del flujo), necesario para favorecer la reproducibilidad de la técnica. También a nivel de la fabricación de las mismas (reproducibilidad en el diámetro de las mismas, producción bajo condiciones cuidadosamente controladas) [75].

En cuanto a la detección por espectrometría de masa, ambos instrumentos mostraron aplicabilidad en la diferenciación de los epímeros a través de las energías de fragmentación.

C. BRONCODILATADORES Y SILDENAFIL

Se desarrolló un método de detección de broncodilatadores y sildenafil con una preparación de muestra con reducción de los volúmenes utilizados en la extracción líquido-líquido. Esta es una estrategia prometedora para el análisis de estas drogas.

El solvente "verde" metiltetrahidrofurano demostró ser adecuado para la extracción líquido-líquido de este grupo de analitos.

El ajuste de la detección en el instrumento de alta resolución brinda un número adecuado de iones para la confirmación de la estructura y cumple con las normativas internacionales, no así la trampa de iones.

Como trabajo futuro se propone:

Mejorar el límite de detección para todas las moléculas de manera de seguir cumpliendo con las normativas internacionales. Se buscará lograr este objetivo mediante la mejora de los parámetros de detección en los detectores de masa para aumentar la sensibilidad de la detección; búsqueda de estrategias de fragmentación adicionales, por ejemplo MS³ en la trampa de iones; estrategias alternativas durante la preparación de muestra, por ejemplo evaluando la potencialidad en la preparación de muestra de otras fibras fabricadas por *electrospinning* (por ejemplo fibras de polisulfona disponibles en el laboratorio).

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Anastas, P.T., Warner, J.C., *Green chemistry: theory and practice*. 1998, USA: Oxford University Press, USA.
2. Sandra, P., Vanhoenacker, G., David, F., Sandra, K., Pereira, A., *Green Chromatography (Part 1): Introduction and Liquid Chromatography*. LCGC EUROPE, 2010. **23**(5).
3. Botré, F., *New and old challenges of sports drug testing*. Journal of Mass Spectrometry, 2008. **43**: p. 903-907.
4. Li, M., et al., *Use of liquid chromatography/tandem mass spectrometric molecular fingerprinting for the rapid structural identification of pharmaceutical impurities*. Rapid Communication in Mass Spectrometry, 2009. **23**(22): p. 3533-42.
5. Tobin, T., Gutierrez, J., Schwartz, E., Camargo, F., Hughes, C., *Equine Drugs, Medications, and Performance Altering Substances: Their Performance Effects, Detection, and Regulation*. Kentucky Agricultural Experiment Station, 2010.
6. Ho, E.N., et al., *Comprehensive screening of anabolic steroids, corticosteroids, and acidic drugs in horse urine by solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2006. **1120**(1-2): p. 38-53.
7. (IFHA), I.F.o.H.A., *2010 REPORT ON PROHIBITED SUBSTANCES*. 2010.
8. Gratz, S.R., Flurer, C.L., Wolnik, K.A., *Analysis of undeclared synthetic phosphodiesterase-5 inhibitors in dietary supplements and herbal matrices by LC-ESI-MS and LC-UV*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2004. **36**(3): p. 525-533.
9. Le Bizec, B., G. Pinel, and J.P. Antignac, *Options for veterinary drug analysis using mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2009. **1216**(46): p. 8016-34.
10. Stolker, A.A.M., Brinkman, U.A.Th., *Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals—a review*. Journal of Chromatography A, 2005. **1067**(1-2): p. 15-53.
11. Stolker, A.A.M., Zuidema, T., Nielen, M.W.F., Nielen, M.W.F., *Residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents*. Trends in Analytical Chemistry, 2007. **26**(10): p. 967-979.
12. De Brabander, H.F., Noppe, H., Verheyden, K., Vanden Bussche, J., Wille, K., Okerman, L., Vanhaecke, L., Reybroeck, W., Ooghe, S., Croubels, S., *Residue analysis: Future trends from a historical perspective*. Journal of Chromatography A, 2009. **1216**(46): p. 7964-7976.
13. (AORC), A.o.O.R.C., *AORC Guidelines for the Minimum Criteria for Identification by Chromatography and Mass Spectrometry*, 2011.
14. (CE), C.E., *DECISIÓN DE LA COMISIÓN de 12 de agosto de 2002 por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados*. (2002/657/CE).
15. (ILAC), I.L.A.C., *Accreditation Requirements and Operating Criteria for Horseracing Laboratories*. 2009. **ILAC-G7:06/2009**.
16. Worl Anti-Doping Agency, W.L.C., *IDENTIFICATION CRITERIA FOR QUALITATIVE ASSAYS INCORPORATING COLUMN CHROMATOGRAPHY AND MASS SPECTROMETRY*, in *Technical Document – TD2010IDCR2010*.
17. Bethem, R., et al., *Establishing the fitness for purpose of mass spectrometric methods*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2003. **14**(5): p. 528-41.
18. Van Eenoo, P., Delbeke, F.T., *Criteria in Chromatography and Mass Spectrometry - a Comparison Between Regulations in the Field of Residue and Doping Analysis*. Chromatographia, 2004. **59**: p. S39-S44.
19. Eurachem, *The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. 1998.
20. (ICH), I.C.O.H.O.T.R.F.R.O.P.F.H.U., *ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY Q2(R1)*, 2005, Version 4.
21. Matuszewski, B.K., M.L. Constanzer, and C.M. Chavez-Eng, *Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS*. Analytical Chemistry, 2003. **75**(13): p. 3019-30.

22. Igualada, C., F. Moragues, and J. Pitarch, *Rapid method for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in animal tissue by liquid chromatography-mass spectrometry with ion-trap detector*. *Analytica Chimica Acta*, 2007. **586**(1-2): p. 432-9.
23. Boner, P.L., Liu, D.W., Feely, W.F., Robinson, R.A., Wu, J., *Determination of Flunixin in Edible Bovine Tissues Using Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003. **51**(26): p. 7555-7559.
24. Luo, Y., Rudy, J.A., Uboh, C.E., Soma, L.R., Guan, F., Enright, J.M., Tsang, D.S., *Quantification and confirmation of flunixin in equine plasma by liquid chromatography-quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry* *Journal of Chromatography B*, 2004 **801**(2): p. 173-184.
25. Uboh, C., Rudy, J., *Quantification and confirmation of flunixin in equine plasma by high performance liquid chromatography- ion trap mass spectrometry* PA Equine Toxicology and Research Laboratory, University of Pennsylvania, 2004.
26. (AORC), A.o.O.R.C., *Proficiency Testing Urine Drug List*. 2013.
27. Gentili, A., *LC-MS methods for analyzing anti-inflammatory drugs in animal-food products*. *Trends in Analytical Chemistry*, 2007. **26**(6): p. 595-608.
28. Niessen, W.M., *Fragmentation of toxicologically relevant drugs in positive-ion liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. *Mass Spectrometry Reviews*, 2011. **30**(4): p. 626-63.
29. Niessen, W.M., *Fragmentation of toxicologically relevant drugs in negative-ion liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. *Mass Spectrometry Reviews*, 2012. **31**(6): p. 626-65.
30. Woodward, R.B., Sondheimer, F., Taub, D., Heusler, K., McLamore, W.M., *The Total Synthesis of Steroids 1*. *Journal of the American Chemical Society*, 1952. **74**(17): p. 4223-4251.
31. Deventer, K., Delbeke, F.T., *Validation of a screening method for corticosteroids in doping analysis by liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2003. **17**(18): p. 2107-2114.
32. Parr, M.K. and W. Schanzer, *Detection of the misuse of steroids in doping control*. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2010. **121**(3-5): p. 528-37.
33. Pujos, E., et al., *Comparison of the analysis of corticosteroids using different techniques*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2005. **381**(1): p. 244-54.
34. Oueslati, F., et al., *Effect of organic modifier and temperature on the resolution of betamethasone and dexamethasone using a porous graphitic carbon column: application to their identification and confirmation in human urine by LC-ESI-MS/MS*. *Journal of Separation Science*, 2007. **30**(18): p. 3137-42.
35. Li, C., Wu, Y., Yang, T., Zhang, Y., *Rapid simultaneous determination of dexamethasone and betamethasone in milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry with isotope dilution*. *Journal of Chromatography A*, 2010. **1217**(3): p. 411-414.
36. Arthur, K.E., J.C. Wolff, and D.J. Carrier, *Analysis of betamethasone, dexamethasone and related compounds by liquid chromatography/electrospray mass spectrometry*. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 2004. **18**(6): p. 678-84.
37. Antignac, J.P., Le Bizec, B., Monteau, F., Poulain, F., André, F., *Collision-induced dissociation of corticosteroids in electrospray tandem mass spectrometry and development of a screening method by high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2000. **14**(1): p. 33-39.
38. Guan, F., Uboh, C., Soma, L., Hess, A., Luo, Y., Tsang, D.S., *Sensitive liquid chromatographic/tandem mass spectrometric method for the determination of beclomethasone dipropionate and its metabolites in equine plasma and urine*. *Journal of Mass Spectrometry*, 2003. **38**(8): p. 823-838.
39. Li, M., Lin, M., Rustum, A., *Application of LC-MSn in conjunction with mechanism-based stress studies in the elucidation of drug impurity structure: Rapid identification of a process impurity in betamethasone 17-valerate drug substance*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2008. **48**(5): p. 1451-1456.

40. Stanley, S.M., et al., *Direct-injection screening for acidic drugs in plasma and neutral drugs in equine urine by differential-gradient LC-LC coupled MS/MS*. Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences, 2007. **848**(2): p. 292-302.
41. Touber, M.E., van Engelen, M.C., Georgakopoulos, C., van Rhijn, J.A., Nielen, M.W., *Multi-detection of corticosteroids in sports doping and veterinary control using high-resolution liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta, 2007 **586**: p. 137-146.
42. Song, L., Bai, J., Zhou, W., *Determination of Betamethasone and Dexamethasone in Human Urine and Serum by MEKC After an Experimental Design*. Chromatographia, 2008. **68**: p. 287-293.
43. Andersen, J.H., Hansen, L.G., Pedersen, M., *Optimization of solid phase extraction clean up and validation of quantitative determination of corticosteroids in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta, 2008 **617**(1-2): p. 216-224.
44. Malone, E.M., Dowling, G., Elliott, C.T., Kennedy, D.G., Regan, L., *Development of a rapid, multi-class method for the confirmatory analysis of anti-inflammatory drugs in bovine milk using liquid chromatography tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2009. **1216**(46): p. 8132-8140.
45. Mazzarino, M., de la Torre, X., Botrè, F., Gray, N., Cowan, D., *A rapid screening LC-MS/MS method based on conventional HPLC pumps for the analysis of lowmolecular weight xenobiotics: application to doping control analysis*. Drug Testing and Analysis, 2010. **2**(7): p. 311-322.
46. Mazzarino, M., et al., *Speeding up the process urine sample pre-treatment: some perspectives on the use of microwave assisted extraction in the anti-doping field*. Talanta, 2010. **81**(4-5): p. 1264-72.
47. Domínguez-Romero, J.C., García-Reyes, J.F., Martínez-Romero, R., Martínez-Lara, E., Del Moral-Leal, M.L., Molina-Díaz, M., *Detection of main urinary metabolites of β 2-agonists clenbuterol, salbutamol and terbutaline by liquid chromatography high resolution mass spectrometry*. Journal of Chromatography B, 2013. **923-924**: p. 128-135.
48. Yang, F., Liu, Z., Lin, Y., Chen, J., Pang, G., Chen, G., *Development an UHPLC-MS/MS Method for Detection of β -Agonist Residues in Milk*. Food Analytical Methods, 2012. **5**(1): p. 138-147.
49. Nicoli, R., Petrou, M., Badoud, F., Dvorak, J., Saugy, M., Baume, N., *Quantification of clenbuterol at trace level in human urine by ultra-high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2013. **1292**: p. 142-150.
50. Gratz, S.R., Gamble, B.M., Flurer, R.A., *Accurate mass measurement using Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for structure elucidation of designer drug analogs of tadalafil, vardenafil and sildenafil in herbal and pharmaceutical matrices*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2006. **20**(15): p. 2317-2327.
51. Song, F., El-Demerdash, A., Lee, S.J., *Screening for multiple phosphodiesterase type 5 inhibitor drugs in dietary supplement materials by flow injection mass spectrometry and their quantification by liquid chromatography tandem mass spectrometry*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2012. **70**: p. 40-46.
52. Singh, S., Prasad, B., Savaliya, A.A., Shah, R.P., *Strategies for characterizing sildenafil, vardenafil, tadalafil and their analogues in herbal dietary supplements, and detecting counterfeit products containing these drugs*. Trends in Analytical Chemistry, 2009. **28**(1): p. 13-28.
53. Patterson, R., Mabe, P., Mitchell, E.N., Cory, W., *Lifestyle illicit drug seizures: A routine ESI-LC-MS method for the identification of sildenafil and vardenafil*. Forensic Science International, 2012. **222**(1-3): p. 83-88.
54. Tobiszewski, M., Mechlińska, A., Namieśnika, J., *Green analytical chemistry-theory and practice*. Chemical Society Reviews, 2010. **39** (8): p. 2869-2878.
55. Ghosh, C., *Green bioanalysis: Some innovative ideas towards green analytical techniques* Bioanalysis, 2012. **4**(11): p. 1377-1391.

56. Rainville, P.D., Simeone, J.L., McCarthy, S.M., Smith, N.W., Cowan, D., Plumb, R.S., *Investigation of microbore UPLC and nontraditional mobile phase compositions for bioanalytical LC-MS/MS*. *Bioanalysis*, 2012. **4**(11): p. 1287-1297.
57. Heudi, O., *Green bioanalytical methods are now a reality*. *Bioanalysis*, 2012. **4**(11): p. 1257.
58. Lord, H.L. and J. Pawliszyn, *Method optimization for the analysis of amphetamines in urine by solid-phase microextraction*. *Analytical Chemistry*, 1997. **69**(19): p. 3899-906.
59. Han, D., Row, K.H., *Trends in liquid-phase microextraction, and its application to environmental and biological samples*. *Microchimica Acta*, 2012. **176**: p. 1-22.
60. He, Y., Lee, H.K., *Liquid-Phase Microextraction in a Single Drop of Organic Solvent by Using a Conventional Microsyringe*. *Analytical Chemistry*, 1997. **69**(22): p. 4634-4640.
61. Jeannot, M.A. and F.F. Cantwell, *Solvent microextraction as a speciation tool: determination of free progesterone in a protein solution*. *Analytical Chemistry*, 1997. **69**(15): p. 2935-40.
62. Rezaee, M., et al., *Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction*. *Journal of Chromatography A*, 2006. **1116**(1-2): p. 1-9.
63. Xiong, G., et al., *Comparison of microwave-assisted extraction of triazines from soils using water and organic solvents as the extractants*. *Talanta*, 1999. **48**(2): p. 333-9.
64. Pearce, K.L., Trenerry, V.C., Were, S., *Supercritical Fluid Extraction of Pesticide Residues from Strawberries*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997. **45**(1): p. 153-157.
65. Baltussen, E., C.A. Cramers, and P.J. Sandra, *Sorptive sample preparation -- a review*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2002. **373**(1-2): p. 3-22.
66. Armenta, S., Garrigues, S., de la Guardia, M., *Green Analytical Chemistry*. *Trends in Analytical Chemistry*, 2008. **27**(6): p. 497-511.
67. Aufartova, J., et al., *Determination of steroid hormones in biological and environmental samples using green microextraction techniques: an overview*. *Analytica Chimica Acta*, 2011. **704**(1-2): p. 33-46.
68. Zgoła-Grześkowiak, A., Grześkowiak, T., *Dispersive liquid-liquid microextraction*. *Trends in Analytical Chemistry*, 2011. **30**(9): p. 1382-1399.
69. Tobiszewski, M., Namieśnik, J., *Direct chromatographic methods in the context of green analytical chemistry*. *Trends in Analytical Chemistry*, 2012. **35**: p. 67-73.
70. Vonaparti, A., Lyris, E., Panderi, I., Koupparis, M., Georgakopoulos, C., *Direct injection LC/ESI-MS horse urine analysis for the quantification and identification of threshold substances for doping control. I. Determination of hydrocortisone*. *Journal of Mass Spectrometry*, 2008. **43**(9): p. 1255-1264.
71. Vonaparti, A., Lyris, E., Panderi, I., Koupparis, M., Georgakopoulos, C., *Direct injection liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometric horse urine analysis for the quantification and confirmation of threshold substances for doping control. II. Determination of theobromine*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2009. **23**(7): p. 1020-1028.
72. Vonaparti, A., Lyris, E., Panderi, I., Koupparis, M., Georgakopoulos, C., *Direct injection horse urine analysis for the quantification and confirmation of threshold substances for doping control. IV. Determination of 3-methoxytyramine by hydrophilic interaction liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry*. *Drug Testing and Analysis*, 2009. **1**(8): p. 365-371.
73. Vonaparti, A., Lyris, E., Panderi, I., Koupparis, M., Georgakopoulos, C., *Direct injection horse urine analysis for the quantification and identification of threshold substances for doping control. III. Determination of salicylic acid by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009. **395**(5): p. 1403-1410.
74. Sandra, P., Tienpont, B., David, F., *Green Chromatography (Part 3): Sample Preparation Techniques*. LCGC EUROPE, 2011.
75. Chigome, S., Torto, N., *Electrospun nanofiber-based solid-phase extraction*. *Trends in Analytical Chemistry*, 2012. **38**: p. 21-31.
76. Chigome, S., Torto, N., *A review of opportunities for electrospun nanofibers in analytical chemistry*. *Analytica Chimica Acta*, 2011. **706**(1): p. 25-36.
77. Chigome, S., Darko, G., Torto, N., *Electrospun nanofibers as sorbent material for solid phase extraction*. *Analyst*, 2011. **136**: p. 2879-2889.

78. Ramakrishna, S., Fujihara, K., Teo, W.E., Lim, T.C., Ma, Z., *An Introduction to Electrospinning and Nanofibers*. 2005: World Scientific Publishing Company.
79. Wang, Y., Wang, B., Wang, G., Yin, T., Yu, Q., *A novel method for preparing electrospun fibers with nano-/micro-scale porous structures*. Polymer Bulletin, 2009. **63**: p. 259-265.
80. Kang, X., *The investigation of electrospun polymer nanofibers as a solid-phase extraction sorbent for the determination of trazodone in human plasma*. Analytica Chimica Acta, 2007. **587**: p. 75-81.
81. Kang, X., Chen, L.Q., Zhang, Y.Y., Liu, Y.W., Gu, Z.Z., *Performance of electrospun nanofibers for SPE of drugs from aqueous solutions*. Journal of Separation Science, 2008. **31**: p. 3272-3278.
82. Zhang, Y., Kang, X., Chen, L., Pan, C., Yao, Y., Gu, Z.Z., *Fiber-packed SPE tips based on electrospun fibers*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2008. **391**: p. 2189-2197.
83. Gu, Z.Z., *Design of packed-fiber solid-phase extraction device for analysis of the drug and its metabolite in plasma*. Biomedical Microdevices, 2009. **11**: p. 723-729.
84. Xu, Q., Wu, S.Y., Wang, M., *Electrospun Nylon6 Nanofibrous Membrane as SPE Adsorbent for the Enrichment and Determination of Three Estrogens in Environmental Water Samples*. Chromatographia, 2010. **71**: p. 487-492.
85. Chronakis, I.S., *Generation of Molecular Recognition Sites in Electrospun Polymer Nanofibers via Molecular Imprinting*. Macromolecules, 2006. **39**: p. 357-361.
86. Lee, K.H., Kim, H.Y., Bang, H.J., Jung, Y.H., Lee, S.G., *The change of bead morphology formed on electrospun polystyrene fibers*. Polymer, 2003. **44**(14): p. 4029-4034.
87. Uyar, T., Besenbacher, F., *Electrospinning of uniform polystyrene fibers: The effect of solvent conductivity*. Polymer, 2008. **49**(24): p. 5336-5343.
88. Wannatong, L., Sirivat, A., Supaphol, P., *Effects of solvents on electrospun polymeric fibers: preliminary study on polystyrene*. Polymer International, 2004. **53**(11): p. 1851-1859.
89. Zheng, J., He, A., Li, J., Xu, J., Han, C.C., *Studies on the controlled morphology and wettability of polystyrene surfaces by electrospinning or electrospraying*. Polymer, 2006. **47**(20): p. 7095-7102.
90. Bielicka-Daszkiwicz, K., Voelkel, A., *Theoretical and experimental methods of determination of the breakthrough volume of SPE sorbents*. Talanta, 2009. **80**: p. 614-621.
91. Shanmuganathan, S., Natalia, D., Van den Wittenboer, A., Kohlmann, C., Grener, L., De María, P. D., *Enzyme-catalyzed C–C bond formation using 2-methyltetrahydrofuran (2-MTHF) as (co)solvent: efficient and bio-based alternative to DMSO and MTBE*. Green Chemistry, 2010. **12**: p. 2240-2245.
92. Pace, V., Hoyos, P., Castoldi, L., Domínguez De María, P., Alcántara, A.R., *2-Methyltetrahydrofuran (2-MeTHF): A Biomass-Derived Solvent with Broad Application in Organic Chemistry*. Chemistry and Sustainability Energy and Materials, 2012. **5**(8): p. 1369-1379.
93. Watanabe, K., *The Toxicological Assessment of Cyclopentyl Methyl Ether (CPME) as a Green Solvent*. Molecules, 2013. **18**(3): p. 3183-3194.
94. Watanabe, K., Yamagiwa, N., Torisawa, Y. 2007, 11, 251-258, Org. Process Res. Dev., *Cyclopentyl Methyl Ether as a New and Alternative Process Solvent*. Organic Process Research & Development, 2007. **11**(2): p. 251–258.
95. Antonucci, V., Coleman, J., Ferry, J.B., Johnson, N., Mathe, M., Scott, J.P., Xu, J., *Toxicological Assessment of 2-Methyltetrahydrofuran and Cyclopentyl Methyl Ether in Support of Their Use in Pharmaceutical Chemical Process Development*. Organic Process Research & Development, 2011. **15**(4): p. 939-941.
96. Zhang, H., Liu, G., Li, C., Zhang, L., *Liquid–Liquid Equilibria of Water + Acetic Acid + Cyclopentyl Methyl Ether (CPME) System at Different Temperatures*. Journal of Chemical & Engineering Data, 2012. **57**(11): p. 2942-2946.
97. Campos Molina, M.J., Mariscal, R., Ojeda, M., López Granados, M., *Cyclopentyl methyl ether: A Green co-solvent for the selective dehydration of lignocellulosic pentoses to furfural*. Bioresource Technology, 2012. **126**: p. 321-327.
98. *Bruker Daltonics User Manual*. 2006. **1**.

99. Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F., Whitehouse, C.M., *Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules*. Science, 1989. **246**: p. 64-71.
100. Iribarne, J.V., Thomson, B.A., *On the evaporation of small ions from charged droplets*. Journal of Chemical Physics, 1976. **64**: p. 2237-2294.
101. Boyd, R.K., Basic, C., Bethem, R.A., *Tools of the Trade V. Mass Analyzers for Quantitation: Separation of Ions by m/z Values*, in *Trace Quantitative Analysis by Mass Spectrometry*. 2008.
102. Lemiere, F., *Mass Analyzers for LC-MS*. 2002.
103. *micrOTOFQ, User Manual Version 1.0*. Bruker Daltonics.
104. Stephens, W.E.P.R., *A Pulsed Mass Spectrometer with Time Dispersion*. The American Physical Society, 1946. **69**(11-12): p. 691.
105. Kenttamaa, H.I., Cooks, R.G., *Tautomer characterization by energy resolved mass spectrometry. Dimethyl phosphite and dimethyl phosphonate ions*. Journal of the American Chemical Society, 1985. **107**(7): p. 1881-1886.
106. Yost, R.A., Enke, C.G., *Selected Ion Fragmentation with a Tandem Quadrupole Mass Spectrometer*. Journal of the American Chemical Society, 1978. **100**(7): p. 2274-2275.
107. Yost, A., *Differences in the Low-Energy Collision-Activated Dissociation of Carboxylate Anions from Structurally Similar Prostaglandins: E2, F2 α , D2, and DHKF2 α* . American Society for Mass Spectrometry, 1990. **1**: p. 389-396.
108. Rathahao, E., Page, A., Jouanin, I., Paris, A., Debrauwer, L., *Liquid chromatography coupled to negative electrospray/ion trap mass spectrometry for the identification of isomeric glutathione conjugates of catechol estrogens*. International Journal of Mass Spectrometry, 2004. **231**: p. 119-129.
109. Kebarle, P., Tang, L., *From ions in solution to ions in the gas phase - the mechanism of electrospray mass spectrometry*. Analytical Chemistry, 1993. **65**(22): p. 972A-986A.
110. U.S. Department of Health and Human Services, F.a.D.A.C.f.D.E.a.R.C. and C.f.V.M. (CVM), *Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation*. 2001.
111. Bonfiglio, R., King, R.C., Olah, T.V., Merkle, K., *The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1999. **13**(12): p. 1175-1185.
112. Boyd, R.K., Basic, C., Bethem, R.A., *Tools of the Trade IV. Interfaces and Ion Sources for Chromatography-Mass Spectrometry*, in *Trace Quantitative Analysis by Mass Spectrometry*. 2008.
113. (IFHA), I.F.o.H.A., *Performance Specification of the Laboratories for doping control required by the International Federation of Horseracing Authorities*. <http://www.ifhaonline.org/IabrwDisplay.asp?section=2>, 2013.
114. Chigome, S., Darko, G., Buttner, U., Torto, N., *Semi-micro solid phase extraction with electrospun polystyrene fiber disks*. Analytical Methods, 2010. **2**: p. 623-626.
115. (AORC), A.o.O.R.C., *Proficiency Testing Urine Drug List*. 2011.

VIII. ANEXOS

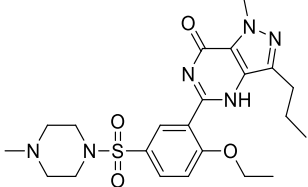
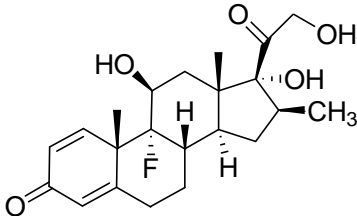
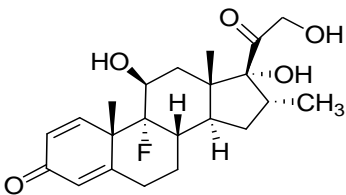
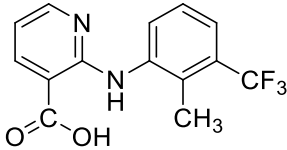
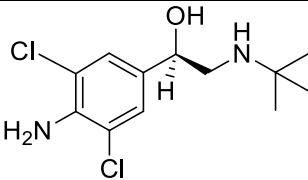
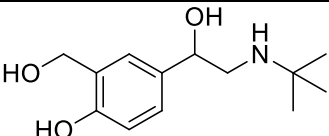
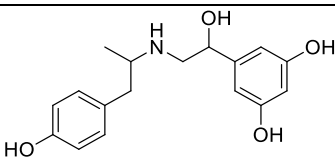
ANEXO I. LÍMITE DE DETECCIÓN PARA SUSTANCIAS PROHIBIDAS

REQUERIDOS POR AORC

Droga	Concentración (ng/mL)	Referencia
Betametasona	10	[115]
Clembuterol	4	[115]
Dexametasona	10	[115]
Flunixinina	200	[115]
Salbutamol	50	[115]
Sildenafil	----	----

Droga	Concentración (ng/mL)	Referencia
Betametasona	5	[26]
Clembuterol	2	[26]
Dexametasona	5	[26]
Salbutamol	5	[26]
Flunixinina	50	[26]
Sildenafil	5	[26]

ANEXO II. ESTRUCTURAS DE LAS MOLÉCULAS

Nombre	Estructura de la molécula	Masa Exacta	Ion M+H (m/z)	Fórmula molecular
Sildenafil		474.2049	475.2	C ₂₂ H ₃₀ N ₆ O ₄ S
Betametasona		392.1999	393.2	C ₂₂ H ₂₉ FO ₅
Dexametasona		392.1999	393.2	C ₂₂ H ₂₉ FO ₅
Flunixinina		296.0773	297.7	C ₁₄ H ₁₂ F ₃ N ₂ O ₂
Clembuterol		276.0796	277.1	C ₁₂ H ₁₈ C ₁₂ N ₂ O
Salbutamol		239.1521	240.2	C ₁₃ H ₂₁ NO ₃
Fenoterol		303.1471	304.1	C ₁₇ H ₂₁ NO ₄

ANEXO III. ANÁLISIS REALIZADOS PARA DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE INYECCIÓN DIRECTA: FLUNIXINA

	MUESTRA	RÉPLICAS	CIFRA DE MÉRITO DETERMINADA
DÍA 1			
Nivel 0	Orina Blanco VEQ XX	2	Límite de detección/Selectividad
Nivel 1	Orina Blanco Fortificada a 10 ng/mL	6	Límite de detección
Nivel 2	Orina Blanco Fortificada a 20 ng/mL	6	Límite de detección
Nivel 3	Orina Blanco Fortificada a 50 ng/mL	6	Límite de detección
Nivel 4	Orina Blanco Fortificada a 75 ng/mL	6	Límite de detección
Nivel 5	Orina Blanco Fortificada a 100 ng/mL	6	Límite de detección
Nivel 6	Orina Blanco Fortificada a 200 ng/mL	6	Límite de detección
Nivel 7	Orina Blanco Fortificada a 500 ng/mL	6	Límite de detección/Selectividad
Nivel 8	Orina Blanco Fortificada a 1000 ng/mL	6	Límite de detección
DÍA 2			
Nivel 0	Orina Blanco VEQ XX	2	Límite de detección/Selectividad
Nivel 1	Orina Blanco Fortificada a 10 ng/mL	6	Límite de detección
Nivel 2	Orina Blanco Fortificada a 20 ng/mL	6	Límite de detección
Nivel 3	Orina Blanco Fortificada a 50 ng/mL	6	Límite de detección
Nivel 4	Orina Blanco Fortificada a 75 ng/mL	6	Límite de detección
Nivel 5	Orina Blanco Fortificada a 100 ng/mL	6	Límite de detección
Nivel 6	Orina Blanco Fortificada a 200 ng/mL	6	Límite de detección
Nivel 7	Orina Blanco Fortificada a 500 ng/mL	6	Límite de detección/Selectividad
Nivel 8	Orina Blanco Fortificada a 1000 ng/mL	6	Límite de detección
DÍA 3			
Nivel 0	Orina Blanco VEQ XX	2	Límite de detección/Selectividad
Nivel 1	Orina Blanco Fortificada a 10 ng/mL	6	Límite de detección
Nivel 2	Orina Blanco Fortificada a 20 ng/mL	6	Límite de detección
Nivel 3	Orina Blanco Fortificada a 50 ng/mL	6	Límite de detección
Nivel 4	Orina Blanco Fortificada a 75 ng/mL	6	Límite de detección
Nivel 5	Orina Blanco Fortificada a 100 ng/mL	6	Límite de detección
Nivel 6	Orina Blanco Fortificada a 200 ng/mL	6	Límite de detección
Nivel 7	Orina Blanco Fortificada a 500 ng/mL	6	Límite de detección/Selectividad
Nivel 8	Orina Blanco Fortificada a 1000 ng/mL	6	Límite de detección
MATRIZ 1			
	Orina Blanco Fortificada a 500 ng/mL con Flunixin y Mix 1	1	Selectividad
	Orina Blanco Fortificada a 500 ng/mL con Flunixin y Mix 2	1	Selectividad
MATRIZ 2			
	Orina Blanco Fortificada a 500 ng/mL con Flunixin y Mix 1	1	Selectividad
	Orina Blanco Fortificada a 500 ng/mL con Flunixin y Mix 2	1	Selectividad

MATRIZ 3			
	Orina Blanco Fortificada a 500 ng/mL con Flunixinina y Mix 1	1	Selectividad
	Orina Blanco Fortificada a 500 ng/mL con Flunixinina y Mix 2	1	Selectividad
MATRICES			
	Orina Blanco VEQ 65 (Hembra)	1	Efecto Matriz
	Orina Blanco VEQ 66 (Hembra)	1	Efecto Matriz
	Orina Blanco VEQ 75 (Macho tratado con furosemide)	1	Efecto Matriz
	Orina Blanco VEQ 77 (Macho tratado con furosemide)	1	Efecto Matriz
	Orina Blanco VEQ 78 (Hembra con sonda)	1	Efecto Matriz
	Orina Blanco VEQ 95 (Macho)	1	Efecto Matriz
	Total	168	

ANEXO IV. PRESENTACIONES Y PUBLICACIONES

PUBLICACIONES

Possi-Pezzali, T., Chigome, S., Rodriguez-Haralambides, A., Torto, N. Evaluation of electrospun fibers as solid phase extraction sorbent for sample preparation in HPLC-MS/MS confirmatory doping control analysis of dexamethasone and betamethasone. *Anal. Methods*, **2013**, 5 (16), 4230-4237, **DOI:** 10.1039/C3AY40606G

PRESENTACIONES

- Possi-Pezzali, Tania*, González, D., Rodríguez, M.A. "Química analítica verde: disminución del impacto ambiental del análisis de trazas por HPLC-MSⁿ", II Congreso Uruguayo de Química Analítica-V Congreso Iberoamericano de Química Analítica, 7-10 Octubre **2012**, Montevideo, poster.
- Possi-Pezzali, T., Chigome, S., Rodríguez, M.A.*, Torto, N. "Electrospun fibers for simple preparation in doping control", IV International IUPAC Conference in Green Chemistry, 25-29 Agosto **2012**, Foz de Iguazú, Brasil, oral.
- Possi-Pezzali, Tania*, Rodriguez, M.A. "Greener Sample Preparation for HPLC-MSⁿ Analysis"; ACS Green Chemistry Summer School, Colorado School of Mines, Denver, Colorado, Julio 2012.
- Possi-Pezzali, Tania*, Chigome, S., Rodriguez, M.A., Torto, N. "Electrospun fibers for drug residues analysis by LC-MS/MS", IV BrMass, 10-13 Diciembre**2011**, Campinas, SP, Brasil, poster.
- Possi-Pezzali, Tania*, González, D., Rodríguez, M.A. "Química verde en el desarrollo de un método confirmatorio para el análisis de flunixinina en matrices biológicas", II ENAQUI, 24-26 Octubre **2011**, Montevideo, poster.
- Possi-Pezzali, Tania*, Chigome, S., Rodríguez, M.A., Torto, N. "Fibras obtenidas por electrospinning, una alternativa verde para el tratamiento de muestra", II ENAQUI, 24-26 Octubre **2011**, Montevideo, poster.
- Possi-Pezzali, T., Rodriguez*, M.A. "Solvent-free Sample Preparation for LC-MS/MS

Confirmatory Analysis of Veterinary Drugs in Equine Urine Matrix”, 1780 (WP07), Proceedings of the 59th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Denver, Colorado, USA, 5-9Junio, **2011**, poster.

- Possi-Pezzali, Tania*, Rodríguez, M.A. “Química Verde en el Desarrollo de un Método Confirmatorio para la Determinación de Flunixin en Matrices Biológicas”, XVIII Jornadas de Jóvenes Investigadores de AUGM. La investigación científica: eje del desarrollo regional en los albores del bicentenario de la independencia latinoamericana, Santa Fé, Argentina, 19-21 Oct, **2010**, poster y oral.
- Possi-Pezzali, T., Rodriguez, M.A.* “A Greener Approach to Sample Preparation in Analysis of Flunixin in Equine Urine Matrix”, 3rd International IUPAC Conference on Green Chemistry, Ottawa, Canadá, 15-18 Ago, **2010**, poster.
- Possi-Pezzali, T., Rodríguez, M.A. “Diferenciación de Isómeros Mediante Técnicas de Espectrometría de Masa Tándem”, Enaqui, Montevideo, Diciembre **2009**, poster.