



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“Uso de los diuréticos como agentes enmascarantes
en el dopaje deportivo”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO

P R E S E N T A

RUDY URIEL CONFESOR RIVERA



MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente: Lilliana Virginia Raquel Saldivar y Osorio
Vocal: Ernestina Cervera Flores
Secretario: Antonio Hernández Martínez
Primer suplente: Adolfo García Osuna
Segundo suplente: Araceli Patricia Peña Álvarez

El presente trabajo se desarrolló en el Departamento de Ecología y Recursos Naturales. Laboratorio de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias, UNAM.

Asesor:

M.en C. Antonio Hernández Martínez

Sustentante:

Rudy Uriel Confesor Rivera

DEDICATORIAS

A Dios, por todo lo que me ha dado y lo que me ha dejado de dar, para poder cristalizar este sueño de éxitos y satisfacción personal.

A mis Padres, Flori y Zefis LOS AMO, gracias por su incondicional amor, cariño, apoyo, consejo y dedicación a lo largo de mi vida, inculcándome el camino de la preparación, es el que lleva al éxito siempre. Gracias por ayudarme a ser como soy, los amo, son mi modelo a seguir, tanto como seres humanos, como pareja y en especial el futuro que seguirán a mis pasos.

A mis Hermanos Sindy y Honter, por todo el cariño y apoyo que me han mostrado siempre, esperando que este trabajo los inspire a seguir adelante, no duden que el camino que han elegido los ayudara a ser los mejores y más grandes de todos.

A mi Familia, aún a quienes han partido, pues son una bendición.

A mis amigos, Erick, Walter, Jess, Ever, Aleja, Coca, Dan, Lalo, Itz, Moi, Héctor por su amistad y lealtad inquebrantable, con ellos he pasado muchísimos grandes momentos de mi vida y espero poder vivir muchos mas iguales.

A mis maestros, por su invaluable instrucción.

A mis compañeros, a todos y cada uno de ustedes Q's 2002, mil gracias por formar parte de un equipo de trabajo, que nos llevo a terminar con esta carrera, con los mejores resultados y ahora formar parte de la vida productiva de este hermoso país.

Al Lic. Manuel y familia Romero, por todo el apoyo, consejos y guía que nos han brindado en estos años de conocerlos.

A ti... que desde hace años nos conocemos, donde todo inicio como una amistad, paso el tiempo y se transformo en un cariño que difícilmente un día se olvidara, gracias por quererme, por aquel lindo amor que por mucho tiempo nos unió, fuiste y eres parte importante de mi vida y por siempre te llevo en el corazón, eres esencial en mi vida y eso lo sabes...

A todos los que han estado conmigo, gracias muchas gracias, ya que sin ustedes no seria como soy ahora... Mil Gracias!!!

AGRADECIMIENTOS

Al mi tutor, M. en C. Antonio Hernandez. Muchas gracias por apoyarme en todo momento en este maravilloso proyecto, por todos los consejos, por estar siempre listo para resolver mis dudas y por tu acertada guía que lograron que este sueño se alcanzara.

A la Dra. Liliana Virginia Raquel Saldivar y Osorio, quien con sus observaciones, recomendaciones y conocimientos lograron complementar este trabajo.

A la maestra Ernestina Cervera Flores, gracias por sus anotaciones, que permitieron que este trabajo se complementara satisfactoriamente.

A la Facultad de Química, quien me ha brindado conocimientos y una visión diferente para poder desempeñarme día a día.

A la UNAM quien me brindo todo su apoyo, oportunidades y recursos para poder llevar a cabo este sueño.

A todos quienes me apoyaron, ya sea con sus consejos, tips o conocimientos que ayudaron a lograr este sueño.

NINGUNA CIENCIA, EN CUANTO A CIENCIA, ENGAÑA;
EL ENGAÑO ESTÁ EN QUIEN NO SABE.
CERVANTES DE SAAVEDRA

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1. Objetivo principal.....	3
2.2. Objetivos Particulares.....	3
3. ANTECEDENTES.....	4
3.1. Breve historia del dopaje en el ámbito deportivo.....	4
3.2. <i>La Agencia Mundial Anti-dopaje (WADA; AMA)</i>	11
3.3. Historia del Dopaje y de sus definiciones.....	12
3.3.1. Programa mundial anti-dopaje.....	15
3.3.2. El código mundial anti-dopaje.....	15
3.4. Los estándares internacionales.....	18
3.4.1. La lista de sustancias y métodos prohibidos. La lista prohibida.....	18
3.4.2. Pruebas.....	20
3.4.3. Laboratorios.....	20
4. QUÍMICA DE LOS DIURÉTICOS.....	21
4.1. Aspectos Generales.....	21
4.2. Estatus de los diuréticos en el deporte.....	25
4.2.1. Compuestos de interés.....	26
4.3. Modo de acción de los diuréticos en el metabolismo humano.....	27
5. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS Y ESPECTROMÉTRICAS.....	28
5.1. La cromatografía.....	28
5.2. Extracción en fase sólida (EFS-SPE).....	30
5.3. Cromatografía de gases (GC).....	33
5.3.1. Instrumentación.....	34
5.4. Espectrometría de masas.....	38
5.5. El acoplamiento de la cromatografía de gases a espectrometría de masas (GC-MS).....	43
5.6. El uso del HPLC acoplado EM en el análisis de los diuréticos.....	45
5.6.1 Cromatografía Líquida.....	47
5.7. Disolución de la muestra y selección de la fase móvil.....	48
5.8. Ionización de los analitos.....	50
5.9. Ionización Electrospray (ESI).....	50
5.10. Electrospray positivo.....	51
5.11. Electrospray negativo.....	52
5.12. Factores que afectan la ionización en ESI.....	52
5.14. Analizador Triple Cuadrupolo (QqQ).....	53
6. ANÁLISIS DE DIURÉTICOS EN UN LABORATORIO CONTROL DE DOPAJE.....	55
6.1. Proceso.....	55
6.2. Condiciones analíticas de los equipos.....	57
6.2.1. Condiciones de trabajo para el HPLC.....	57
7. DISCUSIÓN.....	59
8. CONCLUSIONES.....	61
9. LITERATURA CITADA.....	62

1. INTRODUCCIÓN

En el mundo actual, el ámbito deportivo ha adquirido cada vez mayor relevancia y trascendencia en diversos aspectos, especialmente en el económico y el social, donde no sólo es una actividad que observan y practican millones de individuos alrededor del mundo, sino que además, constituye un negocio de miles de millones de dólares al año provenientes de contratos publicitarios, derechos de transmisión televisiva y un amplia gama de intereses financieros que giran alrededor de este. Un ejemplo de ello es el pasado mundial de Sudáfrica 2010 donde se realizó una inversión aproximada de 2,300 millones de dólares, de acuerdo a datos proporcionados por la FIFA.

Dada la propia naturaleza competitiva del deporte, así como la irrefrenable tendencia de algunos practicantes desleales a la competencia justa, internacionalmente conocida como “Fair Play”, no han faltado quienes, en miras de conseguir la victoria en el campo de juego y sus consecuentes beneficios, han recurrido a sustancias señaladas como ilegales por las entidades federativas, así como de los reglamentos que se encuentran en el Código Mundial Antidopaje, las cuales, en teoría, aumentan el rendimiento físico de los atletas, o bien, enmascaran el uso de este tipo de sustancias, para obtener una ventaja indebida sobre el resto de sus competidores.

Uno de los grupos importantes que se encuentran prohibidos por las agencias deportivas es el de las sustancias enmascarantes, en donde la finalidad de su uso es específicamente para ocultar o enmascarar el uso de otro tipo de sustancias que aumente el desempeño físico del deportista. El modo de acción que presentan es diverso, ya que depende del tipo de sustancia utilizada. En este grupo encontramos a los diuréticos, a los expansores del plasma, a la epitestosterona y los inhibidores de la 5 α -reductasa.

Considerando la alta prevalencia del dopaje deportivo por los atletas y dado el poco estudio que se ha realizado en nuestro país sobre este tema, en el presente trabajo se presenta la investigación de la historia, la actividad biológica y los métodos de análisis de los diuréticos como sustancias prohibidas en el deporte.

El presente trabajo consiste en una recopilación hemerográfica que pretende servir como una herramienta que apoye al lector en dos niveles; el primero, sumamente general, que consiste en sensibilizar al lector sobre la trascendencia social y los peligros que implica el consumo de sustancias ilegales favorecedoras del rendimiento deportivo y, en consecuencia, la necesidad de su regulación. El segundo nivel, está enfocado a los especialistas en el campo de las ciencias, presentando antes ellos un trabajo estructurado que sirva como apoyo en la consulta de información relacionada con el estudio del dopaje y que lo auxilie en el planteamiento de soluciones ante esta problemática mundial.

Por estas razones, en el capítulo 3 se hará referencia a los orígenes históricos de la práctica deportiva y del dopaje, así como a definiciones de la palabra dopaje en la actualidad, se presenta una breve semblanza del organismo internacional rector del dopaje la Agencia Mundial contra el Dopaje (World Anti-Doping Agency (WADA) por sus siglas en inglés), programas, códigos y estándares bajo los que regulan y llevan a cabo estudios por parte de este organismo; del capítulo 4, se tratará este conjunto de sustancias clasificadas como prohibidas en el mundo deportivo revisando sus generalidades, usos y funciones; en el capítulo 5, se analizará las principales técnicas cromatográficas usadas para la detección de este tipo de sustancias; Finalmente, en el capítulo 6 se analiza de forma precisa a los diuréticos, con el objetivo de conocer qué rol desempeñan en el tema del dopaje.

2. OBJETIVOS

2.1. *Objetivo principal*

- Dar a conocer a través de la presente recopilación hemerográfica las condiciones y aspectos más importantes en el análisis de sustancias prohibidas, mediante diferentes técnicas analíticas, para detectar la administración de los diuréticos y de esta forma contribuir a disminuir el dopaje deportivo con este tipo de sustancias.

2.2. *Objetivos Particulares*

- Presentar la reglamentación y aspectos generales actuales acerca de la agencia mundial antidopaje (WADA) sobre este tipo de sustancias.
- Describir las diferentes técnicas y procesos empleados para la detección de los diuréticos, así como proporcionar el método analítico para la identificación de estas sustancias.
- Conocer la obtención y metabolismo de los diuréticos.
- Dar inicio en un tema de investigación de relevante importancia en nuestro país que ha sido poco estudiado.

3. ANTECEDENTES

3.1. *Breve historia del dopaje en el ámbito deportivo*

La práctica del uso de sustancias que mejoran el rendimiento deportivo, es tan antigua como el deporte mismo, donde incluso los antiguos atletas griegos utilizaban dietas especiales y pociones estimulantes para fortalecerse, principalmente hidromiel, como estimulante del Sistema Nervioso Central, y vino, por sus efectos inhibidores y relajantes, todo para obtener un mayor rendimiento en las pruebas olímpicas de la época. En las Olimpíadas del siglo III d.C., los atletas usaban preparaciones a base de extractos de plantas, semillas y hongos, para favorecer su rendimiento. (Domínguez; et. al., 2011)

Se puede decir, por tanto, que la historia del dopaje se remonta a los Juegos Olímpicos de la Grecia Clásica, aunque no es hasta la segunda mitad del siglo XIX cuando comienza su auge.

En 1896 el ciclista Inglés Andrew Linton muere de una sobredosis de drogas dos meses después de haber ganado la carrera Burdeos-Paris, convirtiéndose en el primer caso registrado de muerte en los deportes a causa del dopaje.

En el siglo XIX, los ciclistas y otros atletas de resistencia utilizaron estricnina, cafeína, cocaína y alcohol para mejorar su desempeño. Thomas Hicks, por ejemplo, logró la victoria en el maratón Olímpico de 1904 en Saint Louis con la ayuda de huevos crudos, inyecciones de estricnina y dosis de brandy.

En la década de 1920, se hizo evidente la necesidad de imponer restricciones en cuanto al uso de drogas en el deporte. En 1928, la Federación Internacional de Atletismo Amateur (IAAF, por sus siglas en inglés) (Federación Internacional de Fútbol Asociación. Ya en la época de los griegos; et. al., 2010), se convirtió en la primera federación deportiva internacional que definió el concepto de dopaje y prohibió el uso de sustancias estimulantes. Muchas otras federaciones internacionales hicieron lo mismo, pero las restricciones no fueron efectivas dado que no se les realizaban análisis a los atletas.

El problema empeoró a causa de las hormonas sintéticas, creadas entre 1930-1940 y su creciente uso durante la década de los 50's, un caso en particular que destaca es la síntesis de la testosterona que es lanzada al mercado como un esteroide inyectable.

Antes de la implementación de los programas de muestreo de drogas a finales de 1960, el uso de sustancias para aumentar el desempeño físico por parte de los atletas era comúnmente aceptado dentro de la comunidad deportiva internacional. Atletas, técnicos y dirigentes usualmente simulaban desconocer el hecho o simplemente lo practicaban abiertamente. Aunque la droga se reportó como algo ampliamente usado en los Juegos de Helsinki en 1952 y un poco menos en los Olímpicos de Melbourne en 1956, los países eventualmente en esa época comenzaron a preocuparse por el daño que estaba causando en los individuos y al deporte.

En 1960, durante una competencia ciclística en los Juegos Olímpicos de Roma, el competidor danés Knut Enemark Jensen, murió debido a una fractura de cráneo producida al caer de su bicicleta. La necropsia del atleta reveló restos de Ronicol, una anfetamina estimulante del sistema circulatorio, hecho que incrementó la presión política y social sobre las autoridades rectoras del deporte para la

introducción de programas antidoping. (WADA; Brief History of Antidoping et al., 2009)

En 1966, la Unión de Ciclismo Internacional (UCI), y en 1970, la Federación Internacional de Fútbol Asociación (FIFA) estuvieron entre las primeras federaciones deportivas internacionales que introdujeron las pruebas de dopaje en sus Campeonatos Mundiales. Al año siguiente, el Comité Olímpico Internacional (COI) estableció su primera lista de sustancias prohibidas. Los análisis se realizaron por primera vez en los Juegos Olímpicos de Invierno en Grenoble y en los Juegos de Verano de México en 1968, luego de la trágica muerte del ciclista Tom Simpson durante el Tour de France en 1967. (Federación Internacional de Fútbol Asociación. Ya en la época de los griegos; et. al., 2010)

Ya para 1972 en los Juegos Olímpicos de Munich, se realizan pruebas de orina a los atletas en manera masiva. Siete atletas dan positivo en la prueba de sustancias prohibidas. A partir de esto la mayoría de las Federaciones deportivas Internacionales introdujeron los controles antidopaje durante los 70's. No obstante, el uso de esteroides anabólicos se expandía, especialmente en los eventos de fuerza, sin que hubiera forma de detectarlos. No fue sino hasta 1974 que se introdujo un método de análisis confiable para detectar esteroides anabólicos.

El Comité Olímpico Internacional agregó los esteroides a su lista de sustancias prohibidas en 1975. Esto trajo como consecuencia un aumento significativo en la cantidad de descalificaciones por consumo de drogas a fines de la década de los 70's, especialmente en los deportes relacionados con la fortaleza, tales como las disciplinas de lanzamientos y el levantamiento de pesas.

El trabajo contra el dopaje resultó complicado en las décadas de los 70's y 80's por sospechas de ser financiado por el Estado en algunos países, particularmente de la Alemania Federal.

El caso de dopaje más famoso de la década de los 80's fue el de Ben Johnson, medalla de oro en los 100 metros, cuya prueba dio resultado positivo por uso del esteroide anabólico; el estanozolol, en los Juegos Olímpicos celebrados en Seúl en 1988. El caso de Johnson dirigió la atención mundial al problema del dopaje a un nivel sin precedentes. Para 1982 el Comité Olímpico Internacional añade a la cafeína y la testosterona a la lista de sustancias vetadas.

Mientras la lucha contra los estimulantes comenzaba a producir resultados, el frente principal de la batalla antidopaje, cambió súbitamente al dopaje sanguíneo o autotransfusión, cuyo método implica la extracción de sangre del atleta mientras entrena en campamentos de una altura elevada sobre el nivel del mar, donde el nivel de hemoglobina (el elemento transportador del oxígeno en la sangre) se encuentra incrementado y, subsecuentemente, se procede a la inyección de esa misma sangre antes de la competencia, lo que aumenta la oxigenación de los músculos y, por tanto, el rendimiento del atleta. Un ejemplo de este caso lo protagonizó el equipo de ciclismo olímpico de los Estados Unidos que ganó nueve medallas pero utilizando transfusiones ilegales de sangre para mejorar su desempeño.

Para 1988 le son retiradas a la delegación de Bulgaria dos medallas de oro en halterofilia por el uso de diuréticos que disimulan el uso de esteroides. No obstante, a pesar de los esfuerzos de los organismos internacionales rectores del deporte por combatir estas prácticas, otro sector continuaba la búsqueda de formas de incrementar los niveles de hemoglobina; una de ellas fue encontrada en una hormona llamada eritropoyetina (EPO) la cuál fue incluida en la lista de sustancias prohibidas del Comité Olímpico Internacional en el año de 1990 provocando serias complicaciones debido a la falta de un método confiable de detección. No fue sino hasta los juegos Olímpicos de Sydney, en el año 2000, donde a través de la combinación de análisis de sangre y de orina, pudo ser detectada.

En 1998, la policía encontró una gran cantidad de sustancias prohibidas en una redada durante *La Tour de France*, al grado que dicho evento sería conocido como “La tour de la vergüenza”. El escándalo condujo a una reevaluación importante de la función de las autoridades públicas en los asuntos antidopaje. De hecho, Francia se convirtió en el primer país que aprobó una ley antidopaje. Otros países siguieron el ejemplo galo, pero la cooperación internacional en materia de antidopaje se limitó durante mucho tiempo al Consejo Europeo. El escándalo de *La Tour de France*, hizo notar la necesidad de un organismo internacional independiente que estableciera un conjunto unificado de normas para la lucha en contra del dopaje y que coordinara los esfuerzos de las organizaciones deportivas y las autoridades gubernamentales. El Comité Olímpico Internacional tomó la iniciativa y organizó la Conferencia Mundial sobre el Dopaje en el Deporte en Lausana en febrero de 1999. A propuesta de la conferencia se creó la Agencia Mundial contra el Dopaje (World Anti-Doping Agency, WADA por sus siglas en inglés) el 10 de noviembre de 1999. (WADA. Regional Offices; et al., 2011)

El 5 de marzo de 2003 en la segunda Conferencia Mundial sobre el Dopaje en el Deporte 1200 delegados representantes de 80 gobiernos, el Comité Olímpico Internacional, el Comité Paralímpico Internacional, las Federaciones Internacionales de todos los deportes Olímpicos, los comités nacionales Olímpicos y Paralímpicos, los atletas, las organizaciones nacionales antidopaje y los organismos internacionales apoyaron el Código Mundial contra el Dopaje como la base para la lucha contra el dopaje en el deporte. El Código comenzó a aplicarse el 1 de enero de 2004.

Uno de los instrumentos más sobresalientes en esta materia es la Convención Internacional contra el Dopaje en el Deporte de la UNESCO del 19 de octubre de 2005; un documento político mediante el cual los gobiernos expresaron su intención de armonizar sus esfuerzos en la lucha contra el Dopaje (WADA; Brief History of Antidoping et al., 2009). En 2007 la velocista norteamericana Marion Jones, ganadora de 5 medallas en los Juegos Olímpicos de Sídney 2000, por presiones mediáticas confiesa haber consumido esteroides y le son retiradas sus preseas. El último acontecimiento que fue muy mencionado en diversos medios fue el relacionado con el uso de esteroides por parte de los Jugadores de las Ligas Mayores de Béisbol en los Estados Unidos, el encargado de realizar esta investigación fue el ex Senador de Estados Unidos George Mitchell, que presentó un informe donde se veían involucrados importantes jugadores de la mencionada liga, entre ellos el pelotero Roger Clemens, quien después de haber negado las acusaciones, enfrenta dos casos de perjurio ante el Senado de los Estados Unidos. En la **Tabla 1** se muestran los eventos más significativos en la historia del dopaje deportivo.

Tabla 1: Eventos más significativos en la historia del dopaje

Hace siglos.	Los incas consumían un masticado de coca (<i>Erythroxilon spp</i>), que ayuda a combatir la fatiga; por otro lado los guerreros nórdicos, comieron hongos que contienen muscarina antes de la batalla.
Antiguos deportistas olímpicos.	El pan remojado en el opio, las setas, la estricnina.
Principios de 1900	Nadadores y ciclistas tomando estimulantes.
La Segunda Guerra Mundial	Anfetaminas para contrarrestar la fatiga entre los soldados y pilotos.
1950	Los esteroides anabólicos androgénicos fueron introducido en el dopaje; Síntesis dianazol inspirado en la gente en el deporte.
1959	Estudios clásicos controlados muestran que las anfetaminas mejoran el rendimiento en disciplinas como nadar y correr a distancia.
1960 Olimpiadas	Primera víctima mortal dopaje documentada-anfetamina inducida por golpe de calor.
1964	El Comité Olímpico Internacional (COI) prohíbe el dopaje de los atletas olímpicos
1966–72	Alemania del Este establece un sistema secreto nacional de la hormona de dopaje de los hombres y las mujeres con metandrostenolona y el estado fabricados oral-turinabal.
1967	Muerte de dopaje durante el Tour de Francia, la COI adopta una política de análisis de drogas.
1970	Los diuréticos son utilizados para alcanzar el "derecho" de peso y para diluir la orina antes de la prueba de drogas.
1973	El campeón olímpico Connolly testifica el uso conjunto de los esteroides anabólicos entre los atletas a EE.UU. comité del Senado.
1974	Los esteroides anabólicos androgénicos (EAA) se incluyen en la lista de dopaje.
Hasta 1980	Anfetaminas, la cocaína, la cafeína y estricnina dominan casos de dopaje
1980	El uso de esteroides anabólicos androgénicos se extendió a muchos deportes.
1980	β -bloqueantes son utilizados para mejorar el tiro, aparece un mal uso de la hormona del crecimiento.
1988	Primera medalla de oro olímpica en atletismo despojado por dopaje con EAA.
2000	Tetrahydrogestrinona (THG o "el claro"), un EAA diseñado para escapar a la detección de análisis de dopaje, es desarrollado.
2007	Marion Jones reconoce haber tomado "el claro", una droga que mejora el rendimiento, le son retiradas sus medallas.

Tomado de (SJÖQVIST; et. al. 2008.)

3.2. La Agencia Mundial Anti-dopaje (WADA; AMA)

La Agencia Mundial Antidopaje (World Anti-Doping Agency, WADA por sus siglas en inglés) fue creada bajo forma de fundación sin fines lucrativos, el 10 de noviembre de 1999 para promover, coordinar y monitorear la lucha contra el dopaje en el deporte en todas sus formas. (WADA. Acerca de la agencia mundial antidopaje; et al., 2012)

Su creación, como ya se ha dicho anteriormente, fue resultado del compromiso adquirido en la Declaración de Lausana de 4 de febrero de 1999, bajo la iniciativa del Comité Olímpico Internacional, con el respaldo y participación de organizaciones intergubernamentales, autoridades Públicas y Deportivas, así como otros entes públicos y privados involucrados en la lucha contra el dopaje.

La sede original de la Agencia fue situada en Lausana, pero en el año 2001, por acuerdo del Consejo de Fundación de la Agencia, las oficinas centrales fueron trasladadas a la ciudad canadiense de Montreal. Ese mismo año se decidió la apertura de oficinas regionales que facilitarían la labor de la organización. (WADA. Regional Offices; et al., 2011)

Al momento del traslado de la sede, en abril de 2002, se instauró en Lausana la primera oficina regional de la Agencia, con competencia sobre todo el continente europeo. En noviembre de 2003 se abrieron dos nuevas oficinas regionales, la primera situada en Tokio para que sirviera a la región Asia- Oceanía; y la segunda en El Cabo, Sudáfrica, encargada de los asuntos de África.

La más reciente oficina regional, a fin de servir a América Latina, fue abierta en 2005 en la ciudad de Montevideo, por lo que hasta el día de hoy, existen cuatro oficinas regionales de la Agencia Mundial Antidopaje. (WADA. Regional Offices; et al., 2011)

El lema de la WADA es el del “Juego Limpio” que expresa el espíritu universal del deporte practicado naturalmente dentro de las reglas y sin el uso de mejoras artificiales. Los colores de la WADA tienen su significado: el negro indica la justicia impartida por el árbitro mientras que el verde evoca la imagen de la salud, la naturaleza y el campo de juego tradicional. (WADA. Acerca de la agencia mundial antidopaje; et al., 2012)

3.3. Historia del Dopaje y de sus definiciones

La palabra dopaje se deriva probablemente del término holandés “Dop”, el nombre de una bebida alcohólica hecha de piel de uva y usada por los guerreros Zulú a fin de mejorar sus habilidades en batalla. El término entro en uso en el siglo XX, originalmente refiriéndose a las drogas ilegales en las carreras de caballos. La práctica de mejorar el desempeño a través de sustancias exógenas u otros medios artificiales, es sin embargo, tan antigua como el deporte mismo. Su empleo se generalizó para referirse a todo tipo de sustancia alucinógena y apareció por primera vez en un diccionario de lengua inglesa en 1879. (WADA. Acerca de la agencia mundial antidopaje; et al., 2012)

En enero de 1963 se celebró en Uriage-les-Bains (Francia) el Primer Coloquio Europeo de Medicina Deportiva, en el que se propuso la siguiente definición de dopaje: “La administración a una persona sana, o la utilización por ella misma, de sustancias extrañas al organismo o de sustancias fisiológicas, en cantidades o por vías anormales, con el único fin de conseguir un aumento artificial del rendimiento de esta persona al participar en una competición”. (Barbero; et. al., 2011.)

Posteriormente, la palabra doping fue castellanizada, limitada al ámbito deportivo y finalmente incluida en las últimas revisiones del Diccionario de la Lengua Española por la Real Academia, donde es definida como el “...empleo de fármacos o sustancias estimulantes para potenciar artificialmente el rendimiento de los deportistas”. (Diccionario de la Real Lengua Española; et. al., 2011)

La primera definición con carácter extensivo y reconocida de forma oficial durante 20 años, se elaboró en la primera reunión del grupo de estudio especial del Consejo de Europa, celebrada en Estrasburgo en enero de 1963, reconociéndose la definición como la del Consejo de Europa, siendo el tema central “Dopaje en los atletas”. En esta reunión se estableció como definición de dopaje la siguiente definición: “Doping es la administración a una persona sana, o la utilización por ella misma y por cualquier medio, de una sustancia extraña al organismo o de una sustancia fisiológica utilizadas en cantidades o por vías anormales, con el único fin de aumentar artificialmente y de forma ilegal el rendimiento de esta persona al participar en una competición”. (Barbero; et. al., 2011)

Otra definición importante en la lucha contra el dopaje fue la que se realizó en 1984 por parte de los Ministros Europeos responsables del deporte, los cuales aprobaron un texto simple, llamándolo la “Definición de la Carta Europea contra el dopaje en el deporte”. En esta definición se decía que: “El dopaje en el deporte consiste en emplear, infringiendo los reglamentos de las organizaciones deportivas competentes, sustancias o categorías de sustancias que están prohibidas” (Technische Universitat Munchen; et. al., 2011).

La definición del Convenio contra el dopaje del Consejo de Europa que fue elaborado en 1989 y ratificado a partir de esta fecha por diversos Estados europeos, considera a sus efectos la siguiente definición de dopaje: “El dopaje en el deporte es la administración a los deportistas, o el uso por ellos mismos, de clases farmacológicas de agentes dopantes o de métodos de dopaje, prohibidos por las organizaciones deportivas internacionales competentes y que como tales figuran en las listas aprobadas por el Grupo de Seguimiento del Convenio”. (Barbero; et. al. 2011).

El Comité Olímpico Internacional (C.O.I. por sus siglas en inglés) realizó una definición al respecto antes de la fundación de la WADA, definiéndola como “la presencia en el cuerpo humano de sustancias prohibidas de acuerdo con la lista publicada por el Comité Olímpico Internacional y/o a la Organización Internacional del miembro de la Organización en cuestión”. (Technische Universitat Munchen; et. al., 2011).

Todo este conjunto de definiciones antes descritas, pueden resultar insuficientes para ilustrar la problemática que aborda esta investigación, es por ello que para dar una mayor cantidad de certeza y sustentabilidad al presente trabajo, se presentara la definición oficial actual de dopaje, basada en el Código Mundial Anti-dopaje emitida por el máximo organismo rector del dopaje: la WADA.

De acuerdo con la WADA (WADA. The World Anti-Doping Code; et. al., 2011) el dopaje se define como **la ocurrencia de una o varias de las violaciones de las normas antidopaje**. La definición de dopaje que más nos interesa menciona que una violación al dopaje es: "la presencia de una sustancia prohibida o sus metabolitos o marcadores en la muestra de un atleta".

En específico, la regla de antidoping que interesa en un Laboratorio de Prevención y Control del Dopaje se establece en el artículo 2.1, el cual habla sobre la presencia de una sustancia prohibida o de sus metabolitos o marcadores en la muestra de un atleta y menciona que: “corresponde a cada deportista asegurarse de que ninguna sustancia prohibida se introduzca en su cuerpo”. Los atletas son responsables de que cualquier sustancia prohibida o de sus metabolitos o marcadores estén presentes en sus muestras. En consecuencia con esto, no es necesario que la intención, culpa, negligencia o el conocimiento por parte del deportista con el fin de establecer una violación al código de antidopaje, en especial del artículo 2.1 establecido en el Código Mundial Anti-dopaje (WADA. The World Anti-Doping Code; et. al., 2011).

Además, otras situaciones también se consideran dopaje como: "(i) la negativa de eludir la toma de muestras, (ii) violación de los requisitos aplicables sobre el atleta para los controles fuera de competencia, (iii) la falsificación o intento de alteración de cualquier parte del control del dopaje, (iv) la posesión de sustancias prohibidas y métodos prohibidos, (v) la trata o el tráfico en alguna sustancia o método prohibido y (vi) la administración, la asistencia, incitación, contribución, instigación, encubrimiento o cualquier otro tipo de complicidad involucra una violación de las reglas antidoping".

3.3.1. Programa mundial anti-dopaje

Con la finalidad de armonizar óptimamente los programas y buenas prácticas en la lucha global contra el dopaje a nivel nacional e internacional, la Agencia Mundial Antidopaje, ha sintetizado su movimiento en el llamado Programa Mundial Antidopaje (WADP, World Anti-Doping Program) el cual está compuesto de tres elementos principales:

- El Código Mundial Antidopaje
- Los Estándares Internacionales
- Los Modelos de Mejores Prácticas (WADA. The World Anti-Doping Code; et. al., 2011).

3.3.2. El código mundial anti-dopaje

Se trata de la generación de un documento como la primera gran iniciativa de la Agencia Mundial Antidopaje para armonizar la lucha contra el dopaje.

La primera versión del Código sale a la luz el 5 de marzo de 2003 en la conferencia Mundial sobre el Dopaje en el Deporte celebrada en Copenhague y posteriormente en la Conferencia Mundial de Madrid en noviembre de 2007 finaliza el proceso de reforma el Código mediante un proceso de consulta democrática que inició en abril de 2006, con el fin de que esta nueva versión entrara en vigor desde el 1º. De enero de 2009.

Desde antes de cumplir los tres años de existencia, el Código disfruta de un reconocimiento casi absoluto: lo acepta el Comité Olímpico Internacional (COI) e incluso está citado explícitamente en la Carta Olímpica; toda las federaciones de deportes olímpicos, incluida la Federación Internacional de Fútbol Asociación (FIFA), han aceptado su aplicación y, mediante la Convención Internacional contra el Dopaje en el Deporte, recientemente analizada, se insta a los Estados a adoptar sus nociones fundamentales.

El Código Mundial Antidopaje expone como su fundamento, el llamado “espíritu del deporte”, esencia misma que procede del olimpismo, que insta a jugar limpio y se caracteriza por los siguientes valores:

- Ética, juego limpio y honestidad.
- Salud.
- Excelencia en el ejercicio.
- Desarrollo de la personalidad y educación.
- Diversión y alegría.
- Trabajo en equipo.
- Dedicación y compromiso.
- Respeto por las normas y las leyes.
- Respeto por uno mismo y por los otros participantes.

Estos valores, los cuales se consideran inherentes al deporte mismo, son dignos de ser protegidos y al ser el dopaje una práctica contraria a las mismas, se encuentran absolutamente justificados los alcances de su prohibición.

También hay que hacer notar que el Código Mundial Antidopaje opta por alejarse de las determinaciones ambiguas y genéricas que definen al dopaje como el consumo de "...cualquier sustancia o empleo de todo método dirigido a incrementar artificialmente el rendimiento de los deportistas", (WADA. The World Anti-Doping Code; et. al., 2011) y en su lugar, hace referencia a una lista de sustancias, conforme al artículo 4° del documento que establece la Lista Prohibida, publicada por la Agencia Mundial Antidopaje, al menos una vez al año. Con base en esto se debe mencionar que la Lista de Prohibiciones para el año 2012 y las de varios años anteriores, si bien incluyen una extensa lista de sustancias, se clasifican con base en diversos criterios, como por ejemplo: la temporada en que se encuentran prohibidas (en todo momento o sólo durante la competencia) o la familia química a la que pertenecen, estructura química y efectos biológicos (Farquhar; et. al., 1989) lo cual podría vulnerar en determinado momento la seguridad jurídica del deportista.

En resumen se puede decir que el Código refuerza el principio de firmeza y equidad en el deporte, ejecutando sanciones si se incurren en prácticas de dopaje resultado de tratamientos médicos o ingestiones sin intención, teniendo una mayor flexibilidad en la aplicación de sanciones ante este último caso pudiendo modificar sustancialmente la sanción si lo ameritara.

3.4. *Los estándares internacionales*

De acuerdo al Código Mundial Antidopaje, son cuatro los estándares internacionales diseñados para “...armonizar diferentes aspectos técnicos y operativos del antidopaje”, estos deben ser aceptados por los Estados y organizaciones firmantes. Estos estándares son: La lista prohibida, Excepción de uso terapéutico, Pruebas, Laboratorios y Protección de la privacidad (WADA. Prohibited list – List Revision Timeline; et. al., 2011).

A continuación se describirán brevemente cada uno de ellos.

3.4.1. La lista de sustancias y métodos prohibidos. La lista prohibida

Desde el 2004, como un mandato del Código, WADA es responsable de la preparación y publicación anual de La Lista. Es una piedra angular del Código y un componente clave para la armonización, identificando las sustancias y métodos prohibidos en competición, fuera de competencia y en deportes en particular.

De acuerdo al Código Mundial Antidopaje, una sustancia o un método será susceptible de ser incluido en la lista de prohibiciones de la Agencia, si cumple con dos de los tres siguientes criterios:

- Mejorar el rendimiento deportivo
- Amenazar real o potencialmente la salud del atleta y,
- Violar el espíritu deportivo.

(WADA. The World Anti-Doping Code; et. al., 2011)

La lista de prohibiciones del 2012, distingue tres apartados:

- Sustancias y métodos prohibidos en todo momento (durante y fuera de competición).
- Sustancias y métodos prohibidos durante la competición.
- Sustancias prohibidas en ciertos deportes.

En la **Tabla 2** se muestra las clases de sustancias prohibidas para el año 2012.

Tabla 2: Grupos de sustancias y métodos prohibidos.

CÓDIGO	ESPECIFICACIÓN
S0	Sustancias no aprobadas
S1	Agentes anabolizantes
S2	Hormonas peptídicas. Factores de crecimiento y sustancias afines
S3	Beta-2-agonistas
S4	Antagonistas y moduladores hormonales
S5	Diuréticos y otros agentes enmascarantes
S6	Estimulantes
S7	Narcóticos
S8	Cannabinoides
S9	Glucocorticoesteroides
P1	Alcohol
P2	Betabloqueantes
M1	Aumento de la transferencia de oxígeno
M2	Manipulación física y química
M3	Dopaje genético

3.4.2. Excepción de uso terapéutico

Se trata de las reglas que deben seguirse para que una organización otorgue a un deportista, la autorización de usar cierta sustancia que se encuentra vetada por la lista de prohibiciones, por ser ésta necesaria para un tratamiento médico. Se fundamenta en el artículo 4.4. del Código.

3.4.2. Pruebas

Este estándar, armoniza la planeación para una efectiva toma de muestras, con la intención de mantener la integridad e identidad de las mismas, desde la notificación al atleta hasta su transporte para el análisis. Cabe destacar que se hace hincapié en el anonimato de las muestras, de tal modo que el encargado del análisis de laboratorio ignore a qué deportista pertenece la muestra en estudio.

3.4.3. Laboratorios

Este estándar internacional es el más extenso de todos. El mismo, especifica con detalle las características y garantías que han de cumplir los laboratorios de antidopaje acreditados, con el objetivo de asegurar la producción de resultados válidos de pruebas, reunir datos de evidencia, lograr resultados y reportes uniformes y armonizados.

4. QUÍMICA DE LOS DIURÉTICOS

4.1. Aspectos Generales

Los diuréticos son fármacos ampliamente utilizados en la práctica clínica, principalmente en el tratamiento de la hipertensión y en diferentes tipos de edema (Weiner, et. al., 1990) (Dirks, et. al., 1986.). Los diuréticos aumentan la excreción renal de agua y electrolitos, como consecuencia de su acción perturbadora del transporte iónico en la nefrona. Actúan interfiriendo en la reabsorción tubular de sodio y esto conduce a un aumento de la excreción renal que se acompaña por la eliminación de agua.

Los diuréticos pueden ser clasificados de acuerdo a su estructura química (**Fig. 1**), su mecanismo y su sitio primario de acción en la nefrona y a su potencia como diurético (**Tabla 3**). Los diuréticos con acción primaria en el túbulo proximal incluyen los inhibidores de la anhidrasa carbónica como la acetazolamida y diclofenamida que son derivados sulfonamidas; su eficacia diurética es baja, haciendo que la excreción de sodio sea de menos del 5% filtrado. La máxima eficacia (excreción de más del 15% de sodio filtrado) se alcanza con las drogas que tienen sus principales actividades en la rama ascendente del asa de Henle por la inhibición del sistema electroneutral sodio-potasio-cloro: se trata de derivados sulfonamidas, como la furosemida, bumetanida y piretanida, y los ácidos fenoxiacético tales como el ácido etacrínico.

En la primera parte el túbulo distal, ubicado en el riñón se produce la reabsorción de cloruro de sodio que se ve afectada por diuréticos como la benzotiadiazina y compuestos relacionados (clortalidona, indapamida) como su principal lugar de acción. Se consideran diuréticos de eficacia media (la excreción de un 5-10% de sodio filtrado). El sitio principal de acción de los llamados diuréticos ahorradores de potasio (espironolactona y amilorida y triamtereno) es el túbulo distal tardío y el conducto colector donde inhibe el intercambio de sodio por potasio e hidrógeno. Estos fármacos tienen una eficacia diurética baja y se diferencian por su estructura y su mecanismo de acción. Hay es también un grupo de diuréticos clasificados de baja eficacia, en donde el mecanismo de acción se basa en el efecto osmótico (Diuréticos osmóticos).

El uso de diuréticos ha sido prohibido por el Comisión Médica del Comité Olímpico Internacional Comité (International Olympic Committee; et. al., Lausanne, 1990) porque se demostró que eran usados en el deporte por dos razones principales: para lograr pérdida de peso antes de la competición, en los deportes donde las categorías de peso están involucradas y para enmascarar la ingestión de otros agentes de dopaje mediante la reducción de su concentración en la orina. Este efecto puede ser llevado a cabo por el aumento del volumen de orina, o aumentando el pH de la orina (inhibidores de la anhidrasa carbónica) y, por tanto, la reducción de la excreción en orina básicos de agentes de dopaje.

La familia de los diuréticos incluye compuestos con una amplia diferencia en su estructura química, (**Figura 1**) y en consecuencia en sus propiedades físico-químicas. En relación a su estructura química los diuréticos pueden ser clasificados de tres formas diferentes como se indica en la **Tabla 3**.

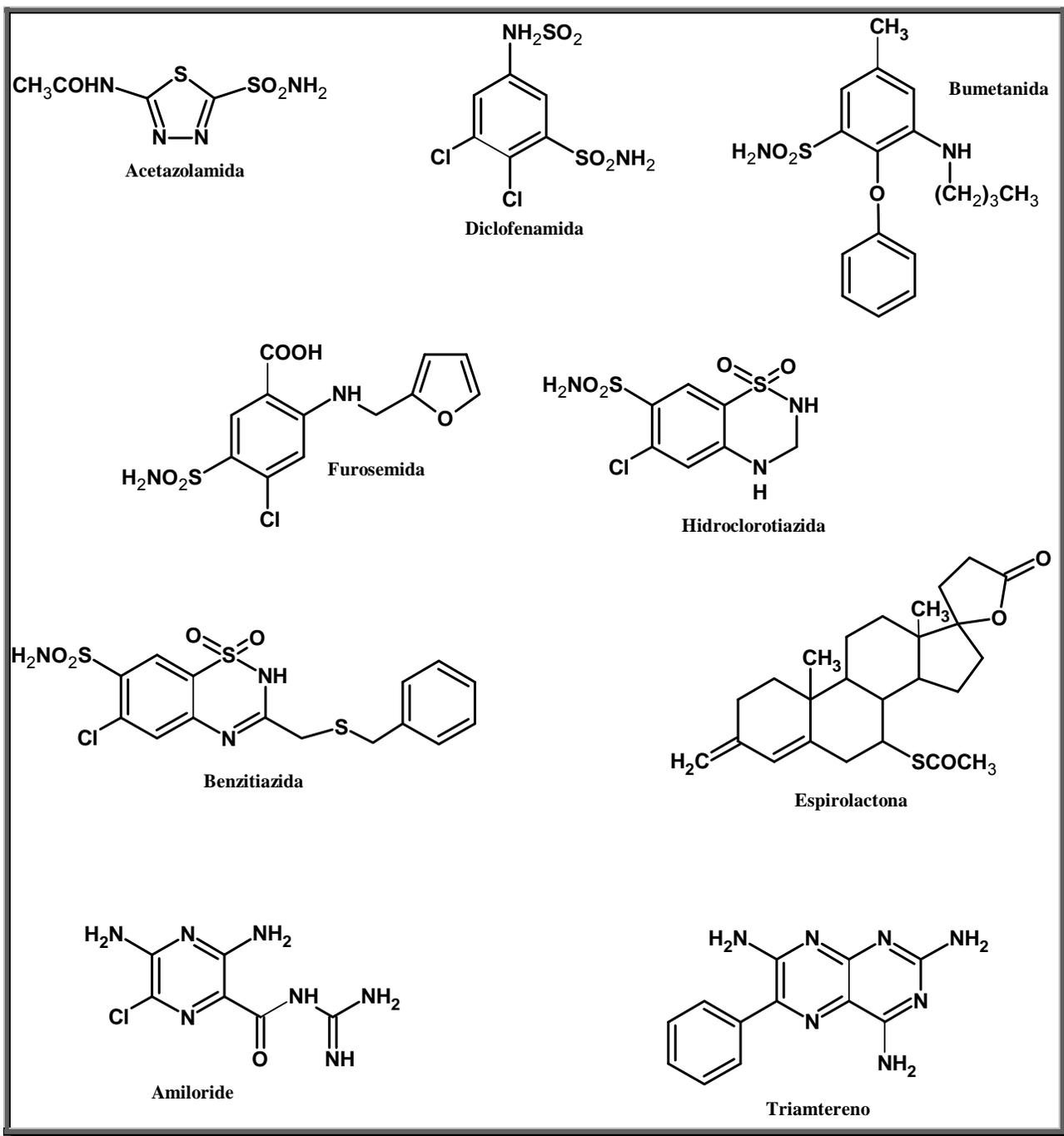


Figura 1: Estructura de algunos diuréticos.

El metabolismo y la excreción urinaria de los diuréticos han sido considerados para propósitos de control del dopaje. Las principales rutas metabólicas y los porcentajes excretados del fármaco en orina descrito para algunos diuréticos después de estudios farmacocinéticos en humanos usando diferentes rutas de administración se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3: Clasificación farmacológica de los diuréticos y porcentaje de excreción sin cambio en orina

Compuesto	% Excreción sin cambio	Referencia
1. Diuréticos de alta eficacia		
Bumetanida	35-44	Feit; et. al., 1973.
Furosemida	48	Andreasen; et. al., 1981
Piretanida	60-74	Clissold; et. al., 1985
2. Diuréticos de media eficacia		
Bendroflumetiazida	30	Beermann; et. al., 1977
Benztiázida	10	Welling; et. al. 1986
Clorotalidona	34-53	Riess; et. al., 1977
Hydroclorotiazida	30-64	Williams; et. al., 1987
3. Diuréticos de baja eficacia		
Espiro lactona	0	Karim; et. al., 1976.
Amiloride	33-43	Williams; et. al. 1987

4.2. Estatus de los diuréticos en el deporte

En el ámbito deportivo los diuréticos son usados por tres principales razones:

- Para enmascarar el consumo de una sustancia prohibida,
- En deportes donde se ven involucradas las categorías de peso y,
- Para eliminar la retención de agua provocada por el uso de agentes anabolizantes.

Los diuréticos han sido prohibidos en los deportes por la Agencia Mundial Anti-dopaje desde 1988 y este grupo abarca un amplio intervalo de sustancias químicamente diferentes que representan un porcentaje importante de consumo a nivel mundial. En la **Tabla 4** se muestran las estadísticas reportadas por la WADA desde el 2003 al 2010 para todas las sustancias prohibidas.

Tabla 4: Estadísticas del uso de los diuréticos del 2003-2010

<i>CODIGO</i>	<i>ESPECIFICACIÓN</i>							
S5	Diuréticos y otros agentes enmascarantes							
	% Reportes analíticos adversos							
	2010	2009	2008	2007	2006	2005	2004	2003
	7.1	5.4	7.9	7.4	6.7	5.7	4.8	5.2

Como se puede observar en la tabla anterior, la revisión de los diuréticos detectados en los laboratorios acreditados, entre 2003 y 2010, se ha mantenido a través de estos años. De forma general, de los resultados de todas las sustancias detectadas por los laboratorios acreditados se observa que ha disminuido la detección de los esteroides anabólicos y de los estimulantes. Pero llama poderosamente la atención el que este descenso se haya producido por el incremento de otros grupos y sustancias, de forma que la detección de Diuréticos pasa del 4 al 10%, la de Beta-2-agonistas del 11 al 14%, la de los Glucocorticosteroides del 4 al 9% y, finalmente, el Cannabis, que se ha detectado en este quinquenio último en un 13%, frente al 9.

4.2.1. Compuestos de interés

Para el 2012, la lista de sustancias prohibidas tiene contemplado los siguientes compuestos como prohibidos para su uso en el ámbito deportivo.

Los diuréticos incluyen:

Acetazolamida, amilorida, bumetanida, canrenona, clortalidona, ácido etacrinico, furosemida, indapamida, metolazona, espironolactona, tiazidas (e.g. bendroflumetiazida, clorotiazida, hidroclorotiazida), triamtereno;

Y otras sustancias con estructura química o efectos biológicos similares, excepto drospirenona, pamabrom y dorzolamida tópica y brinzolamida los cuales no están prohibidos.

El término de “uso tanto fuera de competencia como en competencia” es aplicable a cualquier cantidad de sustancia sujeta a los valores límites de corte.

4.3. Modo de acción de los diuréticos en el metabolismo humano

Como ya se menciona anteriormente los diuréticos son productos que ayudan a eliminar líquidos del cuerpo, causan una pérdida de agua por la paralización parcial de la reabsorción de agua; el riñón es el órgano principal a través del que se excretan estas drogas, por tal razón, las pruebas de antidopaje se hacen en muestras de orina porque es el fluido corporal óptimo para detectar este tipo de sustancias.

El riñón está encargado de regular la cantidad de agua, de sodio, de potasio, y de otros electrolitos en el cuerpo, los diuréticos aumentan la excreción de sodio, de potasio y de agua, el peso corporal desciende debido a la pérdida en agua. En pacientes con fallos cardíacos y otras enfermedades que causan en el cuerpo excesivo líquido, los diuréticos quitan este exceso. Químicamente, los diuréticos son un grupo de compuestos que estimulan o inhiben varias hormonas que se encuentran naturalmente en el cuerpo para regular la producción de la orina por los riñones. De tal modo que los atletas que usan los diuréticos para perder peso rápidamente y para tapar la presencia de otras sustancias prohibidas aumentando el índice de producción y de expulsión de la orina.

Para manejar este problema las medidas de control antidopaje especifican la gravedad de la orina en la recolección de las muestras y si es demasiado baja se localiza y se detiene al atleta para obtener otra muestra.

5. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS Y ESPECTROMÉTRICAS

5.1. *La cromatografía*

En 1906, el botánico Ruso M. Tswett realizó un experimento que condujo al descubrimiento de lo que hoy conocemos como cromatografía. Colocó un extracto de pigmentos vegetales en la parte superior de una columna de vidrio rellena de carbonato de calcio (CaCO_3). Al agregar éter, observó que la mezcla original se separaba en diversas bandas coloridas que descendían a través de la columna a diferentes velocidades.

Un rasgo característico de la cromatografía es la presencia de dos fases; dispuestas de tal manera que mientras una permanece estacionaria dentro del sistema (fase estacionaria), la otra se desplaza a lo largo de ella (fase móvil). La clave de la separación en cromatografía es que la velocidad con la que se mueve cada sustancia que depende de su afinidad relativa por ambas fases (equilibrio de distribución). En el experimento de Tswett, la separación de los pigmentos vegetales se logró gracias a que cada uno de ellos tenía una afinidad diferente por las fases. En general, los componentes más afines a la fase estacionaria avanzan lentamente (serán más retenidos) mientras que los más afines a la fase móvil (serán menos retenidos) se mueven con mayor rapidez. Por consecuencia, la fase móvil (columna, placa o papel) funciona como un controlador de la velocidad de cada sustancia que constituye la mezcla, logrando así su separación y mediante el uso de un detector, su caracterización química. (Garritz; et. al. 2001)

Existen muchas maneras de clasificar los métodos cromatográficos, por el mecanismo de retención-separación, es decir el tipo de equilibrio implicado en la transferencia de los solutos entre las fases donde se puede encontrar la cromatografía de reparto, de adsorción y de exclusión. Según la forma de contacto entre las fases se denomina la columna o superficie plana como se puede observar a continuación En la **Tabla 5**.

Tabla 5: Tipos de cromatografía plana y de columna

TÉCNICA	FASE MÓVIL	FASE ESTACIONARIA
Cromatografía plana		
Cromatografía en capa fina	Líquido (menos polar)	Sólido (polar)
Cromatografía en papel	Líquido (menos polar)	Sólido (polar)
Cromatografía en columna		
Cromatografía de gases	Gas	Sólido o líquido
Cromatografía líquida en fase inversa	Líquido (polar)	Sólido o líquido (menos polar)
Cromatografía líquida en fase normal	Líquido (menos polar)	Sólido o líquido (polar)
Cromatografía líquida de intercambio iónico	Líquido (polar)	Sólido
Cromatografía líquida de exclusión	Líquido	Sólido
Cromatografía líquida de adsorción	Líquido	Sólido
Cromatografía superfluidos críticos	Líquido	Sólido

También se puede clasificar teniendo en cuenta la fase estacionaria, la dimensionalidad, escala física y gradientes y finalmente según su fase móvil clasificándose en esta última en Cromatografía de gases que puede ser a través de dos sistemas, gas- líquido y gas-sólido y Cromatografía líquida donde el eluyente es un líquido y puede ser líquido-líquido, líquido-sólido (Pontificia Universidad Javeriana; et.al. 2011).

5.2. Extracción en fase sólida (EFS-SPE)

En la actualidad la extracción en fase sólida es la técnica de pre concentración más utilizada debido a que el consumo de disolventes orgánicos es reducido, los tiempos requeridos para la extracción son cortos y la manipulación de la muestra es pequeña.

Esta técnica se aplica pasando una disolución que contiene analitos(s) sobre una fase sólida (o fase estacionaria) que lo(s) adsorbe específicamente. La fase sólida suele estar compactada en el fondo de una columna. Después de la adsorción, los analitos se eluyen con una pequeña cantidad de otro disolvente extractor, con el que interaccionan más fuertemente que con la fase estacionaria. En este tipo de extracción es fundamental la selección de la fase sólida, en función de la fase sólida podemos clasificar la extracción EFS en diferentes tipos:

- Fase reversa: la extracción EFS en fase reversa se caracteriza porque la fase líquida es polar y la fase sólida es apolar, de modo que los analitos no-polares o de polaridad media son retenidos en la fase sólida.
- Fase normal: la extracción EFS en fase normal se caracteriza porque la fase líquida es apolar o de polaridad media (acetona, hexano, disolventes clorados) y la fase sólida es polar, de modo que son los analitos polares los que quedan retenidos en la fase sólida.
- Intercambio iónico: la extracción EFS de tipo intercambio iónico se caracteriza porque la fase sólida contiene grupos cargados. La fase líquida generalmente es acuosa, si bien puede ser también orgánica. En función de la naturaleza de la fase sólida se distingue entre intercambio aniónico: SAX, MAX (aminas cuaternarias), WAX (NH₂), e intercambio catiónico: SCX, MCX (ácidos sulfónicos), WCX (COOH).

Además todo el proceso de medida puede automatizarse conectando la extracción en fase sólida en línea con la cromatografía de gases (CG) o con la cromatografía líquida (CL). Además existen diferentes tipos de solventes que se seleccionan en función de los analitos que se quieran determinar, y se comercializan en forma de discos o cartuchos. Podemos diferenciar cinco tipos: de sílices entrelazadas, de carbón, poliméricos, inmuno solventes, y polímeros de huella molecular. Los analitos retenidos se disuelven generalmente con volúmenes pequeños de un disolvente orgánico. (Cháfer, et. al., 2006).

La extracción en fase sólida se asemeja a un proceso de cromatografía líquida en columna abierta, de hecho algunos de los términos empleados en este proceso son similares a los empleados en cromatografía. Sin embargo, la extracción en fase sólida no puede ser considerada como un proceso cromatográfico en el sentido de que se obtengan separaciones de diferentes moléculas. La extracción en fase sólida separa grupos de moléculas con propiedades similares. Por ejemplo: una técnica de extracción en fase sólida podrá separar todas las moléculas de plaguicidas presentes en una muestra de agua de las moléculas disueltas con propiedades químicas (carga y polaridad) diferente a las de plaguicidas. La separación e identificación de las diferentes moléculas de plaguicidas, inicialmente aisladas en la extracción, deberá realizarse posteriormente por cromatografía de gases (Sogorb; et.al., 2004.).

La extracción en fase sólida es una técnica de preparación de muestra que limpia y concentra muestras antes del análisis y puede ser empleada de dos formas distintas:

- 1) La muestra pasa a través de un lecho de fase sólida que retiene los interferentes mientras que los analitos eluyen (menos común);

- 2) La muestra pasa a través de un lecho de fase sólida que retiene los analitos y, posiblemente, algunos interferentes. Estos se eliminan del lecho y después se eluyen los analitos. La elución puede ser realizada con un pequeño volumen de disolvente para concentrar la muestra, aumentando los límites de detección y simplificando el análisis (más común).

Para su aplicación práctica se emplean dispositivos comerciales que contienen entre 50 y 1000 mg de partículas porosas. Cuando la disolución que contiene los analitos pasa a través del adsorbente activado, se produce una retención de éstos junto con compuestos interferentes de los diferentes tipos de muestras. Seguidamente se realiza una etapa de lavado con la que se pretende eliminar los interferentes que hayan podido quedar retenidos. Finalmente, los compuestos de interés se eluyen mediante el paso del volumen necesario de una disolución adecuada.

El formato más común de los dispositivos comercializados para aplicar la extracción en fase sólida se introdujo a finales de los años 70 y consiste en columnas fabricadas principalmente en polipropileno. El adsorbente se mantiene fijo gracias a dos filtrados que normalmente son partículas de polipropileno sinterizadas. El tamaño de las partículas, que está entre 40 y 60 μm de diámetro, es tal que permite el paso de líquidos con una ligera succión.

Este formato presenta sin embargo ciertos problemas si el volumen de muestra es elevado o si contiene partículas en suspensión. Para solventar estos inconvenientes, a principios de los años 90 se introdujo el uso de discos, de aproximadamente 0.5 mm de grosor y entre 4 y 96 mm de diámetro. La demanda creciente de dispositivos adecuados con el objeto de permitir el análisis simultáneo de un elevado número de muestras, originó en 1997 el diseño del formato de 96 pocitos. En este dispositivo, cada pocito contiene un pequeño disco o un minicartucho, con menos de 50 mg de material adsorbente. Por lo tanto, el

volumen de eluyente es mínimo, entre 100 y 200 μL de disolvente. (Nimer; et. al., 2006)

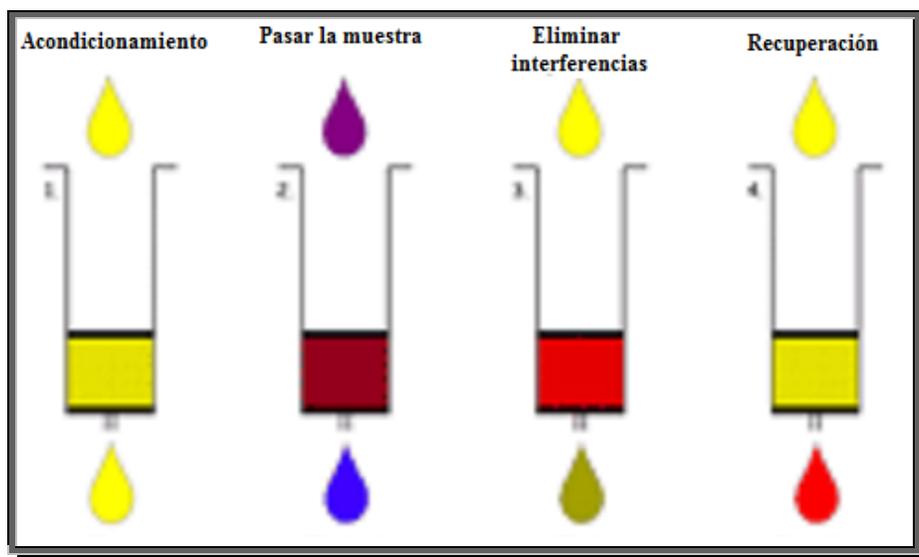


Figura 2: Pasos en la extracción en fase sólida.

5.3. Cromatografía de gases (GC)

Esta técnica permite el análisis rápido y exacto de gases, vapores líquidos; permitiendo identificar los componentes individuales de las mezclas gaseosas. Fue iniciada a finales de 1952 y se ha desarrollado notablemente en separación, identificación y determinación de compuestos volátiles (gases y líquidos) de puntos de ebullición de hasta 350-400 °C. El método tiene las ventajas de ser sensible, rápido y sencillo, y si se maneja con suficiente cuidado suministra información cuantitativa exacta con cantidades muy pequeñas de muestra.

En cromatografía de gases (GC) la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de un gas inerte, cuya única función es la de transportar el analito a través de la columna. Existen dos tipos de cromatografía de gases: la cromatografía Gas-Sólido (GCS) y la cromatografía gas líquido (GLC).

La cromatografía gas-líquido tiene gran aplicación en todos los campos de la ciencia y su denominación se abrevia normalmente como cromatografía de gases (GC). (Skoog, et. al., 2001)

Las áreas de aplicación son muy diversas y abarcan prácticamente todas las actividades en las que interviene la química, como por ejemplo en:

- El análisis de drogas y fármacos en fluidos biológicos como la saliva, la sangre o la orina;
- En seguir la transformación de las sustancias responsables de la transmisión neurológica;
- En determinar la presencia de contaminantes en el medio ambiente;
- En realizar el control de calidad de los productos químicos y farmacéuticos manufacturados; en fin, la lista de ejemplos es interminable. (Garritz; et. al., 2001).

5.3.1. Instrumentación

Los componentes básicos de un instrumento para la cromatografía de gases se muestran en **la figura 3**, el caudal de gas se divide antes de entrar en la columna, este tipo de disposición se utiliza cuando el detector empleado mide un cambio en las propiedades de la corriente de gas por la presencia de las moléculas de analito.

Gas portador. Los gases portadores deben ser químicamente inertes, se encuentran el helio, nitrógeno y el hidrogeno. Con el suministro de gas se encuentran asociados los reguladores de presión, manómetros y medidores de caudal. Además el sistema de gas portador contiene a menudo un tamiz molecular para eliminar el agua u otras impurezas. Los caudales se controlan normalmente mediante un regulador de presión de dos niveles colocado en el cilindro de gas, y

algún tipo de regulador de presión o regulador de flujo instalado en el cromatógrafo (**Figura 3**).

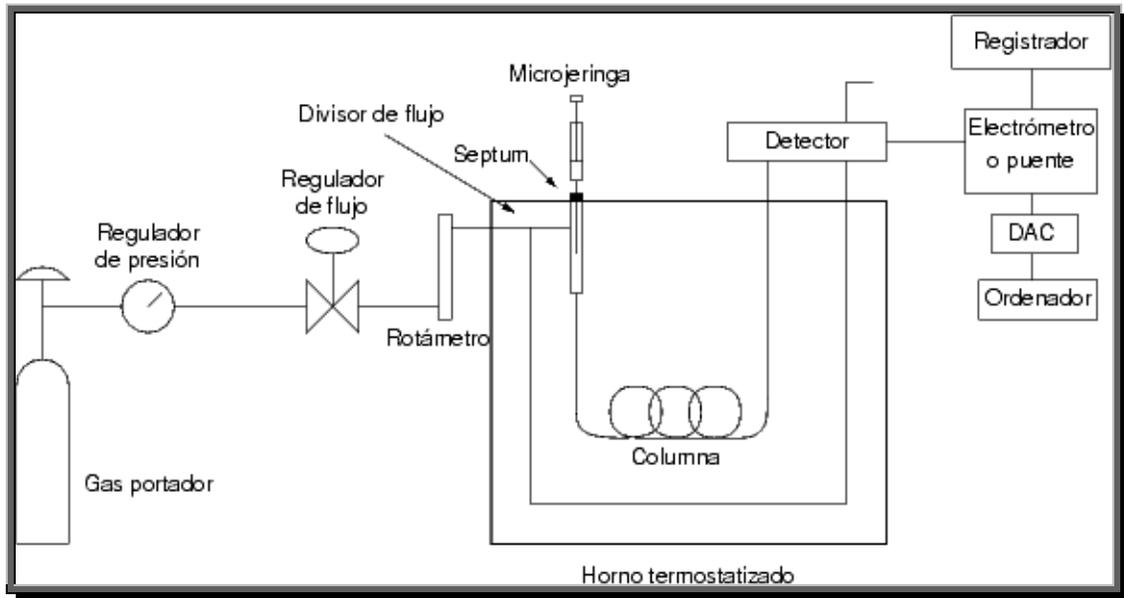


Figura 3. Esquema del Gas portador.

Sistema de inyección de muestra. La eficacia de la columna requiere que la muestra sea de un tamaño adecuado y que sea introducida como un <tapón> de vapor, la inyección lenta de las muestras demasiado grandes provoca un ensanchamiento de la bandas y una pobre resolución. El método más común de inyección de muestra implica el uso de una micro jeringa para inyectar una muestra líquida o gaseosa a través de un diafragma o <septum> de goma de silicona en una cámara de vaporización instantánea situada en la cabeza de la columna (la cámara normalmente se encuentra a unos 50°C por encima del punto de ebullición del componente menos volátil de la muestra). (**Figura 4**).

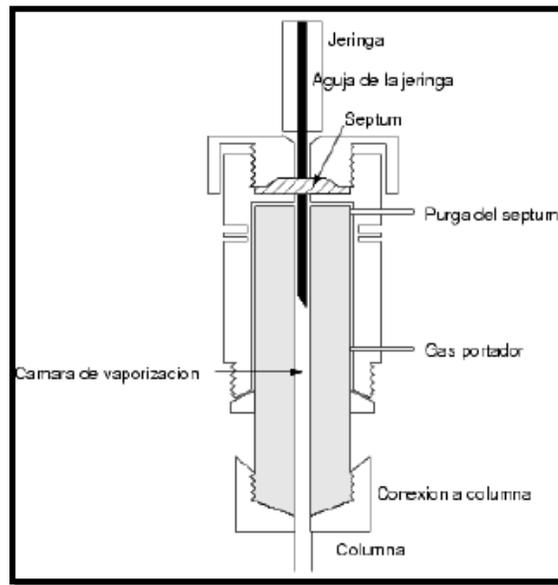


Figura 4. Sistema de inyección de la muestra

Configuración de la columna y del horno para la columna. En cromatografía de gases se usan dos tipos generales de columnas, las rellenas, y las abiertas o capilares. Hasta la fecha la mayor parte de las cromatografía de gases se ha realizado con columnas rellenas. Sin embargo, en la actualidad esta situación está cambiando rápidamente y parece probable que en un futuro próximo, excepto para ciertas aplicaciones especiales, las columnas de relleno sean sustituidas por columnas abiertas más eficaces y rápidas.

Las columnas cromatográficas varían desde menos de 2 m hasta 50 m de longitud o más y presentan un diámetro interior entre 2 y 4 mm. Están fabricadas con acero inoxidable, vidrio, sílice fundida o teflón. La eficiencia de resolución de una columna, a menudo se expresa según el número de platos teóricos por analogía con la destilación, logrando alcanzar los 500.000 platos teóricos en columnas capilares.

La temperatura de la columna es una variable importante, la elevación de la temperatura del horno en el que se encuentra la columna aumenta la velocidad de elución en cromatografía gas-liquido de la misma forma que el uso de un disolvente más polar en la cromatografía de columna, por lo tanto el equivalente directo del gradiente de elución es la programación de temperatura en la que se puede ir aumentando la temperatura de la columna durante el análisis para acelerar la velocidad de elución de los componentes menos móviles de la mezcla, es por ello la columna normalmente se introduce dentro de un horno de temperatura controlada, la temperatura óptima de la columna depende del punto de ebullición de la muestra y del grado de separación requerido, .

Sistemas de detección. El detector ideal para cromatografía de gases tiene las siguientes características:

- 1.- Adecuada sensibilidad
- 2.- Buena estabilidad y reproducibilidad
- 3.-Respuesta lineal para los solutos que se extienda a varios órdenes de magnitud
- 4.-Intervalo de temperaturas de trabajo comprendido desde la temperatura ambiente hasta al menos 400°C
- 5.-Tiempos de respuesta cortos que sean independientes del caudal
- 6.-Alta fiabilidad y manejo sencillo
- 7.-Respuesta semejante para todos los solutos o por el contrario una respuesta selectiva y altamente predecible para uno o más tipos de soluto
- 8.-No destructivo de la muestra.

5.4. Espectrometría de masas

Inicialmente el uso de la espectrometría de masas (EM) estaba limitado a laboratorios de investigación en física y química, así como en las industrias del petróleo y farmacéutica. Desde la década de los años 60 del siglo XX, se ha utilizado también en el área de la química clínica y en los laboratorios de diagnóstico. (Chace; et. al., 2001)

La EM es una técnica instrumental universal, específica y altamente sensible que permite la separación, identificación y cuantificación de moléculas, basada en su relación masa/carga (m/z), en diferentes matrices (líquidas, sólidas), después de su ionización. (Chace; et. al. 2005)

De manera simple, los espectrómetros de masas podemos describir como “instrumentos que pesan moléculas”, que son muy pequeñas para ser pesadas en una escala tradicional. Para estimar el tamaño de una molécula de agua podemos decir que para llenar una cuchara pequeña se necesitan aproximadamente 60×10^{21} moléculas. Los espectrómetros utilizan una propiedad que poseen todas las moléculas: la masa. Cada molécula tiene una masa única, por ejemplo, una molécula de agua pesa 3×10^{-23} gramos; la masa de una molécula de cloruro de sodio (sal de mesa) es 9.6×10^{-23} gramos y la de la sacarosa (azúcar de caña) es 5.6×10^{-22} gramos.

Para explicar cómo funciona un espectrómetro de masas, podemos hacer una analogía con una máquina contadora de monedas: si hay una mezcla de monedas de distintas denominaciones (que sería equivalente a la masa), primero las clasifica, en monedas de 10 centavos seguidas de las de 20 y 50 centavos; posteriormente habría monedas de 1, 2 y 5 pesos y en último lugar, monedas de 10 pesos. Posteriormente determina cuántas hay de cada denominación.

En el caso de un espectrómetro de masas, se obtiene el informe de qué moléculas está compuesta una mezcla y en qué cantidad está presente cada una de ellas. El principio de la espectrometría de masas es la producción de iones a partir de compuestos neutros y la observación de la subsiguiente descomposición de esos iones. Estos iones descompuestos (fragmentos que también poseen carga) se mueven rápidamente y son “clasificados” de acuerdo a su relación m/z (masa/nº de cargas del ión). El espectrómetro de masas no sólo clasifican los fragmentos, sino que además mide la cantidad de ellos que se forman.

Cuando a una molécula se le suministra una determinada energía la molécula se fragmenta siguiendo un patrón concreto en el que se obtienen siempre los mismos fragmentos y en la misma relación de intensidad. Este patrón concreto se representa gráficamente en el espectro de masas, al que denomina por esta razón “huella digital de la sustancia”. De esta forma, el espectro de masas permite la identificación inequívoca de las moléculas.

Un equipo de espectrometría de masas consta de cinco módulos fundamentales: 1) sistema de introducción de muestra, 2) fuente de ionización, 3) analizador de masas, 4) detector y 5) procesador de datos (**Figura 5**). (Chace; et.al., 2002).

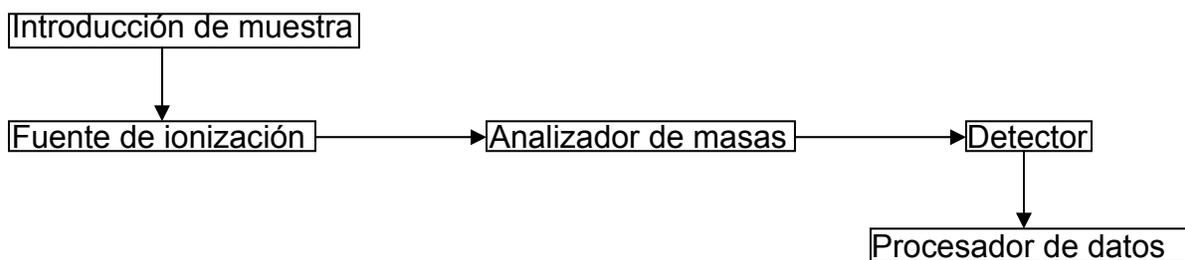


Figura 5. Componentes de un equipo de espectrometría de masas

La función de la fuente de ionización en un equipo de MS es aplicar energía a la muestra para generar moléculas cargadas positiva o negativamente, ya que para medir las moléculas por EM éstas deben estar “eléctricamente cargadas” (iones). Ver **Tabla 6**. (Spitzer; et. al., 2008).

Tabla 6: Tipos de ionización.

Fuente de ionización	Nombre en ingles	Siglas	Tipo de analito	Tipo de ionización	Modo de ionización
Ionización química	Chemical ionisation	CI	Volátil, compuestos orgánicos como alcoholes, gases metano, butano.	Suave	Colisión con gas (metano, amonio) y aplicación de energía eléctrica de manera simultánea.
Ionización por impacto electrónico	Electron impact	EI	Volátil, moléculas pequeñas como ácidos orgánicos, carbohidratos, aminoácidos.	Fuente	Aplicación de energía eléctrica (70eV)
Ionización por electrospray	Electro Spray Ionisation	ESI	No volátil, aminoácidos, acilcarnitinas, vitaminas, esteroides.	Suave	Aplicación de energía eléctrica
Ionización por bombardeo rápido de átomos	Fast Atom Bombardment	FAB	Carbohidratos, organometales, péptidos.	Suave	Bombardeo con un gas inerte
Ionización-desorción asistida por láser	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation	MALDI	Péptidos, proteínas, nucleótidos.	Suave	Aplicación de energía mediante rayo láser.

Existen técnicas de ionización en las que la energía impartida hace que las moléculas sólo adquieran carga (ionización suave) y técnicas de ionización en las que la energía impartida es de mayor magnitud, por lo que la molécula se rompe y forma fragmentos cargados. Las moléculas que sólo adquirieron carga sin ser fragmentadas se conocen como iones moleculares; las moléculas que además de ionizarse se fragmentaron se conocen como productos o fragmentos iónicos.

Los iones provenientes de la fuente de ionización pasan al analizador de masas, que tiene como función separarlos y ordenarlos de acuerdo a su m/z. El intervalo de m/z, su precisión y exactitud dependen del tipo de analizador que se utilice.

Tabla 7. (Griffiths; et. al. 2001)

Tabla 7: Ejemplos de analizadores de masas con intervalo de masa y exactitud

Analizador de masas	Intervalo de masa (Da)	Exactitud (PPM)
Cuadropolo (Q)	2-2,000	100-1,000
Tiempo de vuelo (TOF)	10,000-20,000	10-100
Transformada de Fourier (FTMS)	100,000-1X10 ⁶	0.1-1

Espectrómetro de masa cuadrupolar: son normalmente menos caros y más robustos que los de sector magnético, además también ofrecen la ventaja de emplear tiempos de barrido pequeños (<100ms), lo cual es particularmente útil para realizar barridos de picos cromatográficos en tiempo real. Son, con diferencia los más utilizados hoy en día.

Analizadores de masas de tiempo de vuelo (TOF): en estos aparatos se producen los iones positivos periódicamente por bombardeo de la muestra con impulsos de electrones, de iones secundarios o de fotones generados por láser. Los iones producidos de esta forma son acelerados en un tubo analizador libre de campo mediante un campo eléctrico pulsante de 10³ a 10⁴ V. La separación de los iones en función de la masa se produce durante su recorrido hacia el detector,

situado al final del tubo. Estos aparatos presentan ventajas como la robustez, simplicidad, fácil acceso a las fuentes de iones y el virtualmente ilimitado intervalo de masas, pero tienen no obstante una sensibilidad y una resolución limitadas.

Transformada de Fourier (FT): Como sucede con los instrumentos de infrarrojo y de resonancia magnética nuclear, los espectrómetros de masas de transformada de Fourier proporcionan mejores relaciones señal/ruido, velocidades mayores y sensibilidad y resolución más elevadas.

La parte fundamental de un instrumento de transformada de Fourier es una trampa de iones en la cual los iones circulan en órbitas bien definidas durante largos periodos. Tales cavidades se construyen aprovechando el fenómeno de resonancia iónica ciclotrónica. La resolución es espectrometría de masas de transformada de Fourier está limitada por la precisión en la medida de la frecuencia más que por las rendijas o las medidas de campo. Es posible alcanzar una resolución extremadamente elevada (superior a 10⁶) dado que las medidas de frecuencia se pueden realizar con elevada precisión.

El detector registra y amplifica la señal proveniente del analizador de masas, posteriormente la envía al procesador de datos en donde esta información se registra en forma de espectro de masas, que es una representación gráfica de los iones separados por su valor de m/z y ajustados de acuerdo al porcentaje de las especies más abundantes en la muestra.

Este espectro de masas del patrón corresponde a la fragmentación de los compuestos, obtenido mediante un equipo con fuente de ionización por impacto electrónico. Cada pico representa un fragmento de la molécula. Este tipo de MS es útil para la identificación de compuestos por su patrón de fragmentación. (Spitzer; et. al., 2008)

Las características más importantes de esta técnica son:

- Alta sensibilidad: la cantidad de muestra necesaria es pequeñísima.
- Elevada resolución: permite el análisis de mezclas
- Facilidad y comodidad: las muestras pueden ser líquidas o sólidas o bien disueltas en disolventes adecuados.

5.5. El acoplamiento de la cromatografía de gases a espectrometría de masas (GC-MS)

El uso de un espectrómetro como el detector en cromatografía de gas fue desarrollado durante los años 50 por Roland Gohlke y Fred McLafferty. Estos dispositivos sensibles eran abultados, frágiles y limitados originalmente a las dimensiones de los laboratorios. El desarrollo de la tecnología ha ayudado en la simplificación del uso de este instrumento, también mejorando la cantidad de tiempo que toma para analizar una muestra. Esto ha conducido a su extensa adopción en numerosos campos. (Gohlke; et. al. 1993)

La cromatografía de gases es una técnica separativa que tiene la cualidad de conseguir la separación de mezclas muy complejas. Pero una vez separados, detectados e incluso cuantificados todos los componentes individuales de una muestra problema, el único dato de que disponemos para la identificación de cada uno de ellos es el tiempo de retención de los correspondientes picos cromatográficos. Este dato no es suficiente para una identificación inequívoca, sobre todo cuando se analizan muestras con un número elevado de componentes, como es frecuente en cromatografía de gases capilar.

Por otra parte, la espectrometría de masas puede identificar de manera casi inequívoca cualquier sustancia pura, pero normalmente no es capaz de identificar los componentes individuales de una mezcla sin separar previamente sus componentes, debido a la extrema complejidad del espectro obtenido por superposición de los espectros particulares de cada componente.

Por lo tanto, la asociación de las dos técnicas, GC (“Gas Chromatography”) y MS (“Mass Spectrometry”) da lugar a una técnica combinada GC-MS que permite la separación e identificación de mezclas complejas.

La utilización de la cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas requiere sistemas especiales de conexión. En principio, se trata de dos técnicas que trabajan en fase gaseosa y necesitan una muy pequeña cantidad de muestra para su análisis, por lo que son muy compatibles.

La muestra se inyecta en el cromatógrafo de gases, se separa en la columna cromatográfica, obteniendo la relación sucesiva de los componentes individuales aislados que pasan inmediatamente al espectrómetro de masas. Cada componente es registrado en forma de pico cromatográfico e identificado por el espectrómetro mediante sus respectivos espectros de masas.

En este proceso, el espectrómetro de masas, además de proporcionar los espectros, actúa como detector cromatográfico al registrar la corriente iónica total, cuya representación gráfica constituye el cromatograma o “TIC” (total ion current). En efecto, la corriente iónica generada por todos los iones da lugar a un pico gaussiano de área proporcional a la concentración del compuesto detectado.

En el caso de mezclas complejas, el cromatógrama obtenido puede presentar muchos picos, algunos de ellos muy próximos, resultando difícil la identificación rápida y fiable de algún compuesto de interés. Cuando se desea explícitamente localizar la presencia de uno o varios compuestos determinados, de espectro conocido, con la mayor rapidez o con la máxima sensibilidad posible se recurre a la técnica de detección SIR (“selected ion recording”). En esta modalidad de trabajo se detectan solamente algunas masas de interés, en lugar de trabajar con el total de los iones (TIC). De esta forma, se aumenta la selectividad del método, reduciéndose las interferencias.

5.6. El uso del HPLC acoplado EM en el análisis de los diuréticos

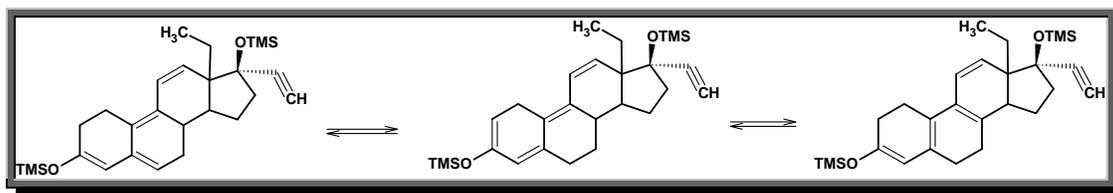
La historia de la Cromatografía Líquida-Espectrometría de Masas (LC/MS) comienza en los años 70 cuando algunos laboratorios decidieron investigar las posibilidades combinar la cromatografía líquida (LC) y la espectrometría de masas (MS). Después de más de 30 años de investigación (fundamentalmente en el campo de las interfaces que permitían el óptimo acoplamiento de ambas técnicas) se pudo conseguir al fin desarrollar instrumentos robustos y capaces de llevar a cabo análisis rutinarios que rápidamente se comercializaron.

La introducción de la LC/MS en los Laboratorios de Control de Dopaje como técnica de análisis fue después de este desarrollo y se llevo a cabo con el fin de solucionar dos importantes problemas a los que los laboratorios se estaban enfrentando:

- Por un lado, la dificultad de alcanzar los niveles mínimos de concentración requeridos (MRPLs) por la Agencia Mundial Antidopaje (WADA).
- Por otro, la dificultad de introducir en los métodos de análisis ya desarrollados el cada vez mayor número de sustancias enumeradas en la Lista de sustancias prohibidas.

Tradicionalmente los análisis de Control de Dopaje se habían realizado mediante Cromatografía de Gases Espectrometría de Masas (GC/MS). Sin embargo esta técnica presentaba algunas limitaciones:

- **Derivatización:** Muchos compuestos que no son volátiles y que poseen grupos polares deben ser derivatizados para poder ser analizados por GC/MS, es decir, es necesario transformar la estructura protegiendo esos grupos polares para hacerlos más volátiles. Sin embargo algunos compuestos no derivatizan bien: como es el caso de la tetrahidrogestrinona (THG) y la gestrinona, que al derivatizarlos con O-trimetilsilano (OTMS) forman tres derivados diferentes cada uno de los cuales presenta un espectro de masas distinto; es también el caso de los glucocorticoides, que poseen múltiples grupos hidroxilo susceptibles de reaccionar con los agentes de derivatización más comúnmente empleados; o el caso de los diuréticos, para los que es imposible obtener derivados metilados adecuados para algunos de ellos (benztiazida).
- **Termolabilidad:** Para ser introducidos en el sistema de cromatografía gaseosa los compuestos deben ser vaporizados a altas temperaturas. Estas temperaturas degradan los compuestos termolábiles, como es el caso del estimulante Mesocarbo (Sidnocarbo) un estimulante que se desarrolló en la URSS en la década de los 70's, se ha demostrado que actúa como un inhibidor de la receptación de la dopamina, que es de acción mas lenta pero de mayor duración y menos toxico que la dextro anfetamina.
- **Compuestos de alto peso molecular:** La GC/MS no permite analizar péptidos o proteínas debido a que son compuestos difíciles de vaporizar porque son pesados, poseen muchos grupos polares y además son termolábiles.



Esquema 1: Estructura de los tres derivados que forma la gestrinona por GC/MS.

La implementación de la LC/MS en los Laboratorios de Control de Dopaje ha permitido resolver algunos de estos problemas fácilmente. Además la LC/MS ha permitido ampliar el campo de aplicación de la Espectrometría de Masas a moléculas más polares y más pesadas. Esto ha abierto nuevas vías de investigación en los Laboratorios de Control de Dopaje ya que han empezado a desarrollarse métodos de análisis por LC/MS/MS para sustancias que hasta el momento eran indetectables por EM, como las hemoglobinas e insulinas sintéticas o los expansores de plasma.

5.6.1 Cromatografía Líquida

La Cromatografía Líquida es un método de separación físico en el que los componentes de una mezcla que han de ser separados son distribuidos selectivamente entre dos fases inmiscibles: una fase móvil (líquida) y una fase estacionaria (un sólido empaquetado en una columna). El proceso cromatográfico ocurre como resultado de repetidos pasos de absorción/desorción durante el movimiento de los analitos a lo largo de la fase estacionaria. La fase móvil está compuesta de una mezcla de disolventes de diferente polaridad, mientras que la fase estacionaria está compuesta de un material (como sílice, alúmina o algún polímero) que puede sufrir ciertas modificaciones. Existen varios mecanismos de separación en función de cómo sea la naturaleza de esa fase: La fase normal (sílice no modificada), *fase reversa* (sílice modificada de materiales poliméricos), *intercambio iónico* (sílice modificada con cargas iónicas fijas).

La fase reversa es el mecanismo de separación más ampliamente utilizado y es adecuado para el análisis de compuestos con cierta polaridad. Para obtener esta fase ligada por modificación de la sílice, se hace reaccionar la superficie de la sílice con un organosilano que posee como ligando una cadena alquílica de 4, 8, 12, o 18 carbonos.

No todos los silanoles (SiOH) de la superficie sílice reaccionan con estos ligandos. Esto ocasiona que los compuestos polares sufran interacciones secundarias con estos grupos (mayor retención) y que se observen colas en los compuestos básicos. Con el fin de evitar estas interacciones se han desarrollado otras técnicas como “endcapping” (se hace reaccionar un segundo pequeño silano, trimetilclorosilano, con los silanoles libres de la superficie de sílice) o los grupos embebidos polares (“embedded polar groups”, que son grupos polares embebidos en la cadena alquílica de 4,8 y 12 carbonos que bloquean la interacción del analito con los silanoles libres). El objetivo en ambas técnicas es eliminar las interacciones secundarias por puentes de hidrógeno entre los analitos polares y los silanoles que deforman los picos cromatográficos (aparición de colas).

5.7. Disolución de la muestra y selección de la fase móvil

La disolución de la muestra juega un papel muy importante en la LC/MS. Es necesario disolver el analito en un disolvente que sea lo más parecido en polaridad a la fase móvil del sistema cromatográfico y además es necesario comprobar que el analito sea soluble en dicha fase móvil. Generalmente se utiliza como fase móvil (y como disolvente de la muestra) diferentes proporciones de agua destilada o algún tampón con metanol y/o acetonitrilo.

Algunos de los tampones comúnmente utilizados en la cromatografía líquida no deben ser utilizados en LC/MS. Tales aditivos son:

- Sales o tampones no volátiles (NaCl, fosfatos). Interfieren en la ionización y forman aductos fuertes con los analitos que dificultan el espectro y minimizan la señal.
- Ácidos inorgánicos (ácido clorhídrico o sulfúrico): Pueden suprimir la señal.
- Trietielamina (TEA) y ácido trifluoroacético (TFA): Son aditivos ampliamente utilizados en LC y que deben ser evitados en LC/MS ya que ambos producen un alto ruido de fondo y una supresión de la señal el primero en ionización positiva y el segundo en ionización negativa.

No obstante, es recomendable utilizar fases móviles tamponadas con el fin de mantener el equilibrio en la distribución iónica de muchos analitos ácidos y básicos.

En LCMS se utilizan tampones volátiles, algunos de los cuales se describen en la **Tabla 8**.

Tabla 8: Algunos tampones volátiles más comúnmente empleados en LC/MS

<i>Buffer</i>	<i>pKa</i>	<i>Rango pH</i>
Formiato	3.8	2.8-4.8
Acetato	4.8	3.8-5.8
Amonio	9.2	8.2-10.2
Bicarbonato	9.0	8.0-10
Dietilamina	10.5	9.5-11.5

5.8. Ionización de los analitos

La combinación de la Cromatografía Líquida y el alto vacío requerido por la Espectrometría de Masas ha sido un proceso limitante en el desarrollo de la LC/MS.

La LC/MS no se empezó a utilizar en análisis rutinarios hasta el desarrollo de diversos sistemas de ionización que solucionaron estas incompatibilidades del pasado entre la LC y la MS. A diferencia de GC/MS donde la evaporación del analito y la ionización del mismo ocurren en lugares muy diferenciados (portal de inyección del GC y fuente de ionización del EM, respectivamente), en LC/MS estos dos procesos ocurren en la *interface o fuente* de ionización. Las fuentes de ionización más utilizadas en análisis de rutina son:

- Ionización Electrospray (ESI).
- Ionización Química a Presión Atmosférica (APCI).

Aunque es menos utilizado en análisis rutinario (es una técnica más cara y cubre el rango de aplicación de la GC/MS) también es necesario nombrar la fotoionización Química (APPI), que es una variante de la APCI que permite ionizar compuestos más apolares.

5.9. Ionización Electrospray (ESI)

Su principal característica es que permite obtener espectros de masas de grandes moléculas (proteínas, péptidos, polímeros). Aunque también puede ser utilizado en el análisis de moléculas de bajo peso molecular. En el proceso de ionización no emplea elevadas temperaturas, por lo que no descompone las moléculas termolábiles (proteínas, péptidos y otras moléculas de bajo peso molecular).

La ionización se produce en fase líquida, lo que permite obtener espectros en modo positivo y negativo. Sin embargo, requiere que los iones estén preformados en disolución. Esto puede ser favorecido por ajuste del pH de la fase móvil, por afinidad de aditivos catiónicos o aniónicos o por inducción de carga vía la derivatización del analito.

Se obtienen óptimos resultados con compuestos que son iones en disolución (ácidos y bases), compuestos polares a los que se les puede inducir carga, compuestos con heteroátomo. Sin embargo, no funciona bien con compuestos apolares.

5.10. Electrospray positivo

ESI es una ionización suave que produce principalmente iones moleculares protonados, $[M+H]^+$. Para moléculas de bajo peso molecular el ESI⁺ produce sólo un pico el MH^+ de masa $M+1$. Para pequeños péptidos con varias cadenas aminadas podemos formar iones multicargados: MH^+ , MH^{2+} y MH^{3+} . Estas especies pueden analizarse por EM a pesar de que la masa de ellas sea del orden de 300Dalton porque el espectro de masas determina el valor m/z , esto es la masa dividida por la carga.

Algunos ejemplos de sustancias que funcionan bien mediante ionización positiva son las aminas que o bien son básicas y pueden ser fácilmente protonables o bien son ya iones por naturaleza (aminas cuaternarias R_4N^+). Pero puede funcionar con otras sustancias como alcoholes (las condiciones fuertemente ácidas que ocurren cuando las gotas de disolución se evaporan en la fuente de ionización permiten ionizarlos) o con moléculas con enlaces múltiples (THG, gestrinona) que pueden acomodar cargas positivas fácilmente.

5.11. Electrospray negativo

El ESI⁻ produce iones $[M-H]^-$ de masa $M-1$. Al igual que la ionización positiva puede producir iones multicargados (en el análisis de ADN). Se obtienen óptimos resultados en la ionización de analitos ácidos.

5.12. Factores que afectan la ionización en ESI

Uno de los factores que más afecta a la eficacia de la ionización ESI es el pH. La ionización negativa esta favorecida a pH básico (ácidos desprotonados), mientras que el ESI positivo a pH ácido (bases protonadas).

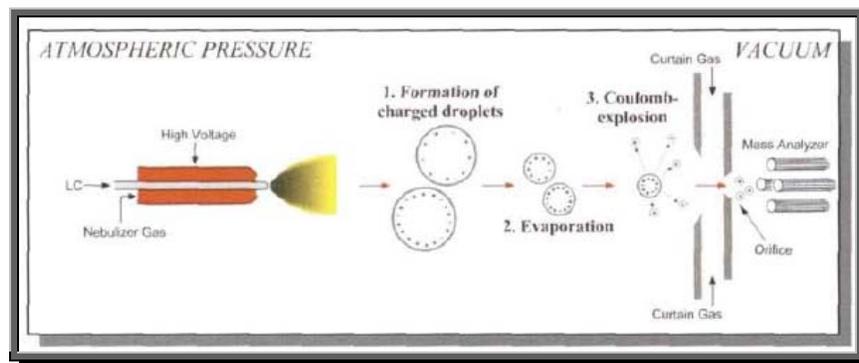


Figura 6: Mecanismo de ionización por ESI

5.13. Analizadores

Después de la ionización de la muestra el espectrómetro de masas debe llevar a cabo la separación de los iones producidos. Este proceso ocurre en el *analizador de iones*. Los iones formados en la fuente de ionización son separados o filtrados en función de su relación masa/carga mediante campos eléctricos y magnéticos.

El analizador es la parte esencial de un espectrómetro de masas y de la que dependen en mayor grado las características más importantes del sistema, tales como la resolución, sensibilidad, rango de masas, capacidad para la medida exacta de masas.

Los analizadores más comúnmente acoplados a un cromatógrafo líquido son: *cuadrupolo (Q)*, *triple cuadrupolo (QqQ)*, *trampa de iones 3D (IT)*, *trampa de iones lineal (LIT)*, *tiempo de vuelo (ToF)*.

El Laboratorio de Control de Dopaje de México actualmente posee varios analizadores de masas, sin embargo solo se hablará del analizador del triple cuadrupolo (QqQ).

5.14. Analizador Triple Cuadrupolo (QqQ)

La **Figura 7** muestra un esquema de un analizador triple cuadrupolo. Consiste en tres analizadores cuadrupolares conectados en serie. El cuadrupolo 1 (Q1) y el cuadrupolo 3 (Q3) están formados por cuatro barras o polos de sección cilíndrica, alineadas paralelamente entre sí y equidistantes de un eje central imaginario situado sobre el eje Z. Mediante la aplicación a cada pareja de barras opuestas de voltajes variables de corriente continua (DC) y de radiofrecuencia (RF) superpuestos podemos conseguir que los cuadrupolos puedan realizar las siguientes funciones:

- Transferir iones: Se minimiza la dispersión de los iones haciendo que el haz de iones sea lo más empaquetado posible. Este pasa a través de los cuadrupolos siguiendo trayectorias oscilantes estables que les conducen al detector o al siguiente analizador.

- Escanear iones: Los iones comprendidos en un rango m/z determinado pasan por las cuatro barras, siguiendo trayectorias oscilantes estables, mientras que las demás masas, al seguir trayectorias inestables son desviadas del conjunto de las barras.
- Seleccionar iones: En este caso solo los iones con un específico m/z siguen trayectorias oscilantes estables.

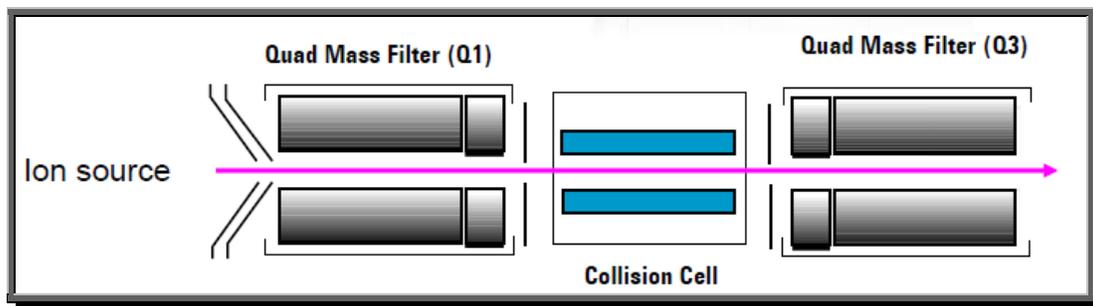


Figura 7: Imagen de una analizador QqQ.

6. ANÁLISIS DE DIURÉTICOS EN UN LABORATORIO CONTROL DE DOPAJE

6.1. Proceso

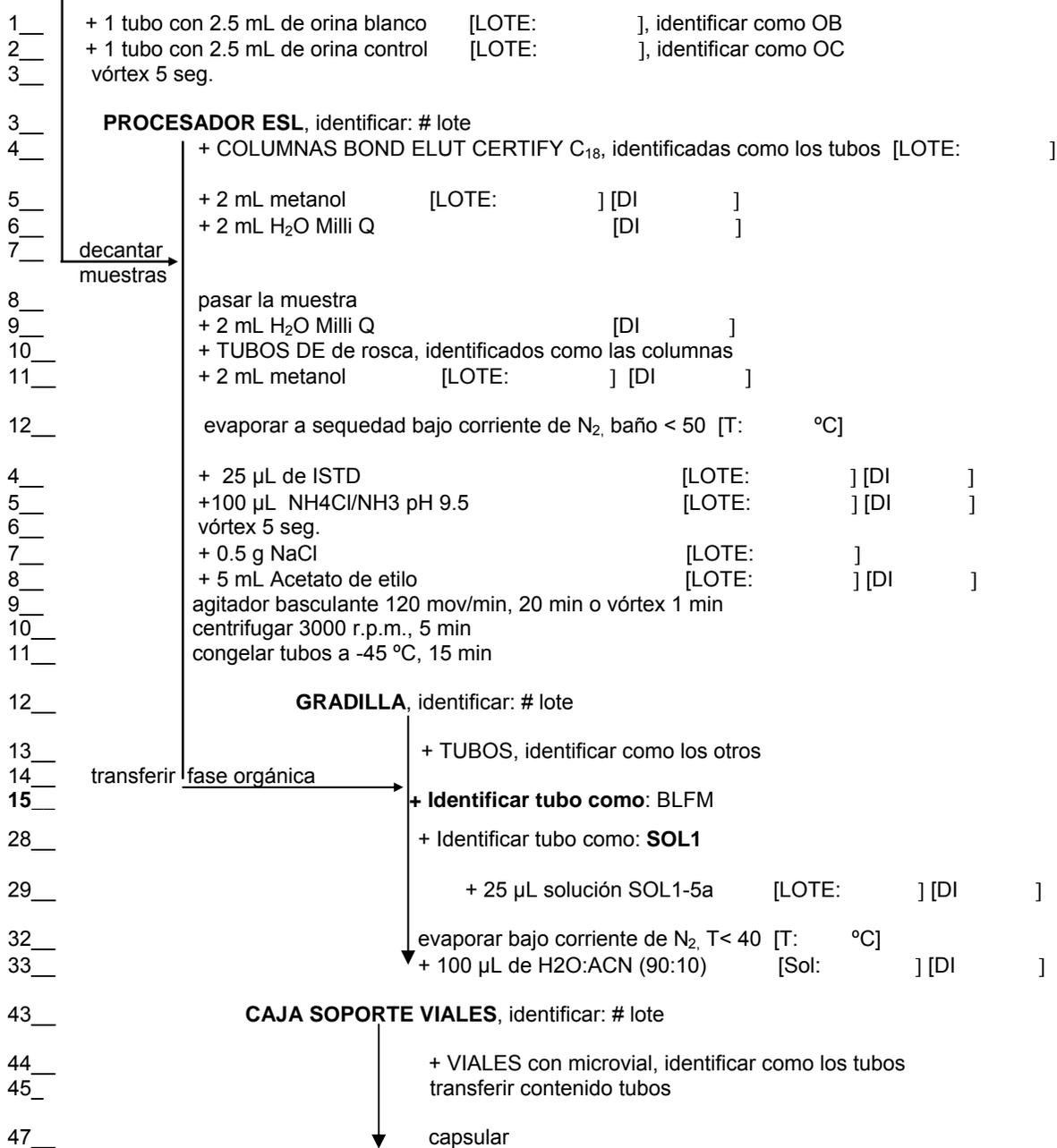
El método de cribado del análisis de los diuréticos involucra la extracción y pre concentración de los analitos en una muestra de orina, para posteriormente formar los metil derivados y finalmente ser analizados por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas. (Beyer; et. al., 2005) (Morra; et. al., 2006), o bien, por cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas en tándem (Deventer; et. al., 2002) (Qin; et. al., 2003) (Sanz-NebotV; et. al., 2001) (Thieme; et. al., 2001). Hoy en día, la mayoría de esos métodos de rutina usados para la detección de diuréticos o para la caracterización de sus metabolitos están basados en estos conceptos, como se muestra en el **Diagrama de flujo No. 1**.

La cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas permite la separación cromatográfica de compuestos polares sin la necesidad de la derivatización y, al menos en el modo de fase reversa, la preparación de la muestra se simplifica debido a la compatibilidad entre la muestra acuosa y el sistema analítico ya que en el análisis de la mayoría de los agentes dopantes en la prevención y control del dopaje su utiliza como muestra biológica una muestra de orina de los deportistas.

Los métodos rutinariamente usados en el cribado de los diuréticos están principalmente enfocados en aquellos metabolitos que son excretados sin metabolizar en la orina. Previo al análisis de la muestra en los instrumentos analíticos, a las alícuotas de las muestras, que consisten en 2.5 mL de orina se les realiza una extracción en fase sólida y posteriormente una extracción líquido-líquido.

A. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

GRADILLA (identificada: # lote), conteniendo las **muestras (1 alícuota de 2.5 mL para cada muestra)**



ANÁLISIS INSTRUMENTAL

Diagrama de flujo No. 1: Preparación de la muestra antes del análisis cromatográfico.

6.2. Condiciones analíticas de los equipos

Las condiciones analíticas en los diferentes equipos que se usan son las siguientes:

6.2.1. Condiciones de trabajo para el HPLC

El método utilizado se realizó en un equipo Agilent 1200 conectado a un QTrap 400 mediante un fuente de ions de “Electrospray” Turbo V™. La aguja del inyector se lava antes de cada inyección. Se utiliza una columna ODS-3 Chromack Intersil (100×3 mm i.d., 3 µm tamaño de partícula), equipada con una guarda columna de fase reversa. La temperatura de la columna se mantuvo a 28 °C durante todo el análisis.

El flujo se mantuvo constante a 0.2 mL/min y el gradiente utilizado fue el siguiente: de 100% A a 100% B en 12 min se mantuvo durante 6 min y a los 18 min el flujo se cambio a las condiciones iniciales.

A continuación se muestran algunos ejemplos de cromatogramas de algunos diuréticos.

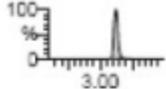
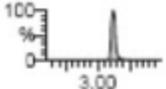
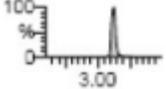
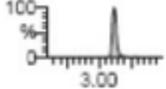
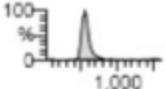
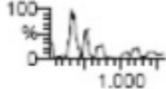
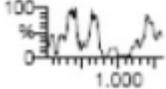
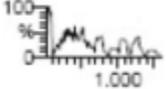
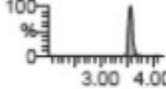
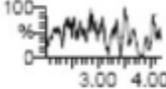
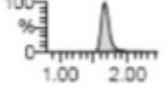
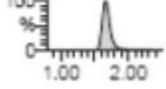
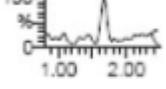
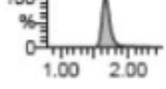
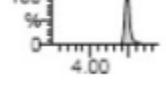
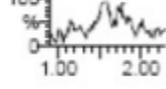
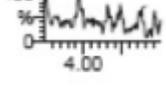
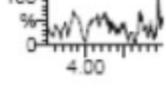
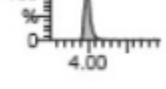
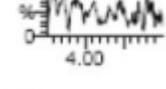
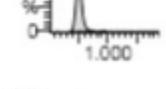
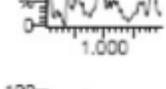
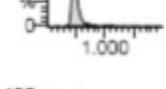
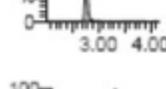
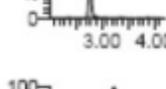
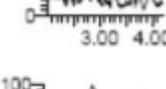
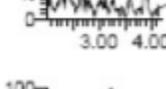
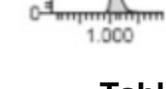
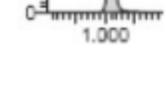
Nombre	Calibración	Muestra control	Muestra 200/1224	Muestra 200/1223
Piretinida impura A (estándar interno)				
Acetalozamida				
Altizida				
Amilorida				
Bendroflumetiazida				
Benzotiazida				
Clorotiazida				
Furosamida				
Hidroclorotiazida				

Tabla 9. Ejemplos de cromatogramas de diuréticos.

(Tomado de Thörngren; et. al. 2008.)

7. DISCUSIÓN

Con la información que se tiene en la actualidad podemos mencionar que:

- Los diuréticos son los compuestos más ampliamente usados por los deportistas para enmascarar el consumo de otro tipo de sustancias que aumentan el desempeño físico del deportista y son detectados a través de la combinación de diferentes técnica cromatográficas y espectrométricas entre las que destaca y son presentadas en el presente trabajo para el análisis de diuréticos como lo son la GC/MS y el uso del HPLC/MS/MS.
- Se presento la Normatividad Internacional que dicta la Agencia Mundial Anti-dopaje y la cual esta compuesta por el programa mundial anti-dopaje, el código mundial anti-dopaje y la lista de sustancias prohibidas, presentando sus aspectos generales y mostrando como la normas son cada vez son más estrictas dado que cada vez aparecen nuevos agentes dopantes en el mercado y pueden ser accesibles para los deportistas. Lamentablemente, en nuestro país el tema del dopaje es relativamente nuevo.
- En el presente trabajo se muestra el análisis de diurético en un laboratorio de control de dopaje, en el que los analitos de la muestra de orina se extraen y pre concentran, para posteriormente formar los metil derivados y finalmente ser analizados por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas o bien por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem.

- Los diuréticos son productos que ayudan a eliminar líquidos del cuerpo, causan una pérdida de agua por la paralización parcial de la reabsorción de agua; el riñón es el órgano principal a través del que se excretan estas drogas, es por esta razón que la prueba se realiza sobre una muestra de orina.
- Según lo presentado en este trabajo de tesis, las personas que consumen una sustancia prohibida darán resultados positivos en los análisis realizados en un Laboratorio de Control y Prevención del Dopaje.

8. CONCLUSIONES

El deseo de realizar una tesis que contemplara un tema poco investigado en México y que contemplara los aspectos sociales, farmacológicos, toxicológicos y analíticos se cumplió con este trabajo de investigación.

Se abordaron todos los temas vistos en los objetivos, presentando un panorama general de la confirmación de los diuréticos por HPLC/MS/MS, y con el resurgimiento de la importancia de la Federación Deportiva ante el tema del dopaje y de las medidas estrictas ante las violaciones al código mundial del dopaje; fue importante dar a conocer la reglamentación actual, así como las sustancias prohibidas para este año 2012.

9. LITERATURA CITADA

1. A. Bernreuther, J. Koziat, P. Brunerie, G. Krammer, N. Christoph, P. Schreier, Z. Lebensm. Unters. Forsch. 191. (1990) 299–301.
2. A. T. Kicman, Pharmacology of anabolic steroids. *Br. J. Pharmacol.* 2008, 154, 502-521.
3. A. Karim, J. Zagarella, T.C. Hutsell, A. Chao and B.J. Baltes, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 19 (1976) 170.
4. Adam T. Cawley and Ulrich Flenker The application of carbon isotope ratio mass spectrometry to doping control. *J. Mass Spectrom.* 2008; 43: 854–864
5. Ann S. Clark,, Leslie P. Henderson. Behavioral and physiological responses to anabolic-androgenic steroids. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 27 (2003) 413–436
6. Basaria S, Wahlstrom JT, Dobs AS. Clinical review 138: anabolicandrogenic steroid therapy in the treatment of chronic diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(11):5108–17.
7. Beyer J, Bierl A, Peters FT, Maurer HH. Screening procedure for detection of diuretics and uricosurics and/or their metabolites in human urine using gas chromatography–mass spectrometry after extractive methylation. *Ther Drug Monit* 2005;27:509–20.
8. Braithwaithe, A. & Smith J.F. *Chromatographic Methods*. Chapter 1. 4th Ed. Chmpman Hall. London (1985):3-8.
9. B. Beermann, M. Gro~hinsky-Grind and B. Lindstri~m, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 22 (1977) 385.
10. Brief History of Antidoping , Wada, v.6.0, 2009
11. Brooks RV (1975) Androgens. *Clin Endocrinol Metab* 4:503-520.
12. Cabañero AI, Recio JL, Rupérez M. *J Agric Food Chem.* 2006 Dec 27;54(26):9719-27. Liquid chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry: a new perspective on honey adulteration detection.
13. C Saudan, N Baume, N Robinson, L Avois, P Mangin, M Saugy. Testosterone and doping control. *Br J Sports Med* 2006;40(Suppl 1):i21–i24.

14. C. Ayotte, D. Goudreault, A. Charlebois. Testing for natural and synthetic anabolic agents in human urine. *J. Chromatogr. B* 1996, 687, 3-25.
15. Cawley, A.T., Flenker U. The application of carbon isotope ratio mass spectrometry to doping control. *J. Mass Spectrom.* 2008; 43: 854–864.
16. Cedric H. L. Shackleton, Andy Phillips, Tony Chang, Ye Li. Confirming testosterone administration by isotope ratio mass spectrometric analysis of urinary androstenediols. *Steroids* 62:379-387, 1997
17. Cháfer Pericás, Consuelo. et al. “Acoplamiento microextracción en fase sólida-cromatografía” de http://www.tdr.cesca.es/TESIS_UV/AVAILABLE/TDX-1115107-144308//chafer.pdf Tesis Doctoral. Universidad de Valencia, España, 2006. Páginas 9, 10
18. Chace DH. Mass spectrometry in the clinical laboratory. *Chem Rev.* 2001;101:445-77
19. Chace DH, Kalas TA. A biochemical perspective on the use of tandem mass spectrometry for newborn screening and clinical testing. *Clin Chem.* 2005;38:296-309.
20. Chace DH, Kalas TA, Naylor EW. The application of tandem mass spectrometry to neonatal screening for inherited disorders of intermediary metabolism. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2002;3:17-45.
21. Coert A, Geelen J, de Visser J, et al. The pharmacology and metabolism of testosterone undecanoate (TU), a new orally active androgen. *Acta Endocrinol* 1975;79:789–800.
22. Coplen TB. New guidelines for reporting stable hydrogen, carbon, and oxygen isotope-ratio data. *Geochimica et Cosmochimica Acta.* 1996; 60(17):3359-60
23. Coplen TB. Reporting of stable hidrógeno, carbon, and oxygen isotopic abundances. *Pure and Applied Chemistry.* 1984;66:273-6.
24. Craig H. Isotopic standars for carbon and oxygen and correction factors for mass-spectrometry análisis of carbon dioxide. *Geochimica et Cosmochimica Acta.* 1957; 12:133-49

-
-
25. D.M. Jones, J.F. Carter, G. Eglinton, E.J. Jumeau, C.S. Fenwick, *Biol. Mass Spectrom.* 20 (1991) 641–646.
26. Detlef Thieme, Peter Hemmersbach, *Doping in Sports*. 2010. Springer
27. Diccionario de la Real Lengua Española. de <http://www.wordreference.com/definicion/dopaje> ,
Visitado el 28 de agosto 2011.
28. Deventer K, Delbeke FT, Roels K, Van Eenoo P. Screening for 18 diuretics and probenecid in doping analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Biomed Chromatogr* 2002;16:529–35.
29. Domínguez Ortega, Aliana; et. al. “El Dopaje Deportivo. Tendencias Actuales”, en:
http://www.portalfitness.com/articulos/entrenamiento/Dopaje_deportivo.htm,
consultado el 20 y 30 de junio de 2011
30. Eakin P, Fallick A, Gerc J. Some instrumental effects in the determination of stable carbon isotope ratios by gas chromatography-isotope ratio mass spectrometry. *Chemical Geology*. 1992; 101:71-9
31. F. Andreasen, C.K. Christensen, F.K. Jakobsen and C.E. Mogensen, *Aeta Pharmacol. Toxicoi.*, 49 (1981) 223.
32. F. Hartgens, H. Kuipers, Effects of Androgenic-Anabolic Steroids in Athletes. *Sports Med.* 2004, 34, 513-554.
33. Farquhar, G.D., Ehleringer, J.R., Hubick, K.T. Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1989; 40:503-37
34. Federación Internacional de Fútbol Asociación. Documentos. “Ya en la época de los griegos” de http://es.fifa.com/mm/document/afdeveloping/medical/6.7_already_the_greek_did_it_es_6447.pdf ,
Consultado el 30 de Junio 2010
35. Fourcroy L. Jean. *Pharmacology, Doping and Sports. A scientific guide for athletes, coaches, physicians, scientists and administrators*. Ed. Routledge. 2009

-
-
36. Fried, Edgar. Tasks and objectives of the int. Olympic Committee Since 1884. International Olympic Committee 2009
37. Garritz Ruiz, Andoni et al. Tú y la Química. 1era. Ed., ED. Pearson Educación, México, 2001. Páginas 127-129
38. Griffiths WJ, Johnson AP, Liu S, Rai DK, Wang Y. Electrospray and tandem mass spectrometry in biochemistry. *Biochem J.* 2001;355:545-61.
39. Gohlke, R. S.; McLafferty, F. W., *Cromatografía de gas temprana/spectrometry total. J. . Soc. Spectrom total.* 1993, 4, (5), 367-371.
40. Harold, M. McNair, James M. Miller. *Basic Gas Chromatography. Second Edition.* A JOHN WILEY & SONS, INC., PUBLICATION. 2009
41. H. O'Leary, M. Carbon isotope fractionation in plants. *Phytochemistry.* 1981; 20(4):553-567
42. H.L. Schmidt, M. Butzenlechner, A. Rossmann, S. Schwarz. H. Kexel, K. Kempe, Z. Lebensm. Unters. Forsch. 196 (1993) 105–110
43. Horton, H. Robert; Moran, Laurence A.; Scrimgeour, K. Gray; Perry, Mark D.; Rawn, J. David. *Principios de Bioquímica.* 4th Ed. Pearson Education, México. 2008
44. <http://www.wadaama.org/en/dynamic.ch2?pageCategory.id=312>
Consultado el 3 de Febrero de 2010
45. http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-Prohibitedlist/WADA_Prohibited_List_2010_EN.pdf
46. http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-The-Code/WADA_Anti-Doping_CODE_2009_EN.pdf
[Consultado el 3 de Febrero de 2010](#)
47. http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-The-Code/WADA_Anti-Doping_CODE_2009_EN.pdf
[Consultado el 15 de Febrero del 2010](#)
48. <http://www.wada-ama.org/en/dynamic.ch2?pageCategory.id=312>
[Consultado el 18 de Febrero 2010](#)

-
-
49. <http://www.wada-ama.org/en/Science-Medicine/Anti-Doping-Laboratories/Technical-Documents/>
50. <http://www.wada-ama.org/en/World-Anti-Doping-Program/Sports-and-Anti-Doping-Organizations/International-Standards/> Consultado el 3 de Febrero del 2010
51. International Olympic Committee, The fight against doping and promotion of athletes' health, IOC, Switzerland, 2007, 5/5
52. International Olympic Committee, Medical Commission, International Olympic Charter Against Doping in Sport, IOC, Lausanne, 1990
53. I.M. Weiner, in A. Goodman Gilman, T.W. Rail, A.S. Nies and P. Taylor (Editors), Goodman and Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics, Pergamon Press, New York, 1990, pp. 708-48.
54. J.H. Dirks and R.A.L. Sutton (Editors), Diuretics. Physiology, Pharmacology and Clinical Use, W.B. Saunders Company, Philadelphia, PA, 1986..
55. J. Marcos, J. A. Pascual, X. de la Torre, J. Segura. Fast cribado of anabolic steroids and other banned doping substances in human urine by gas chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 2002, 37, 1059-1073.
56. J. Sheider Angela., Friedmann Theodore. Gene Doping in Sports. The Science and Ethics of Genetically Modified Athletes. Elsevier 2006.
57. Klaassen, C.D.; Casarett & Doull's. Toxicology: The Basic science of poison; 6º Ed.; McGrall-Hill: E.U., 2001
58. L. D. Bowers, D. J. Borts. Separation and confirmation of anabolic steroids with quadrupole ion trap tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 1996, 687, 69-78.
59. L. Dehennin and A. M. Matsumoto. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1993 (44):179-189

60. Leonid E. Fridlyand, Renate Scheibe. Regulation of the Calvin cycle for CO₂ fixation as an example for general control mechanisms in metabolic cycles. *BioSystems*. 1999 (51) 79–93.
61. Nimer Leite, Marcio. et al. “Estudio del comportamiento ambiental del sulfonato de alquilbenceno lineal (las) en una parcela agrícola de la vega de Granada” de <http://hera.ugr.es/tesisugr/16684163.pdf> Tesis Doctoral. Universidad de Granada, España, 2006. Páginas 108-122
62. Nieschlag E, Mauss J, Coert A, et al. Plasma androgen levels in men after oral administration of testosterone or testosterone undecanoate. *Acta Endocrinol* 1975;79:366–74.
63. M. Donike, N-methyl-n-trimethylsilyl-trifluoroacetamide a new silylating agent from series of silylated amides, *J. Chromatogr.* 42 (1) (1969) 103–104.
64. M. Saugy, C. Cardis, N. Robinson, C. Schweizer. Test methods: anabolics. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2000, 14, 111-133.
65. M. Thevis, W. Schänzer. Mass spectrometry in sports drug testing: structure characterization and analytical assays. *Mass Spectrom. Rev.* 2007, 26(1), 79-107.
66. Martin, Mayes Rodwell. *Bioquímica de Harper* 9ª Ed. Editorial El manual Moderno. 1984. Pag 502.
67. M.E.C. Moers, D.M. Jones, P.A. Eakin, A.E. Fallick, H. Griffiths, S.R. Larter, *Org. Biochem.* 20 (1993) 927–933.
68. Mc Nair, H.M. & Miller, J.M. *Basic Gas Chromatography*. Ed Jonh Wiley & Sons Inc. New York. USA. 1998.
69. Meier-Augenstein W, Watt P, Langhans C. Influence of gas chromatographic parameters on measurement of ¹³C/¹²C isotope ratios by gas-liquid chromatography-sombustion isotope ratio mass spectrometry. I. *Journal of Chromatography A.* 1996; 752:233-41
70. Meier-Augenstein W. Applied gas chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry. *Journal of Cromatography A.* 1999; 842:351-71

71. Meier-Augenstein W. The chromatographic side of isotope ratio mass spectrometry: pitfalls and answers. LC-GC International. 1997; 17-25
72. Morra V, Davit P, Capra P, Vincenti M, Di Stilo A, Botre F. Fast gas chromatographic/mass spectrometric determination of diuretics and masking agents in human urine: development and validation of a productive screening protocol for antidoping analysis. J Chromatogr A 2006;1135:219–29.)
73. Mueller Klaus, et al., Chromatographic Techniques- The Basis of Doping Control, Institute of doping Analysis and Sports Biochemistry, Germany, 1-11.
74. Museum, the Olympic Games in Antiquity, International Olympic Committee 2007
75. Myriam O.B., Viviana G.T., Actividad del citocromo P450 y su alteración en diversas patologías. Rev. Med. Chile. 2004; 132, pp 85-94.
76. O’Leary John Drugs and Doping in Sport. Socio-Legal Perspectives, Ed. Cavendish Publishing, Anglia Polytechnic University, London. 2001.
77. Opfermann G, Donike M. Metabolism of stanozolol: identification and synthesis of urinary metabolites. J Steroid Biochem 1990;36(1/2):153–74.
78. P.G. Welling, Biopharm. Drug Dispos., 7 (1986) 501.
79. P. Van Reterghem, P. Van Eenoo, W. Van Thuyne, H. Geyer, W. Schänzer, F. T. Delbeke, Validation of an extended method for the detection of the misuse of endogenous steroids in sport, including new hydroxylated metabolites. *J. Chromatogr. B*, 2008, 876, 225-235.
80. P. Van Reterghem, P. Van Eenoo, W. Van Thuyne, H. Geyer, W. Schänzer, F. T. Delbeke, Validation of an extended method for the detection of the misuse of endogenous steroids in sport, including new hydroxylated metabolites. *J. Chromatogr. B*, 2008, 876, 225-235.
81. Platzner IT, Habfast K, Walder AJ, Goetz A. In: Wineforder JD, ed Modern isotope ratio mass spectrometry. New York; J. Wiley: 1997
82. Payne AH, Hales DB. Endocrine Rv. 2004: 25:947.

83. Pontificia Universidad Javeriana. “Cromatografía” de <http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/celular/cromatografia.htm>,

Consultado el 20 de Agosto 2011

84. P.W. Feit, K. Roholt and H. Sorcnsen H, J. Pharm. Sci., 62 (1973) 375.

85. Qin Y, Wang XB, Wang C, et al. Application of high-performance liquid chromatography–mass spectrometry to detection of diuretics in human urine. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2003;794:193–203.

86. R.A. Day, A.L. Underwood. Química Analítica Cuantitativa, Ed. 5ª Ed. Pearson Education, México

87. R. Kazlauskas, G. Trout. Drugs in sports: Analytical trends. *Ther. Drug. Monit.* 2000, 22, 103-109.

88. R.L. Williams, J. Mordenti, R.A. Upton, E.T. Lin, W.L. Gee and C.D. Blume, *Pharm. Res.*, 4 (1987) 348.

89. R. Massé, et al., *J. Chromatogr.* 489(1989):23.

90. R. Meyer Verónica. Practical High-performance Liquid Chromatography, John Wiley and Sons. University of Berne. 1988

91. R.P. Evershed, K.I. Arnot, J. Collister, G. Eglinton, S. Charters, *Analyst* 119 (1994) 909–914.

92. Rachel L. Gomes, Will Meredith, Colin E. Snape, Mark A. Sephton. Analysis of conjugated steroid androgens: Deconjugation, derivatisation and associated issues. *J. Pharm. Biomed. Anal.* (2009), doi:10.1016/j.jpba.2009.01.027

93. Robert T. Furbank and William C. Taylor. Regulation of Photosynthesis in C3 and C4 Plants: A Molecular Approach. *The Plant Cell*, 1995. Vol. 7, 797-807

94. Roldan Barbero, Horacio; et. al. “La creación política de una nueva delincuencia: El uso del doping en el deporte”, en <http://www.uclm.es/aidp/pdf/barbero2/24.pdf>,

Visitado el 28 de agosto de 2011.

95. Sarah Benson, Chris Lennard, Philip Maynard, Claude RouxSchanzer W, Forensic applications of isotope ratio massspectrometry—A review. *Forensic Science International* 157 (2006) 1–22
96. Sanz-NebotV, Toro I, BergesR,VenturaR, Segura J,Barbosa J.Determination and characterization of diuretics in human urine by liquid chromatography coupled to pneumatically assisted electrospray ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2001;36:652–7.
97. S.G. Webster., *J. Chromatogr.* (1985) 333:186
98. Shahidi NT. A review of the chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids. *Clin Ther* 2001;23(9):1355–90.
99. SJÖQVIST, Folke; GARLE, Mats; RANE, Anders Horacio; et. al. “Use of doping agents, particularly anabolic steroids, in sports and society”, en Vol. 371, Mayo 31 2008.
100. Skoog DA, West DM, Holler FJ. *Chimie Analytique*. 7th ed. Paris: De Boeck Universite.
101. Skoog, D. *Principios de Análisis Instrumental*. Mc Graw Hill, 5ª Ed. España. 2001. Pag 537-573, 759-782.
102. Skoog, Douglas A. y Leary, James J. et al. *Fundamentos de Química Analítica*. 2da. Ed., ED. Reverte, México, 2001. Páginas 692-698, 705
103. S.P. Clissold and R.N. Brogden, *Drugs*, 29 (1985) 489.
104. Spitzer A, Chace DH. Proteomics and metabolimcs-based neonatal diagnostics in assessing and managing the critically ill neonate. *Clin Perinatol*. 2008;35:695-716.
105. Sogorb Sanchez, Miguel Angel, Villanova Gisbert Eugenio et al. *Técnicas analíticas de contaminantes químicos*. 1era. Ed., ED. Diaz de Santos, S.A., España, 2004. Páginas 27- 37
106. Technische Universitat Munchen “Definición de dopaje” de <http://www.doping-prevention.de/es/doping-in-general/doping-definition.html>, Visitado el 05 de Septiembre 2011.

107. Thieme D, Grosse J, Lang R, Mueller RK, Wahl A. Screening, confirmation and quantification of diuretics in urine for doping control analysis by highperformance liquid chromatography–atmospheric pressure ionisation tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001;757:49–57).
108. Thörngren J., Östervall F., Garle M. A high-throughput multicomponent screening method for diuretics, masking agents, central nerveour system (CNS) stimulants and opiates in human urine by UPLC-MS/MS. *J. of Mass Spectrometry* 2008;43:980-992.
109. Toscano V. Dihydrotestosterone metabolism. *Clin Endocrinol Metab* (1986) 15:279-292.
110. Toshimitsu Niwa. Basic theory of mass spectrometry. *Clinical Mass Spectrometry*. (Clinical Chemica Acta) 1995 (241-242):15-71.
111. U. Mareck, H. Geyer, G. Opfermann, M. Thevis, W. Schänzer, Factors influencing the steroid profile in doping control analysis. *J. Mass Spectrom.* 2008, 43, 877-891.
112. V. Hauke, R. Graff, P. Wehrung, J.M. Trendel, P. Albrecht, A. Riva, G. Hopfgartner, F.O. Gulacar, A. Buchs, P.A. Eakin, *Geochim. Cosmochim. Acta* 56 (1992) 3595–3602.
113. W. Schänzer. Metabolism of anabolic androgenic steroids. *Clin. Chem.* 1996, 42, 1001-1020
114. W. Schanzenzer, et al. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* Gas chromatography/mass spectrometry identification of long-term excreted metabolites of the anabolic steroid 4-chloro-1,2-dehydro-17 α -methyltestosterone in humans (1996) 57:363.
115. W. Schanzenzer, et al., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* Metabolism of metandienone in man: Identification and synthesis of conjugated excreted urinary metabolites, determination of excretion rates and gas chromatographic-mass spectrometric identification of bis-hydroxylated metabolites 38(1991) 441.
116. W. Riess, U.C. Dubach, D. Burckhardt, W. Theobald, P. Vuillard and M. Zimmerli, *Eur. J. Clin. Pharmacoi.*, 12 (1977) 375.

117. WADA. The World Anti-Doping Code publicado en http://www.wadaama.org/rtecontent/document/code_v3.pdf,

Visitado el 03 de Julio de 2011

118. WADA. “Prohibited list – List Revision Timeline” De <http://www.wada-ama.org/en/World-Anti-Doping-Program/Sports-and-Anti-Doping-Organizations/International-Standards/Prohibited-List/> ,

Visitado el 08 de septiembre 2011

119. Willard, H., Merritt, L., Dean, J. Métodos de Análisis Instrumental. Compañía Editorial Continental. 1988. Cap. 15-19. pp 477-628.

120. World Anti-doping Agency. “Acerca de la agencia mundial antidopaje” de http://www.wadaama.org/Documents/About_WADA/RegionalOffices_LatinAmerica/WADA_AboutLatinAmerica_SP.pdf , el 30 de Enero 2012

121. World Anti-doping Agency. “Regional Offices” de <http://www.wada-ama.org/en/About-WADA/Regional-Offices/>

Visitado el 01 de Julio 2011

122. World Anti-doping Agency. “Constitutive Instrument of Foundation of the Agence Mondiale Atidopage, World Anti-Doping Agency” de http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/constitutive_instrument_foundation.pdf,

Visitado el 12 de agosto 2011

123. Y.Q. Zeng, H. Mukai, H. Bandow, Y. Nojiri, Anal. Chim. Acta 289 (1994) 195–204. S.A. Baylis, K. Hall, E.J. Jumeau, Org. Geochem. 21 (1994) 777–785.