



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

Técnicas analíticas utilizadas para la detección y
confirmación de esteroides anabólicos androgénicos
en dopaje deportivo

T E S I S

MODALIDAD: ACTIVIDAD DE APOYO A
LA DOCENCIA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A

DANIEL NICOLÁS COBA

Director: M en C. Antonio Hernández Martínez

Asesora: M en C. María Teresa Griselda Fuentes Lara



Universidad Nacional
Autónoma de México



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: M en C. María Gloria Velázquez Vaquero
Vocal: M en C. Antonio Hernández Martínez
Secretario: M en C. María Teresa Griselda Fuentes Lara
Primer suplente: M en C Lourdes Castillo Granada
Segundo suplente: Q.F.B. Teresa Benítez Escamilla

Director:

M. en C. Antonio Hernández Martínez

Asesora:

M. en C. María Teresa Griselda Fuentes Lara

Sustentante:

Daniel Nicolás Coba

DEDICATORIAS

Este trabajo se lo dedico a mi madre (Carmen Coba Cerón), a mi padre (Filemón Daniel Nicolás Herrera) por darme el don más grande que existe en el mundo “La Vida”, y por sus grandes esfuerzos y la dedicación que han tenido para brindarnos a mi hermano y a mi amor y una educación, por brindarme su apoyo en los diferentes momentos de mi vida les doy mil gracias. A mi Hermano (Mauricio Nicolás Coba) por brindarme el ejemplo de hermano mayor y apoyarme en todo momento, a mi cuñada Martha Elisa Sánchez por su apoyo en los años de estudiante y por haber traído a este mundo a un hermoso niño que se ha convertido en la luz y la esperanza de mi familia. A mi tía Alfonsina, por ser un pilar de unión, a mi padrino Toño y mi madrina Berna por ser grandes ejemplos de esfuerzo y solidaridad, a mi tío Andrés por su apoyo y sus consejos en todo momento, A mi abuela Altagracia y a mis tíos José y Gabriel que son un gran ejemplo de esfuerzo y perseverancia, a mi tío Isaías por el apoyo brindado en momentos difíciles y a todos los integrantes de mi familia por brindarme su cariño, el apoyo y la convivencia, les agradezco con toda el alma. .

También dedico este trabajo a mis amigos de preparatoria J. Manuel Montiel, Fernando Hernández, Alberto Balam Velarde, Mariana Velarde, Javier Sánchez, Carlos Velázquez, Wilber Reynoso, Augusto Reynoso, Armando Mendoza, Ángel Ortiz, Mauricio Mendoza. . A mis amigos de la facultad Iván Legazpi, Héctor Gil, Erick Castañeda, Jessica Sánchez, Alejandro Medina, Omar Rocha, Omar Caudillo, José Quinatzin Moran, Elena Ramírez, Mauricio Martínez, Pavel Santiago, Alberto Rubio, Edson Becerra, Rodolfo Carreón, Carlos Salvador Valadez, Edna Quintero. A mis amigos del trabajo Maricela Domínguez, Javier García, Pedro Cabrera, Ana Laura Pérez, Eradio Méndez, Raymundo Rivero, Tonatzin Ramírez, Pedro Cabrera, Karina Mercado, Pedro Jurado, Jahir Bautista, Miguel Ángel Delgadillo, Eduardo Reynoso, Manuel López, Laura Aguilar, Cecilia López, Rodrigo Vian a todos ellos y aquellos que faltaron mencionar muchas

gracias por su amistad, apoyo y la convivencia que me han brindado a lo largo de mi trayectoria como estudiante, como deportista y en la vida laboral.

Nuestro mayor temor no es ser inadecuado. Nuestro mayor temor es que somos poderosos sin medida. Es nuestra luz, no nuestra oscuridad lo que más nos asusta. Si vives tímidamente no servirás al mundo. No tiene nada de iluminado el encogerse para que la gente no se sienta insegura a tu lado. Todos estamos destinados a brillar, como los niños. No solo algunos de nosotros, sino todos. Y al dejar que nuestra luz brille inconscientemente les damos permiso a otros de hacer lo mismo. Al liberarnos de nuestros propios miedos nuestra presencia automáticamente libera a otros.

Nelson Mandela

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por compartir su grandeza educativa conmigo a través de sus profesores, instalaciones y recursos.

Agradezco a todos y cada uno de los profesores que con su esfuerzo y dedicación lograron transmitir su conocimiento y experiencia a mi persona.

Agradezco a la M en C. María Teresa Griselda Fuentes Lara y al M en C. Antonio Hernández Martínez por su apoyo para poder desarrollar el presente trabajo. También agradezco a los miembros del jurado por sus valiosas correcciones y aportaciones. Al igual que a la Dra. Evangelina Camacho Frías, al cDr. Miguel Ángel Delgadillo Marín, al Técnico Laboratorista Clínico. Pedro Cabrera Osegueda, a la Q.I Maricela Domínguez Rodríguez y al Q.I. Javier García García por sus aportaciones las cuales fueron de gran ayuda para mejorar este trabajo.

Y en especial agradecer al Q.F.B. Alejandro Alcántara Pineda, a la Q.F.B Lourdes Araceli Santana Castillo y al Dr. Benjamín Velazco Bejarano por la oportunidad que me han brindado en mi crecimiento como profesionista y como persona.

ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Historia del dopaje	4
2.2 Definición de dopaje	7
2.3 Aspectos normativos en control de dopaje deportivo.....	9
2.3.1 Código Mundial Antidopaje.....	10
2.3.2 Estándares Internacionales.....	10
2.3.3 Lista de Sustancias Prohibidas	11
2.3.4 Documentos técnicos.....	15
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
4. OBJETIVOS	19
4.1 Objetivo general.	19
4.2 Objetivos particulares	19
5. METODOLOGÍA	20
6. QUÍMICA DE LOS ESTEROIDES ANABÓLICOS ANDROGÉNICOS	21
6.1 Generalidades.....	21
6.1.1 Propiedades fisicoquímicas.....	27
6.1.2 Propiedades farmacológicas	30
6.1.3 Efectos secundarios.....	31
6.1.4 Uso de esteroides anabólicos androgénicos en el deporte.....	32
6.2 Biosíntesis y metabolismo	34
7. TÉCNICAS ANALÍTICAS UTILIZADAS EN EL ANÁLISIS DE ESTEROIDES ANABÓLICOS ANDROGÉNICOS	36
7.1 Cromatografía.....	37
7.1.1 Generalidades	37
7.2 Cromatografía de gases.....	38
7.3 Espectrometría de masas	46
7.4 El acoplamiento de la cromatografía de gases y la espectrometría de masas	50
7.5 Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas con analizador tipo cuádruplo simple	52
7.6 Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas en tándem	55
7.7 Cromatografía de gases con celda de combustión acoplado a espectrometría de masas de relaciones isotópicas.....	57

8. ANÁLISIS DE ESTEROIDES ANABÓLICOS ANDROGÉNICOS	60
8.1 Aspectos críticos en el análisis de esteroides anabólicos androgénicos	60
8.1.1 Hidrólisis	61
8.1.2 Extracción	61
8.1.3 Derivatización.....	61
8.2 Ejemplos del análisis de esteroides.....	64
9 ANALISIS Y DISCUSIÓN.....	67
10 CONCLUSIONES	69
11. REFERENCIAS	71
12 ANEXO.....	78

1 INTRODUCCIÓN

El deporte es una actividad cuyo principal propósito es, buscar la salud física y mental de los individuos que lo practican. En la práctica deportiva se busca la igualdad de condiciones durante la competencia, sin embargo, a través del tiempo se han utilizado diferentes estrategias y métodos para lograr un mayor rendimiento en los atletas. Estos han ido desde la extirpación de órganos hasta el consumo de sustancias que vigorizan y aumentan el rendimiento físico durante la competencia, el uso de estos métodos y el abuso de diferentes tipos de sustancias han puesto en peligro la integridad de los atletas, es por ello que, en 1968, durante los Juegos Olímpicos de México, se comenzaron a realizar los primeros controles antidopaje, implementados por la Comisión Médica del Comité Olímpico Internacional. En la actualidad, el organismo internacional encargado de regular las actividades contra el dopaje deportivo es la Agencia Mundial Antidopaje (WADA, por sus siglas en inglés). La WADA publica periódicamente diferentes documentos los cuales tienen la finalidad de reglamentar y homogenizar los criterios para el control del dopaje en el deporte. Los documentos más importantes que competen a los laboratorios acreditados para el control de dopaje son: el Código Mundial Antidopaje, los Estándares Internacionales para Laboratorios, La Lista de Sustancias Prohibidas y los Documentos Técnicos.

Los esteroides anabólicos androgénicos son hormonas producidas por el cuerpo humano para regular diversas funciones metabólicas y sexuales. Estos son producidos de manera natural por el organismo y se les denomina endógenos.

El principal esteroide anabólico androgénico es la hormona masculina testosterona, que fue sintetizada en los años 30's y a partir de entonces, se ha obtenido mediante síntesis orgánica, una gran variedad de compuestos derivados

de esta. Estos compuestos presentan efectos similares a los de su precursor o bien han sido modificados para eliminar las propiedades androgénicas de la testosterona, dejando que solo contribuyan los efectos anabólicos de dicha sustancia.

Los esteroides anabólicos androgénicos son la clase de compuestos más utilizados por los deportistas para aumentar su rendimiento físico durante las competencias (principalmente en deportes que involucran fuerza, potencia o explosividad para su desarrollo), es por esto que la WADA incluye a este grupo de sustancias dentro de la lista de sustancias prohibidas, y se hace referencia de los esteroides anabólicos androgénicos como sustancias prohibidas tanto en competencia como fuera de competencia. Esta prohibición incluye a los esteroides endógenos, cuando estos se encuentran fuera de los valores normales, así, como para los esteroides exógenos

A partir de la prohibición de los esteroides anabólicos androgénicos en el deporte, se han desarrollado varias metodologías analíticas para detectar su uso, desde los ensayos inmunológicos hasta el uso de la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

La WADA a través de los Estándares Internacionales para Laboratorio (ISL por sus siglas en inglés), así como en los Documentos Técnicos, destaca el uso de la Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS por sus siglas en inglés), Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas/masas (GC/MS/MS por sus siglas en inglés) y Cromatografía de gases con celda de combustión acoplado a espectrometría de masas de relaciones isotópicas (GC/C/IRMS por sus siglas en inglés) como las principales alternativas analíticas para la detección y confirmación de la presencia de esteroides en las

muestras biológicas de los atletas (orina), así como para la determinación del origen de los esteroides endógenos y sus precursores.

Para el desarrollo de las diferentes técnicas analíticas utilizadas en la detección y confirmación de la presencia de esteroides anabólicos androgénicos en muestras biológicas de atletas, es necesario tener el conocimiento básico de su estructura, sus propiedades fisicoquímicas, así como, su metabolismo y biotransformación. Parte de este conocimiento es adquirido durante la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo en el módulo de Evaluación de Fármacos y Medicamentos II, en la unidad que concierne al estudio de los mecanismos de acción, la relación estructura actividad, farmacocinética y metabolismo de los principales fármacos con acción en el sistema endocrino, en este caso enfocado a las hormonas sexuales. El presente documento tiene la finalidad de apoyar al estudio de este tema, principalmente ilustrando el desarrollo de los métodos analíticos partiendo del conocimiento del metabolismo de los esteroides anabólicos androgénicos.

2. ANTECEDENTES

2.1 Historia del dopaje

A través de las diferentes épocas y diferentes lugares del planeta se tienen registros históricos del uso de sustancias, ya sea en forma de infusiones o extractos que han ayudado al ser humano a mejorar su resistencia, a esfuerzos físicos o a condiciones climáticas adversas. También se han usado para rituales religiosos o en actos bélicos. Por ejemplo, en la mitología nórdica se hace mención de los guerreros Bersekers, quienes conseguían aumentar su fuerza combativa al consumir el hongo *Amanita muscaria*, el cual contiene el alcaloide denominado muscarina. En la cultura China, más de 5000 años atrás se empleó la efedra por sus propiedades estimulantes. En el año 2737 a.C el emperador chino Shen Nung describió el efecto estimulante de varias plantas de las que, sin duda, se debe mencionar la raíz del ginseng como una de las principales. En el continente americano se tiene la referencia del uso de la coca (*Erythroxylon coca*) usada por los indígenas del Perú, Bolivia y México. En la hoja disecada de la coca se encuentra el alcaloide más importante que es la cocaína, el cual actúa como un estimulante. Las tribus tarahumaras utilizaron la mezcalina, sustancia alucinógena extraída del peyote (*Lophophora williamsi*). En África y oriente medio se encuentra el Kat, planta cuyo nombre científico es "*Catha edulis*" un arbusto que crece en las mesetas de Abisinia, y que de sus hojas se extrae la catina que es un alcaloide simpaticomimético con efectos similares a los de la efedrina. En Europa durante la época medieval se usó la mandrágora, esta planta (*Mandragora autumnalis*) fue utilizada principalmente por sus efectos narcóticos, afrodisiacos y tóxicos. En la Grecia antigua y posteriormente en Roma se tienen la mayoría de los antecedentes del uso de sustancias tonificantes para mejorar las cualidades físicas de los competidores aunque estas sustancias fueran nocivas para el competidor, inclusive existía una lucha para que el adversario recibiese alguna

sustancia que disminuyese su capacidad para competir [1]. Los romanos administraban a sus caballos infusiones de fermentos de miel para obtener una mayor resistencia de estos en las carreras.

En la época contemporánea se ha hecho uso de sustancias dopantes en los conflictos bélicos principalmente las anfetaminas, su uso tuvo auge durante la segunda guerra mundial, al ser utilizadas para obtener un mayor rendimiento físico en los soldados, principalmente alemanes e ingleses, y posteriormente su consumo se trasladó al ámbito deportivo.

En el atletismo se tienen registros de 1879 que se refieren a dopaje. Y en 1886 en ciclismo, siendo este último año en donde se tiene reportado, el primer caso conocido de “Muerte por uso de sustancias en el deporte”. Arthur Linton un ciclista de origen galés, durante la carrera de Burdeos-París, falleció después de la administración de un cóctel de estupefacientes. Para comienzos del siglo XX, se detecta, en la práctica del boxeo el uso indiscriminado de píldoras de estriquina, que eran ingeridas por los boxeadores en compañía de bebidas alcohólicas y de cocaína. De igual manera, los futbolistas franceses y belgas efectuaban la misma práctica e implementaron la administración de oxígeno en el descanso del partido, la llamada oxigenoterapia.

Los antecedentes del dopaje en el deporte olímpico de la era moderna fueron en 1904, durante los Juegos Olímpicos de Saint Louis, que se efectuaron entre el 23 de junio y el 15 de octubre, en donde el inglés Thomas Hicks, ganó el maratón representando a los Estados Unidos. Durante el evento su entrenador le inyectó en dos ocasiones 1 mg de sulfato de estriquina y coñac con el fin de contrarrestar la fatiga. Ante ello, el barón Pierre de Coubertin, declaró: “Se hace trampa en una forma física cuando se dopa al atleta como a un caballo”. Estos hechos

condujeron a crear, las que serían primeras normas sobre sustancias prohibidas en competencia, dictadas por el Comité Olímpico Internacional [2].

Hasta antes de 1960, deportistas, técnicos y médicos simulaban desconocer los efectos de la administración de estas sustancias, de forma que el hecho de consumirlas para mejorar el rendimiento era comúnmente aceptado. El punto de inflexión que inició la lucha contra el dopaje fue la creación del primer laboratorio especializado en la detección de sustancias dopantes en Florencia Italia en 1961[3].

En 1960 se registraron los primeros casos del uso de esteroide como agentes dopantes en deportistas de la disciplina de lanzamiento y posteriormente su uso se extendió en otras modalidades deportivas.

En 1960 durante los Juegos Olímpicos de Roma acontece un hecho fatal, la muerte del ciclista danés Kurt Enemar Knud Jensen, quien fue campeón de Escandinavia y figura principal del cuarteto de Dinamarca. La muerte le sobrevino durante el recorrido de los 100 metros de la carrera contra reloj por equipos, tras haber pasado media carrera se sintió indispuerto y fue trasladado a un hospital, donde falleció como consecuencia de un colapso irreversible. Según resultados de la necropsia, su muerte fue consecuencia de la excesiva ingestión de anfetaminas y vasodilatadores.

La trágica muerte televisada del ciclista Tommy Simpson durante el Tour de Francia de 1967 hizo que cambiara la perspectiva que hasta entonces se tenía sobre el dopaje. El Comité Olímpico Internacional (COI) se vinculó firmemente en la lucha contra el dopaje con la creación de la Comisión Médica, la cual comenzó a realizar controles antidopaje en los Juegos Olímpicos de México en 1968 [2].

2.2 Definición de dopaje

La definición de dopaje ha evolucionado en las diferentes épocas conforme se han ido regulando las diferentes actividades para su control. A continuación se mencionan algunas de las definiciones de dopaje, hasta llegar a la definición actual, la cual está establecida por la Agencia Mundial Antidopaje.

La palabra “Doping” es un anglicismo que apareció por primera vez en 1889 en el lenguaje norteamericano, posteriormente se incorporó a un diccionario inglés en el cual se hacía referencia a una mezcla de opio y narcóticos administrada a los caballos.

En enero de 1963 en Francia se celebró el primer Coloquio Europeo de Medicina Deportiva en Uriage Les-Bains, en el que se propuso la siguiente definición de dopaje “Se considera dopaje al uso de sustancias y medios destinados a incrementar artificialmente el rendimiento ante una competencia, que pudiera perjudicar la integridad física y psíquica del deportista” [2].

Una de las definiciones que adoptó la Comisión Médica del Comité Olímpico Internacional fue la siguiente: “Se entiende como dopaje la administración a los deportistas o al uso de estos, de cualquier sustancia natural o sintética que modifique y/o incremente en forma artificial el desempeño físico, así como cualquier método o manipulación farmacológica, física o química que altere o enmascare la utilización de sustancias consideradas como agentes dopantes” [4].

En la actualidad la definición de dopaje se toma del código mundial antidopaje y es la siguiente:

El dopaje se define como la comisión de una o varias infracciones de las normas antidopaje según lo dispuesto desde el artículo 2.1 al artículo 2.8 del Código Mundial Antidopaje. A continuación se mencionan los artículos del código mundial antidopaje del 2.1 al 2.8.

2.1 La presencia de una sustancia prohibida o de sus metabolitos o marcadores en la muestra de un deportista.

2.2 Uso o intento de uso por parte de un deportista de una sustancia prohibida o de un método prohibido.

2.3 La negativa o resistencia, sin justificación válida, a una toma de muestras tras una notificación hecha conforme a las normas antidopaje aplicables, o evitar de cualquier otra forma la toma de muestras.

2.4 Vulneración de los requisitos sobre la disponibilidad del deportista para la realización de controles fuera de competencia.

Incluye el no presentar la información requerida sobre su localización, así como los controles que se consideren fallidos en base a las normas internacionales para controles. Cualquier combinación de tres controles fallidos y/o no presentación de la información sobre su localización, que se produzca en un período de dieciocho meses establecido por las organizaciones antidopaje con jurisdicción sobre el deportista constituirá una infracción de las normas antidopaje.

2.5 Falsificación o intento de falsificación de cualquier parte del procedimiento de control de dopaje.

2.6 Posesión de sustancias prohibidas y métodos prohibidos.

2.7 Tráfico o intento de tráfico de cualquier sustancia prohibida o método prohibido.

2.8 Administración o intento de administración durante la competencia a un deportista de una sustancia prohibida o método prohibido, la administración o el intento de administración de cualquier método o sustancia prohibidos a un deportista fuera de competición, o bien la asistencia, incitación, contribución, instigación, encubrimiento o cualquier otro tipo de complicidad en relación con una infracción de las normas antidopaje o cualquier otra tentativa de infracción de éstas [5].

En específico, el artículo que interesa en un laboratorio de prevención y control del dopaje se establece en el número 2.1, el cual menciona la presencia de una sustancia prohibida o de sus metabolitos o marcadores en la muestra de un atleta.

2.3 Aspectos normativos en control de dopaje deportivo

El uso de sustancias con la finalidad de generar un mayor rendimiento en competencias deportivas data de mucho tiempo atrás, sin embargo, en la época moderna no se le daba demasiada importancia, hasta que en 1961 fue creado el primer laboratorio de detección de sustancias dopantes, y mayor fue el énfasis en este tema cuando en 1967 muere el ciclista Tommy Simpson durante el tour de Francia, por una insuficiencia cardiaca provocada por el consumo de anfetaminas. Este hecho impulsó al Movimiento Olímpico Internacional a crear la Comisión Médica del Comité Olímpico Internacional la cual comenzó a realizar controles de dopaje, el primer control de dopaje fue en los Juegos Olímpicos de México en 1968.

Los objetivos de la lucha contra el dopaje son garantizar la ética en el deporte, la igualdad en las condiciones durante la competencia, de tal forma que los resultados dependan básicamente de las condiciones físicas y psicológicas del

deportista y preservar la salud en el sentido de que el ejercicio no debe provocar alteraciones y patologías en el deportista [2].

Actualmente el organismo que regula las actividades contra el dopaje deportivo es la agencia mundial antidopaje (WADA), la cual fue creada en 1999. Esta agencia es un organismo autónomo que promueve, coordina y supervisa la lucha contra el dopaje en el deporte. La WADA ha publicado, diferentes documentos para homogenizar criterios en la lucha contra el dopaje, el Código Mundial Antidopaje, Los Estándares Internacionales de Control, la Lista de Sustancias Prohibidas, los Documentos Técnicos, entre otros.

2.3.1 Código Mundial Antidopaje

El Código es el documento fundamental y universal en el que se basa el Programa mundial Antidopaje en el deporte. El propósito del Código es promover la lucha contra el dopaje mediante la armonización universal de los principales elementos relacionados con la lucha antidopaje [5].

2.3.2 Estándares Internacionales

Los Estándares Internacionales de Control son un conjunto de documentos en los cuales se mencionan los diferentes protocolos, guías, lineamientos legales, especificaciones científicas y técnicas que se deben considerar para el desarrollo de análisis de muestras. Estos estándares son cinco y son el de Laboratorios, Pruebas (toma de muestra), La Lista de Sustancias Prohibidas, Excepción de Uso Terapéutico y el de la Información Personal y Protección de la Privacidad. En el caso de este trabajo nos referiremos a la Lista de Sustancias Prohibidas y a los Estándares Internacionales para Laboratorios.

2.3.3 Lista de Sustancias Prohibidas

Desde el 2004, como un mandato del Código, la WADA es responsable de la preparación y publicación anual de La Lista de Sustancias Prohibidas, la cual es un documento de gran importancia y un componente clave para la armonización, identificando las sustancias y métodos prohibidos en competencia, fuera de competencia y en deportes en particular [6].

La Lista de Sustancias Prohibidas está dividida en diferentes grupos de sustancias y métodos prohibidos en el deporte. Esto dependiendo del grupo farmacológico al que pertenecen. En la tabla 1 se encuentran enlistados los diferentes grupos de sustancias y métodos prohibidos por la WADA.

Tabla. 1: Grupos de sustancias y métodos incluidos en la Lista de Sustancias Prohibidas [7].

ESPECIFICACIÓN DE LA SUSTANCIA O MÉTODO	CODIGO
Sustancias no aprobadas	S0
Agentes anabolizantes	S1
Hormonas peptídicas, factores de crecimiento y sustancias afines	S2
Beta -2 agonistas	S3
Moduladores hormonales y metabólicos	S4
Diuréticos y otros agentes enmascarantes	S5
Estimulantes	S6
Narcóticos	S7
Canabinoides	S8
Glucocorticoesteroides	S9
Alcohol	P1
Betabloqueadores	P2
Manipulación de sangre y componentes sanguíneos	M1
Manipulación química y física	M2
Dopaje genético	M3

Para los Agentes Anabólicos (S1); la lista comprende:

1. Esteroides Anabólicos Androgénicos

a) Esteroides Anabólicos Androgénicos exógenos entre ellos:

- **1-androstenediol** (5 α -androst-1-en-3 β ,17 β -diol)
- **1-androstenediona** (5 α -androst-1-en-3,17-diona)
- **bolandiol** (estr-4-en-3 β ,17 β -diol)
- **bolasterona**
- **boldenona**
- **boldiona** (androsta-1,4-dieno-3,17-diona)
- **calusterona**
- **clostebol**
- **danazol** ([1,2]oxazolo[4',5':2,3]pregna-4-en-20-in-17 α -ol)
- **dehidroclorometiltestosterona** (4-cloro-17 β -hidroxi-17 α -metilandrosta-1,4-dien-3-ona)
- **desoximetiltestosterona** (17 α -metil-5 α -androst-2-en-17 β -ol)
- **drostanolona**
- **estanozolol**
- **estenbolona**
- **etilestrenol** (19-norpregna-4-en-17 α -ol)
- **fluoximesterona**
- **formebolona**
- **furazabol** (17 α -metil-[1,2,5]oxadiazolo[3',4':2,3]-5 α -androstan-17 β -ol)
- **gestrinona**
- **4-hidroxitestosterona** (4,17 β -dihidroxiandrost-4-en-3-ona)
- **mestanolona**
- **mesterolona**
- **metandienona** (17 β -hidroxi-17 α -metilandrosta-1,4-dien-3-ona)

- **metandriol**
- **metasterona** (17 β -hidroxi 2 α , 17 α -dimetil-5 α -androstan-3-ona-)
- **metenolona**
- **metildienolona** (17 β -hidroxi-17 α -metilestra-4,9-dien-3-ona)
- **metil-1-testosterona** (17 β -hidroxi-17 α -metil-5 α -androst-1-en-3-ona)
- **metilnortestosterona** (17 β -hidroxi-17 α -metilestr-4-en-3-ona)
- **metiltestosterona**
- **metribolona** (metiltrienolona, 17 β -hidroxi-17 α -metilestra-4,9,11-trien-3-ona)
- **mibolona**
- **nandrolona**
- **19-norandrostendiona** (ester-4-en-3,17-diona)
- **norboletona**
- **norclostebol**
- **noretandrolona**
- **oxabolona**
- **oxandrolona**
- **oximesterona**
- **oximetolona**
- **prostanazol** (17 β -[(tetrahidropiran-2-il)oxi]-1'H-pirazolo[3,4:2,3]-5 α -androstan)
- **quimbolona**
- **1-testosterona** (17 β -hidroxi-5 α -androst-1-en-3-ona)
- **tetrahydrogestrinona** (18a-homo-pregna-4,9,11-trien-17 β -ol-3-ona)
- **trembolona** (17 β -hidroxiestr-4,9,11-trien-3-ona)

y otras sustancias con estructura química o efectos biológicos similares.

b) . Esteroides Anabólicos Androgénicos endógenos, administrados exógenamente

- **androstendiol** (androst-5-en-3 β ,17 β -diol)

- **androstendiona** (androst-4-en-3,17-diona)
- **dihidrotestosterona** (17 β -hidroxi-5 α -androstan-3-ona)
- **prasterona** (dehidroepiandrosterona, DHEA, 3 β -hidroxiandrost-5-en-17-ona)
- **testosterona**

Y sus metabolitos e isómeros, que incluyen pero no se limitan a:

- **5 α -androstan-3 α ,17 α -diol**
- **5 α -androstan-3 α ,17 β -diol**
- **5 α -androstan-3 β ,17 α -diol**
- **5 α -androstan-3 β ,17 β -diol**
- **androst-4-en-3 α ,17 α -diol**
- **androst-4-en-3 α ,17 β -diol**
- **androst-4-en-3 β ,17 α -diol**
- **androst-5-en-3 α ,17 α -diol**
- **androst-5-en-3 α ,17 β -diol**
- **androst-5-en-3 β ,17 α -diol**
- **4-androstendiol** (androst-4-en-3 β ,17 β -diol)
- **5-androstendiona** (androst-5-en-3,17-diona)
- **epi-dihidrotestosterona**
- **epitestosterona**
- **3 α -hidroxi-5 α -androstan-17-ona**
- **3 β -hidroxi-5 α -androstan-17-ona**
- **7 α -hidroxi-DHEA**
- **7 β -hidroxi-DHEA**
- **7-ceto-DHEA**
- **19-norandrosterona**
- **19-noreticolanolona.**

2. Otros Agentes Anabólicos, que incluyen pero no se limitan a su estructura:

Clenbuterol, moduladores selectivos del receptor de andrógeno (SARMs), tibolona, zeranol, zilpaterol.

Para efectos de esta sección:

* “exógeno” se refiere a una sustancia que, por lo común, el cuerpo no puede producir de forma natural.

** “endógeno” se refiere a una sustancia que el cuerpo puede producir de forma natural [7].

2.3.4 Documentos Técnicos

La WADA publica periódicamente recomendaciones técnicas concretas que aborden ámbitos operativos específicos de los laboratorios acreditados en un Documento Técnico. Las recomendaciones técnicas descritas en ellos son obligatorias y debe realizarse antes de la fecha efectiva especificada en el documento técnico. Estos documentos sustituyen cualquier publicación anterior sobre un tema similar. Los Documentos Técnicos de interés para la detección y confirmación de esteroides anabólicos androgénicos vigentes para el año 2013 establecidos por la WADA son lo que se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Documentos Técnicos emitidos por WADA [8]

Título	Código del Documento
Límites de decisión para la cuantificación confirmatoria de sustancias con umbral.	TD2013DL
Armonización de los análisis e informes de 19-Noresteroides relacionados con nandrolona	TD2012NA
Criterios de Identificación para análisis cualitativos que incorporan cromatografía de columna y espectrometría de masas	TD2010IDCR
Límites mínimos requeridos para la detección de sustancias prohibidas	TD2013MRPL
Guía de reporte y evaluación para testosterona (T), epitestosterona (E), para la relación T/E, y otros esteroides endógenos	TD2004EAAS

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El dopaje en México y el mundo es un problema actual. Una de las familias de sustancias más utilizada en el deporte de alto rendimiento es la de los esteroides anabólicos androgénicos, por lo cual, se requiere como herramienta, la aplicación de técnicas analíticas e instrumentales para la detección y confirmación de sustancias que se usen con otro objetivo que no sea el terapéutico, ya que el uso ilícito de estas sustancias pone en riesgo la salud e incluso la vida del deportista.

Es importante identificar y proyectar diversas áreas de aplicación para los conocimientos adquiridos durante la estancia en la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo, conocimientos como, farmacología, química analítica, química orgánica, análisis instrumental entre otros, y su aplicación en el desarrollo de áreas como la medicina y toxicología aplicadas en el deporte. Uno de los temas de gran relevancia en medicina del deporte es el de dopaje deportivo. Este tema es conocido en el mundo desde hace décadas, sin embargo, es necesario generar una recopilación de información que permita lograr una mayor comprensión a esta problemática de nivel mundial.

Ya que en México la investigación realizada en el ámbito deportivo está en desarrollo, es importante conocer los métodos actuales para el análisis y detección de los esteroides anabólicos androgénicos en muestras de orina humana, para el control de dopaje en el deporte, incluyendo los métodos de cribado o screening, los métodos de confirmación, así como la determinación del origen de los esteroides anabólicos, clasificados como endógenos y exógenos.

Además el de establecer la relación de este proyecto con el módulo de Evaluación de Fármacos y Medicamentos II, módulo en el cual se estudian los

diversos aspectos farmacológicos de los principales fármacos con acción en el sistema endócrino, específicamente sobre hormonas sexuales. Debido a que este módulo tiene aplicaciones teórico prácticas, es importante tomar en cuenta las alternativas analíticas más utilizadas en la actualidad en el área de dopaje deportivo para la detección de este tipo de sustancias prohibidas en el deporte.

Considerando lo anterior, en este trabajo se propone generar una recopilación de la información del análisis de dichas sustancias, por lo que se abordan las principales técnicas utilizadas para su análisis, que son la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, la cromatografía de gases acoplada a masas en tándem y la cromatografía de gases con celda de combustión acoplada a espectrometría de masas de relaciones isotópicas.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general.

Mostrar el impacto e importancia que ha adquirido el desarrollo de técnicas analíticas e instrumentales para la detección, confirmación y cuantificación de esteroides anabólicos androgénicos, utilizados en el control y prevención de dopaje deportivo.

4.2 Objetivos particulares

- Describir la importancia del uso de la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) tipo cuadrupolar para la separación y detección de esteroides anabólicos androgénicos en la prevención y control de dopaje deportivo.
- Describir la importancia del uso de la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en tándem (GC/MS/MS) para la separación y detección de esteroides anabólicos androgénicos en la prevención y control de dopaje deportivo.
- Describir la importancia de la cromatografía de gases con celda de combustión acoplada a espectrometría de masas de relaciones isotópicas (GC/C/IRMS) en la metodología para confirmación de la presencia de esteroides anabólicos androgénicos endógenos administrados de forma exógena en la prevención y control de dopaje deportivo.
- Vincular este proyecto con el módulo de Evaluación de Fármacos y Medicamentos II impartido en la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

5. METODOLOGÍA

Para el desarrollo del presente trabajo se inicio con una búsqueda general sobre dopaje deportivo y esteroides anabólicos androgénicos, su estructura, su actividad biológica su metabolismo y biotransformación. Posteriormente se procedió a la consulta de la pagina web de la Agencia Mundial Antidopaje, en donde se consultaron los diferentes documentos emitidos por esta, los cuales indican los criterios y las alternativas analíticas que se exige a los laboratorios acreditados para la detección, confirmación y cuantificación de sustancias prohibidas en muestras de deportistas. Por ultimo se consultaron diferente paginas de Agencias estatales de diferentes países en los que se tienen programas de control de dopaje, y, se realizo la búsqueda de artículos y publicaciones con respecto al análisis, detección y confirmación de la presencia de esteroides anabólicos androgénicos en muestras de atletas, así como los estudios de excreción realizados en diferentes laboratorios.

6. QUÍMICA DE LOS ESTEROIDES ANABÓLICOS ANDROGÉNICOS

6.1 Generalidades

Los esteroides son moléculas policíclicas complejas que se encuentran en todas las plantas y animales, su estructura se basa principalmente en el esqueleto ciclopentanoperhidrofenantreno (Ver figura 1). Están clasificados como lípidos simples ya que no experimentan hidrólisis como las grasas, aceites y ceras. La familia de los esteroides incluye una gran variedad de compuestos [9]. Los esteroides se encuentran en las membranas de las eucariotas, y muy rara vez en las bacterias [10].

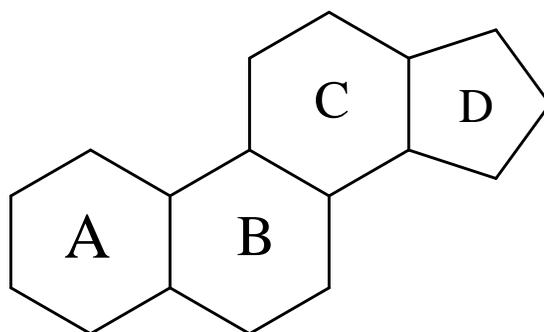


Figura 1. Estructura general de los esteroides

Los anillos de los esteroides se identifican como A, B, C y D. El colesterol contiene dos grupos metilo angulares el metilo C-19, que está unido al C-10, y el metilo C-18, unido al C-13. Los grupos metilo C-18 y C-19 del colesterol están por encima del plano que contiene los cuatro anillos. Un sustituyente que se encuentra por encima de este plano se denomina orientado en β , mientras que un sustituyente que esté por debajo de él está orientado en α . Si existe un átomo de hidrógeno unido al C-5, puede estar orientado en α o β . Cuando este átomo de hidrógeno

está orientado en α , los anillos A y B están fusionados en una conformación *Trans*, mientras que una orientación en β origina una fusión *Cis*. La ausencia del símbolo griego para el átomo de hidrógeno del C-5 del núcleo esteroideo implica una fusión *Trans*. El átomo de hidrógeno de C-5 está orientado en α en todas las hormonas esteroideas que contienen un átomo de hidrógeno en esta posición [11]. En la Figura 2 se ilustra la estructura del colesterol así como la numeración de los átomos de carbono que lo conforman.

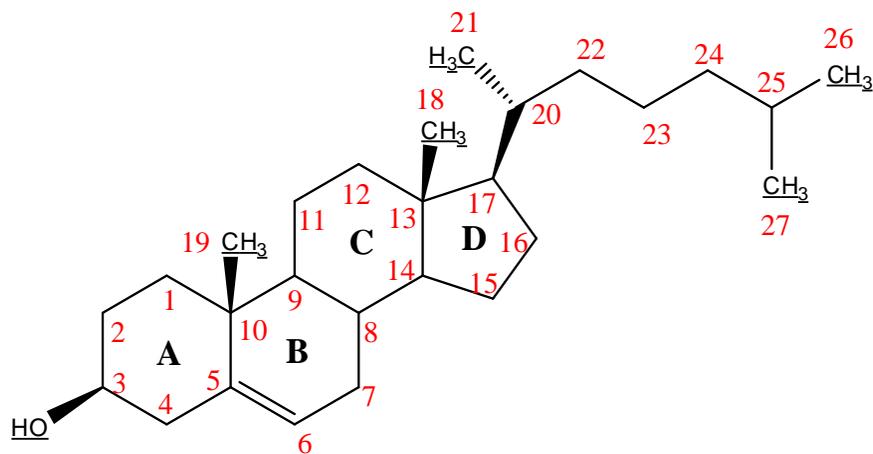


Figura 2 Estructura del colesterol y numeración de los átomos de carbono

El colesterol es el precursor de las cinco clases principales de hormonas esteroideas: progestágenos, glucocorticoides, mineralocorticoides, andrógenos y estrógenos. Estas hormonas son moléculas señal poderosas que regulan multitud de funciones en el organismo.

La progesterona, un progestágeno, prepara los revestimientos del útero para la implantación del ovulo fecundado. La progesterona también es esencial para el mantenimiento del embarazo.

Los glucocorticoides (como el cortisol) promueven la gluconeogénesis y la formación del glucógeno, aumenta la degradación de grasas y proteínas, e inhibe la respuesta inflamatoria.

Los mineralocorticoides (principalmente la aldosterona) actúan sobre los túbulos distales del riñón donde incrementa la reabsorción del Na^+ y la excreción de H^+ y K^+ , lo que provoca un aumento del volumen y la presión sanguíneos.

Los andrógenos (como la testosterona) son los responsables del desarrollo de los caracteres sexuales secundarios de tipo masculino, mientras que los estrógenos (como la estrona) son necesarios para los caracteres sexuales secundarios de tipo femenino. Los estrógenos junto con la progesterona también participan en el ciclo ovárico. Los lugares de síntesis de estas hormonas son: el cuerpo lúteo para los progestágenos; los ovarios para los estrógenos; los testículos para los andrógenos y la corteza suprarrenal para los corticoides y mineralocorticoides [11]. En la figura 3 se ilustra las rutas de biosíntesis de las hormonas esteroideas.

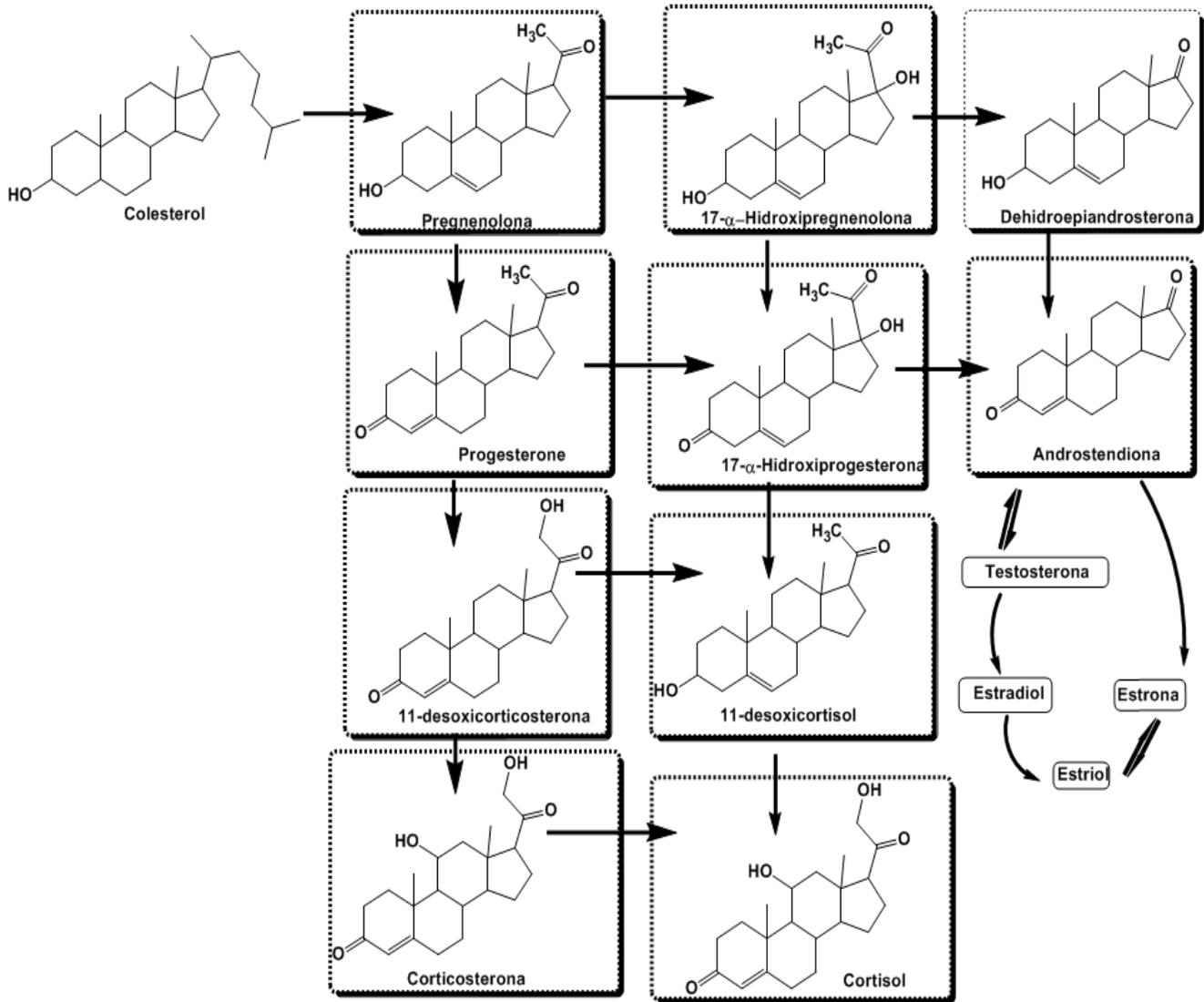


Figura 3 Biosíntesis de hormonas esteroideas [13].

La testosterona y la androsterona son las dos hormonas sexuales masculinas ó andrógenos más importantes. Los andrógenos son responsables del desarrollo de las características sexuales secundarias en los hombres, cuando estos se encuentran en la etapa de la pubertad, y desarrollan los tejidos y los músculos. Ambas se sintetizan en los testículos a partir del colesterol [12]. En la figura 4 se ilustra la estructura de la testosterona y androsterona.

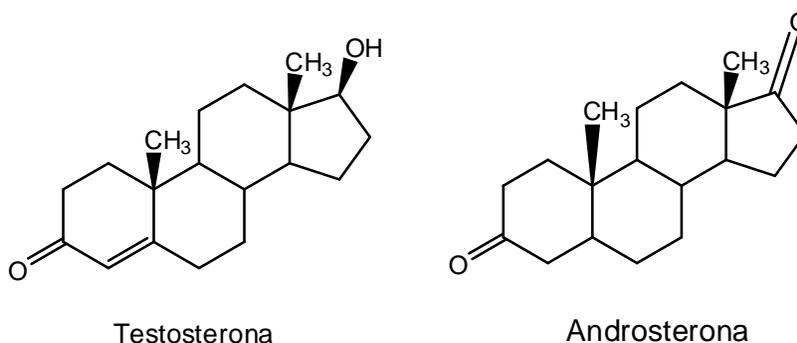


Figura 4: Estructuras de la testosterona y la androsterona

La testosterona, un esteroide de 19 átomos de carbono, es el andrógeno predominante en la mayoría de las especies de mamíferos. Los andrógenos afectan de modo directo a casi todos los sistemas corporales durante el desarrollo fetal, puberal y en la vida adulta. La diferenciación sexual del feto en mamífero requiere no solo de la información genética contenida en los cromosomas sexuales, sino también de las secreciones hormonales del testículo fetal [13].

Los esteroides anabólico androgénicos exógenos son sustancias sintéticas variantes de la testosterona. El término “anabólico” se refiere al crecimiento muscular que esas sustancias promueven, mientras que “androgénico” se refiere al aumento en las características sexuales masculinas. Los esteroides anabólicos androgénicos exógenos son variables sintéticas de la hormona masculina testosterona. Debido a que los esteroides anabólicos androgénicos exógenos se

asemejan estructuralmente a la testosterona, también imitan algunos de sus efectos.

Las compañías farmacéuticas produjeron y comercializaron por primera vez esteroides anabólicos a comienzos de los años 50 para el tratamiento de anemia general y ciertas enfermedades que destruyen el músculo esquelético, una década más tarde, algunos atletas comenzaron a utilizar esteroides anabólicos para aumentar rápidamente su masa muscular y su rendimiento [14]. En la figura 5 se representan la estructura de algunos esteroides anabólicos androgénicos.

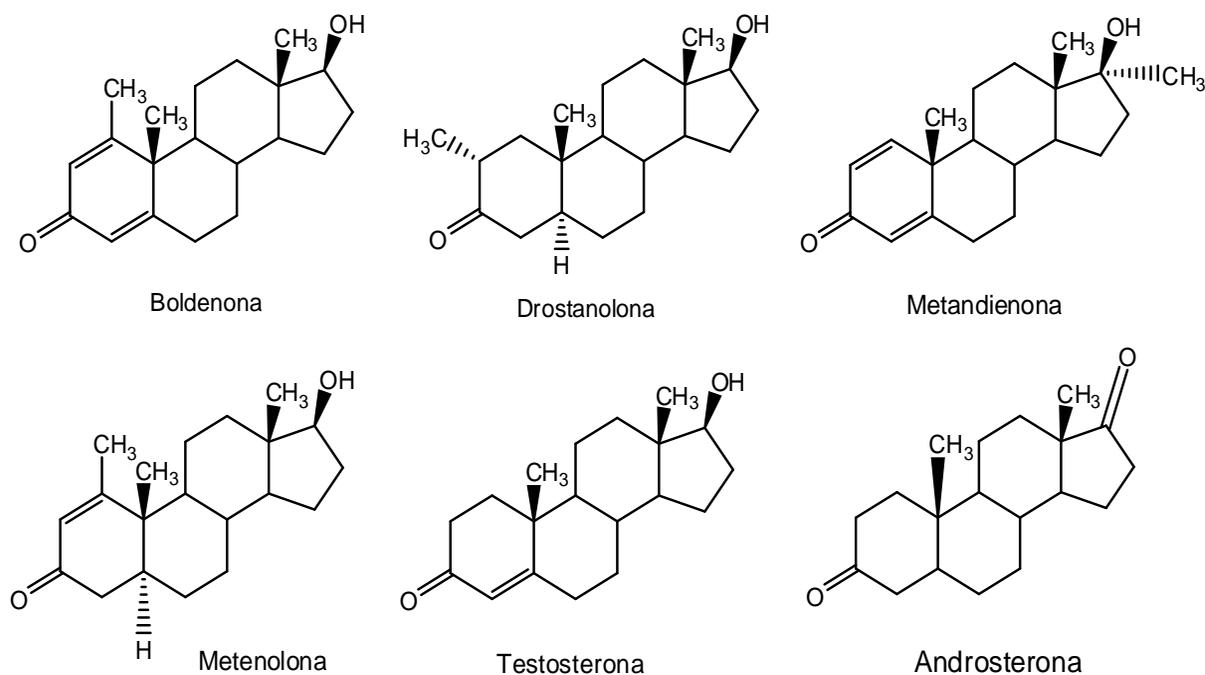
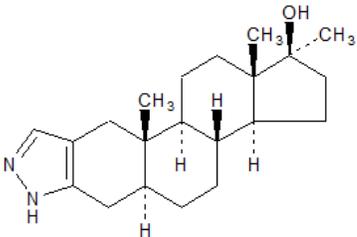
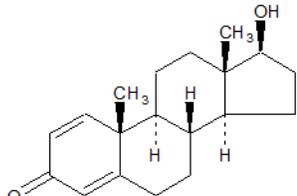
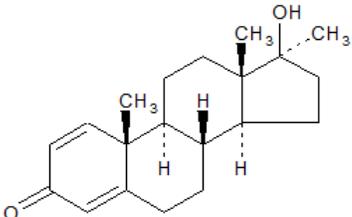
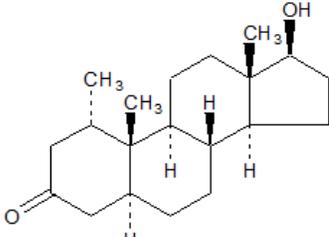
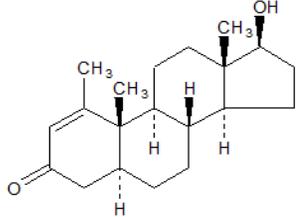
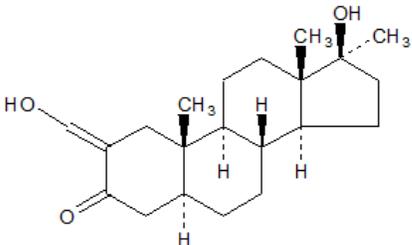
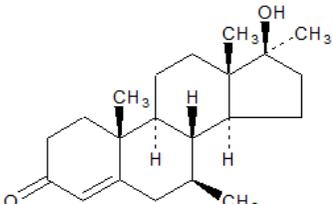
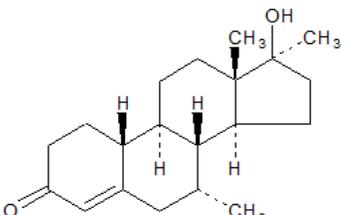
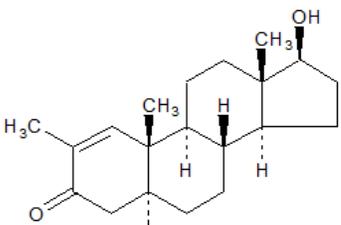
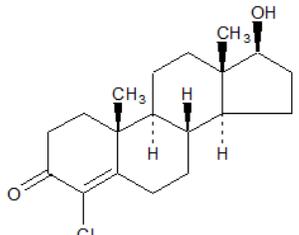


Figura 5 estructuras de esteroides anabólicos androgénicos.

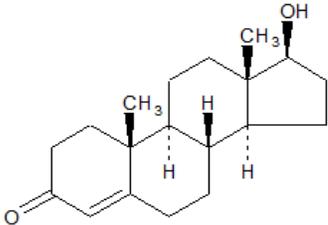
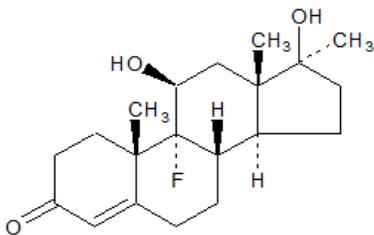
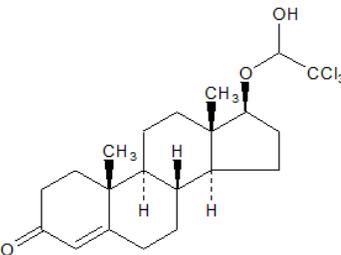
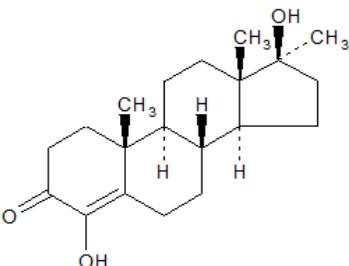
<p style="text-align: center;">ESTANOZOLOL</p> 	$C_{21}H_{32}N_2O$	328.42	<p>Cristales con punto de fusión de 229 °C a 242°C. Rotación óptica $[\alpha]_D$ +35.7° en cloroformo; $[\alpha]_D$ +48.6 en metanol.</p>
<p style="text-align: center;">BOLDENONA</p> 	$C_{19}H_{26}O_2$	286.41	<p>Cristales con punto de fusión de 164°C a 166°C Rotación óptica $[\alpha]_D$ +25° en cloroformo</p>
<p style="text-align: center;">METANDROSTENOLONA</p> 	$C_{20}H_{28}O_2$	300.43	<p>Cristales con punto de fusión de 163°C a 164° Absorción máxima UV (245nm)</p>
<p style="text-align: center;">MESTEROLONA</p> 	$C_{20}H_{32}O_2$	304.47	<p>Cristales con punto de fusión de 203.5 a 205°C. Rotación óptica $[\alpha]_D$ +17.6° en cloroformo</p>
<p style="text-align: center;">METENOLONA</p> 	$C_{20}H_{30}O_2$	302.45	<p>Cristales con punto de fusión de 160°C a 161°. Rotación óptica $[\alpha]_D$ +58.9°</p>

<p style="text-align: center;">OXIMETOLONA</p> 	<p style="text-align: center;">$C_{21}H_{32}O_3$</p>	<p style="text-align: center;">332.48</p>	<p style="text-align: center;">Cristales con punto de fusión de 178°C a 180°C. Rotación óptica $[\alpha]_D+38^\circ$ Máximo de absorción UV (285nm)</p>
<p style="text-align: center;">CALUSTERONA</p> 	<p style="text-align: center;">$C_{21}H_{32}O_2$</p>	<p style="text-align: center;">316.48</p>	<p style="text-align: center;">Cristales con punto de fusión de 127°C a 129°C. Rotación óptica $[\alpha]_D+57^\circ$ en cloroformo. Absorción máxima UV en alcohol (243 nm)</p>
<p style="text-align: center;">MIBOLERONA</p> 	<p style="text-align: center;">$C_{20}H_{30}O_2$</p>	<p style="text-align: center;">302.45</p>	<p style="text-align: center;">Polvo en forma cristalina.</p>
<p style="text-align: center;">ESTENBOLONA</p> 	<p style="text-align: center;">$C_{20}H_{30}O_2$</p>	<p style="text-align: center;">302.45</p>	<p style="text-align: center;">Cristales con punto de fusión de 155 a 158°C. Rotación óptica $[\alpha]_D+52^\circ$ en cloroformo y $[\alpha]_D^{26}+47^\circ$. Absorción máxima UV en etanol (241nm)</p>
<p style="text-align: center;">CLOSTEBOL</p> 	<p style="text-align: center;">$C_{19}H_{27}ClO_2$</p>	<p style="text-align: center;">364.91</p>	<p style="text-align: center;">Cristales con punto de fusión de 188°C a 190°C. Rotación óptica $[\alpha]_D^{20}+148^\circ$ en cloroformo</p>

6.1.1 Propiedades fisicoquímicas

En la tabla 3 se muestran las diferentes estructuras y propiedades fisicoquímicas de algunos esteroides.

Tabla 3 Propiedades fisicoquímicas de esteroides anabólicos androgénicos

NOMBRE Y ESTRUCTURA	FORMULA MOLECULAR	PESO MOLECULAR	PROPIEDADES
<p>TESTOSTERONA</p> 	$C_{19}H_{28}O_2$	288.42	<p>Polvo en forma de Cristales. Punto de fusión 155°C Rotación óptica $[\alpha]_D^{24} +109$. Soluble en alcohol, éter y otros solventes orgánicos, insoluble en agua</p>
<p>FLUOXIMESTERONA</p> 	$C_{20}H_{29}FO_3$	336.44	<p>Polvo en forma de cristales, se descompone a los 270°C. Soluble en piridina, ligeramente soluble en acetona, cloroformo, metanol. Insoluble en agua benceno y hexano. Absorción máxima en etanol (240 nm)</p>
<p>CLOXOTESTOSTERONA</p> 	$C_{21}H_{29}Cl_3O_3$	435.82	<p>Polvo en forma de cristales, con punto de fusión de 200°C a 201°C, máximo de absorción UV en etanol (241nm)</p>
<p>OXYMESTERONA</p> 	$C_{20}H_{30}O_3$	318.45	<p>Cristales con punto de fusión de 169°C a 171°C, soluble en cloroformo, etanol y acetona, insoluble en agua. Máximo de absorción UV en etanol (278 nm)</p>

6.1.2 Propiedades farmacológicas

Los esteroides anabólicos androgénicos se obtienen legalmente mediante prescripción médica para tratar ciertas afecciones que ocurren cuando el cuerpo produce una cantidad baja de testosterona, como cuando hay un retraso en la pubertad. También se administran como tratamiento en enfermedades que resultan en la pérdida de la masa muscular magra, como el cáncer y el SIDA [16]. También pueden utilizarse para tratar la osteoporosis senil y las quemaduras graves, para acelerar la recuperación de intervenciones quirúrgicas o enfermedades crónicas debilitantes. En algunos casos de endometriosis se utiliza el danazol como medicamento para su tratamiento [17].

La testosterona es ineficaz por vía oral a causa de la inactivación que sufre en el metabolismo de primer paso. La testosterona se absorbe con rapidez en hígado y otros tejidos, y se metaboliza en compuestos relativa o completamente inactivos que se excreta sobretodo en la orina pero también en las heces [17].

La esterificación de un ácido graso con el grupo hidroxilo 17β de la testosterona crea un compuesto que es más lipófilo que la testosterona. Cuando el éster, como el enantato de testosterona o el cipionato se disuelven en aceite y se administran por vía intramuscular cada dos semanas a varones hipogonadales, el éster se hidroliza y da por resultado concentraciones séricas de testosterona que varían desde mas alta que lo normal durante los primeros días después de la inyección, a normales ó bajos justo antes de la siguiente inyección. [18]

La testosterona puede administrarse mediante implantes subcutáneos o parches transdérmicos. Undecanoato de testosterona y mesterolona pueden administrarse por vía oral. Los andrógenos pueden ser modificados para potenciar sus efectos anabolizantes. Por ejemplo la nandrolona incrementa la síntesis de proteínas y

favorece el desarrollo muscular. Se utiliza en el tratamiento de la anemia plástica [19].

Cuando un esteroide, o grupo de esteroides, es administrado de forma oral o intramuscular el objetivo principal es la producción de la síntesis de proteínas. Una vez que el esteroide ha alcanzado el torrente sanguíneo penetra en la célula diana y se fija al receptor específico. Este proceso de fijación entre la hormona y su receptor específico tiene lugar en el citosol celular. La formación del complejo receptor de hormonas viaja hacia el núcleo de la célula donde se fija en segmentos específicos de ADN y estimula la transcripción del nuevo ARN mensajero. Este proceso permite que tenga lugar la nueva síntesis de proteínas. El aumento de la síntesis de proteínas conduce un aumento de la masa y a la fuerza de las células del músculo esquelético [20].

Los esteroides anabólico androgénicos se consumen por vía oral o se inyectan, generalmente en ciclos en lugar de usarse continuamente. El uso cíclico (o “*cycling*”) se refiere a un patrón de consumo en que se toman los esteroides por periodos de semanas o meses, seguidos por un periodo de descanso en que se deja de tomar el fármaco, para nuevamente volver a consumirlo después [16].

6.1.3 Efectos secundarios

El abuso de los esteroides anabólicos androgénicos puede llevar a problemas graves e incluso irreversibles para la salud. Los más peligrosos son daño al hígado, ictericia (pigmentación amarillenta de la piel, los tejidos y los fluidos corporales), retención de líquidos, presión arterial alta, aumento del colesterol presente en las lipoproteínas de baja densidad (LDL, “colesterol malo”) y disminución del colesterol presente en las lipoproteínas de alta densidad (HDL, colesterol “bueno”).

Otros efectos descritos incluyen insuficiencia renal, casos severos de acné y temblor. Además, hay algunos efectos colaterales específicos según el sexo o la edad del usuario:

- En los *hombres*: disminución del tamaño de los testículos, conteo bajo de espermatozoides, infertilidad, calvicie, desarrollo de los senos y mayor riesgo de cáncer de próstata.
- En las *mujeres*: crecimiento del vello facial, calvicie de patrón masculino, cambios o cese del ciclo menstrual, aumento en el tamaño del clítoris y engrosamiento de la voz.
- En los *adolescentes*: cese precoz del crecimiento por madurez esquelética prematura y cambios acelerados en la pubertad; riesgo de tener baja estatura el resto de sus vidas si toman esteroides anabólico-androgénicos antes de pasar por el periodo de “estiramiento” típico de la adolescencia [16].

6.1.4 Uso de esteroides anabólicos androgénicos en el deporte

Aunque el uso de esteroides para la mejora del rendimiento deportivo ha sido ilegal o prohibido por las ligas deportivas y los órganos de gobierno, en los últimos tiempos, se sabe mucho sobre cómo los atletas usan estos medicamentos.

Los esteroides androgénicos anabólicos aumentan la masa muscular, la fuerza máxima y la potencia, estos son dependientes de la dosis. Por lo tanto, se puede esperar que esos fármacos mejoren el rendimiento en actividades como el levantamiento de pesas. El empleo de esteroides androgénicos por atletas participantes en competencias de resistencia, por ejemplo carreras de larga distancia y ciclismo, no es favorable ya que no se ha demostrado que los

andrógenos mejoren los parámetros de resistencia como el umbral de lactato y el Volumen de Oxígeno máximo (VO_{2max}) [13].

Los esteroides anabólicos son el grupo de sustancias de uso más amplio por los deportistas (principalmente en las disciplinas en las que se requiere la aplicación de fuerza o potencia), las estadísticas proporcionadas por la WADA a nivel mundial muestran que tuvieron un índice de 59.4 % en 2011. Ver la **Tabla 4**.

Tabla 4. Número de sustancias prohibidas reportadas en el 2011 [21].

	Grupo de sustancias	# Muestras	% Reportes adversos
S1.	Agentes anabólicos	3,325	59.4
S6.	Estimulantes	718	12.8
S8.	Canabinoides	445	7.9
S5.	Diuréticos y otros agentes enmascarantes	368	6.6
S9.	Glucocorticoides	274	4.9
S3.	β – 2 Agonistas	225	4.0
S2.	Hormonas y sustancias relacionadas	125	2.2
S4.	Hormonas antagonistas y moduladores	70	1.3
P2.	β -Bloqueadores	21	0.4
S7.	Narcóticos	20	0.4
P1.	Alcohol	5	0.1
M2.	Manipulación física y química	3	0.1
M1.	Acarreadores de oxígeno	1	0.02

6.2 Biosíntesis y metabolismo

Los testículos cumplen dos funciones aparentemente separadas, pero estrechamente vinculadas. La primera está relacionada con la espermatogénesis en la que las células germinales, por proceso de división y maduración, dan lugar a espermatozoos, proceso que se realiza en los túbulos seminíferos, la segunda función es hormonal y se cumple a través de las células intersticiales (de Leydig) cuya producción de testosterona, fundamentalmente, crea y mantiene los caracteres sexuales secundarios propios del varón. Las células de Leydig del testículo, al igual que otros tejidos productores de hormonas esteroideas como la corteza suprarrenal, el folículo, cuerpo lúteo o estroma ovárico, contienen los organelos intracelulares y sistemas enzimáticos necesarios para sintetizar esteroides a partir de estructuras químicas simples, o biotransformar estructuras esteroides para la síntesis de andrógenos principalmente.

El colesterol es precursor obligado y factor limitante en la síntesis, ya que es necesaria la hidroxilación de los carbonos 20 y 22 para eliminar una cadena de 7 carbonos mediante una desmolasa específica, resultando así la formación de 5-pregnenolona [22] La conversión del colesterol en testosterona puede producirse a través de dos vías biosintéticas la vía $\Delta 5$ y la vía $\Delta 4$. En el testículo humano predomina la vía $\Delta 5$, que conlleva escisión de la cadena lateral de la pregnolona, reducción del grupo 17-ceto y oxidación del anillo A.

La testosterona se metaboliza principalmente en el hígado (del 50 al 70%) aunque también se produce alguna degradación en los tejidos periféricos, sobretodo en la próstata y la piel. El hígado capta la testosterona desde la sangre y a través de una serie de reacciones químicas en las que participan reductasas 5α y 5β , hidroxiesteroide deshidrogenasas 3β , 3α y 17 hidroxiesteroide deshidrogenasa, la convierten en androsterona y eticolanolona (ambos metabolitos inactivos) y en DHT y androstendiol. Esas sustancias experimentan glucuronidación o sulfatación antes de su excreción por los riñones. La androsterona y la eticolanolona libres y

conjugadas son los metabolitos urinarios predominantes de la testosterona. [13].
En la **figura 6** se muestra la biosíntesis de testosterona.

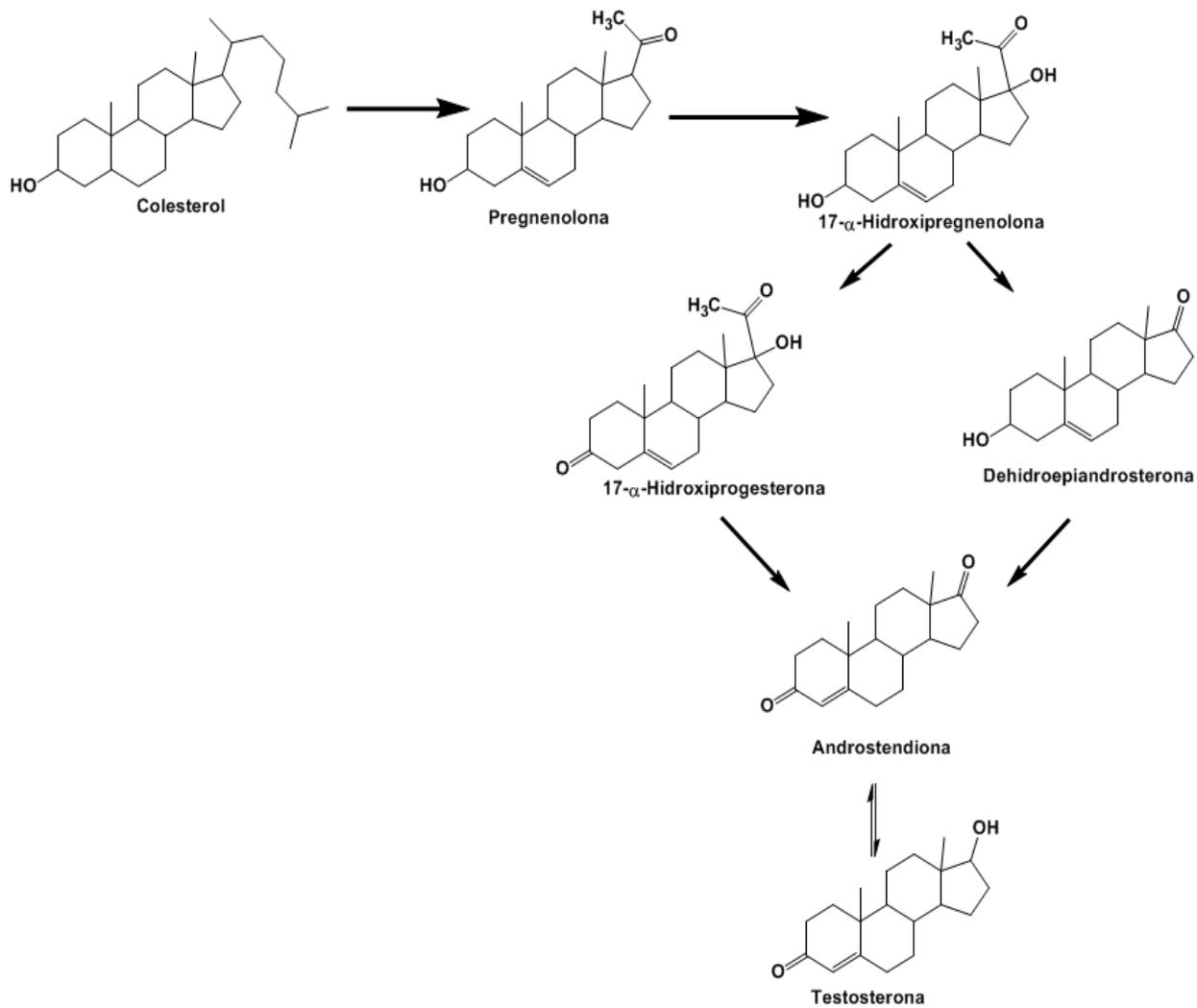


Figura 6 Biosíntesis de testosterona [23]

7. TÉCNICAS ANALÍTICAS UTILIZADAS EN EL ANÁLISIS DE ESTEROIDES ANABÓLICOS ANDROGÉNICOS

Aunque inicialmente se utilizaron técnicas de radioinmunoanálisis para detectar esteroides anabólicos androgénicos en muestras de orina, los laboratorios acreditados han utilizado desde 1981 la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para detectar este tipo de sustancias.

En algunos casos la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (HPLC/MS por sus siglas en inglés), ha sido útil para detectar esteroides androgénicos que muestran una mala detección por cromatografía de gases o que son termolábiles. Aunado a esto, desde finales de 1990, la introducción de la espectrometría de masas de alta resolución (HRMS por sus siglas en inglés) y la Espectrometría de masas en tándem (MS/MS por sus siglas en inglés), como por ejemplo la trampa de iones, han mejorado más la sensibilidad de las técnicas de detección de esteroides androgénicos [13].

En los Estándares Internacionales de Laboratorio, en el numeral 5.2.4.3.1.2 se establecen las alternativas analíticas utilizadas para la detección de sustancias prohibidas, a los cuales se refiere de la siguiente forma: La cromatografía de gases o cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas, es el método preferente para confirmar la presencia de sustancias prohibidas, metabolitos de una sustancia prohibida o de marcadores del uso de una sustancia o método prohibido. Los métodos de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas o cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas son aceptables tanto para los procedimientos de detección como para los procedimientos de confirmación con respecto a un analito concreto [24].

Para la detección de testosterona administrada de forma exógena se ha utilizado el análisis de la relación testosterona/epitestosterona (T/E), cuantificado con la técnica de cromatografía de gases con celda de combustión acoplado a un espectrómetro de masas de relaciones isotópicas (GG-C-IRMS, por sus siglas en inglés) [13].

7.1 Cromatografía

7.1.1 Generalidades

Michael Tswett un científico ruso, informó en 1906 acerca de la separación de los componentes de diferentes colores procedentes de hojas, al hacer pasar un extracto de estas, a través de una columna de carbonato de calcio, alumina y sacarosa. Acuñó el término cromatografía con las palabras griegas que significan “color” y “escribir”. En la actualidad se interpreta la cromatografía como la separación de componentes de una muestra al distribuirse entre dos fases.

La cromatografía es un método fisicoquímico de separación, en el que los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una estacionaria y otra móvil, en una dirección definida. La fase estacionaria suele estar en una columna, pero puede tener otras formas, soporte plano [25].

Las separaciones se consiguen a través de una gran variedad de técnicas, con bases moleculares muy claramente bien definidas: por ejemplo, se puede conseguir la separación de los elementos de una muestra sobre la base de sus cargas eléctricas (cromatografía iónica), de su polaridad (cromatografía de adsorción), de su tamaño (cromatografía de exclusión molecular), por su afinidad a otras moléculas (cromatografía de afinidad), de su solubilidad en diferentes disolventes (cromatografía de reparto) e, incluso, de la disposición espacial de los enlaces (cromatografía quiral) [26].

Hay dos clases de cromatografía de gases: cromatografía de gas-sólido y cromatografía de gas-líquido. De ellas, la más importante es la cromatografía de gas líquido, utilizando columnas capilares [25].

7.2 Cromatografía de gases

En cromatografía de gases, la muestra pasa al estado de vapor (si no es ya gaseosa) inyectándola a un puerto calentado, y el eluyente es un gas (el gas acarreador). En general, la fase estacionaria es un líquido no volátil soportado en una pared capilar con partículas sólidas inertes. Hay una gran cantidad de fases líquidas disponibles, y cambiando la fase líquida y no la fase móvil es como se logran diferentes separaciones

La muestra se inyecta rápidamente con una microjeringa hipodérmica a través de un tapón septum de goma de silicona y pasa a la columna. El puerto de inyección de muestra, la columna y el detector se calientan a temperaturas a las que la muestra tenga una presión de vapor mínima de 10 torr, usualmente a unos 50°C por arriba del punto en el que hierve el soluto con mayor punto de ebullición. El puerto de inyección y el detector se suelen mantener un poco más calientes que la columna para evaporar rápidamente la muestra líquida y evitar que esta se condense en el detector.

La separación se efectúa a medida que los componentes del vapor se equilibran con el gas acarreador y la fase estacionaria. El gas acarreador es un gas químicamente inerte que debe encontrarse en forma pura, como, helio o nitrógeno. Un gas muy denso tiene mejor eficiencia porque su difusividad es menor, pero un gas de baja densidad permite mayores velocidades. [25].

Es analizable por cromatografía de gases compuestos con un punto de ebullición inferior a 250 °C. Una limitación adicional a la del punto de ebullición es que la sustancia debe ser estable en estado gaseoso y no pirolizarse (romperse por acción del calor). A veces se puede recurrir a la derivatización, es decir, someter al analito a una reacción química que lo transforme en un compuesto analizable por cromatografía de gases.

La derivatización tiene dos finalidades:

- 1) transformar el analito en compuesto volátil y/o
- 2) transformar el analito en compuesto que cause una mayor señal en el detector.

El gas portador debe cumplir dos propósitos:

- 1) arrastrar los analitos por el interior de la columna y,
- 2) proporcionar una matriz adecuada al detector.

Los gases comúnmente utilizados en cromatografía de gases son Helio, Nitrógeno e Hidrógeno. Los requisitos que debe cumplir son: a) debe ser inerte, es decir no debe reaccionar con la muestra; b) debe ser fácil de adquirir y con un alto grado de pureza [26].

Los dos tipos de columnas que se usan en cromatografía de gases son las columnas empacadas y las columnas capilares. Las columnas empacadas fueron el primer tipo, y se usaron durante muchos años. En la actualidad, se usan más las columnas capilares, aunque las columnas empacadas se siguen usando en aplicaciones que no requieren grandes resoluciones, o cuando es necesaria mayor capacidad [25].

Las columnas capilares poseen diámetros internos menores de 1 mm. La longitud oscila entre los 25 m y 100 m. la columna es habitualmente de sílice fundida y sus paredes internas están recubiertas de una película de fase estacionaria, mientras que las externas lo están de poliimida, compuesto que le otorga mayor flexibilidad. La eficacia cromatográfica de estas columnas ronda los 200000 platos teóricos.

El parámetro que define las columnas capilares es la denominada proporción de fase, que relaciona el diámetro del capilar con el espesor de la película de fase estacionaria. Así si r es el diámetro interno de la columna y d_p es el grosor de la película, la proporción de fase de la columna vendría definida por la relación:

$$\beta = r / 2d_p$$

El parámetro β ayuda a determinar el tipo de columna necesaria para separar analitos. Así, columnas con bajos valores de β son útiles para compuestos de bajo peso molecular y apolares, ya que se requiere mayor volumen de gas para retardar estos compuestos tan fácilmente eluibles [26].

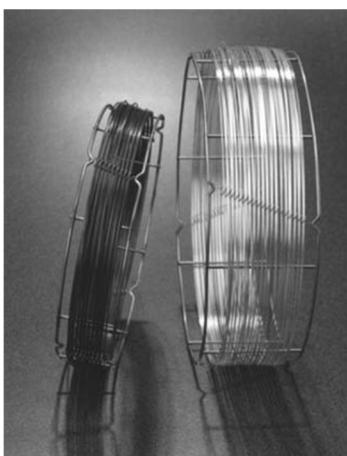
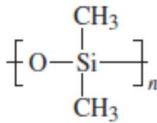
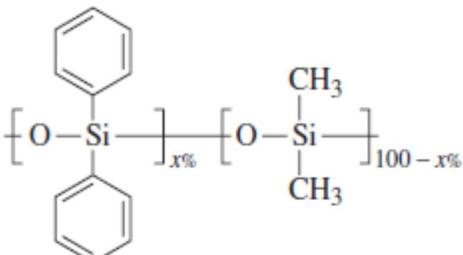
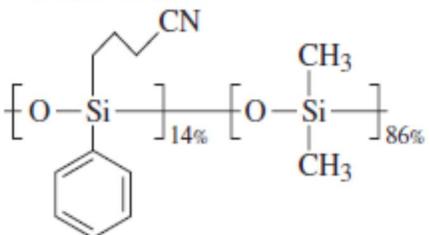
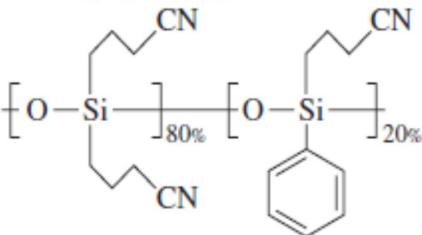
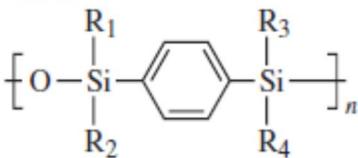
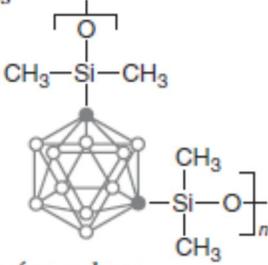
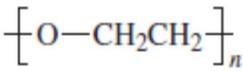


Figura 8 Columnas capilares para cromatografía de gases [25]

La temperatura en la columna es una variable importante que se tiene que regular hasta unas décimas de grado en el caso de un trabajo preciso. Por lo consiguiente la columna se debe alojar dentro de un horno con temperatura controlada. La temperatura óptima de la columna depende del punto de ebullición de la muestra y del grado de separación requerido. En la tabla 5 se muestran diferentes tipos de fase estacionaria de columnas capilares y sus temperaturas máximas [27].

Tabla 5: Fases estacionarias utilizadas en cromatografía de gases [27]

Fase	Polaridad	Uso	Temperatura máxima
Dimetil polisiloxano 100% 	No polar	Hidrocarburos, compuestos aromáticos, polinucleares, policlorobencenos	320
Difetil, dimetil polisiloxano 	5% baja 35%, 65% intermedia 65%,35% intermedia	Plaguicidas	320 300 370
14% cianopropilfenil-86% dimetilsiloxano 	intermedia	Separación de plaguicidas organoclorados mencionados en los métodos 608 y 8081 de EPA. Susceptibles a daños por humedad u oxígeno	280
80% Biscianopropil-20% cianopropilfenil polisiloxano 	Muy polar	Ácidos libres, ácidos grasos, polisaturados, alcoholes. Evite disolventes polares como agua y metanol	275

<p>Arilenos</p> 	<p>Varia la polaridad al variar R</p>		<p>300-350</p>
<p>Carboranos</p>  <p>círculos vacíos = boro círculos llenos = carbono</p>	<p>Varia la polaridad al variar R</p>		<p>430</p>
<p>Poli(etilenglicol) (Carbowax)</p> 	<p>Muy polar</p>	<p>Alcoholes, aldehídos, cetonas y separación de isómeros aromáticos, como xilenos</p>	<p>250</p>

El inyector es la zona del cromatógrafo en donde se introduce la muestra en la columna y vaporiza los compuestos de la misma para que se puedan analizar. Para que las separaciones sean eficaces, reproducibles y los picos tengan una buena resolución la inyección se debe realizar en el menor tiempo posible. A su vez, para que la evaporación sea eficaz, la temperatura del inyector debe ser superior a la del punto de ebullición del disolvente y si es posible también a la de los analitos [26].

Con el fin de tener una alta eficiencia en la columna se requiere que la muestra sea de un tamaño adecuado y que se introduzca como un “tapón” de vapor, la inyección lenta o muestras demasiado grandes causan dispersión de las bandas y una mala resolución. Las microjeringas calibradas, se utilizan para inyectar muestras líquidas, a través de un diafragma de silicón (septum), en una cámara caliente especial para la muestra que se ubica en la cabeza de la columna. La

cámara de la muestra esta casi siempre a unos 50 °C por encima del punto de ebullición del componente menos volátil de la muestra [27].

Para controlar mejor la reproducibilidad de las inyecciones habitualmente se adapta un inyector automático, gracias al cual los movimientos de la jeringa se automatizan, asociado a un carrusel portamuestras, así es posible programar secuencias cíclicas de toma de muestra, introducción muy rápida en el inyector (0,2 s) y enjuagado de la jeringa.

Una técnica conocida como headspace (espacio de cabeza) de la que existen dos variantes, estática y dinámica, esta muy extendida en cromatografía de gases para el análisis cuantitativo de los constituyentes volátiles de muestras.

El headspace (espacio cabeza) es un dispositivo de extracción que funciona en tándem con un equipo de cromatografía de gases que se aplica al análisis de compuestos volátiles presentes en una matriz sólida o líquida. Esta técnica puede tener dos variantes, estática y dinámica.

En el modo estático: la muestra se introduce en un pequeño recipiente cerrado (sin llenarlo) por un tapón perforable. Tras un periodo de equilibrado termodinámico entre las fases presentes, se toma un poco del vapor en equilibrio. En estas condiciones la cantidad de cada compuesto volátil en el volumen de espacio de cabeza es proporcional a su concentración en la matriz. Después del ajuste (por un patrón interno) es posible hacer corresponder las concentraciones reales en la muestra con las de los vapores inyectados en el cromatógrafo.

En el modo dinámico en lugar de usar un recipiente cerrado se hace pasar primero un gas portador; como el helio, bien a nivel de superficie o bien haciendo burbujear la muestra, para arrastrar los componentes volátiles hacia una trampa

donde son adsorbidas y concentradas. Posteriormente se produce una desorción térmica de la trampa para su inyección en el cromatógrafo. Esta técnica, designada por purga y trampa es semicuantitativa [28].

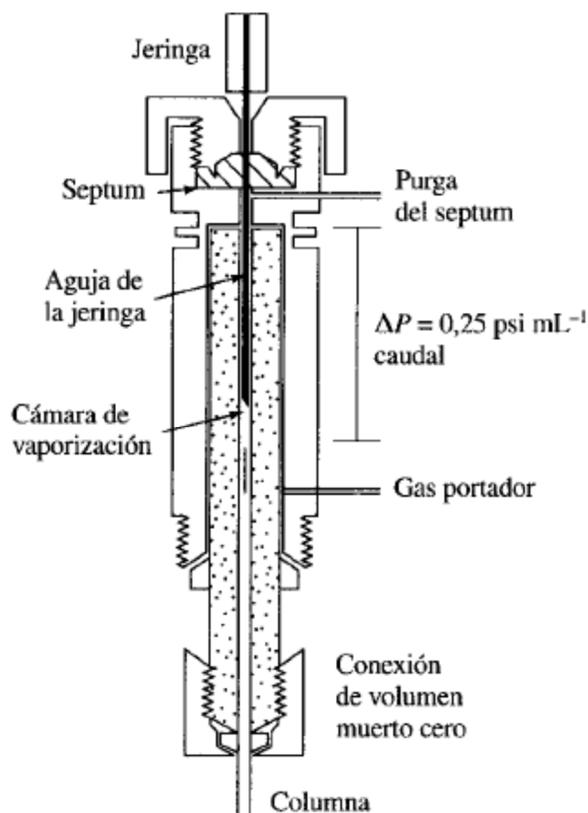


Figura 9 Inyector de cromatógrafo de gases [27]

A partir de los primeros experimentos con la cromatografía de gases se han desarrollado diferentes tipos de detectores. Algunos de ellos fueron diseñados para responder a la mayor parte de los compuestos en general, otros para ser selectivos hacia determinados tipos de sustancias. En la tabla 6 se mencionan diferentes detectores utilizados en cromatografía de gases.

Tabla 6 Detectores utilizados en cromatografía de gases [25]

DETECTOR	APLICACIÓN	INTERVALO DE SENSIBILIDAD	LINEALIDAD	OBSERVACIONES
Conductividad térmica	General responde a todas las sustancias	5-100 ng, 10 ppm-100%	Buena, excepto termistores a mayores temperaturas	Sensible a cambios de temperatura y flujo; sensible a la concentración de los analitos.
Ionización de flama	Todas las sustancias orgánicas.	10-100 pg 10ppb 99%	Excelente hasta 10^6	Requiere flujo muy estable de gas
Fotométrico de flama	Compuestos de azufre (393 nm) Compuestos de fósforo (526 nm)	Muy buena 10 pg de azufre y 1 pg de fósforo	Excelente	
Termoiónico de flama	Todos los compuestos nitrogenados y fosforados	Excelente	Excelente	Se debe recubrir la malla con sales de sodio; sensible a la masa
Perla de silicato de rubidio	Específicos para sustancias nitrogenadas y fosforadas	Excelente	Excelente	Sensible a la masa

Ionización de argón (rayos β)	Todas las sustancias orgánicas, con He como gas acarreador	Muy buena; 0.1-100 ng, 0.1-100ppm,	Buena	Muy sensible a las impurezas y al agua necesita gas acarreador muy puro; sensible a la concentración
Captura de electrones	Todas las sustancias que tienen afinidad para capturar electrones; no responde a hidrocarburos alifáticos ni nafténicos.	Excelente para sustancias halogenadas 0.05-1pg, 50ppt-1ppm	Pobre	Muy sensible a impurezas y cambios de temperatura; análisis cuantitativo complicado; sensible a la concentración.
Espectrometría de masas	Casi todas las sustancias, depende del método de ionización	Excelente	Excelente	Puede suministrar información estructural y de peso molecular

7.3 Espectrometría de masas

El fenómeno de la deflexión de los iones en campos eléctricos o magnéticos fue propuesto inicialmente por Wien, en 1897. Empleando este principio, Thomson en 1912 y Aston en 1919 llevaron a cabo algunos experimentos de identificación y cuantificación de isótopos. No obstante, a mediados de la década de 1930 comenzó a disponerse de un espectrómetro de masas para uso general [29].

La espectrometría de masas (MS por sus siglas en inglés) es un método de análisis que se basa en la determinación de especies atómicas o moleculares

individuales de la muestra analizada lo que permite recabar información sobre su naturaleza, su composición y de igual modo sobre su estructura [28].

Para obtener un espectro de masas las moléculas gaseosas o las especies desorbidas de fases condensadas se ionizan, los iones se aceleran en un campo eléctrico y a continuación se separan según su relación masa carga (m/z) [30]. Un espectrómetro de masas mide la relación masa carga (m/z). En la mayoría de los casos los iones formados en espectrometría de masas tienen carga 1, por lo que su relación m/z es numéricamente igual a la masa molecular del ión formado, pero no siempre es así [26].

Las tres partes básicas de un espectrómetro de masas son: La fuente de ionización, es la zona del espectrómetro en donde las moléculas del analito son aceleradas y ionizadas. El analizador y el transductor/detector estas dos secciones del espectrómetro son las que separan los iones de distinta masa y posteriormente amplifican la señal y la transforman en una señal de salida. Un espectrómetro se mantiene a una presión entre 10^{-3} y 10^{-7} torr. La muestra puede introducirse tanto en fase gaseosa como en fase sólida o líquida (siempre que se evaporen los líquidos y se sublime a los sólidos) [31]. En la Figura 10 Se esquematiza los elementos que conforman un espectrómetro de masas

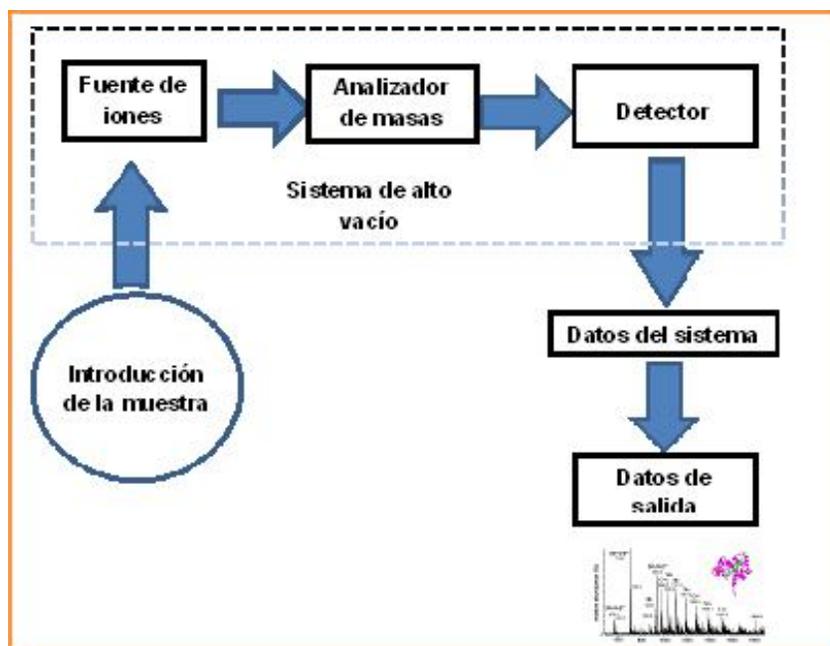


Figura 10 Componentes de un espectrómetro de masas

En espectrometría de masas siempre hay alguna forma de energía que es transferida a las moléculas para realizar el proceso de ionización. Un ejemplo es la electroionización o impacto electrónico en donde la fuente de iones es sencilla, los electrones son emitidos por un filamento caliente de wolframio o de renio y se les acelera mediante la aplicación de aproximadamente 70 V entre el filamento y el ánodo [27]. En las figuras 11 se esquematiza diferentes patrones de fragmentación de moléculas y en la figura 12 se muestra un espectro de masas del diclorometano.

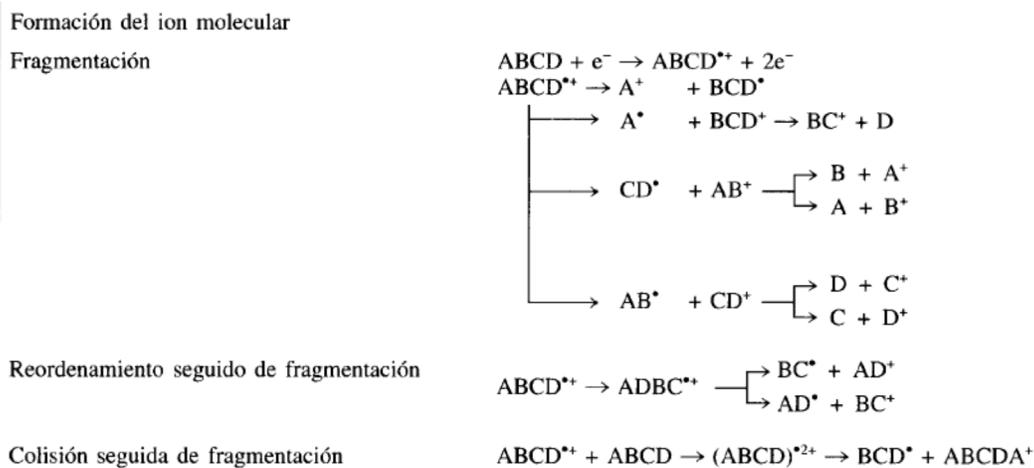


Figura 11 Patrones de fragmentación del analito [27]

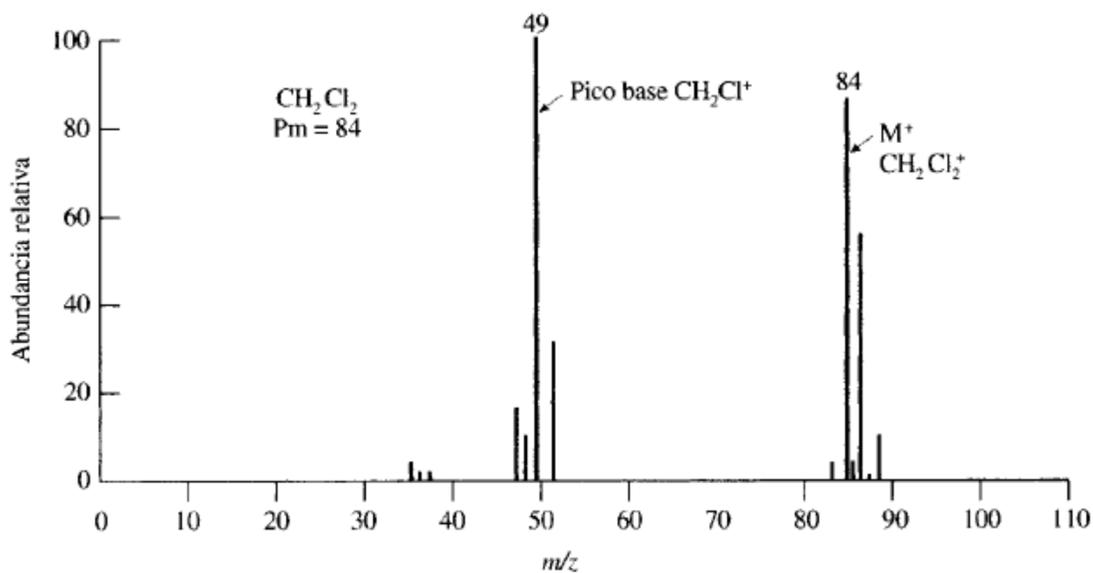


Figura 12 Espectro de masas del diclorometano [27]

En la **Tabla 7**, se presenta un resumen de los diferentes tipos de componentes en un espectrómetro de masas.

Tabla 7 Componentes del espectrómetro de masas [26]

Componente	Opciones
Introducción de la muestra	Directa
	Desorción/Ionización Asistida por Laser MALDI
	Acoplado a GC
	Acoplado a HPLC
	Electroforesis capilar
	Plasma de acoplamiento inductivo
Fuente de ionización	Impacto electrónico (EI)
	Ionización química
	Electrospray a presión atmosférica (API-ES)
	Ionización química a presión atmosférica
	Desorción por láser
Analizador	Sector magnético
	Doble sector (doble enfoque)
	Tiempo de vuelo
	Cuádruplo
Detector	Dínodo continuo
	Dínodo discontinuo

7.4 El acoplamiento de la cromatografía de gases y la espectrometría de masas

En las diferentes ramas de las ciencias químico- biológicas uno de los aspectos de interés es la identificación y determinación de compuestos. Uno de los detectores

más potentes para cromatografía de gases es el espectrómetro de masas. La tasa de flujo procedente de las columnas capilares es tan baja que la salida de la columna se puede alimentar de manera directa a la cámara de ionización del espectrómetro de masa [27]. El acoplamiento de un detector de espectrometría de masas a un sistema de separación cromatográfico constituye una herramienta que permite que se resuelvan con las suficientes garantías los problemas de identificación y cuantificación de diferentes sustancias. En efecto cuando los detectores de masas por impacto electrónico operan en modo SCAN proporcionan una información espectral muy precisa sobre la identidad del producto, y cuando operan en modo (SIM modo selectivo de iones por sus siglas en inglés) proporciona una excelente sensibilidad con una alta especificidad, lo que posibilita el análisis cuantitativo [32].

Las fuentes de ionización más comunes en GC/MS son la ionización por electroionización o impacto electrónico y la ionización química [27]. En la figura 13 se esquematiza de forma general el acoplamiento del cromatógrafo de gases con el espectrómetro de masas.

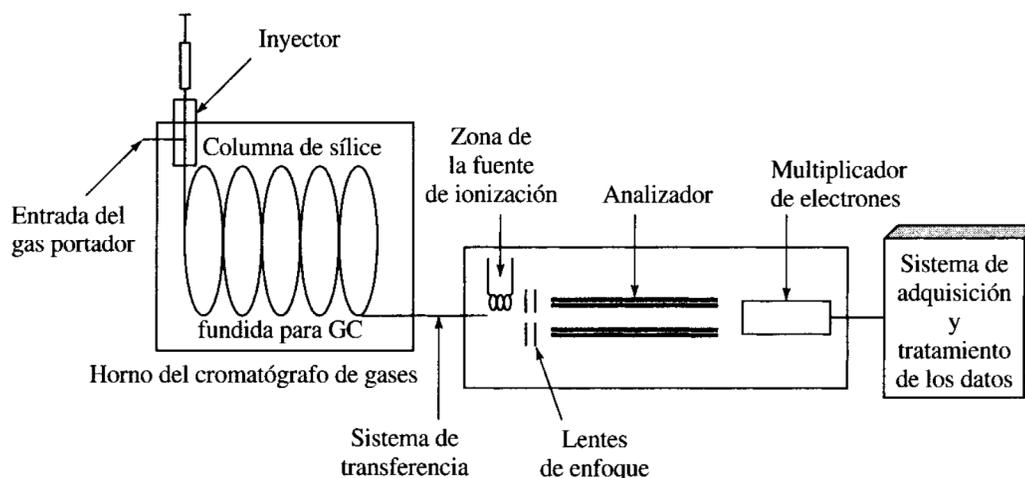


Figura 13 esquematización general del cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas [27]

7.5 Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas con analizador tipo cuádruplo simple

El analizador de masas tipo cuadrupolar es el analizador de uso más generalizado para su acoplamiento a HPLC y GC. El cuádruplo se construye a partir de cuatro barras metálicas de la misma longitud y diámetro alineadas paralelamente entre sí, estas barras suelen ser de acero inoxidable o molibdeno y, a veces, se recubren de cerámica para proteger el elemento de la corrosión [26].

El analizador de masas cuadrupolar es un “filtro de masas” que sólo permite el paso de iones específicos. Consiste en cuatro varillas metálicas paralelas a las que se aplica al mismo tiempo un voltaje de cd (U) y un voltaje oscilante de radiofrecuencia ($V \cos \omega t$, donde ω es la frecuencia y el tiempo). Dos polos opuestos se cargan de modo positivo y los otros dos en forma negativa, y sus polaridades cambian durante el análisis. Los voltajes aplicados son $U+V \cos \omega t$ y $-(U - V \cos \omega t)$. Estos voltajes determinan la trayectoria de los iones mediante la trayectoria de vuelo entre los cuatro polos.

Cuando los iones procedentes de la fuente de ionización entran al campo de radiofrecuencia a lo largo del eje z de los electrodos, oscilan con respecto a ese eje. Sólo los que tienen determinada relación de masa/carga resuenan a lo largo del campo y tendrán una trayectoria estable hacia el detector. Otros, los que no resuenan, son deflectados (trayectoria inestable), y colisionarán con los electrodos y se perderán (se filtran y eliminan). Al variar rápidamente los voltajes, los iones de una masa tras otra tomarán la trayectoria estable y serán recolectados por el detector. Se hace variar ω manteniendo constantes U y V , o bien se hacen variar U y V manteniendo constante U/V . El analizador cuadrupolar tiene varias ventajas que lo hacen ideal para gases-masas. La trayectoria no depende de la energía cinética (es decir, de la velocidad) ni de la deflexión angular de los iones que entran; entonces, la rapidez de transmisión es alta. Como sólo se requiere un

cambio de voltaje, un barrido completo puede ser muy rápido. Se pueden registrar hasta ocho espectros por segundo sobre un intervalo aproximado de 800 unidades de masa. Se necesita un barrido rápido para monitorear los máximos de cromatografía que pueden tener una fracción de segundo de ancho. Se puede alcanzar una resolución de unos 1 500, y los sistemas de cromatografía de gases suelen proporcionar resolución unitaria. En la figura 13 se puede observar las partes que constituyen un cuádruplo así como la trayectoria que siguen los fragmentos de las moléculas ionizadas en un espectro de masas [25].

La detección de esteroides anabólicos androgénicos y de sus productos metabólicos se ha logrado analizar mediante sistemas de GC-MS convencionales que contienen analizadores individuales de masas de cuádruplo. El uso del modo selectivo de iones (SIM por sus siglas en inglés) de los fragmentos de iones más abundantes, característicos y / o específicos de los compuestos de interés, ha permitido la detección y cuantificación de esteroides anabólicos androgénicos, para la detección de algunos de ellos se requiere límites de detección de hasta 2 ng/mL [29].

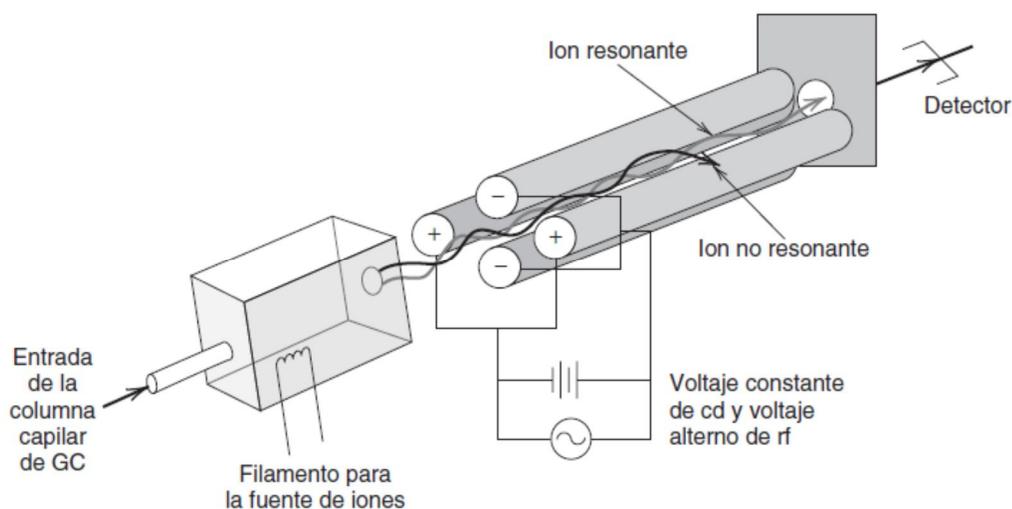


Figura 13 Imagen general de un analizador tipo cuádrupolar [26]

En la figura 14 y 15 se observan los espectros de masas de diversos esteroides anabólicos androgenicos en su forma derivatizada (TMS-derivados) obtenidos con un equipo de GC/MS tipo cuadrupolar.

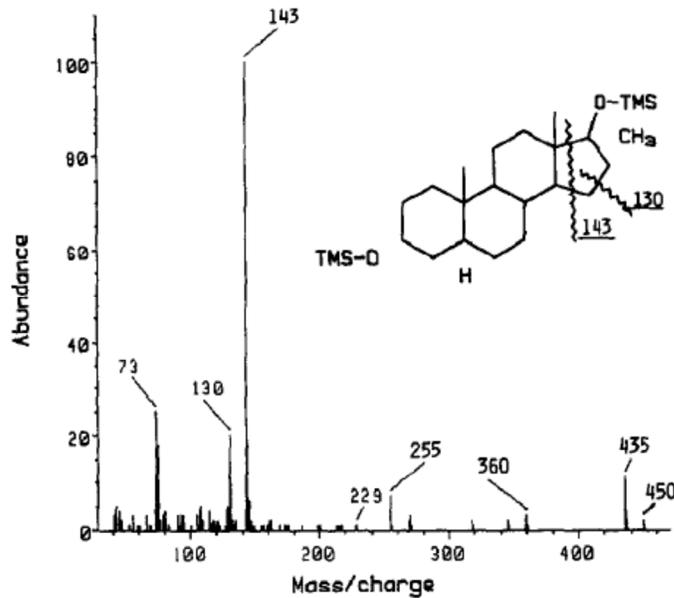


Figura 14 espectro de masas de 17 α -metil-5 α -androstene-3 α ,17 β -diol bis-TMS [33]

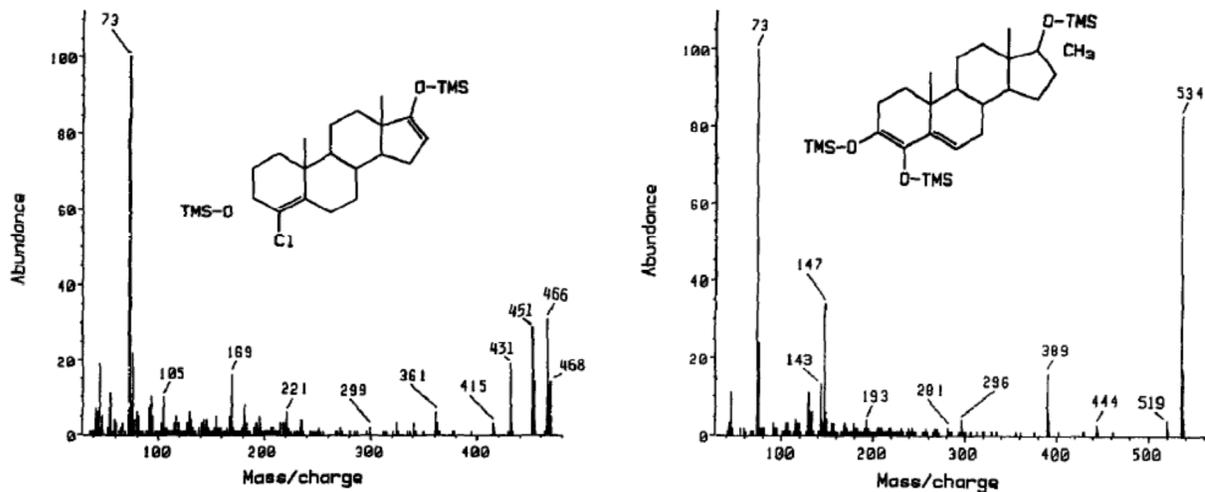


Figura 15 a la derecha espectro de masas de 4-clorandrost-4-en-3 α -ol-17-ona bis-TMS. A la izquierda espectro de masas de la oximesterona tris-TMS [33]

7.6 Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas en tándem

Un espectrómetro de masas en tándem es un espectrómetro de masas con más de un analizador (normalmente en la práctica dos). El acoplamiento de dos analizadores de masas se usa en la identificación de estructuras complejas de compuestos. Los dos analizadores están físicamente separados por una cámara de fragmentación situada entre ambos. Esta cámara de fragmentación contiene un gas inerte que bombardea los iones que entran en la cámara produciendo nuevas fragmentaciones [26]. La principal ventaja de la espectrometría de masa en tándem reside en el análisis directo de mezclas debido a su gran espectro de masas, alta resolución y extrema sensibilidad [29].

Los niveles mínimos de desempeño para la detección de sustancias prohibidas (MRPL por sus siglas en inglés) es un parámetro analítico de rendimiento técnico con el que los laboratorios deberán cumplir al comprobar la presencia de una sustancia prohibida particular, su(s) metabolito (s) o marcador (s). El MRPL no es un límite de detección o límite de cuantificación [34]. Debido a que los laboratorios acreditado por la agencia mundial antidopaje deben cumplir con métodos validados y que cumplan con los MRPL es que se han ido incorporando equipos con una alta sensibilidad como lo son los espectrómetros de masas en tándem [35].

Para los esteroides anabólicos androgénicos el MRPL es de 5 ng/mL, para metandienona (y su metabolito, 17β -methyl- 5β -androst-1-ene- 3α , 17α -diol), metiltestosterona (metabolito 17α -methyl- 5β -androstane- 3α , 17β -diol) y estanozolol (metabolito 3'-hydroxystanozolol) el MRPL es de 2 ng/mL y para clenbuterol es de 0.2 ng/mL [34].

En la Figura 16, se muestra los componentes de un espectrómetro de masas triple cuádruplo y en la figura 17 se observa el templete de espectros de masas de esteroides anabólicos androgenicos analizados por espectrometría de masas en tándem (triple cuádruplo).

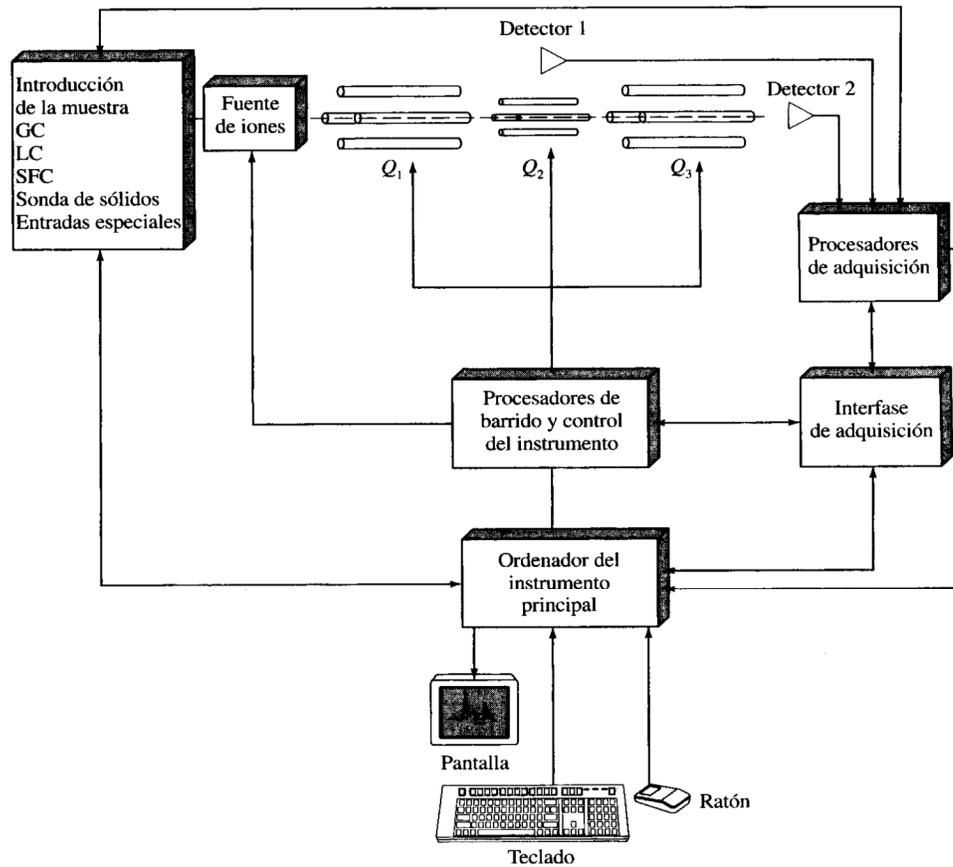


Figura 16. Imagen de un espectrómetro de masas 3Q.[27]

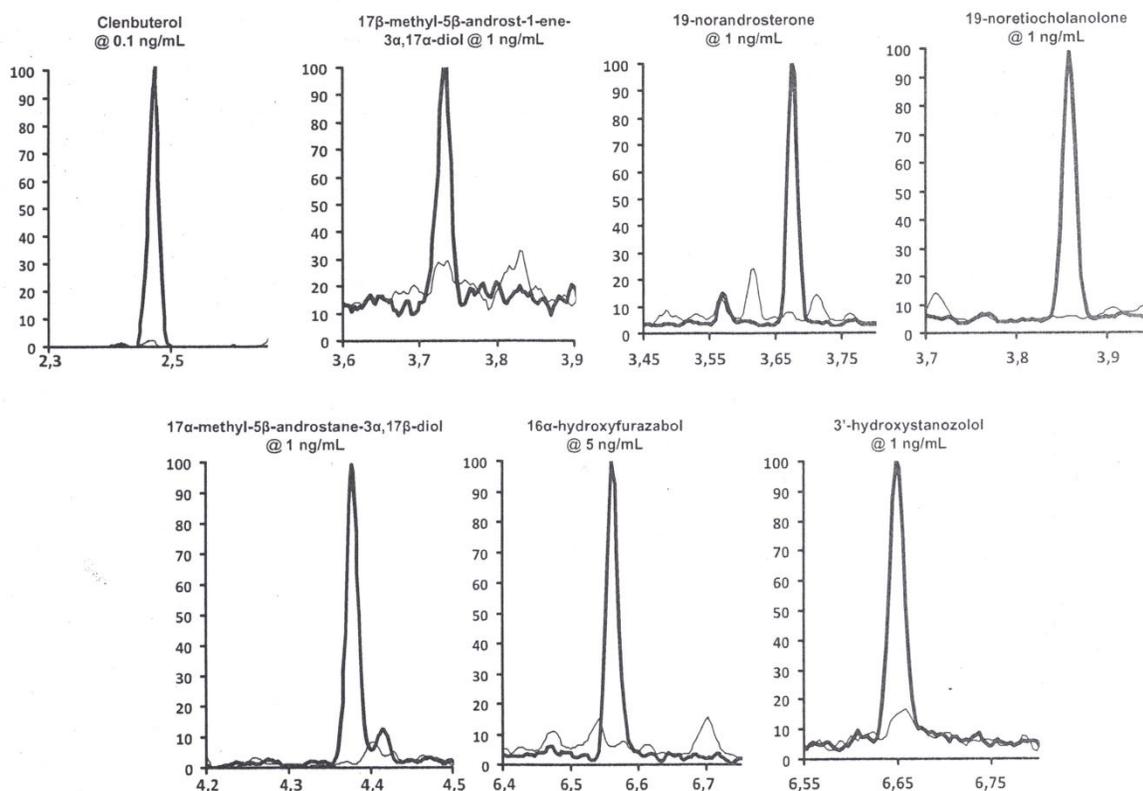


Figura 17 Template de espectros de masas de esteroides anabólicos androgénicos a concentraciones de 1 a 5 ng/mL [35]

7.7 Cromatografía de gases con celda de combustión acoplado a espectrometría de masas de relaciones isotópicas.

Los perfiles esteroidales urinarios son usados para controlar el abuso de esteroides endógenos (administrados de forma exógena) tales como la testosterona y la dihidrotestosterona (DHT). En el ámbito deportivo una relación de testosterona con su epímero, epitestosterona, mayor a 4 ($T/E \geq 4$), puede indicar el consumo exógeno de testosterona, o bien, de sus precursores. El uso de un GC/MS solo nos proporciona la información estructural del compuesto pero no nos indica el origen de dicha sustancia, que puede ser de dos tipos: endógeno o exógeno. Cuando nos referimos a un esteroide endógeno, estamos hablando de

un esteroide que se biosintetiza en el organismo, mientras que por un esteroide exógeno nos referimos a un esteroide sintético y que puede tener la misma estructura de un esteroide endógeno.

Una relación $T/E \geq 4$ como se menciono anteriormente, puede indicar el abuso de testosterona, sin embargo, existe una amplia variación natural de la relación T/E entre los individuos, incluso esta relación puede estar por encima del valor de corte permitido sin el consumo exógeno de esteroides sintéticos. En otros casos esta relación puede estar por debajo del valor permitido y el deportista está consumiendo esteroides. Recientemente se ha establecido que una relación T/E baja se debe a una variación genética.

La relación de T/E es constante a través del tiempo y una variación en individuo indica dopaje. Lamentablemente, esta técnica solo se aplica a muestras sospechosas que presentan un valor en la relación de T/E por encima del valor permitido [36].

Por medio de la cromatografía de gases con celda de combustión acoplado a espectrometría de masas de relaciones isotópicas se puede medir la abundancia relativa de un isótopo de un determinado átomo por ejemplo (C, N, O, H, S). Para efectos de control del dopaje, esta técnica permite discriminar entre la naturaleza exógena o endógena de ciertos compuestos excretados en la orina como testosterona y/o sus precursores o compuestos de metabolización como 19-Norandrosterona y 19-Noreticolanolona.

En el sistema de cromatografía de gases con celda de combustión acoplada espectrometría de masas de relaciones isotópicas (GC/C/IRMS, por sus siglas en inglés) la muestra se introduce en el cromatógrafo de gases, donde es evaporada y se realiza la separación cromatográfica de los componentes de la muestra. El

eluyente que procede del cromatógrafo de gases atraviesa un horno de combustión donde se produce la reacción de combustión de la materia orgánica generando bióxido de carbono y agua. El CO_2 generado por la combustión se introduce en el espectrómetro de masas junto con un flujo de helio, como gas portador. Por otro lado, se introduce también en el espectrómetro un flujo continuo de gas de referencia, generalmente es CO_2 . En la fuente de ionización las moléculas de dióxido de carbono son ionizadas dando lugar a los iones $^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$ y $^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$. Mediante un electroimán se dirige el haz hacia un sistema de colectores, donde se detectan de manera simultánea las diferentes trazas de las diferentes formas isotópicas generadas. Se determina así la diferencia en la composición isotópica entre los dos gases (muestra y gas de referencia) [37]. En la Figura 18 se muestra un diagrama de un GC/C/IRMS.

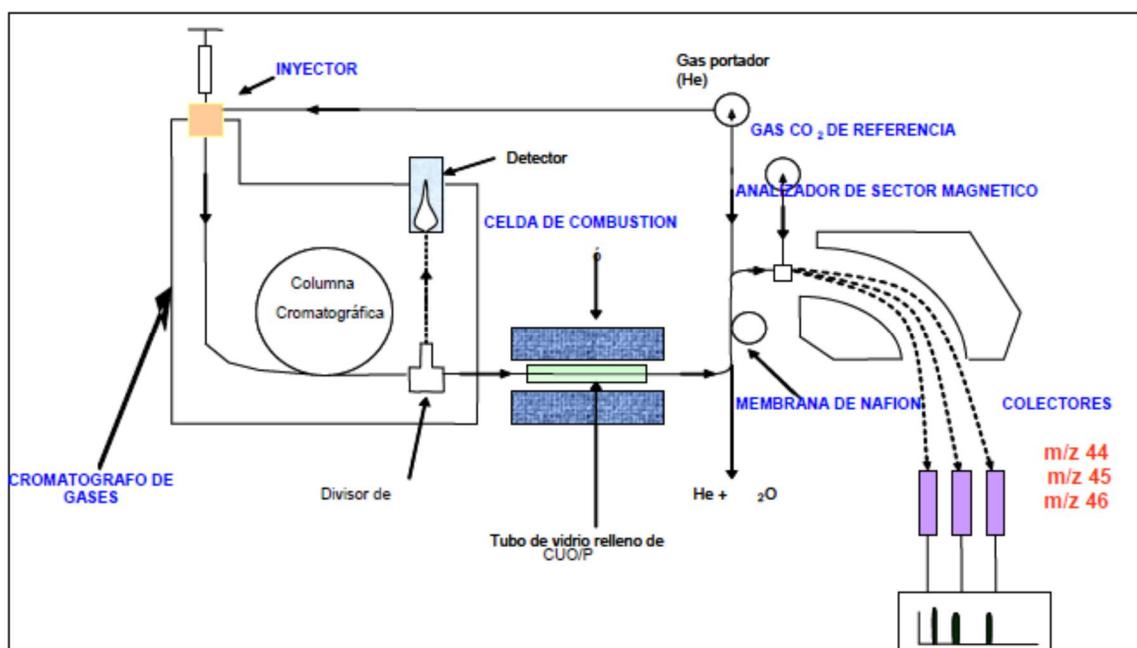


Figura 18: Cromatógrafo de Gases con Celda de Combustión acoplado a un Espectrómetro de Masas de Relaciones isotópicas (GC/C/IRMS).[37]

8. ANÁLISIS DE ESTEROIDES ANABÓLICOS ANDROGÉNICOS

8.1 Aspectos críticos en el análisis de esteroides anabólicos androgénicos

El Dr. Manfred Donike, al frente del Instituto de Bioquímica de la Universidad Alemana de Deporte, desde 1977 hasta su muerte en 1995, fue el iniciador principal de la introducción de la espectrometría de masas en los análisis antidopaje. Ya desde 1968 había estado involucrado en los análisis antidopaje con Cromatografía y Espectrometría de masas como las técnicas clave [38].

El análisis de esteroides en un control antidopaje se realiza generalmente a partir de muestras de orina como matriz. Los métodos utilizados habitualmente en la detección de esteroides se centran principalmente en los metabolitos, que son excretados en su forma conjugada como glucuronidos en la orina.

Para tener una confiabilidad de los resultados en el análisis de las muestras para la detección de esteroides anabólicos androgénicos se llevan a cabo normalmente en una única alícuota de las muestras de orina, agrupados en lotes que contienen también una muestra de control de calidad de composición conocida. Los análisis de confirmación de un parámetro superior a los rangos de valores que normalmente se mide en los seres humanos deben proporcionar una identificación clara de la sustancia analizada, y se requiere su cuantificación, por triplicado [39]. Además de la muestra de control de calidad se adiciona a cada una de las muestras a analizar un estándar interno, este estándar interno es una sustancia a una concentración conocida.

Durante el análisis de las muestras para la detección de esteroides anabólicos androgénicos existen factores determinantes que pueden llevar a un resultado falso positivo o a un falso negativo. Dichos pasos críticos son: La hidrólisis, extracción y derivatización de las muestras.

8.1.1 Hidrólisis

Como se menciona anteriormente la testosterona y/o sus metabolitos son eliminados del organismo en forma de glucuronido, por tal motivo es necesario realizar un procedimiento de hidrólisis para poder obtener el metabolito libre antes de ser analizado por técnicas analíticas. La técnica más ampliamente utilizada es la hidrólisis con enzimas principalmente de bacterias como la β -glucuronidasa de *E. coli*.

8.1.2 Extracción

En esta etapa del proceso se utiliza algún solvente orgánico poco polar, ya que la estructura de los esteroides anabólicos androgénicos presentan básicamente es no polar, en la metodología de screening se utiliza principalmente terbutil metil éter como solvente para la extracción de los analitos que pudiesen estar presentes.

8.1.3 Derivatización

La volatilidad y la estabilidad térmica de los compuestos son requeridas para el análisis mediante GC/MS. La derivatización es obligatoria para los compuestos polares y termolábiles para hacerlos susceptibles al análisis cromatográfico.

Los requerimientos principales para una reacción de derivatización exitosa son:

- Un solo derivado debe ser formado por cada compuesto.
- La reacción de derivatización debe ser simple y rápida.
- La reacción debe ocurrir bajo condiciones suaves.

- El derivado debe ser formado con alta reproducibilidad y rendimiento.
- El derivado debe ser estable en el medio de reacción.
- Los principales procedimientos usados para reacciones de derivatización son la silación, acilación, alquilación, etc. En este punto solo nos enfocaremos a la reacción de derivatización con compuestos de silicio.
- La silación es el procedimiento de derivatización más ampliamente usado para el análisis de GC/MS.. Los derivados silil son formados cuando se desplaza un protón activo, en los grupos –OH, -SH o –NH, por un grupo alquilsilil. Casi todos los grupos funcionales protonados presentes en compuestos orgánicos pueden ser convertidos en esteres o esteres de silil. La habilidad de varios grupos funcionales para formar los derivados silil es la siguiente: alcoholes>fenoles>ácidos carboxílicos>aminas>amidas. El procedimiento más común de silación es la trimetilsilación, ya que los derivados trimetilsilil (TMS) combinan la estabilidad química y térmica, así como una alta volatilidad. Son fáciles de preparar y muestran excelente comportamiento en la GC. Una gran variedad de este tipo de agentes con diferentes propiedades (volatilidad, reactividad, selectividad, etc.) han sido desarrollados. Las TMS amidas, N,O-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA) y N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida (MSTFA) son los más ampliamente usados en los trabajos analíticos. El MSTFA es la TMS-amida más volátil disponible. Algunos esteroides anabólicos y algunos de sus metabolitos no presentan buen comportamiento cromatografico, principalmente debido a la presencia de los grupos hidroxilo y cetona en su estructura.
- Algunos esteroides anabólicos androgénicos y sus metabolitos también contienen un grupo carboxilo en la molécula. La posibilidad de formar los derivados TMS a través de la forma enólica es usado para incrementar la

masa molecular del derivado y evitar interferencias. Esto se logra al usar acetato de potasio o TMSIm como catalizadores. El uso de ioduro de amonio con MSTFA para generar in situ el ioduro de trimetilsilil (TMSI) ha sido recomendado, la adición de agentes reductores tales como el ditioeritritol, etanetiol o 2-mercaptoetanol minimiza la formación de iodo y han sido descritos por algunos autores. Este tipo de reacción se presenta en la figura 19. (Hernández Martínez, Antonio. Comunicación personal realizada el 5 de Enero del 2012) y en la figura 20 se muestra la testosterona y su derivado.

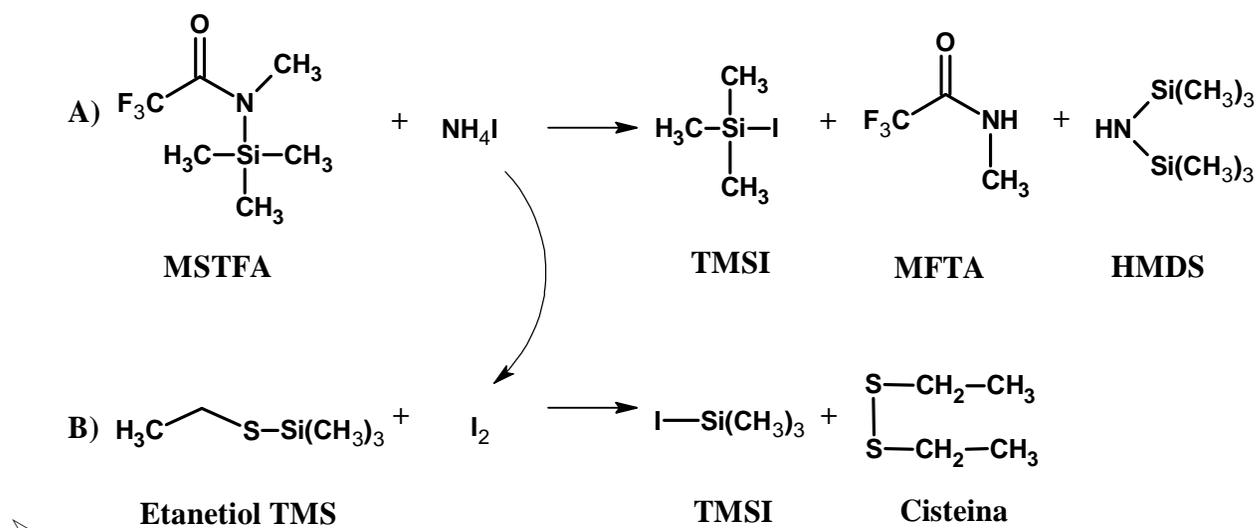


Figura 19. Preparación de MSTFA:NH₄I:Etanetiol

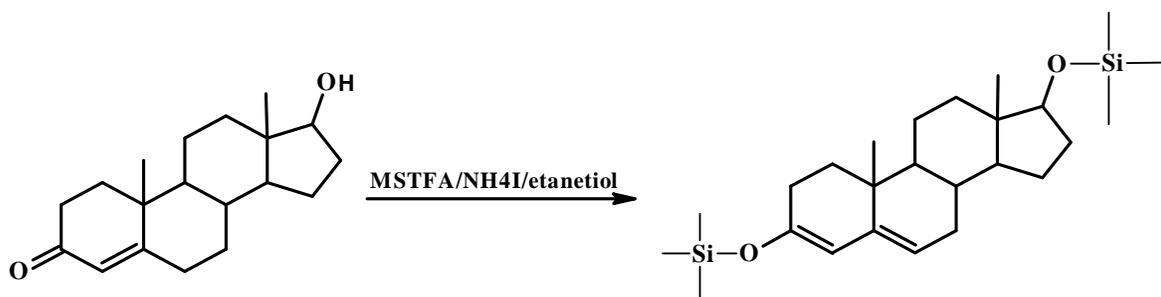


Figura 20 Reacción de derivatización de la testosterona

8.2 Ejemplos del análisis de esteroides

Las condiciones para el análisis instrumental de las muestras para la detección de esteroides anabólicos androgénicos depende de qué tipo de análisis se realice, (screening o cribado, confirmación o relación testosterona/epitestosterona alta). De acuerdo a los lineamientos de WADA se debe requerir un método general para la detección de las sustancias prohibidas y un método alternativo para su confirmación, esto incluye la cuantificación del analito, si así se requiere.

En los **diagramas 1 y 2** se describen dos diferentes metodologías para la detección y confirmación de esteroides anabólicos androgénicos respectivamente..

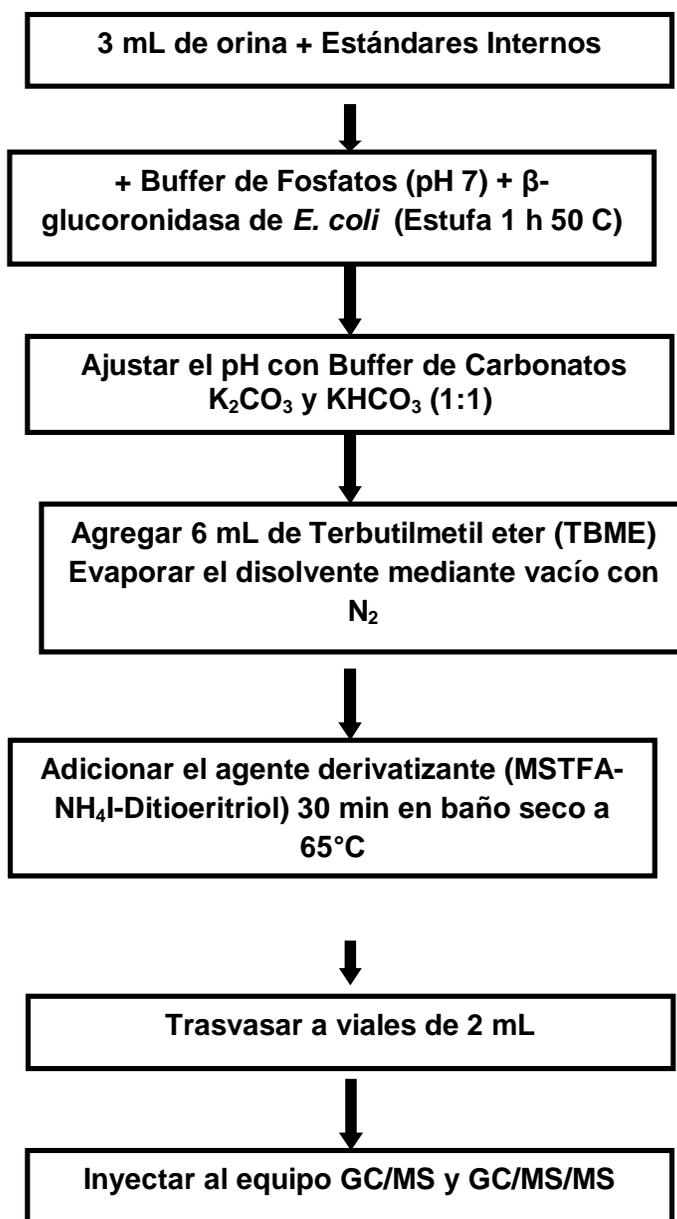


Diagrama 1 Análisis de Screening para la detección de esteroides anabólicos androgénicos en el control de dopaje [39].

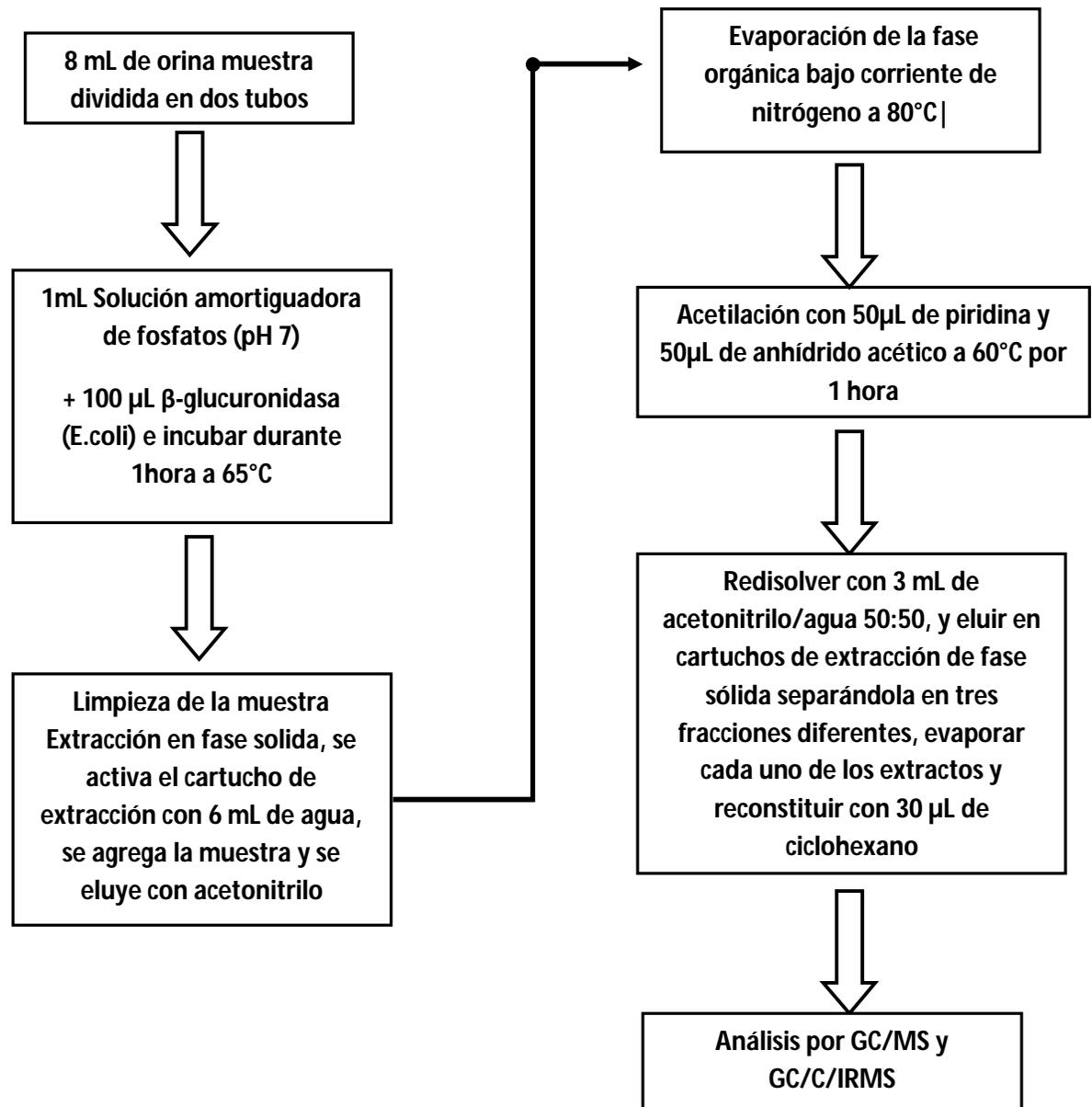


Diagrama 2: Confirmación de esteroides anabólicos androgénicos mediante GC/C/IRMS [40].

9 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

Como se observó el uso de esteroides anabólicos androgénicos ocupó el primer lugar en consumo por los atletas de alto rendimiento (principalmente en deportes en los que se necesita aplicar fuerza y potencia corporal) durante el año 2011. Por lo que el análisis para la detección de estas sustancias se ha convertido en una necesidad cotidiana para los organismos encargados de preservar la ética y los valores deportivos a nivel mundial.

También hemos observado la evolución de los organismos dedicados a regular y controlar las actividades en contra del dopaje hasta llegar a lo que actualmente es la WADA, junto con esta evolución se ha observado el desarrollo de metodologías analíticas e instrumentales para el seguimiento a los controles antidopaje. Así como la necesidad del conocimiento del metabolismo y biotransformación de los diferentes esteroides anabólicos androgénicos para plantear esas metodologías para su detección.

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en sus diferentes variables ha tenido una gran importancia desde su incorporación en el control antidopaje en los años 80's, para el análisis de muestras y la detección de esteroides anabólicos androgénicos. Iniciando con los métodos de cribado o screening y posteriormente utilizando técnicas más específicas para determinar el origen de las sustancias, en el caso de esteroides anabólicos androgénicos endógenos de origen exógeno así como algunos de sus precursores, utilizando la cromatografía de gases con celda de combustión acoplado a espectrometría de masas de relaciones isotópicas.

El uso de la cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (con sus diversas variantes) tiene cualidades específicas que las hacen importantes

durante los diferentes análisis de muestras así como para la confirmación de la presencia de esteroides anabólicos androgénicos en estas. Lo cual hace a estas técnicas analíticas poderosas herramientas en la lucha contra el dopaje deportivo.

Sin embargo la ciencia y la tecnología siguen, avanzando y como tal las técnicas analíticas utilizadas también, lo que ha provocado la creación de nuevas metodologías para la detección de esteroides anabólicos androgénicos, en los casos de aquellos esteroides en los cuales su detección es complicada, así como para disminuir el tiempo de análisis. Dentro de estas nuevas metodologías se encuentra la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas.

10 CONCLUSIONES

Se describió la importancia que ha tenido la cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas tipo cuadrupolar, para el análisis de screening o cribado de muestras en el control de dopaje deportivo.

Se describieron algunos de los requisitos de la agencia mundial antidopaje, en cuanto a la sensibilidad y niveles de detección en la concentración de los analitos, y la importancia de la cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas en tándem para el análisis de muestras y la detección de esteroides anabólicos androgénicos

Se describió parte del metabolismo y biotransformación de los esteroides anabólicos androgénicos y la importancia del uso de la cromatografía de gases con celda de combustión acoplado a espectrometría de masas de relaciones isotópicas para la determinación del origen de los esteroides endógenos.

La información recopilada en este trabajo genera una base de consulta para apoyar a la docencia en especial en el módulo de Evaluación de Fármacos y Medicamentos II en la unidad que corresponde a fármacos con acción en el sistema endocrino, referente a hormonas sexuales, debido a que se ilustra la importancia que cobra el conocimiento del metabolismo y biotransformación de los esteroides anabólicos androgénicos tanto endógenos como exógenos para el desarrollo de las técnicas analíticas utilizadas para su detección, la cual puede ser utilizada en diferentes ámbitos científicos, en este trabajo se hace un énfasis en el ambiente deportivo, pero este puede ser llevado al ámbito endocrinológico, y toxicológico principalmente.

El control antidopaje es un área relativamente nueva en México, la cual requiere de la aplicación de diferentes áreas del conocimiento científico (farmacología, química orgánica, química analítica (análisis instrumental), entre otras) para la detección de sustancias prohibidas en el deporte, la detección de esteroides anabólicos androgénicos en el control antidopaje ha sido de gran interés e importancia, por lo cual, se han desarrollado y validado diferentes metodologías para su detección y confirmación con el fin de mejorar las técnicas y hacerlas más accesibles en los diferentes laboratorios internacionales, acortando los tiempos de análisis y tratando de economizar su estudio, además de desarrollar metodologías nuevas que sean más sensibles y capaces de detectar las nuevas generaciones de esteroides sintéticos.

El programa de estudios de la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo aborda muchas de las áreas del conocimiento requeridas para la detección de esteroides anabólicos androgénicos y otros tipos de sustancias consideradas como dopantes en el ámbito deportivo, es por esto que el profesional de la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo se encuentra en una posición idónea para incursionar en esta área laboral o en alguna otra área en la cual se tengan que utilizar metodologías para la elaboración de perfiles esteroidales o la detección de sustancias tóxicas en pacientes hospitalarios, así como detección de drogas.

11. REFERENCIAS

1. Milano M, Meléndez G. Manual de farmacología del doping. Editorial Alfa-Beta. Argentina 1999. Pp 17-20
2. Ramos A. Lucha contra el dopaje como objetivo de salud. Revista Adicciones 1999; 11: 299-310
3. Gracia M, Rey JP, Casajus JA. El dopaje en los juegos olímpicos de verano (1968-2008) Apunts Med Esport, 2009; 162: 66-73
4. CONADE. Manual para el entrenador. Sistema de capacitación y certificación para entrenadores deportivos 3ª edición. Editorial Grfik SA de CV. México 1997. Pp 210-215
5. www.wada-ama.org/static/PDF/OtherLanguages/code_v2009_Sp.pdf (consultada el 20 de diciembre de 2011)
6. (International Olympic Committee, The fight against doping and promotion of athletes' health, IOC, Switzerland, 2007, 5/5)
7. http://www.wada-ama.org/Documents/Other_Languages/Spanish/WADA-Prohibited-List-2013-ESP.pdf (consultado el 20 de enero de 2013)
8. http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-IS-Laboratories/Technical_Documents/WADA-TD2013-INDEX-EN.pdf (consultado el 20 de enero de 2013)
9. Wade L. Química Orgánica 5ª edición Editorial Pearson Education Madrid 2004. Pp 1171-1174
10. Horton R. Moran L. Scrimgeour G. Perry M. Rawn J. Principios de Bioquímica. 4ª edición. Editorial Pearson Education México 2008. Pp 264-266.
11. Berg J. Tymoczko J. Stryer L. Bioquímica 6ª edición. Editorial Reverte Barcelona-España 2007. Pp 749-750.
12. McMurry J. Química Orgánica, 5ª edición. Editorial Thomson México 2001. Pp 1134.
13. Kronenberg H. Melmed S. Williams, Tratado de endocrinología. 11a edición editorial Elsevier. Barcelona España 2009. Pp 655-660;692-693

14. Campbell .N, Mitchell. L, Reece.J. Biología conceptos y relaciones. Tercera edición, editorial Pearson educación México 2001. Pp. 41,42.
15. The Merck Index an encyclopedia of chemicals, drugs, and biological 13^a edición New Jersey 2001.
16. http://www.drugabuse.gov/sites/default/files/steroids09_sp.pdf (consultada el 20 de diciembre de 2011)
17. Mycek M. Harvey R. Champe P. Farmacología 2^a edición. Editorial Mc Graw Hill México 2004. Pp 322-324
18. (Snyder P). Brunton L. Lazo J. Parker K. Goodman and Gilman Las Bases farmacológicas de la terapéutica. 11^a edición. Editorial Mc Graw Hill. México 2007. Pp 1573-1579
19. Rang H. Dale M. Ritter J. Flower R. Farmacología 6^a edición. Editorial Elsevier. España 2008. Pp 451-452
20. Bompa T, Cornachia L. Musculación Entrenamiento avanzado. Editorial Hispano-Europea, España 2002. Pp 231-247.
21. <http://www.wada-ama.org/Documents/Resources/Testing-Figures/WADA-2011-Laboratory-Testing-Figures.pdf> (consultado el 20 de Enero de 2013).
22. Malacara J. Garcia M. Valverde C. Fundamentos de Endocrinología Clínica. 3^a edición. Editorial La Prensa Medica Mexicana. México 1979. Pp. 180-185.
23. Makin.H. Gower D. Steroid analysis 2^a edición. Editorial Springer.Londres 2010.
24. http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-IS-Laboratories/ISL/WADA_Int_Standard_Laboratories_2012_EN.pdf (Consultado el 19 de Enero de 2012)
25. Christian G. Química Analítica. 6^a edición Editorial Mc Graw Hill. México 2009. Pp 574-601.

26. Sogorb M. Vilanova E. Técnicas Analíticas de Contaminantes Químicos. Aplicaciones toxicológicas medioambientales y alimentarias. Editorial Díaz de Santos. España 2004. Pp 117-120
27. Skoog D. West.D. Holler J. Crouch. Principios de análisis instrumental. 6a edición. Editorial Cengage Learning. México 2008.
28. Rouessac F. Rouessac A. Análisis Químico Métodos y Técnicas Instrumentales Modernas. Editorial Mc Graw Hill. España 2003. Pp 30-35; 399-340.
29. Bailey L. Remington Farmacia (Tomo 1) 20^a edición. Editorial Médica panamericana Buenos Aires 2003.
30. Harris D. Análisis Químico Cuantitativo 3^a edición. Editorial Reverte. Barcelona España 2003.
31. Rubinson K. Rubinson J. Análisis Instrumental. Editorial Pearson Prentice Hall. Madrid España 2001. Pp 584-634; 680-712.
32. Quintela O. Cruz A. Cocheiro M. De Castro A. López M. Metodología LC-MS. Aspectos generales de la técnica y sus aplicaciones en el campo de la toxicología. Rev.Toxicol.2005; 22,7-14
33. Schanzer W. Donike M. Metabolism of anabolic steroids in man: synthesis and use of reference substances for identification of anabolic steroids metabolics. Analytica Chimica Acta. 1993;275: 23-48.
34. http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-IS-Laboratories/Technical_Documents/WADA-TD2013MRPL-Minimum-Required-Performance-Levels-v1-2012-EN.pdf. (Consultado el 20 de enero del 2013)
35. Delgadillo M. Garrostas L. Pozo O. Ventura R. Velazco B. Segura J. Marcos J. Sensitive and robust method for anabolic agents in human urine by gas chromatography –triple quadrupole mass spectrometry. Journal of chromatography B. 2012; 897: 85-89.
36. Montes de Oca R. Rosado E. Correa T. Diferencias de esteroides endógenos y exógenos mediante Cromatografía de gases-Combustión-Espectrometría de

- Masas de relaciones Isotópicas. Revista CENIC Ciencias Químicas.2007; 38: 311-318.
37. <http://www.aea.gob.es/media/126621/espectrometr%C3%ADa%20de%20masa%20de%20relaciones%20isot%C3%B3picas-nuevo.pdf> (Consultado el 16 de Diciembre de 2011)
38. Hammerbach P. History of mass spectrometry at the Olympic Games. J. Mass Spectrometry 2008; 43: 839-853.
39. Parr M.K. . Schänzer W. Detection of the misuse of steroids in doping control. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. 2009; 121, 528-537.
40. Aguilera R. Chapman T. Pereira H. Oliveira G. Illanes R. Fernandes T. Azevedo D. Aquino F. Drug testing data from the 2007 Pan American Games: $\delta^{13}\text{C}$ values of urinary androsterone, etiocholanolone and androstendiols determined by GC/C/IRMS. Journal of Steroids Biochemistry and Biology. 2009;115: 107-114.
41. Thiem D. Hemmerbach P. Doping in Sports. Editorial Springer. Berlin 2010.
42. Todd, J.F.J.. Ion trap mass spectrometer-past, present and future. Mass Spectrometry Reviews, 1991;10:3-52;
43. Mcluckey, S.A. et al. Ion Trap Mass Spectrometry of Externally Generated ions. Analytical Chemistry. 1994;13: 66-70
44. <http://www.bris.ac.uk/nerclsmsf/techniques/gccirms.html> (consultado el 13 de diciembre de 2011)
45. Ganong W. Fisiología médica. 20ª edición. Editorial Manual moderno. México 2006
46. Murray R. Granner D. Rodwell V. Harper Bioquímica ilustrada 17ª edición. Editorial Manual Moderno. México 2007.
47. Carey F. Química orgánica 6ª edición. Editorial Mc Graw Hill. México 2006.
48. Skoog D. West.D. Holler J. Crouch S. Química analítica 7ª edición. Editorial Mc Graw Hill. México 2001.

49. Watson J. Sparkman D. Introducción to mass spectrometry. (Instrumentation, Applications and Strategies for Data Interpretation 4^a edición. Editorial John Wiley and Sons. Inglaterra 2007.
50. Flanagan R. Taylor A. Watson I. Whelpton R. Fundamentals of Analytical Toxicology. Editorial John Wiley and Sons. Inglaterra 2007.
51. Fourcroy J. Pharmacology Doping and Sports (A scientific guide for athletes, coaches, physicians, scientists and administrators). Editorial Routledge. USA 2009.
52. Segura J, Ventura R, Jurado C. Derivatization procedures for gas chromatographic-mass spectrometric determination of xenobiotics in biological samples, with special attention to drugs of abuse and doping agents. Journal of Chromatography B 1998; 713: 61-90.
53. Marcos J, De la Torre X, Gonzales J.C, Segura J, Pascual J.A. Liquid chromatography clean-up method to improve identification of anabolic agents in human urine by gas chromatography –mass spectrometry. Analytica Chimica Acta 2004; 522: 79-88.
54. Payne A.H, Hales D.B. Overview of Steroidogenic Enzymes in the Pathway from Cholesterol to Active Steroid Hormones. Endocrine Reviews 2004; 25: 947-970.
55. Okano M, Sato M, Ikekita A. Kageyama S. Analysis of non-ketoid steroids 17 α -methylpithiostanol and desoxymethyltestosterone in dietary supplements. Drug Testing and Analysis. 2009; 1: 518-525.
56. Piper T, Riemann P, Opferman G, Mareck U, Geyer H, Vajjala G, Flenker U, Schänzer W. Determination of ¹³C/¹²C ratios of urinary epitestosterone and its main metabolites 5 α - and 5 β -androstane-3 α , 17 α -diol. . Drug Testing and Analysis. 2009; 1: 576-586.
57. Broker L. Parr M.K, Cawley A, Flenker U, Howe C, Kazlauskas R, Schanzer W, George A. Development of criteria for detection of androsterone administration by gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry for doping control. . Drug Testing and Analysis. 2009; 1: 587-595.

58. Saudan C, Baume N, Mangin P, Saugy M. Urinary analysis of 16(5 α)-androst-3 α -ol by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry: implications in anti-doping analysis. *Journal of Chromatography B*, 2004, 810: 157-164.
59. Schanzer W. Metabolism of anabolic androgenic steroids. *Clinical Chemistry* 1996; 7: 1001-1020.
60. Schrand Y, Thevis M, Schanzer W. Quantitative determination of metabolic products of 19-norandrostendiol in human plasma using gas chromatography/mass spectrometry. *Drug Metabolism and Disposition* 2006; 34 :1328-1335.
61. Gomez R. Meredith W. Snape C. Sephton M. Analysis of conjugated steroid androgens: Deconjugation, derivatisation and associated issues. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2009; 49: 1133-1140.
62. Zhang Y. Tobias H. Brenna T. Steroid isotopic standards for gas chromatography-combustion isotope ratio mass spectrometry (GC-C-IRMS). *Steroids*. 2009; 74: 369-378.
63. Marek U. Geyer H, Opfermann G, Thevis M. Schänzer W Factors influencing the steroid profile in doping control analysis. *Journal of mass spectrometry*. 2008;43: 877- 891
64. Van Thuyne W., P. Van Eenoo, F.T. Delbeke. Implementation of gas chromatography combined with simultaneously selected ion monitoring and full scan mass spectrometry in doping analysis. *Journal of Chromatography A*. 2008; 1210:193–202
65. Avois L. Mangin P. Saugy M. Use of ion trap gas chromatography–multiple mass spectrometry for the detection and confirmation of 3hydroxystanozolol at trace levels in urine for doping control. *Journal of Chromatography B*. 2005; 816: 193–201
66. Flenker U. Güntner U, Schänzer W. $\delta^{13}\text{C}$ -Values of endogenous urinary steroids. *Steroids*. 2008; 73: 408-416.

67. Bagchus W. Smeets J. Varheul H. De Jager-Van Der Veen. Port A. Geurts P. Pharmacokinetic Evaluation of Three Different Intramuscular Doses of Nandrolone Decanoate: Analysis of Serum and Urine Samples in Healthy Men. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2005; 90: 2624-2630.
68. Van Eenoo P. Delbeke F. Metabolism and excretion of anabolic steroids in doping control—New steroids and new insights. *Journal of Steroids Biochemistry and Molecular Biology*. 2006; 101: 161-178.
69. Shackleton M. Steroid analysis and doping control 1960–1980: Scientific developments and personal anecdotes. *Steroids*. 2009; 74: 288-295.
70. Cawley A. Trouta G. Kazlauskasa R. Howea C. Georgeb A. Carbon isotope ratio ($\delta^{13}\text{C}$) values of urinary steroids for doping control in sport. *Steroids*. 2009; 74: 379-392.
71. Baume R. Saudan C. Desmarchelier A. Strahm E. Sottas P. Bagutti C. Cauderay M. Schumacher Y. Mangin P. Saugy M. Use of isotope ratio mass spectrometry to detect doping with oral testosterone undecanoate: Inter-individual variability of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio. *Steroids*. 2006; 71: 364-370.

12 ANEXO

Parámetros cromatográficos

En cromatografía se puede parametrizar la forma, la resolución y la posición de las bandas. El parametrizar los datos cromatográficos permite facilitar la comunicación de datos y también la comparación de los resultados entre diferentes condiciones y métodos.

Los parámetros que describen un cromatograma pueden correlacionarse con descripciones de los procesos moleculares que tienen lugar durante la separación.

Volumen muerto (V_0): es el volumen mínimo de fase móvil que puede transportar un componente de muestra a lo largo de toda la columna.

Volumen de retención (V_R): es el volumen necesario para eluir un componente determinado.

Los parámetros cromatográficos enunciados anteriormente tienen su equivalencia cuando en un cromatograma es expresado en tiempo de elución, en la figura 1A se representa los parámetros de tiempo muerto y tiempo de retención [26].

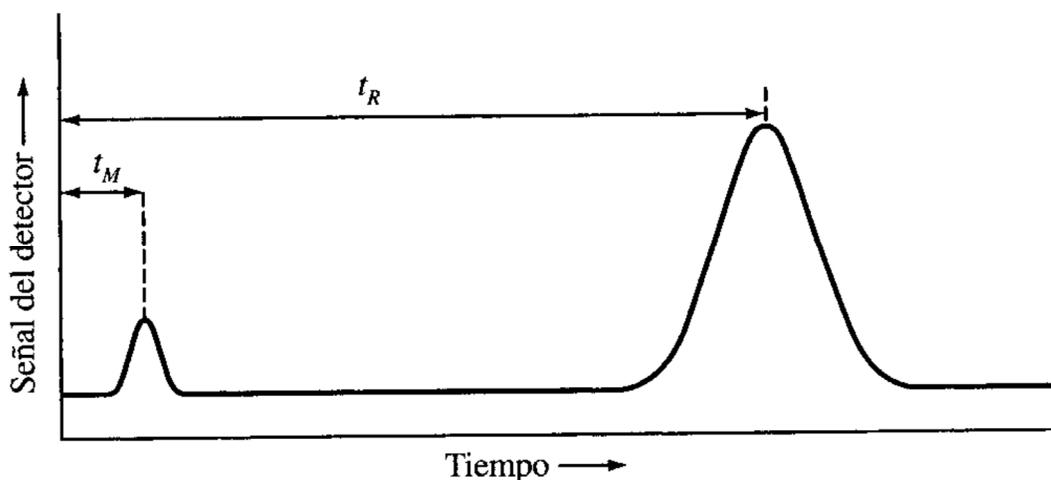


Figura 1A Representación del tiempo muerto y el tiempo de retención. [27]

El ancho de pico (W) y el ancho de pico a media altura ($W_{1/2}$) son parámetros que ayudan a definir y a caracterizar un pico cromatográfico. El ancho de pico corresponde a la base del triángulo teórico que se formaría uniendo las líneas tangentes a los puntos de inflexión de la Gausiana que forma el pico. Así pues, el ancho de pico solo puede ser determinado matemáticamente a posteriori, ya que depende de la triangulación del pico. Sin embargo, el ancho de pico a media altura es un parámetro medible experimentalmente, ya que el sistema nos puede ofrecer el tiempo transcurrido entre que se alcanza la mitad de la altura máxima al ascender y descender la línea de registro. El alto de $W_{1/2}$ nos permite calcular W , ya que se puede demostrar que si el pico es un campana de Gauss perfecta, en la figura 2A se representan los parámetros correspondientes al ancho de pico y el ancho de pico a altura media:

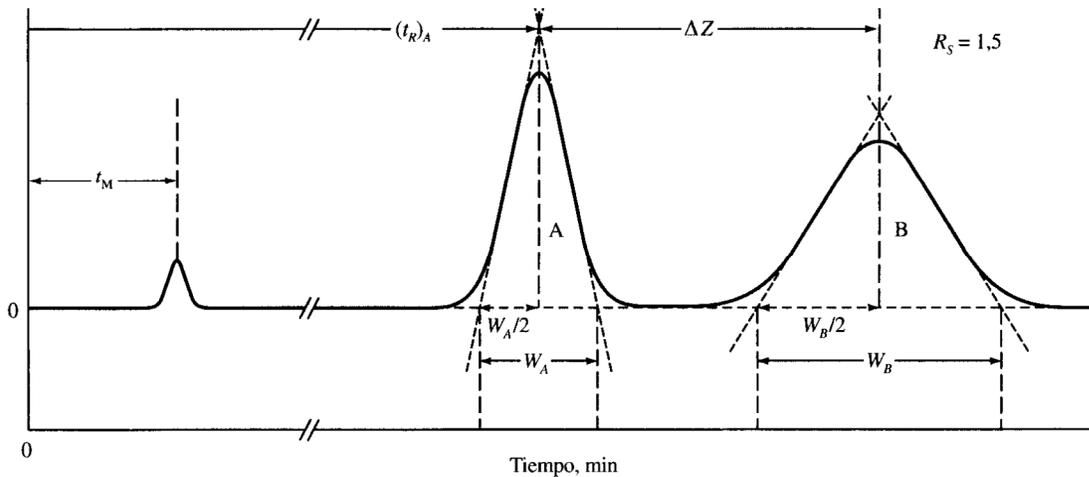


Figura 2A Representación de parámetros cromatográficos. [27]

El factor de capacidad (k) es la relación entre el volumen corregido de retención y el volumen muerto (o bien la relación entre el tiempo corregido de retención y el tiempo muerto si el flujo es constante).

$$k = \frac{V_R - V_0}{V_0}$$

Idelamente las separaciones deben realizarse en condiciones dadas para las que k este comprendido entre 1 y 5. Al contrario de los tiempos y volúmenes de retención, el factor de capacidad no depende de la geometría del sistema. Es decir que para una fase estacionaria y unas condiciones dadas, el k se mantendrá constante al variar la longitud de la columna, el diámetro y su tamaño de partícula. El factor de capacidad es adimensional.

La eficacia cromatográfica (N) es un parámetro individual para cada banda del cromatograma, y por tanto no todas las bandas tienen la misma eficacia cromatográfica. El parámetro N también suele denominarse número de platos

teóricos y resulta útil para comparar separaciones cromatográficas en condiciones diferentes. Cuanto mayor es N, mayor es la tendencia del analito a aparecer en el cromatograma como un pico estrecho y por tanto, mejor es la separación obtenida. La ecuación matemática que describe el parámetro N es:

$$N = 16 \left(\frac{t_{Ri}}{W_i} \right)^2$$

$$N = 5,54 \left(\frac{t_{Ri}}{W_{1/2}} \right)^2$$

La eficacia cromatográfica de un pico esta determinada por factores como la construcción y empaquetado de la columna y la velocidad de la fase móvil.

El concepto de eficacia pretende cuantificar la capacidad del sistema para aprovechar las interacciones entre el analito y la fase estacionaria, consiguiendo que se forme el equilibrio entre ambas fases el mayor número de veces posible.

Otra medida útil es el numero de platos teóricos por unidad de longitud de la columna, o bien su inverso, la altura equivalente de plato teorico (H). Cuanto menor es H, mejor es el sistema cromatográfico para el componente que se haya calculado.

$$H = \frac{L}{N}$$

El factor de separación se utiliza para definir el grado de mezcla de las sustancias contenidas en los picos eluidos. El factor de separación ($\alpha_{1/2}$) o especificidad de dos bandas adyacentes se define como la razón entre los volúmenes corregidos de elución. La expresión matemática de esta razón es:

$$\alpha_{1/2} = \left(\frac{t_{R_2} - t_0}{t_{R_1} - t_0} \right)$$

y si el flujo es constante entonces

$$\alpha_{1/2} = \left(\frac{t_{R_2} - V_0}{t_{R_1} - V_0} \right)$$

Un factor de separación alto nos indica que el centro de los picos esta muy alejado y, por lo tanto, que la fase estacionaria retiene mas una sustancia que otra; es por eso que el factor de separación a veces se denomina también como especificidad [26].

Nombre de archivo: Tesis Daniel Nicolás
Directorio: C:\Users\Daniel Nicolas\Documents
Plantilla: C:\Users\Daniel
Nicolas\AppData\Roaming\Microsoft\Plantillas\Normal.dotm
Título:
Asunto:
Autor: Daniel Nicolas
Palabras clave:
Comentarios:
Fecha de creación: 04/02/2013 09:16:00 a.m.
Cambio número: 55
Guardado el: 06/02/2013 11:10:00 p.m.
Guardado por: Daniel Nicolas
Tiempo de edición: 1,290 minutos
Impreso el: 06/02/2013 11:26:00 p.m.
Última impresión completa
Número de páginas: 90
Número de palabras: 16,790 (aprox.)
Número de caracteres: 92,349 (aprox.)