



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad De Estudios Superiores
Zaragoza

**Desarrollo y Optimización De Un Método
Analítico Para La Determinación De
Tetrahydrocannabinol (THC) En Muestras
De Orina Humana Por Cromatografía De
Gases Acoplada A Espectrometría De
Masas (CG/EM).**

Para obtener el título de:

Químico Farmacéutico Biólogo

Presenta:

Ricardo Pável Santiago Membrillo

Director: Dr. Miguel Ángel Delgadillo Marín

Asesor: Q.F.B. Victor Hugo Becerra López

Laboratorio Nacional Para La Prevención
y Control Del Dopaje.





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza y a sus profesores por brindarme la base fundamental de las ciencias químicas, farmacológicas y de la naturaleza, sin ello nunca hubiera podido llegar a saber lo que se hoy.

De igual manera al Laboratorio Nacional para la Prevención y control del dopaje (CONADE), al Dr. Benjamín Velazco Bejarano, Dra. Evangelina Camacho Frías, Dr. Miguel Ángel Delgadillo Marín, Q.F.B. Victor Hugo Becerra López, Mtra. Isabel Garduño Pozadas, M. en C. Griselda Fuentes Lara, Q.F.B. Georgina Ríos Olivera, Patricia Almaraz Sibaja, por brindarme su tiempo, recursos, conocimientos y apoyo para la realización de esta tesis y por haber obtenido el primer lugar en el Congreso Nacional de Química Analítica impartido en la Facultad de Química de la UNAM en 2012.

**¡MUCHAS GRACIAS A TODOS POR ESTA
EXPERIENCIA!**

Mi Primer Lugar

DEDICATORIA

A mis compañeros de la facultad: Daniel Nicolás Coba, Liliana Martínez Sosa, Edson Becerra, Edna Quintero, Arturo Sandoval, Paulina Martínez, el Jaguar, Laura M. Palma, Enrique Zaldívar, Daniel Ronces, Omar Santos, Kenia, Mena, Julián Martínez, Alejandra, Verónica Guerrero...

A mis compañeros de la CONADE: Karina Mercado Soberanes, Maricela Domínguez, Eradio Méndez, Ana Laura Pérez, Pedro Cabrera, Laura Aguilar, Raymundo Rivero, Tonantzin Ramírez, Jahir Bautista, Ilcie Quintero, Javier García, Patricia Almaraz Sibaja, Eduardo Reynoso, Alejandra Magaña, Manuel López, Sonia Ramírez, Antonio Hernández, Omar Negrellos, Evangelina Camacho, Leonardo Rodríguez, Denise Reyes, Rodrigo Vian...

Esta tesis está dedicada a cada una de las personas que con poquito o mucho de su apoyo, hicieron que pudiera terminar un ciclo más...

DEDICATORIA

¡A toda mi familia, por brindarme más
de lo que me podían dar!

¡GRACIAS!

DEDICATORIA

A mi MAMÁ

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| INTRODUCCIÓN. | 1 |
| 1.MARCO TEÓRICO. | 4 |
| 1.1. GENERALIDADES. | 4 |
| 1.2. AGENCIA MUNDIAL ANTIDOPAJE (WADA). | 7 |
| 1.3. MARIHUANA. | 9 |
| 1.4. LOS CANNABINOIDES. | 10 |
| 1.4.1. ORIGEN QUÍMICO. | 12 |
| 1.5. EL TETRAHIDROCANNABINOL (Δ^9 -THC). | 13 |
| 1.6. METABOLISMO DEL TETRAHIDROCANNABINOL (Δ^9 -THC). | 15 |
| 1.6.1. INGESTA, ABSORCIÓN Y DISTRIBUCIÓN DEL TETRAHIDROCANNABINOL (Δ^9 -THC). | 15 |
| 1.6.2. METABOLISMO DEL TETRAHIDROCANNABINOL (Δ^9 -THC). | 17 |
| 2. FUNDAMENTOS DE CROMATOGRAFÍA. | 19 |
| 2.1. CLASIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS. | 20 |
| 3. INSTRUMENTACIÓN. | 22 |
| 3.1. COMPONENTES DEL CROMATÓGRAFO DE GASES. | 22 |
| 3.1.1. GAS ACARREADOR. | 22 |
| 3.1.2. INYECTOR. | 22 |
| 3.1.3. COLUMNA CROMATÓGRAFICA. | 23 |
| 3.1.4. DETECTORES. | 24 |
| 3.2. INTERPRETACIÓN DE CROMATOGRAMAS. | 25 |
| 3.2.1. ANÁLISIS CUALITATIVO. | 25 |
| 3.2.2. ANÁLISIS CUANTITATIVO. | 26 |
| 3.3. ESTÁNDAR EXTERNO E INTERNO. | 28 |
| 4. TIPOS DE DETECTORES EN CROMATOGRAFÍA DE GASES. | 28 |
| 4.1. CONDUCTIVIDAD TÉRMICA (TCD). | 28 |
| 4.2. IONIZACIÓN DE LLAMA (FID). | 29 |
| 4.3. CAPTURA ELECTRÓNICA (ECD). | 29 |
| 4.4. DETECTOR DE NITRÓGENO-FÓSFORO (NPD). | 29 |
| 4.5. ESPECTROMETRÍA DE MASAS (EM). | 29 |
| 4.5.1. ACOPLAMIENTO CG/EM. | 30 |
| 5. DISEÑO DE EXPERIMENTOS. | 31 |
| 5.1. MATRICES BIOLÓGICAS. | 33 |
| 5.2. VARIABLES EN LA PREPARACIÓN DE MUESTRAS. | 34 |
| 5.2.1. HIDRÓLISIS. | 34 |
| 5.2.2. SALTING OUT. | 34 |
| 5.2.3. PH. | 35 |
| 5.2.4. EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO. | 35 |
| 5.2.5. DERIVATIZACIÓN. | 36 |
| 5.3. DISEÑO FACTORIAL. | 37 |

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| 6. MODELO ESTADÍSTICO. | 39 |
| 7. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA. | 41 |
| 8. OBJETIVOS. | 42 |
| 9. HIPÓTESIS. | 42 |
| 10. DISEÑO EXPERIMENTAL. | 43 |
| 11. MATERIAL E INSTRUMENTOS. | 43 |
| 11.1. MATERIALES. | 43 |
| 11.2. INSTRUMENTOS. | 43 |
| 12. VARIABLES A DESARROLLAR EN LA METODOLOGÍA ANALÍTICA. | 44 |
| 12.1. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS. | 45 |
| 12.1.1 MÉTODO CROMATOGRÁFICO DE RUTINA. | 45 |
| 12.1.2. MÉTODO CROMATOGRÁFICO MODIFICADO. | 45 |
| 13. DIAGRAMA DE FLUJO. | 47 |
| 14. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. | 50 |
| 14.1. EVALUACIÓN DE HIDRÓLISIS. | 50 |
| 14.2. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE SALTING OUT. | 50 |
| 14.3. EVALUACIÓN DE EXTRACCIÓN A DIFERENTE PH. | 51 |
| 14.4. EVALUACIÓN DE EXTRACCIÓN CON DIFERENTES DISOLVENTES. | 52 |
| 15. RESULTADOS DE LA MATRIZ CON EL STATGRAPHICS CENTURION XVI. | 53 |
| 15.1. DIAGRAMA DE PARETO PARA INTERACCIONES Y EFECTOS ENTRE VARIABLES. | 54 |
| 15.2. GRÁFICAS DE INTERACCIONES PARA EL METABOLITO Δ^9 -THC-COOH. | 55 |
| 15.3. GRÁFICAS DE INTERACCIONES PARA Δ^9 -THC. | 59 |
| 15.4. GRÁFICAS DE INTERACCIONES PARA EL METABOLITO 11-OH-THC. | 63 |
| 16. CONDICIONES ÓPTIMAS DE ANÁLISIS. | 66 |
| 17. CONCLUSIONES. | 68 |
| 18. LISTA DE REFERENCIAS. | 69 |

INTRODUCCIÓN

Desde el inicio de los tiempos, el hombre ha buscado un producto milagroso que sea capaz de transformarlo de un individuo normal en un superhombre, en la actualidad sabemos que esto se logra con diferentes clases de sustancias conocidas al día de hoy como sustancias prohibidas, debido a esto la sociedad actual impulsa a multitud de personas a buscar un incremento en su rendimiento físico y mental, y a una disminución en la sensación de fatiga ante el esfuerzo de un trabajo intenso y prolongado; atletas, ejecutivos, estudiantes, trabajadores en general, etc. buscan en suplementos, tónicos o infusiones, e incluso alimentos artificiales o naturales, con lo que puedan acrecentar sus capacidades físicas y mentales, más allá de su límite sin tener en cuenta el riesgo que conlleva, de igual forma los atletas de alto rendimiento no están exentos de este tipo de prácticas.

Una forma de influir en el desempeño físico del atleta, ha sido mediante el consumo de complementos alimenticios, fármacos, infusiones y drogas naturales o sintéticas, que al ser ingeridas provocan un aumento del rendimiento físico y mental. Estas sustancias no son reglamentadas en su totalidad, algunas son ilegales y su uso indiscriminado llega a poner la salud del atleta en serios problemas, oponiéndose a la filosofía que dio surgimiento al Comité Olímpico Internacional (COI) quien promueve todo un conjunto de valores éticos, morales pedagógicos y humanistas referentes al deporte, para lograr un desarrollo integral de la personalidad del deportista y con el objeto de salvaguardar el juego limpio.

Esta concepción filosófica está amenazada con el uso de sustancias prohibidas por parte de los atletas de alto rendimiento y los coloca en desigualdad de posibilidades competitivas, frente a quienes no consumen estas sustancias, por estas razones, la Agencia Mundial Antidopaje (WADA por sus siglas en inglés) y otros organismos deportivos a nivel mundial se han dado a la tarea de implementar técnicas analíticas que permitan la detección de estos compuestos en muestras de orina de los atletas,

valiéndose para ello de técnicas cromatográficas y espectrométricas, para salvaguardar el espíritu de la competencia honesta entre los deportistas, siendo la WADA la que coordina este tipo de acciones en prevención del dopaje deportivo.

Ante esta situación los laboratorios acreditados por la WADA, mediante el “Estándar Internacional para Laboratorios” (ISL por sus siglas en inglés) han desarrollado métodos analíticos capaces de detectar todas las “Sustancias Prohibidas” que son mencionadas en la “Lista de Sustancias Prohibidas” que publica a nivel mundial esta misma agencia. La WADA se basa en los reportes emitidos por cada laboratorio para actualizar esta lista cada año, en donde el Tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC) y sus metabolitos principales Δ^9 -THC-COOH, 11-OH-THC es una de las sustancias con mayor incidencia en orinas de atletas, en diferentes disciplinas, dentro y fuera de competencia.

Si bien esta sustancia no proporciona ventajas en el rendimiento físico es una sustancia psicoactiva y con alto poder adictivo, tanto en el deporte como en la vida diaria, por esta razón está prohibida en muchos países y se encuentra incluida en la Lista de Sustancias Prohibidas de la WADA sancionándose, solo cuando el atleta se encuentra en competencia.

Los laboratorios acreditados deben contar con metodologías analíticas adecuadas para su determinación en cuanto a la parte del control de dopaje en atletas.

En México, el Laboratorio Nacional de Prevención y Control del Dopaje es el encargado de implementar las metodologías analíticas de acuerdo al Estándar Internacional de Laboratorios (ISL), el cual asegura que los resultados analíticos emitidos sean válidos, ya que por medio de este documento, se armonizan los resultados de todos los laboratorios para la determinación de sustancias prohibidas entre ellas el Δ^9 -THC y sus metabolitos (Δ^9 -THC-COOH, 11-OH-THC) de esta manera prevenir el consumo de este tipo de sustancias prohibidas y fomentar el juego limpio entre los atletas.

Considerando lo anterior, es importante contar con una metodología analítica para la determinación de Tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC) y sus metabolitos en orina de atletas, como parte del control de dopaje deportivo y de esta forma prevenir el uso de esta sustancia prohibida y otros narcóticos.

1. MARCO TEÓRICO.

1.1. GENERALIDADES.

El tema del dopaje deportivo en México es poco conocido, dada la poca información que existe sobre el tema en nuestro país, es de particular interés abordar el estudio del dopaje, motivos causas y perjuicios sobre éste en forma general, y así difundir entre los atletas y la comunidad deportiva en general la lista de sustancias prohibidas emitida por la WADA, para evitar el consumo de sustancias que tengan efectos adversos a la salud.

El dopaje, la aparición y la extensión de este término se debe en gran parte a diferentes factores que a la misma esencia del deporte.¹ En nuestra sociedad, no solo se usan fármacos ó medicamentos para combatir enfermedades, sino también como ayuda en los estados fisiológicos límites (cansancio, dolor, sueño, ansiedad frustración, etc.) Todo tipo de personas buscan un producto milagroso con lo que puedan acrecentar sus posibilidades físicas y mentales más allá de su límite^{1,2} o bien para estimularse, sedarse, aumentar o disminuir su peso aumentar su fuerza y masa muscular, su capacidad cardíaca su concentración, calmar la fatiga, etc. De tal manera que el dopaje se utiliza para obtener el triunfo o para conseguirlo con menor esfuerzo,^{1,2} o simplemente para intentar mejorar la calidad de vida de manera ficticia a un alto costo en la salud.

Otra causa en el incremento del dopaje es el exceso de comercialización del deporte, en particular la reciente compra de los derechos de televisión unida a los grandes contratos de patrocinio y a sus asociaciones deportivas² dicha comercialización y sus repercusiones económicas y financieras, incluyendo las altas retribuciones económicas que se le otorgan al atleta, han conducido a un aumento en las competencias deportivas y a la disminución del tiempo de recuperación del mismo, realizando esfuerzos más allá de sus límites, lo cual provoca también la reducción de la vida deportiva del atleta.²

De la misma forma, el atleta, ante una expectativa de mayores beneficios económicos se suma a esta carrera desenfrenada de mantener un ritmo elevado en su deporte, y en donde se ve empujado por la presión que ejerce la sociedad, el entrenador, el médico e inclusive miembros de la familia, exigen al atleta, que tenga una superación continua de su rendimiento deportivo, obteniendo una ventaja antes sus adversarios que evidentemente por medios naturales no alcanzaría, en conclusión termina incurriendo en el dopaje.

Desgraciadamente la naturaleza del dopaje está cambiando, el acto de doparse, ya no es, salvo excepciones, el acto aislado de un deportista el día de la competencia². El dopaje consiste ahora en métodos sistemáticos y organizados dentro de los equipos deportivos, que utilizan los resultados del progreso científico para objetivos contrarios a la ética deportiva², por ejemplo, utilizando sustancias que permiten enmascarar los productos dopantes en los análisis antidopaje.

Una explicación a la proliferación de sustancias dopantes se encuentra en la aceptación por las sociedades, donde está legalizado el uso de este tipo de sustancias, aún se sigue pensando que son productos mágicos que mejoran nuestra capacidad física. Nuestra sociedad acepta implícitamente, la autoestimulación y el consumo de sustancias, esto abre una brecha a la automedicación y el uso inadecuado de medicamentos sin ningún control médico, sin justificación terapéutica favoreciendo su consumo dentro del marco deportivo o en la vida diaria ignorando el riesgo que esta acción conlleva.

Es muy difícil determinar exactamente los efectos secundarios que una sustancia o un método prohibido pueden tener en un atleta² que se esté dopando, en parte se debe al tipo de sustancia o al método utilizado los atletas que están consumiendo sustancias, a menudo toman dosis considerablemente mayores y con más frecuencia, de lo que se prescribiría con fines terapéuticos, y a menudo las consumen en combinación con otras. Dado que doparse nunca se ha experimentado en sujetos sanos, equivale a aceptar ser un conejillo de indias y arriesgarse a padecer efectos adversos con resultados irreversibles además expone

al organismo al riesgo de llegar a sobrepasar fatalmente sus límites fisiológicos ocasionando progresiva dependencia y hábito al uso de drogas cuyas dosis aumentan gradualmente para mantener efectos que a veces, son ilusorios.

Cada individuo aspira, generalmente a destacar sobre los demás individuos, de igual manera en el deporte de competencia, que continuamente compara a cada deportista con sus compañeros, estas aspiraciones dejan de ser legítimas y son deshonestas cuando se utilizan medios peligrosos, violentos y ajenos a la ética deportiva, entre los cuales se encuentra el dopaje siendo este el motivo por el cual su práctica está prohibida^{3,4}, ya que destruye y envilece los beneficios que de forma tradicional se han buscado en el deporte, que es conseguir una mejor salud física, mental, social, ético y mental.^{3,4}

El ejercicio es relajante, pero con la competencia aparecen determinadas tensiones que pueden convertir al deporte en una actividad de gran tensión, si a ello se añade el uso de sustancias prohibidas que aumentan la agresividad, el resultado puede ser el ataque o la agresión corporal de aquellos que las consumen.^{3,4}

Por último, el dopaje, al tratar de mejorar artificialmente las cualidades y habilidades deportivas, contraviene el principio esencial del deporte de competición el cual debe ser justo y equitativo, introduce en el deporte la mentira y el engaño, destruye la confianza, por estas razones es de gran importancia combatir, prevenir y en último de los casos regular todo este tipo de sustancias, métodos y prácticas que han envilecido al deporte.^{1,2,3,4}

Ante la violación de la competencia y del deporte sano, la WADA se coordina para promover la lucha contra el dopaje en el deporte a nivel internacional⁴. Pero dado el avance tecnológico, y que en el mercado se pueden encontrar nuevos agentes dopantes a diario, la WADA, se encarga de actualizar la “Lista de Sustancias y Métodos Prohibidos”, año con año, para combatir este tipo de prácticas.⁵

1.2. AGENCIA MUNDIAL ANTIDOPAJE (WADA).

La Agencia Mundial Antidopaje (WADA por sus siglas en inglés) es una agencia independiente, que fue creada a partir de la Declaración de Laussana (Laussana Declaration) en la primer Conferencia Mundial de Dopaje en el Deporte, que convocó el Comité Olímpico Internacional (COI)^{1,4,5}, está conformada por representantes del movimiento deportivo federativos de distintas disciplinas, así como representantes del gobierno de los diferentes países afiliados al COI.

Fue fundada el 10 de Noviembre de 1999 en Lausana Suiza, pero años más tarde se trasladó a Montreal, Canadá. Esta organización fue creada para promover, coordinar y monitorear la lucha contra el dopaje deportivo¹, pero además se encarga de la investigación científica educación y desarrollo de las capacidades antidopaje a nivel mundial así como el monitoreo por medio de estatutos como el Código Mundial Antidopaje^{1,4} el cual homologa las regulaciones antidopaje de todos los países y de todos los deportes, también recopila información de los diferentes laboratorios antidopaje que la misma agencia acredita.⁴

Estos laboratorios deben cumplir con el Estándar Internacional para Laboratorios⁴ (ISL por sus siglas en inglés) emitido por la WADA para poder operar y emitir resultados confiables que son recopilados, y con los cuales se actualiza la lista anual de Sustancias y Métodos Prohibidos que los deportistas deben evitar, esta lista que se modifica cada año agregando o quitando sustancias.^{5,6}

La lista de sustancias prohibidas se divide por Sustancias y Métodos prohibidos, dentro y fuera de competencia, para todos los deportes, los deportistas son los únicos responsables de lo que consumen⁴ y al encontrar alguna sustancia en orina o sangre son sancionados y multados por la Federación deportiva correspondiente al deporte que practica.^{4,5}

Dentro de esta lista de sustancias prohibidas se encuentra el Tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC), ubicada en el grupo S8, incluyendo a sus metabolitos.⁵

La lista prohibida se divide en los siguientes grupos:

- **S0.** Sustancias no aprobadas.
- **S1.** Agentes anabolizantes.
- **S2.** Hormonas peptídicas, factores de crecimiento y sustancias relacionadas.
- **S3.** β -2-Agonistas.
- **S4.** Moduladores hormonales y metabólicos.
- **S5.** Diuréticos y otros agentes enmascarantes.
- **S6.** Estimulantes.
- **S7.** Narcóticos.
- **S8.** Cannabinoides.
- **S9.** Glucocorticoesteroides.
- **M1.** Manipulación de sangre y componentes sanguíneos.
- **M2.** Manipulación física y química.
- **M3.** Dopaje genético.
- **P1.** Alcohol.
- **P2.** β -bloqueantes.

(Lista Prohibida 2013.⁵)

1.3. MARIHUANA.

La marihuana es una droga derivada de la planta *Cannabis sativa* contiene más de 400 compuestos, además de la sustancia psicoactiva delta-9-Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) que es el metabolito principal responsable de los efectos tóxicos y medicinales^{7,8} de esta planta se encuentra en una resina dorada y pegajosa, exudada por las flores de la planta, que sirve para protección contra el calor, botánicamente existen tres variedades distintas de la planta: *Cannabis sativa*, *Cannabis indica* y *Cannabis ruderalis*.^{8, 9, 10, 11}

Esta planta se conoce desde hace por lo menos 8000 años, ya que en antiguos documentos chinos se menciona, que se hacían fibras para fabricar cordel, ropas, calzado, papel y resina que se utilizaba para poder curar algunos padecimientos;^{12,13} algunas religiones lo utilizaban como parte de sus ritos sacramentales, como el jefe de una secta de origen mahometano conocido como “el Viejo de la Montaña” se separó del islamismo, generando esta secta llamada Hashashin, los cuales entraban en éxtasis con el Hashish, que es la resina de la marihuana.^{12, 13, 14}

En los inicios del siglo XIX el consumo de la marihuana se hizo común entre los islámicos, al punto en que Napoleón al realizar su campaña por Egipto, creo una ley para restringir su uso, controlar su distribución y sancionarlo ejemplarmente, aun así el consumo se diseminó por varios países europeos.^{12, 14}

En 1924 durante la Segunda Conferencia Internacional de Opio, empezó a considerarse a la marihuana como droga peligrosa, y en 1948 la Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció que su uso es peligroso, finalmente en 1971, la DEA (Drug Enforcement Administration) ubicó a la marihuana como sustancia controlada, dentro de las drogas que no tiene uso médico y con alto poder adictivo.^{12, 14}

No obstante como muchas otras drogas psicoactivas, la marihuana se tornó extremadamente popular durante la década de los años sesentas y setentas, como método de autoexploración y experimentación por la juventud norteamericana, posteriormente y al conocerse mejor sus efectos adversos disminuyó su consumo, para luego aumentar nuevamente en la década de los años noventa.^{12, 14, 15}

Actualmente se sigue considerando una droga con un alto poder adictivo, pero en algunos países europeos como Holanda se ha legalizado el consumo, ya que recientemente han encontrado varios usos terapéuticos, mientras que en otros se ha combatido el consumo acarreado incluso problemas sociales.^{14, 15}

Recientemente se han encontrado varios usos terapéuticos y medicinales, como calmar el dolor en infartos al miocardio, en el cáncer de glaucoma, donde los analgésicos convencionales son insuficientes¹⁶ pero como toda sustancia prohibida, también tiene efectos adversos como náuseas, vómito contracción de la pupila, enrojecimiento ocular o excitabilidad, al día de hoy ya se encuentra disponible con ciertas restricciones en forma farmacéutica, y se sigue investigando otras propiedades de esta planta.

1.4. LOS CANNABINOIDES.

Actualmente, se reconocen tres tipos generales de cannabinoides:

1. Los cannabinoides herbarios o fitocannabinoides: que son sintetizados naturalmente en la planta de cannabis.
2. Los cannabinoides endógenos; producidos por organismos animales y por el cuerpo humano. (ej. Anandamidas)
3. Los cannabinoides sintéticos: producidos en un laboratorio.

Los cannabinoides naturales, cannabinoides herbáceos o cannabinoides clásicos, son conocidos únicamente ya que se producen en gran cantidad en la planta, y se concentran en la savia, pueden ser separados de la planta por extracción con disolventes orgánicos polares^{16,17} los hidrocarburos y alcoholes son muy utilizados pero bastante tóxicos; comúnmente se utiliza etanol, butano, hexano o benceno para su extracción quedando un residuo aceitoso de gran concentración de Δ^9 -THC ya que es fácilmente soluble, la mezcla puede ser separada en componentes individuales usando técnicas de destilación, o se puede esperar a que se evapore dependiendo del disolvente utilizado.¹⁹

Todos los cannabinoides son derivados de sus respectivos 2-acidocarboxílico por descarboxilación catalizados por calor, luz o condiciones alcalinas, son bastante insolubles en agua pero muy solubles en lípidos, alcoholes y otros disolventes orgánicos polares.¹⁹

Los cannabinoides fueron descubiertos en 1940, cuando por primera vez se identificó el cannabidiol, el Tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC) fue aislado por primera vez por Yechiel Gaoni y Raphael Mechoulam en el Instituto Weizman de Ciencias en Israel en 1964,^{19,20,21} se cree que estas sustancias están involucradas en el mecanismo de autodefensa de la planta, en contra de los herbívoros.

Hasta el momento se han aislado más de 450 cannabinoides procedentes de la planta, todas las clases derivan de compuestos del tipo cannabigerol (**Fig. 1**) pero dentro de los más estudiados se encuentra el Δ^9 -THC que es el componente psicoactivo más importante de la planta.^{15, 17, 19, 20}

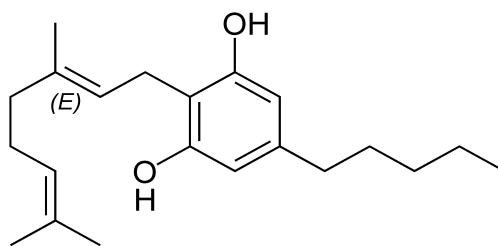


Fig. 1. Cannabigerol, producto primario de la degradación de la marihuana.

Muchos de los componentes y derivados de la marihuana pueden tener distintas formas, dependiendo de la posición del doble enlace en el anillo cíclico del carbono, esto puede causar confusión a la hora de nombrar la posición del doble enlace, además está constituido por 21 carbonos, pero no todos siguen esta regla a causa de la variación en la longitud de la cadena ligada al anillo aromático.

En el caso del Δ^9 -THC esta cadena es un pentilo (5 carbonos) pero en moléculas semejantes la cadena es sustituida por un propilo (3 carbonos).^{19, 20, 21}

1.4.1. ORIGEN QUÍMICO.

Los cannabinoides originalmente provienen de los terpenos, los terpenos se originan por polimerización enzimática de dos o más unidades de isopreno, un hidrocarburo de 5 átomos de carbono (**Fig. 2**) enlazadas de muchas maneras diferentes.^{20, 21}

La gran mayoría tienen estructuras multicíclicas las cuales difieren entre sí, no solo en su grupo funcional, sino también en su esqueleto básico de carbono.^{20,21,22}

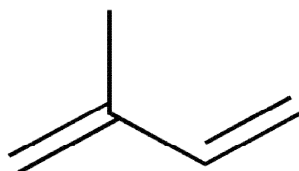


Fig. 2. Isopreno (2-metil-1,3-butadieno).

Los monómeros son unidades de isopreno, ya que la descomposición por calor de muchos terpenos da por resultado ese producto y también porque en condiciones químicas adecuadas, se puede inducir al isopreno a polimerizarse en múltiplos de 5 carbonos, generando numerosos esqueletos de terpenos, por eso se relaciona a los terpenos con el isopreno.²²

Cuando los terpenos son modificados químicamente por alguna reacción, su esqueleto hidrocarbonado, se le denomina terpenoide como la vitamina A.²² (**Fig. 3**)

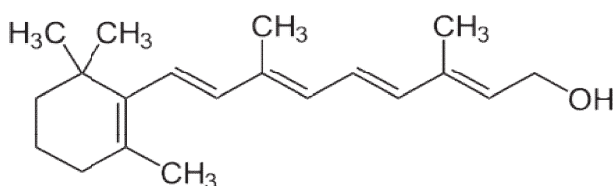


Fig. 3. Vitamina A o retinol, ejemplo claro de un terpenoide.

1.5. EL TETRAHIDROCANNABINOL (Δ^9 -THC).

El tetrahidrocannabinol, THC, Δ^9 -THC, 11-hidrox- Δ^9 -THC, o $C_{21}H_{30}O_2$ es la principal sustancia psicoactiva encontrada en las plantas de la especie *Cannabis sativa*.^{20, 21, 22}

En estado puro es un sólido vítreo a bajas temperaturas, y se torna viscoso y pegajoso al calentarlo, es poco soluble en agua (altamente hidrofóbico, Log Kow 7.61) pero se disuelve fácilmente en la mayoría de los disolventes orgánicos como el etanol o hexano, en los lípidos y alcoholes además es altamente lipofílico, posee altas propiedades de absorción en el espectro de UV-B (280-315 nm)^{20, 21, 22} (**Fig. 4.**)

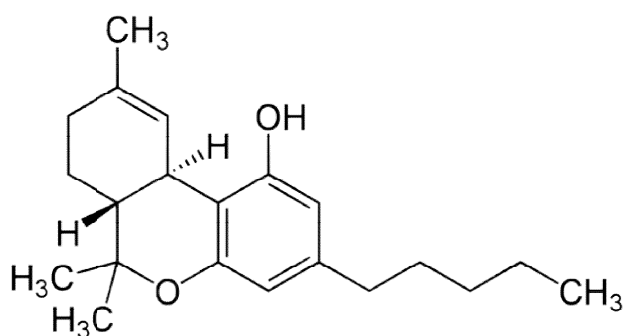


Fig. 4. Tetrahidrocannabinol, THC, Δ^9 -THC, 11-hidroxi- Δ -9-THC, o $C_{21}H_{30}O_2$ es la principal sustancia psicoactiva de la *Cannabis sativa*.

La marihuana contiene el Δ^9 -THC que es el componente psicoactivo más importante de la planta y el cual desencadena los efectos psicoactivos se tornó extremadamente popular entre la juventud durante varias décadas, posteriormente y al conocerse mejor sus efectos adversos disminuyó su consumo, para luego aumentar nuevamente en la actualidad, aun se sigue considerando una sustancia con un alto poder adictivo, en algunos países se ha legalizado el consumo de ésta.

Recientemente se han encontrado varios usos terapéuticos y medicinales, desgraciadamente tanto los atletas profesionales como los amateur lo usan con intenciones recreativas, más que con intenciones de aumentar su rendimiento en algún deporte, algunos lo usan por los efectos analgésicos, por la depresión respiratoria o incluso por la excitabilidad, de cualquier forma el consumo de esta sustancia está sancionado por las federaciones deportivas internacionales de cada país, así como, también por las autoridades encargadas de combatir el consumo de estas sustancias prohibidas en cada país, ante esto la WADA la ha incluido en la Lista de Sustancias y Métodos Prohibidos, sancionándose solo en competencia, no por ser una sustancia que provoque un aumento en el rendimiento sino por ser una sustancia moralmente no aceptada por la sociedad en ningún ámbito desgraciadamente, la sociedad de cada país dependiendo del grado de riqueza, aceptan el consumo de ciertas sustancias como la marihuana con fines de recreación, mientras que en los países en desarrollo como México, el consumo de

ésta y otras sustancias es mal visto por la sociedad, de ahí que se trate de erradicar el consumo de esta sustancia dañina entre los atletas y población en general.

El Δ^9 -THC tiene su origen químico en los terpenos, los terpenos también cumplen una función de aumentar la fijación de algunas proteínas a las membranas celulares, produciendo el efecto característico de cada una.^{19, 20, 21, 22}

Los efectos farmacológicos del Δ^9 -THC son el resultado de su vinculación con los receptores específicos membranales de cannabinoles situados en el cerebro y en todo el organismo, probablemente sea su afinidad con las sustancias lipofílicas lo que hace que el Δ^9 -THC se adhiera a la membrana de las células neuronales, una vez en su lugar éste desencadena una serie de reacciones celulares que causan el efecto que se sienten los usuarios al inhalar el humo de la marihuana.^{16, 17, 23, 24, 25}

1.6. METABOLISMO DEL TETRAHIDROCANNABINOL (Δ^9 -THC).

1.6.1. INGESTA, ABSORCIÓN Y DISTRIBUCIÓN DEL

TETRAHIDROCANNABINOL (Δ^9 -THC).

Los Cannabinoides pueden ingresar en el organismo de varias formas:

- a) Por inhalación del humo procedente de cigarrillos.
- b) Por ingestión oral de bebidas o alimentos sólidos.
- c) Por aerosoles o pulverizadores.
- d) En forma de gotas, tratamiento ocular.
- e) Por administración rectal o parenteral.

Comúnmente se consumen en forma de cigarrillos por lo que son absorbidos por los pulmones, y su grado de absorción depende de muchos factores como:

- El tipo de preparación utilizada, que puede ser sola o con otros ingredientes.
- La combustión de la mezcla, ya que algunos cannabinoides se descomponen rápidamente con el calor.
- El tiempo empleado en fumarlo ya que la duración de la inhalación y de la retención del aliento tras la aspiración, dan lugar a diferentes tiempos de contacto.

La ingestión de los cannabinoides por vía oral da lugar a niveles plasmáticos de Δ^9 -THC inicialmente bajos que cuando se inhala, por vía oral su disponibilidad se ve reducida por las condiciones gastrointestinales²³, al parecer fumar es el método más eficaz de administrar la droga con respecto a las otras. La entrada del Δ^9 -THC en sangre y la posterior distribución en los tejidos son bastante rápidas.

Solo un porcentaje del Δ^9 -THC presente en sangre está en forma libre dadas sus propiedades hidrófobas; también se une a diferentes componentes plasmáticos, otro porcentaje se une a las lipoproteínas plasmáticas y el resto a la albúmina.^{25, 26, 27, 28, 29}

En cuanto a su distribución en los tejidos corporales el Δ^9 -THC es captado del plasma en un 70% por los tejidos y el resto es metabolizado, dada su alta lipofilia penetra rápidamente en los tejidos, encontrándose elevadas concentraciones en aquellos órganos altamente vascularizados y posteriormente se redistribuye en el tejido adiposo, por lo cual puede tardar varias semanas en ser totalmente eliminada.^{26, 27, 28, 29}

1.6.2.METABOLISMO DEL TETRAHIDROCANNABINOL (Δ^9 -THC).

El metabolismo del Δ^9 -THC ocurre principalmente en el hígado, sólo una mínima cantidad de Δ^9 -THC en su forma original, es eliminada del cuerpo mientras que la mayor parte aparecen en forma de metabolitos tanto en las heces como en la orina.^{23, 24} En la orina hay una apreciable presencia de 11-OH-THC y una elevada concentración de ácido THC-11-oico, ambos en forma libre o conjugada con glucurónidos.^{26, 27, 28}

La primer reacción implicada en el catabolismo del Δ^9 -THC, es la del citocromo P-450 que oxida el cannabinoide a derivados mono-, di- o trihidroxilados, el Δ^9 -THC es rápidamente hidroxilado a 11-hidroxi- Δ^9 -THC (11-OH-THC), la hidroxilación puede producirse en más de ocho sitios diferentes, ya que existen diferentes tipos de citocromos P-450. La hidroxilación en posición 11 es la reacción más importante del Δ^9 -THC.^{23, 24, 25, 26, 27, 28, 29}

Así el 11-hidroxi- Δ^9 -THC puede oxidarse al ácido carboxílico correspondiente (ácido Δ^9 -THC-11-oico) o volver a hidroxilarse, en esta segunda vía se convierte a 8,11-dihidroxi- Δ^9 -THC que puede ser hidroxilado en una cadena lateral.

Estos compuestos hidroxilados son transformados, posteriormente a otros metabolitos más polares por rotura de la cadena lateral y oxidación en el C-11 al correspondiente ácido carboxílico.^{23, 24, 25, 26, 27, 28, 29}

La máxima concentración de 11-OH-THC es más baja que la de Δ^9 -THC y aparece cuando se deja de fumar, el ácido Δ^9 -THC-11-oico; Se detecta algunos minutos después del consumo y su concentración crece lentamente y alcanza una meseta durante un periodo prolongado de tiempo, pudiendo llegar a superar los niveles de Δ^9 -THC hasta 5 veces.^{23, 24}

Los metabolitos procedentes de la degradación de los cannabinoides son eliminados en forma de ácidos libres o conjugados con glucurónido o con ácidos grasos. Para poder realizar esta condensación es necesario que se produzca una esterificación entre los grupos hidroxilo de los cannabinoides y los grupos carboxilo de los compuestos con los que se conjugan. Los glucuronatos así formados se almacenan en el cuerpo durante períodos relativamente prolongados de tiempo y pueden llegar a ser detectados en la orina varias semanas después del consumo.^{23, 24, 26, 27, 28, 29}

Un segundo tipo de conjugación, implica la esterificación del 11-OH-THC con ácidos grasos de cadena larga como el oleico, el palmítico y el esteárico, siendo los responsables de la retención de los cannabinoides en los tejidos grasos.^{26, 27, 28, 29}

(Fig. 5.)

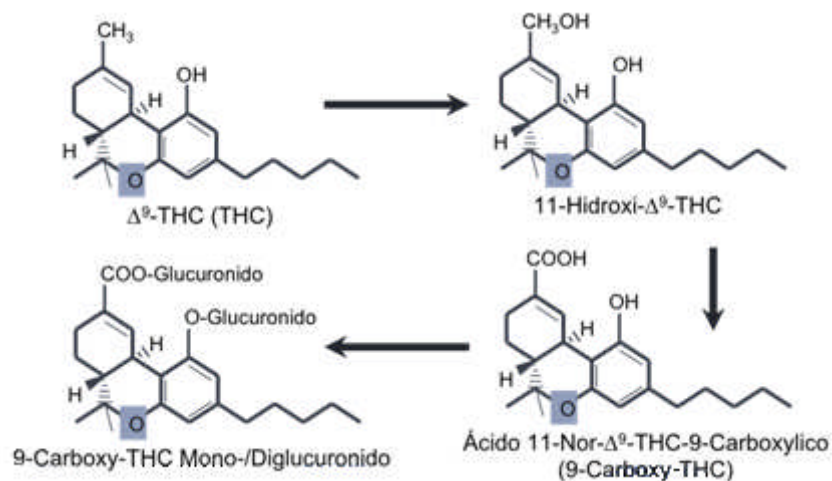


Fig. 5. Metabolismo de Δ^9 -THC.

2. FUNDAMENTOS DE CROMATOGRAFÍA.

En la industria moderna en general existen mezclas complejas que incluyen uno o más componentes activos, además de cantidad de materiales inertes, que proviene de distintas matrices biológicas como sangre, suero, orina e incluso tejidos, además de productos farmacéuticos, por esto el analista debe ser capaz de separar los componentes individuales de esas mezclas antes del análisis cualitativo y cuantitativo.³⁰

Entre las técnicas más poderosas de que dispone el analista para la caracterización de estas mezclas, existe la **Cromatografía** (chroma que significa color y graphein que significa escribir) la cual es un poderoso método de separación.^{30,31}

La cromatografía comprende un grupo de métodos para separar mezclas complejas basadas en las afinidades diferenciales de los solutos, entre dos fases no miscibles, de las cuales una de las fases es estacionaria, es una fase fija de gran área superficial, que se fija a una columna o a una superficie sólida mientras que la otra (la fase móvil), es un líquido, un gas o un fluido supercrítico, el cual se mueve a través de la superficie de la fase fija o dentro de ella, aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria, fluyen lentamente con el flujo de la fase móvil, por el contrario los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria se mueven con rapidez, lo cual provoca que los componentes de la mezcla se separen en bandas o zonas las cuales se analizan.^{30,31,32,33}

La fase estacionaria puede ser un sólido poroso o finamente dividido, o un líquido que ha sido colocado en una capa delgada sobre material de soporte inerte, es necesario que las partículas sean lo más pequeñas y homogéneas para proveer una superficie de gran tamaño, de modo que la adsorción y desorción de los solutos ocurra con frecuencia. La fase móvil, puede ser un líquido, gas o fluido supercrítico puro o una mezcla de soluciones.^{30,31}

2.1. CLASIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.

Se pueden clasificar de acuerdo con la naturaleza de las fases estacionarias y móvil; si la fase estacionaria es un sólido, el proceso se denomina cromatografía de adsorción mientras, que si es un líquido se llama cromatografía de partición, la diferencia de estas dos se puede atribuir a la naturaleza de las fuerzas que influyen en la distribución de los solutos entre las dos fases, si la fase móvil es un líquido, el proceso se denomina cromatografía líquido-sólida (CLS) pero cuando la fase móvil es un gas se llama cromatografía gas-sólida (CGS). **Tabla 1.**^{30, 31, 32}

Tabla 1. Clasificación de los Métodos Cromatográficos.

| Clasificación General | Método específico | Fase estacionaria | Tipo de equilibrio |
|--|---------------------------------|--|--|
| Cromatografía de líquidos (CL). Fase móvil: Líquida | Líquido-Líquido o reparto | Líquido adsorbido sobre un sólido | Distribución entre líquidos inmiscibles |
| | Líquido-fase unida químicamente | Sólido | Adsorción |
| | Intercambio iónico | Resina de intercambio iónico | Intercambio iónico |
| | Exclusión por tamaño | Líquido en los intersticios de un sólido polimérico | Distribución/exclusión |
| Cromatografía de gases (CG) Fase móvil: gas | Gas-líquido | Líquido adsorbido sobre un sólido | Distribución entre un gas y un líquido |
| | Gas-fase unida químicamente | Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida | Distribución entre el líquido y la superficie enlazada |
| | Gas-sólido | Sólido | Adsorción |

En la cromatografía de adsorción, la fase móvil contiene los solutos disueltos, pasa por encima de la fase estacionaria retiene los componentes y su consiguiente separación, depende de la capacidad de los átomos que se encuentran en la superficie para remover los solutos de la fase móvil y adsorberlos de manera temporaria por medio de fuerzas electromagnéticas.

En la cromatografía de partición, un material sólido inerte como el gel de sílice, la tierra de diatomeas, o aun las paredes de la columna misma sirven para sostener una capa delgada de líquido, la cual es la fase estacionaria, al paso de la fase móvil que contiene los solutos, pasa muy cerca de esta fase líquida y se produce la retención y separación a causa de la solubilidad relativa de los componentes analizados en los líquidos según lo determinen sus coeficientes de partición, ahora que si la fase móvil es un líquido ésta se denomina cromatografía Líquido-Líquido (CLL) y si es un gas se llama cromatografía Líquido-Gas (CLG).^{30, 31, 32, 33}

Existen otros tres tipos de cromatografía, en los cuales la fase estacionaria es un sólido, se clasifica de manera diferente debido a la naturaleza, éstas son la cromatografía de intercambio iónico cromatografía de exclusión por tamaño y la cromatografía de afinidad.

3. INSTRUMENTACIÓN.

3.1. COMPONENTES DEL CROMATÓGRAFO DE GASES.

Para la gran mayoría de los cromatógrafos de gases, los componentes son los mismos, los cuales son esenciales para el uso y mantenimiento de éste.(Fig. 6.)

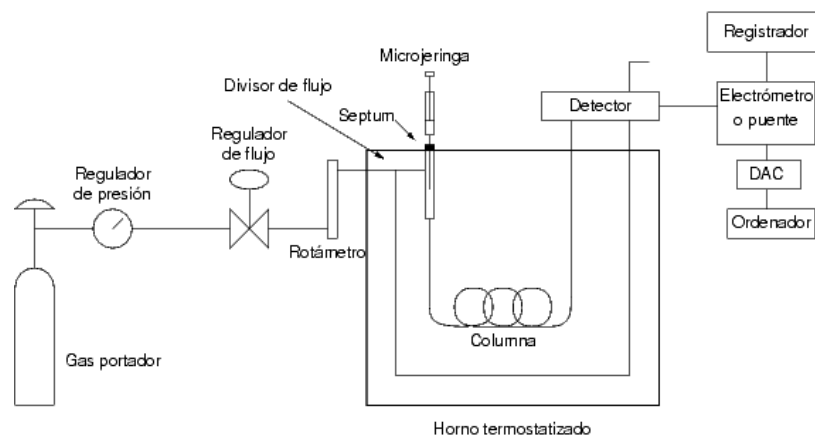


Fig. 6. Cromatógrafo de gases, representación esquemática.

3.1.1. GAS ACARREADOR.

En primer lugar se encuentra el gas transportador o acarreador sirve como fase móvil, se provee en tanques de alta presión y debe tener un sistema que regule la presión del tanque al equipo, con el fin de reducir la presión y el flujo a un nivel compatible con el instrumento y adecuado al método utilizado, este debe ser un gas inerte como helio, nitrógeno e hidrogeno, y se selecciona por el tipo de detector que se utilice.^{30, 31, 32}

3.1.2. INYECTOR.

El siguiente componente es el puerto de inyección de muestra o inyector, que es una pequeña cámara (cámara de vaporización instantánea) calentada generalmente a una temperatura superior a la de la columna (**Fig. 7.**) en la cual se hace vaporizar rápidamente la muestra antes de que entre en la columna, la muestra se introduce al centro de la corriente del gas a través de una goma auto sellante o septum, utilizando una jeringa de volumen en el orden de los micro litros.

La muestra se inyecta dentro de la cámara directamente al comienzo de la columna para reducir la difusión debida a la turbulencia, pero también las columnas capilares exigen muestras mucho menores ($\approx 1-3 \mu\text{L}$) en estos casos se emplea un sistema divisor de la muestra que permite pasar a la cabeza de la columna solamente una pequeña fracción de la muestra, desechando el resto.^{30, 31, 32} (Fig. 7.)

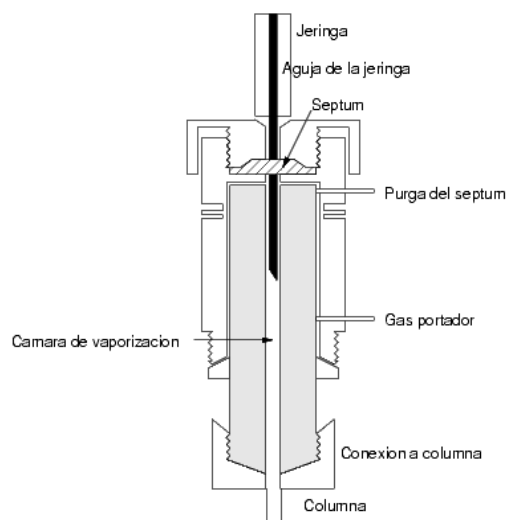


Fig. 7. Inyector para Cromatógrafo de Gas.

3.1.3. COLUMNA CROMATÓGRAFICA.

Las muestras pueden ser sólidos o líquidos, disueltos en disolventes líquidos o gases, después esta mezcla gaseosa entra en la columna, en la actualidad, en cromatografía de gases, se usan dos tipos generales de columnas capilares, las empacadas y las de tubo abierto las cuales son más eficientes varían en longitud desde menos de 10 hasta 300 metros o más, con un diámetro de 0.1 a 0.5 mm, y un espesor de película de 0.11 a 0.5 μm dependiendo el tipo de columna y su aplicación, están elaboradas en acero inoxidable o sílice fundida. En CG, la columna se encuentra ubicada dentro de un horno con temperatura controlada con una precisión de $\pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$, ya que es una variable para un trabajo preciso, la temperatura de elución depende del punto de ebullición de la muestra, de su masa molecular y de su polaridad.^{30, 31, 32}

La columna puede tener forma recta, en espiral y en forma de U, ésta se llena con un material adsorbente sólido para la CGS o en el caso de la CGL una fase líquida que cubre como una capa delgada directamente sobre las paredes o sobre un aglomerado de partículas sólidas pequeñas e inertes, dependiendo de su atracción electrostática por la superficie del sólido o sus coeficientes de partición entre los dos líquidos, los solutos son retenidos en forma temporaria por la fase estacionaria, a medida que el gas transportador continua fluyendo, las moléculas retenidas difunden de nuevo a la fase móvil.^{30, 31, 32}

3.1.4. DETECTORES.

Al final de la columna, cada uno de los solutos separados crean una mezcla binaria con el gas transportador que se mueve dentro del detector que es calentado, a un nivel superior que el de la columna para evitar la condensación de los solutos, los detectores deben cumplir con varias características como: adecuada sensibilidad, buena estabilidad y reproducibilidad, buena respuesta lineal, varias temperaturas de trabajo, tiempo de respuesta corto, confiable y de manejo sencillo, respuesta selectiva a varios analitos.^{30, 31}

El detector es un aparato que convierte alguna propiedad física del soluto, como ejemplo la conductividad térmica, la capacidad de ionizarse o la de capturar electrones emana una señal eléctrica que es proporcional a la cantidad de soluto en el gas transportador, ésta señal se amplifica electrónicamente y se envía a un registrador adecuado que produce un registro gráfico del nivel de la señal eléctrica contra el tiempo (cromatograma) ésta se envía comúnmente a una computadora la cual almacena los resultados obtenidos.^{30, 31, 32} **(Fig. 8.)**

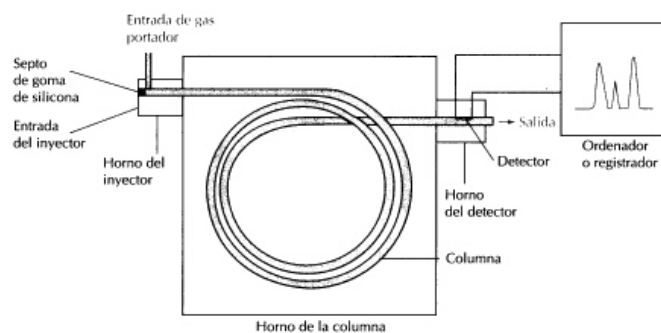


Fig. 8. Diagrama esquemático de un Cromatógrafo de Gases.

3.2. INTERPRETACIÓN DE CROMATOGRAMAS.

3.2.1. ANÁLISIS CUALITATIVO.

Los métodos cromatográficos por sí mismos, pueden determinar los compuestos químicos que están presentes en una mezcla pero nunca informa su naturaleza, por ende a pesar de estas limitaciones gracias al análisis cualitativo y cuantitativo, se indican ciertos parámetros de retención de un compuesto, evidentemente, los parámetros de retención de un compuesto dependen de un gran número de variables,^{30, 31} por lo que la identidad entre analitos y patrones solamente puede ser establecida para un sistema dado y en un momento dado, lo que hace muy trabajosa la identificación de una sustancia por este método.

Teniendo en cuenta estas limitaciones, el mejor método para realizar un análisis cualitativo es, la comparación directa de los parámetros de retención de los picos de la muestra con los de sustancias patrón, en el mismo sistema cromatográfico, bajo las mismas condiciones de trabajo.^{30, 31, 32}

Algunos de los parámetros que permiten corregir la variabilidad inducida por determinadas condiciones son: tiempos o volúmenes de retención corregidos, factores de capacidad y tiempos de retención relativos.^{30, 31} De entre estos parámetros, los dos primeros permiten corregir las diferencias de retención debidas a los volúmenes muertos de cada sistema.

Y los tiempos de retención relativos se definen mediante la ecuación:

$$T_r = t/t_p$$

Ec.1. *Tiempo de retención relativo.*

Donde **t** es el tiempo de retención del compuesto que se trata de identificar y **t_p** el tiempo de retención de un compuesto que se toma como patrón.³¹

La utilización de esta ecuación permite eliminar todos los factores de variabilidad, salvo los que pueden afectar a los valores de K' (naturaleza de la fase estacionaria, naturaleza de la fase móvil y temperatura), por lo que este parámetro es el más adecuado para la identificación cualitativa de compuestos en base a los datos bibliográficos.

Este tipo de técnicas permite realizar una identificación negativa, es decir, permiten asegurar con absoluta certeza que un compuesto determinado no se encuentre presente en una mezcla pero, por el contrario, no permiten nunca asegurar la presencia de un compuesto, ya que no se puede excluir la posibilidad de que dos compuestos diferentes presenten los mismos parámetros de retención sobre un sistema dado.^{30, 31}

3.2.2. ANÁLISIS CUANTITATIVO.

Como se ha mencionado anteriormente, las técnicas de análisis cualitativo ofrecen escasas posibilidades, pero como técnica cuantitativa son enormes, lo que permite un análisis directo de muestras que de otra manera serían muy difíciles de cuantificar.³¹ Esto también gracias a la ayuda de los nuevos detectores que ofrecen una respuesta muy fácil de relacionar con la cantidad de analito contenida en la sustancia analizada.

La medida del área o de la altura del pico cromatográfico, es el factor más importante a la hora de realizar un análisis cuantitativo.³⁰ La utilización de la altura de pico para la cuantificación es de gran utilidad pero únicamente proporciona una exactitud aceptable en cromatogramas que presenten picos bien definidos, agudos, estrechos y simétricos, siendo un procedimiento de uso más general.

Existen multitud de métodos que permiten medir las áreas bajo los picos cromatográficos, aunque la medida por medio de integración electrónica es por mucho la más utilizada.³⁰ Este método es un dispositivo de naturaleza digital, digitaliza la señal analógica proporcionada por el detector, detecta el comienzo y el final de cada pico cromatográfico integra digitalmente el área bajo la curva y corrige automáticamente la línea base, también se puede corregir los errores de la integración automática, modificándolo manualmente, en caso de ser necesario.³⁰

Otro método utilizado es el área relativa o método de estándar interno, que también permite corregir las diferencias del área debidas a las variaciones en la inyección de cada muestra.^{30, 31}

Se define mediante esta ecuación:

$$A_{\text{Relativa}} = A_{\text{Muestra}} / A_{\text{Estándar interno}}$$

Ec. 2. Área relativa.

Donde $A_{\text{Estándar interno}}$ es el área del estándar o patrón, y A_{Muestra} es el área de la muestra que se trata de identificar. La utilización permite eliminar todos los factores de variabilidad, a la hora de la inyección de la muestra.^{30, 31}

3.3. ESTÁNDAR EXTERNO E INTERNO.

El estándar externo, consiste en inyectar en el equipo volúmenes constantes de disoluciones conocidas y crecientes del compuesto que se pretende cuantificar, se representa la cantidad de compuesto frente al tamaño del pico obteniéndose una línea recta, a partir de esta recta es posible cuantificar de la muestra desconocida, por interpolación gráfica.^{30, 31, 32, 33}

El estándar interno, se utiliza con frecuencia para compensar posibles errores derivados de la manipulación de la muestra, consiste en añadir una cantidad conocida de un compuesto patrón a la muestra a analizar antes de realizar con ella cualquier manipulación, así en el cromatograma aparecerá el analito y el estándar interno y la relación entre ambos podrá calcularse.^{30, 31}

4. TIPOS DE DETECTORES EN CROMATOGRAFÍA DE GASES.

4.1. CONDUCTIVIDAD TÉRMICA (TCD).

Su función se fundamenta en los cambios de conductividad térmica de la corriente de gas producida por las moléculas del analito, consiste en un elemento Platino (Pt), Oro (Au), o Wolframio (W) el cual se calienta y cuya temperatura depende de la conductividad térmica del gas que en este caso es el de Helio (He) e Hidrogeno (H₂), ya que su conductividad es mayor, así en presencia de cantidades de materia orgánica la conductividad disminuye y la temperatura del detector aumenta.^{30, 31, 32}

4.2. IONIZACIÓN DE LLAMA (FID).

Este efecto basa su funcionamiento en que los compuestos orgánicos, al exponerlos a una llama de H₂/Aire, se pirolizan, produciendo iones y electrones que conducen la electricidad a través de la llama y la señal depende del número de átomos de carbono que entran en el detector por unidad de tiempo, por lo que es más sensible a la masa que a la concentración.^{30, 31, 32}

4.3. CAPTURA ELECTRÓNICA (ECD).

Su función se fundamenta en el efluente que pasa sobre un emisor β de Niquel 63 y un electrón provoca la ionización del gas portador, así en ausencia de especies orgánicas, se obtiene una corriente constante, pero en presencia de ellas esta corriente disminuye por su tendencia a capturar electrones.^{30, 31, 32}

4.4. DETECTOR DE NITRÓGENO-FÓSFORO (NPD).

El detector de llama alcalina, o de nitrógeno fósforo, es un detector de ionización de llama modificado, que es especialmente sensible a compuestos que contienen nitrógeno y fósforo, comúnmente usado para hidrocarburos, pesticidas y medicamentos.^{30, 31, 32}

4.5. ESPECTROMETRÍA DE MASAS (EM).

Un espectrómetro de masas es un instrumento que genera iones en un ambiente de alto vacío, que se desplazan rápidamente según su relación masa/carga (m/z), la gran mayoría de iones presentan una sola carga de modo que la relación m/z se convierte en la masa de cada ión fragmento formado.^{30, 31, 32}

Es una técnica cuantitativa muy sensible y altamente selectiva, el tamaño de la muestra generalmente es muy pequeña microgramos a nano gramos y los patrones son altamente reproducibles, las principales limitaciones son el costo relativamente alto, la necesidad de profesionales en el uso y para la correcta interpretación de datos, el mantenimiento apropiado del equipo.^{30, 31}

En la actualidad la EM se ha convertido en una importante herramienta en diversos aspectos del desarrollo analítico.³²

La muestra que por diferentes técnicas se convierte en iones gaseosos mediante el bombardeo por un haz de electrones, fotones, iones o moléculas, lo lleva a un estado iónico gaseoso constituido por un ión padre y diversos fragmentos iónicos de la molécula original, luego este flujo de iones positivos o negativos, son acelerados y separados de acuerdo con su masa/carga (m/z) dentro del analizador de masa, así el flujo de iones llega al detector que convierte el haz de iones en una señal eléctrica para que sea procesada y registrada.^{30, 31, 32}

El espectro de masas registra la cantidad de diferentes tipos de iones formados en condiciones específicas graficadas contra la relación m/z , así el espectro de cada compuesto es único e irreplicable y por lo tanto puede proporcionar información valiosa en cuanto a la estructura molecular y en muchos casos hasta en una medición exacta en su peso molecular.^{30, 31, 32}

4.5.1. ACOPLAMIENTO CG/EM.

El análisis de espectrometría de masas es una poderosa herramienta en el análisis de muestras, pero es insuficiente para el análisis de mezclas debido al gran número de fragmentos con diferentes valores de m/z producidos en cada caso, el espectro resultante es tan complejo que es imposible de leer.^{30, 31} Por esta razón, se han desarrollado varios métodos en los cuales el espectrómetro de masas está acoplado a un sistema de separación eficaz.

La cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG/MS) se ha convertido en una poderosa herramienta para el análisis de mezclas complejas. El Cromatógrafo de Gases separa las muestras, para su posterior análisis e identificación en el Espectrómetro de Masas, ya después son almacenados en una computadora para el análisis de la muestra, el mayor problema que reside en esta técnica, es que la

muestra en la columna se encuentra muy diluida por el gas portador, a lo cual se han desarrollado métodos que resuelven este problema.^{30, 31, 32}

5. DISEÑO DE EXPERIMENTOS.

Los experimentos son una serie de pruebas que se realizan en todas las disciplinas científicas y son parte fundamental del proceso de descubrimiento y aprendizaje, del cual se extraen conclusiones confiables acerca del mismo experimento, por ello desempeña un papel fundamental en la solución de problemas.³⁴

Existen varias posibilidades y aplicaciones potenciales para el uso de diseño de experimentos, algunas podrían ser:

- Resolución de problemas de un proceso.
- Desarrollo y optimización de procesos.
- Evaluación de materiales alternativos.
- Pruebas de funcionamiento.
- Configuración del diseño del producto.
- Determinación de tolerancia de los componentes.

Estos problemas se resuelven eficientemente y gracias a ellos es posible reducir, los costos de mejorar el producto, servicio o pruebas.^{34, 35}

Prácticamente en todos los campos de estudio se llevan a cabo experimentos, para descubrir algo, acerca de un proceso, en general un experimento puede definirse como una prueba o serie de pruebas en la que se hacen cambios deliberados en las variables de entrada, para observar e identificar las razones de los cambios que pudieran observarse en la respuesta de salida.^{34, 35} **(Fig. 9.)**

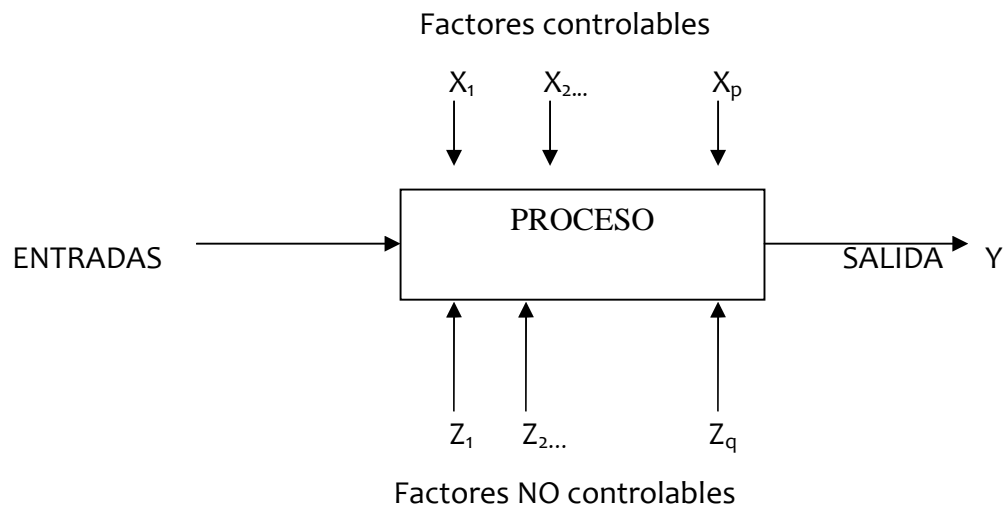


Fig. 9. Modelo general de un proceso o sistema.

En un experimento cual fuese, nos interesa determinar cuáles factores afectan la respuesta, el siguiente paso lógico consiste en determinar qué factores conducen a una respuesta óptima, pero en cualquier experimento, los resultados y las conclusiones que puedan sacarse depende en gran medida de la manera en que se recabaron los datos, es muy importante saber recabar los datos.^{35, 36}

Al llevar a cabo un experimento con la mayor eficiencia posible, es necesario utilizar un enfoque científico para planearlo. El diseño estadístico de procesos, se refiere al proceso para planear el experimento de tal forma que se recaben datos adecuados que puedan analizarse con métodos estadísticos que lleven a conclusiones válidas y objetivas.^{34, 35, 36}

Para aplicar el enfoque estadístico en el diseño y análisis de un experimento, es necesario que todos los que participan tengan la idea clara de que es exactamente lo que va a estudiarse, como se colectaran los datos y al menos la comprensión de la forma en que van a analizarse estos datos.³⁷

En el presente trabajo se propone un desarrollo de experimentos 2^n para evaluar el efecto de las principales variables de influencia (Hidrólisis, pH, disolvente, y efecto

Santing Out) en la determinación de Δ^9 -THC y sus principales metabolitos en muestras de orina humana.

5.1. MATRICES BIOLÓGICAS.

La calidad de los resultados de los análisis clínicos y analíticos de muestras biológicas de pacientes y en este caso de atletas para el control del dopaje, comienza con una solicitud de análisis o de control de dopaje y una correcta obtención de la muestra, que puede ser sangre, suero, orina, saliva, líquido cefalorraquídeo, heces e incluso cabello, dependiendo del análisis. Es de igual importancia su manipulación, conservación, transporte, y procesado, una buena metodología de trabajo por parte del personal para asegurar la fiabilidad de los datos obtenidos reduciendo al mínimo errores que conllevan al rechazo de la muestra, repetición del análisis y un perjuicio en la calidad del servicio.³⁸

En este caso en el control de dopaje comúnmente se utiliza más como matriz biológica la orina, y en segundo lugar la sangre y el suero.^{38, 40}

La orina es uno de los fluidos resultantes del metabolismo y su análisis aporta información rápida, su obtención es relativamente fácil, lo que hace que sea una prueba fundamental en el control de dopaje, la muestra se analiza de varias maneras y con diversos objetivos, por ejemplo el abuso de drogas, medicamentos, y análisis clínicos.³⁸

Cuando obtenemos una muestra de orina primero realizamos un examen macroscópico, esto se complementa con el análisis de sustancias anormales ajenas al organismo, por métodos analíticos, al paso de las 24 horas del día, estas sustancias varían dependiendo de la ingesta y actividad del paciente, por eso es de gran importancia conocer que sustancias conforman la orina, así de esta manera no tendremos ninguna interacción en el análisis por parte de ésta.^{38, 39}

5.2.VARIABLES EN LA PREPARACIÓN DE MUESTRAS.

Las variables que se presentan a continuación, fueron evaluadas para cada metabolito y se eligieron intervalos altos y bajos de cada una para incluirlos en el modelo estadístico de diseño de experimentos y de esta forma encontrar las mejores condiciones para la determinación de Δ^9 -THC y sus principales metabolitos.

5.2.1.HIDRÓLISIS.

Es una reacción ácido-base de un anión o un catión con el agua, una molécula reacciona con otra molécula de agua en la cual sus átomos se dividen y pasan a la otra molécula.⁴⁰ En hidrólisis enzimática ocurre lo mismo solo que la molécula de agua es sustituida por una enzima la cual ejerce un efecto catalítico hidrolizante, es decir producen una ruptura en el enlace de la molécula a hidrolizar, a este tipo de enzimas se les conoce como hidrolasas, pero comúnmente se les asigna el nombre de sustrato seguido de la palabra hidrolasa y cuando la enzima es específica para separar un grupo en particular, este puede utilizarse como prefijo.⁴⁰ Este tipo de enzimas actúa en un rango de pH específico en el cual su trabajo es óptimo, al no encontrarse en este rango la enzima no actúa y se desactiva.^{40, 41}

5.2.2. SALTING OUT.

El salting out es un fenómeno que mejora la extracción de un soluto, ya sea orgánico o inorgánico, de una fase acuosa hacia una orgánica mediante la adición de una sal, la cual permanece preferentemente en la fase acuosa.^{40, 41}

Por ejemplo, si el ácido acético es distribuido entre el éter y el agua, la concentración de equilibrio en el éter puede ser incrementada añadiendo acetato de sodio a la capa acuosa, así “el equilibrio de extracción puede ser alterado profundamente, y procesos de extracción útiles que de otra forma serían imposibles de llevarse a cabo, pueden resultar”. Este proceso es muy utilizado para deshidratar compuestos orgánicos.^{40, 41}

5.2.3. pH.

El pH es una medida de acidez o alcalinidad de una sustancia, este indica la concentración de iones hidronio $[H_3O^+]$ presentes en determinadas sustancias.

La sigla pH significa potencial hidrógeno y se define como el logaritmo negativo en base 10 de la concentración de los iones hidrógeno.

$$pH = -\log_{10}[H^+]$$

Ec. 3. Ecuación pH.

Por ejemplo, una concentración de $[H_3O^+] = 1 \times 10^{-7} \text{ M}$ (0,0000001) es simplemente un pH de 7 ya que: $pH = -\log[10^{-7}] = 7$.

La escala de pH va de 0 a 14 en disolución acuosa, siendo ácidas las disoluciones con pH menores a 7 y alcalinas las que tienen pH mayores a 7, siendo el pH 7 el valor neutro del agua.^{40, 41}

Por ejemplo el ácido de batería de automóviles tiene valores cercanos de pH menores que uno, mientras que el hidróxido de sodio varía de 13 a 14, mientras que los fluidos biológicos como la orina esta de un rango de 4 a 7, si se encuentra alguna otra sustancias ajena al organismo el pH puede variar aún más, incluso siendo a veces mortal.^{40, 42}

5.2.4. EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO.

Cuando un soluto se distribuye entre dos líquidos inmiscibles, existe una relación definida entre las concentraciones en las dos fases en el equilibrio, estos son los principios de la ley de distribución, cuando señalo que un soluto se distribuirá entre dos líquidos inmiscibles en tal forma, que la relación entre las concentraciones en el equilibrio es constante a una temperatura en particular.^{40, 41,}

⁴²

En bastantes casos esta relación no es exacta, lo que se mantiene constante es la relación entre las actividades en lugar de la relación entre las concentraciones, a lo que se traduce que la actividad de una especie química en una fase mantiene una relación constante con la actividad de esta misma especie en la otra fase líquida, a esta relación se le llama coeficiente de distribución de la especie, y se puede utilizar la concentración en vez de la actividad del analito.^{41, 42}

$$K_{DA} = a_{A1} / a_{A2}$$

Ec. 4. Ecuación de coeficiente de distribución.

5.2.5. DERIVATIZACIÓN.

En cromatografía de gases es frecuente encontrar muestras que no se pueden analizar de forma directa, ya sea por no ser volátiles, inestables térmicamente, ser sumamente volátiles o tener una polaridad elevada, lo cual produce picos cromatográficos deformados (coleados), debido a las interacciones fuertes de los grupos funcionales polares con la fase estacionaria.^{40, 43}

Para superar este tipo de problemas, existen técnicas especiales tales como la pirólisis y la formación de derivados. Con el objeto de mejorar sus propiedades cromatográficas, en general los reactivos derivatizantes más utilizados son los acilantes, metilantes o sililantes, es de suma importancia que dichas reacciones puedan llevarse a cabo selectivamente además de ser cuantitativas en los casos requeridos, este tratamiento puede ser necesario para 1) disminuir la polaridad de las especies, 2) aumentar la respuesta del detector y la selectividad de la respuesta 3) aumenta la volatibilidad, 4) aumenta la estabilidad térmica de las moléculas, 5) mejora la fragmentación y 6) aumenta la sensibilidad.^{40, 41, 42, 43}

Para los esteroides y otros compuestos análogos que no pueden ser fácilmente analizados por Cromatografía de Gases, debido a que no son lo suficientemente volátiles o se descomponen en temperaturas altas, se forman derivados para los cuales se utilizan reactivos denominados agentes silantes ya antes mencionados, como el: N-trimetilsililimidazol (TSIM), N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA), y N,O-bis(trimetilsilil)acetamida (BSA), estos agentes derivatizantes reaccionan con compuestos orgánicos que tienen protones ácidos, como los alcoholes, las aminas, los ácidos carboxílicos o los tioles para producir los correspondientes éteres, sililaminas, ésteres o tioéteres.^{40, 43}

Debido a la polaridad reducida, los derivados tienen mayor volatilidad y estabilidad que los compuestos originales, y eluyen de la columna con mayor rapidez, además de ser útiles como agentes productores de derivados, estos compuestos silantizantes se usan para desactivar soportes sólidos y superficiales de columnas de vidrio, en estas aplicaciones reaccionan con facilidad con los grupos silanol (-Si-OH) ubicados sobre la superficie, bloqueando de esta manera los sitios polares que interfieren con el proceso de derivatización.^{40, 41, 43}

En el presente trabajo, el derivatizante utilizado para mejorar el análisis por Cromatografía de Gases del Δ^9 -THC y sus principales metabolitos fue una mezcla de MSTFA:NH₄I, Ditioneolol en proporción 1000:2:1 v/p/p, el cual mejora la volatilidad, la estabilidad y el análisis cromatográfico de los compuestos analizados.^{40, 43}

5.3. DISEÑO FACTORIAL.

Como se sabe los experimentos incluyen muchas veces varios factores habitualmente uno de los objetivos de la persona que realiza un experimento, es determinar la influencia que tienen estos factores sobre la respuesta de salida del sistema, pero no sólo eso es necesario, se necesita planear y llevar a cabo el experimento, a lo cual llamamos estrategia de experimentación, el cual el experimentador debe utilizar varias herramientas.⁴⁴

Una estrategia es el enfoque de un factor a la vez, este método consiste en seleccionar un punto de partida o línea base de los niveles, para cada factor, para después variar sucesivamente cada factor en su rango manteniendo constantes los factores restantes en el nivel base, al haber concluido las pruebas, se construyen una serie de gráficas en las que se muestra la forma en que la variable de respuesta es afectada al variar cada factor manteniendo las demás constantes.^{44,45}

La desventaja principal de la estrategia de un factor es, que no puede tomar en consideración cualquier posible interacción entre los factores. Hay una interacción cuando uno de los factores no produce el mismo efecto en la respuesta con niveles diferentes de otro factor. Las interacciones entre los factores son muy comunes y en el caso de existir, la estrategia de un factor a la vez casi siempre producirá resultados deficientes, comúnmente este tipo de experimentos son menos eficientes.^{44, 45}

El enfoque correcto para trabajar con varios factores es conducir un experimento factorial, en la cual los factores se hacen variar en conjunto, en lugar de uno a la vez. Una característica muy importante en este tipo de experimentos, es que se hace el uso más eficiente de los datos.

En resumen, los diseños factoriales ofrecen varias ventajas, son más eficientes que los experimentos de un factor a la vez, además, un diseño factorial es necesario cuando puede haber interacciones presentes a fin de evitar llegar a conclusiones incorrectas, y por último los diseños factoriales permitan la estimación de los efectos de un factor con varios niveles de los factores restantes, produciendo conclusiones que son válidas para un rango de condiciones experimentales.^{44, 45}

6. MODELO ESTADÍSTICO.

- 1) Definir la variable de respuesta a ser medida.

La variable de respuesta es el **Área Relativa de cada experimento**.

$$A_{\text{Relativa}} = A_{\text{Muestra}} / A_{\text{Estándar interno}}$$

Ec. 5. Área relativa.

- 2) Se definieron los factores experimentales que se van a variar, en el modelo estadístico que proporcionó el software estadístico Statgraphics predijo que el proceso sería Factorial, aleatorio con variables continuas controlables asignándoles nombre, unidades, niveles alto y bajo, a cada uno de los factores, a continuación se muestra los factores experimentales aleatorios a desarrollar y optimizar.

Tabla. 2. Factores experimentales a variar y ser medidos en el modelo estadístico y experimental.

| Nombre | Unidades | Bajo | Alto |
|----------------------|----------|----------------|------------|
| A: Hidrólisis | % | 10 (β) | 100 (KOH) |
| B: pH | pH | 5 | 9 |
| C: Disolvente | % | 10 (Éter) | 90 (Étilo) |

3) Selección de diseño experimental.

El programa StarGraphics® seleccionó un diseño factorial aleatorio, con 2 repeticiones y un total de 36 ejecuciones, seleccionando 20 por el método de uno hacia atrás, las cuales se realizaron experimentalmente a continuación se presentan:

Tabla 3. Matriz de variables a realizar experimentalmente.

| No. Ejecución | Hidrólisis | pH | Disolvente |
|---------------|-----------------------|----|--------------------|
| 1 | β Glucuronidasa | 9 | Tercbutilmetileter |
| 2 | β Glucuronidasa | 5 | Tercbutilmetileter |
| 3 | KOH | 5 | Tercbutilmetileter |
| 4 | KOH | 5 | Acetato de Etilo |
| 5 | KOH | 9 | Acetato de Etilo |
| 6 | β Glucuronidasa | 9 | Acetato de Etilo |
| 7 | β Glucuronidasa | 5 | Acetato de Etilo |
| 8 | KOH | 9 | Tercbutilmetileter |
| 9 | β Glucuronidasa | 9 | Acetato de Etilo |
| 10 | KOH | 5 | Tercbutilmetileter |
| 11 | KOH | 5 | Acetato de Etilo |
| 12 | β Glucuronidasa | 5 | Tercbutilmetileter |
| 13 | KOH | 9 | Acetato de Etilo |
| 14 | β Glucuronidasa | 9 | Tercbutilmetileter |
| 15 | β Glucuronidasa | 9 | Tercbutilmetileter |
| 16 | β Glucuronidasa | 5 | Tercbutilmetileter |
| 17 | KOH | 5 | Acetato de Etilo |
| 18 | β Glucuronidasa | 5 | Acetato de Etilo |
| 19 | KOH | 9 | Acetato de Etilo |
| 20 | KOH | 9 | Tercbutilmetileter |

7. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La información existente sobre los efectos provocados por el consumo de Marihuana y de su principal sustancia psicoactiva Δ^9 -THC como lo son la sedación, euforia, depresión, alucinaciones, afectación en las funciones cognitivas y psicomotrices, lo cual deriva en el relajamiento muscular y en hipotensión ortostática, ubican a esta sustancia dentro de la lista prohibida por la WADA, sin embargo los métodos para confirmar la presencia de Δ^9 -THC presentan variabilidad importante y poca reproducibilidad.

Considerando lo anterior, es necesario estudiar el efecto de las principales variables que afectan el proceso de preparación de muestras para el análisis de Δ^9 -THC Δ^9 -THC-COOH y 11-OH-THC como son: Hidrólisis, Salting out, pH y disolvente (extracción Líquido-Líquido), con objeto de establecer una metodología cromatográfica de análisis confiable y reproducible, para su determinación y cuantificación en orina humana, como parte del control de dopaje deportivo y de esta forma prevenir el uso de esta sustancia prohibida y otros narcóticos.

Por lo anterior surge la siguiente pregunta de investigación:

¿Existe interacción de la Hidrólisis, Salting out, pH y cambio de disolvente en la determinación cromatográfica de Δ^9 -THC en orina de atletas de alto rendimiento para el control de dopaje?

8. OBJETIVOS.

GENERAL.

- Desarrollo y optimización de un método analítico a partir del compuesto inalterado Δ^9 -THC y de sus metabolitos principales (Δ^9 -THC-COOH y 11-OH-THC) en orina humana por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.

PARTICULARES.

- Desarrollo y optimización de un procedimiento de preparación de muestra para la determinación de Δ^9 -THC y sus metabolitos principales (Δ^9 -THC-COOH y 11-OH-THC) en orina humana, los parámetros a evaluar serán: hidrólisis, extracción, influencia de pH y efecto “salting out”.
- Optimización de un método cromatográfico por CG/EM, para la identificación y cuantificación de Δ^9 -THC y metabolitos principales (Δ^9 -THC-COOH y 11-OH-THC) en los extractos de orina humana.

9. HIPÓTESIS.

A partir del desarrollo y optimización de un método de extracción selectivo y específico para Δ^9 -THC y sus metabolitos principales (Δ^9 -THC-COOH y 11-OH-THC) en muestras de orina humana, se podrá implementar y optimizar una metodología analítica eficaz, para su identificación y cuantificación en muestras de orina humana y con ello obtener resultados confiables y reproducibles en el proceso de control de dopaje en deportistas de alto rendimiento.

10. DISEÑO EXPERIMENTAL.

a. TIPO DE ESTUDIO.

Experimental, Prospectivo, Transversal, Descriptivo.

b. POBLACIÓN EN ESTUDIO.

Las orinas de atletas de alto rendimiento, dentro y fuera de competencia de las diferentes disciplinas que se practican en México.

c. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN.

En este estudio se incluyen muestras de orina de individuos que consumen Δ^9 -THC y que generen resultado adverso a Δ^9 -THC y sus metabolitos mencionados, por lo tanto se excluyen las muestras que den resultado negativo a Δ^9 -THC.

11. MATERIAL E INSTRUMENTOS.

11.1. MATERIALES.

Tubos de ensayo, viales, insertos, puntas varios volúmenes, centrifuga, vórtex, agitador oscilatorio, baño seco, desecador.

11.2. INSTRUMENTOS.

- Cromatógrafo de Gases.
7890 GC System Agilent Technologies.
5975C inert XL MSD con detector de Triple Axis.
7693 Autosampler inyector.
- Estufa 1250 Marca Binder.
- Baño criogénico de recirculación Modelo 11805 VWR.
- Evaporador Turbo Vap LV Biotage.
- Baño seco Thermo line Dri-bath.
- Potenciómetro Mettler Toledo seven easy 8603.

12. VARIABLES A DESARROLLAR EN LA METODOLOGÍA ANALÍTICA.

Las principales variables de influencia en el presente estudio y que a continuación se presentan, fueron evaluadas de forma individual y posteriormente en conjunto por medio del diseño de experimentos propuesto, para conocer de esta manera la interacción entre cada una de ellas y como afectaban la determinación del Δ^9 -THC y sus principales metabolitos (Δ^9 -THC-COOH y 11-OH-THC) por medio del software Statgraphics Centurion XVI. Variables evaluadas:

- **Hidrólisis:** Se probó la hidrólisis alcalina con KOH 10M y otra con la enzima β -Glucuronidasa, para saber cuál es más eficiente.

- **Cantidad de sal (Salting out):** Se probaron diferentes volúmenes de la solución salina al 36%; 0, 250, 500 y 1000 μ l, esta para favorecer el efecto de salting out.

- **pH de la extracción:** Se cambió el pH de la muestra a 5, 7 y 9, con diferentes disoluciones amortiguadoras.

- **Disolvente para extracción:** Se experimentó con 3 diferentes disolventes, Acetato de etilo, Cloroformo, y Terc-butilmetileter los cuales tienen diferentes polaridades y afinidades por el Δ^9 -THC y sus metabolitos.

12.1. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS.

12.1.1 MÉTODO CROMATOGRÁFICO DE RUTINA.

Columna capilar: (fase estacionaria 100% metilsilicon, diámetro interno 0.2 mm, espesor de película 0.11 µm. Longitud 25 metros marca Agilent.

Gas portador: Helio.

Flujo de gas portador: 0.8 mL/min.

Temperatura del inyector: 280°C

Volumen de inyección: 1 µL

Temperatura de la línea de transferencia: 270°C

Programa de temperatura del horno: Inicial 130°C durante 14 min, con una rampa de 10°C/min hasta una temperatura final de 270°C

Relación de split 10:1

Tiempo de análisis: 15 minutos.

12.1.2. MÉTODO CROMATOGRÁFICO MODIFICADO.

Columna capilar: (fase estacionaria 100% metilsilicon, diámetro interno 0.2 mm, espesor de película 0.11 µm. Longitud 25 metros marca Agilent.

Gas portador: Helio.

Flujo de gas portador: 1.0 mL/min.

Temperatura del inyector: 280°C

Volumen de inyección: 1 µL

Temperatura de la línea de transferencia: 280°C

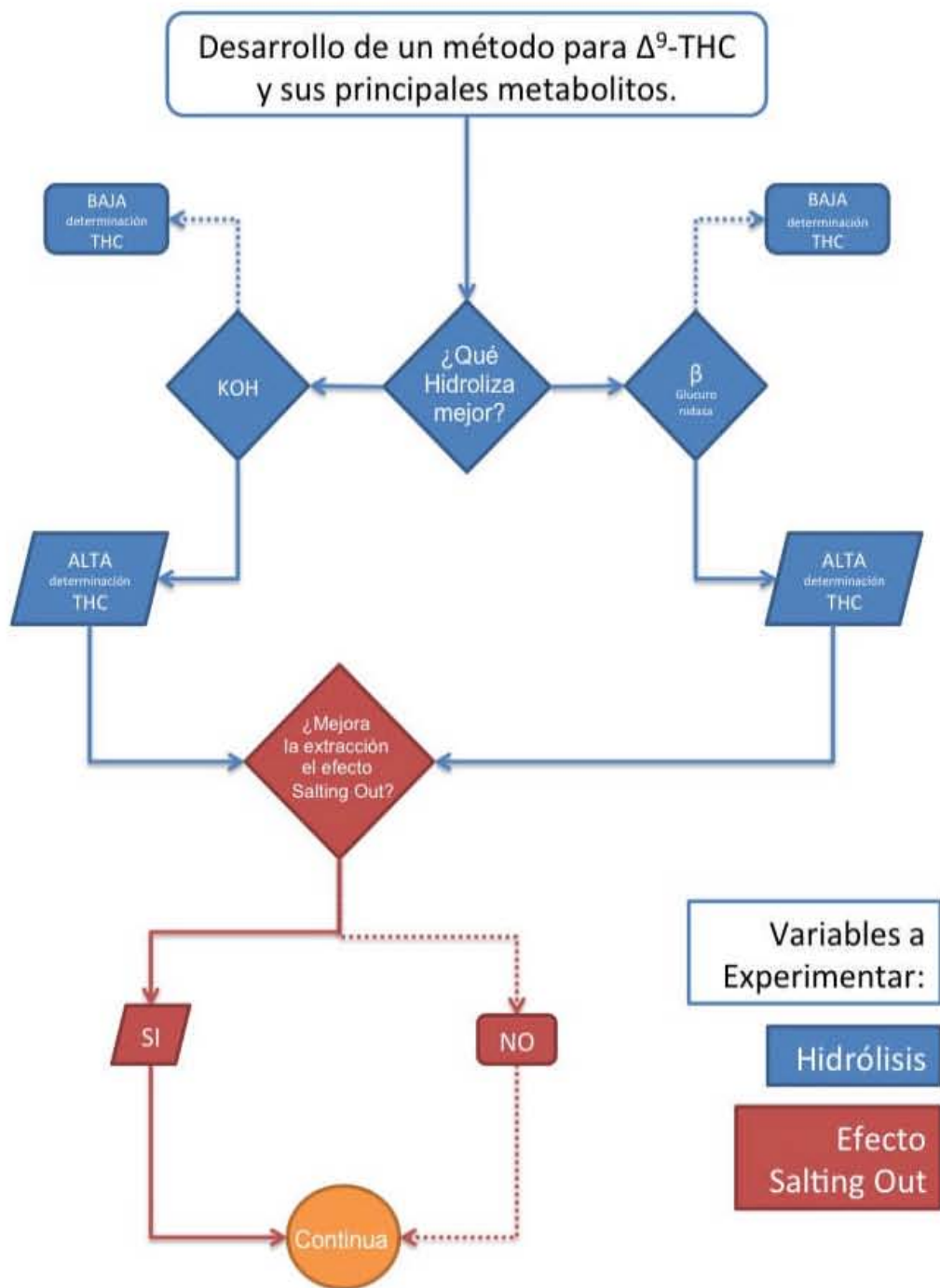
Programa de temperatura del horno: Inicial 200°C durante 10 min, con una rampa de 25°C/min hasta una temperatura final de 280°C.

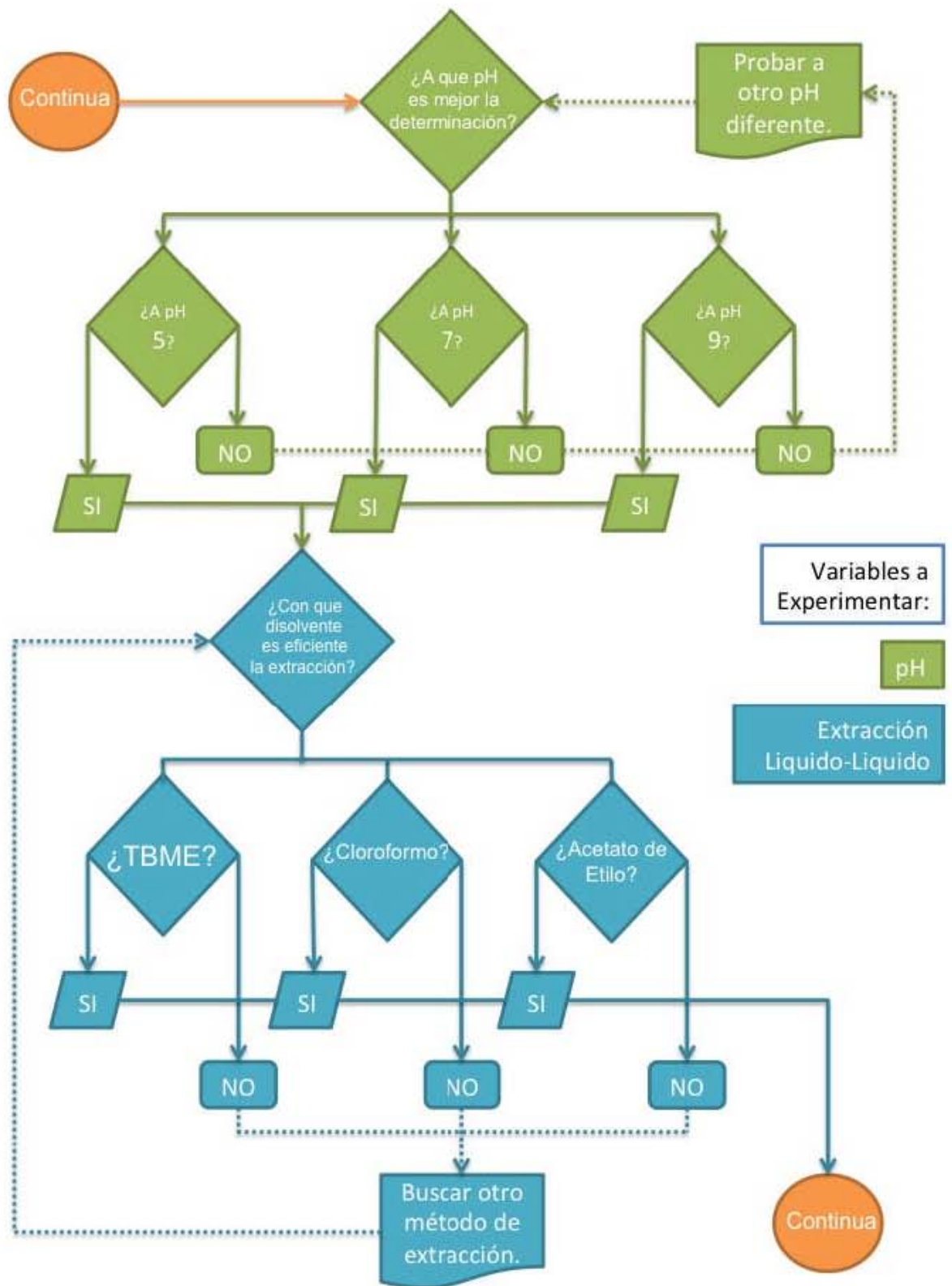
Relación de split: 10:1

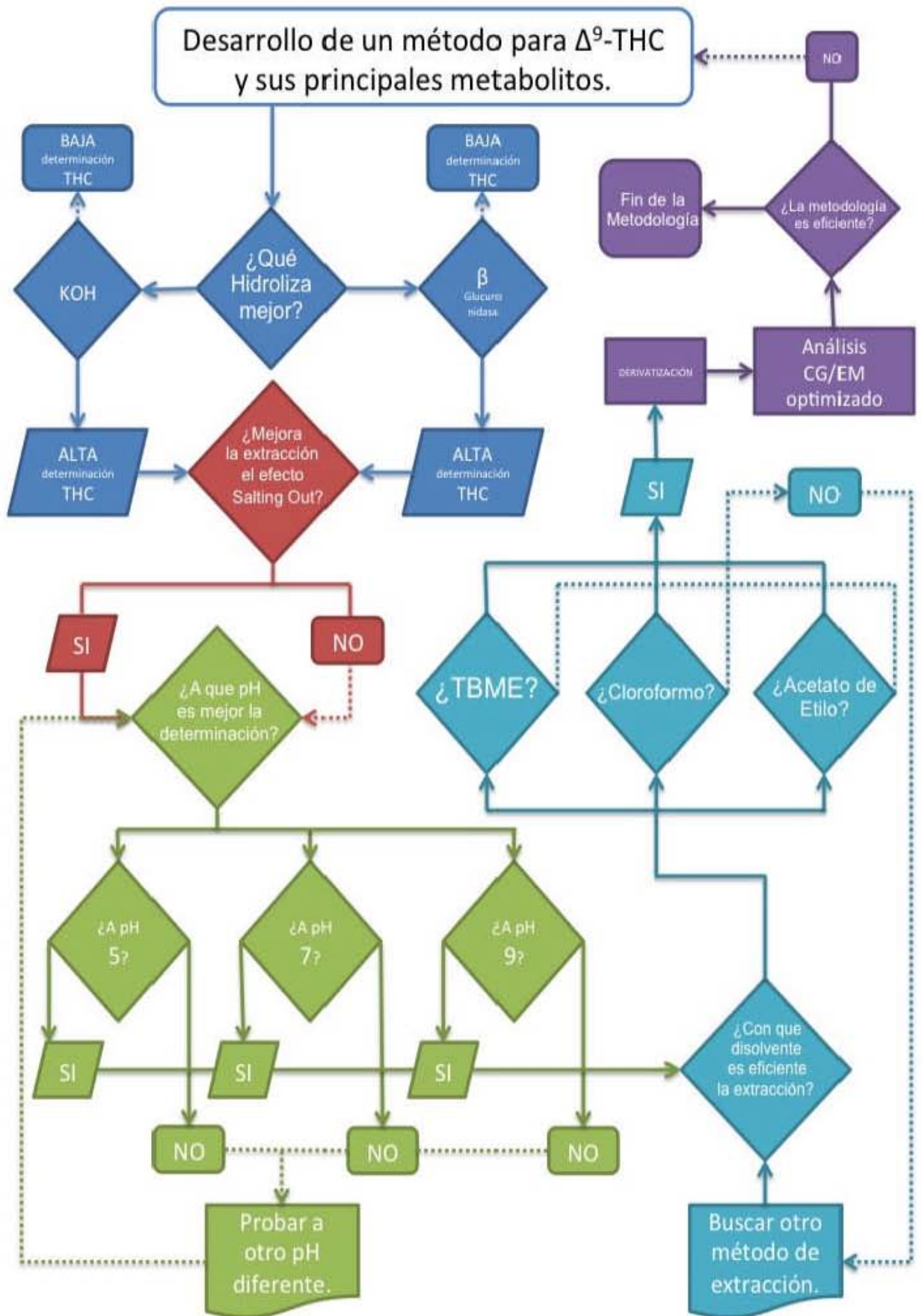
Tiempo de análisis: 12 minutos.

Como se muestra la optimización del método cromatográfico no se modificó en gran medida, el flujo de gas se modificó de 0.8 mL/min a 1.0 mL/min, la temperatura del inyector de 270° C a 280°C, también la temperatura de la línea de transferencia de 270° C a 280°C, la temperatura y calentamiento del horno, inicial de 130°C durante 14 minutos con una rampa de 10°C/min y una temperatura final de 270°C a una temperatura inicial de 200°C durante 10 min con una rampa de 25°C/min con una temperatura final de 280°C y por último una relación de split 10:1, bajo estas condiciones se obtuvieron mejores resultados en la determinación del Δ^9 -THC y sus metabolitos principales en un tiempo menor de análisis.

13. DIAGRAMA DE FLUJO.



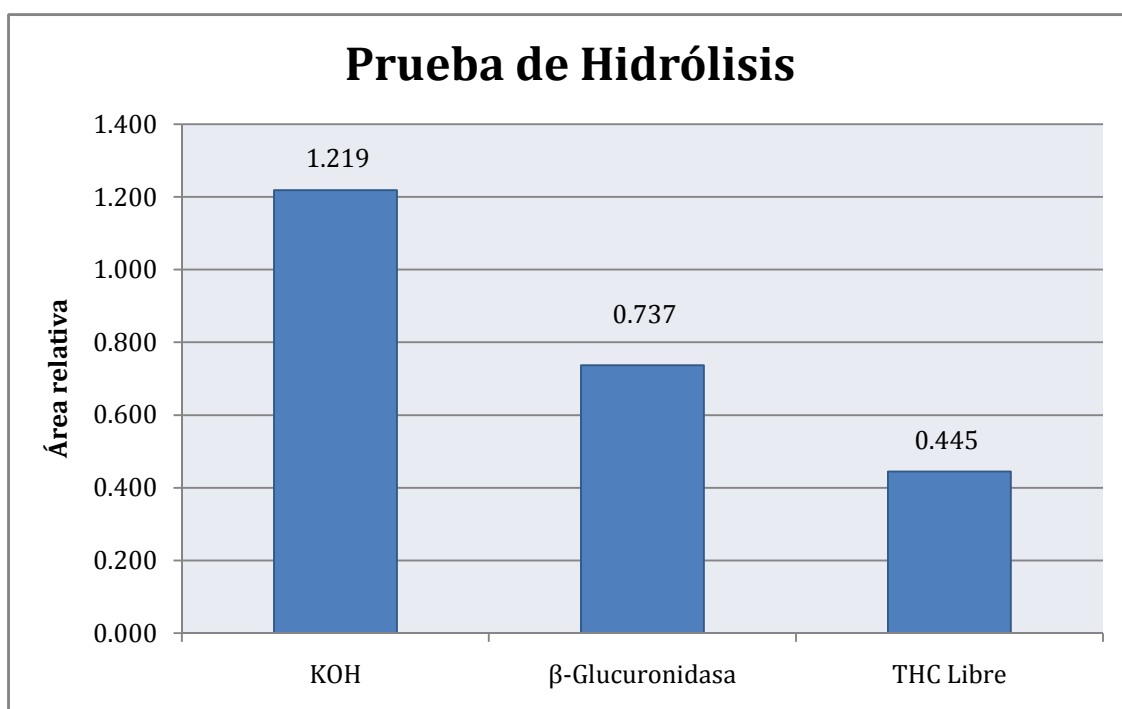




14. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

14.1. EVALUACIÓN DE HIDRÓLISIS.

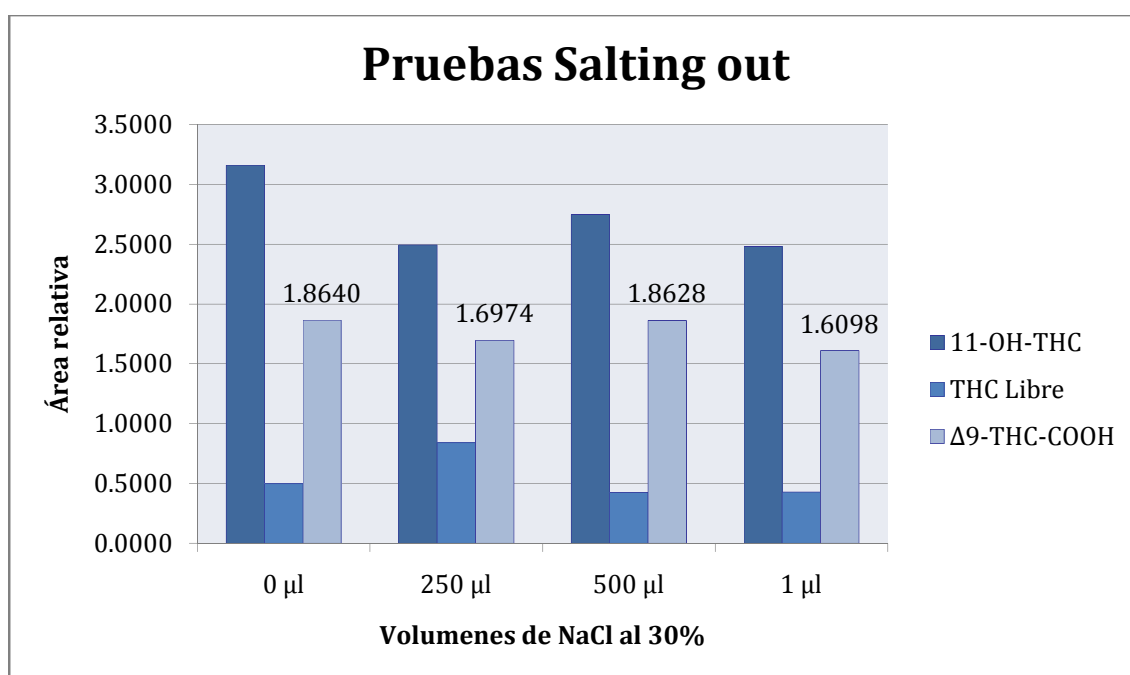
Las pruebas de hidrólisis con la enzima β -glucuronidasa, presentó un área relativa menor a la de la hidrólisis con KOH demostrando que la hidrólisis alcalina es una mejor opción que la hidrólisis enzimática para el Δ^9 -THC y sus metabolitos (Δ^9 -THC-COOH y 11-OH-THC) esto es debido a que el KOH rompe más eficientemente el enlace mono/diglucurónido, formado en el metabolismo hepático, no así con la enzima, la cual al no tener un pH óptimo no actúa de la misma manera que el KOH. Dependiendo de la cantidad consumida y del método de consumo, se puede obtener más, o menos cantidad libre de Δ^9 -THC debido a que no todo el Δ^9 -THC consumido es metabolizado y pasa por el organismo en forma libre hasta su excreción. (*Gráfica. 1*)



Gráfica 1. Se visualiza el área relativa para la hidrólisis con KOH, β -glucuronidasa y Δ^9 -THC en forma libre.

14.2. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE SALTING OUT.

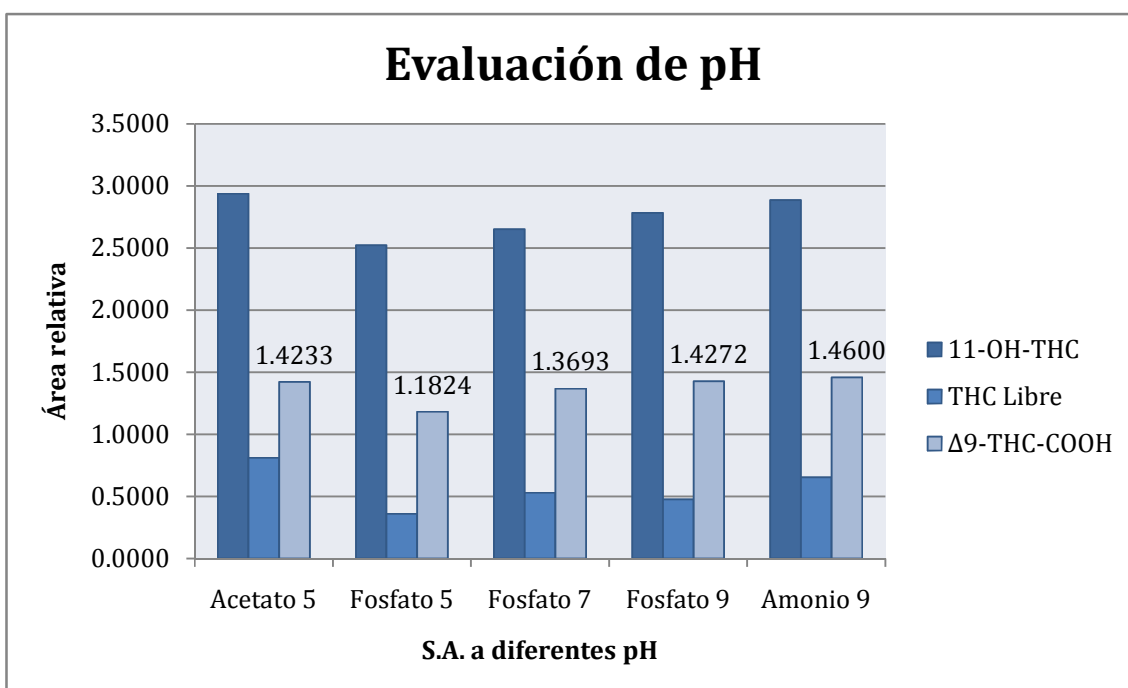
El método del Salting out mejoró la extracción de los metabolitos, en este análisis se obtuvo una mejor área relativa para el volumen de 0 μl y 500 μl , como se observa, a 0 μl da una extracción semejante que a la de 500 μl , por lo cual podemos decir que no impacta en la extracción de los metabolitos de Δ^9 -THC, al contrario al no adicionarle la sal los metabolitos se extrajeron mucho más viéndose reflejado en el área relativa, recortando gastos en el uso de la sal. (Gráfica 2.)



Gráfica 2. Se observan las áreas relativas de Δ^9 -THC y sus metabolitos a diferentes volúmenes de sal.

14.3. EVALUACIÓN DE EXTRACCIÓN A DIFERENTE PH.

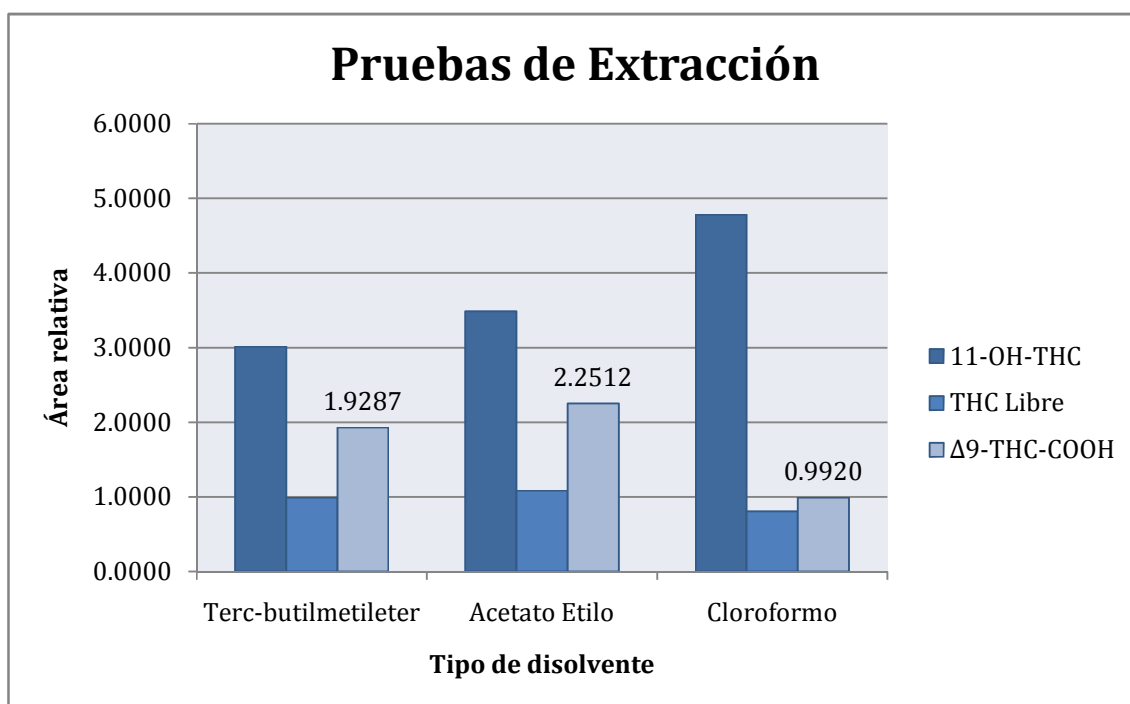
Se observa que el área relativa es similar con los diferentes valores de pH de las disoluciones amortiguadoras, tanto para la disolución amortiguadora de Acetatos, Fosfatos y Amonio son las mejores áreas en estas últimas, hubo una mejor extracción y por lo tanto un área relativa mayor. La disolución amortiguadora (S. A.) de amonio fue la que presentó una mejor área relativa, excepto para Δ^9 -THC que se obtuvo una mejor área con la disolución amortiguadora de Acetatos a pH 5, pero es el segundo mejor con respecto a los demás. (Gráfica 3).



Gráfica 3. Se muestran los valores de área relativa a diferente pH con distintas disoluciones amortiguadoras para Δ^9 -THC y sus metabolitos.

14.4. EVALUACIÓN DE EXTRACCIÓN CON DIFERENTES DISOLVENTES.

Se muestran las áreas relativas para cada disolvente observando, que el metabolito principal tiene una mejor área relativa para el Acetato de Etilo, debido a que el acetato de etilo es medianamente polar al igual que el terc-butilmetiléter, pero existe un poco más de afinidad al acetato de etilo, por ende existe una mayor extracción de estos y una mejor área relativa. El cloroformo siendo poco polar, extrajo en menor cantidad los metabolitos del Δ^9 -THC, excepto el 11-OH-THC, debido a las características de este disolvente, en la extracción líquido-líquido la fase acuosa ascendía en el tubo de ensayo, debido a que es menos densa que el cloroformo, impidiendo separar la fase acuosa de la orgánica viéndose afectadas la extracción de estos y sus áreas relativas, más sin embargo mostró una buena respuesta. (Gráfica 4.)



Gráfica 4. Se muestran las áreas relativas de las extracciones, con diferentes disolventes para Δ^9 -THC y sus metabolitos.

15. RESULTADOS DE LA MATRIZ CON EL STATGRAPHICS CENTURION XVI.

En el **Diagrama 1**. se observan los efectos principales para el Δ^9 -THC en área relativa, los efectos principales son los factores previos ya estudiados cual da mejor respuesta, y la respuesta de sus interacciones, en este caso la respuesta se mide en área relativa, para la hidrólisis, se observa que en el factor alto 100 que corresponde al KOH, se obtuvo una mejor área relativa, que al factor 10 que corresponde a la β -Glucuronidasa, también para el pH el factor alto 9 que corresponde al pH 9 el área relativa es mayor que al factor bajo 5 o pH 5, de igual forma el factor alto 90 que corresponde al disolvente acetato de etilo es mayor que al factor bajo 10 que es el terc-butilmetiléter, con estos datos, podemos relacionar que el método analítico para la determinación de Δ^9 -THC y sus metabolitos en orina, pueden obtenerse mejores áreas relativas al utilizarse KOH 10M, en un medio a pH 9 y usando un disolvente medianamente polar como lo es el acetato de etilo, en estas condiciones obtendremos mayores áreas relativas y mayor extracción de los metabolitos. (**Diagrama 1**.)

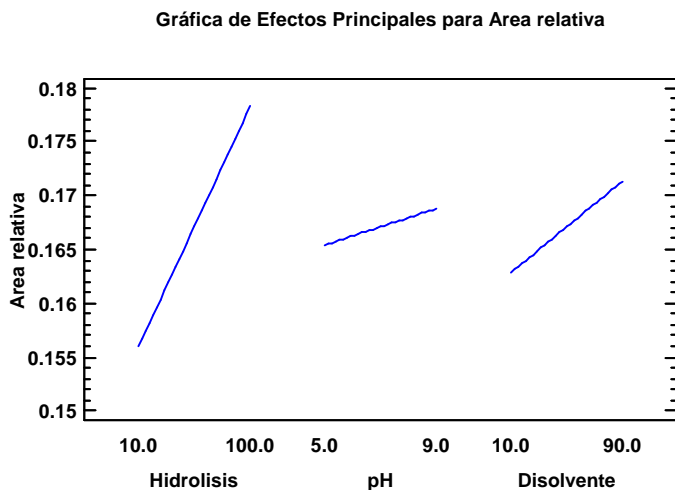


Diagrama 1. Efectos principales para Hidrólisis, pH y extracción variables que más afectan en la extracción de Δ^9 -THC y sus metabolitos.

15.1. DIAGRAMA DE PARETO PARA INTERACCIONES Y EFECTOS ENTRE VARIABLES.

Se observa en el **Diagrama 2.** Diagrama de Pareto, las estimaciones para cada uno de los efectos y las interacciones entre ellos, también se muestra el error estándar de cada uno de estos efectos. Como se observa, cada uno de los factores analizados por sí solos, no tuvo una interacción importante a excepción de la hidrólisis (A), pero no así por su parte el disolvente (C) y pH (B).

Por otra parte las interacciones entre cada una de ellas, AC y AB demuestran que existe una menor interacción entre cada una de estas variables, la interacción AB, hidrólisis (A) y pH (B), no da un resultado significativo, ni tampoco la interacción AC, hidrólisis (A) y disolvente (C) pero no así para BC, pH (B) y disolvente (C), la interacción entre estas dos variables es mucho mayor, observando que una puede depender de la otra, mejorando la extracción de los metabolitos, y obteniendo una mejor área relativa. (**Diagrama 2.**)

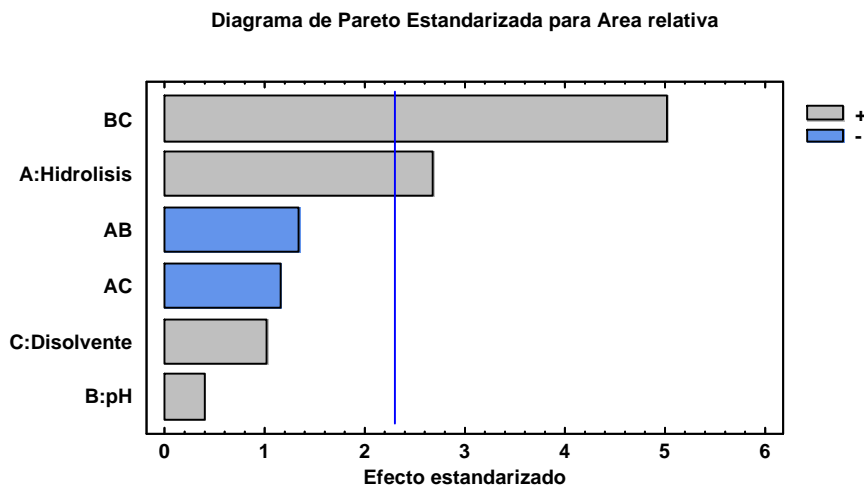
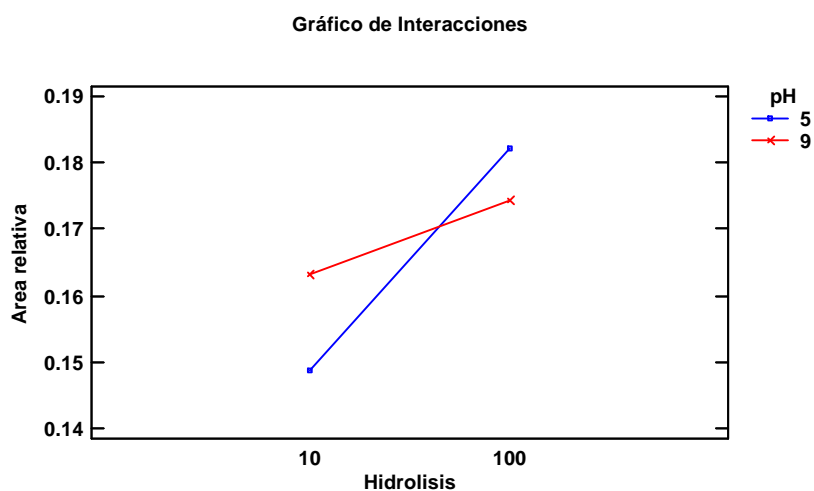


Diagrama 2. Diagrama de Pareto de las estimaciones de cada uno de los efectos y las interacciones entre ellos.

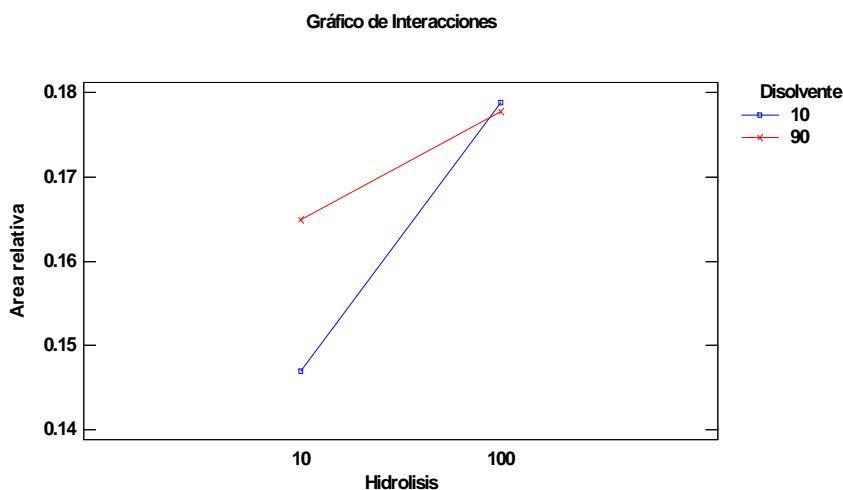
15.2. GRÁFICAS DE INTERACCIONES PARA EL METABOLITO Δ^9 -THC-COOH.

Se observa en la **Gráfica 5**. Las interacciones entre los efectos pH e hidrólisis, obteniendo de cada uno los mejores valores para áreas relativas, como se observa la línea roja para el factor bajo de hidrólisis 10 (β -Glucuronidasa) a pH 9 no se obtiene un área relativa mayor, no así para el factor alto 100 (KOH) con el cual tampoco se obtiene una gran área relativa, pero para la línea azul, en el factor bajo 10 (β -Glucuronidasa), a pH 5 los valores para el área relativa decaen demasiado a comparación de los valores de la línea roja, no así para el factor alto 100 (KOH) a pH 5 que el valor de área relativa es suficientemente mayor a los demás, con lo cual observamos que a pH 5 y con KOH existen mejores valores de área relativa para Δ^9 -THC-COOH.



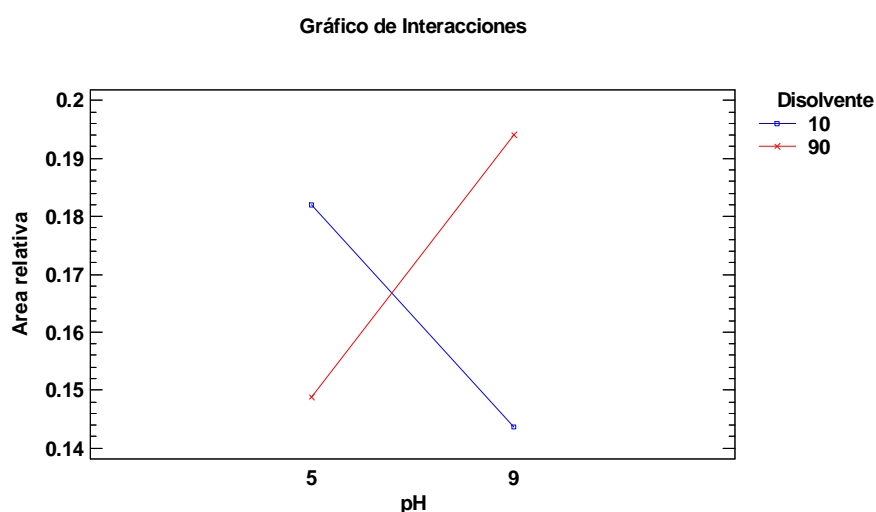
Gráfica 5. Interacción entre los efectos pH e hidrólisis para Δ^9 -THC-COOH.

En la **Gráfica 6**. Se observa las interacciones para hidrólisis y disolvente en la línea roja se observa que la hidrólisis al factor bajo de 10 (β -Glucuronidasa) con el disolvente factor alto 90 (Acetato de etilo), no da una buena respuesta para el área relativa, pero para el factor 100 (KOH) con el mismo disolvente el área relativa aumenta, mientras en la línea azul para la hidrólisis al factor bajo 10 (β -Glucuronidasa) utilizando el disolvente 10 (terc-butilmetileter) el área relativa es la menor a todas las interacciones, pero para el factor 100 (KOH) con el mismo disolvente, el área relativa mejora por mucho, sobrepasando por poco el valor de la línea roja, se podrá decir que no existe una diferencia entre cual disolvente se utilice, mientras en el método se utilice el KOH. (**Gráfica 6.**)



Gráfica 6. Se observa las interacciones para hidrólisis y disolvente para Δ^9 -THC-COOH.

En la **Gráfica 7**. Se observa las interacciones entre pH y disolvente, en este gráfico en la línea roja, el pH 5 con el disolvente factor alto 90 (Acetato de etilo) los valores para el área relativa son bajos, pero no así para el pH 9 con el mismo disolvente, el cual es el mayor en área relativa, en la línea azul con el pH 5 entre el disolvente factor bajo 10 (Terc-butilmetileter) el valor para el área relativa es el segundo mejor pero para pH 9 con el mismo solvente el valor decae demasiado, esto nos dice que hay una interacción fuerte entre el pH 9 y el disolvente factor alto 90 (Acetato de etilo).



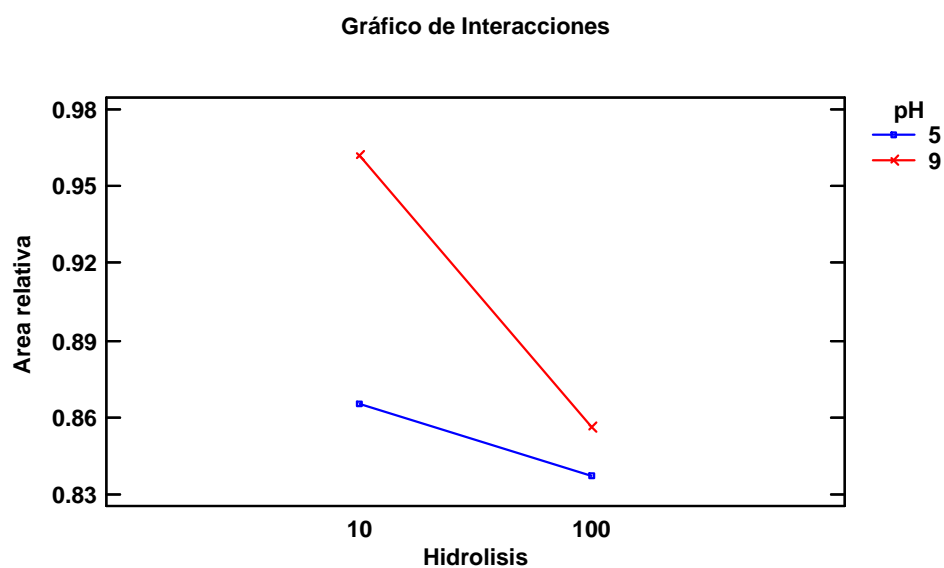
Gráfica 7. Se observa las interacciones entre pH y disolvente para Δ^9 -THC-COOH.

Se han observado las interacciones entre los diferentes efectos a los diferentes factores alto y bajo, de esto se puede deducir las mejores condiciones para determinar el metabolito Δ^9 -THC-COOH en orina, en base a las áreas relativas, las cuales son: para el pH se obtuvo una mejor respuesta a pH 9 esto a que la interacción más importante fue la de pH y disolvente como lo vimos en el diagrama de Pareto (**Diagrama 2.**) se obtuvo una mejor área relativa a este pH con acetato de etilo, y en la interacción del disolvente con la hidrólisis, solo se observó que mientras se utilice el KOH 10M cualquier disolvente puede utilizarse pero no así con la β -Glucuronisada, que no arrojó buenas áreas relativas con ningún pH.

En la determinación del metabolito Δ^9 -THC-COOH, la utilización de KOH, a pH 9 utilizando acetato de etilo es la mejor opción.

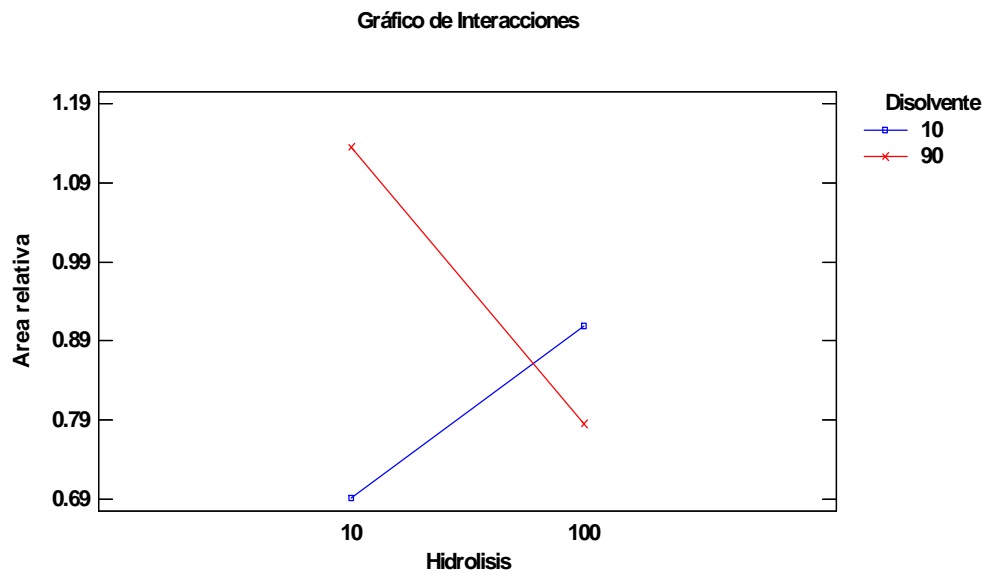
15.3. GRÁFICAS DE INTERACCIONES PARA Δ^9 -THC.

Se observa en la **Gráfica 8**. Las interacciones entre pH e hidrólisis, a pH 5 señalado con la línea azul, en la hidrólisis en el factor bajo 10 (β -Glucuronidasa) el área relativa no es tan baja, con respecto al factor alto 100 (KOH), mientras que en la línea roja a pH 9 con un factor bajo 10 (β -Glucuronidasa) es la mejor respuesta, no así con el factor alto 100 (KOH) en ese mismo pH.



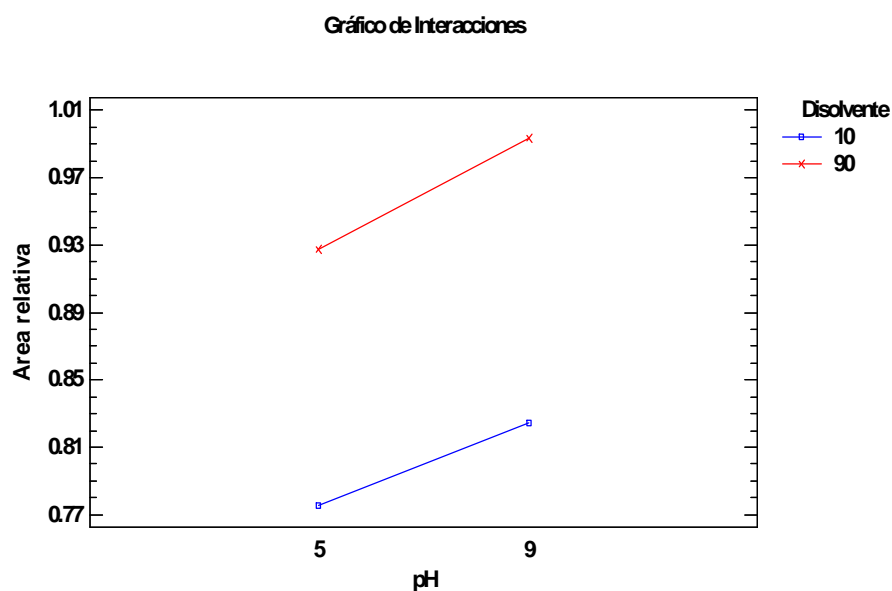
Gráfica 8. Interacciones entre pH e hidrólisis para Δ^9 -THC.

Se observa en la **Gráfica 9**. Las interacciones entre hidrólisis y disolvente en la línea azul con terc-butiletileter e hidrólisis factor bajo 10 (β -Glucuronidasa) la respuesta del área relativa está muy por debajo de los demás valores, no así para el factor alto 100 (KOH), mientras que en la línea roja con el acetato de etilo, se observa que en el factor bajo 10 (β -Glucuronidasa) da un buen resultado con respecto al área relativa pero no así con el factor alto 100 (KOH) que el valor es bajo con ese mismo disolvente.



Gráfica 9. Interacciones entre hidrólisis y disolvente para Δ^9 -THC.

Se observa en la **Gráfica 10**. Las interacciones entre pH y disolvente, al ser la interacción más importante, de esta se deduce que en la línea roja con acetato de etilo a pH 9 es la que mejor da una respuesta conforme al área relativa, mientras que en el factor bajo no. No así con el terc-butilmetileter que es la línea color azul, que en ninguno de los dos factores da una buena respuesta al área relativa.

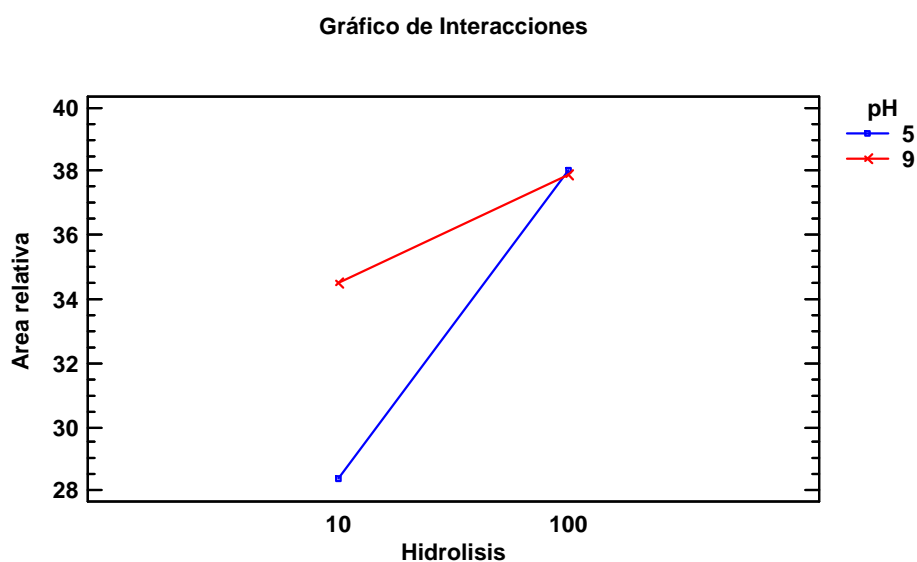


Gráfica 10. Interacciones entre pH y disolvente Δ^9 -THC.

Se han observado las interacciones para el compuesto padre Δ^9 -THC o THC en forma libre, donde se puede deducir las mejores condiciones para determinar el metabolito, las cuales son: para el pH se obtuvo una mejor respuesta a pH 9 esto a que la interacción más importante fue la de pH y disolvente como lo vimos en el diagrama de Pareto (**Diagrama 2.**) se obtuvo una mejor área relativa a este pH con acetato de etilo, en la interacción del disolvente con la hidrólisis, se observó que la interacción fue diferente dando un buen resultado con la β -Glucuronisada y el mismo disolvente, también para la interacción hidrólisis-pH la cual observamos una buena respuesta a pH 9 con β -Glucuronisada. Podemos decir que en la determinación de este compuesto padre Δ^9 -THC o THC en forma libre, la utilización de β -Glucuronisada, a pH 9 utilizando acetato de etilo es la mejor opción, pero si se observa los resultados de las áreas relativas con respecto a la Hidrólisis con KOH, estas no reportan tan bajos resultados.

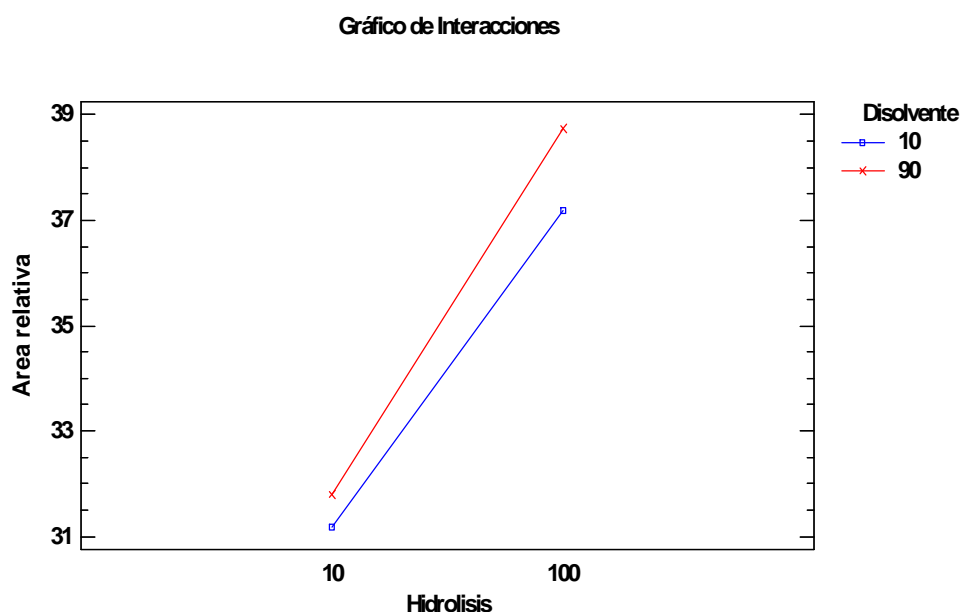
15.4. GRÁFICAS DE INTERACCIONES PARA EL METABOLITO 11-OH-THC.

Se observa en la **Gráfica 11**. las interacciones entre pH e hidrólisis, a pH 5 señalado con la línea azul, y en la hidrólisis en el factor bajo 10 (β -Glucuronidasa) el área relativa es baja, con respecto al factor alto 100 (KOH), mientras que en la línea roja a pH 9 con un factor bajo 10 (β -Glucuronidasa) la mejor respuesta es considerablemente mayor, pero para ambos pHs con un factor alto 100 (KOH), los puntos se sobreponen, observando que da igual que pH utilices en el método mientras ocupes el KOH en la hidrólisis, se observa en los resultados de área relativa. (**Gráfica 11**.)



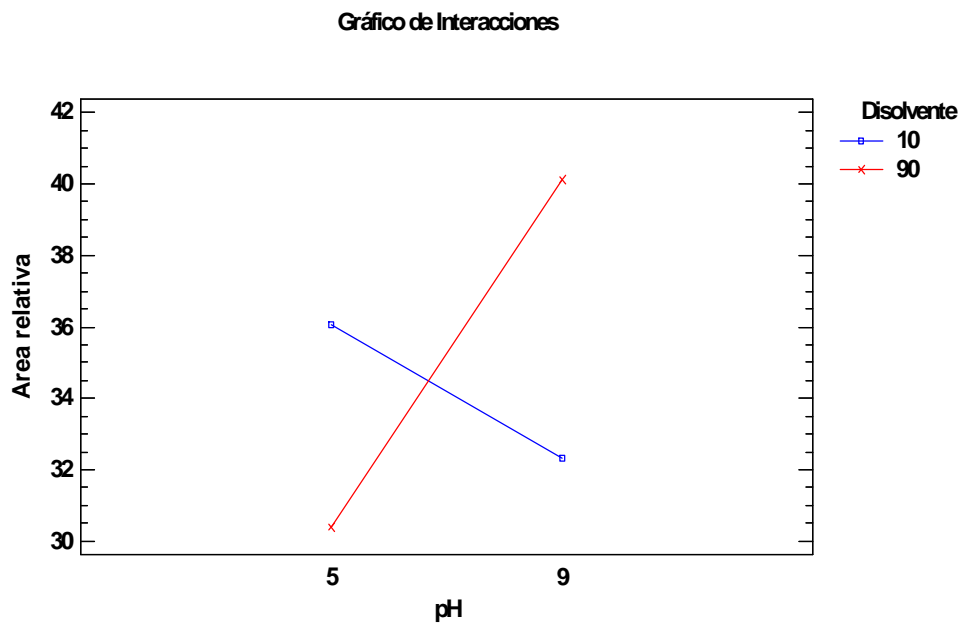
Gráfica 11. Interacciones entre pH e hidrólisis para 11-OH-THC.

Se observa en la **Gráfica 12**. Las interacciones entre hidrólisis y disolvente en la línea azul con terc-butiletileter e hidrólisis factor bajo 10 (β -Glucuronidasa) la respuesta del área relativa está por debajo, de los demás valores, no así para el factor alto 100 (KOH), mientras que en la línea roja con el acetato de etilo, se observa que en el factor bajo 10 (β -Glucuronidasa) da un resultado similar al otro disolvente en la misma condición, con respecto al área relativa, pero no así con el factor alto 100 (KOH) el valor para área relativa es superior. (**Gráfica 12.**)



Gráfica 12. Interacciones entre hidrólisis y disolvente para 11-OH-THC.

Se observa en la **Gráfica 13**. Las interacciones entre pH y disolvente, al ser la interacción más importante, de esta se deduce que en la línea roja con acetato de etilo a pH 9 es la que mejor da una respuesta conforme al área relativa, mientras que en el factor bajo no. No así con el terc-butiletileter que es la línea color azul, que en el pH 5 da aproximadamente la mitad de la respuesta, en comparación a la otra mientras que para el pH 9 su respuesta no es tan baja. (**Gráfica 13.**)



Gráfica 13. Interacciones entre pH y disolvente para 11-OH-THC.

Se han observado las interacciones para el metabolito 11-OH-THC donde se pueden deducir las mejores condiciones para determinar el metabolito las cuales son: para el pH se obtuvo una mejor respuesta a pH 9 y esto a que la interacción más importante fue la de pH y disolvente como lo vimos en el diagrama de Pareto (**Diagrama 2.**) y se obtuvo una mejor área relativa a este pH con acetato de etilo, en la interacción del disolvente con la hidrólisis, se observó que la interacción fue diferente dando un buen resultado con el KOH en ambos disolventes, los resultados de las áreas relativas no son tan desproporcionados como se esperaba, para la interacción hidrólisis-pH la cual observamos una buena respuesta con KOH en cualquier pH. Podemos decir que en la determinación de este metabolito, la utilización de KOH, a pH 9 utilizando acetato de etilo es la mejor opción.

16. CONDICIONES ÓPTIMAS DE ANÁLISIS.

Como hemos observado, es importante saber las interacciones y condiciones que favorecen la extracción e identificación de los metabolitos analizados, en este trabajo se desarrolló, y encontraron las mejores condiciones para la determinación de Tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC) y sus metabolitos principales (Δ^9 -THC-COOH y 11-OH-THC) en orina humana para control de dopaje, la WADA decreta en el Código Mundial Antidopaje, que es necesario detectar tres metabolitos que identifiquen y confirmen la presencia y/o el consumo de Tetrahidrocannabinol, de ahí la necesidad de buscar las mejores condiciones para la extracción e identificación de esta sustancia y sus metabolitos, resultando como las mejores condiciones las siguientes:

Tabla 4. Resultados de las mejores condiciones de determinación para los metabolitos de Δ^9 -THC.

| Metabolito | Variables experimentales | | |
|-----------------------|--------------------------|----|------------------|
| | HIDRÓLISIS | pH | Disolvente |
| Δ^9 -THC-COOH | KOH | 9 | Acetato de Etilo |
| Δ^9 -THC o THC | β -Glucuronidasa | 9 | Acetato de Etilo |
| 11-OH-THC | KOH | 9 | Acetato de Etilo |

Se observó que en la hidrólisis para el Δ^9 -THC, la β -Glucuronidasa fue el mejor agente que pudo romper los enlaces glucurónidos, pero se observó que los resultados reportados para KOH no fueron tan bajos debido a que si se utiliza la β -Glucuronidasa, para la ruptura de enlaces de este metabolito, en una misma muestra, se vería mermada la hidrólisis de los enlaces glucurónidos de los otros dos además de que es imposible ocupar KOH y β -Glucuronidasa juntos, en este caso sería recomendable, tomar en cuenta el uso de KOH, lo cual permitiría obtener una respuesta promedio aceptable para el Δ^9 -THC y sus dos metabolitos estudiados.

Sin duda el KOH es la mejor sustancia que puede romper los enlaces glucurónidos formados en el metabolismo del Δ^9 -THC, gracias a las características de la molécula se observa que la adición de sal “Efecto salting out” puede ser de gran ayuda, esto solo se podrá verificar haciendo nuevas pruebas de interacción, si este efecto es de ayuda para mejorar la extracción, y por ende las áreas relativas, el que si mejoro la extracción fue efecto del pH, al utilizar una disolución amortiguadora de pH 9, ya sea de fosfatos o de amoniaco, dependiendo la disponibilidad del reactivo y de los costos, para mejorar así la cuantitividad de la determinación, en conjunto con un buen disolvente acorde a la afinidad de la molécula (en este caso Acetato de etilo), los cuales en conjunto ofrecieron las mejores condiciones experimentales para el análisis requerido.

Evaluar una a una las variables para el desarrollo del método analítico, permitió conocer las mejores condiciones para la extracción de Δ^9 -THC y sus metabolitos, lo cual fue corroborado por medio del diseño de experimentos realizado aplicando el software Statgraphics Centurion, al correlacionar la influencia de cada una de las variables experimentales sobre la determinación del Δ^9 -THC y sus metabolitos. Así mismo, el método cromatográfico optimizado e implementado permitió la correcta separación de los metabolitos lo cual derivó en una mejor identificación de los mismos y un menor tiempo de análisis.

17. CONCLUSIONES.

- Se desarrolló un método analítico para la identificación y cuantificación de Δ^9 -THC y sus principales metabolitos (Δ^9 -THC-COOH, 11-OH-THC), en muestras de orina humana.
- Con los experimentos realizados, fue posible identificar las principales variables de influencia para la determinación de Δ^9 -THC y sus principales metabolitos.
- Se optimizó el método cromatográfico para la correcta separación e identificación y cuantificación del Δ^9 -THC y de sus principales metabolitos.
- Se comprobó que con el desarrollo de experimentos 2ⁿ propuesto, se obtuvieron las mejores condiciones de análisis con la realización de 20 experimentos y se evaluó la influencia de cada una sobre el procedimiento de extracción, así como la interacción entre ellas.
- Con el método desarrollado, se analizaron muestras de reales de orina para la identificación y cuantificación del Δ^9 -THC y sus metabolitos, demostrando así, el correcto desempeño de la metodología propuesta.

18. LISTA DE REFERENCIAS.

1. A brief History of Antidoping www.wada-ama.org.com [INTERNET]. Montreal Canada: Agencia Mundial Antidopaje WADA-AMA [Consulta el 06 de Agosto de 2013] Disponible en: www.wada-ama.org.com
2. Alcocer L, Ibarra C. Manual de Sustancias prohibidas en el deporte. Editorial del Deporte Mexicano. México; 2008.
3. Ley General de Cultura Física y Deporte. Comisión Nacional de Cultura Física y Deporte; Última Reforma publicada 15 de Agosto de 2008. México D.F.
4. World Anti-doping Code www.wada-ama.org.com [INTERNET]. Montreal Canada: Agencia Mundial Antidopaje WADA-AMA [Consulta el 06 de Agosto de 2013] Disponible en: www.wada-ama.org.com
5. The Prohibited Lists 2013 www.wada-ama.org.com [INTERNET]. Montreal Canadá: Agencia Mundial Antidopaje WADA-AMA [Consulta el 8 de Agosto de 2013] Disponible en: www.wada-ama.org.com
6. International Standard Laboratories 2015 Draft Version 2.0 www.wada-ama.org.com [INTERNET]. Montreal Canadá: Agencia Mundial Antidopaje WADA-AMA [Consulta el 8 de Agosto de 2013] Disponible en: www.wada-ama.org.com
7. Turner C.E, Elsohly M.A, Constituent of Cannabis Sativa. Review of the natural constituent Journal of Natural Products 2008. p 169-204.
8. La Marihuana. 2010 [INTERNET]. México [Consultada el 08 de Agosto de 2013] Disponible en www.lamarihuana.com
9. Broeckers M. Cannabis, Cañamo. México 2002. p 128-131.
10. Bofes J, Calafat A. Monografía Cannabis. Vol. 12 suplemento 2. año 2000. p 20-29.
11. Cádiz. "revista oficial de la cultura del cannabis". 2011. Ed. Barcelona, España.
12. Escobedo, A. Historia General de las Drogas. Ed. Espasa; 2005. p1305-1316.
13. Eliade M. Shamanism. Archaic techniques of ecstasis. London 1964
14. Grispoon L, Bakalar J, Marihuana La Medicina Prohibida. Ed: Paidós; Buenos Aires 1997. p 25-47,49-143.
15. High Times, revista especializada en el cultivo de la marihuana y otros temas relacionados con el ámbito de drogas psicoactivas, varios números. Ed. Varios EUA. 2006
16. Walker J.M, Huang S.M. Analgesia de Cannabinoid. Farmacología y terapéutica. El 2002; 95 (2). p 127-35.

-
-
17. Croteau R, Kutchan T.M, Lewis N. G. Natural Products (Secondary Metabolites). Ed. Buchanan, Grisseem, Jones. 2004
 18. Evans F.J. The medicinal chemistry of cannabis: O'Shaugnessy's legacy. *Pharmaceutical Sciences* 1997. p 245-291.
 19. Gaoni Y, Mechoulam R. "Aislamiento, estructura y síntesis parcial de un componente activo del hachís". 1964. *Diario de la sociedad química americana* 86 (8): p 1646-1647.
 20. Mechoulam R. *Química de la marihuana*. *Ciencia* 168 (3936); 1970. p 1159-1165.
 21. Adams R, Hunt M, Clar J.H. Structure of THC, cannabidiol, a product isolated from the marihuana extract of Minnesota wild hemp. 1940. *J. Am. Chem Soc.* 62. p 196-200.
 22. McMurry J. *Química orgánica*. Ed: Thomson México 2004. p. 1129-1132
 23. Milano M, Melendez G. *Manual de farmacología del doping*. 6a ed. Argentina: Ed. Alfa-Beta; 2008
 24. Rang H, Dale M, Ritter J, Flower R. *Farmacología*. 5a. ed. Barcelona: Ed: Elsevier; 2008. p 766-767.
 25. Lupica C.R, Riegel C.A, Hoffman A.F. La regulación de la marihuana y del cannabinoide del cerebro recompensa los circuitos. *Diario británico de la farmacología*. El 2004; 143 (2). p 227-34.
 26. Huestis A. Pharmacokinetics y metabolismo de los cannabinoides de la planta, Δ^9 - tetrahydrocannabinol, cannabidiol y cannabinol. *Handb Exp Pharmacol* 2005. (168): p 657-90.
 27. Grotenhermen F. Pharmacokinetics y pharmacodynamics de cannabinoides. 2003. *Clin Pharmacokinet* 42 (4). p 327-60.
 28. Agurell S, Halldin M, Lindgren J, Ohlsson A, Widman M, Gillespie H, Hollister L. Pharmacokinetics and metabolism of delta-9-THC and other cannabinoids with emphasis on man, *Pharmacology Rev* 1986; 38: 21-42.
 29. Harvey DJ. Absorption, distribution and biotransformation of the cannabinoids. En Hahas GG, Sutin KM, Harvey DJ, Agurell S. *Humana Press*. Totowa. New Jersey 1999; 91-103.
 30. R.A. Underwood *Química Analítica Cuantitativa*. 5 Ed. Pearson Printice Hall; México 2005.
 31. Daniel C. Harris *Análisis Químico Cuantitativo* 3Ed. Reverte; España. Barcelona 2007.
 32. Skoog D, Holler F.J, Nieman T.A. *Análisis Instrumental*. 5 Ed. Mc Graw Hill: España; 2003. p 786-828.
 33. Gennaro A.R. *Remington Farmacia*. 20 Ed. Ed. Panamericana; México. 2000. P 557-718.

-
-
34. Montgomery D. Design and analysis of experiments 2 Ed. Limusa Willey México p 288-296.
 35. Hines W.W, Montgomery D.C, Goldsman D.M, Borror C.M. Probabilidad y Estadística para Ingeniería. Ed. CECSA; México. 2006.
 36. Walpole R.E, Myers R.H, Myers S.L. Probabilidad y estadística para Ingeniería y Ciencias. 8 ed. Ed. Pearson Education; 2007.
 37. Mark J.K, Stephen R.S, Ronald J.B. Basic statistics 4 Ed, 2005 Cap 8. p 435-440
 38. Lillian A.M. Kristy S.G. Análisis de orina y de líquidos corporales. 2ed. Ed. Panamericana 2011
 39. Arthur C.G. Jhon H.E. Tratado de Fisiología Médica. 12 ed. McGraw Hill México 2011 p 210-211, 323-337, 852-885,887,1142.
 40. Havver D.D. Modern Analytical Chemistry 2 Ed. New York 2000 Cap. 3 p 180-194
 41. Manuel V.C. Arturo G.H. Técnicas analíticas de separación. Ed. Reverte Barcelona España 1988
 42. THC: droga o medicamento. Determinación analítica www.pncq.org.br/biblioteca/actualidades2005_04.pdf [INTERNET]. España, Madrid. [Consulta el 21 de Mayo de 2012]
 43. DROZD J. Chemical derivatization in gas chromatography. Journal of Chromatography Library, Vol. 19. 1981, Elsevier Scientific Publishing.
 44. Montgomery D. Design and analysis of experiments 2 Ed. Limusa Willey México.
 45. James N. M. Jane C. M. Estadística y Quimiometria para química analítica 4 Ed. Prentice Hall Madrid 2002. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland, Estados Unidos. 2000. Cap 2
 46. Strasinger S.K. Líquidos Corporales y Análisis de Orina. Manual Médico 1ed. México 1991
 47. Jean L. F. Pharmacology, Doping and Sport Routledge London 2009
 48. Jean C. S. Martindale's Drug restricted in sport. Bpharm 2009
 49. Castillo J.R. Aplicación del método de estándar interno a la cromatografía de gases. Laboratorio de Análisis Instrumental Mexico 2003
 50. Jaime L.Z. Therapeutic Drug Monitoring. 29 (6) 711-734 Universidad de Barcelona. España. Diciembre 2007
 51. Monografía del cannabis. Revista Adicciones, suplemento 2 (Vol. 12)
 52. Drogodependencias: farmacología, patología, psicología, legislación. Madrid 1999. Editorial Médica Panamérica.

-
53. Derivados del cannabis: ¿Drogas o Medicamentos? Instituto Deusto de Drogodependencias. Avances en farmacología de drogodependencias. (1998). Edición Universidad Deusto
 54. RULE G.S., HENION J.D. Determination of drugs from urine by on-line immunoaffinity chromatography-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatography. 1992, 582, (103-112)