

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA



**MÉTODOS ANALÍTICOS EN LA
DETECCIÓN DEL DOPAJE DEPORTIVO**



Juan Antonio Crespo Perea

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

GRADO EN FARMACIA



TRABAJO FIN DE GRADO

**“MÉTODOS ANALÍTICOS EN LA DETECCIÓN
DEL DOPAJE”**

Autor: Juan Antonio Crespo Perea

Tutor: Ramón Aparicio Ruiz

**TRABAJO FIN DE GRADO DE CARÁCTER
BIBLIOGRÁFICO**

Sevilla, Julio 2022

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1. Contexto histórico del dopaje	3
2.1.1. Contexto histórico a nivel deportivo.	3
2.2. Definición del dopaje y sustancias productoras de este.	4
2.2.1. Definición del dopaje.	4
2.2.2. Sustancias dopantes.....	5
2.3. Métodos prohibidos	10
2.3.1. Manejo de sangre o componentes de la sangre.	11
2.3.2. Manipulación química y física.	11
2.3.3. Dopaje genético.....	11
2.4. Abordaje del dopaje en la oficina de farmacia	12
3. OBJETIVOS	14
4. METODOLOGÍA	15
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
5.1. Recogida y preparación de muestras	16
5.2. Análisis de la muestra.	19
5.2.1. Cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (CG/EM)	20
5.2.2. Inmunoensayo.	25
5.2.3. Isoelectroenfoque (IEF) y posterior detección por quimioluminiscencia.	27
5.2.4. Cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas (CL/EM).....	29
5.3. Otras sustancias dopantes.	33
6. CONCLUSIONES	34
7. BIBLIOGRAFÍA	35

1. RESUMEN

El dopaje consiste en el uso de sustancias por parte del deportista con el objetivo de mejorar el rendimiento físico. La Agencia Mundial Antidopaje (AMA) ha elaborado una lista oficial de métodos y sustancias prohibidas en el ámbito deportivo, entre las cuales se encuentran algunos fármacos de uso cotidiano como los glucocorticoides, agonistas beta 2, diuréticos, etc.

Esta revisión bibliográfica tiene como objetivo analizar los métodos analíticos actuales utilizados para detectar el dopaje deportivo. Además de ello, conocer la normativa que afecta a la recogida de muestras, así como los procedimientos y el transporte de esta.

El análisis de muestras (orina o sangre) para la detección de sustancias dopantes se realiza preferentemente por cromatografía líquida (CL) o gaseosa (CG). La característica principal de estos métodos es que se ponen en contacto dos fases, una estacionaria y otra móvil, mutuamente inmiscibles. La diferencia entre ambas cromatografías reside en el estado en el que se encuentra la fase móvil.

Estas técnicas suelen ir acopladas a la espectrometría de masas (EM) para facilitar la detección de las sustancias dopantes. Su fundamento se basa en ionizar la muestra y posteriormente separar los iones en función de su relación masa/carga. El resultado es un espectro que se puede definir como la “huella digital” de la muestra que se analiza.

También se pueden utilizar otras técnicas analíticas como la electroforesis-quimioluminiscencia o los inmunoensayos, tal como se menciona en el código mundial antidopaje estándar internacional de laboratorios.

El dopaje es uno de los principales problemas que afecta al deporte en la actualidad, y es por ello, que se utilizan métodos analíticos de elevada sensibilidad y especificidad para eliminarlo, como las técnicas cromatográficas acoplada a la espectrometría de masas.

Palabras clave: dopaje deportivo, sustancia dopante, método analítico, cromatografía, espectrometría de masas.

Abreviaturas:

- ACTH: Corticotrofinas.
- ADN: Ácido desoxirribonucleico.
- AEMPS: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios.
- AEPSAD: Agencia Española de Protección de la Salud y el Deporte.
- AMA: Agencia Mundial Antidopaje.
- AMEFIDE: Asociación de la Medicina de la Educación Física y el Deporte.
- API: Ionización química a presión atmosférica
- AUT: Autorización de Uso Terapéutico.
- CACOF: Consejo Andaluz de Colegios Oficiales de Farmacéuticos.
- CAUT: Comité de Autorizaciones de Uso Terapéutico.
- CG/EM: Cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas.
- CIMA: Centro de información de medicamentos.
- CL/EM: Cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas.
- COI: Comité Olímpico Internacional.
- DTT: Ditiotreitól o Reactivo de Cleland
- EAA: Esteroides androgénicos anabolizantes.
- EPO: Eritropoyetina.
- ESI: Fuente de ionización por electroaspersión.
- FEMEDE: Federación Española de Medicina del Deporte.
- FIP: Federación Internacional Farmacéutica.
- HCL: Ácido clorhídrico.
- hGh: Hormona de crecimiento.
- HPLC: Cromatografía líquida de alto rendimiento.
- HTA: Hipertensión arterial.
- IEF: Isoelectroenfoque.
- Ig: Inmunoglobulina.
- LH: Hormona luteneizante.
- MBTFA: N-metil-bis(trifluoroacetamida).
- MRPL: Límite mínimo de rendimiento requerido.
- M/z: Masa/carga.
- NESP: Novel Erythropoiesis Stimulating Protein
- OCD: Oficial de control.
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.
- Psi: Libras por pulgada cuadrada.
- PVDF: Fluoruro de polivinilideno.
- RCF: Fuerza centrífuga relativa.
- rhEPO: Eritropoyetina humana recombinante.
- SIM: Método de monitoreo selectivo de iones.
- tr: tiempo de retención.
- Tris: tris-(hidroximetil)-aminometano.
- VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Contexto histórico del dopaje.

El dopaje se puede considerar uno de los principales problemas en la época actual del deporte. Sin embargo, la realidad es que el consumo de sustancias ergogénicas surge a la vez que el nacimiento del propio ejercicio físico.

En el origen del dopaje destacan el uso de sustancias naturales como la muscarina, procedente del hongo “*Amanita muscaria*”, la cual es estimulante del parasimpático. También destacan en las civilizaciones chinas el uso de compuestos estimulantes como “Ma Huang”, al poseer efedrina, o la raíz de ginseng (*Panax ginseng*). En el continente americano destacan el mate, la psilocibina, el yagé, la mescalina y principalmente la coca, las cuales presentan efectos estimulantes, anorexígenos o alucinógenos. Con respecto a Oriente Medio y África nos encontramos con la catina, procedente de la planta “*Catha edulis*” con efectos estimulantes parecidos a la norefedrina, y la mandrágora (*Mandragora autumnalis*), productora de efectos afrodisíacos, narcóticos o tóxicos.

Una vez que el dopaje incrementó su transcendencia y relevancia en el mundo contemporáneo, surgen nuevos compuestos sintéticos utilizados para el doping como las anfetaminas. Ésta sustancia fue utilizada durante la Segunda Guerra Mundial o la guerra de Corea (López Gómez, 2010). Los primeros esteroides anabolizantes fueron utilizados por los levantadores de peso soviéticos en el 50. En el caso de los pilotos, se utilizó la transfusión de sangre y la ingesta de anfetaminas para aumentar la eficiencia y estimulación en vuelos nocturnos (Rodríguez-Pérez et al., 2015).

Hoy en día, podemos decir que nos adentramos en una nueva fase del dopaje en base a los avances biotecnológicos como el desciframiento del genoma humano por James D. Watson. En esta etapa surge el dopaje genético (Atienza Macías et al., 2014).

2.1.1. Contexto histórico a nivel deportivo.

Con el inicio de los Juegos Olímpicos en Grecia (776 a.C.), comienza el uso de pócimas, alimentos o brebajes para aumentar el rendimiento físico (López Gómez, 2010). Sin embargo, este tipo de dopaje era diferente al actual; se caracterizaba por el consumo de cocimientos de plantas, en el caso de los corredores para evitar la congestión, como la cola de caballo. También era habitual la ingesta de varios tipos de carne, como la de cabra, toro o cerdo, por atletas, lanzadores o boxeadores (Alfaya, 2018).

Con el surgimiento del deporte moderno, se comienzan a usar compuestos farmacológicos. Hasta entonces, el dopaje era un acto no sancionado, e incluso aceptado por el mundo del deporte debido al desconocimiento de sus efectos. El primer caso detectado se atribuyó a un

grupo de nadadores en el canal de Ámsterdam que usaron una sustancia desconocida para aumentar su rendimiento. En la carrera de París-Burdeos (1886) se produjo la primera muerte documentada por dopaje del ciclista Arthur Linton, el cual consumió una mezcla de estupefacientes (Rodríguez-Pérez et al., 2015). El atleta Thomas Hicks en las Olimpiadas de St. Louis (1904) consumió alcohol y estircnina, las cuales le ayudaron a finalizar victorioso la carrera (Atienza Macías et al., 2014).

En los Juegos Olímpicos de Londres (1908) el atleta Dorando Pietri ingirió estircnina produciéndole varias caídas a lo largo de la maratón. Debido a esto, surge la frase “lo importante no es ganar, sino participar” en la ceremonia de clausura de dichos juegos pronunciada por Pierre de Coubertin (Rodríguez-Pérez et al., 2015). También destaca la muerte televisada del ciclista Tommy Simpson durante el Tour de Francia (1967) (Marco et al., 2009) por el consumo de anfetaminas (Rodríguez-Pérez et al., 2015).

La mayoría de estos casos fueron los causantes del cambio de perspectiva que se tenía del dopaje. A partir de este momento se incrementan las medidas antidoping y surgen laboratorios para el control de éste.

En el año 1960 el Consejo Europeo publicó una sentencia contra el consumo de sustancias dopantes (Rodríguez-Pérez et al., 2015). En 1961 surge el primer laboratorio antidoping en Florencia, Italia (Casajús Mallén, 2005). El Comité Olímpico Internacional (COI) se une a la política antidoping en los Juegos Olímpicos de México (1968) (Marco et al., 2009) mediante la realización de controles de orina a los deportistas. Sin embargo, los análisis de orina se consideraron posteriormente técnicas poco desarrolladas desde un punto de vista técnico y sólo servían para un número limitado de drogas (Atienza Macías et al., 2014). Entre 1988 y 1998 se producen los siguientes hechos: positivo en esteroides de Ben Johnson y suceso Festina, y con ellos el COI produce cambios en la forma de realizar los exámenes de orina, haciéndolos de manera esporádica a lo largo de la temporada (Alfaya, 2018).

Finalmente, surge la Agencia Mundial Antidopaje (AMA) en 1999 y con ella toda la normativa y directrices a seguir por parte de los países y delegaciones deportivas (Casajús Mallén, 2005).

2.2. Definición del dopaje y sustancias productoras de este.

2.2.1. Definición del dopaje.

Hoy en día existen muchas definiciones formales elaboradas por las diferentes agencias nacionales e internacionales involucradas en el mundo del dopaje.

Entre ellas destacamos la definición de la AMA:

Según el Artículo 1 del Código Mundial Antidopaje (2021) define el dopaje como “la comisión de una o varias infracciones de las normas antidopaje, siendo dichas infracciones:

- Presencia de sustancias prohibidas, sus metabolitos o marcadores en la muestra biológica del deportista.
- Uso o intento de utilización de una sustancia o método prohibido.
- Evitar o negarse a someterse a la recogida de muestras.
- Localización fallida del deportista.
- Manipulación o su intento en cualquier parte del proceso de control del dopaje.
- Posesión o tráfico de una sustancia o un método prohibido.
- Administración a un deportista durante o fuera de la competición, de una sustancia o método prohibidos” (AMA, 2021a).

Según la Comisión de Dopaje en Medicina del Deporte de la Asociación de la Medicina de la Educación Física y el Deporte (AMEFIDE) y de la Federación Española de Medicina del Deporte (FEMEDE) plantea la siguiente definición:

“Toma o aplicación de sustancias por parte del deportista, con el fin de mejorar su rendimiento, que pueden resultar peligrosas para la salud como consecuencia de las siguientes circunstancias:

- Las propias características de riesgo de las sustancias empleadas.
- La inducción de cambios en el entorno vital del deportista que impliquen la aparición o incremento de riesgo para el mismo.
- La utilización de dosis masivas de sustancias.
- La combinación de diversas sustancias” (Marqueta, 2001).

Obviamente, como en muchos otros países, en España, el dopaje está tipificado como delito según el Artículo 362 quinquies del Código Penal, y está dentro del ámbito de aplicación en función de la Ley Orgánica 3/2013, de 20 de junio, de Protección de la salud del deportista y lucha contra el dopaje en la actividad deportiva.

2.2.2. Sustancias dopantes.

A lo largo de los años la lista de sustancias y métodos prohibidos en competición ha ido modificándose y evolucionando según la situación científica y deportiva del momento.

Entre las primeras listas que surgen encontramos la “Lista de 1966 del Consejo de Europa”, que incluye narcóticos, anfetaminas y sus derivados, estricnina, trinitroglicerina, éter dietílico, fenilmetilmorfolina y dialcoholamidas del ácido crotonilalcoholaminobutírico. A continuación, es la “Lista de 1972 del Comité Olímpico Internacional” la que constituye una importante evolución pasando de prohibir sustancias aisladas a prohibir grupos farmacológicos (aminas simpaticomiméticas, analgésicos narcóticos y derivados, diversos estimulantes del sistema nervioso central y estimulantes psicomotores). Listas posteriores incluyen diuréticos y

hormonas peptídicas como la eritropoyetina, así como métodos como el dopaje sanguíneo o el dopaje genético.

Finalmente, en la “Lista de 2009 del Comité Olímpico Internacional” se dividen las sustancias en aquellas que están prohibidas siempre y las que están prohibidas durante la competición. También, algunas sustancias como los betabloqueantes y el alcohol sólo estarán prohibidas en determinadas modalidades deportivas. Incluso, se permite el uso de ciertas sustancias siempre y cuando se justifique clínicamente su uso por parte del deportista (Alfaya, 2018).

Actualmente, las sustancias prohibidas estarán divididas en tres categorías según la Agencia Mundial Antidopaje:

- Sustancias que están prohibidas siempre.
- Sustancias que están prohibidas en competición.
- Sustancias prohibidas en ciertos deportes.

2.2.2.1. Sustancias que están prohibidas siempre.

Son aquellas sustancias prohibidas tanto dentro como fuera de la competición (**Tabla 1**). Encontramos:

- *Agentes anabolizantes*: esteroides anabolizantes androgénicos (testosterona, nandrolona) (Roldan-Tabares et al., 2019) y sustancias con efectos biológicos o estructura química similar como clenbuterol, tibolona, moduladores selectivos del receptor de andrógeno, zilpaterol y zeranol (Alfaya, 2018). Se suelen usar en suplementos deportivos u otros productos y sólo si las cargas de entrenamiento y las dosis usadas son altas producirán un incremento de la masa muscular, peso y efecto estimulante. Entre los problemas adversos más frecuentes se encuentran la detención del crecimiento, atrofia testicular, acné, caída del cabello, ginecomastia, hirsutismo, amenorrea, calvicie (Marqueta, 2001). Únicamente la testosterona será cuantificada debido a su producción endógena por el organismo; el resto de los esteroides anabolizantes androgénicos serán considerados positivos por poca cantidad que se detecte en orina (Gordillo, 1999).
- *Hormonas peptídicas, factores de crecimiento, sustancias afines y miméticos*: eritropoyetina (EPO), corticotrofinas (ACTH) o hormona de crecimiento (hGh) (Roldan-Tabares et al., 2019). En el caso de la EPO incrementa la hemoglobina y los glóbulos rojos en sangre, favoreciendo el transporte de oxígeno, pero pudiendo desencadenar hipertensión arterial (HTA), policitemia e incluso un accidente tromboembólico. La ACTH puede desencadenar fenómenos de euforia (Marqueta, 2001). Sin embargo, tiene efectos contraproducentes como reacciones alérgicas, HTA, retención de fluidos o síndrome de Cushing (Garro Zamora, 2013). Por último, la hGh incrementa la masa muscular, reduce el peso graso e incrementa la altura en adolescentes. En contraposición, tiene efectos adversos notables

tales como gigantismo, acromegalia, intolerancia a la glucosa y diabetes, hipotiroidismo, HTA y aumenta el riesgo de contagio de hepatitis y SIDA (Marqueta, 2001). Por muy poca dosis que aparezca en la orina se considerarán positivos, sin embargo el problema es que muchos de estos compuestos no son detectados en la orina, por ejemplo EPO, hGh, ACTH, etc (Gordillo, 1999).

- *Agonistas beta 2*: fenoterol, terbutalina o salbutamol (Roldan-Tabares et al., 2019). Los deportistas utilizan estos compuestos para aumentar su capacidad respiratoria, aunque pueden provocar disminución del flujo sanguíneo que conlleva fatiga muscular, disminución de la frecuencia cardiaca, hipotensión arterial, sequedad ocular y disminución del sueño. (Baltzarova Valentinova, 2013)
- *Moduladores hormonales y metabólicos*: inhibidores de la aromatasa, moduladores selectivos de receptores de estrógeno, agentes modificadores de la función de la miostatina, otras sustancias antiestrogénicas (Roldan-Tabares et al., 2019). Estos grupos de compuestos se encuentran en fases de ensayo clínico y se piensa que podrían ser usados para el crecimiento de los músculos y para mejorar el metabolismo (Barroso et al., 2008).
- *Diuréticos y agentes enmascarantes*: desmopresina, probenecida, expansores del plasma, acetazolamida, ácido etacrínico (Roldan-Tabares et al., 2019). Estos compuestos no producen ningún tipo de aumento del rendimiento físico, sin embargo, son utilizados por los deportistas con dos fines: reducción rápida de peso y enmascarar sustancias dopantes en la orina. Los efectos adversos que producen son: alteraciones electrolíticas, reducción de proteínas plasmáticas, alteraciones gastrointestinales y hematológicas (Marqueta, 2001).

Tabla 1. Clasificación de las sustancias dopantes prohibidas siempre por la AMA.

Sustancias que están prohibidas siempre			
Grupo farmacológico	Ejemplo de sustancia	Efecto dopante	Reacción adversa
Agentes anabolizantes (esteroides androgénicos)	Testosterona, nandrolona, clenbuterol, tibolona.	Aumento masa muscular, peso y efectos estimulantes.	Detención crecimiento, atrofia testicular, acné, caída cabello.
Hormonas peptídicas, factores de crecimiento.	EPO	Aumento masa muscular y reducción hipoxia tisular.	HTA, policitemia, accidente tromboembólico.
	ACTH	Efectos estimulantes (euforia)	Reacciones alérgicas, HTA, retención de fluidos, síndrome de Cushing.
	hGh	Aumento masa muscular,	Gigantismo, acromegalia,

Sustancias que están prohibidas siempre			
		disminución peso graso y aumento de altura.	intolerancia a la glucosa y diabetes, HTA, hipotiroidismo.
Agonistas Beta 2	Fenoterol, terbutalina o salbutamol	Aumentar función respiratoria.	Disminución flujo sanguíneo. Fatiga muscular, bradicardia, hipotensión, sequedad ocular.
Moduladores hormonales y metabólicos	Inhibidores de la aromatasa, moduladores selectivos de receptores de estrógeno, agentes modificadores de la función de la miostatina.	Mejorar el metabolismo y favorecer la hipertrofia muscular.	
Diuréticos y agentes enmascarantes	Desmopresina, probenecida, expansores del plasma, acetazolamida.	Disminución rápida del peso y enmascarar otras sustancias dopantes.	Alteraciones electrolíticas, disminución proteínas plasmáticas, alteraciones gastrointestinales y hematológicas.

2.2.2.2. Sustancias prohibidas en competición.

Se pueden clasificar en (**Tabla 2**):

- *Estimulantes*: los cuales pueden ser específicos como cafeína, catinona, epinefrina o pseudoefedrina, y los no específicos como cocaína o anfetamina (Roldan-Tabares et al., 2019). Estas sustancias permiten realizar mayores esfuerzos debido a que mejoran el rendimiento físico e incrementan la agresividad. Por el contrario, pueden producir problemas cardiacos (arritmias, taquicardias, incremento del gasto cardiaco), HTA, dependencia física, crisis convulsivas, ansiedad e incluso la muerte (Marqueta, 2001).
- *Narcóticos*: morfina, buprenorfina, metadona, heroína, petidina (Roldan-Tabares et al., 2019). Son comúnmente utilizados para reducir la respuesta psicológica y fisiológica del dolor. Tienen como inconvenientes sus posibles efectos secundarios: disminución de lutropina, aumento de la descarga de la hormona antidiurética, depresión respiratoria y cardiovascular, disminución de la testosterona, reducción de la función renal, alto grado de dependencia, estreñimientos (Marqueta, 2001).
- *Cannabinoides*: naturales como el cannabis, hachís y marihuana, o sintéticos como THC (Roldan-Tabares et al., 2019). Los escasos estudios científicos acerca del uso de cannabinoides expresan que los efectos de estos se basan en la relajación del deportista (Macías, 2013a). Los efectos negativos a corto plazo pueden ser pérdida de la

concentración, incremento del apetito, subida de la frecuencia cardiaca, ansiedad, mientras que a largo plazo pueden provocar un empeoramiento de enfermedades respiratorias e infecciosas y una reducción de la memoria, concentración y aprendizaje (Gonzales Calderon, 2020).

- *Glucocorticoides*: metilprednisolona, dexametasona, prednisona, cortisona, budesonida, hidrocortisona (Roldan-Tabares et al., 2019). Son antiinflamatorios. Como reacciones adversas presentan hiperglucemia, HTA, mayor incidencia de infecciones, Síndrome de Cushing (Marqueta, 2001).

Tabla 2. Clasificación de las sustancias dopantes prohibidas en competición por la AMA.

Sustancias prohibidas en competición			
Grupo farmacológico	Ejemplo de sustancia	Efecto dopante	Reacción adversa
Estimulantes	Cafeína, cocaína, anfetaminas, catinona.	Aumentan rendimiento físico y agresividad.	Problemas cardiacos, HTA, dependencia física, ansiedad, muerte.
Narcóticos	Morfina, buprenorfina, heroína, metadona, petidina.	Reducen respuesta psicológica y fisiológica del dolor	Disminución de lutropina, depresión respiratoria y cardiovascular, estreñimiento, disminución testosterona.
Cannabinoides	Hachís, marihuana, THC.	Relajación del deportista.	Pérdida de la concentración, ansiedad, taquicardia, reducción memoria y aprendizaje.
Glucocorticoides	Metilprednisolona, dexametasona, prednisona, cortisona, hidrocortisona, budesonida.	Antiinflamatorios	HTA, hiperglucemia, infecciones, síndrome de Cushing.

2.2.2.3. Sustancias prohibidas en ciertos deportes.

De las cuales se prohíben (**Tabla 3**):

- *Betabloqueantes*: en deportes como el billar, dardos, automovilismo, golf, tiro, tiro con arco, deportes submarinos y esquí (Alfaya, 2018). Estas sustancias también se encuentran prohibidas fuera de la competición y serían: atenolol, propranolol, carvedilol, sotalol o timolol (AMA, 2021a). Sus efectos en deportistas son la reducción de las pulsaciones, la

ansiedad y el estado nervioso de los deportistas previamente a una competición. Como reacciones adversas presentan hipotensión, bradicardia, alteraciones digestivas, insuficiencia cardiaca, hipoglucemia (Baltazarova Valentinova, 2013).

- *Alcohol*: si la concentración de alcohol en sangre es superior a 0,5 se considerará positivo (Gordillo, 1999). Se encuentra prohibido en deportes como esgrima y tiro. La mayor parte de deportistas utilizan el alcohol por razones sociales, sin embargo, hay un pequeño porcentaje de ellos que lo utilizan por razones ergogénicas. El alcohol se usa para reducir la sensibilidad al dolor y mejorar la confianza. También puede estimular el sistema cardiovascular o disminuir el temblor o excitación emocional. Los efectos adversos más frecuentes son deshidratación, pérdida del equilibrio, acidez gástrica, taquicardia, etc. (Maughan, 2000)

Tabla 3. Clasificación de sustancias dopantes prohibidas en ciertos deportes por la AMA.

Sustancias prohibidas en ciertos deportes				
Grupo farmacológico	Ejemplo de sustancia	Efecto dopante	Reacción adversa	Deportes prohibidos
Betabloqueantes	Atenolol, propranolol, carvedilol, timolol, sotalol.	Reducción del estado nervioso previo a las competiciones.	Hipotensión, alteraciones digestivas, bradicardia, insuficiencia cardiaca, hipoglucemia.	Billar, dardos, automovilismo, golf, tiro, tiro con arco, deporte submarinos, esquí.
Alcohol		Reducir estrés y excitación, estimular sistema cardiovascular, mejorar confianza y reducir sensibilidad al dolor.	Deshidratación, acidez gástrica, taquicardia, pérdida del equilibrio.	Esgrima, tiro.

2.3. Métodos prohibidos

Otros métodos prohibidos de dopaje descrito por la AMA son:

- Manejo de sangre o componentes de la sangre.
- Manipulación química y física.
- Dopaje genético y celular.

2.3.1. Manejo de sangre o componentes de la sangre.

Hace referencia a la administración intravenosa de sangre o productos sanguíneos que contengan hematíes con la finalidad de aumentar el rendimiento físico (Gordillo, 1999). Se pueden observar tres situaciones:

- Aumentar el transporte de oxígeno de manera artificial mediante productos químicos perfluorados y de hemoglobina modificada.
- Administración de una dosis de sangre en el sistema circulatorio de la misma o diferente persona.
- Manipulación fisicoquímica de la sangre o componentes de la sangre (Roldan-Tabares et al., 2019).

Como efectos secundarios se pueden producir fiebre, ictericia, shock anafiláctico, sobrecarga del aparato circulatorio (Gordillo, 1999).

2.3.2. Manipulación química y física.

Consiste en los procesos implicados en la manipulación o alteración de las muestras biológicas del deportista para el control del dopaje (Roldan-Tabares et al., 2019).

2.3.3. Dopaje genético

Se define como “uso no terapéutico de genes, elementos genéticos y/o células que tienen la capacidad de incrementar el rendimiento de un deportista” (Argüelles et al., 2014). Según la AMA lo que se encuentra prohibido en relación con el dopaje genético es el uso de células normales o genéticamente modificadas y la transferencia de polímeros de ácidos nucleicos o análogos (Verdugo Guzmán, 2017).

Este tipo de dopaje consiste en la identificación, aislamiento y amplificación de células del deportista para su posterior extracción y cultivo in vitro mediante transfección y transducción de ADN (ácido desoxirribonucleico). Finalmente se produce la transferencia del gen a las células a través de un vector, usando métodos como la inhalación o la inyección (Roldan-Tabares et al., 2019). Este vector puede ser de origen vírico (virus, adenovirus, retrovirus, ...) o no virales (ADN desnudo, oligonucleótidos, dendrímeros, ...) (Cabrera Oliva & Pino Rivero, 2010).

Para la detección del dopaje genético sería necesario utilizar técnicas moleculares como:

- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- Extracción de ADN de muestras biológicas.
- Estudio de las secuencias de interés mediante biosensores, sondas, polimorfismos, marcadores (Argüelles et al., 2014).

Actualmente no se han detectado casos de dopaje genético en ningún deportista. Sin embargo, los ensayos clínicos y la experimentación con animales se encuentran en una etapa muy avanzada. Hasta el día de hoy solo podemos especular sobre aquellos genes que serían mejores candidatos para el dopaje genético, por ejemplo, un gen que codifica para la EPO, miostatina, hGh, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Cantelmo et al., 2020).

Los efectos adversos que se estiman que sean los más probables de producirse son: infarto de miocardio, cardiomegalia, embolismos, trastornos inmunológicos, accidentes cerebrovasculares, alteraciones musculares (Cabrera Oliva & Pino Rivero, 2010).

2.4. Abordaje del dopaje en la oficina de farmacia

El farmacéutico es un profesional de la salud que posee una amplia variedad de conocimientos farmacológicos, toxicológicos o de análisis químico, entre otros. En la oficina de farmacia una de las principales funciones del farmacéutico es la dispensación de medicamentos y productos sanitarios, los cuales podrían tratarse de sustancias dopantes. Así pues, para la dispensación de estas sustancias, el farmacéutico se debe asegurar que sea con receta médica (si lo precisa) y bajo control médico.

En el año 2005, se produjo una reunión por la Federación Internacional Farmacéutica (FIP) en El Cairo teniendo como tema principal “el papel del farmacéutico en el dopaje deportivo”. En dicha reunión, se determinaron las siguientes recomendaciones:

- Fomentar los efectos beneficiosos del ejercicio físico.
- Estar al tanto del uso de medicamentos por razones justificadas y por causas ilegales entre deportistas.
- Negarse a la dispensación de medicamentos siempre y cuando se sepa con certeza que van a ser usados con fines dopantes.
- Anotar en la ficha del paciente la participación en competiciones deportivas del mismo.
- Proporcionar información sobre medicamentos con sustancias dopantes a personas deportistas de competición.
- Proporcionar información a personas deportistas acerca de los beneficios de los suplementos nutricionales y sus posibles riesgos (Asociación Andaluza de Derecho Deportivo., 2002).

La campaña “Protege tu salud, di no al dopaje” propuesta por la Agencia Española de Protección de la Salud y el Deporte (AEPSAD) implica al farmacéutico en la prevención del dopaje. El farmacéutico proporciona información y asesoramiento a deportistas y clientes de la farmacia, además de notificar sospechas de casos de dopaje al Colegio (CACOF, Consejo Andaluz de Colegios Oficiales de Farmacéuticos).

También el farmacéutico puede trabajar en colaboración con la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), usando el Centro de Información de Medicamentos (CIMA) para ver la ficha técnica de los medicamentos y ver si presentan sustancias ergogénicas. También, podrían ver la lista de sustancias prohibidas propuestas por la AMA.

3. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo bibliográfico es conocer y describir los principales métodos analíticos que se utilizan actualmente para la identificación del dopaje deportivo. Para la consecución de este objetivo principal se consideran los siguientes sub-objetivos:

- Explicar cómo se produce la recogida de muestras en el área de control del dopaje y el transporte de estas hasta el laboratorio.
- Conocer la documentación precisa que debe entregar el deportista en caso de competición y la necesaria en caso de que tenga algún tratamiento farmacológico concreto.
- Conocer toda la normativa legal que afecta a varios ámbitos del deporte y el dopaje (deportista, laboratorio, zona de recogida de muestras, etc). Además, conocer el “límite mínimo de rendimiento requerido” para las sustancias que lo precisen.
- Describir los métodos analíticos que permiten la cuantificación e identificación de sustancias dopantes en el deportista.

4. METODOLOGÍA

El Trabajo de Fin de Grado “Métodos analíticos en la detección del dopaje” se trata de una revisión bibliográfica de artículos, libros, documentos realizados por organismos públicos, páginas web e incluso tesis doctorales y otros trabajos de fin de grado relacionados con el dopaje en el ámbito deportivo y las diferentes técnicas analíticas para su detección.

Para la búsqueda de información se utilizaron bases de datos como

- Google Académico.
- PubMed.
- Sciencedirect.
- Web of Science.
- Biblioteca de la Universidad de Sevilla a través del catálogo FAMA.

Las palabras claves utilizadas, de manera general, fueron: “dopaje”, “doping”, “historia del dopaje”, “control dopaje”, “métodos analíticos para el control del dopaje”, “fundamentos de química analítica”, “efectos de - sustancia ergogénica – en el deportista”. Más específicamente: “cannabinoides dopaje”, “ACTH dopaje”, “dopaje genético”, “cromatografía y dopaje”, “cromatografía de gas acoplada a la espectrometría de masas dopaje”, “EPO dopaje”, cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas dopaje”, “narcóticos dopaje”, “inmunoensayos dopaje”, “electroforesis dopaje”, “cuantificación – sustancia dopante – doping”, “esteroides anabolizantes androgénicos dopaje”.

Para realizar la revisión también se usaron palabras claves en inglés como: “doping”, “effects of – doping substance – doping”, “doping control”, “doping history in sports”, “analysis method of – doping substance – doping”. Más específicamente: “effects of alcohol doping in sports”, “gene doping side effects”.

Para la traducción de palabras en inglés se han utilizado las siguientes páginas: “Traductor de Google” y “WordReference”. En el caso de artículos completos, el programa: “deepl”.

Para la elaboración de la “Figura 1” y “Figura 2” se utilizaron imágenes procedentes de Google y posteriormente se editaron en el programa “Paint”.

También se ha buscado información en las páginas web de la AEPSAD y CACOF, así como en documentos elaborados por la AMA, como el Código Mundial Antidopaje.

La imagen procedente de la portada ha sido sacada de “Google Imágenes” y pertenece a un vídeo elaborado por la AEPSAD.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la actualidad existen dos tipos de control del dopaje, por un lado, el control de dopaje “en competición” – en el cual pueden ser elegidos cualquiera de los deportistas implicados en la prueba -, y por otro lado, el dopaje “fuera de competición” - para deportistas incluidos en el grupo de seguimiento de la AEPSAD - (Atletismo., 2018).

Según la ley española, los controles antidopaje incluyen:

- Organización del control antidopaje.
- Recolección, manipulación y transporte de la muestra.
- Análisis de la muestra en el laboratorio.
- Gestión de los resultados (Macías, 2013b).

5.1. Recogida y preparación de muestras.

Según la Ley Orgánica 3/2013 (“Ley de protección de la salud del deportista y lucha contra el dopaje en la actividad deportiva), cualquier deportista puede ser elegido para proporcionar una muestra por una agencia antidopaje (Yelmo, 2014).

La selección del deportista para el control será notificada al mismo a través de un oficial de control (OCD) (AEPSAD, Agencia Española de Protección de la Salud y el Deporte). Los deportistas sometidos a control pueden ser: elegidos por sorteo, por la clasificación final o por otro motivo. Se tendrá en cuenta el sexo del deportista (Baltazarova Valentinova, 2013).

El Área de Control de Dopaje donde se procederá a la recogida de la muestra deberá estar compuesta por un personal cualificado: un médico y un técnico o enfermero. Según la Orden PRE/1832/2011, de 29 de Junio (por la que se regula el área de control de dopaje, el material para la toma de muestras y el protocolo de manipulación y transporte de muestras de sangre), la estación de control deberá contar con una sala de espera, una sala de trabajo para completar formularios y realizar actividades complementarias a la recogida de muestras, una sala de extracción de sangre y una sala de recogida de muestras de orina (Ministerio de educación cultura y deporte, 2021).

Las muestras generalmente pueden ser de orina o de sangre.

- Para muestras de sangre se realiza una extracción o venopunción con aguja estéril por sistema de vacío. La recogida se lleva a cabo en tubos de vidrio los cuales contendrán anticoagulante o gel polímero inerte separador del activador de la coagulación y el suero en casos donde se quiera analizar la sangre o el suero.

Como material complementario se pueden utilizar: esparadrapos, gasas y apósitos estériles, compresor, guantes desechables, una solución desinfectante que no interfiera

en el proceso de identificación de sustancias dopantes y un contenedor para residuos de riesgo o sanitarios.

El transporte al laboratorio de las muestras de sangre se realizará en un depósito que evite la exposición solar directa y que permita la posición vertical de los tubos de vidrio. Los tubos de vidrio portadores de la sangre se introducirán en dos frascos de vidrio (un frasco A y un frasco B), los cuales estarán identificados con un código común correspondiente a un deportista. Ambos frascos deberán estar cerrados por dos tapones que se abren mediante rotura mecánica. Cada frasco se introducirá en una bolsa de plástico transparente, la cual debe incluir una bolsa con material adsorbente y al menos 8 etiquetas adhesivas con el código del deportista (Ministerio de educación cultura y deporte, 2021) (**Figura 1**).

Una vez en el laboratorio acreditado por la AMA se procederá al análisis de la muestra.

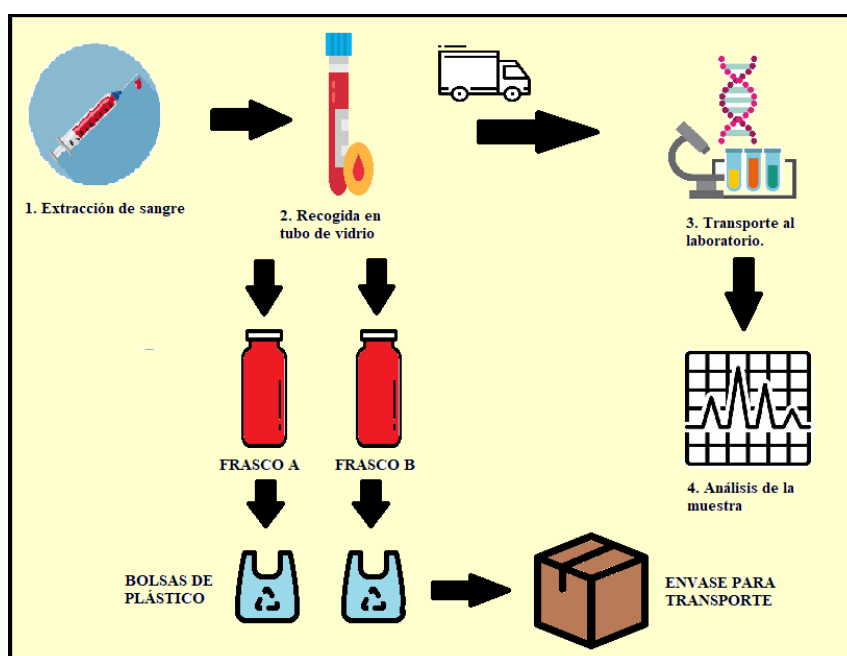


Figura 1. Esquema de la recogida y preparación de las muestras de sangre.

- Para muestras de orina el deportista, en primer lugar, debe elegir el recipiente para la recogida de muestras. Una vez seleccionado, se procederá a la recogida de orina y para ello tiene que dejar libre de ropa desde la cintura hasta la rodilla para que el OCD pueda observar la emisión. El volumen de orina no debe ser inferior a 80 mililitros.

La orina recogida será almacenada en frascos de vidrio (frasco A y frasco B) (BOE, 2011). Como mínimo los frascos deben poseer las siguientes características: ser de vidrio resistente, que incluyan algún procedimiento para evitar que se produzca un cierre accidental, capacidad de al menos 100 mililitros cada uno y deben garantizar que

la identidad del deportista no aparezca en ellos. Además, cada frasco estará identificado con un código común correspondiente a cada deportista, el cual constará de seis dígitos. Los frascos deben estar cerrados herméticamente y para ello se utilizan tapones que impiden la salida de muestra.

Para el envío de muestras de orina al laboratorio se debe utilizar un contenedor que posea las siguientes características:

- Para el transporte de muestras que no requieran congelación ni refrigeración, los frascos se incorporan en una bolsa de seguridad precintada.
- Para el envío de muestras que se necesiten conservar congeladas o refrigeradas se utilizará una bolsa de seguridad precintada, la cual debe poder resistir los requerimientos de temperatura exigidos. En este caso, a las muestras de orina se les debe agregar acumuladores del frío para mantener las temperaturas (Ministerio de educación cultura y deporte, 2021) (**Figura 2**).

El OCD además debe medir la densidad de la orina y el pH utilizando el refractómetro y las tiras reactivas de orina respectivamente (BOE, 2011).

Se procederá al análisis de la muestra una vez se encuentre en el laboratorio acreditado por la AMA.

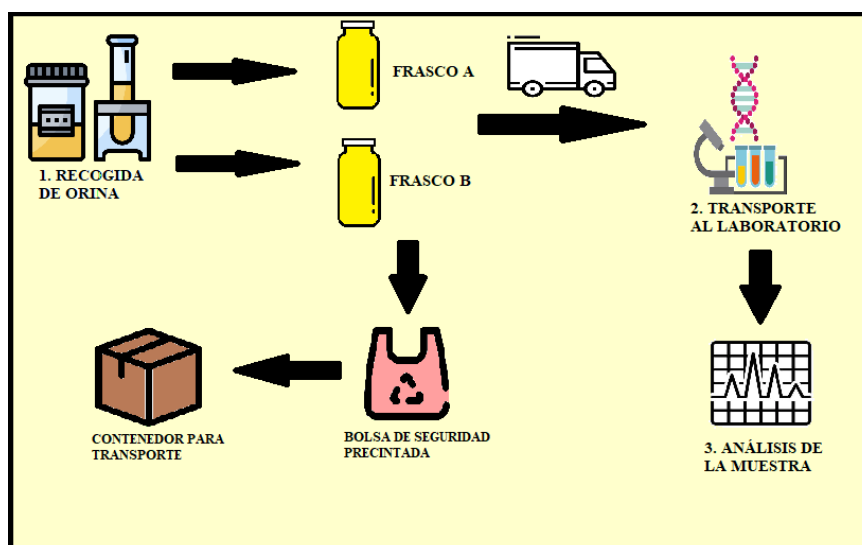


Figura 2. Esquema de la recogida y preparación de las muestras de orina.

Todo esto viene regulado por el Real Decreto 641/2009, de 17 de abril (por el que se regulan los procesos de control de dopaje y los laboratorios de análisis autorizados, y por el que se establecen medidas complementarias de prevención del dopaje y de protección de la salud en el deporte) (BOE, 2011).

Por último, el deportista tiene la obligación de firmar el Formulario de Control de Dopaje, el cual consta de cinco hojas dirigidas a:

- Autoridad de Control: Agencia Española de Protección de la Salud en el Deporte, Federación Internacional u organismo internacional competente.
- Al deportista.
- Autoridad de Recogida: Agencia Española de Protección de la Salud en el Deporte u organismo encargado en la toma de muestras.
- Al laboratorio que se encarga del control del dopaje.

Los datos que cumplimentar de manera obligatoria son:

- Datos identificativos del deportista (nombre, apellidos, nacionalidad, tipo de documentado utilizado para la identificación y número).
- Tipo de muestra a recoger.
- Fecha y hora de la notificación.
- Nombre y apellidos del personal sanitario que realiza la notificación.
- Firma del personal sanitario que realiza la toma de muestras.
- Firma del deportista (Ministerio de Cultura y Deporte, 2021).

En casos donde el deportista esté bajo un tratamiento farmacológico que incluya sustancias dopantes prohibidas por la AMA será necesario solicitar una Autorización de Uso Terapéutico (AUT). Las condiciones para pedir la AUT son:

- Demostrar el padecimiento de una determinada patología.
- Que la sustancia o método prohibido es necesario para esa patología.
- Que no existe otra alternativa farmacológica.
- Que existen bajas probabilidades de que el tratamiento produzca una mejora de tu rendimiento.

La solicitud se debe realizar lo más pronto posible a la AEPSAD, si es a nivel nacional, o a tu federación internacional y será aceptada y validada por el Comité de Autorizaciones de Uso Terapéutico (CAUT) (AEPSAD, s.f.).

5.2. Análisis de la muestra.

Una vez la muestra se encuentre en el laboratorio, es el momento de analizarla. Para ello el laboratorio debe tener una serie de requerimientos (norma ISO/IEC 17025) (World Anti-Doping Agency, 2009):

- Competencias humanas.
- Instalaciones y condiciones ambientales adecuadas.
- Métodos de ensayo y calibración.
- Procedimientos de ensayo validado.

- Procedimientos y métodos óptimos de ensayo que aseguren la calidad de los resultados y permitan la acreditación del laboratorio (Consejo Superior de Deportes, 2008).

Ahora bien, un método analítico es aquella técnica que se utiliza para identificar que sustancias puede haber presente en un material y para determinar las cantidades exactas de dicha sustancia (Gary D, 2009).

En el análisis de las sustancias dopantes vamos a distinguir varios tipos de técnicas:

- Cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (CG/EM).
- Inmunoensayo.
- Isoelectroenfoque (IEF) y posterior detección por quimioluminiscencia.
- Cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas (CL/EM).

En el código mundial antidopaje estándar internacional para laboratorios (norma ISO/IEC 17025) se menciona que de elección para el análisis de sustancias dopantes son la CG/EM y la CL/EM. Sin embargo, también se pueden utilizar otros como el inmunoensayo o la electroforesis para algunas moléculas (hGh o EPO, respectivamente) (AMA, 2021b).

Además, para cada sustancia la AMA establece un “Límite mínimo de rendimiento requerido (MRPL)” que viene recogido en el documento técnico de la AMA “TD2022MRPL” (WADA, 2022). Esto quiere decir que, si el resultado analítico del análisis de una sustancia es superior al MRPL, se reportaría. Este MRPL sólo es válido para las técnicas cromatográficas y espectrometría de masas.

5.2.1. Cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (CG/EM)

La cromatografía de gases (GC) es una de las técnicas más utilizadas para la determinación cualitativa y cuantitativa de compuestos orgánicos (Gary D, 2009). La característica principal de este método analítico es que permite que los componentes de una muestra vaporizada se dividan al ser distribuidos entre una fase móvil y una fase estacionaria, la cual está retenida en una columna (Skoog et al., 2015).

Existen dos tipos de CG, cromatografía de gas-sólido y cromatografía de gas-líquido, siendo la principal diferencia entre ambas el estado de la fase estacionaria (Gary D, 2009).

Esta técnica utiliza como fuente móvil un gas inerte cuya función principal es trasladar los componentes de la muestra, permitiendo que éstas fluyan a través de la columna de fase fija (Skoog et al., 2015).

Los compuestos a determinar deben ser volátiles y estables a las temperaturas utilizadas (50-300 °C). Por ejemplo: gases, compuestos organometálicos, mayoría de compuestos orgánicos no ionizados, sólidos o líquidos que posean hasta unos 25 carbonos (Gary D, 2009). Si no se

podiera cumplir estos requisitos, se recurre al proceso de derivatización a través del cual se modifica químicamente una sustancia dando lugar a un derivado con mejoras en su volatilidad o estabilidad térmica y, por tanto, facilitando su detección (Macián, 2016).

Encontramos dos tipos de columnas en la CG: columna empacada y columna capilar (Skoog et al., 2015), siendo ésta última la más usada debido a su elevada eficacia de separación y con ello reduce el tiempo de análisis y el volumen de muestra (Macián, 2016).

En conclusión, con esta técnica se permite separar mezclas muy complejas, aunque a veces no es posible y se le acopla la espectrometría de masas (EM) como sistema de detección.

La espectrometría de masas es un método que consiste en ionizar y detectar las moléculas y átomos mediante su relación masa/carga (m/z) (Macián, 2016). Se puede utilizar para todo tipo de muestras. Los componentes básicos de un espectrómetro de masas serían un sistema de entrada de la muestra, el cual la impulsa hacia la fuente de iones donde los componentes de la muestra se transforman en iones gaseosos a través del choque de electrones, iones, fotones o moléculas. Estos iones salen hacia el analizador de masas, el cual los divide según su m/z , se recolectan y son transformados en una señal eléctrica. Además, requieren un sistema de vacío para asegurar una baja presión garantizando una frecuencia de colisión baja entre las diferentes especies químicas en el EM. Finalmente presentan un sistema de manipulación de datos que realiza el procesamiento de los resultados con el objetivo de producir el espectro de masas (Skoog et al., 2015).

Encontramos dos tipos de analizadores de masas: cuadripolar, el cual permite el pasos de iones específicos y presenta como ventajas la alta rapidez de transmisión, son pocos costosos y son compactos, y analizador de tiempo de vuelo, utilizados para el análisis de iones de gran masa (Gary D, 2009).

5.2.1.1. Análisis de los esteroides androgénicos anabolizantes (EAA). Testosterona.

Para este grupo de sustancias dopantes se usará la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas como método de elección. Previamente será necesario preparar la muestra (orina) mediante (Bueno, 1993):

- *Hidrólisis enzimática:* para separar los enlaces entre el ácido glucurónico y el compuesto.
- *Extracción y secado:* para ello se utilizará éter y se irá añadiendo poco a poco una disolución de timolol y metiltestosterona. El objetivo de esta fase será trasladar los compuestos de interés a la fase orgánica y finalmente purificar y concentrar.
- *Derivatización:* bloqueando los grupos termolábiles para mejorar las propiedades cromatográficas (Consejo Superior de Deportes, 2016). Generalmente la derivatización

utilizada consiste en una reacción de silanización, en la cual se transforman los grupos hidroxilos en grupos trimetilsilanoles (Torres, 2013).

Posteriormente, la muestra ya preparada puede analizarse mediante la CG/EM. Las características de este método serían:

- Necesaria la conversión química de los esteroides para mejorar su estabilidad química (preferiblemente aquellas moléculas que presentan grupos polares).
- Buscamos mejorar la resolución en las columnas capilares y la volatilidad de los esteroides debido a su elevado peso molecular y a la presencia de grupos polares (alcoholes o fenoles) que reducen las propiedades de separación en la columna.
- Generalmente se suele utilizar un sistema cromatógrafo de gases con inyector automático (Bueno, 1993). Se utiliza el helio como gas portador. Las condiciones del cromatógrafo serían: columna capilar del tipo HP-1 (100% dimetilpolisiloxano) con 17 m de longitud, grosor de la fase estacionaria de 0,11 μm y diámetro interior de 0,20 mm. Otras características de este método son la inyección tipo split (relación 10:1) con un volumen de inyección de 2 μL y el flujo constante (Martínez et al., 2007).
- La sustancia química que se analiza suele ser algún metabolito del esteroide administrado, el cual se encuentra en la orina en concentraciones mínimas e imprevisibles, y puede permanecer en el organismo en un plazo variable de tiempo, incluso de meses (Bueno, 1993).
- El acoplamiento de la EM es útil para obtener información estructural con una alta precisión y con la gran ventaja del espectro de masas, que es como una huella digital de la estructura química (Torres, 2013). El espectrómetro de masas, del tipo cuadrupolo (Martínez et al., 2007), utiliza el método de monitoreo selectivo de iones (SIM) con 70 eV de energía de ionización (Fernández et al., 2004).
- El MRPL, en el caso de los esteroides androgénicos, es de 2,5 ng/mL (WADA, 2022).

La testosterona a diferencia de los demás esteroides va a seguir un control diferente al tratarse de una sustancia endógena:

- Análisis cualitativo: el cual no es significativo, ya que, como hemos dicho, se trata de una sustancia presente en nuestro organismo (válido para el resto de EAA).
- Análisis cuantitativo: no es significativo porque el número de EAA varía de una persona a otra según el ciclo menstrual, sexo, periodo de vida, etc.

Entonces, estas dos consecuencias llevaron esto a dos hechos:

En 1979 se comienza a medir el cociente T/LH (testosterona/hormona luteinizante), ya que la administración exógena provoca un aumento de T y una caída de LH. Pero se rechaza la propuesta al no poder ratificar esta medida por CG/EM.

En 1983 se centran en una molécula natural como alternativa muy parecida a la testosterona: epitestosterona. Se comienza a medir el cociente T/E (testosterona/ epitestosterona) y representa así el único método válido para la detección del dopaje por esteroides androgénicos (intervalo del cociente T/E por encima de 4 daría positivo) (Bueno, 1993).

5.2.1.2. Análisis de agonistas Beta 2.

Los agonistas Beta 2 como el salbutamol también van a ser analizados, preferentemente, por CG/EM. Los pasos previos y condiciones cromatográficas son parecidas al caso de los EA.

Se han descrito, para el aislamiento de los compuestos, la extracción en fase líquida (utilizando terc butilmetil éter como disolvente), así como la extracción en fase sólida (empleando metanol y agua desionizada) (Martínez et al., 2007). Posteriormente, la CG/EM para la identificación, con un paso previo de derivatización (trimetilsililación, acilación y formación de derivados cíclicos). Se utilizó, también, la β -glucuronidasa para la hidrólisis enzimática. Al igual que en la identificación de los EAA, se emplearon los siguientes equipos: cromatógrafo de gases y un sistema de monitoreo selectivo de iones (SIM) en el espectrómetro de masas. El cromatógrafo de gases presenta una columna capilar de sílice fundida con polisilfenileno/siloxano al 5% acoplado a un detector selectivo de masas. La inyección se realiza a través del modo splitless con un volumen de inyección de 2 microlitros.

De acuerdo con los criterios de la COI, la identificación de compuestos mediante EM se basa en el tiempo de retención (t_r), en el cual la diferencia en el t_r del analito no debe ser superior al 1% en comparación con la misma sustancia presente en un control positivo. Además, para la EM, es necesario la presencia de un mínimo de tres iones de diagnóstico (Ventura et al., 2000). Dicho espectrómetro de masas trabaja con el modo SIM con una corriente de ionización de 70 eV del tipo cuadrupolo (Martínez et al., 2007).

La AMA prohíbe todos los β -2 agonistas, excepto si son de uso terapéutico – formoterol (dosis máxima de 54 mg/24h), salbutamol (dosis máxima de 1600 mg/24h) y salmeterol (por inhalación). Sin embargo, cuando la concentración de salbutamol o la de formoterol es superior de 1000 o 40 ng/mL, respectivamente, se considera positivo por dopaje (Santamaría, 2013).

El MRPL que confirma el positivo por β -2 agonistas es de 20 ng/mL (WADA, 2022).

5.2.1.3. Análisis de estimulantes (Cocaína, anfetaminas).

Los estimulantes van a ser identificados mediante CG/EM, usando una muestra de orina que ha sufrido una derivatización. Esto se debe a que algunos estimulantes no derivatizados producen una pequeña cantidad de iones de diagnóstico (Garg, 2016).

En el caso de la cocaína la conversión a sus metabolitos, benzoilecgonina y ecgonina metil éster, comienza a ocurrir poco después de la absorción. La benzoilecgonina es el componente que encontramos en orina o sangre mayoritariamente (Segura et al., 1998). Para el análisis de este compuesto, previamente, se podría utilizar el reactivo de Scott (con tiocianato de cobalto) que reacciona dando un color azul (Martinez-Quiroz et al., 2021).

Para realizar esta técnica también será necesario realizar una extracción líquido-líquido (con agua desionizada, metanol y cloroformo) (Garg, 2016) y posteriormente una derivatización (acilación con N-metil-bis(trifluoroacetamida) (MBTFA)) (Hemmersbach & De La Torre, 1996).

En la CG/EM se utiliza un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas con un inyector automático. Las condiciones fueron las siguientes: columna capilar de 5% fenilmetilsilicona (0,2 mm de diámetro interno, 12 m de longitud y 0,33 μ m de espesor interno), el gas portador fue el helio, split (1:15) como modo de inyección con un volumen de 3 μ L (Monfort et al., 2015). El EM utiliza un modo de ionización por impacto de electrones (70 eV) (Hemmersbach & De La Torre, 1996).

El MRPL para los estimulantes impuesto por la AMA es de 50 ng/mL. Si especificamos en la cocaína se limita a 10 ng/mL; en cambio su metabolito benzoilecgonina es de 50 ng/mL (WADA, 2022).

5.2.1.4. Análisis de narcóticos (morfina, heroína, codeína)

Para los análisis de opiáceos se pueden utilizar muchos tipos de muestras: saliva, tejidos, cabello, humor vítreo, etc. Sin embargo, las más usadas son sangre y orina. La sangre tiene como ventaja la obtención del fármaco original, sin embargo, es una prueba mediante punción venosa y a veces las concentraciones de fármaco disminuyen rápidamente. Por eso, las muestras de orina suelen ser la elección, no son invasivas, se puede adquirir un volumen grande de muestra y las concentraciones de metabolito o fármaco suelen ser altas. El inconveniente que presenta es que la concentración de fármaco puede variar por el tiempo transcurrido desde la administración, la dosis absorbida, etc.

Una vez que tenemos la muestra, debemos prepararla previamente para proceder al análisis. Para ello se realiza una hidrólisis con ácido clorhídrico (HCl) concentrado o 3-glucuronidasa (se pueden degradar la heroína o morfina y por ello algunos laboratorios no la realizan), extracción con disolventes orgánicos (cloroformo-2-propanol o diclorometano-metanol) (Wasels & Belleville, 1994) y una derivatización (con anhídrido trifluoroacético) (Garg, 2016).

Las condiciones de la técnica cromatográfica son las siguientes: columna capilar de 95% dimetilpolisiloxano (12 o 15 m de longitud) (Wasels & Belleville, 1994), inyector automático en modo splitless con un volumen de inyección de 1 μ L (Garg, 2016), acople a espectrómetro de masas con modo de impacto (70 eV) (Wasels & Belleville, 1994).

Para los narcóticos, el MRPL establecido por la AMA es de 25 ng/mL (WADA, 2022).

5.2.2. Inmunoensayo.

Los métodos de inmunoensayo se utilizan para la identificación específica de drogas, hormonas, vitaminas, etc. Esta técnica consiste en la reacción entre un antígeno analito y un antígeno previamente marcado (por un fluoróforo, un trazador radiactivo o una enzima), compitiendo por un sitio de unión sobre el anticuerpo de ese antígeno. Un antígeno es una sustancia externa que provoca la producción de anticuerpos en el organismo. Un anticuerpo se trata de una proteína globulina de alto peso molecular capaz de reconocer una sustancia intrusa. Cuando la proteína presenta actividad de anticuerpo se le conoce con el nombre de inmunoglobulina (Ig). En el organismo existen cinco tipos: IgA, IgD, IgE, IgG, IgM. La característica principal de los anticuerpos es que presentan una parte idéntica y una parte variable a la que se unen los antígenos.

La especificidad del inmunoensayo viene determinada por:

- Reacción cruzada con otros antígenos.
- Posibles interferencias de la reacción antígeno-anticuerpo debido a sustancias de bajo peso molecular en el ambiente.
- Heterogeneidad del anticuerpo.

Para producir un anticuerpo que va a ser utilizado en un inmunoensayo, se inyecta en una especie animal el antígeno problema, y se extrae el suero que contiene el anticuerpo resultante (antisuero). Para que el antisuero sea adecuado nos vamos a centrar en la afinidad y especificidad para el antígeno problema y lo vamos a obtener inyectando el antígeno puro con el “auxiliar de Freund” (aceite mineral, ceras y bacilos muertos) en el animal de experimentación.

Posteriormente, en un recipiente añadimos el antígeno marcado, el antisuero (con el anticuerpo) y la muestra sérica (que puede llevar o no el antígeno no marcado). Este recipiente lo dejamos incubar de unas horas a varios días, sin llegar a realizar incubaciones muy largas porque podrían producir el daño del antígeno. Durante la incubación, se forma un inmunocomplejo antígeno-anticuerpo. Si en la muestra no hay antígeno “no marcado”, una porción del antígeno “marcado” se une al anticuerpo, en caso contrario, el anticuerpo se va saturando con el antígeno “no marcado” y cada vez se une menos al antígeno “marcado”.

Después de la incubación, se separan los antígenos enlazados y los antígenos libres y se mide la porción marcada para determinar el porcentaje de unión del antígeno marcado. La separación se puede realizar por diferentes métodos: precipitación, técnica del doble anticuerpo, electroforesis o la unión del antígeno o anticuerpo con una fase sólida para usarlos como reactivos (Gary D, 2009).

5.2.2.1. Análisis de la hormona del crecimiento (hGh).

La detección de la hGh por parte de los laboratorios acreditados por la AMA es difícil debido a:

- Estructura química de la hormona natural es muy similar a la hormona sintética.
- Bajas concentraciones, a las cuales se analiza la hGh.
- Corta vida media.
- La secreción pulsátil hace que no se distinga entre administración u origen pituitario.
- Moléculas en el torrente sanguíneo que pueden interferir con los anticuerpos que se utilizan en el ensayo (Consejo Superior de Deportes, 2008).

En el caso de la hGh el método para detectar el abuso de esta hormona se puede hacer mediante un método directo que explica como las cantidades de las diferentes isoformas de la hGh se ven alteradas en una administración exógena (Bosch Colom, 2012), ya que la hGh recombinante se compone solamente de la isoforma de 22 kDa (Consejo Superior de Deportes, 2008).

El tratamiento de la muestra incluye: almacenamiento de las muestras a 4 °C durante 24 horas en un tubo con gel separador y una vez en el laboratorio se debe centrifugar (Consejo Superior de Deportes, 2008).

La técnica consiste, en primer lugar, en la creación de más de 200 clones y posteriormente seleccionar los anticuerpos monoclonales deseados. Estos anticuerpos son sometidos a cuatro inmunoensayos distintos. Dos son conocidos como “diferencial rec”, los cuales diferencian la variante monomérica de 22 kDa, y los otros dos “diferencial pit”, reconocen una combinación de variantes de hGh de origen hipofisario (Bosch Colom, 2012). En el método se utilizan tubos recubiertos de gel separador para capturar de forma específica la isoforma de 22 kDa o cualquier otra isoforma (Hernández Domínguez et al., 2012).

El principio del método consiste en probar con la selectividad de varios tipos de anticuerpos anti hGh. Para ello se utilizan anticuerpos de captura – se utilizan para anclar las diferentes isoformas de la hGh a la superficie del tubo – y anticuerpos trazadores (se utiliza en los cuatro ensayos) – es un anticuerpo específico de la hGh que provoca una reacción luminiscente al estar marcado con un éster de acridinio.

Finalmente, se colocan los tubos en el luminómetro, se calcula la media y, con ello, se construye una recta de calibrado por ajuste de mínimos cuadrados frente a la concentración del calibrador semejante. Además, para cada muestra se calcula la media de la concentración de pit hGh y rec hGh y finalmente se calcula la relación rec hGh/pit hGh. Si esta relación es superior a los valores establecidos , se considera positivo (Consejo Superior de Deportes, 2008).

5.2.3. Isoelectroenfoque (IEF) y posterior detección por quimioluminiscencia.

La electroforesis es una técnica de separación de sustancias en base a sus relaciones de carga utilizando el efecto de un campo eléctrico sobre las cargas de esas sustancias. Existen dos tipos: La electroforesis de zona: en la cual las proteínas están suspendidas en un sólido y, por tanto, la muestra se desplaza sobre un sólido. Los soportes que se emplean con más frecuencia son espuma de poliuretano, papel, geles de poliacrilamida y gel de almidón. Este método se utiliza principalmente para separar proteínas y ácidos nucleicos. En primer lugar, preparamos la placa con el soporte a utilizar. Después se aplica la muestra en línea por toda la placa. A continuación, al aplicar un campo eléctrico sobre los electrodos, los componentes con carga positiva migran al cátodo y los que tienen carga negativa van al ánodo. Finalmente, obtenemos una serie de bandas o líneas separadas que se pueden ver como una mancha.

La electroforesis capilar: se trata de un nuevo método de separación en la cual se aparta una pequeña cantidad de sustancias en tiempos relativamente cortos con alta resolución (Gary D, 2009). La instrumentación necesaria para realizar una electroforesis es simple:

- Capilar de sílice fusionada, con 40-100 cm de longitud y un diámetro interno entre 10 y 100 μm , el cual se llena de una disolución amortiguadora.
- La introducción de la muestra, acompañada por una inyección electrocinética o de presión, se realiza por un extremo, y la detección se hace por el extremo opuesto.
- Potencial de entre 5 y 30 kV de corriente.
- Detector que puede ser: espectrometría (absorción, fluorescencia, lentes térmicas, espectroscopía Raman o quimioluminiscencia), EM o electroquímica (conductividad, potenciometría o amperometría) (Skoog et al., 2015).

Un subtipo de la electroforesis capilar sería la electroforesis en gel para separar macromoléculas acordes a su tamaño. En este caso, el capilar se llena con un gel polimérico poroso y se produce un cribado molecular cuando las moléculas se trasladan a través del gel. Este método se emplea para la separación de ácidos nucleicos en la secuenciación del ADN. Tiene como ventajas su elevada resolución, y además, permite sustituir el gel en el capilar evitando problemas de contaminación de la matriz de la muestra (Gary D, 2009). El IEF sería una electroforesis en gel de poliacrilamida y debe tener las siguientes características: alta conductividad eléctrica, naturaleza química inerte, transparencia, baja toxicidad rigidez razonable, no debe absorber el analito o electroendoosmosis (Lugo & Montalvo, 2016).

Posteriormente se puede utilizar como método de detección, la quimioluminiscencia que consiste en una reacción química que genera una sustancia electrónicamente excitada que emite luz mientras vuelve a su estado natural. Los dispositivos que se utilizan son un vaso de reacción

y un tubo fotomultiplicador, por lo tanto, una de sus principales ventajas es su simplicidad y también su alta sensibilidad (Skoog et al., 2015).

5.2.3.1. Análisis de la eritropoyetina (EPO).

La EPO recombinante surge a partir del 1985 y es a partir de este momento, cuando comienzan a producirse los casos por dopaje con esta sustancia.

El método para la identificación del dopaje por EPO está aplicado para su análogo hiperglicosado NESP (Novel Erythropoiesis Stimulating Protein) o para la darbopoetin alfa (actúa al estimular la producción de glóbulos rojos en la médula ósea) y rhEPO (eritropoyetina humana recombinante alfa y beta), las cuales son diferentes tipos de EPO exógenas que presentan modificaciones y que les van a permitir permanecer más tiempo en el torrente sanguíneo, y, por tanto, prolongar su actividad en el organismo.

Las dificultades que se presentan para la detección del abuso por EPO son: la baja concentración de EPO, tanto en orina como en suero, la similitud estructural entre la EPO natural y administrada, y la vida media corta de la hormona (Consejo Superior de Deportes, 2016).

El método analítico se basa en una técnica cualitativa y directa, y presenta como objetivo diferenciar la EPO natural de la administrada. Los pasos son los siguientes:

- a. Concentración previa de la muestra mediante ultracentrifugaciones (**Tabla 4**): esto se hace para concentrar la cantidad de proteínas, y con ello se aumenta la sensibilidad de la técnica.
- b. Separación de las diferentes isoformas de la proteína: para ello se utiliza la electroforesis en gel de poliacrilamida, la cual se realiza en un gel de poliacrilamida de 0,8 mm de espesor y se trabaja en un rango de pH entre 2 y 6, utilizando para la disolución del cátodo, una disolución de anfolito al 2%, a la cual se le añade rojo de metilo, y para la del ánodo, se emplea una disolución 0,5 M de ácido fosfórico.
- c. Inmunotransferencia (**Tabla 5**): que se trata de la inmovilización de las proteínas sobre membranas sintéticas. Se utilizan membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) de 0,45 μm , las cuales son hidrofóbicas, con una elevada afinidad por biomoléculas y con resistencia mecánica
- d. Detección por quimioluminiscencia: consiste en la identificación de antígenos inmovilizados conjugados con peroxidasa de rábano, unidos a anticuerpos. La peroxidasa de rábano juntada con un catalizador produce una reacción de oxidación que genera luz quimioluminiscente, la cual es detectada mediante una cámara de adquisición

de imágenes o una placa de radiografía. La intensidad de la luz será proporcional a la concentración de sustancia (Lasne et al., 2002).

Tabla 4. Proceso de preconcentración de la muestra mediante ultracentrifugación.

Preconcentración de la muestra	
1	A una muestra de orina se le añade tris-(hidroximetil)-aminometano (tris)/ HCl y solución Complete (disolución de inhibidores de la proteasa). Todo se mezcla y se centrifuga a 2700 RCF (Fuerza centrífuga relativa) y 20 °C durante 10 minutos. El sobrenadante se filtra a través del equipo Steriplip.
2	El filtrado sufre una ultrafiltración mediante centrifugación a 3570 RCF y 20 °C durante 20 minutos.
3	Se realiza un lavado del filtrado obtenido y se centrifuga en las mismas condiciones anteriores. El resultado se somete a una ultrafiltración con el equipo Microcon YM-30 y se centrifuga a 14000 RCF y 20 °C durante 12 minutos.
4	Finalmente, el filtrado obtenido se hace alícuota y se congela a -20°C hasta el siguiente paso.

Tabla 5. Transferencias de las proteínas en el gel de electroforesis.

PRIMERA TRANSFERENCIA	SEGUNDA TRANSFERENCIA
Las proteínas separadas en función de su punto isoeléctrico son transportadas a una membrana. Ésta se incuba con ditioneitol o Reactivo de Cleland (DTT), con el objetivo de romper los puentes disulfuro de la EPO y así aumentar la sensibilidad del método. Posteriormente, incubamos con un anticuerpo monoclonal anti-EPO, el cual se une con la EPO que se encuentra en la membrana.	Esta segunda transferencia tiene como objetivo solucionar la inespecificidad del anticuerpo secundario, permitiendo así, aislar la señal de la hormona de la señal del resto de moléculas presentes en la orina. Se debe realizar en medio ácido, por eso se le conoce también como transferencia ácida.

5.2.4. Cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas (CL/EM).

La CL/EM se ha convertido en una de las principales técnicas de análisis y detección de sustancias dopantes, al igual que la CG/EM. La principal diferencia con ésta es que un soluto disuelto en un disolvente constituye la salida de la columna en la CL (fase móvil) (Skoog et al., 2015).

La CL al principio se realizaba con partículas y columnas grandes y alimentación por gravedad. Al cabo del tiempo, con los avances tecnológicos se permite el uso de columnas de mayor longitud y menor volumen. A esto se le conoce como cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) (Gary D, 2009).

La instrumentación del HPLC es más costosa y elaborada porque tiene, a parte de la válvula de inyección, la columna y el detector, presenta algunos elementos complementarios, ya que en esta técnica es necesario bombear altas presiones para alcanzar velocidades de flujo comprensibles (sistema de suministro de fase móvil o bomba).

El sistema de suministro de la fase móvil consiste en una bomba que puede ser de dos tipos: bomba tipo jeringa impulsada por tornillos – que produce una salida libre de pulsos y el control es más fácil. Sin embargo, la capacidad es menor (unos 250 mL) y a la hora de cambiar el disolvente es poco práctico – y las bombas de tipo émbolo – las cuales presentan un flujo pulsado que debe ser paliado para que no salga ruido basal en el cromatograma. Las ventajas que presenta esta bomba son elevada presión de salida, velocidad de flujo constante, pequeño volumen interno y fácil adaptación a la elución en gradiente (Skoog et al., 2015).

El sistema de inyección de la muestra se constituye de un anillo de acero inoxidable con seis conexiones, de las cuales una de ellas conecta con la columna. La muestra se puede inyectar con una jeringa de forma manual o con un inyector automático (Gary D, 2009).

La columna puede ser de acero inoxidable, vidrio o polímeros. Siempre son columnas rectas. Se pueden utilizar dos precolumnas: columna “de desperdicios” entre el reservorio de la fase móvil y el inyector (para preparar la fase móvil) y una columna de protección entre el inyector y la columna (previene que impurezas contaminen la columna). Se obtienen cromatogramas más reproducibles y mejores cuando permanece constante la temperatura. Para la HPLC se utilizan dos tipos de empacamiento: partículas pelliculares y partículas porosas (de sílice más frecuentes).

El detector debe tener un volumen interno pequeño y ser compatible con el flujo del líquido. Según la naturaleza de la muestra encontramos diferentes tipos: absorbancia, fluorescencia, electroquímico, conductividad, EM, etc (Skoog et al., 2015).

El HPLC se utiliza en modo de cromatografía de partición líquido-líquido (más común) o de cromatografía de adsorción líquido-sólido. En la cromatografía de partición, la fase estacionaria es un segundo líquido inmiscible en la fase móvil (Gary D, 2009). Encontramos dos tipos según el empacamiento de su columna:

- a. Cromatografía en fase normal: presenta fase estacionaria polar (por ejemplo, agua) y fase móvil no polar (hexano, por ejemplo). Aquí el componente menos polar eluye primero. Si aumentamos la polaridad de la fase móvil disminuye el tiempo de elución.
- b. Cromatografía en fase inversa: presenta fase estacionaria no polar (por ejemplo, un hidrocarburo) y fase móvil polar. Aquí el componente más polar eluye primero. Si

aumentamos la polaridad de la fase móvil aumenta el tiempo de elución (Skoog et al., 2015).

Los fundamentos de la EM se encuentran explicados en el apartado 5.2.1. El acople a la CL es complicado porque hay que eliminar el disolvente. Actualmente hay una serie de técnicas que permite que esta conexión se haga posible. Entre ellas encontramos: fuente de ionización por electroaspersión (ESI) (para moléculas polares, iónicas o muy grandes), ionización química a presión atmosférica (API) (para compuestos no polares y grandes), ionización por termoaspersión (para compuestos polares y no polares) y la ionización con haz de partículas (para moléculas volátiles, pequeñas, polares y no polares) (Gary D, 2009).

5.2.4.1. Análisis de los diuréticos y agentes enmascarantes.

Los diuréticos más utilizados por los deportistas, como hidroclorotiazida, triamtereno o furosemida, tienen una vida media muy corta y por lo tanto no se pueden detectar en la orina en un plazo de 24 a 48 horas posteriores a la administración.

El análisis de estas sustancias se centrará en la detección de la molécula original o de los metabolitos más abundantes. A veces, el objetivo será el análisis de los productos de degradación en casos donde se retrase la recogida de muestras o análisis por parte del laboratorio. La principal técnica utilizada será la CL/EM, la cual ha relevado a la GC/EM (también aceptada para el análisis de los diuréticos) (Cadwallader et al., 2010).

Para la preparación de la muestra se utiliza mefruside como patrón interno, se realiza una extracción sólido-líquido con agua y metanol y el extracto final se evapora con nitrógeno hasta sequedad (Goebel et al., 2004).

El cromatógrafo líquido de alta resolución presenta las siguientes condiciones cromatográficas para el análisis de diuréticos y agentes enmascarantes (**Tabla 6**):

Tabla 6. Condiciones cromatográficas para el análisis de diuréticos.

	HPLC/EM	UHPLC/EM
Bomba de suministro	Binaria	Cuaternaria
Fase móvil	Acetronilo y acetato de amonio	Agua y acetronilo
Columna	XDB C8 (75 mm x 4,6 mm., 3,5 µm de tamaño de partícula)	BEH C18 (100 mm x 2,1 mm., 1,8 µm de tamaño de partícula)
Velocidad de flujo	0,4 mL/min	0,6 mL/min
Volumen de inyección	10 µL	5 µL

	HPLC/EM	UHPLC/EM
EM	Triple cuadrupolo acoplado a ESI	Acoplado a una interfase (API)
Condiciones de ESI/API	Nitrógeno: gas de desolvatación Argón: gas de colisión (Thieme et al., 2001)	Temperatura de gas: 408 ° C Presión del gas del nebulizador: 55 psi (libras por pulgada cuadrada) Presión del gas del calentador: 80 psi (Ventura et al., 2008)

El MRPL, en el caso de los diuréticos, es de 200 ng/mL (WADA, 2022).

5.2.4.2. Análisis de glucocorticoides.

Los glucocorticoides están prohibidos siempre y cuando se administren por vía intravenosa, rectal, intramuscular u oral. Para la administración por vía inhalatoria o tópica sí están permitidos con una AUT (Morales Herrera et al., 2014).

Para la preparación de la muestra se realiza una hidrólisis con la enzima *Escherichia coli* β glucuronidasa. Se añade como estándar interno la metilttestosterona. La extracción se realiza con dietil éter, usando embudo con lecho de sulfato de sodio anhidro. Finalmente, la fase orgánica es evaporada hasta secado con nitrógeno, y reconstituida en un volumen de 100 μ L con los disolventes acetronilo-agua (50:50).

El análisis de glucocorticoides se realiza a través de HPLC acoplado a un EM, que lleva añadido un ESI.

Las condiciones del cromatógrafo líquido son las siguientes: el volumen de inyección de la muestra es de 3 μ L (mediante inyector automático), y se produce a una velocidad de flujo de 0,3 mL/min. Para suministrar la fase móvil (formiato de amonio y acetonitrilo) presenta una bomba binaria de dos pistones y, además, se utiliza una columna C18 (100 mm x 2,1 mm., 1,8 μ m de tamaño de partícula). El espectrómetro de masas tiene un ESI como fuente de ionización (operado en el modo de iones positivos), donde se utiliza el nitrógeno como gas de secado (flujo de secado: 10 L/min) y nebulización. La temperatura de 350 ° C y la presión de 45 psi (Georgakopoulos et al., 2007).

La AMA establece en 30 ng/mL el MRPL de los glucocorticoides (WADA, 2022).

5.3. Otras sustancias dopantes.

En este punto se mencionan algunos métodos analíticos para el análisis y la detección de otras sustancias dopantes (Tabla 7).

Tabla 7. Otras sustancias dopantes.

Sustancia dopante	Técnica analítica
ACTH	Cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas (purificación por inmunoafinidad).
β -bloqueantes	Cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a la espectrometría de masas (tiempo de vuelo) con una fuente de ionización por electroaspersión.
Cannabis	Cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (simple cuadrupolo), cromatografía de gases acoplada a detector de ionización de llamas.

En el caso de la ACTH se utiliza la CL/EM. Lo más característico de la técnica es la purificación mediante inmunoafinidad, la cual aporta eficiencia y sensibilidad al método. Se realiza con anticuerpos ACTH policlonales (primarios) y también anticuerpos secundarios recubiertos con anticuerpos. Al proceso se le agregan perlas magnéticas y disolución salina tamponada con fosfato. El complejo antígeno-anticuerpo se separa con ácido acético. Finalmente, se introducen 2 μ L del eluato en el cromatógrafo (Tretzel et al., 2015).

En el caso del cannabis se utiliza la CG/EM o la CG acoplada a un detector de ionización de llamas. Para la CG/EM, el cromatógrafo presenta un automuestreador, el cual introduce un volumen de 1 μ L (modo split; 5:1) y una columna DB-1 (30 m x 0,25 mm x 1 μ m). Además, se utiliza helio como gas de arrastre a un flujo de 1 mL/min. El EM utiliza el modo de ionización electrónica, con un potencial de 70 eV. Para la CG acoplada a un detector de ionización de llamas, la diferencia es que el flujo del gas de arrastre es de 5 mL/min y la columna es OV-1 (100% polidimetilsiloxano) (30 m x 0,53 mm x 0,50 μ m). La temperatura del horno es de 260 $^{\circ}$ C (Florian R et al., 2009). El MRPL para el cannabis es de 1 ng/mL (WADA, 2022).

Los β -bloqueantes se analizan mediante la CL/EM (EM con detector de tiempo de vuelo: tiempo necesario para que un ion alcance el detector al final de la parte libre de campo es inversamente proporcional a la masa del ion (Skoog et al., 2015)). Para la preparación de la muestra se realiza una extracción sólido-sólido, una hidrólisis con β -glucuronidasa y un posterior lavado con HCl. Posteriormente, se eluyen con metanol y las fracciones se evaporan hasta estar secas y se reconstituyen con acetonitrilo/ácido fórmico en 150 μ L. El cromatógrafo, en el cual se inyectan 10 μ L de muestra, se utiliza una columna C18 (100 mm x 2 mm, 3 μ m) y como fase móvil: agua, ácido fórmico y acetonitrilo (Domínguez Romero, 2015). Para los β -bloqueantes, el MRPL es de 50 ng/mL (WADA, 2022).

6. CONCLUSIONES

1. La recogida de muestras se hace en los puestos instalados para el control del dopaje con todos los requerimientos que sean necesarios (personal cualificado, sala de espera, etc). En el caso de la recogida de sangre, hay que tener precaución ya que se realiza una punción con aguja. Además, hay que tener precaución a la hora del almacenamiento de las pruebas y utilizar los reactivos necesarios según lo que se quiera analizar (anticoagulante, suero o gel polímero inerte separador del activador de la coagulación).
2. Para el transporte hasta el laboratorio se tendrá especial cuidado, utilizando contenedores con las muestras en bolsas y añadiendo los compuestos precisos en caso de que requieran refrigeración.
3. La acreditación del laboratorio y el cumplimiento de la normativa impuesta por la AMA permiten obtener resultados analíticos confiables. Estos laboratorios acreditados para realizar el análisis antidoping emplearán el término “Límite mínimo de rendimiento requerido (MRPL)” para confirmar un positivo por dopaje.
4. Es necesario, aportar la “autorización de uso terapéutico” en casos donde el deportista esté con tratamiento farmacológico.
5. El uso de métodos analíticos para la identificación y cuantificación de sustancias dopantes es de vital importancia para combatir el dopaje deportivo. Se emplearán aquellas técnicas oficiales o recomendables por la AMA, en caso de que haya varias formalizadas.
6. Para el análisis y la detección de las posibles sustancias dopantes se utilizarán principalmente las técnicas cromatográficas (gaseosa o líquida) acopladas a la espectrometría de masas. Estas técnicas permiten detectar un gran número de compuestos con una elevada especificidad y sensibilidad.
7. El farmacéutico como profesional sanitario y conocedor de la información del medicamento puede jugar un papel muy importante advirtiendo al paciente, que realice cualquier tipo de deporte, sobre los riesgos del consumo de estos ante un control antidoping.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Alfaya, E. (2018). Sustancias Dopantes Y Técnicas Antidopaje: Una Visión Histórica. *Gaceta Internacional Ciencias Forense*.
- AMA. (2021a). *Código Mundial Antidopaje*.
- AMA. (2021b). *Código Mundial Antidopaje - Laboratorios (Estándar Internacional)*.
- Argüelles, C. F., Hernández-Zamora, E., & Salamanca-Gómez, F. (2014). Dopaje genético: transferencia génica y su posible detección molecular. *FairPlay, Revista de Filosofía, Ética y Derecho Del Deporte*, 143(2).
- Asociación Andaluza de Derecho Deportivo., J. M. (2002). Anuario andaluz de derecho deportivo. *Anuario Andaluz de Derecho Deportivo, ISSN 1695-1050, N°. 9, 2009, Págs. 267-289, 9, 267–289*.
- Atienza Macías, E., López Frías, F., & López Triviño, J. (2014). El dopaje y el antidopaje en perspectiva histórica. *Materiales Para La Historia Del Deporte*, 0(12), 94–110.
- Atletismo., D. anti-dopaje de la real federación de. (2018). *Obligaciones de los atletas*.
- Baltazarova Valentinova, E. (2013). Efectos sobre el organismo de las principales sustancias y métodos utilizados . Control del dopaje . *Universidad de Valladolid - Trabajo de Fin de Grado*.
<http://content.ebscohost.com.ezproxy.unal.edu.co/pdf9/pdf/2006/P96/01Oct06/33881943.pdf?T=P&P=AN&K=33881943&S=R&D=a9h&EbscoContent=dGJyMNLr40SeprY4yOvqOLCmr0yep69Ssau4TK6WxWXS&ContentCustomer=dGJyMPGnsEq3r7BRuePfgex44Dt6fIA%5Cnhttp://www.gdeportes.cu/pod>
- Barroso, O., Mazzoni, I., & Rabin, O. (2008). Hormone abuse in sports: The antidoping perspective. *Asian Journal of Andrology*, 10(3), 391–402.
- BOE. (2011). Real Decreto 641/2009, de 17 de abril, por el que se regulan los procesos de control de dopaje y los laboratorios de análisis autorizados, y por el que se establecen medidas complementarias de prevención del dopaje y de protección de las salud en el depor. *Boletín Oficial Del Estado*.
- Bosch Colom, J. (2012). La Hormona de crecimiento en el ámbito deportivo : métodos de detección, comparación y funcionamiento metodológico. *Tesis Doctoral*, 23–41.
- Bueno, C. R. (1993). *Estudio de los elementos de análisis utilizados y propuestos como detectores de la testosterona en el control analítico del dopaje*.
- Cabrera Oliva, V. M., & Pino Rivero, J. P. (2010). *La amenaza del dopaje genético. Una*

revisión necesaria. 1–12.

- Cadwallader, A. B., De La Torre, X., Tieri, A., & Botrè, F. (2010). The abuse of diuretics as performance-enhancing drugs and masking agents in sport doping: Pharmacology, toxicology and analysis. *British Journal of Pharmacology*, *161*(1), 1–16.
- Cantelmo, R. A., da Silva, A. P., Mendes-Junior, C. T., & Dorta, D. J. (2020). Gene doping: Present and future. *European Journal of Sport Science*, *20*(8), 1093–1101.
- Casajús Mallén, J. A. (2005). Dopaje, salud y deporte. *Sistema Nacional de Salud*, *29*(1), 1–11.
- Consejo Superior de Deportes. (2008). *Procedimientos analíticos de control de dopaje. II*.
- Consejo Superior de Deportes. (2016). *Aspectos analíticos y de aseguramiento de la calidad del control del dopaje* (Vol. 4).
- Domínguez Romero, J. C. (2015). *Detección De Sustancias Dopantes En Orina Mediante Cromatografía De Líquidos/Espectrometría De Masas De Tiempo De Vuelo*.
- Fernández, A. R., Teresa, M., & Vidal, C. (2004). *Procedimiento para el análisis de esteroides anabólicos excretados en forma libre y otros compuestos. I*.
- Florian R, N. M., Parada A, F., & Garzón M, W. F. (2009). Estudio del contenido de cannabinoides en muestras de marihuana (*Cannabis sativa* L.) cultivadas en varias regiones de Colombia. *Vitae - Revista de La Facultad de Química Farmacéutica*, *16*(2), 237–244.
- Garg, U. (2016). Clinical Applications of Mass Spectrometry in Drug Analysis. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1383).
- Garro Zamora, L. (2013). Sustancias de dopaje, una revisión y la implicación del profesional farmacéutico. *Pharmaceutical Care La Farmacoterapia*, *2*(2), 30–45.
- Gary D, C. (2009). Química Analítica. *Universidad Nacional Autónoma de México, Sexta Edic.*
- Georgakopoulos, C. G., Vonaparti, A., Stamou, M., Kiouisi, P., Lyris, E., Angelis, Y. S., Tsoupras, G., Wuest, B., Nielen, M. W. F., Panderi, I., & Koupparis, M. (2007). Preventive doping control analysis: Liquid and gas chromatography time-of-flight mass spectrometry for detection of designer steroids. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *21*(15), 2439–2446.
- Goebel, C., Trout, G. J., & Kazlauskas, R. (2004). Rapid screening method for diuretics in doping control using automated solid phase extraction and liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, *502*(1), 65–74.
- Gonzales Calderon, S. (2020). La percepción de los deportistas sobre el consumo de cannabis en

- el mundo deportivo. *Universidad de La Laguna*.
- Gordillo, A. S. R. (1999). Lucha contra el dopaje como objetivo de salud. *Adicciones*, 11(4), 299–310.
- Hemmersbach, P., & De La Torre, R. (1996). Stimulants, narcotics and β -blockers: 25 years of development in analytical techniques for doping control. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, 687(1), 221–238.
- Hernández Domínguez, D., Fiallo, T., Correa Vidal, M. T., & Granda Fraga, M. (2012). Validación de los kits comerciales para la determinación de la hormona de crecimiento humana. *Laboratorio Antidoping de La Habana*, 7.
- Lasne, F., Martin, L., Crepin, N., & De Ceaurriz, J. (2002). Detection of isoelectric profiles of erythropoietin in urine: Differentiation of natural and administered recombinant hormones. *Analytical Biochemistry*, 311(2), 119–126.
- López Gómez, S. (2010). Evolución del dopaje en el deporte. *Trances: Revista de Transmisión Del Conocimiento Educativo y de La Salud*, 2(1), 30–54.
- Lugo, M., & Montalvo, A. (2016). Electroforesis: Fundamentos, avances y aplicaciones. *Epistemos*, 26, 48–54.
- Macián, M. R. (2016). Evaluación de nuevas herramientas analíticas para mejorar la capacidad de detección en el control del dopaje. *Universitat Jaume I. Departamento de Química Física y Analítica*.
- Macías, E. A. (2013a). Dopaje y enfermedad mental: más allá de la responsabilidad del deportista. *Percurso Acadêmico*, 3(5), 53–79.
- Macías, E. A. (2013b). Prevención, represión y control del dopaje frente al derecho a la intimidad del deportista en el marco jurídico español. *Revista de Derecho*, XL, 53(9).
- Marco, L. G., López, J. P. R., & Mallén, J. A. C. (2009). El dopaje en los Juegos Olímpicos de verano (1968-2008). *Universidad de Zaragoza*, 44(162), 66–73.
- Marqueta, M. (2001). Problemática del dopaje para el deportista. *Osasunaz*, 4, 81–96.
- Martinez-Quiroz, J., Lozada Sosa, J. ., & Lázaro Rangel, J. . (2021). Validación de un método analítica por cromatografía de gas-líquido y reacción colorida para la identificación de cocaína y metanfetamina en muestras decomisadas. *Gaceta Internacional Ciencias Forense*, 38(1), 21–30.
- Martínez, D., Teresa, M., & Vidal, C. (2007). *Procedimiento para la detección e identificación*

y narcóticos. 38(2), 297–301.

Maughan, R. J. (2000). Nutrition in sport. In *Blackwell Science*.

Ministerio de Cultura y Deporte. (2021). Resolución de 29 de septiembre de 2020 , de la Presidencia del Consejo Superior de Deportes , por la que se aprueban los formularios para los controles de dopaje . *Boletín Oficial Del Estado*, 1–34.

Ministerio de educación cultura y deporte. (2021). Boletón Oficial del Estado. *Boletín Oficial Del Estado*, 26798–26800.

Monfort, N., Martínez, L., Bergés, R., Segura, J., & Ventura, R. (2015). Screening method for stimulants in urine by UHPLC-MS/MS: Identification of isomeric compounds. *Drug Testing and Analysis*, 7(9), 819–830.

Morales Herrera, A. M., Puerto Avella, D. C., Torres Wilches, M. Á., Gallo Isaza, G., Rodríguez, L., & Vallejo, M. D. (2014). Determinación cualitativa de algunos metabolitos de seis glucocorticoides en orina a través de cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a masas-masas. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 43(1), 137–152.

Rodríguez-Pérez, M. de L., Díaz-Rodríguez, P. A., & Díaz-Rodríguez, A. (2015). Una mirada histórica al fenómeno del doping. *PODIUM - Revista de Ciencia y Tecnología En La Cultura Física*, 10(1), 89–105.

Roldan-Tabares, M. D., Herrera-Almanza, L., Serna-Corredor, D. S., & Martínez-Sánchez, L. M. (2019). Dopaje en deportistas: asunto de difícil manejo a nivel mundial. *Revista AVFT*, 38(2), 1–8.

Santamaría, Á. C. (2013). *Determinación de β -agonistas mediante dilución isotópica y GC-MS*.

Segura, J., Ventura, R., & Jurado, C. (1998). Derivatization procedures for gas chromatographic-mass spectrometric determination of xenobiotics in biological samples, with special attention to drugs of abuse and doping agents. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, 713(1), 61–90.

Skoog, D. A., West, D. M., Holler, J., & Crouch, S. R. (2015). Fundamentos de Química Analítica. In *Novena Edición*.

Thieme, D., Grosse, J., Lang, R., Mueller, R. K., & Wahl, A. (2001). Screening, confirmation and quantitation of diuretics in urine for doping control analysis by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure ionisation tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 757(1), 49–57.

- Torres, P. B. S. (2013). Optimización de una Metodología para Derivatizar Disruptores Endocrinos (17 Beta - Estradiol y 17 - alfa - Etinilestradiol) y su análisis por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (CG-EM). *Tesis Doctoral*.
- Tretzel, L., Thomas, A., Geyer, H., Delahaut, P., Schänzer, W., & Thevis, M. (2015). Determination of Synacthen® in dried blood spots for doping control analysis using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(16), 4709–4720.
- Ventura, R., Damasceno, L., Farré, M., Cardoso, J., & Segura, J. (2000). Analytical methodology for the detection of β 2-agonists in urine by gas chromatography-mass spectrometry for application in doping control. *Analytica Chimica Acta*, 418(1), 79–92.
- Ventura, R., Roig, M., Monfort, N., Sáez, P., Bergés, R., & Seguraab, J. (2008). High-throughput and sensitive screening by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry of diuretics and other doping agents. *European Journal of Mass Spectrometry*, 14(3), 191–200.
- Verdugo Guzmán, S. I. (2017). El Dopaje Genético y la manipulación de genes en el deporte. *Ius Et Scientia*, 3(1), 227–234.
- WADA. (2022). *WADA Technical Document – TD2022MRPL Minimum Required Performance Levels and applicable Minimum Reporting Levels*.
- Wasels, R., & Belleville, F. (1994). Gas chromatographic-mass spectrometric procedures used for the identification and determination of morphine, codeine and 6-monoacetylmorphine. *Journal of Chromatography A*, 674(1–2), 225–234.
- World Anti-Doping Agency. (2009). *Revisión “ La Lucha contra el Dopaje en el Deporte : la Lista de Prohibiciones , los Laboratorios Agencia Mundial Antidopaje (AMA)*. 1–14.
- Yelmo, A. (2014). *La huella del dopaje: Una visión entre la Ley y la Marca Personal Deportiva*. April.