



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

JÉSSICA GORETT BRITO FONTES

**ESTUDO DA DETECÇÃO DE GLICEROL POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA EM
FASE REVERSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA
RESOLUÇÃO**

Rio de Janeiro

2018

JÉSSICA GORETT BRITO FONTES

ESTUDO DA DETECÇÃO DE GLICEROL POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA EM
FASE REVERSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA
RESOLUÇÃO

Projeto final de curso apresentado ao Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de bacharel em Química.

Orientador: Vinicius Figueiredo
Sardela, MSc.

Rio de Janeiro

2018

*Aos meus admiráveis pais,
Valter e Márcia, e a meu
amado esposo Victor, dedico.*

Agradecimentos

Sem dúvida, gostaria de agradecer primeiramente a Deus, aquele que esteve comigo em todo tempo e que proporcionou que as demais pessoas desta lista fizessem parte da minha vida.

Agradeço aos meus pais, pessoas incríveis, que sempre fizeram e ainda fazem de tudo por mim e para mim. Com certeza, sem vocês, sem o amor, o carinho, a segurança e o suporte que me deram, eu jamais teria chegado até aqui.

Ao meu amado esposo Victor, obrigada por ter tido tanta paciência, por estar sempre disposto a me ajudar no que for preciso, por nunca me deixar sozinha e por compreender que eu precisava perder alguns finais de semana com relatórios e provas.

Agradeço aos meus familiares, por torcerem sempre por mim, e em especial, minha avó Vitória, que desde a infância até aqui, foi fundamental para a minha formação.

Ao professor Vinicius Sardela, meu orientador, por me proporcionar a oportunidade de adquirir conhecimento, estando sempre disposto a ensinar. Com certeza, sua participação tem sido importante para o meu desenvolvimento profissional.

Também aos professores do Instituto de Química, pelas ótimas aulas.

A todos os meus amigos, de dentro e fora da faculdade, por tornarem as coisas mais fáceis, e principalmente, a Rebecca Mattos, alguém que felizmente pude conhecer e conviver. Obrigada pelas risadas, pelo desespero compartilhado, e por ser alguém que eu pudesse contar.

À toda equipe do LADETEC, por compartilhar o conhecimento de forma paciente e por me fazer sentir parte do grupo.

RESUMO
PROJETO DE CURSO

Título: ESTUDO DA DETECÇÃO DE GLICEROL POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA EM FASE REVERSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO

Aluna: Jéssica Gorett Brito Fontes

Orientador: Vinicius Figueiredo Sardela, (DQA – UFRJ).

Até o fim de 2017, o glicerol, um líquido transparente, solúvel em água e com viscosidade elevada, era considerado uma substância dopante, pela Agência Mundial Antidopagem (AMA). Seu efeito é o de mascarar o *doping* sanguíneo, bem como a ingestão de determinadas substâncias, através da indução da passagem de água dos tecidos para o plasma. Por existir de forma endógena no organismo, o limite de concentração considerado dopagem era de $4,3 \text{ mg.mL}^{-1}$, porém estudos ao longo dos anos mostraram que esse efeito mascarante era pequeno, fazendo então, com que esse tri-álcool saísse da lista de substâncias proibidas no ano de 2018. Ainda assim, a compreensão de métodos para o seu monitoramento continua sendo relevante para o controle antidopagem, pois o glicerol, de duas formas diferentes, serve como um possível marcador do abuso da transfusão sanguínea autóloga. Uma delas é por ser utilizado como um conservante durante o armazenamento das bolsas de sangue, e a segunda é devido ao aumento constatado da concentração de glicerol em sangue refrigerado por alguns dias. Devido à grande importância atual da implementação de métodos abrangentes, que reduzem o número de procedimentos e, conseqüentemente, os custos, a detecção do glicerol foi avaliada em um procedimento único capaz de detectar outros 520 alvos analíticos no controle antidopagem, com o objetivo de avaliar a detectabilidade e a possível estimativa de sua concentração por cromatografia líquida em fase reversa acoplada a espectrometria de massas de alta resolução. A preparação de amostras incluiu a combinação da extração em fase sólida utilizando um cartucho de fase mista e a diluição do extrato com parte da urina *in natura* dissolvida em solução de ácido acético 2%. Em seguida, $8 \mu\text{L}$ dessa mistura foram injetados no cromatógrafo líquido acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução. Os resultados obtidos na detecção do glicerol foram comparados com os resultados utilizando como material de referência, glicerol-d5. Nos espectros do glicerol e do glicerol-d5 foram observados uma série de picos com diferenças de m/z 100. E com isso, pela primeira vez foi observada a hipótese da ocorrência de ligação entre glicerol e boro formando aglomerados em série. Essa associação foi vista, inclusive, no modo negativo de ionização. Através da interpretação dos espectros de massas em alta resolução foi possível elucidar a composição elementar dessas séries homólogas e ainda propor estruturas para elas. Além disso, constatou-se que a formação de adutos de glicerol boratos está diretamente relacionado com as condições analíticas empregadas. Observou-se ainda no espectro, a presença de glicerol na forma de aduto com sódio, e avaliando a relação linear entre a resposta dada por esse analito e os analitos borados e a concentração de glicerol, viu-se que em nenhum dos casos o coeficiente de determinação é adequado para análise quantitativa. Portanto, esses alvos devem ser utilizados apenas em procedimentos iniciais de análise.

Lista de Ilustrações

Figura 1. Estrutura do glicerol	12
Figura 2. Reação de hidrólise de um triglicerídeo (Adaptado de: STRYER <i>et al</i> , 2004).	12
Figura 3. Crescente número de publicações sobre glicerol nos últimos anos. (Adaptado de: MOTA <i>et al</i> , 2017).....	13
Figura 4. Diferentes aplicações do glicerol (Adaptado de: Mota <i>et al</i> , 2017)	14
Figura 5. Monitoramento de glicerol em sangue fresco (3h da retirada) e refrigerado por 7 e 21 dias (Adaptado de: NUNES <i>et al</i> , 2018).....	19
Figura 6. Fluxograma de preparação de amostras do método utilizado no LBCD para o monitoramento de 520 substâncias em urina, descrito em SARDELA <i>et al</i> , 2018.....	20
Figura 7. Monitoramento de glicerol. A concentração é diretamente proporcional a intensidade da coloração até 1 mg.mL ⁻¹ . (Fonte: SARDELA <i>et al</i> , 2015).21	
Figura 8. Processo de ESI (Adaptado de: HARRIS, 2010)	24
Figura 9. Esquema do espectrômetro de massas Q-Exactive Plus.....	28
Figura 10. Estrutura do glicerol-d5 (Fonte: Produtos - Glycerol-1,1,2,3,3-d ₅).....	33
Figura 11. Corrente de íons totais provenientes da injeção de glicerol a 2 mg.mL ⁻¹ nos modos positivo (a) e negativo (b).....	34
Figura 12. Corrente de íons totais provenientes da injeção de glicerol-d5 a 2 mg.mL ⁻¹ nos modos positivo (a) e negativo (b).....	35
Figura 13. Espectro de massas de glicerol(a) e glicerol-d5 (b), no modo positivo de ionização, com aproximação da região de 80-140 <i>m/z</i>	37
Figura 14. Espectro de massas de glicerol(a) e glicerol-d5 (b), no modo negativo de ionização, com aproximação da região de aproximadamente 80-110 <i>m/z</i>	38
Figura 15. Espectro de massas de glicerol e glicerol-d5 no modo de varredura, com destaque para sinais que diferem em 100 <i>m/z</i> para glicerol e 105 para glicerol-d5.	39
Figura 16. Aproximação do espectro de massas, de glicerol e glicerol-d5 na região de <i>m/z</i> 200-230, com destaque para picos característicos de isótopos. ...	40
Figura 17. Espectros de massas, de glicerol e glicerol-d5, com destaque para a diferença de massa entre os picos representantes da série com boro.....	41

Figura 18. Proposta de estruturas para as espécies formadas, onde A, B e C referem-se ao primeiro, segundo e terceiro componente da série, respectivamente.	41
Figura 19. Estrutura do borato de glicerol (Fonte: Chemical Book – Glycerol Borate)	42
Figura 20. Ampliação das regiões do espectro do glicerol, onde são vistos de a até f de forma crescente, os sinais correspondentes aos membros da série de borato de glicerol.	43
Figura 21. Espectro de varredura de massas (100-800 m/z) no modo positivo de ionização das soluções de glicerol preparadas em material de vidro (a) e plástico (b).	44
Figura 22. Picos cromatográficos das soluções de glicerol preparadas em material de vidro (a) plástico (b).	45
Figura 23. Avaliação da linearidade entre a resposta analítica e a concentração de glicerol utilizando os parâmetros usuais do método: matriz de urina e ácido acético 2% como solução de ressuspensão.	47
Figura 24. Avaliação do comportamento do CV (%) utilizando diferentes tolerâncias de erro na busca pelas massas exatas.	48
Figura 25. Avaliação do impacto do uso do PI na linearidade da curva, utilizando matriz de urina e solução de ácido acético 2% com glicerol-d5 a 2,5 mg.mL^{-1} (PI) como solução de ressuspensão.	49
Figura 26. Avaliação do impacto da utilização do quadrupolo como filtro de massas na associação linear entre as variáveis, utilizando matriz de urina e solução de ácido acético 2% com glicerol-d5 a 2,5 mg.mL^{-1} (PI) como solução de ressuspensão.	50
Figura 27. Avaliação do impacto do aumento da concentração de boro no meio, através da utilização de ácido bórico 3% com glicerol-d5 a 2,5 mg.mL^{-1} (PI) como solução de ressuspensão e matriz de urina para as soluções de glicerol.	51
Figura 28. Avaliação do impacto da utilização de água como matriz das soluções de glicerol, com a utilização de ácido bórico 3% com glicerol-d5 a 2,5 mg.mL^{-1} (PI) como solução de ressuspensão.	52
Figura 29. Avaliação do impacto do aquecimento na linearidade entre as variáveis para o analito de m/z 215,06974, com a utilização de ácido bórico 3%	

- como solução de ressuspensão, água como matriz para as soluções de glicerol e aquecimento a 50 °C por 30 min.....53
- Figura 30. Avaliação do impacto do aquecimento na linearidade entre as variáveis para o analito de m/z 115,03657, com a utilização de ácido bórico 3% como solução de ressuspensão, água como matriz para as soluções de glicerol e aquecimento a 50 °C por 30 min.....53
- Figura 31. Avaliação do impacto do aquecimento na linearidade da curva, para o analito de m/z 215,06974 com a utilização de urina como matriz para as soluções de glicerol, ácido bórico 3% com glicerol-d5 a 2,5 mg.mL⁻¹ (PI) como solução de ressuspensão e aquecimento a 50 °C por 30 min.....54
- Figura 32. Avaliação do impacto do aquecimento na linearidade da curva, para o analito de m/z 115,03657 com a utilização de urina como matriz para as soluções de glicerol, ácido bórico 3% com glicerol-d5 a 2,5 mg.mL⁻¹(PI) como solução de ressuspensão e aquecimento a 50 °C por 30 min.....54
- Figura 33. Espectros de Massas de glicerol e glicerol-d5 com destaque para os dois primeiros componentes da série borada, em suas formas protonadas. ...55
- Figura 34. Espectros de Massas, no modo negativo, de glicerol e glicerol-d5, com destaque para o primeiro componente da série borada, em sua forma desprotonada.....56
- Figura 35. Avaliação do impacto do aquecimento na linearidade da curva, para o analito de m/z 191,07215 com a utilização de urina como matriz para as soluções de glicerol, ácido bórico 3% com glicerol-d5 a 2,5 mg.mL⁻¹(PI) como solução de ressuspensão e aquecimento a 50 °C por 30 min.....57
- Figura 36. Avaliação da linearidade entre a resposta analítica do íon m/z 191,07215 e a concentração de glicerol, utilizando matriz de urina e solução de ácido acético 2% com glicerol-d5 a 2,5 mg.mL⁻¹ (PI) como solução de ressuspensão.58
- Figura 37. Avaliação da linearidade entre a resposta analítica do íon m/z 115,03657 e a concentração de glicerol, utilizando matriz de urina e solução de ácido acético 2% com glicerol-d5 a 2,5 mg.mL⁻¹ (PI) como solução de ressuspensão.58

Lista de Tabelas

Tabela 1. Massas nominal e exata de diferentes compostos iônicos (Adaptado de: IGLESIAS, 2012)	26
Tabela 2. Variação nos parâmetros do procedimento de “diluir e injetar”	32
Tabela 3. Alvos esperados para o glicerol	35
Tabela 4. Erro relativo entre as massas experimental e exata de algumas das espécies da série.....	42
Tabela 5. Erro relativo entre as massas experimental e exata de algumas das espécies.	56

Lista de Abreviaturas e Siglas

AMA Agência Mundial Antidopagem

CL Cromatografia Líquida

CL-EM Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas

CL-EMAR Cromatografia Líquida acoplada Espectrometria de Massas de Alta
Resolução

CG Cromatografia Gasosa

CG-EM Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas

C18 Octadecil

CV Coeficiente de Variação

EM Espectrometria de Massas

EMAR Espectrometria de Massas de Alta Resolução

EVP Expansor de Volume de Plasma

ESI do inglês, *electrospray ionization*

LBCD Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem

m/z Razão massa/carga

PAB Passaporte Biológico do Atleta

PI Padrão Interno

TIC do inglês, *Total Ion Current*

Sumário

1 Introdução	12
1.1 Glicerol	12
1.2 O Controle Antidopagem.....	15
1.2.1 Glicerol e o <i>doping</i> sanguíneo.....	17
1.2.2 Monitoramento de glicerol.....	19
1.3 Métodos Analíticos.....	22
1.3.1 Cromatografia Líquida (CL).....	22
1.3.2 Acoplamento da CL com Espectrometria de Massas (EM)	23
1.3.3 Espectrometria de Massas de Alta Resolução (EMAR).....	26
2 Objetivos	29
2.1 Objetivo Geral.....	29
2.2 Objetivos específicos	29
3 Metodologia	29
3.1 Considerações Gerais	29
3.2 Instrumentação e método de injeção	29
3.3 Avaliação e escolha de alvo analítico para a detecção do glicerol	30
3.4 Investigação da possível fonte do átomo presente na nova espécie formada	31
3.5 Investigação da tendência linear entre a concentração de glicerol e área do pico cromatográfico do alvo analítico escolhido.....	31
4 Resultados e Discussão	33
4.1 Avaliação e escolha de alvo analítico para a detecção do glicerol	33
4.2 Investigação da possível fonte do átomo presente na nova espécie formada	44
4.3 Investigação da tendência linear entre a concentração de glicerol e área do pico cromatográfico do alvo analítico escolhido.....	46
5 Conclusão	59
6 Perspectivas Futuras	59
7 Referências	60
Apêndice A	64
Apêndice B	69
Anexo I	71

Isso significa que é natural que haja glicerol no corpo humano. Ele até participa de alguns processos metabólicos, como a gliconeogênese e a própria biossíntese de triacilgliceróis, ambos os processos com a intenção de obtenção de energia, direta ou indiretamente.

Mesmo fora do organismo humano, o glicerol está frequentemente presente no dia a dia de cada indivíduo. Sua utilização é bastante variada, indo desde células à combustível até a área médica. E as ramificações dessa utilização estão cada vez maiores, pois tendo em vista que este, é um subproduto na produção do biodiesel, os estudos em relação a sua aplicabilidade têm crescido bastante nos últimos anos. O gráfico mostrado abaixo (Figura 3), indica o aumento de artigos sobre glicerol/glicerina publicados desde 1996 até 2016.

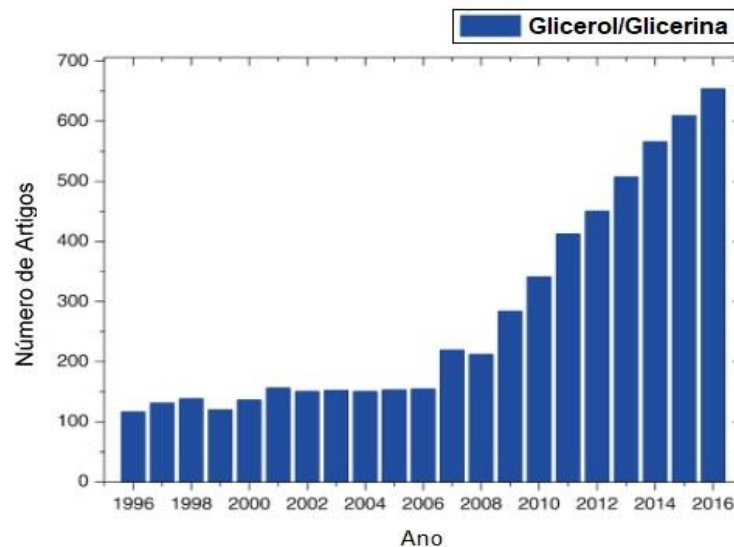


Figura 3. Crescente número de publicações sobre glicerol nos últimos anos.

(Adaptado de: MOTA et al, 2017)

Uma de suas primeiras utilizações foi em 1846, na produção de nitroglicerina que anos à frente levou a obtenção da dinamite. Esse tri-álcool de três carbonos é matéria-prima para a produção de diversos produtos químicos (MOTA et al, 2017). Também é utilizado em cosméticos como, cremes para pele e maquiagem, desempenhando função umectante e emoliente. Está presente também como aditivo alimentar, sendo usado para adocicar e preservar a comida. Tem-se ainda aplicação na área médica como lubrificante, aditivo em fármacos e laxantes (DEVENTER; VAN EENOO, 2015).

É visto na Figura 4, que ilustra as diversas e abrangentes aplicações do glicerol, sua utilização como agente termorregulatório.

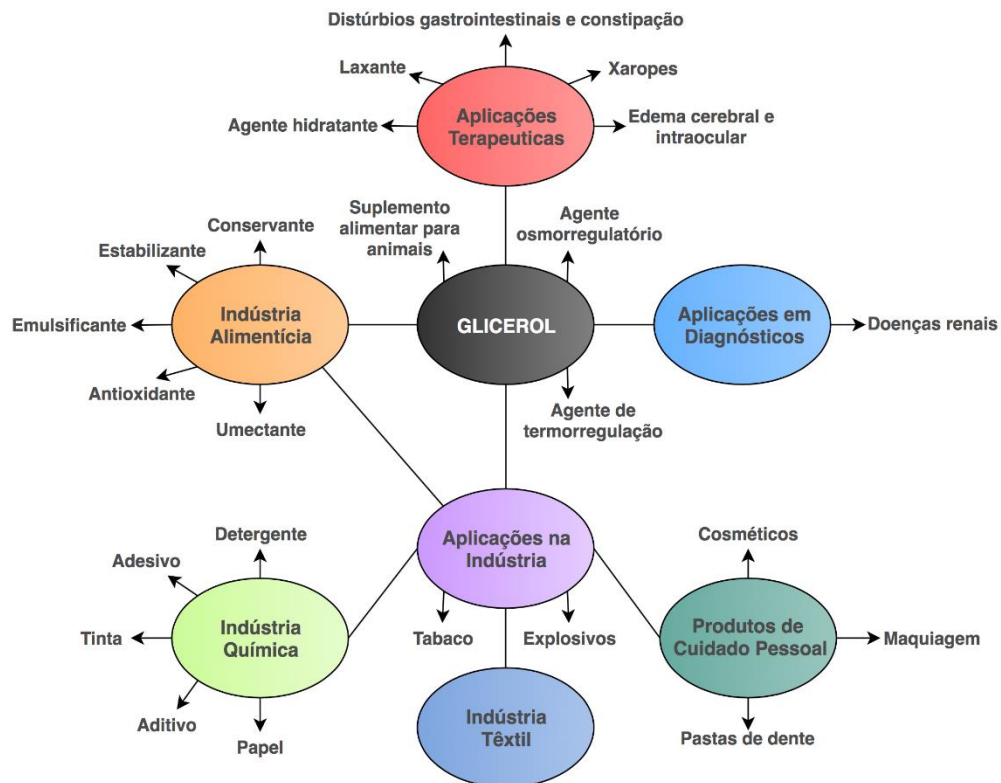


Figura 4. Diferentes aplicações do glicerol (Adaptado de: Mota et al, 2017)

Isso se deve a sua capacidade de hiper-hidratação, que ocorre quando ele é administrado no corpo humano juntamente com excesso de fluido, pois devido a suas propriedades químicas, ele faz com que parte de fluido fique retido e o total de água no corpo aumenta. Essa hiper-hidratação previne os efeitos negativos da desidratação e melhora a regulação térmica, principalmente ao se praticar exercícios físicos no calor (KOEHLER et al, 2013).

Ainda na área médica, o glicerol faz parte de um variado grupo de substâncias que tem em comum a propriedade de aumentar o volume do plasma sanguíneo, por atração osmótica do líquido intersticial, ao ser injetado no espaço vascular. Essas substâncias, chamadas de expansores de volume de plasma (EVP) e usadas na medicina quando há acentuada perda de sangue, são classificadas em três grupos, sendo um deles o de diuréticos osmóticos, do qual o glicerol faz parte. Esse grupo consiste em substâncias de baixo peso molecular, que por serem

osmoticamente ativas, aumentam a osmolalidade do fluido intravascular. O aumento da pressão osmótica no plasma promove a extração de água dos tecidos para o espaço vascular, expandindo assim o seu volume. As partículas osmoticamente ativas adicionais evitam a reabsorção de água, promovendo assim a diurese (SIMONI *et al*, 2011; SARDELA *et al*, 2015). Por este motivo, a Figura 4 mostra sua aplicação como um agente osmorregulatório.

Com tudo isso, o uso do glicerol tem atraído interesse de atletas, não apenas na tentativa de melhorar a performance de resistência, que vem da sua capacidade de evitar desidratação, mas principalmente por sua capacidade de mascarar o *doping* sanguíneo, sendo por este motivo considerada até 2017 uma substância proibida pela Agência Mundial Antidopagem (AMA).

1.2 O Controle Antidopagem

Na atualidade o esporte tem se mostrado presente, de forma positiva, direta e indiretamente na vida da maioria das pessoas. Para algumas delas ele pode ser apenas uma forma de lazer ou manutenção da saúde, para outras, uma maneira de socialização ou até mesmo de ressocialização, e ainda, para um grupo menor de pessoas, pode ser a profissão. Dentro do aspecto profissional, ele pode ser a única chance que indivíduos de classes menos favorecidas tem para melhorar sua qualidade de vida.

No âmbito profissional, é comum que atletas sejam levados a tentativa de excederem seus limites a qualquer custo, seja por vontade e opinião próprias, seja pela influência de técnicos, treinadores, amigos e familiares, com o objetivo de obterem os melhores resultados nas competições (AQUINO NETO, 2001). Para isso, acabam por vezes optando pela utilização de substâncias e métodos proibidos capazes de oferecer, de modo artificial, uma melhoria no desempenho por alterarem de alguma maneira (física ou psíquica) o organismo dos atletas. Tal prática é conhecida como dopagem, do inglês *doping* (SARDELA, 2013). Para Bowers (1998), ela já ocorre desde época dos jogos olímpicos originais.

A preocupação com a utilização dessas substâncias e métodos não se dá apenas pela necessidade de se ter competições honestas e limpas, mas também devido aos enormes malefícios que podem trazer a saúde dos atletas.

Por muito tempo a dopagem foi conhecida, mas não proibida. Apenas em 1960, com a morte do ciclista dinamarquês Kurt Jensen nas olimpíadas de Roma por overdose de anfetamina, é que foi criada uma resolução contra o uso de agentes dopantes. Desde então, outros casos graves surgiram até que em 1967, o Comitê Olímpico Internacional estabeleceu sua comissão médica e nas olimpíadas do México, em 1968, foi realizado o primeiro controle de dopagem (AQUINO NETO, 2001).

A AMA só foi criada em 1999 através de uma parceria única entre o esporte e governos em todo o mundo com o objetivo de trazer consistência às políticas e regulamentações antidopagem dentro das organizações esportivas e dos governos. Sua missão é a de promover um mundo onde os atletas possam competir em um ambiente livre de *doping*. Por este motivo é que o código mundial antidopagem foi criado, levando os atletas a jogarem de forma “limpa”, protegendo o esporte e até mesmo os próprios atletas e gerando honestidade, integridade e igualdade no esporte (WADA, 2018A).

A lista de substâncias e métodos proibidos é atualizada anualmente pela AMA. Ela é dividida tanto em classes de substâncias, como em tipos de métodos, de acordo com seus efeitos. Existem as substâncias que são proibidas apenas quando se está em competição e outras que tem seu uso desautorizado dentro ou fora dela (WADA, 2018B). Há também substâncias que, se encontradas no organismo, independentemente da concentração levam a punição do atleta, e outras que só são consideradas dopagem a partir de determinada concentração encontrada na urina ou no sangue. Esse era o caso, por exemplo, do glicerol, objeto deste estudo, que até o fim de 2017 fazia parte da classe dos diuréticos e agentes mascarantes. Por já existir de forma endógena no organismo e também por estar presente em alimentos e medicamentos, do início de 2012 até setembro de 2013 só era considerado *doping* quando presente em concentração superior a 1.0 mg.mL^{-1} na urina. Ainda em setembro de 2013, esse limite subiu para 4.3 mg.mL^{-1} (SARDELA *et al*, 2015; OKANO 2014; WADA, 2012; WADA, 2014).

Considerando as informações de artigos científicos que indicaram que a magnitude dos efeitos do glicerol no volume do plasma e nos parâmetros do passaporte biológico dos atletas (PBA) são considerados mínimos, a AMA decidiu por excluí-lo da lista de substâncias proibidas a partir de janeiro de 2018 (WADA,

2018B, 2018C). Ainda assim o seu monitoramento se faz importante por motivos que serão discutidos no próximo tópico.

1.2.1 Glicerol e o *doping* sanguíneo

Como já foi dito, a proibição do glicerol se dava pela possibilidade de mascarar outras substâncias (monitoradas pelo sangue) ou métodos proibidos. Esses casos envolvem sempre o chamado *doping* sanguíneo, onde, de alguma forma, o atleta obtém uma maior habilidade de captação do oxigênio e conseqüentemente, maior ganho de energia, melhorando seu desempenho (WADA, 2018D).

Uma das maneiras de se realizar a dopagem do sangue, é pela utilização de substâncias que proporcionem melhora no recebimento, transporte ou entrega de oxigênio. É o caso da ingestão indevida da forma recombinante da eritropoetina (EPO), um hormônio peptídico endógeno que aumenta a concentração de hemácias, gerando maior aporte de oxigênio ao tecido muscular, o que leva a maior resistência e desempenho (BENTO *et al*, 2003; WADA 2018D).

Uma outra forma de *doping* sanguíneo é dada não pela administração de uma substância, mas sim pela realização de um método proibido, que é o abuso da transfusão sanguínea. O método baseia-se na infusão de sangue armazenado e pode ocorrer de forma autóloga, quando o atleta armazena e reinfunde seu próprio sangue, ou homóloga, onde utiliza-se bolsas de sangue de terceiros com o mesmo tipo sanguíneo (WADA, 2018D; JONES; PEDOE, 1989). Ocorre que se o atleta está no seu nível de hematócrito normal e recebe uma bolsa de sangue, a concentração de hemácias, e por conseqüência o nível de hemoglobina, será aumentado, impactando positivamente no transporte de oxigênio. E mesmo que a dopagem seja autóloga, durante o período de armazenamento, a concentração de células vermelhas no sangue do atleta é reestabelecida, e, portanto, o atleta estará em seus níveis de hematócrito normais no momento da reinfusão, o que significa que o transporte de oxigênio também será aumentado.

Portanto, o objetivo comum tanto do uso da EPO como do abuso da transfusão sanguínea, é o de aumentar a concentração das células transportadoras de oxigênio no sangue. O papel do glicerol para ambos os casos é o de evitar que a alteração seja percebida no exame sanguíneo. Os níveis de hematócrito, por exemplo, são periodicamente medidos e registrados no PBA, e se a concentração

de hemácias tem um aumento relevante em determinado momento, tem-se a indicação do *doping* sanguíneo. Já a EPO, mesmo não entrando no PBA, também possui um método para o seu monitoramento. E como o glicerol induz a passagem de água para o espaço intravascular, a concentração de hemácias ou do hormônio administrado (no caso da EPO) diminuirá, fazendo com que no PBA, os níveis do hematócrito pareçam estar dentro da normalidade do atleta, e que a EPO fique abaixo dos limites de detecção do método, mascarando em ambos os casos, a dopagem.

Embora o glicerol tenha sido retirado da lista proibida, seu monitoramento continua sendo importante, pois além de poder voltar a integrar a lista, ele é ainda um possível marcador da dopagem do sangue.

Uma técnica utilizada para o armazenamento do sangue que será posteriormente reinjetado, é adição de glicerol às bolsas antes de sua refrigeração. Isso é feito para que se evite a formação de cristais de água entre 0 e - 4°C que acabariam por romper as células. Para reinfusão, as células são descongeladas e devem passar por uma série de lavagens de osmolalidade crescente para remover o glicerol (JONES; PEDOE, 1989). Quando todo esse processo é feito de forma improvisada e inadequada, o que normalmente ocorre na dopagem, é possível que nem todo o glicerol seja removido. Desta forma, a concentração de glicerol no organismo poderia ser superior à de referência. (OKANO, 2014; SARDELA *et al*, 2015).

Além disso, dados de Nunes *et al* (2018) indicam que há um aumento na concentração de glicerol no sangue, quando este é armazenado. O gráfico a seguir (Figura 5) mostra esse aumento, comparando a intensidade dos sinais relacionados a glicerol em sangue fresco (analisado após 3h da retirada) e armazenado por 7 e 21 dias, respectivamente. Nele é possível ver que após sete dias de armazenamento, a intensidade do sinal quadruplica e após isso, apresenta, em média, uma ligeira queda, mas ainda se mantém cerca de três vezes maior que a do sangue fresco.

Embora as hemácias não utilizem ácidos graxos como fonte de energia, supõe-se que isso ocorra, pela presença de lipases que, como mostrado na Figura 2 catalisam a quebra de triglicerídeos em glicerol e ácido graxo. Esses triglicerídeos podem ser provenientes da membrana fosfolipídica, caso ocorra a ruptura de

algumas células, e estando então em contato com seu substrato as lipases exerceriam sua função.

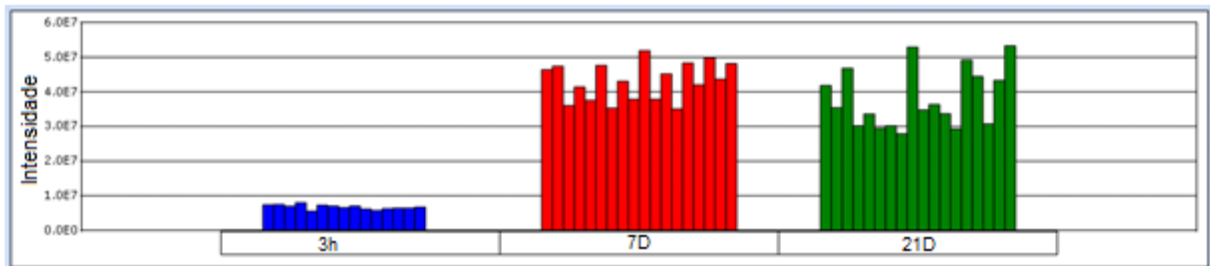


Figura 5. Monitoramento de glicerol em sangue fresco (3h da retirada) e refrigerado por 7 e 21 dias (Adaptado de: NUNES et al, 2018)

Outra possibilidade, é o equilíbrio que ocorre entre a di-hidroxiacetona-P e o glicerol, durante a via glicolítica, que possivelmente pode estar deslocado, para a formação do tri-álcool.

Mais uma vez o glicerol é visto como um possível marcador do abuso da transfusão sanguínea. Apesar destes resultados não serem suficientes para decretar a dopagem do sangue, eles são uma forma de sinalizar a ocorrência dela, sendo a medida da concentração de glicerol, um dos parâmetros a ser analisado.

Portanto, ainda que o glicerol, atualmente, não seja considerado *doping* por si só, ele ainda seria relevante como um possível marcador do abuso da transfusão sanguínea. Por isso, a compreensão de métodos para o seu monitoramento continua sendo relevante para o controle antidopagem.

1.2.2 Monitoramento de glicerol

Atualmente no Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem (LBCD) a detecção de 520 alvos analíticos, incluindo peptídeos e pequenas moléculas orgânicas no controle antidopagem é feita através de um procedimento único, já estabelecido e descrito em SARDELA *et al* (2018). Este procedimento faz uso da cromatografia líquida acoplada a Espectrometria de Massas de Alta Resolução (CL-EMAR), e a amostra injetada é composta por uma pequena fração da urina *in natura*, mas previamente diluída, juntamente com uma alíquota de urina que passou por um processo de extração em fase sólida. A fração *in natura* é necessária para incluir as moléculas polares que seriam eliminadas no processo de lavagem durante a extração, como pode ser visto na Figura 6, que apresenta em um fluxograma, o procedimento de preparação das amostras.

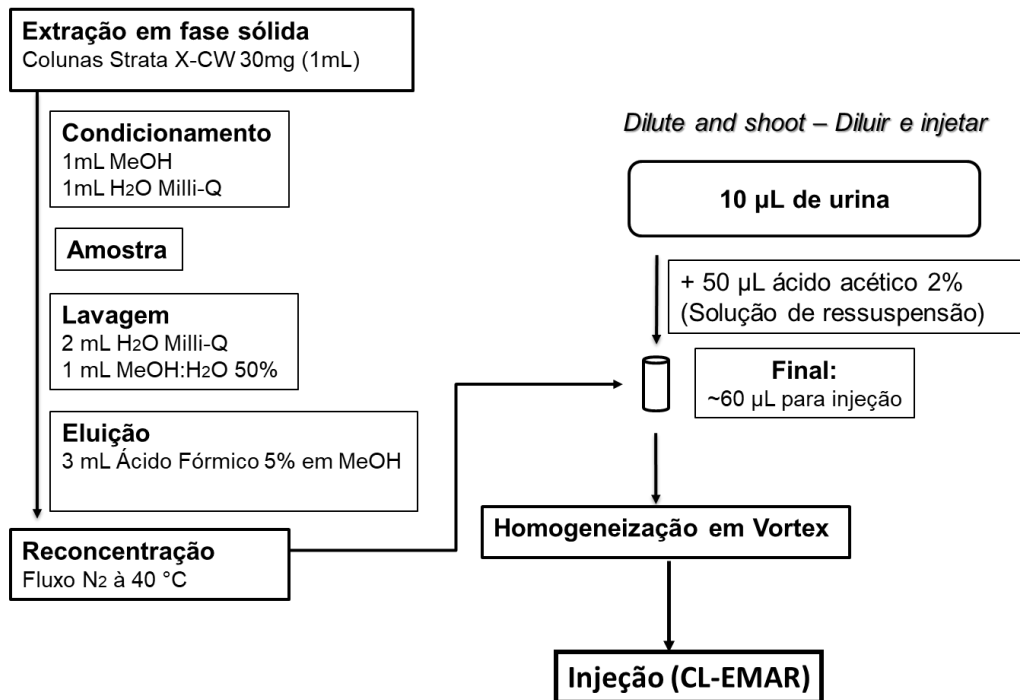


Figura 6. Fluxograma de preparação de amostras do método utilizado no LBCD para o monitoramento de 520 substâncias em urina, descrito em SARDELA *et al*, 2018.

O glicerol não faz parte do grupo de substâncias determinadas dessa maneira. Para ele, uma análise qualitativa é feita por método colorimétrico, onde junto do manitol essa substância é monitorada. Neste método o glicerol passa por um processo oxidativo, que utiliza periodato de sódio, ácido sulfúrico e bissulfito de sódio, gerando glicolaldeído, que em reação com fucsina gera um produto de cor rosa. Quanto maior for a concentração de glicerol e/ou manitol na urina, maior será a intensidade da coloração. Essa relação diretamente proporcional é vista até 1 mg.mL^{-1} . O resultado é apresentado na Figura 7. Mais informações sobre o método colorimétrico podem ser obtidas em Sardela *et al*, 2015.

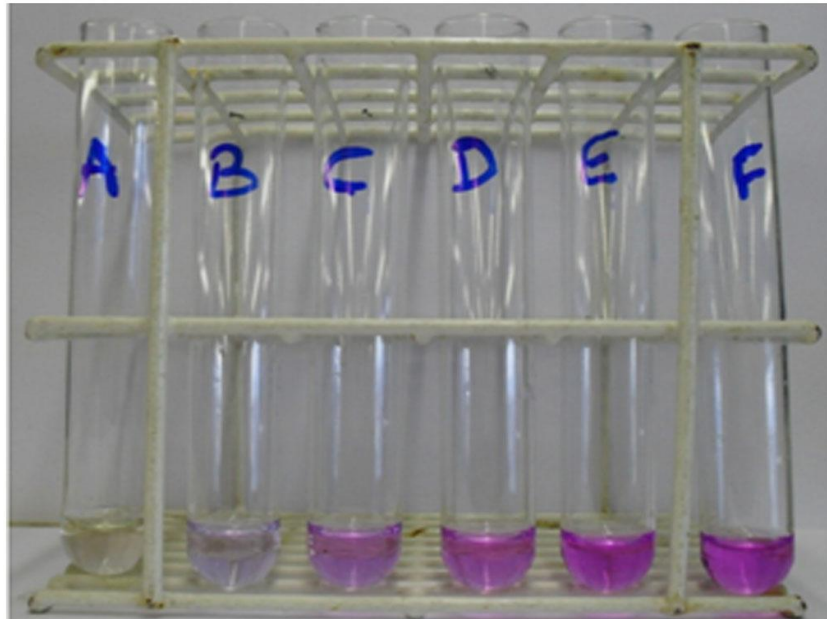


Figura 7. Monitoramento de glicerol. A concentração é diretamente proporcional a intensidade da coloração até 1mg.mL^{-1} . (Fonte: SARDELA *et al*, 2015)

Empregado desde 2010 como principal procedimento analítico para detecção do abuso de glicerol em urina, o método colorimétrico resulta em inúmeros casos com falsas suspeitas, por não trazer caracterização molecular e por ser infiel a estimativa da concentração, já que sua faixa de linearidade é estreita, estando seu ponto máximo, abaixo da concentração considerada *doping* pela AMA (4.3mg.mL^{-1}). Além disso, o resultado é pouco seletivo e específico, fazendo com que a coloração mais intensa apareça mesmo em baixas concentrações de glicerol. Por consequência, a necessidade de métodos mais eficientes para a confirmação da concentração é quase sempre presente, já que essa é uma substância naturalmente já existente no organismo. A confirmação quantitativa é feita utilizando a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) em um método exclusivo onde o glicerol passa por um processo de derivatização (SARDELA *et al*, 2015).

Uma vez que é importante implementar métodos mais abrangentes, reduzindo o número de procedimentos e, conseqüentemente, reduzindo custos, maximizando a disponibilidade de equipes/instrumentação, seria interessante que a detecção do glicerol pudesse ser realizada juntamente com diversas outras substâncias em um mesmo procedimento, como ocorre no método já utilizado no LBCD.

1.3 Métodos Analíticos

1.3.1 Cromatografia Líquida (CL)

A CL é a técnica analítica de separação mais usada dentre todas as outras. Isso devido a vantagens, como a sua adaptabilidade às determinações quantitativas com exatidão e a sua capacidade de separação de compostos não voláteis ou termicamente instáveis (SKOOG *et al*, 2009).

Basicamente, a amostra é transportada por uma fase móvel líquida, que é forçada, a passar através de uma fase estacionária imiscível fixa, colocada em uma coluna. O processo de separação ocorre devido a diferença de interação dos componentes da amostra com as fases móvel e estacionária. Componentes que interagem mais fortemente com a fase estacionária, ficando mais retidos nela, movem-se mais lentamente no fluxo da fase móvel e vice-versa. Devido a essa diferença na velocidade de migração, os compostos separam-se, eluindo e consequentemente sendo detectados, em momentos diferentes (SKOOG *et al*, 2009).

Um fator importante na diferenciação das fases estacionárias é a polaridade do material que as compõem. Podendo ser, por exemplo, desde sílica pura até compostos bastante apolares. Chama-se de fase normal o modo em que se utiliza fase estacionária polar e um solvente menos polar. Já a fase reversa, a maneira mais comumente utilizada, é quando a fase estacionária é apolar ou fracamente polar e o solvente é mais polar. Em ambos os casos, utiliza-se solventes com baixa força de eluição para que durante a corrida, a separação dos componentes da mistura seja mais eficiente. A fase estacionária mais utilizada na CL é a octadecil (C18) (HARRIS, 2010). Ela é utilizada, inclusive, no método citado anteriormente, empregado no LBCD para o monitoramento de diversas moléculas. Trata-se de um composto de 18 carbonos suportado em sílica, ou seja, uma fase estacionária não polar.

Para o monitoramento de glicerol em urina utilizando CL em fase reversa, como é o caso da coluna C18 com fase móvel polar, espera-se que seu tempo de retenção seja curto. Pois, a grande capacidade de promover ligações de hidrogênio, fazem com que o glicerol, molécula bastante polar, interaja muito mais intensamente com a fase móvel do que com a fase estacionária. Portanto, ele seria eluído nos primeiros momentos da corrida, juntamente com os demais componentes dessa

matriz complexa, que não interagem com a fase estacionária, chegando rapidamente ao detector, que comumente é um espectrômetro de massas.

Tem-se então um primeiro grande desafio na incorporação do glicerol no método de rotina abrangente utilizado no LBCD, já que este utiliza a cromatografia em fase reversa, pois na perspectiva de uma análise quantitativa, haveria como fator prejudicial o efeito da matriz, que levaria a uma deformação do pico cromatográfico, devido a supressão iônica, efeito esse, que será melhor explicado no próximo tópico.

1.3.2 Acoplamento da CL com Espectrometria de Massas (EM)

Para MAKAROV e SCIGELOVA (2010), a dimensão e a qualidade do conhecimento obtido com a CL estão diretamente relacionadas aos avanços na instrumentação. Pois, apesar de ser uma ótima técnica de separação, quando há a necessidade de identificar a substância, ou seja, numa análise qualitativa, uma técnica para confirmação se faz necessária e para isso a EM se mostra extremamente satisfatória (LANÇAS, 2009).

Um espectrômetro de massas é um equipamento que contém basicamente, uma fonte de íons, um separador ou filtro de massas, na realidade da razão massa/carga (m/z), e um detector (MORAES; LAGO, 2002). Desta forma, a espectrometria de massas consiste, em resumo, em um método que mede a razão m/z de moléculas ou fragmentos de moléculas que foram ionizados no próprio espectrômetro, mais precisamente, em sua fonte de íons, permitindo a descoberta da estrutura e identidade química das substâncias (SCHUBERTH).

O equipamento de EM trabalha em alto vácuo. Inicialmente esse estado era necessário desde sua fonte de íons (primeiro componente do instrumento). Para a CL, onde o efluente da coluna é um líquido e os compostos separados são relativamente pouco voláteis e/ou sensíveis à temperatura, o acoplamento só foi possível depois do desenvolvimento de interfaces e formas de ionização alternativas (CHIARADIA *et al*, 2008).

Com o passar do tempo algumas técnicas de ionização mais brandas e à pressão atmosférica surgiram, mas em 1989 é que foi desenvolvida a principal técnica de ionização utilizada em CL-EM, a ionização por *electrospray* (ESI, do inglês *electrospray ionization*), criada por John B. Fenn e que lhe garantiu o prêmio Nobel de química de 2002.

Segundo FENN *et al* (1989), a ESI é uma técnica capaz de produzir a partir de espécies grandes e complexas em solução, íons intactos em vácuo. Ela permite a aplicação da análise espectrométrica de massas às moléculas polares, grandes e frágeis, de forma mais abrangente do que era possível com outros métodos de ionização branda.

Na ESI, o líquido no qual o analito de interesse se encontra dissolvido, entra na câmara através de um capilar de aço inoxidável, à pressão atmosférica e sob alta voltagem. O campo resultante na ponta do capilar carrega a superfície das gotas formadas, que são dessolvatadas ao se deslocarem em sentido contrário ao posicionamento de um eletrodo em uma região de pressão atmosférica (CHIARADIA *et al*, 2008; FENN *et al*, 1989). Essa dessolvatação, é assistida por um gás de secagem (N_2), que flui em contracorrente e a uma temperatura não superior a $80\text{ }^\circ\text{C}$. Ele acelera a evaporação do solvente de cada gota, diminuindo seu diâmetro à medida que se desloca em direção à parede final da câmara (FENN *et al*, 1989).

Desta forma, a densidade de carga aumenta na gota e conforme isso acontece, o campo elétrico formado entre o capilar e o contra eletrodo aumenta provocando a deformação da gota até que o chamado limite de Rayleigh seja atingido, no qual a repulsão de Coulomb se torna da mesma ordem que a tensão superficial (MORAES; LAGO, 2003; FENN *et al*, 1989). A instabilidade resultante, leva a chamada "explosão de Coulomb", que separa a gota, produzindo gotículas ainda menores e carregadas que também evaporam. Esse processo acontece continuamente até que o raio de curvatura da gota seja tão pequeno ao ponto de gerar um campo, devido à densidade de carga na superfície, forte o suficiente para dessolvatar íons da gota para o gás ambiente (FENN *et al*, 1989). A Figura 8 ilustra o processo:

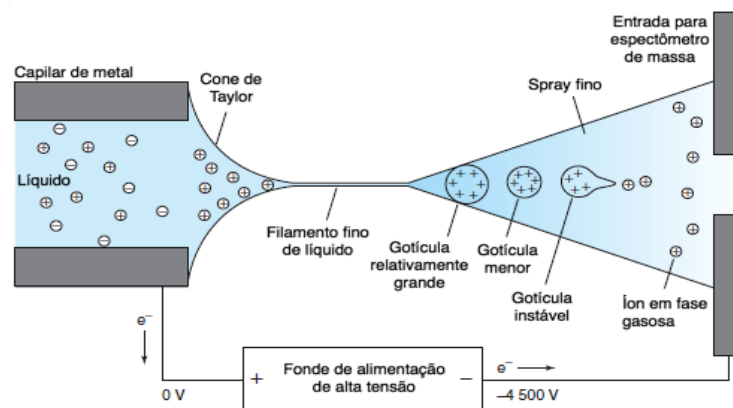


Figura 8. Processo de ESI (Adaptado de: HARRIS, 2010)

Esses íons formados geralmente tratam-se da própria molécula protonada, $[M+H]^+$ (modo positivo) ou desprotonada, $[M-H]^-$. Então, a massa obtida através da análise, se refere a massa da molécula acrescida (ou diminuída) da massa do próton (CHIARADIA *et al*, 2008; FENN *et al*, 1989). Embora a transferência de prótons seja mais comum, a formação de adutos com sódio, $[M+Na]^+$, e potássio, $[M+K]^+$, principalmente, tem sido observada (LANÇAS, 2009). Neste caso, a massa obtida seria o somatório da massa molecular acrescida da massa desses elementos. É possível ainda que um analito seja dividido nessas três formas ionizadas, e isso precisa ser levado em consideração na perspectiva de uma análise quantitativa, por exemplo.

Nesse momento, outro fator importante deve ser mencionado. Uma das principais dificuldades na detecção de moléculas orgânicas em baixa concentração por CL-EM utilizando ESI, é a possibilidade de ocorrência da supressão iônica que aparece como um tipo de efeito matricial e ocorre durante a evaporação (VIRUS *et al*, 2008; SOUVERAIN *et al*, 2004). A presença de substâncias endógenas, ou seja, moléculas orgânicas ou inorgânicas presentes na amostra, e recuperadas no extrato final, é o principal motivo do problema. Desta forma, compostos altamente polares e várias moléculas orgânicas incluindo carboidratos, aminas, lipídeos, peptídeos ou metabólitos com uma estrutura química próxima ao analito alvo alteram a eficiência da formação ou evaporação da gota, o que pode afetar na quantidade de íons carregados na fase gasosa (NELSON; DOLAN, 2002; ANTIGNAC *et al*, 2005). A supressão iônica compromete de forma considerável a acurácia da quantificação, podendo levar até mesmo, nos casos de controle de *doping* ou análises forenses, a um resultado falso negativo (PETERS, 2011). Esse é o efeito mencionado no tópico anterior, que pode ocorrer na detecção do glicerol em matriz de urina utilizando cromatografia em fase reversa.

Algumas medidas são tomadas para compensar o efeito da matriz, expresso pela supressão de íons. Uma dessas medidas é a padronização interna, onde uma substância (padrão) com alta pureza e concentração conhecida é adicionada à amostra. O padrão, idealmente, deve ter similaridade estrutural com o analito, sofrendo, portanto, os mesmos efeitos e eluindo próximo a ele. O uso de análogos deuterados ou marcados com carbono 13 é a melhor maneira de atingir esse

objetivo. Dessa forma é possível comparar as respostas do analito e do padrão e relacioná-las com a concentração (NELSON; DOLAN, 2002).

A união da CL com a EM cria uma ferramenta bastante versátil e importante para análises quantitativas e qualitativas, pois une a alta seletividade e eficiência da separação, qualidades da cromatografia, com a obtenção de informação estrutural, massa molar e ainda aumento na seletividade proporcionadas pela EM (CHIARADIA *et al*, 2008; LANÇAS, 2009).

Diante de todas essas vantagens, que possibilitam uma melhor elucidação de amostras mais complexas, CL-EM, e principalmente CL-EMAR, com o auxílio da alta resolução, tem se tornado cada vez mais importante no campo clínico e forense, nos testes de medicamentos e nas análises de *doping* (PETERS, 2011). Com isso, laboratórios acreditados pela AMA utilizam principalmente essa técnica para a detecção de seus alvos analíticos (VIRUS *et al*, 2008).

1.3.3 Espectrometria de Massas de Alta Resolução (EMAR)

Sabe-se que a massa de uma molécula ou íon é dada pelo somatório das massas dos átomos que a constituem. A espectrometria de massas faz uso justamente das massas dos íons relacionadas as suas cargas para cumprir o seu papel de identificar compostos desconhecidos.

Para calcular corretamente a massa de fragmentos e moléculas, é preciso utilizar a massa atômica de um único isótopo. Os pesos atômicos monoisotópicos não são números inteiros exatos, estando sempre relacionados a massa do ^{12}C . De forma que: $^{12}\text{C} = 12,00000000$, então: $^1\text{H} = 1,007825035$, $^{14}\text{N} = 14,00307400$, $^{16}\text{O} = 15,99491463$ (AZEVEDO, 2004).

Dependendo da acurácia, é possível considerar que duas moléculas ou fragmentos diferentes tenham a mesma massa, como é exemplificado na Tabela 1.

Tabela 1. Massas nominal e exata de diferentes compostos iônicos (Adaptado de: IGLESIAS, 2012)

Íon	Massa Nominal	Massa Exata
$[\text{C}_8\text{H}_7\text{NO}]^+$	133	133,05222
$[\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}]^+$	133	133,08860
$[\text{C}_7\text{H}_7\text{N}_3]^+$	133	133,06345

Desta forma, entende-se que a medida da massa de um íon com acurácia suficiente gera a determinação correta de sua composição elementar (e isotópica) (HARRIS, 2010).

Introduz-se então um outro componente extremamente importante no equipamento em questão, o analisador de massas. Quanto maior for a resolução do analisador, maior será a exatidão da relação m/z fornecida. Um tipo de analisador, chamado quadrupolo, tem resolução apenas capaz de diferenciar a m/z 133 da m/z 132, logo, ele indicaria que todos os compostos indicados na Tabela 1, apresentam m/z 133, enxergando-os como a mesma molécula.

O quadrupolo é formado por quatro barras metálicas cilíndricas dispostas em pares, nas quais é aplicada radiofrequência alternada. Elas formam uma espécie de caixa com um espaço no meio pelo qual os íons passam, sendo acelerados pelo campo elétrico oscilante (SCHUBERTH). Íons de determinada razão m/z só conseguem atravessar o quadrupolo em uma voltagem específica sendo posteriormente detectados (CHIARADIA *et al*, 2008).

Atualmente nos laboratórios de controle de dopagem, o analisador mais utilizado e que garante alta resolução é o *orbitrap*. Segundo HARRIS (2010), seu poder de resolução é de aproximadamente 150000, o que significa que ele seria capaz de diferenciar todos os compostos da Tabela 1, mesmo sem uma separação cromatográfica adequada, indicando suas m/z com até cinco casas decimais.

O *orbitrap* é um analisador de massas que não necessita de um campo magnético ou radiofrequência. Ele é constituído de três eletrodos, um central, mantido em -5KV, e dois externos, isolados eletricamente, pelos quais entra de forma perpendicular, um pacote de íons. Os íons realizam um movimento axial ao redor do eletrodo central, guiados pelo campo elétrico, e com isso, mantêm uma órbita no centro do *orbitrap*. A frequência de oscilação de um íon no *orbitrap* é proporcional a $1/(m/z)^{1/2}$. Cada íon com determinado valor m/z cria um componente da corrente e a soma da corrente correspondente a todos esses valores é o sinal observado. Um computador, calcula então, através de uma transformada de Fourier, os valores de m/z dos íons baseado na corrente medida por um certo tempo que é decomposta em suas frequências componentes (HARRIS, 2010). Desta forma, o equipamento com *orbitrap* acaba não tendo um detector, pois este próprio analisador, cumpre esse papel.

A Figura 9 exibe o esquema de um espectrômetro de massas do modelo híbrido *Q-Exactive Plus*, utilizado nas análises antidopagem no LBCD. Esse equipamento contém tanto um quadrupolo, que serve basicamente como um filtro, como um *orbitrap* que responde em relação as massas com alta resolução.

A amostra sofre ESI e segue através de lentes focalizadoras para o quadrupolo que pode ou não ser utilizado como filtro (resolução de 1 unidade). Em seguida os íons são encaminhando para a *C-trap*, local em que é feito o acúmulo de uma quantidade significativa de íons para a posterior injeção no *orbitrap* (MAKAROV; SCIGELOVA, 2010). O equipamento conta ainda com uma célula de colisão, que promove a fragmentação dos compostos, se assim for desejado, já que o ESI não tem energia suficiente para isso.

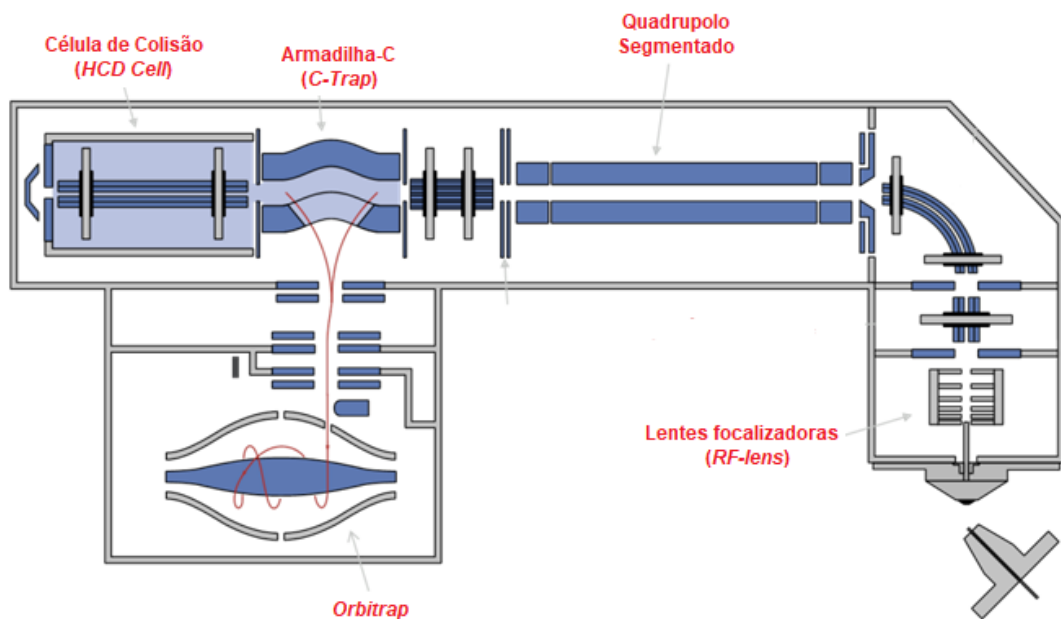


Figura 9. Esquema do espectrômetro de massas *Q-Exactive Plus*.
(Adaptado de: <http://planetorbitrap.com/q-exactive-plus#tab:schematic>)

Portanto, a massa dos analitos que é fornecida depende do poder de resolução do analisador de massa, e somente a alta resolução é capaz de diferenciar espécies quase isobáricas, evitando falsos positivos e/ou negativos (MAKAROV; SCIGELOVA, 2010). A massa exata é, portanto, um parâmetro importantíssimo nas análises de fármacos, de contaminação alimentar e no controle de dopagem, por exemplo.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral do trabalho foi avaliar a detectabilidade do glicerol e a possível estimativa de sua concentração por cromatografia líquida em fase reversa acoplada a espectrometria de massas de alta resolução.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar se as espécies comumente esperadas são de fato, possíveis alvos analíticos para a detecção do glicerol, mesmo nas condições dos procedimentos iniciais de análise utilizados no laboratório de controle antidopagem e descritos em Sardela *et al*, 2018.

- Buscar e selecionar uma nova espécie que poderia ser utilizada como alvo analítico.

- Elucidar a composição molecular e possivelmente a estrutura do novo aduto encontrado.

- Verificar se a relação entre a concentração de glicerol e o pico cromatográfico do alvo analítico apresenta linearidade, a fim de realizar, mesmo em procedimentos iniciais de análise (triagem), uma estimativa da concentração.

3 Metodologia

3.1 Considerações Gerais

- ✓ Todos os compostos químicos utilizados para fase móvel e outros (ácido fórmico, ácido acético, formiato de amônio, e metanol), possuíam grau analítico ou HPLC e eram provenientes da Tedia (Fairfield, USA).
- ✓ A água utilizada foi de grau ultrapuro, sendo obtida através do sistema Milli-Q-Millipore (18 MW cm⁻¹) (Massachusetts, USA).
- ✓ Os padrões certificados de glicerol e glicerol-1,1,2,3,3-d5 (98%D), foram adquiridos do fornecedor SIGMA-ALDRICH Brasil LTDA.

3.2 Instrumentação e método de injeção

O método citado a seguir já é utilizado no LBCD, e para informações mais detalhadas, pode-se consultar SARDELA *et al*, 2018.

O sistema de CL utilizado foi um Dionex (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha) acoplado a um espectrômetro de massa com analisador do tipo Q-Exactive Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha). A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna de fase reversa (Syncronis - Thermo, USA C₁₈, 1,7 µm, 50 mm x 2,1 mm) a 40 °C. As fases móveis utilizadas foram (A) solução aquosa de formiato de amônio a 5,0 mM e (B) MeOH, ambos com ácido fórmico a 0,1%, sendo o perfil de eluição empregado o seguinte: 0–0,3 min, 5% (B); 0,3–0,5 min, 5–10% (B); 0,5–1,0 min, 10–25% (B); 1,0–6,0 min, 25–90%; 6,0–8,0 min, 90–100%; 8,0–9,0 min, 100% (B) (lavagem da coluna); 9,0–9,1 min, 100–5% (B), 9,1–11,0 min, 5% (B) (equilíbrio da coluna para a condição inicial). A taxa de fluxo foi 400 µL/min. O tempo de execução da corrida foi de 11 min e o volume de injeção máximo de 8,0 µL.

O efluente do cromatógrafo líquido foi bombeado para um espectrômetro de massas equipado com uma fonte de ESI, operando nos modos de ionização positivo e negativo, quando a voltagem do spray era setada em 3,9 e 2,9 kV, respectivamente. A temperatura do capilar foi de 380 °C, o fluxo do nitrogênio como gás nebulizador foi de 60 e como gás de secagem foi de 20, ambas unidades arbitrárias.

Para garantir precisões de massa abaixo de 6 ppm, o instrumento foi calibrado diariamente usando as soluções de calibração do fabricante (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha). O espectrômetro de massas realizou aquisição, no modo de ionização positivo e negativo, com uma resolução de 70.000 FWHM. A varredura completa do modo positivo abrange m/z de 100 a 800, e do modo negativo, de 100-620, porém inicialmente realizou-se alteração no método para faixa de 50-750 m/z (modo positivo) e 50-620 m/z , pois alguns dos alvos esperados, possuem m/z inferior a 100.

3.3 Avaliação e escolha de alvo analítico para a detecção do glicerol

No método mencionado anteriormente, utilizado no LBCD, a lavagem da amostra na extração em fase sólida é feita com água e com uma mistura de água e metanol, ou seja, as substâncias polares presentes na amostra são eliminadas, sendo perdidas nesse momento (Figura 6). Sendo assim, a detecção do glicerol por

esse método só é possível pela fração de urina *in natura* que passa pelo procedimento de “diluir e injetar”.

Desta forma, seguindo este procedimento, foram preparadas soluções aquosas de glicerol e glicerol-d5 a 2 mg.mL^{-1} , concentração menor que a metade do limite estabelecido pela AMA, a partir de soluções a 100 mg.mL^{-1} previamente preparadas. Uma alíquota de $10 \text{ }\mu\text{L}$ dessas soluções foram adicionadas (separadamente) em dois *inserts* cotendo $50 \text{ }\mu\text{L}$ de ácido acético 2%, que é a solução de ressuspensão do procedimento já utilizado no laboratório. Para o ensaio em “branco”, realizou-se o mesmo procedimento, porém utilizou-se $10 \text{ }\mu\text{L}$ de água ultrapura ao invés das soluções de glicerol e glicerol-d5. Ambos os *inserts* foram colocados em *vials*, que foram homogeneizados em *vortex*. Em seguida, os mesmos foram levados para a injeção no sistema CL-EMAR. Neste momento, utilizou-se a faixa de 50-750 *m/z*, no modo positivo, e 50-620 *m/z* no negativo.

3.4 Investigação da possível fonte do átomo presente na nova espécie formada

Foram preparadas duas soluções padrão de glicerol a 100 mg.mL^{-1} em metanol. Uma delas utilizando apenas material de plástico e outra apenas material de vidro. Essas soluções foram posteriormente diluídas com água, sendo levadas a concentração de 1 mg.mL^{-1} também usando apenas o tipo de material adequado para cada uma delas. A partir de então, realizou-se o mesmo procedimento anterior (diluir e injetar). Utilizou-se o modo de varredura usual do método de triagem do laboratório (*m/z* 100-800).

3.5 Investigação da tendência linear entre a concentração de glicerol e área do pico cromatográfico do alvo analítico escolhido

A fim de verificar se a relação entre a concentração de glicerol e a área relativa do pico cromatográfico referente ao alvo analítico escolhido era linear, realizou-se a construção de curvas analíticas.

Em balão volumétrico de $1,00 \text{ mL}$, preparou-se uma solução de glicerol a $40,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ e a partir dessa solução mãe, foram preparadas, também de forma quantitativa, soluções de glicerol em brancos de urina (BU) e em água ultrapura nas concentrações de 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 7,0 e 8,0 mg.mL^{-1} . O BU trata-se de urina humana isenta das substâncias exógenas proibidas, monitoradas pelo LBCD.

O procedimento, a partir de então, trata-se do preparo das amostras de “diluir e injetar”, utilizando as soluções preparadas de diferentes concentrações de glicerol, sempre em triplicata, e variando alguns parâmetros, como: o meio de preparo das soluções de glicerol; a solução de ressuspensão; o uso ou não de Padrão Interno (PI) e a temperatura. A alteração desses parâmetros ocorreu sempre devido aos resultados dos experimentos anteriores. Portanto, não escolheu-se de maneira premeditada qual seria a variação dos parâmetros e nem quais parâmetros seriam alterados. Na verdade, avaliou-se a linearidade inicialmente com o procedimento de “diluir e injetar” presente no método já utilizado no laboratório e descrito em Sardela *et al*, 2018, e conforme os resultados foram sendo obtidos, percebeu-se a necessidade da alteração desses parâmetros, a fim de se estudar o comportamento do alvo analítico.

Desta forma, a Tabela 2 indica os parâmetros utilizados em cada uma das etapas. Após a preparação, foram construídos gráficos de concentração de glicerol x área do pico cromatográfico do alvo analítico ou concentração de glicerol x razão entre as áreas dos picos cromatográficos do alvo analítico e do PI.

Buscou-se pela massa exata do alvo analítico para obtenção da área do pico cromatográfico, inicialmente com tolerância de 6 ppm e após alguns procedimentos, com tolerância de 50 ppm.

Nos procedimentos em que o uso do padrão interno foi realizado, diluiu-se uma solução padrão de glicerol-d5 a 2,5 mg.mL⁻¹ (PI) diretamente na solução de ressuspensão.

Tabela 2. Variação nos parâmetros do procedimento de “diluir e injetar”

Procedimento	Matriz	Solução de ressuspensão	Adição de PI	Incubação a 50°C por 30 min
3.5.1	BU	Ácido acético 2%	Não	Não
3.5.2* e 3.5.3	BU	Ácido acético 2%	Sim	Não
3.5.4**	BU	Ácido acético 2%	Sim	Não
3.5.5	BU	Ácido bórico 3%	Sim	Não
3.5.6	Água	Ácido bórico 3%	Sim	Não
3.5.7	Água	Ácido bórico 3%	Não	Sim
3.5.8	BU	Ácido bórico 3%	Sim	Sim

* Uma amostra de glicerol em urina a $4,00 \text{ mg.mL}^{-1}$, passou por todo o procedimento usual de diluir e injetar, com adição de PI diretamente na fase móvel, e em seguida foi injetada por 5 vezes a fim de se verificar qual a tolerância de erro para a massa exata melhor se adequava estatisticamente. Para isso, tomou-se os cinco valores de área correspondentes aos picos extraídos pela massa exata do analito com diversas faixas de tolerância. Realizou-se então, a razão entre essas áreas e as cinco áreas dos picos do PI, obtidos sempre com tolerância de 6 ppm. Com estes valores, calculou-se a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação relativa (CV(%)).

** Foi utilizado o quadrupolo como filtro para a massa desejada.

4 Resultados e Discussão

4.1 Avaliação e escolha de alvo analítico para a detecção do glicerol

A diferença entre a molécula de glicerol e a de glicerol-d5 (glicerol deuterado) está na troca dos cinco hidrogênios, que não fazem parte das hidroxilas, por deutério, fazendo com que sua massa seja maior em cinco unidades (Figura 10).

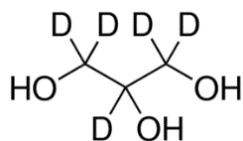


Figura 10. Estrutura do glicerol-d5 (Fonte: Produtos - Glycerol-1,1,2,3,3-d₅)

Desta forma, o glicerol-d5 é uma possível molécula a ser utilizada como padrão interno (PI) no monitoramento do glicerol, já que sua estrutura é bastante similar, o que leva a crer que seu comportamento químico também é, e, portanto, sofreria praticamente os mesmos efeitos. Por isso, para que pudesse ser feita uma comparação dos efeitos ocorridos através da verificação dos resultados obtidos, é que o mesmo procedimento também foi realizado para o glicerol-d5.

Como mencionado anteriormente, por se tratar de uma coluna C18, o glicerol apresentou pouca interação com a fase estacionária, tendo maior afinidade pela fase móvel (polar), devido as suas possibilidades de interação por ligação de hidrôgenio. Baseado nisso e em dados da literatura (DEVENTER; VAN EENOOO, 2015), infere-se que ele sairá da coluna nos primeiros momentos da eluição.

Suspeita-se então, que os picos referentes a(s) espécie(s) gerada(s) pela molécula de glicerol, nos modos positivo e negativo de ionização, são os iniciais, com tempos de retenção de 0,34 e 0,33 min, respectivamente. Esses valores diferem, pois eles são uma média dos tempos de retenção final e inicial, e como a intensidade do sinal é diferente entre os experimentos, a área do pico cromatográfico também é, fazendo com que a média dos tempos de retenção sejam diferentes. Ambos estão destacados com uma seta nas Figura 11a e Figura 11b, que representam a corrente de íons totais (TIC, do inglês *Total Ion Current*), nos modos positivo e negativo. Exatamente o mesmo perfil é visto para a molécula deuterada (Figura 12a e Figura 12b).

No branco, foi observado um pico no mesmo tempo de retenção, porém sua intensidade era mais de 100 vezes inferior a do padrão e portanto, não é considerado um sinal significativo.

Glicerol

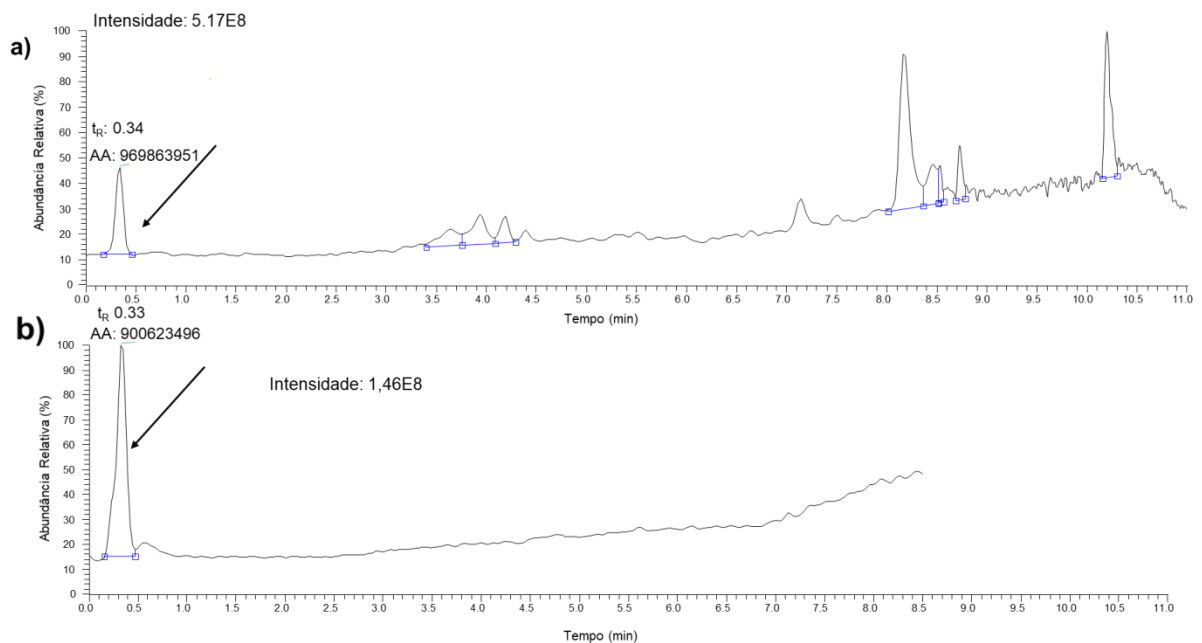


Figura 11. Corrente de íons totais provenientes da injeção de glicerol a 2 mg.mL^{-1} nos modos positivo (a) e negativo (b).

Glicerol-d5

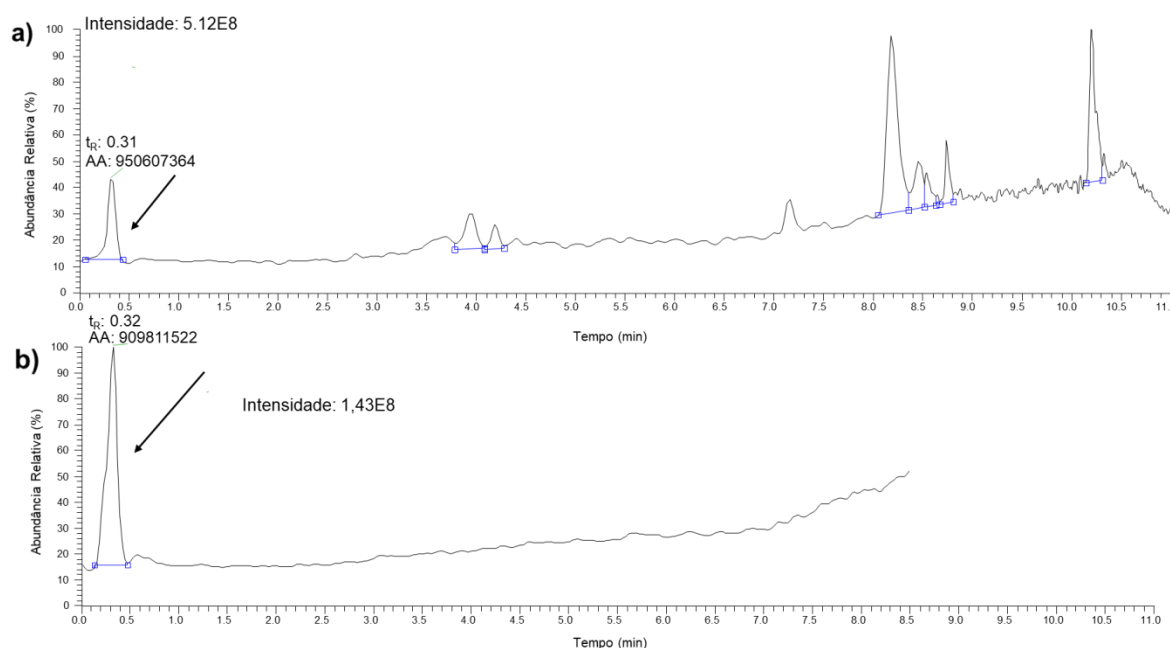


Figura 12. Corrente de íons totais provenientes da injeção de glicerol-d5 a 2 mg.mL^{-1} nos modos positivo (a) e negativo (b).

Dados encontrados na literatura indicam apenas a ionização do glicerol no modo positivo como alvo a ser monitorado. Porém, com base nas correntes de íons obtidas, vê-se que a ionização ocorreu em ambos os modos, positivo e negativo, inclusive, no modo negativo, se mostrou mais intensa.

Tem-se então, como alvos teóricos esperados: a molécula protonada, desprotonada e o adutos formados com sódio e potássio, representados respectivamente por, $[M+H]^+$, $[M-H]^-$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$. As massas exatas dessas espécies seguem na tabela abaixo:

Tabela 3. Alvos esperados para o glicerol

Espécie	Massas exatas	
	Glicerol	Glicerol-d5
$[M+H]^+$	93,05462	98,08600
$[M-H]^-$	91,03897	96,07035
$[M+Na]^+$	115,03657	120,06795
$[M+K]^+$	131,01050	136,04189

Nos espectros de massas dos íons positivos, no tempo de retenção adequado, tanto para o glicerol como para sua forma deuterada, não foram observados picos referentes as espécies $[M+H]^+$ e $[M+K]^+$. Isso pode ser melhor

observado através da aproximação mostrada nas Figura 13a e Figura 13b. Nelas também é possível perceber a presença do sinal representante do aduto formado com sódio, porém, sua intensidade é 100 vezes inferior a do sinal mais intenso.

Foi observado que a calibração diária do equipamento leva a um resultado com erros sempre inferiores a 6 ppm, indicando acurácia adequada nas massas observadas. Foram então calculados os erros relativos correspondentes as massas dos picos encontrados no espectro em comparação com as massas exatas exibidas na Tabela 2. Para o aduto de glicerol com sódio, o erro foi de 2,09 ppm e já para o glicerol-d5, foi de 1,08 ppm. Esses baixos valores de erro, confirmam a composição elementar da molécula.

Com base nos resultados obtidos, pode-se dizer que, de fato, a resposta obtida para o glicerol-d5 é muito similar a de glicerol, confirmando assim, sua possível utilização como PI.

Além disso, para fins de detecção de glicerol, nenhuma das espécies se mostrou, *a priori*, um bom alvo analítico a ser monitorado, pois ainda que o íon de m/z 115 tenha sido observado, sua intensidade foi baixa.

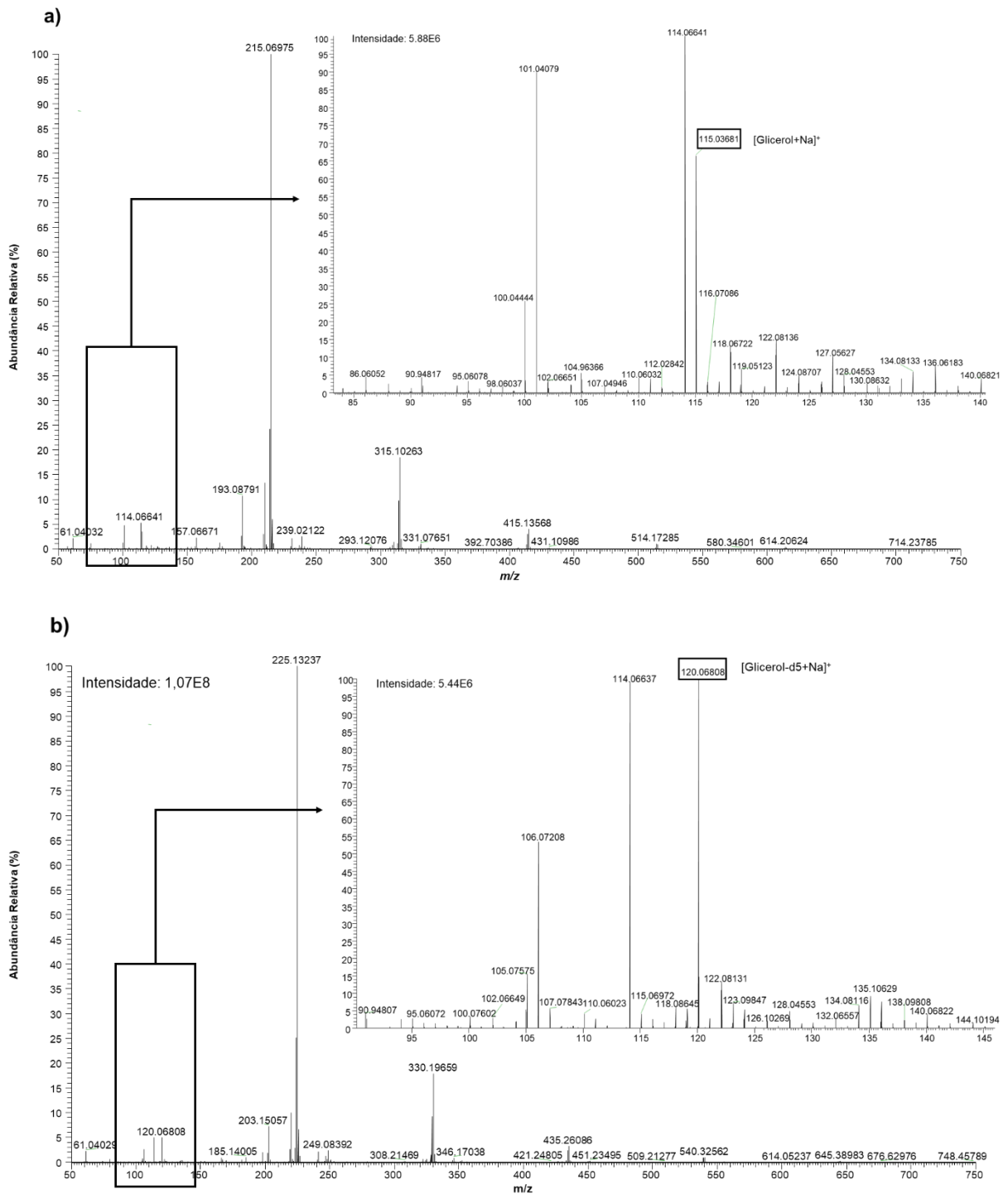


Figura 13. Espectro de massas de glicerol(a) e glicerol- d_5 (b), no modo positivo de ionização, com aproximação da região de 80-140 m/z .

Já no modo negativo de ionização, não foram observados os sinais de m/z 91,03897 e 96,07035 referentes as moléculas desprotonadas de glicerol e glicerol- d_5 , respectivamente. Esse resultado pode ser observado nas Figuras 14a e 14b.

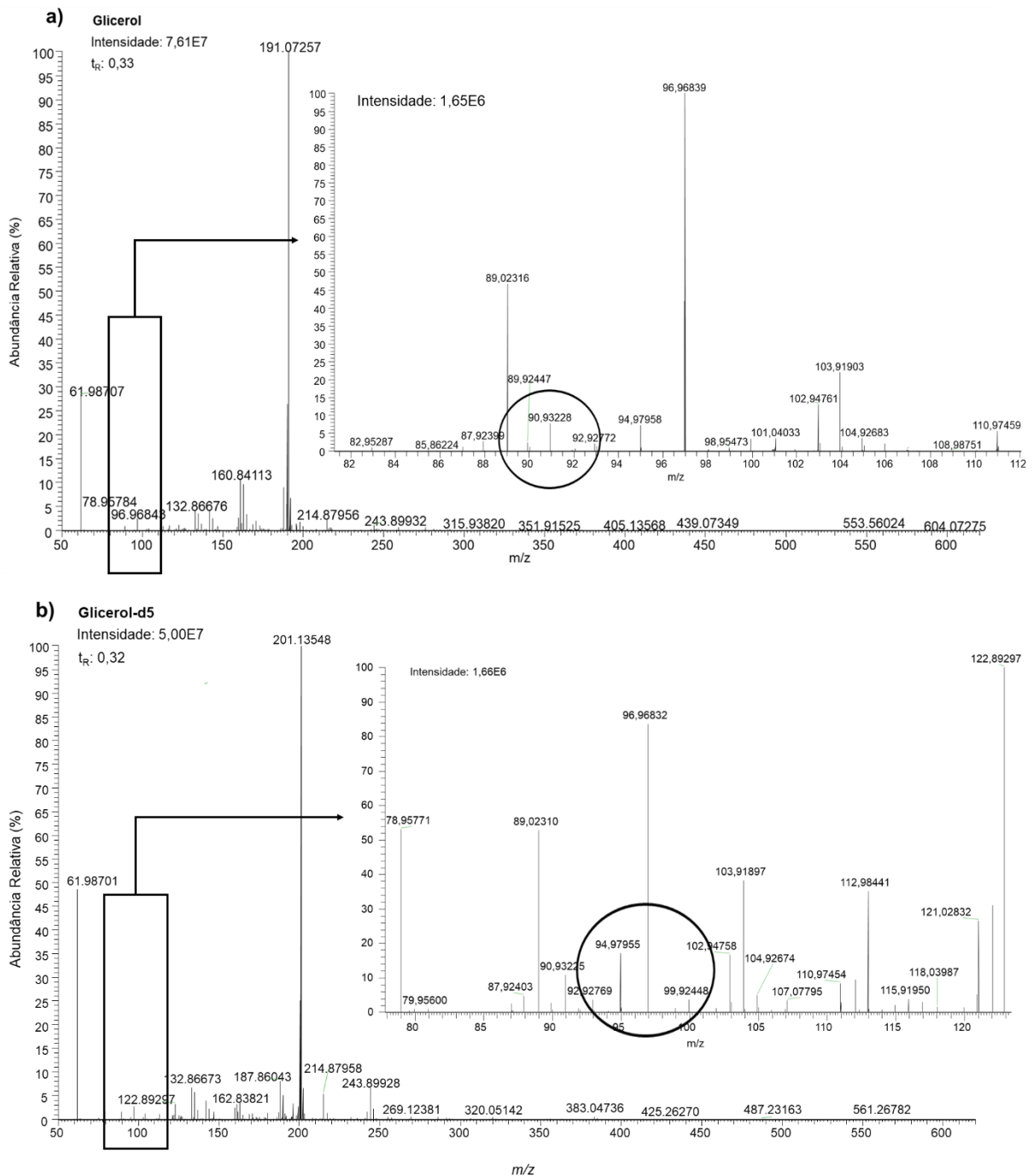


Figura 14. Espectro de massas de glicerol(a) e glicerol-d5 (b), no modo negativo de ionização, com aproximação da região de aproximadamente 80-110 m/z.

Tendo em vista que as referências consultadas, que utilizam CL-EM para o monitoramento do glicerol, buscam seu aduto com sódio, ou seja, um íon positivo (DEVENTER; VAN EENOOO, 2015; McInstosh *et al*; DONG *et al*), decidiu-se analisar de forma mais detalhada, o espectro de massas no tempo de retenção referente ao glicerol, a fim de compreender os eventos ocorridos e encontrar um possível alvo analítico.

Com a análise mais criteriosa do espectro do glicerol, notou-se a presença de íons com diferença de m/z 100, com intensidade decrescente, incluindo entre eles o pico mais intenso do espectro. Em determinado momento, entre dois dos adutos, tem-se a diferença de 99 m/z , esse fato será melhor discutido posteriormente. O mesmo resultado foi visto para glicerol-d5, porem com diferença de m/z de 105. A Figura 15 coloca esses íons em destaque.

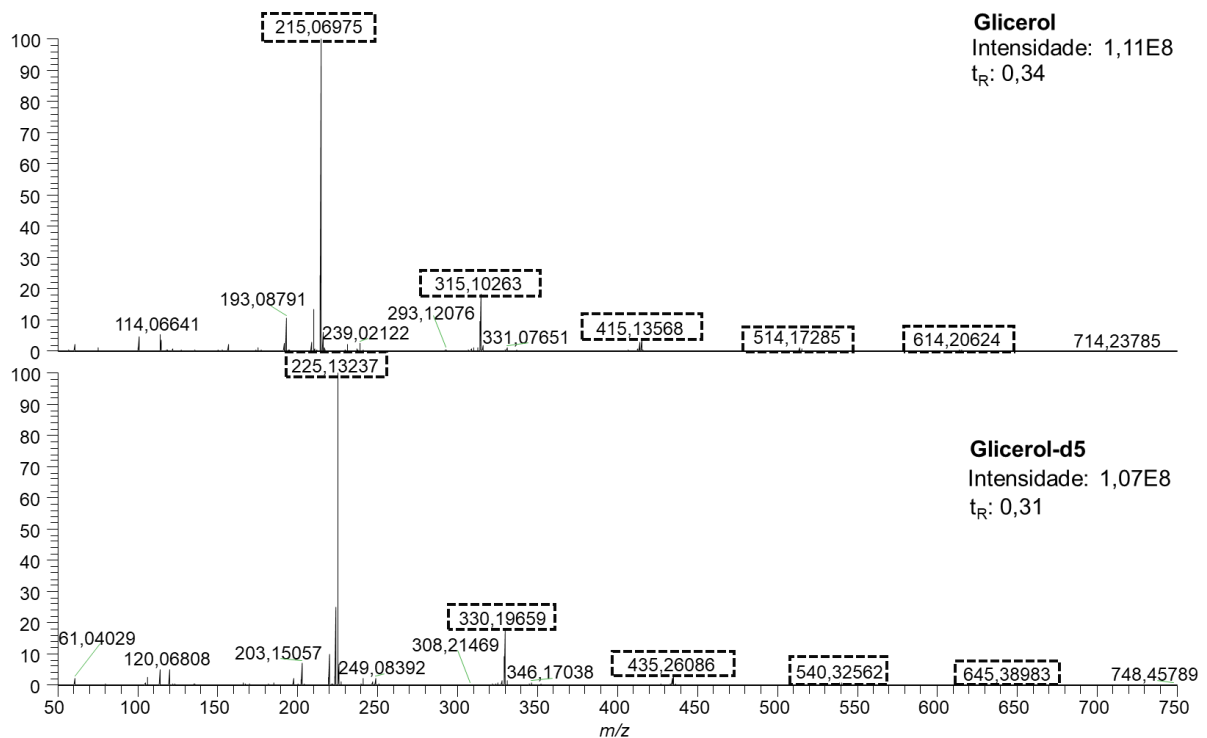


Figura 15. Espectro de massas de glicerol e glicerol-d5 no modo de varredura, com destaque para sinais que diferem em 100 m/z para glicerol e 105 para glicerol-d5.

Obs.: É visto que a diferença de m/z entre os sinais 415 e 514 não é de 100 e sim de 99. Esse fato será melhor discutido, posteriormente.

Outro ponto que chama atenção é que todos esses íons aparecem próximos a um íon com intensidade e m/z menores, caracterizando a presença de isótopo. Para a melhor visualização desse fato, foi realizada uma aproximação dessa região dos espectros (Figura 16) e através dela, percebe-se que a diferença de m/z entre os sinais é de cerca de uma unidade e além disso, a intensidade do íon de m/z 214 ou 224 equivale a cerca de 20% do íon mais intenso (m/z 215 ou 225).

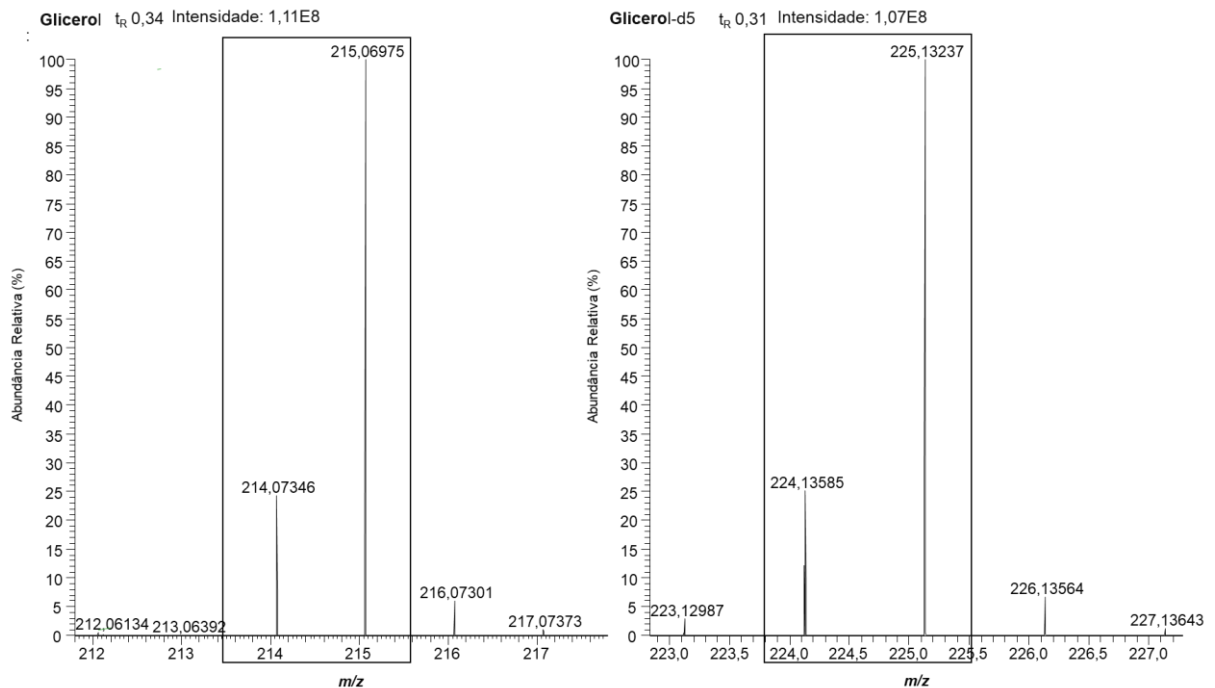


Figura 16. Aproximação do espectro de massas, de glicerol e glicerol-d5 na região de m/z 200-230, com destaque para picos característicos de isótopos.

Recorrendo-se, então, a uma tabela de distribuição isotópica, que pode ser encontrada no Anexo I, vê-se que o único elemento que apresenta tais características é o Boro, considerando a abundância relativa dos elementos. Ele possui apenas um isótopo; a abundância relativa entre os átomos é de 20:80; a diferença de massa entre eles é de uma unidade; o isótopo mais abundante é o de maior massa. Entende-se, por consequência, que o elemento boro está presente na espécie formada.

Na tentativa de elucidar a composição elementar e possivelmente as estruturas das espécies geradas, percebeu-se que os íons mais intensos dos espectros do glicerol e glicerol-d5 (A1 e A2), vistos na Figura 17, diferem em 10 unidades de massa, e como a massa da molécula de glicerol-d5 é maior que a de glicerol em cinco unidades, entende-se que a estrutura dos íons mais abundantes contém 2 moléculas de glicerol/glicerol-d5. Os próximos sinais mais abundantes nos espectros, picos B1 e B2 e C1 e C2, tem diferença de massa de 15 e 20 unidades respectivamente, e assim ocorre de maneira sucessiva. Isso significa que a cada íon uma molécula de glicerol/glicerol-d5 é acrescentada, formando uma espécie em série.

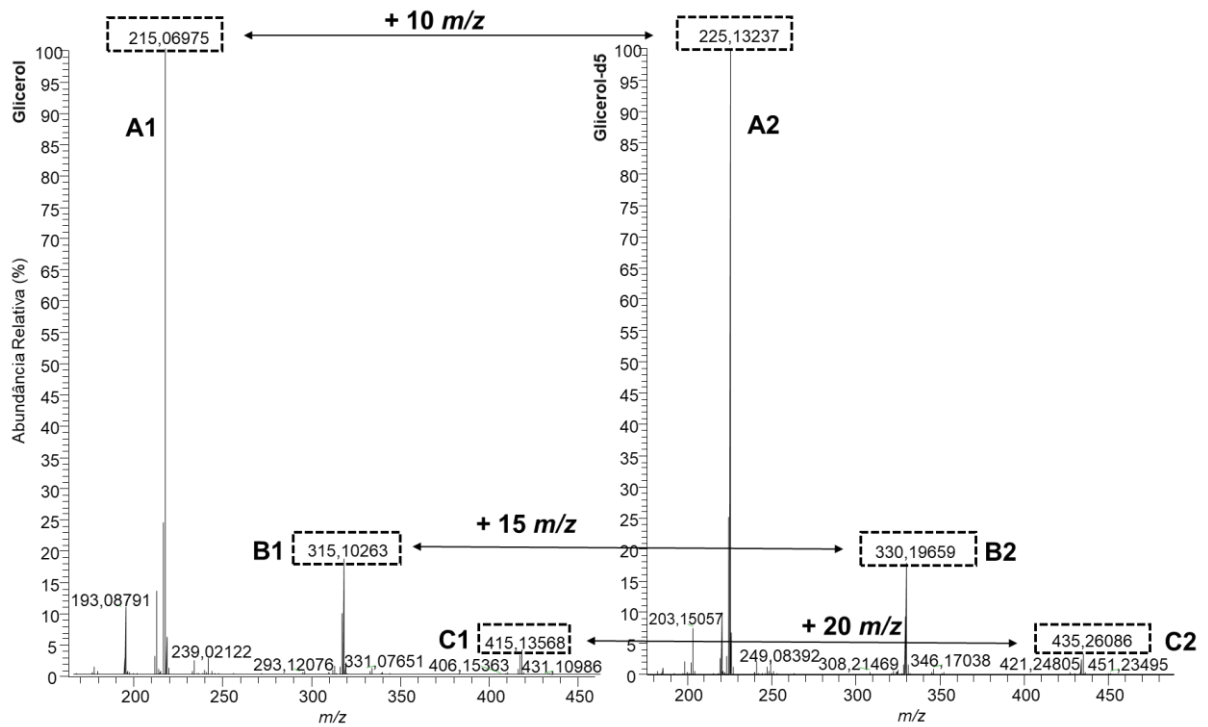


Figura 17. Espectros de massas, de glicerol e glicerol-d5, com destaque para a diferença de massa entre os picos representantes da série com boro.

Em posse de todas essas informações, foram propostas estruturas que correspondessem as massas dos íons (Figura 18). Foram também calculados os erros relativos em comparação com a massa exata, que por serem baixos, confirmam a composição elemental das espécies (Tabela 4).

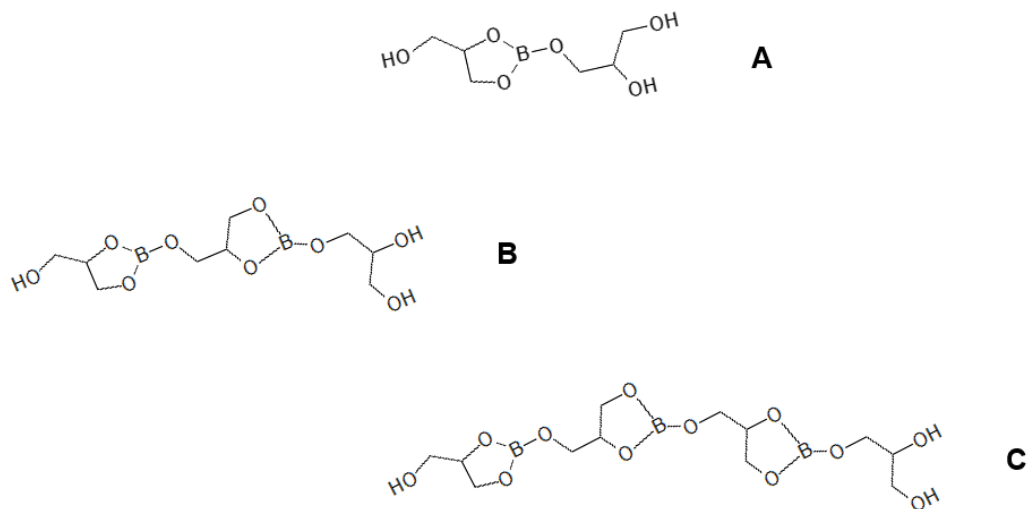


Figura 18. Proposta de estruturas para as espécies formadas, onde A, B e C referem-se ao primeiro, segundo e terceiro componente da série, respectivamente.

Tabela 4. Erro relativo entre as massas experimental e exata de algumas das espécies da série.

Íon	Massa exata		Massa Experimental		Erro Relativo (ppm)	
	Glicerol	Glicerol-d5	Glicerol	Glicerol-d5	Glicerol	Glicerol-d5
[A+Na] ⁺	215,06974	225,13251	215,06975	225,13237	0,046496546	0,62185599
[B+Na] ⁺	315,10291	330,19707	315,10263	330,19659	0,888598585	1,453677345
[C+Na] ⁺	415,13609	435,26162	415,13568	435,26086	0,987627937	1,746076302

As energias de tensão dos anéis de cinco, seis e sete membros são bem pequenas. E na medida em que essa tensão do anel afeta de forma semelhante a taxa de ciclização, espera-se que a taxa de formação de anéis de 5 e 6 membros seja bastante semelhante (NORMAN; COXON, 1993). Porém, a informação acima não leva em consideração o fator de entropia. O termo entrópico é menos favorecido na formação de anéis de seis do que de cinco membros e a menos que haja um fator significativo de tensão envolvida na formação do anel de cinco membros, ele será formado mais rapidamente. Por este motivo, as estruturas foram propostas com a formação de anéis de 5 e não de 6 membros, (OUELLETTE; RAWN, 2014).

A literatura apresenta a existência de uma molécula com os mesmos tipos de ligações que aqui foram propostos (Figura 19). Ela é nomeada como borato de glicerol (*Glycerol Borate*). Por esse motivo, as estruturas A, B e C mostradas na Figura 18, são tratadas como cadeias de boratos de glicerol.

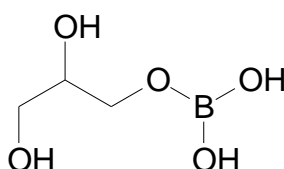


Figura 19. Estrutura do borato de glicerol (Fonte: Chemical Book – Glycerol Borate)

Outro ponto a ser destacado, é a presença de novos sinais com a diferença de 1 unidade de m/z , à medida que o tamanho da cadeia aumenta, ou seja, quando o número de átomos de boro aumenta. A Figura 20 mostra a aproximação das regiões do espectro do glicerol, onde são vistos os membros da série. Na figura, de a até f tem-se os sinais correspondentes aos componentes da série em ordem crescente. É possível ver na Figura 20a, em que há ampliação de 311-319 m/z , a presença de 3 sinais. Acredita-se que o mais intenso (m/z 315), represente o íon quando os dois boros presentes são de massa 11, o de m/z 314 se refere a espécie em que um dos boros é o de massa 11 e o outro o de massa 10 e o de m/z 313 é

aquele em que os dois boro são de massa 10. Assim também é visto nas espécies maiores.

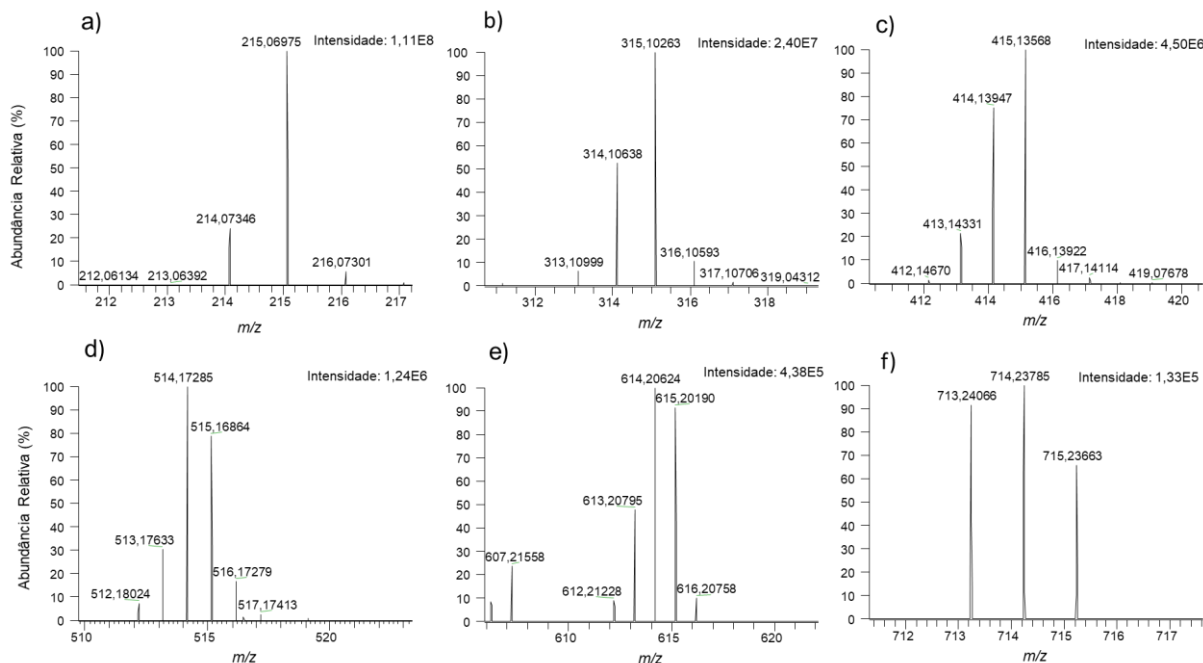


Figura 20. Ampliação das regiões do espectro do glicerol, onde são vistos de a até f de forma crescente, os sinais correspondentes aos membros da série de borato de glicerol.

Embora não se saiba exatamente o motivo, é visto que conforme a cadeia cresce, os íons que contém isótopos de boro menos abundantes na natureza se tornam mais intensos. Inclusive, no momento em que a série passa a ser composta por 4 moléculas de glicerol e 3 átomos de boro (Figura 20d), tem-se como pico mais intenso, aquele em que um dos átomos de boro é o de massa 10 (m/z 514) e não o que até o momento havia apresentado sempre maior intensidade, aquele com todos os boro de massa 11. Por esse motivo, observou-se no espectro do glicerol na Figura 15, a diferença de aproximadamente 99 m/z entre os sinais 415 e 514 citada anteriormente e não de 100, como se esperaria. Supõe-se que essa inversão na intensidade esteja ligada a conceitos relacionados a força das ligações que mantenham a cadeia com isótopos de boro 10 sendo favorecidos.

Acredita-se ainda que o pico de m/z 216, 316, 416 e assim por diante se refira ao íon em que um dos carbonos é o de massa 13, o menos abundante dos isótopos do carbono.

Levando em consideração o fato de que os possíveis alvos com m/z inferiores a 100 não são formados, passou-se a utilizar o método de triagem do laboratório na

íntegra, ou seja, com modo de varredura na faixa de 100-800 m/z , já que um dos objetivos é avaliar a possibilidade da inserção do glicerol no grupo de moléculas detectadas pelo procedimento descrito em Sardela *et al*, 2018.

4.2 Investigação da possível fonte do átomo presente na nova espécie formada

Tendo em vista que espécies contendo boro foram formadas, questionou-se a respeito da fonte desse elemento. Sabendo que o vidro utilizado nos tubos de ensaio, frascos de armazenamento de soluções, e outras vidrarias do laboratório são de borosilicato, é possível que os átomos de Boro estejam sendo capturados desses materiais.

A seguir (Figura 21) são apresentados os espectros de massas referentes as amostras preparadas nos materiais de vidro e plástico.

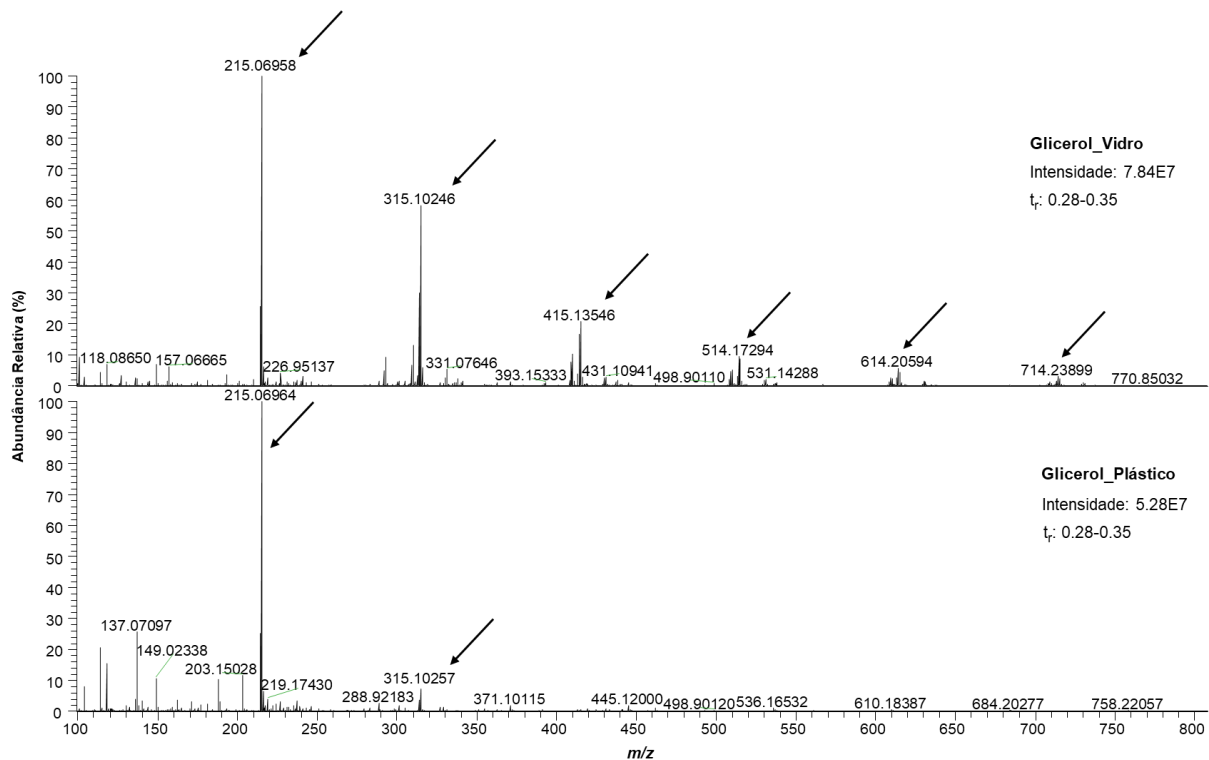


Figura 21. Espectro de varredura de massas (100-800 m/z) no modo positivo de ionização das soluções de glicerol preparadas em material de vidro (a) e plástico (b).

De fato, pelo espectro de massas, é possível perceber que o material de plástico não favoreceu a formação dos boratos. Isso porque, embora o íon de m/z 215 tenha apresentado a mesma intensidade, isso não ocorreu para os demais íons. Para eles, as intensidades foram bem mais baixas no espectro referente as soluções

preparadas em material de plástico, indicando que possivelmente a quantidade de boro no meio não foi suficiente para a formação das espécies com cadeias maiores.

O mesmo pode ser visto através da diferença nas áreas dos picos cromatográficos referentes a glicerol, com tempo de retenção de 0,35 min. Percebe-se que o pico da Figura 22a, referente ao preparo da solução em material de vidro tem área cerca de 3 vezes maior que a do material de plástico (Figura 22b).

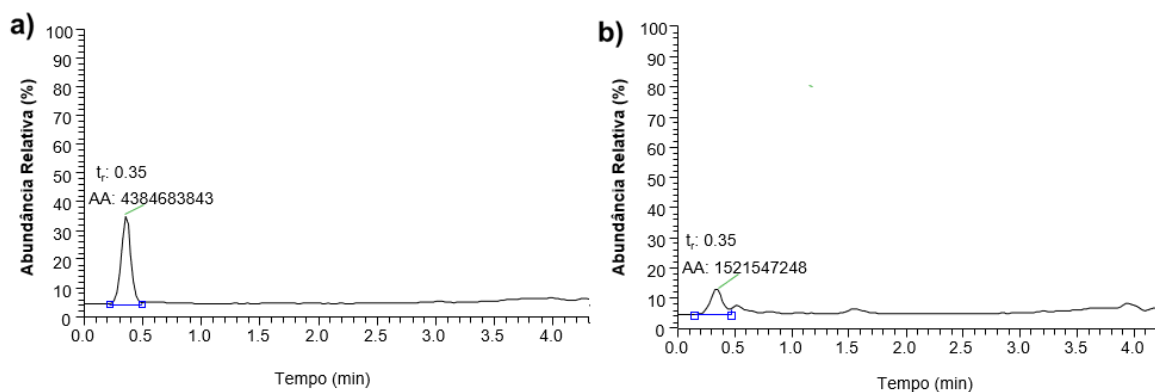


Figura 22. Picos cromatográficos das soluções de glicerol preparadas em material de vidro (a) plástico (b).

Mas independentemente disso, é fato que espécies boradas também foram formadas na amostra preparada em material plástico, e embora os demais componentes da série não tenham sido observados ou apresentaram-se em intensidade bem mais baixa (m/z 315), o íon m/z 215 apresentou intensidade da mesma ordem de grandeza em ambos os espectros. Acredita-se, então, que a captação do boro possa ter ocorrido durante o contato da solução com *insert* (material de vidro), mesmo a durabilidade deste evento sendo muito curta, já que os *vials* foram rapidamente levados para a injeção, ou que a extração tenha ocorrido dos frascos onde os componentes da fase móvel ficam armazenados, material este que não foi substituído por plástico.

Embora o frasco do padrão de glicerol obtido do fornecedor fosse de material plástico, por não se conhecer detalhes da produção desse padrão, não é possível garantir que em momento algum não tenha havido contato com material de borosilicato antes da chegada no laboratório, não se podendo afirmar que o procedimento foi integralmente livre da presença de boro.

O fato do íon de m/z 215 ser o mais intenso, e mesmo em condições desfavoráveis, manter essa intensidade, o torna um possível alvo analítico a ser monitorado na detecção do glicerol. Por isso, foi o escolhido para esse fim.

4.3 Investigação da tendência linear entre a concentração de glicerol e área do pico cromatográfico do alvo analítico escolhido

4.3.1 Considerações gerais

✓ Como o glicerol só era considerado *doping* a partir de determinada concentração, desejava-se que mesmo em procedimentos iniciais de análise, ou seja, de triagem, fosse possível estimar sua concentração a fim de que se pudesse selecionar os casos mais relevantes para a confirmação. Por esse motivo é que foi investigada a linearidade da curva referente a concentração de glicerol e a área do pico cromatográfico correspondente a massa exata do analito.

✓ Todas as tabelas com os respectivos valores de concentração e área do pico cromatográfico do alvo analítico encontram-se no Apêndice A. Nelas, é visto que para alguns pontos, não foram obtidas áreas para algumas das replicatas, pois nestes casos, os picos não foram gerados, refletindo a não ionização da molécula. Ainda assim, as curvas foram geradas, sem esses valores, tratando-os como aberrantes.

✓ Os procedimentos realizados nesta etapa, bem como a interpretação de seus resultados, são frutos de uma investigação a respeito do comportamento e efeitos sofridos pelos adutos formados.

4.3.2 Avaliação dos parâmetros que afetam a linearidade da curva de calibração do glicerol descritos na Tabela 2.

A avaliação dos resultados obtidos nos procedimentos descritos na Tabela 2 foi realizada em função da linearidade. A linearidade de um método é evidenciada quando a resposta analítica é diretamente proporcional a concentração do analito. Uma forma de avaliar essa associação linear entre as variáveis, é através do modelo de regressão linear, por meio do coeficiente de determinação (R^2). Quanto mais próximo de 1 está o R^2 , maior a linearidade. A resolução da ANVISA indica, inclusive, que o R^2 deve estar acima de 0,99 para que seja decretado o comportamento linear entre as variáveis (ANVISA - RDC N° 166, 2017).

Neste trabalho, optou-se por utilizar o R^2 para avaliar o efeito que a alteração de alguns parâmetros do procedimento causaria na relação entre as variáveis. Se tornaria ou não a curva mais linear, já que um dos objetivos era ter apenas uma estimativa da concentração nos procedimentos iniciais de análise. As concentrações escolhidas para a curva analítica foram determinadas baseado no limite de glicerol considerado dopagem pela AMA (4.3 mg.mL^{-1}), que deveria estar na metade da curva, e ao mesmo tempo pela necessidade de abranger também, o dobro deste limite.

Para o procedimento 3.5.1, onde todos os parâmetros normais do procedimento de “diluir e injetar” foram mantidos e utilizou-se faixa de tolerância de 6 ppm, obteve-se o seguinte resultado (Figura 23):

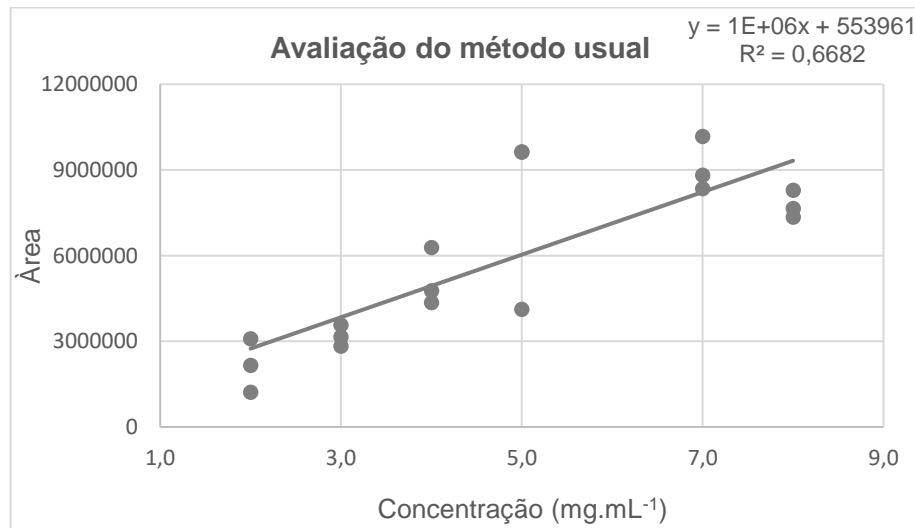


Figura 23. Avaliação da linearidade entre a resposta analítica e a concentração de glicerol utilizando os parâmetros usuais do método: matriz de urina e ácido acético 2% como solução de ressuspensão.

A falta de linearidade da curva acima, leva a tentativa de utilização da padronização interna, pois acredita-se que a oscilação na resposta analítica se deve a efeitos diversos, como a quantidade de boro captada, que seriam sofridos da mesma forma pelo PI. E desta maneira, o uso do glicerol-d5 (PI) compensaria esses efeitos, já que seria utilizada como variável a razão entre as áreas dos picos cromatográficos do analito e do PI.

Porém, antes da construção de nova curva analítica, a falta de homogeneidade entre as replicatas, levou a realização do procedimento 3.5.2, onde injetou-se por 5 vezes seguidas uma solução de glicerol a $4,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ que havia passado pelo procedimento de “diluir e injetar”.

Ao se buscar um pico cromatográfico referente a uma massa exata, tem-se para essa massa, uma certa tolerância de erro, que usualmente é de 6 ppm. Porém, devido à alta concentração de glicerol, acredita-se que o efeito do espelhamento da carga no espaço possa estar ocorrendo e, portanto, o aumento dessa faixa de erro, levaria a uma melhor detecção dos íons do analito. Isso porque o raio da órbita em que estes se encontram seria maior do que se esperaria devido à alta concentração.

Dessa forma, desejou-se saber qual faixa de tolerância na massa exata levaria ao menor coeficiente de variação, pois ele é uma forma de conhecer a variabilidade dos dados em relação à média, sem a influência da ordem de grandeza, como ocorre, no desvio padrão. Quanto menor é o CV, mais homogêneos são os dados. As tabelas com os valores das áreas em cada uma das tolerâncias utilizadas, bem como as médias e desvios padrão, encontram-se no Apêndice B.

O gráfico abaixo (Figura 24) mostra o comportamento do coeficiente de variação nas diferentes faixas de erro utilizadas para a busca da massa exata. Pode-se perceber uma queda brusca no CV entre os valores de 40 e 50 ppm, e em seguida, o valor se mantém praticamente constante. Passou-se então a realizar a busca pela massa exata com a tolerância de 50 ppm, pois valores maiores do que este, levaram a praticamente o mesmo valor de CV (%).

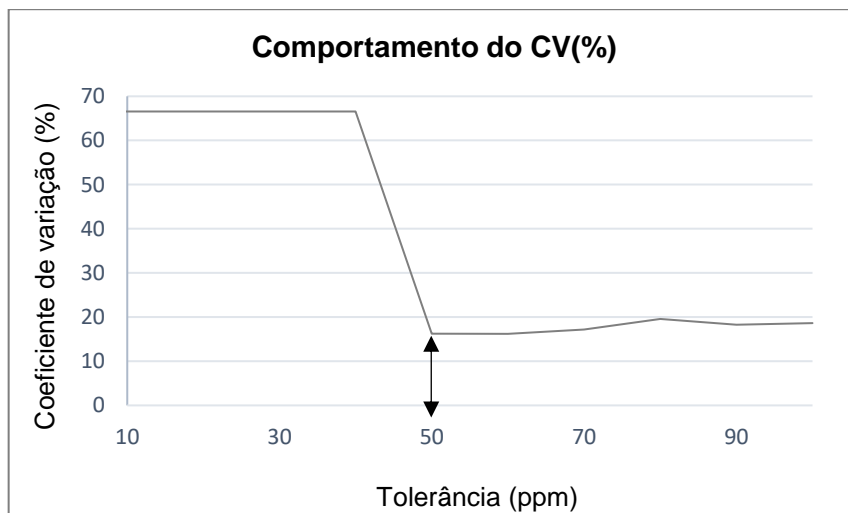


Figura 24. Avaliação do comportamento do CV (%) utilizando diferentes tolerâncias de erro na busca pelas massas exatas.

Realizando-se então nova curva analítica (procedimento 3.5.3), utilizando a razão entre as áreas dos picos cromatográficos do analito (m/z 215,06974) e do PI (m/z 225,13251), foi obtido o gráfico apresentado na Figura 25:

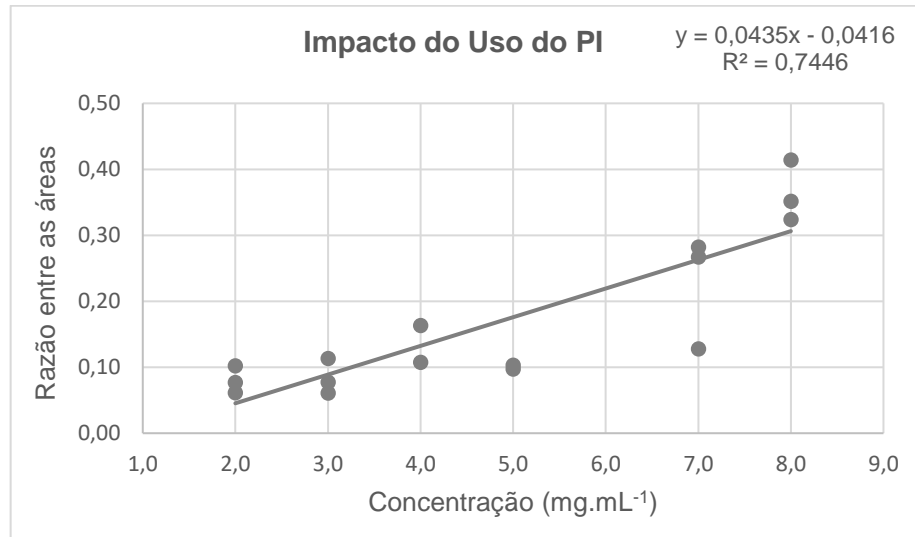


Figura 25. Avaliação do impacto do uso do PI na linearidade da curva, utilizando matriz de urina e solução de ácido acético 2% com glicerol-d5 a 2,5 mg.mL⁻¹ (PI) como solução de ressuspensão.

A utilização do PI, bem como o aumento na tolerância de massa utilizada, representou um aumento no valor do coeficiente de determinação, mas ainda assim, não se pode dizer que há linearidade entre as variáveis.

A diferença entre os procedimentos 3.5.3 e 3.5.4, é a utilização do quadrupolo como um filtro para as massas do analito e do PI. Desta maneira, em determinado momento, apenas os íons de m/z 215 e 225, analito e PI, respectivamente, chegariam ao *orbitrap*, e com isso o sinal dessas espécies é aumentado, o que significa que a relação sinal/ruído se torna maior, e do ponto de vista visual, a diferenciação entre o analito e possíveis interferentes é facilitada. O resultado é visto na Figura 26.

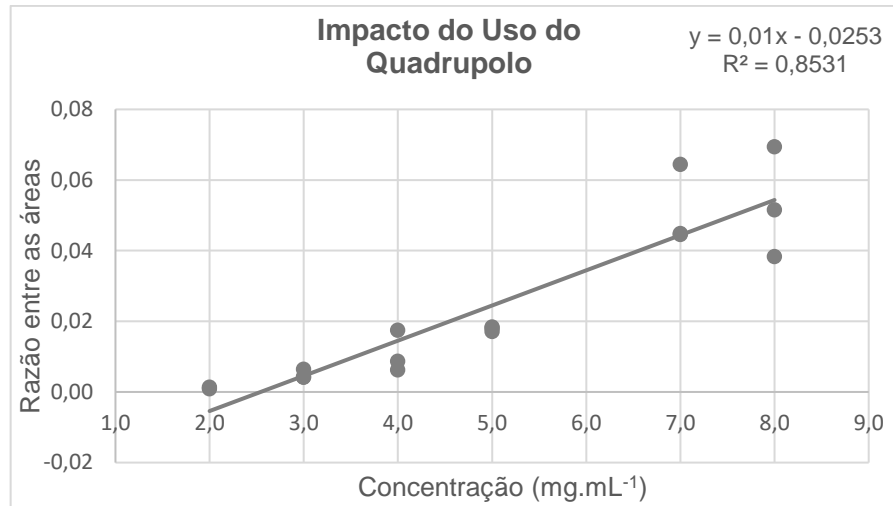


Figura 26. Avaliação do impacto da utilização do quadrupolo como filtro de massas na associação linear entre as variáveis, utilizando matriz de urina e solução de ácido acético 2% com glicerol-d5 a 2,5 mg.mL⁻¹ (PI) como solução de ressuspensão.

Mesmo com a utilização do quadrupolo, não foi alcançada a linearidade esperada. Com isso, sua utilização não mostrou vantagem que compensasse a continuidade do seu uso, já que isso tornaria o método mais específico, porém simultaneamente mais lento para o monitoramento dos demais compostos. Entretanto, algo que pode ser percebido no gráfico, é o maior espalhamento entre os pontos em concentrações mais altas, o que leva a crer que a quantidade de boro captada poderia não estar sendo suficiente, já que em concentrações mais elevadas, maior seria a quantidade de boro necessária. Por isso, embora não seja o procedimento usual do método, mas para fins de investigação, utilizou-se uma solução de ácido bórico 3% no lugar do ácido acético 2%, a fim de promover maior quantidade de boro no meio. Esse foi o procedimento 3.5.5 e seu resultado é apresentado abaixo (Figura 27).

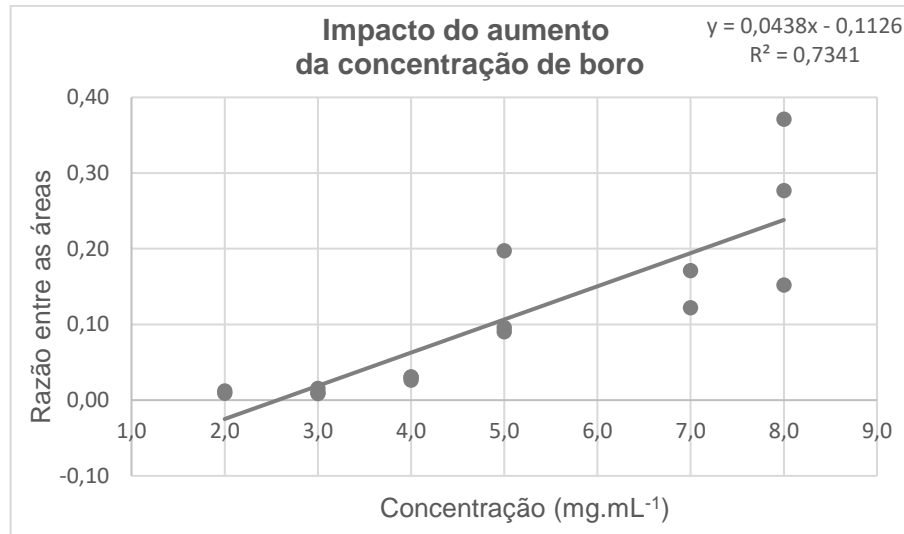


Figura 27. Avaliação do impacto do aumento da concentração de boro no meio, através da utilização de ácido bórico 3% com glicerol-d5 a 2,5 mg.mL⁻¹ (PI) como solução de ressuspensão e matriz de urina para as soluções de glicerol.

De fato, o gráfico acima mostra que a adição de boro não trouxe melhoria, e que possivelmente, a quantidade de boro no meio não é o que causa essa dispersão nos pontos.

Ainda assim, foi realizado um cálculo estequiométrico, a fim de determinar se a quantidade de Boro era suficiente. Considerando uma relação estequiométrica de aproximadamente 1,5 moléculas de glicerol/glicerol-d5 para 1 átomo de boro, viu-se que a quantidade de boro era cerca de 16 vezes maior do que a necessária para se ligar a todo o glicerol e glicerol d-5 presente no *vial* contendo a solução de maior concentração.

Porém, com esse experimento, concluiu-se apenas que mesmo em condições de excesso de boro, a linearidade ainda não é observada, mas não é possível dizer que nos procedimentos anteriores, a quantidade de boro tenha sido suficiente, já que isso é algo difícil de determinar devido às variáveis aleatórias. Em consequência disso, em alguns dos próximos procedimentos, manteve-se o uso de ácido bórico como solução de ressuspensão.

O próximo passo na investigação, foi a avaliação da influência que a matriz de urina estaria proporcionando nesta relação linear entre o pico do alvo analítico e a concentração de glicerol, já que devido a sua complexidade, era grande a possibilidade de ocorrência de supressão iônica. Isso porque diversas são as substâncias polares presentes na urina que poderiam eluir junto com o glicerol.

Desta forma, foi realizado o procedimento 3.5.6, onde utilizou-se soluções de glicerol em água e seu resultado é visto na Figura 28. Observa-se que há certa influência da matriz, pois visualmente já é notada uma distribuição mais linear dos pontos, o que é corroborado pelo aumento no coeficiente de determinação, tendo este um valor próximo de quando foi utilizado o quadrupolo como filtro, o que de certa forma também tornou o meio mais “limpo”.

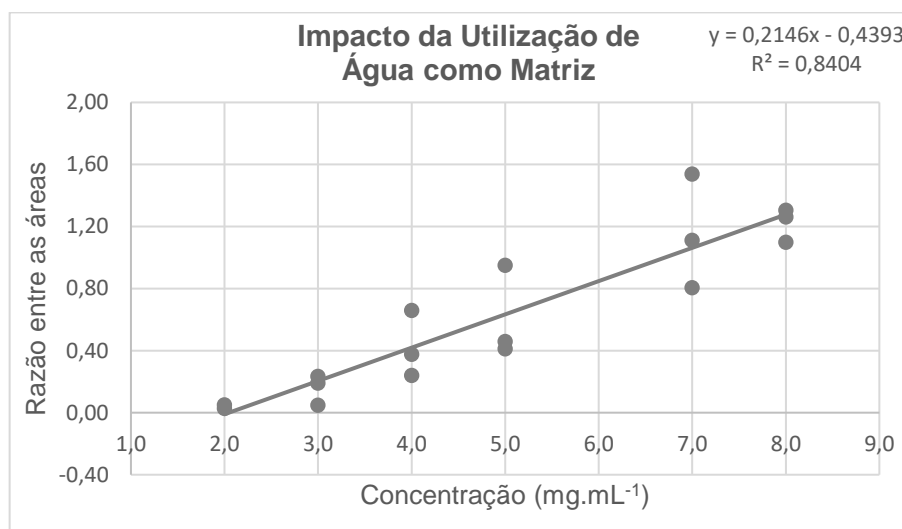


Figura 28. Avaliação do impacto da utilização de água como matriz das soluções de glicerol, com a utilização de ácido bórico 3% com glicerol-d5 a 2,5 mg.mL⁻¹(PI) como solução de ressuspensão.

Embora tenha havido melhoria, ainda não se encontra uma associação de fato linear. Diante de todos os resultados até então, foi cogitada a possibilidade da reação não estar ocorrendo de forma completa, e possivelmente o glicerol estivesse se dividindo em mais de um aduto. E embora, nos resultados iniciais, a intensidade do pico referente ao aduto com sódio ($[M+Na]^+$) tenha apresentado baixa intensidade, optou-se por buscar, também, por esse íon e avaliar, assim, a linearidade.

Além disso, algo que ainda não havia sido investigado e está diretamente relacionado com o equilíbrio químico, é o efeito da temperatura. Parâmetro esse, que influencia a maioria das reações químicas. Desta forma, no procedimento 3.5.7, manteve-se a água como matriz, a solução de ácido bórico para a diluição, e foi feito o aquecimento, a fim de que com o aumento do grau de agitação das moléculas, fosse proporcionado um “encontro” mais efetivo entre elas, levando a maior interação. A temperatura de 50 °C foi utilizada, pois no procedimento descrito em Sardela *et al*, 2018, a hidrólise da fração da amostra que passa pela extração em

fase sólida, ocorre nesta temperatura. Como resultado, percebe-se na Figura 29 que o aumento da temperatura promoveu o deslocamento do equilíbrio, favorecendo a formação das espécies boradas e aumentando de forma significativa o valor do coeficiente de determinação.

Também é visto que o glicerol se divide em mais de um aduto, pois a molécula sodiada foi formada e apresentou tendência à linearidade com a concentração de glicerol, sendo, portanto, um possível alvo analítico a ser monitorado (Figura 30).

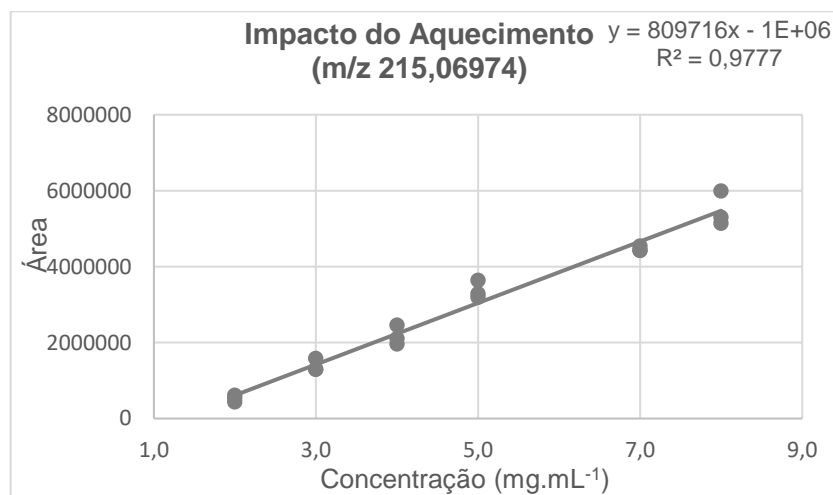


Figura 29. Avaliação do impacto do aquecimento na linearidade entre as variáveis para o analito de m/z 215,06974, com a utilização de ácido bórico 3% como solução de ressuspensão, água como matriz para as soluções de glicerol e aquecimento a 50 °C por 30 min.

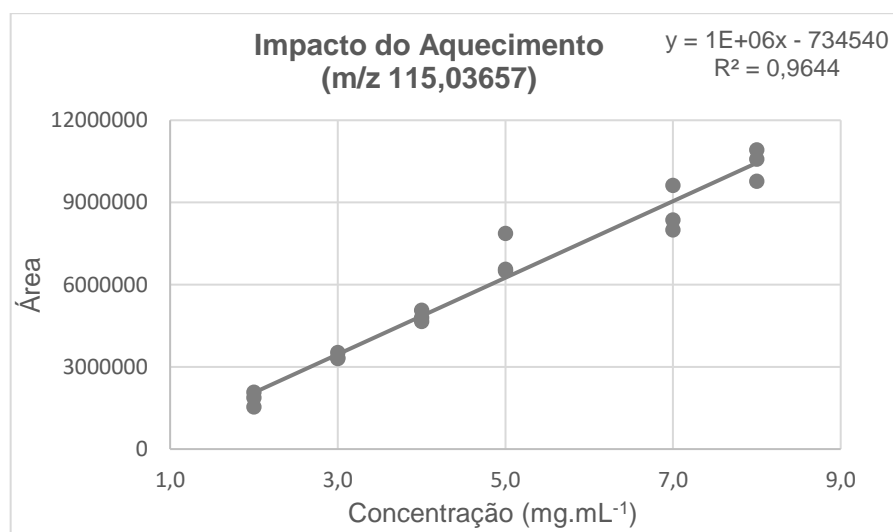


Figura 30. Avaliação do impacto do aquecimento na linearidade entre as variáveis para o analito de m/z 115,03657, com a utilização de ácido bórico 3% como solução de ressuspensão, água como matriz para as soluções de glicerol e aquecimento a 50 °C por 30 min.

Partindo do princípio de que o aquecimento, pode ter sido o principal fator responsável pelo aumento do coeficiente de determinação, e conseqüentemente, da linearidade, realizou-se o procedimento 3.5.8, utilizando novamente matriz de urina e mantendo o aquecimento e a solução de ácido bórico 3%. Segue o resultado para os dois alvos analíticos: o primeiro membro da série de borato de glicerol (Figura 31) e o glicerol sodiado (Figura 32).

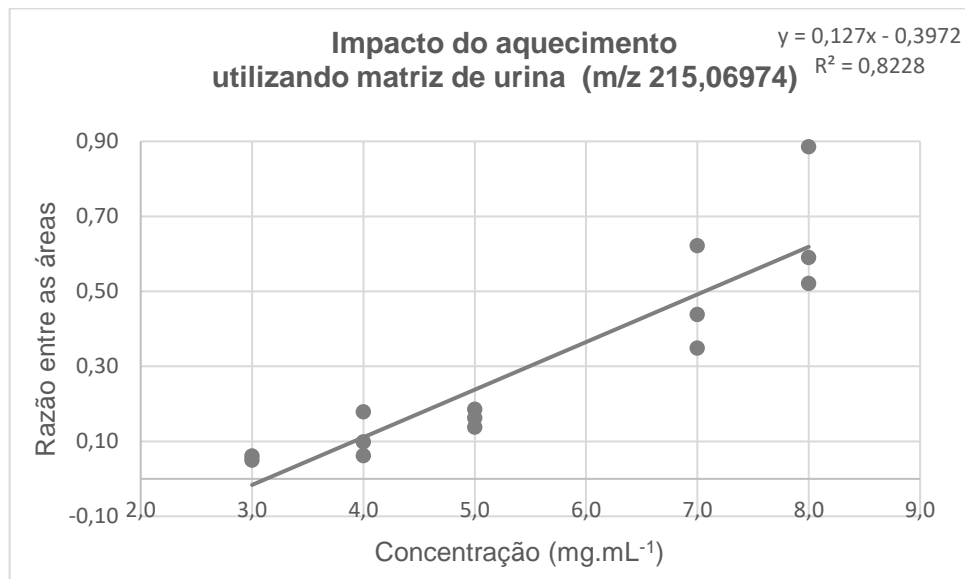


Figura 31. Avaliação do impacto do aquecimento na linearidade da curva, para o analito de m/z 215,06974 com a utilização de urina como matriz para as soluções de glicerol, ácido bórico 3% com glicerol-d5 a 2,5 mg.mL⁻¹ (PI) como solução de ressuspensão e aquecimento a 50 °C por 30 min.

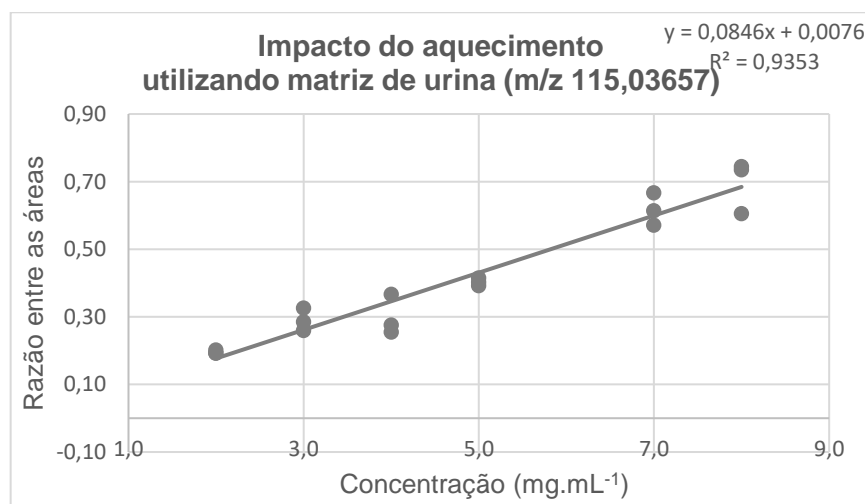


Figura 32. Avaliação do impacto do aquecimento na linearidade da curva, para o analito de m/z 115,03657 com a utilização de urina como matriz para as soluções de glicerol, ácido bórico 3% com glicerol-d5 a 2,5 mg.mL⁻¹ (PI) como solução de ressuspensão e aquecimento a 50 °C por 30 min.

É possível perceber que o aduto com sódio apresenta maior tendência a linearidade, mesmo em matriz de urina, se mostrando um alvo mais eficiente na detecção do glicerol, embora o valor do R^2 ainda não seja adequado para quantificação.

Esses resultados, mostrando a presença da espécie sodiada de forma constante, fez com que se observasse de forma detalhada o espectro de massas, a fim de se encontrar outras possíveis espécies anteriormente não vistas.

Percebeu-se então, a presença de dois sinais representantes do primeiro e segundo componentes da série borada, porém não utilizando o sódio como aduto, mas sim, na forma protonada. Esses picos encontram-se destacados tanto para glicerol, como para glicerol-d5 na Figura 33.

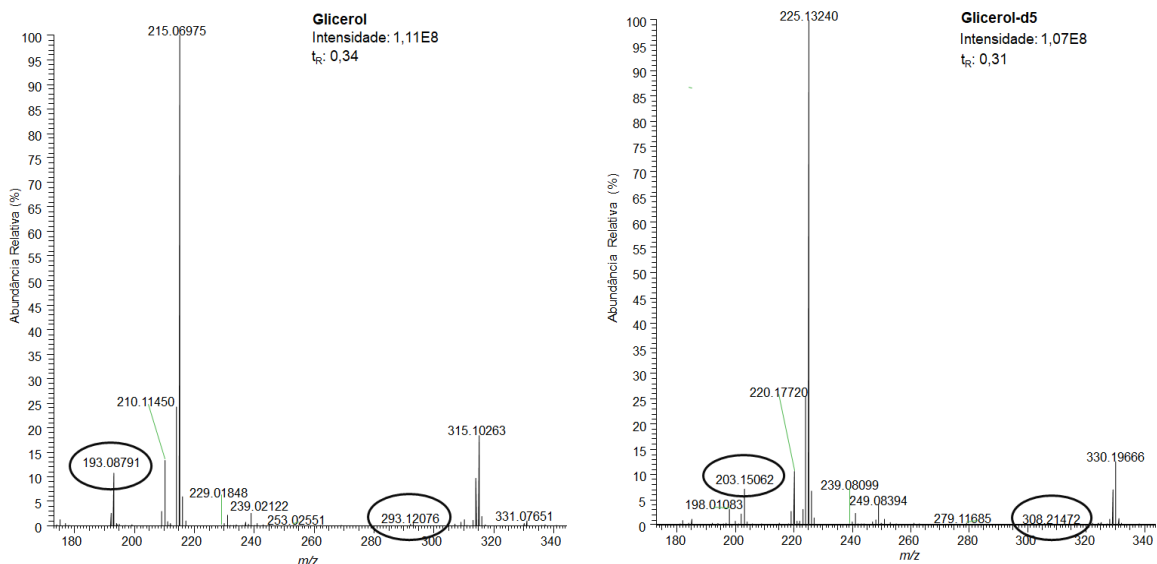


Figura 33. Espectros de Massas de glicerol e glicerol-d5 com destaque para os dois primeiros componentes da série borada, em suas formas protonadas.

Confirma-se a ocorrência dessas espécies pelos baixos valores de erros relativos, encontrados na Tabela 5. Mas embora essas espécies existam, suas intensidades são baixas e os demais componentes da série nem são observados.

Um outro fator importante, já que novas espécies foram encontradas, é que inicialmente foi vista a ionização do glicerol no modo negativo. Mas como ainda não se conhecia a possibilidade de ligação do glicerol com o boro, e o ânion comumente esperado, que seria a molécula desprotonada não se apresentava no espectro, não se tinha informação alguma para que uma investigação fosse feita, até porque nas referências consultadas o modo negativo não é analisado.

Contudo, diante da descoberta das espécies boradas, verificou-se no modo negativo do espectro de massas de glicerol/glicerol-d5, que os picos de maior intensidade apresentavam m/z de aproximadamente 191 e 201, respectivamente. Esse resultado é visto na Figura 34.

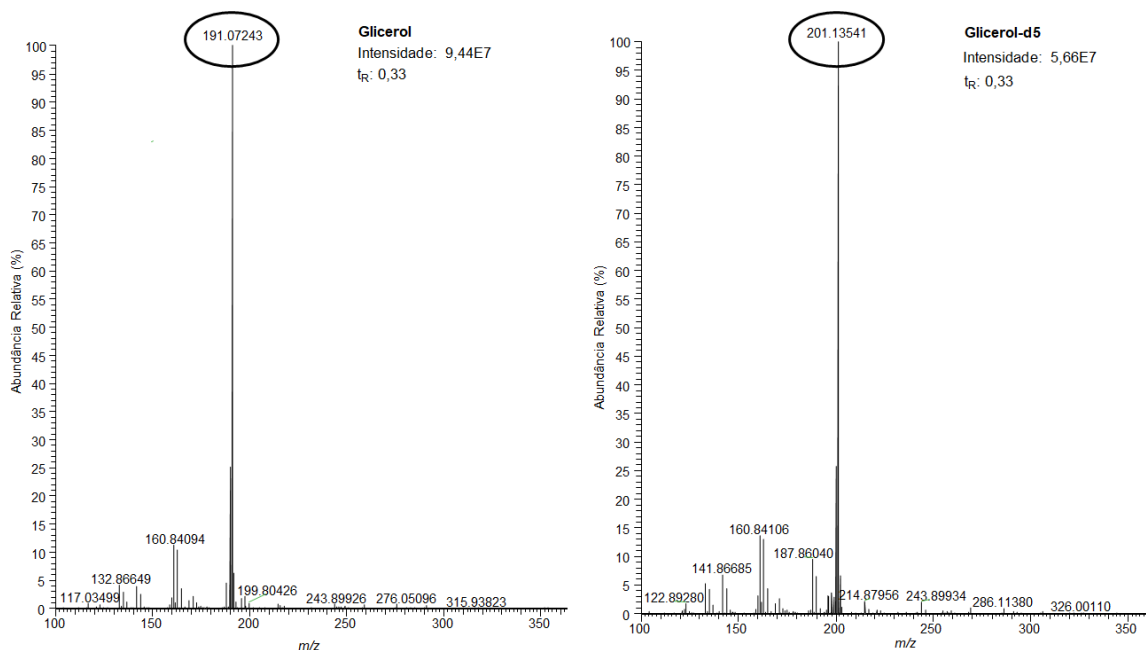


Figura 34. Espectros de Massas, no modo negativo, de glicerol e glicerol-d5, com destaque para o primeiro componente da série borada, em sua forma desprotonada.

A diferença entre os sinais é justamente de 10 m/z , assim como ocorreu nas espécies boradas na forma de aduto com sódio. Percebeu-se então, que se tratava do primeiro componente da série com o boro, porém com as moléculas desprotonadas. Também para essas espécies tem-se correspondência entre as massas experimentais e teóricas, vista na Tabela 5.

Tabela 5. Erro relativo entre as massas experimental e exata de algumas das espécies.

Íon	Massa exata		Massa Experimental		Erro Relativo (ppm)	
	Glicerol	Glicerol-d5	Glicerol	Glicerol-d5	Glicerol	Glicerol-d5
[A+H] ⁺	193,0878	203,15056	193,08791	203,15062	0,569689022	0,295347451
[B+H] ⁺	293,12097	308,21512	293,12076	308,21472	0,71642776	1,297794865
[A-H] ⁻	191,07215	201,13491	191,07243	201,13541	1,465415028	2,485893672

Por apresentar alta intensidade, optou-se por buscar a massa exata das espécies desprotonadas, nos resultados do procedimento 3.5.8, com o intuito de

verificar se este seria mais um possível alvo analítico para a detecção do glicerol. No gráfico abaixo (Figura 35), onde o resultado é apresentado, vê-se uma tendência linear entre esse alvo analítico e a concentração de glicerol.

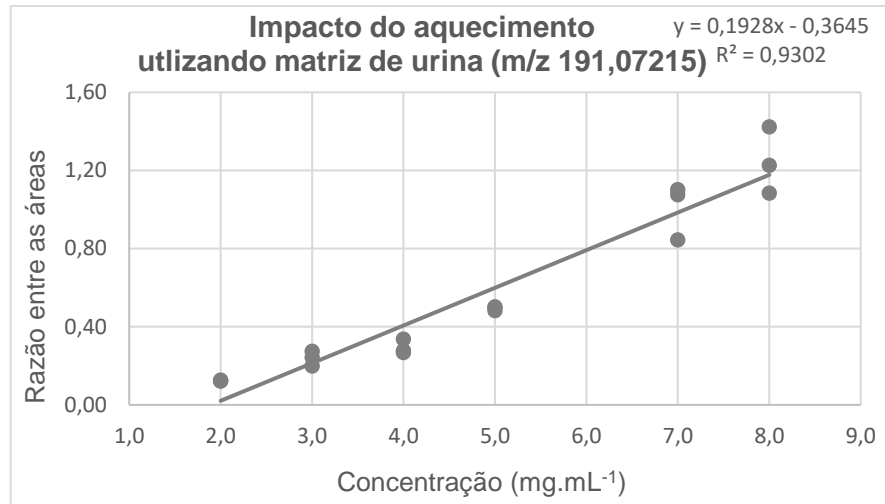


Figura 35. Avaliação do impacto do aquecimento na linearidade da curva, para o analito de m/z 191,07215 com a utilização de urina como matriz para as soluções de glicerol, ácido bórico 3% com glicerol-d5 a 2,5 mg.mL⁻¹(PI) como solução de ressuspensão e aquecimento a 50 °C por 30 min.

Por consequência, buscou-se nos resultados do experimento 3.5.3, onde se utiliza os parâmetros comuns do método descrito em Sardela *et al*, 2018, a massa dessa espécie (m/z 191,07215) e também do íon apenas sodiado (m/z 115,03657), o que ainda não havia sido realizado, obtendo-se o valor das áreas de seus picos cromatográficos. Buscou-se também pelas massas dos respectivos alvos no PI e construiu-se, então, os gráficos que se encontram abaixo (Figura 36 e Figura 37).

Obs.: Para este mesmo procedimento, com a espécie de m/z 215, o coeficiente de determinação foi de 0,7446.

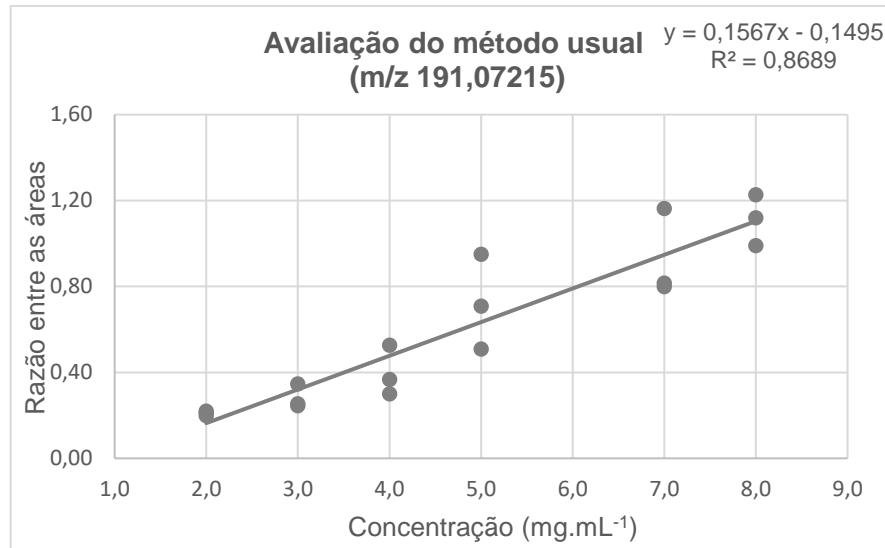


Figura 36. Avaliação da linearidade entre a resposta analítica do íon m/z 191,07215 e a concentração de glicerol, utilizando matriz de urina e solução de ácido acético 2% com glicerol-d5 a 2,5 mg.mL⁻¹ (PI) como solução de ressuspensão.

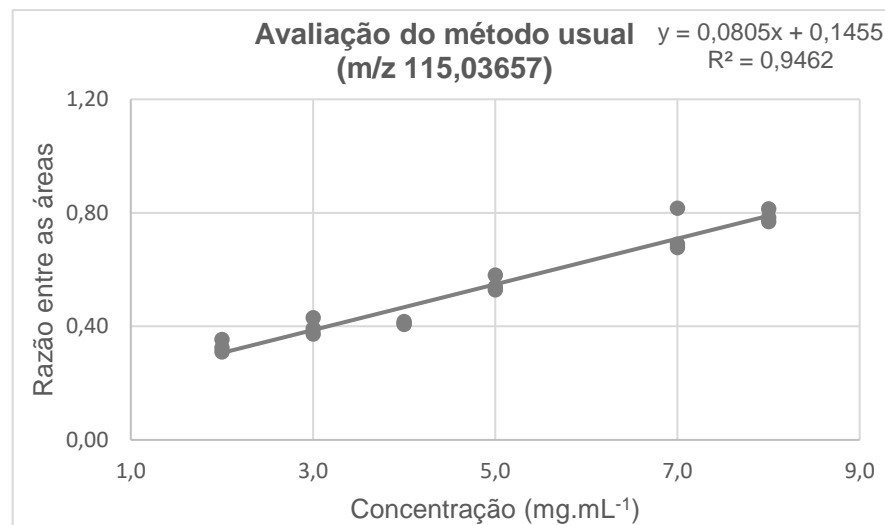


Figura 37. Avaliação da linearidade entre a resposta analítica do íon m/z 115,03657 e a concentração de glicerol, utilizando matriz de urina e solução de ácido acético 2% com glicerol-d5 a 2,5 mg.mL⁻¹ (PI) como solução de ressuspensão.

Pelos resultados, é visto que o aduto de glicerol com sódio é o alvo analítico que melhor apresenta associação linear com a concentração de glicerol, no método já utilizado no LBCD. Porém, a linearidade exigida pela ANVISA, ainda assim não foi alcançada.

5 Conclusão

Dos alvos comumente monitorados (glicerol protonado, desprotonado, o aduto com sódio e o aduto com potássio), apenas o glicerol sodiado pode ser utilizado como alvo para a detecção do glicerol nas condições dos procedimentos iniciais de análise utilizados no laboratório de controle antidopagem e descritos em Sardela *et al*, 2018.

Foram encontradas novas espécies geradas a partir do glicerol. Tratam-se de aglomerados em série formados por este tri-álcool e átomos de boro, nas formas protonada, desprotonada e o aduto com sódio. A composição molecular dessas espécies foi elucidada, sendo o erro relativo encontrado entre a massa experimental obtida e a massa exata delas, abaixo de 2,5 ppm em todos os casos. Desta forma, possíveis estruturas também foram propostas.

Entre os boratos, os que podem ser utilizadas como alvos para o monitoramento do glicerol são os primeiros componentes da série em suas formas de aduto com sódio e desprotonada.

Contudo, nenhum desses alvos apresentou resposta analítica suficientemente linear em relação a concentração de glicerol. Portanto, do ponto de vista quantitativo, a análise de glicerol por cromatografia líquida em fase reversa é um desafio. Qualitativamente, sua detecção é possível, desde que as diversas espécies em que essa molécula pode se converter sejam monitoradas.

6 Perspectivas Futuras

Possível elucidação das estruturas dos boratos formados, através da técnica de ressonância magnética nuclear.

Parceria com laboratório de técnicas computacionais, para que com cálculo de energia molecular, seja possível definir se os anéis formados são realmente de cinco membros, ou de seis.

Publicação de artigo científico relatando a formação de aglomerados em série entre moléculas de glicerol e átomos boro, anteriormente não vista.

7 Referências

ANTIGNAC J. P. *et al.* **The ion suppression phenomenon in liquid chromatography–mass spectrometry and its consequences in the field of residue analysis.** *Journal of Chromatography B.* 529: 129, 2005

ANVISA - **RDC N° 166, 2017.** Disponível em:
http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401. Acesso em: 10 abr. 2018

AQUINO NETO, F. R., **O papel do atleta na sociedade e o controle de dopagem no esporte**, *Revista brasileira de medicina no esporte*, v. 7, n. 4, p. 138-148, 2001.

AZEVEDO, D. A., **Espectrometria de massas** (apostila), Universidade Federal do Rio de Janeiro 105 f., 2004.

BEATRIZ, A.; ARAÚJO, Y. J. K.; DE LIMA, D. P. **Glicerol**: um breve histórico e aplicação em sínteses estereosseletivas. *Química Nova*, v. 34, n. 2, p. 306-319, 2011.

BENTO, R. M. A., DAMASCENO, L. M. P., AQUINO NETO, F. R., **Eritropoetina humana recombinante no esporte: uma revisão**, *Revista Brasileira de Medicina no Esporte*, v. 9, n. 3, p. 169-180, 2003.

Chemical Book - Glycerol Borate. Disponível em:
http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB6511810.htm. Acesso em: 10 dez. 2018.

CHIARADIA, M. C., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F., **O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos**, *Química Nova*, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.

DEVENTER, K.; VAN EENOO, P. **Screening and confirmation of a glycerol-positive case.** *Drug Testing and Analysis*, v. 7, p. 1009-1013, 2015.

DONG, Y *et al.*, **Quantitative analysis of glycerol levels in human urine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry**, *Journal of Chromatography B*, V. 957, p. 30-35, 2014.

HARRIS, D. C., **Quantitative Chemical Analysis**, 8 ed., New York: W. H. Freeman and Company, 2010.

IGLESIAS, A. H., **Introdução ao Acoplamento Cromatografia Líquida – Espectrometria de Massas.** *In*: Encontro Nacional sobre Metodologia e Gestão de Laboratórios da Embrapa, Pirassununga, 2012. Disponível em:
<http://www.cnpsa.embrapa.br/met/images/arquivos/17MET/minicursos/minicursoama-deu-iglesias.pdf>. Acesso em: 18 mar. 2018.

JONES, M., PEDOE, D. S. T., **Blood doping - a literature review**, Br. J. Sp. Med., v. 23, n. 2, p. 84-88, 1989.

KOEHLER, K., THEVIS, M., SCHAEZNER, W. **Meta-analysis**: Effects of glycerol administration on plasma volume, haemoglobin, and haematocrit. Drug Test. Anal., v. 5, 896-899, 2013.

LANÇAS, F. M., **A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”?**, Scientia Chromatographica, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009.

MAKAROV, A., SCIGELOVA, M., **Coupling liquid chromatography to Orbitrap mass spectrometry**, Alemanha, Journal of Chromatography A, v. 1217, p. 3938–3945, 2010.

MCINTOSH, T. S., DAVIS H. M., MATTHEWS D. E., A Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Method to Measure Stable Isotopic Tracer Enrichments of Glycerol and Glucose in Human Serum, Analytical Biochemistry, v. **300**, p. 163–169, 2002.

MORAES, M. C. B., LAGO, C. L. DO, **Espectrometria de massas com ionização por “electrospray” aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas**, Química Nova, v. 26, n. 4, p. 556-563, 2003.

MOTA, C.J.A; PINTO, B. P.; DE LIMA, A. L. **Glycerol**: A versatile Renewable Feedstock for the Chemical Industry. 1. ed. Switzerland: Springer, 110 p., 2017.

NELSON M. D., DOLAN J. W., **Ion Suppression in LC-MS-MS - A case study**. LC-GC Europe; 2 :73, 2002.

NORMAN, R. O. C., COXON, J. M., **Principles of Organic Synthesis**, 3 ed., Cheltenham: Nelson Thornes, 1993.

NUNES *et al*, Biomarkers analysis from stored red blood cells as a tool for blood transfusion detection. In: Manfred Donike Workshop, 36th Cologne Workshop on Dope Analysis. 22.04-27.04.2018.

OUELLETTE, R. J., RAWN, J. D., **Organic chemistry**: structure, mechanism and synthesis, San Diego: Elsevier, 2014.

PETERS, F. T., **Recent advances of liquid chromatography–(tandem) mass spectrometry in clinical and forensic toxicology**, Alemanha, Clinical Biochemistry, v. 44, p. 54–65, 2011.

Produtos - **Glycerol-1,1,2,3,3-d₅**. Disponível em:
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/454524?lang=pt®ion=BR>
Acesso em: 25 set. 2017

Q Exactive Plus: Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer. Disponível em:
<http://planetorbitrap.com/q-exactive-plus#tab:schematic>. Acesso em: 20 mar. 2018.

SARDELA, V. F. *et al*, **Comprehensive analysis by liquid chromatography-Q-orbitrap mass spectrometry: Fast screening of peptides and organic molecules**, *Journal of Mass Spectrometry*, doi: 10.1002/jms.4077, 2018.

SARDELA, V. F., **Estudo de reagentes derivatizantes na detecção de agentes simpaticomiméticos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas**, Rio de Janeiro, 2013. 154 f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2013.

SARDELA, V. F. *et al*. **Systematic analysis of glycerol**: colourimetric screening and gas chromatography–mass spectrometric confirmation. *Drug Testing and Analysis*, v. 7, p. 967-970, 2015.

SCHUBERTH, J., **Mass Spectrometry in Forensic Science**, National Laboratory of Forensic Chemistry, p. 158-169.

SIMONI, R.E. *et al*. **Plasma volume expanders: use in medicine and detecting misuse in sports**. *Bioanal.*, v.3, n. 2, p. 215, 2011.

SKOOG, D. A.; HOLLER, J. H.; CROUCH, S. R. **Princípios de Análise instrumental**. Tradução de Celio Pasquini *et al*. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

SOUVERAIN, S., RUDAZ, S., VEUTHEY, JL. **Matrix effect in LC-ESI-MS and LC-APCI-MS with off-line and on-line extraction procedures**. *Journal of Chromatography. A.*; 1058: 61, 2004.

STRYER, L.; BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L. **Bioquímica**. Tradução de João Paulo de Campos *et al*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

VIRUS, E. D., SOBOLEVSKY T. G., RODCHENKOV, G. M., **Introduction of HPLC/orbitrap mass spectrometry as screening method for doping control**, *Journal of Mass Spectrometry*, v. 43, p. 949-957, 2008.

WADA (Agência Mundial Antidopagem). **Who we are**, 2018A. Disponível em: <<https://www.wada-ama.org/en/who-we-are>>. Acesso em: 12 mar. 2018.

WADA (Agência Mundial Antidopagem). 2018 **Prohibited List**, 2018B. Disponível em: <https://www.wada-ama.org/sites/default/files/prohibited_list_2018_en.pdf>. Acesso em: 11 mar. 2018.

WADA (Agência Mundial Antidopagem). 2018 **Prohibited List Q&A**. 2018C. Disponível em: <<https://www.wada-ama.org/en/questions-answers/prohibited-list-qa#item-390>>. Acesso em: 11 mar. 2018.

WADA (Agência Mundial Antidopagem). **Blood Doping**, 2018D. Disponível em: <<https://www.wada-ama.org/en/questions-answers/blood-doping#item-592>>. Acesso em: 13 mar. 2018.

WADA (agência mundial antidopagem). Wada technical document -TD2012DL: **Decision Limits for the Confirmatory Quantification of Threshold substances**. Montreal, 2012. Disponível em: <https://www.wada->

ama.org/sites/default/files/resources/files/WADA-TD2012DL-Decision-Limits-for-the-Confirmatory-Quantification-Threshold-Substances-EN.pdf. Acesso em: 10 jan. 2018.

WADA (agência mundial antidopagem). Wada technical document -TD2012DL: **Decision Limits for the Confirmatory Quantification of Threshold substances.** Montreal, 2014. Disponível em: <https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/WADA-TD2014DL-v1-Decision-Limits-for-the-Quantification-of-Threshold-Substances-EN.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2018.

Apêndice A

Avaliação do método usual		Impacto do Uso do PI			
Concentração (mg.mL ⁻¹)	Área Relativa	Concentração (mg.mL ⁻¹)	Analito m/z 215,06974	PI m/z 225,13251	Razão Analito/PI
2,0	3084400	2,0	3815538	37400157	0,102019304
2,0	2147669	2,0	2403872	39207763	0,061311124
2,0	1207019	2,0	3596825	46971827	0,076574092
3,0	3562442	3,0	2964003	48722943	0,060833825
3,0	2822897	3,0	3246176	42059404	0,077180742
3,0	3150681	3,0	3504833	30947448	0,113251115
4,0	4351692	4,0	4815788	44935116	0,107172039
4,0	6282702	4,0	4503280	27650412	0,162864843
4,0	4760543	5,0	3301927	32172238	0,102632804
5,0	4117821	5,0	4331769	44588888	0,097149070
5,0	9622124	7,0	8417833	31531630	0,266964727
5,0	9629710	7,0	5503720	43197720	0,127407650
7,0	10170480	7,0	7255271	25749195	0,281766906
7,0	8344871	8,0	11861466	33754395	0,351405084
7,0	8812267	8,0	9291495	28714776	0,323578878
8,0	7343739	8,0	12231503	29535824	0,414124319
8,0	7644311				
8,0	8283630				

Impacto do uso do quadrupolo na linearidade			
Concentração (mg.mL ⁻¹)	Analito m/z 215,06974	PI m/z 225,13251	Razão Analito/PI
2,0	22982	25828276	0,000889800
2,0	34124	25203887	0,001353918
3,0	169702	26572087	0,006386476
3,0	159346	38737833	0,004113446
3,0	155400	36575355	0,004248763
4,0	214869	34508560	0,006226542
4,0	127435	14692514	0,008673465
4,0	294150	16802787	0,017506024
5,0	458818	26855528	0,017084676
5,0	468955	25582642	0,018330984
5,0	466279	25833699	0,018049254
7,0	857348	19121303	0,044837321
7,0	991377	15380323	0,064457489
7,0	1107705	24834378	0,044603694
8,0	666333	12936642	0,051507416
8,0	868507	22657684	0,038331676
8,0	1348825	19430140	0,069419212

Impacto do aumento da concentração de boro			
Concentração (mg.mL⁻¹)	Analito m/z 215,06974	PI m/z 225,13251	Razão Analito/PI
2,0	105629	11737728	0,008999101
2,0	106003	8977664	0,011807414
3,0	189773	12174000	0,015588385
3,0	171229	20222858	0,008467102
3,0	182341	18073440	0,010088893
4,0	324106	10748143	0,030154604
4,0	451461	17218172	0,026220031
4,0	285330	9302839	0,030671282
5,0	860897	8981987	0,095847055
5,0	880831	9769763	0,090158891
5,0	1121161	5686221	0,197171549
7,0	2336849	13648743	0,171213496
7,0	1512791	12418284	0,121819649
8,0	3880312	10453319	0,371203825
8,0	2421228	8749739	0,276720026
8,0	1728171	11383705	0,151810944

Impacto da Utilização de Água como Matriz			
Concentração (mg.mL⁻¹)	Analito m/z 215,06974	PI m/z 225,13251	Razão Analito/PI
2,0	60111	2119350	0,028362941
2,0	131175	2595452	0,050540330
3,0	389148	1665697	0,233624723
3,0	293985	1547306	0,189997971
3,0	111214	2311119	0,048121278
4,0	918173	2434367	0,377171150
4,0	669197	1014862	0,659397041
4,0	462086	1916316	0,241132465
5,0	971228	2114490	0,459320214
5,0	488219	1187562	0,411110325
5,0	900626	947201	0,950828810
7,0	1481988	963604	1,537963728
7,0	1463529	1816341	0,805756738
7,0	1697241	1528375	1,110487282
8,0	2129090	1686336	1,262553845
8,0	3069103	2794950	1,098088696
8,0	2447704	1875187	1,305311950

Impacto do aquecimento utilizando água como matriz		
Concentração (mg.mL ⁻¹)	Analito m/z 115,03657	Analito m/z 215,06974
2,0	2079082	540291
2,0	1874853	620786
2,0	1540688	443448
3,0	3340600	1303403
3,0	3528955	1298740
3,0	3304831	1585254
4,0	4792824	2464813
4,0	5062311	1965999
4,0	4652243	2110467
5,0	6558227	3198727
5,0	6505870	3292866
5,0	7867001	3644839
7,0	8357355	4427858
7,0	7996777	4440156
7,0	9619513	4548680
8,0	10581555	5309867
8,0	10921324	5995274
8,0	9773380	5146664

Impacto do Aquecimento utilizando urina como matriz						
Concentração (mg.mL ⁻¹)	Analito m/z 215,06974	PI m/z 225,13251	Razão Analito/PI 215/225	Analito m/z 115,03657	PI m/z 120,06795	Razão Analito/PI 115/120
2,0		4127868		3758274	19437646	0,19335026
2,0		3915711		4305512	22394793	0,19225505
2,0		3972421		3670533	18252027	0,20110276
3,0		4958710		5927148	20824842	0,28461911
3,0	207796	3399099	0,06113267	5569590	21491046	0,25915863
3,0	207201	4151749	0,04990692	5844112	17961206	0,32537414
4,0	225004	3637526	0,06185633	6245396	22674250	0,27544003
4,0	370918	3746412	0,0990062	8361973	22836867	0,36616113
4,0	640635	3585096	0,17869396	5333541	20925866	0,25487791
5,0	498475	3617782	0,1377847	8108284	20710842	0,39149949
5,0	624302	3361356	0,18572921	7754415	19283875	0,40211913
5,0	839775	5157595	0,16282298	9669261	23301930	0,41495537
7,0	1498993	4294120	0,34908037	12128430	21246757	0,57083676
7,0	2158487	3467805	0,62243609	12394409	20193537	0,61378098
7,0	1986653	4532614	0,43830183	13355297	20035488	0,66658207
8,0	1695724	3251588	0,52150641	17025565	23184573	0,73434887
8,0	2062161	3492544	0,59044668	12767882	21092393	0,60533113
8,0	3407521	3845754	0,88604757	15200926	20423619	0,74428171

Impacto do aquecimento utilizando urina como matriz			
Concentração (mg.mL⁻¹)	Analito m/z 191,07215	PI m/z 201,13491	Razão Analito/PI
2,0	5272068	43306107	0,121739597
2,0	5448829	42735981	0,127499799
2,0	4616951	37239789	0,123978979
3,0	10114360	41547276	0,243442193
3,0	9858867	36046922	0,273500939
3,0	7730531	38824826	0,199113088
4,0	11123127	40192081	0,276749218
4,0	14315768	42568929	0,336296175
4,0	10475511	39090919	0,26797812
5,0	18359702	38016425	0,482941308
5,0	17618201	35441063	0,497112657
5,0	21806247	43452979	0,50183549
7,0	35487369	42017018	0,844595135
7,0	41186835	37379122	1,101867374
7,0	40615164	37743057	1,0760963
8,0	44632253	41165578	1,084212956
8,0	50314061	35341528	1,423652679
8,0	45003690	36692780	1,226499873

Avaliação do método usual			
Concentração (mg.mL⁻¹)	Analito m/z 191,07215	PI m/z 201,13491	Razão Analito/PI
2,0	39342941	198177294	0,198523959
2,0	35524878	167931271	0,21154415
2,0	40330057	184008403	0,219175083
3,0	52925489	208424583	0,253931126
3,0	49400139	142865263	0,345781318
3,0	28937488	118478173	0,244243199
4,0	42263676	140876618	0,300004902
4,0	54611118	148748250	0,367137886
4,0	71604084	136222875	0,525639207
5,0	96840197	136815560	0,707815668
5,0	73435149	144567278	0,507965219
5,0	94690829	99710625	0,949656358
7,0	96836885	118784888	0,815228996
7,0	91867392	114972264	0,799039601
7,0	125322603	107831940	1,162202989
8,0	124854759	126123127	0,989943415
8,0	106170775	94859725	1,119239751
8,0	45003690	36692780	1,226499873

Avaliação do método usual			
Concentração (mg.mL⁻¹)	Analito m/z 115,03657	PI m/z 120,06795	Razão Analito/PI
2,0	43931391	141849621	0,309703972
2,0	41370615	127148120	0,325373391
2,0	45373472	128116106	0,354159000
3,0	56623915	144192621	0,392696343
3,0	51300398	118985820	0,431147157
3,0	48629599	130183691	0,373546015
4,0	54576996	133035108	0,410245061
4,0	51090987	122380634	0,417476077
4,0	51171013	125793382	0,406786209
5,0	72310640	136554669	0,529536196
5,0	67108184	115535907	0,580842664
5,0	64069477	118762187	0,539477073
7,0	94346446	115552403	0,816481904
7,0	88864290	131055275	0,678067251
7,0	82700261	119717785	0,690793444
8,0	106613552	130869358	0,814656338
8,0	101532118	129467693	0,784227444
8,0	88758514	115420851	0,768998957

Apêndice B

Tabelas contendo as áreas dos picos cromatográficos do Analito e do PI, utilizando diferentes erros de tolerância.

Tolerância 6-10-20-30-40 ppm			Tolerância 50 ppm		
Analito	PI	Razão	Analito	PI	Razão
9707	25957504	0,0003740	4239326	25957504	0,1633179
1396018	28853275	0,04838335	3705443	28853275	0,1284237
1180018	26712849	0,04417417	4540316	26712849	0,1699675
757218	27962168	0,0270801	4635335	27962168	0,1657717
660111	28133093	0,0234639	3306655	28133093	0,1175361
Média		0,0286951	Média		0,1490034
Desvio Padrão		0,0191003	Desvio Padrão		0,024183
CV (%)		66,5631	CV (%)		16,2299

Tolerância 60 ppm			Tolerância 70 ppm		
Analito	PI	Razão	Analito	PI	Razão
4309926	25957504	0,1660378	4309926	25957504	0,1660378
3733281	28853275	0,1293885	3733281	28853275	0,1293885
4426651	26712849	0,1657124	4426651	26712849	0,1657124
4631485	27962168	0,1656340	4738980	27962168	0,1694783
3263907	28133093	0,1160166	3196504	28133093	0,1136208
Média		0,148558	Média		0,148848
Desvio Padrão		0,024072	Desvio Padrão		0,025618
CV (%)		16,20369	CV (%)		17,21092

Tolerância 80 ppm			Tolerância 90 ppm		
Analito	PI	Razão	Analito	PI	Razão
5031588	25957504	0,1938394	4960797	25957504	0,1911123
3939969	28853275	0,1365519	3988286	28853275	0,1382265
4966539	26712849	0,1859232	4962894	26712849	0,1857868
4863971	27962168	0,1739483	4872100	27962168	0,1742390
3411149	28133093	0,1212504	3501926	28133093	0,1244771
Média		0,162303	Média		0,162768
Desvio Padrão		0,031767	Desvio Padrão		0,029721
CV (%)		19,57255	CV (%)		18,25963

Tolerância 100 ppm		
Analito	PI	Razão
5060512	25957504	0,1949537
3999429	28853275	0,1386127
4960686	26712849	0,1857041
4944993	27962168	0,1768458
3520414	28133093	0,1251343
Média		0,16425
Desvio Padrão		0,030614
CV (%)		18,63889

Anexo I

Tabela Periódica dos Elementos

Distribuição Isotópica Natural

