Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

“Saliva como matriz alternativa na determinação de etanol com aplicação forense”.

Laís Helena Picolo Bueno

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO -SP

2014

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

“Saliva como matriz alternativa na determinação de etanol com aplicação forense”.

Versão corrigida

Laís Helena Picolo Bueno

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: **Química**

Orientador: Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis

RIBEIRÃO PRETO -SP

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Bueno, Laís Helena Picolo

Saliva como matriz alternativa na determinação de etanol com aplicação forense. Ribeirão Preto, 2014.

47p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Química.

Orientador: De Martinis, Bruno Spinosa

1. Etanol. 2. Saliva. 3. Urina. 4. Ar exalado 5. Cromatografia em fase gasosa

A todos que acreditam e confiam em mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Às amigas de laboratório, Dayanne, Fabiana, Fernanda G., Fernanda M, Marcela, Mariana e Lidiane e aos amigos, Leo e Thiago, pela amizade e pelo apoio que foram imprescindíveis para a realização desse trabalho.

Ao Ivan, meu amor, companheiro e amigo, por estar sempre presente com sua paciência e sinceridade e à sua família, pelo incentivo.

À minha família, pela confiança, amor incondicional e apoio infinito, sem os quais não seria possível ser o que sou hoje.

Aos amigos de Ribeirão, Camila, Gorda, Babi, Piko, Ju, Valéria, Bruno e Bozo, pela amizade e alegria de todos os reencontros.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis, pela orientação, paciência e amizade que me deu motivação para sempre fazer o melhor.

Ao Prof. Dr. Ricardo Henrique Alves da Silva, pela confiança e colaboração.

À Universidade de São Paulo e aos docentes e funcionários da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto.

À CAPES e à FAPESP, pela bolsa de estudos e pelo apoio financeiro a esta pesquisa.

“Longa viagem começa por um passo.”

Provérbio chinês

RESUMO

Bueno, L.H.P. **Saliva como matriz alternativa na determinação de etanol com aplicação forense**. 2014. 47 f. Dissertação (Mestrado).

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Na tentativa de reduzir o número de ocorrência de acidentes de trânsito, o Brasil adotou leis para restringir o consumo de álcool por motoristas e para garantir que as mesmas sejam cumpridas, o contingente policial conta com teste de etilômetro. Ao realizar o teste, se o resultado for positivo para o uso de etanol, o motorista pode ser encaminhado para uma unidade de saúde para que a coleta de sangue seja realizada, para confirmar a presença de etanol ou de outras drogas caso necessário. Porém, pode haver um longo tempo entre a abordagem do motorista e a realização da coleta de sangue, fazendo com que a concentração de etanol no organismo do motorista se altere, além disso, a coleta de sangue é um método invasivo e é necessária a presença de um profissional especializado para que seja realizada. O presente estudo propõe a utilização da saliva como matriz biológica alternativa para dosagem de etanol em motoristas, uma vez que essa matriz permite a dosagem de etanol e de outras drogas, além de permitir que a análise seja repetida, diferentemente do teste do etilômetro, desde que a cadeia de custódia for preservada. Além disso, a coleta dessa amostra não é invasiva, podendo ser realizada no local da abordagem e sob supervisão (coleta vigiada), sem necessitar de profissional especializado. Para verificar se a variação de etanol ao longo do tempo na saliva é semelhante à do ar exalado e da urina, matrizes já utilizadas na dosagem de etanol em motoristas, foi realizado um experimento de ingestão controlada de bebidas alcoólicas por voluntários sadios de maneira controlada, coletando-se amostras de saliva, urina e ar exalado nos tempos de 10, 30, 60 e 90 min após a ingestão. Na segunda etapa do estudo, foi verificado um possível interferente no teste de Etilômetro e na análise de saliva, uma vez que o limite de etanol permitido por lei atual é muito baixo, fazendo-nos questionar se o uso de produtos comuns ao dia a dia e que contém álcool em sua composição, como o enxaguatório bucal, seria capaz de gerar um resultado falso positivo para a ingestão de bebidas alcoólicas. No experimento de interferência, foram testados os seguintes enxaguatórios bucais: Anapyon®, Listerine Cool Mint®, Listerine Cuidado Total®, Cepacol®, Oral B®, Oral B complete®, e ar exalado e saliva foram coletados nos tempos de 5, 10, 15 e 20 minutos. O etanol em amostras de saliva e urina foi determinado por cromatografia em fase gasosa acoplada a detector de ionização por chama (GC-FID) e as amostras de ar exalado foram analisadas no Etilômetro Alcotest 7410 da Dräger.

Palavras-chave: Etanol, Saliva, Ar Exalado, Urina, Etilômetro, Cromatografia em Fase Gasosa, Enxaguatórios Bucais.

ABSTRACT

Bueno, L.H.P. **Saliva as an alternative matrix to determine ethanol for forensic purposes**. 2014. 47 f. Dissertação (Mestrado).

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

In an attempt to reduce the number of traffic accidents, Brazil has adopted laws to restrict ethanol consumption among drivers, and to guarantee the effectiveness of this law, police officers make use of breathalyzers. When the breathalyzer test is performed, the results can indicate alcohol intake, in this case the driver can be routed to a health unit to collect blood, and then ethanol dosage can be made as well as other drugs if necessary. Therefore, a long time can occur between drivers approach and the blood collection, and the concentration of ethanol in blood can be altered. In addition this sample collection is invasive and needs an specialized personnel to be done. The present study proposes the use of saliva as an alternative biological matrix to ethanol dosage in drivers, once this matrix permits not only the dosage of alcohol but as well as other drugs, and this analysis can be repeated, if the chain of custody has been preserved. Besides, saliva has a non invasive way of collection and can be done under supervision and does require specialized personnel. To verify if the range of ethanol concentration in saliva is the same found in urine and breath, matrixes already used to monitor drivers in traffic, an experiment of alcohol intake in a controlled manner was performed, and urine, saliva and breath were collected in 10, 30, 60 and 90 minutes after alcohol intake. In a second stage of this study, a possible interfering in the breathalyzer test and in saliva analysis was investigated, since the limit if ethanol permitted for drivers in now very low, making us wonder whether the use of products like mouthwashes, that contain ethanol in its composition is capable of generate an false positive result for alcohol intake. It was tested the following mouthwashes: Anapyon™, Listerine Cool Mint™, Listerine Cuidado Total™, Cepacol™, Oral B™, Oral B complete™. Breath and saliva were collected in 5, 10, 15 and 20 minutes after the mouthwashes use. The ethanol in saliva and urine was determined using Gas Chromatography with Flame Ionization Detector (GC-FID), and the ethanol in breath was analyzed using Alcotest 7410 breathalyzer by Dräger.

Keywords: Ethanol, Saliva, Breath, Urine, Breathalyzer, Gas Chromatography, Mouthwash.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação da coleta do analito na fase vapor utilizando uma seringa, após aquecimento da amostra. 9

Figura 2- Representação do dispositivo utilizado na coleta de saliva (Salivette®) 19

Figura 3 – Urina no frasco coletor universal 20

Figura 4. Perfil cromatográfico da análise de etanol em amostra de urina do voluntário n° 7 após 30 min da ingestão da bebida. 24

Figura 5 – Curva analítica da razão (área do pico do etanol divida pela área do isobutanol) versus concentração de etanol em saliva. 25

Figura 6 – Curva analítica da razão (área do pico do etanol divida pela área do isobutanol) versus concentração de etanol em urina. 26

Figura 7 - Concentração de etanol no ar exalado e na saliva nos tempos 30, 60 e 90 min após a ingestão da cerveja para os voluntários do sexo feminino. 30

Figura 8 - Concentração de etanol no ar exalado e na saliva nos tempos 30, 60 e 90 min após a ingestão da cerveja para os voluntários do sexo masculino. 30

Figura 9 - Concentração de etanol na urina e saliva nos tempos 30, 60 e 90 min após a ingestão de cerveja para o sexo feminino. 31

Figura 10 - Concentração de etanol na urina e saliva nos tempos 30, 60 e 90 min após a ingestão de cerveja para o sexo masculino. 31

Figura 11 - Concentração de etanol (g L^{-1}) dos enxaguatórios utilizados na análise de interferência no teste do etilômetro. 34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Limites de concentração de etanol permitidos para o sangue e ar exalado e a caracterização do ato de acordo com a Resolução n° 432 de 23 de janeiro de 2013. 2

Tabela 2 - Sintomas clínicos do álcool em função na concentração de etanol no sangue..... 4

Tabela 3 - Procedimento de preparação das soluções padrão de etanol em saliva ou urina. ... 12

Tabela 4 - Enxaguatórios bucais utilizados nos experimentos e sua composição (dados informados no rótulo) 13

Tabela 5 - Descrição dos voluntários, quanto ao gênero, massa corporal, volume de cerveja e quantidade de etanol ingerido. 20

Tabela 6 - Precisão (DPR) e exatidão (EPR) intra (n=5) e interensaio (n=15). 26

Tabela 7 - Concentração de etanol dos CQB e CQA (saliva e urina) e o erro percentual após cada ciclo de congelamento (12, 24 e 36 h).. 27

Tabela 8 – Concentração de etanol dos CQB e CQA (saliva e urina) e o erro percentual após serem armazenados a temperatura ambiente por 12 h. 27

Tabela 9 – Concentração de etanol dos CQB e CQA (saliva e urina) e o erro percentual após serem preparados e armazenados no injetor automático por um período de 12 e 24 h 28

Tabela 10– Concentração de etanol dos CQB e CQA (saliva e urina) e o erro percentual após serem armazenados por 1, 2, 3, 7 e 30 dias. 28

Tabela 11 – Concentração de etanol em ar exalado, saliva e urina em 10, 30, 60 e 90 min após o término de ingestão da cerveja, e antes do início do experimento (tempo 0) para os voluntários do sexo feminino (de 1 a 5) e masculino (de 6 a 10). 29

Tabela 12 – Correlação de Pearson entre saliva e os fluídos corporais ar exalado e urina para homens e mulheres. 33

Tabela 13 – Concentração de etanol no ar exalado (mg L^{-1}) em 1, 5, 10 e 15 min e concentração de etanol na saliva (g L^{-1}) em 1 min após o uso de Listerine Cuidado Total®. 35

Tabela 14 – Concentração de etanol no ar exalado (mg L^{-1}) em 1, 5, 10 e 15 min e concentração de etanol na saliva (g L^{-1}) em 1 min após o uso de Listerine Cool Mint®. 36

Tabela 15 – Concentração de etanol no ar exalado (mg L^{-1}) em 1, 5, 10 e 15 min e concentração de etanol na saliva (g L^{-1}) em 1 min após o uso de Periogard®. 37

Tabela 16 – Concentração de etanol no ar exalado (mg L^{-1}) em 1, 5, 10 e 15 min e concentração de etanol na saliva (g L^{-1}) em 1 min após o uso de Anapyon®. 38

Tabela 17 – Concentração de etanol no ar exalado (mg L^{-1}) em 1, 5, 10 e 15 min e concentração de etanol na saliva (g L^{-1}) em 1 min após o uso de Cepacol®. 39

Tabela 18 – Concentração de etanol na saliva (g L^{-1}) com o tempo após o uso de Listerine Cuidado Total®. 40

Tabela 19 – Concentração de etanol no sangue (dg L^{-1}) estimada a partir da concentração de etanol na saliva utilizando a razão 1,10 (saliva/sangue) com o tempo após o uso de Listerine Cuidado Total®. 41

LISTA DE ABREVIATURAS

ADH	Álcool-desidrogenase
ALDH	Aldeído-desidrogenase
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
CONTRAN	Conselho Nacional de Trânsito
CME	Concentração média experimental
CQ	Controle de qualidade
CQA	Controle de qualidade de alta concentração
CQB	Controle de qualidade de caixa concentração
CQD	Controle de qualidade de diluição
CQM	Controle de qualidade de média concentração
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
EPR	Erro percentual relativo
FID	Detector de ionização por chama
GC-FID	Cromatografia em fase gasosa acoplada a detector de ionização por chama
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IML	Instituto médico legal
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
OMS	Organização Mundial da Saúde
SNC	Sistema nervoso central
TGI	Trato gastrointestinal
VN	Valor nominal

SUMÁRIO

RESUMO i

ABSTRACT ii

LISTA DE FIGURAS iii

LISTA DE TABELAS iv

LISTA DE ABREVIATURAS vi

1 INTRODUÇÃO 1

1.1 Etanol 3

1.1.1 Aspectos toxicológicos 4

1.1.2 Absorção 5

1.1.3 Distribuição 6

1.1.4 Excreção 6

1.2 Saliva como matriz biológica alternativa para a determinação de etanol 6

1.3 Análise de etanol em matrizes biológicas por CG-FID utilizando a técnica de *Headspace* 8

2 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA 10

3 OBJETIVOS 11

3.1 Objetivo Geral 11

3.2 Objetivos específicos 11

4 MATERIAL 12

4.1 Soluções-Padrão 12

4.2 Amostras de saliva e urina 13

4.3 Bebidas alcoólicas e enxaguatórios bucais 13

4.4 Equipamentos e acessórios 14

5 MÉTODO 14

5.1 Validação do método 14

5.1.1 Efeito residual (*Carry over*) 14

5.1.2 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) 14

5.1.3 Linearidade 15
5.1.4 Precisão 15
5.1.5 Exatidão 16
5.1.6 Estabilidade 16
5.1.6.1 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento 16
5.1.6.2 Estabilidade de curta duração 17
5.1.6.3 Estabilidade pós-processamento 17
5.1.6.4 Estabilidade de longa duração 18
5.2 Voluntários 18
5.2.1 Ingestão controlada de bebidas alcoólicas 18
5.2.2 Uso de produtos de higiene oral 18
5.3 Procedimento experimental 19
5.3.1 Coleta de amostras 19
5.3.1.1 Ar exalado 19
5.3.1.2 Saliva 19
5.3.1.3 Urina 20
5.3.2 Ingestão controlada de bebidas alcoólicas 20
5.3.3 Uso de enxaguatórios bucais 21
5.4 Preparo de amostras 22
5.5 Condições cromatográficas 22
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO 24
6.1 Validação do método 24
6.1.1 Efeito residual (*Carry Over*) 24
6.1.2 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) 25
6.1.3 Linearidade 25
6.1.4 Precisão (DPR) e exatidão (EPR) inter e intraensaio 26
6.1.5 Estabilidade 27
6.1.5.1 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento 27
6.1.5.2 Estabilidade de curta duração 27
6.1.5.3 Estabilidade pós-processamento 28

6.1.5.4 Estabilidade de longa duração 28

6.2 Ingestão controlada de bebidas alcoólicas 29

6.3 Avaliação da interferência do etanol presente em enxaguatórios bucais no teste do Etilômetro 33

6.4 Avaliação da interferência do etanol presente em enxaguatórios bucais na dosagem do etanolna saliva 40

7 CONCLUSÃO 42

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 43

9 ANEXOS 47

1 INTRODUÇÃO

Segundo relatório publicado em 2014 pela Organização Mundial da Saúde (OMS), o consumo médio mundial de etanol per capita em 2010 foi equivalente a 6,2 L de etanol por pessoa com idade superior a quinze anos. O Brasil está entre os consumidores que estão acima dessa média mundial, juntamente com Estados Unidos e praticamente todos os países da America latina, com um consumo per capita de etanolvariando de 7,5 a 9,9 L (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

O etanol atua no Sistema Nervoso Central (SNC) causando efeitos adversos prejudiciais à coordenação motora, à visão e ao tempo de reação, diminuindo a eficiência do motorista na condução do veículo (BASELT, 1996; DE MARTINIS E OLIVEIRA, 2012). Beber e dirigir não só aumenta o risco de envolvimento em acidentes, mas também a gravidade dos ferimentos resultantes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013) e são inúmeros os estudos que demonstram esta relação causal (DEL RIO; ALVAREZ, 1999; HOLMGREN; HOLMGREN; AHLNER, 2005; PEREIRA et al., 2011; PONCE et al., 2011; POULSEN; MOAR; TRONCOSO, 2012)

Na tentativa de reduzir o número de ocorrência de acidentes de trânsito, muitos países adotaram leis para restringir o consumo de etanol entre pessoas que irão conduzir veículos automotores (SCHUCKIT, 2012). Em 2013, foi registrado que oitenta e nove países possuem leis que determinam que a concentração de etanol no sangue, permitida a motoristas seja igual ou abaixo de 0,05 g dL^{-1}, o que é muito adequado, já que a aplicação desse limite gera significantes reduções dos acidentes de trânsito devido ao consumo excessivo de etanol (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013).

Em 1997 foi instituído no Brasil o Código de Trânsito Brasileiro. Dentre os objetivos desse código é possível citar: “estabelecer diretrizes da Política Nacional de Trânsito, com vistas à segurança, à fluidez, ao conforto, à defesa ambiental e à educação para o trânsito, e fiscalizar seu cumprimento” (BRASIL, 1997). No capitulo XV deste código, estão descritas as infrações e os artigos 165, 276, 277 e 306, que tratam especificamente do consumo de álcool e drogas ilícitas pelos motoristas. Esses artigos determinam como infração dirigir com concentração de etanol no sangue superior a 6 dg L^{-1}, sendo que o motorista com essa concentração de etanol no sangue é impedido de conduzir um veículo automotor. O motorista também pode ser submetido a testes de alcoolemia, exames clínicos, perícia, ou outros procedimentos que permitam verificar o seu estado. (BRASIL, 1997).

Em 2012, alguns artigos da lei de 1997 foram alterados pela lei nº 12.760, de 20 de dezembro de 2012, para torná-la mais restrita e o trânsito mais seguro. Esta lei ficou conhecida como "Lei Seca", por não tolerar qualquer consumo de etanol por motoristas, reduzindo a concentração de etanol permitida no sangue a zero (BRASIL, 2012). Essa lei também prevê penalidades mais severas para o descumprimento de suas determinações, como multas, suspensão do direito de dirigir, recolhimento de habilitação e retenção do veículo.

Os limites de concentração de etanol no ar exalado e no sangue permitidos por lei, bem como os procedimentos a serem adotados na fiscalização são estabelecidos pelo Conselho Nacional de Trânsito (CONTRAN), através da Resolução n° 432 de 23 de janeiro de 2013. De acordo com esta resolução, constitui Infração administrativa a condução de automóveis sob a influência de qualquer concentração de etanol no sangue (Tabela 1). Se o condutor for pego dirigindo com concentrações sanguíneas iguais ou acima de 6 dg L^{-1} o ato é considerado crime. (BRASIL, 2013). Para garantir que a lei seja cumprida, o contingente policial conta com etilômetros, popularmente conhecidos como bafômetros. A análise de etanol no ar exalado consiste em uma técnica simples que pode ser realizada no local de abordagem, uma vez que não necessita de profissional especializado para a coleta e análise dos resultados. O limite de etanol no ar exalado também é determinado pela Resolução de 2013: a concentração de etanol igual ou superior a 0,05 mg L^{-1} de ar exalado é caracterizado como infração administrativa e, se o condutor for pego dirigindo com concentração superior a 0,34 mg L^{-1}, o ato é considerado crime (BRASIL, 2013).

Tabela 1 – Limites de concentração de etanol permitidos para o sangue e ar exalado e a caracterização do ato de acordo com a Resolução n° 432 de 23 de janeiro de 2013.

Matriz biologica	Concentração de etanol	Caracterização do ato
Sangue	Acima de 0 dg L^{-1}	Infração Administrativa
	Igual ou acima de 6 dg L^{-1}	Crime
Ar exalado	Igual ou acima de 0,05 mg L^{-1}	Infração Administrativa
	Igual ou acima de 0,34 mg L^{-1}	Crime

Para que os motoristas respeitem o limite do etanol no trânsito, a fiscalização deve ser constante. Estudos mostram que o respeito à lei é mais efetivo quando o teste do bafômetro é realizado em todos os motoristas, e não somente nos que apresentam sinais de terem ingerido bebidas alcoólicas, e também quando é realizado em locais onde a ingestão de bebidas é mais provável, como em locais próximos a bares e casas noturnas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013).

No local da abordagem, o policial necessita de métodos rápidos e práticos para estimar a concentração de etanol no sangue do motorista, uma vez que a realização do exame de sangue necessita deslocar o motorista até um posto do IML, para que a coleta e análise do sangue seja feita por um profissional especializado (JONES et al, 1992; DE MARTINIS; OLIVEIRA, 2012). Portanto, é de grande valia dispor de métodos alternativos que permitam a coleta de amostra biológica no local.

Um aspecto importante que deve ser considerado na dosagem do etanol no ar exalado é a interferência de etanol bucal, resultante do uso de produtos que contém etanol em sua composição, tais como enxaguatórios bucais, medicamentos para asma e sprays. Em todos estes casos, o indivíduo não ingeriu bebidas alcoólicas, mas o conteúdo etanólico desses produtos é capaz de gerar um resultado positivo para o etanol no teste do etilômetro (GARCÍA et al, 2005; MODEL; TAYLOR; LEE, 1993;).

1.1 Etanol

O etanol é uma substância volátil, hidrossolúvel, de baixa massa molecular e baixo ponto de ebulição (78,29°C) (LIDE, 2009; KALANT, 1996). É o álcool encontrado em bebidas alcoólicas. Bebidas fermentadas como vinho e cerveja possuem etanol graças ao processo de fermentação do açúcar oriundo de, por exemplo, frutas, mel, grãos ou cereais. A reação de fermentação, que converte glicose em etanol é a seguinte (McANALLEY, 1996):

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2\ CH_3CH_2OH + 2\ CO_2$$

Em teoria, todo o açúcar seria convertido em etanol e gás carbônico, com um rendimento de 51,1%. No entanto, as leveduras (micro-organismos que realizam o processo de fermentação) acabam por utilizar parte da energia para converter a glicose em outros compostos, como os acetaldeídos e os ésteres, além de produzirem novas células de levedura, fazendo com que o rendimento caia a 48% (McANALLEY, 1996).

Bebidas com teor etanólico superior a 14 % são obtidas por destilação do etanol das bebidas fermentadas. Tais bebidas são aquecidas até atingirem o ponto de ebulição do etanol que então evapora e é coletado e condensado, formando as bebidas destiladas. O produto formado com a destilação varia de acordo com a bebida de origem, por exemplo, o conhaque é originário da destilação do vinho e o whisky do malte .(SCIVOLETTO, 1996).

1.1.1 Aspectos toxicológicos

O etanol é uma droga psicotrópica comparável a drogas terapêuticas como tranquilizantes, narcóticos, sedativos e hipnóticos. Assim como os narcóticos, atuam no SNC, induzindo à tolerância e à dependência física (GARRIOTT, 1996).

A intensidade dos efeitos da droga no SNC depende da concentração de etanol no sangue (ECKARDT, 1996). Esse sistema é o mais afetado e é a fonte de alteração comportamental, fato de grande importância para estudos médico-legais. Na Tabela 2 são apresentados os sintomas clínicos do etanol de acordo com a concentração sanguínea, muitos dos sintomas causados pela ingestão de etanol prejudicam a habilidade de conduzir um veículo automotor (GARRIOTT, 1996).

Tabela 2 - Sintomas clínicos do etanol em função na concentração de etanol no sangue

Concentração de etanol no sangue (g L^{-1})	Efeito Causado	Sintomas Clínicos
0,1 - 0,5	Subclínico	Efeitos pouco aparentes, comportamento próximo do normal.
0,3 - 1,2	Euforia	Euforia Contida, sociabilidade, aumento da confiança. Desinibição, diminuição na velocidade de processamento de informação.
0,9 - 2,5	Excitação	Instabilidade emocional, perda do julgamento crítico, dificuldade de percepção, memória e compreensão, redução da acuidade visual, visão periférica. Descontrole motor e tonturas.
1,8 - 3,0	Confusão	Desorientação, confusão mental, tonturas, distúrbios da visão e na percepção de cores, formas e movimentos. Aumento do limiar de dor. Aumento da descoordenação muscular. Apatia, letargia.
2,5 – 4,0	Estupor	Inércia geral, perda da função motora. Diminuição da resposta a estímulo, incapacidade de ficar em pé, vômito, incontinência urinária e fecal. Sonolência.

3,5 – 5,0	Coma	Completa falta de consciência, coma, anestesia. Depressão, temperatura subnormal, prejuízos na circulação e respiração. Possibilidade de morte.
4,5+	Morte	Morte por depressão respiratória.

1.1.2 Absorção

Uma vez ingerido, o etanol entra em contato com o trato gastrointestinal (TGI), podendo ser absorvido por toda a mucosa. A quantidade de etanol absorvido por uma dada região dependerá de sua concentração em contato com a membrana, do tempo de duração do contato, do fluxo sanguíneo do local e da superfície disponível para que ocorra a absorção (KALANT, 1996). A concentração plasmática máxima ocorre, geralmente, entre 30 a 90 minutos após a ingestão da bebida alcoólica (SCIVOLETTO, 1996).

Regiões do TGI como boca e esôfago, tem pouco tempo de contato com o etanol e, portanto menor absorção da substância. Estômago e intestino, devido à digestão, dispõem de maior tempo de contato com o álcool, sendo as regiões que tem a maior capacidade de absorção. Ambas têm um alto suprimento sanguíneo, mas o intestino tem uma maior eficiência de absorção devido à sua área de contato, que é superior à do estômago (BASELT, 1996).

Um fator importante que altera a absorção de etanol pelo TGI é a presença de alimentos. Segundo Scivoletto (1996),

> [...] Vários fatores podem influenciar a absorção, sendo que o tempo de esvaziamento gástrico e o início da absorção intestinal podem ser considerados os principais fatores determinantes das taxas variáveis de absorção encontradas em diferentes indivíduos ou circunstâncias. Se o tempo de esvaziamento gástrico é retardado, por exemplo, pela presença de alimentos, a absorção intestinal também o será. Uma vez no intestino delgado, o etanol é absorvido rápida e completamente, independente da presença de alimentos no intestino e no estômago.

Alguns estudos mostram que indivíduos que ingeriram etanol em jejum, exibiram picos de concentração sanguínea entre 30 min a 2 h; já os que estavam alimentados antes da ingestão apresentaram picos sanguíneos entre 1 e 6 h (BASELT, 1996).

1.1.3 Distribuição

Por apresentar uma alta solubilidade em água, o etanol estará presente em todos os tecidos, com níveis semelhantes aos níveis plasmáticos, variando sua concentração de acordo com a composição hídrica. No sangue, tem-se uma alta proporção de água, estará presente a maior quantidade do etanol, enquanto que no tecido adiposo estará a menor quantidade (SCIVOLETTO, 1996).

A saliva é composta principalmente de água (99%), sendo os outros componentes basicamente proteínas e eletrólitos (KIDWELL; HOLLAND; ATHANASELIS, 1998). A concentração de etanol encontrada na saliva é ligeiramente maior que a do sangue. Segundo Jones (1993), foi encontrada uma razão saliva/plasma de 1,094 em um intervalo de 40 a 400 min após a ingestão do etanol, sendo essa razão constante nas fases de absorção, distribuição e eliminação de etanol no organismo.

Os alvéolos pulmonares possuem intensa irrigação sanguínea, o que possibilita trocas gasosas com o sangue. Por essa razão, o nível de etanol no ar expirado é bem consistente com o nível encontrado no sangue, e pode-se facilmente estimar o nível de etanol sanguíneo pelo ar exalado através no coeficiente de partição 2000:1 (sangue/ar exalado) (SCHUCKIT, 2012).

1.1.4 Excreção

O etanol é eliminado do organismo através de sua metabolização no fígado. A principal via responsável pela excreção de 90 a 98%, é a transformação em acetaldeído pela enzima álcool-desidrogenase (ADH), que é transformado em ácido acético pela aldeído-desidrogenase (ALDH) (SCHUCKIT, 2012). O etanol também pode ser excretado em sua forma inalterada na urina, saliva e ar expirado (BASELT, 1996).

A concentração de etanol na urina é menor que a do sangue na fase de absorção do etanol, e adquire valores maiores na fase de eliminação A razão urina-sangue foi estimada como sendo em média 1,3, mas os dados variam entre os estudos, encontrando valores que vão de 0,94 a 2,44 (BASELT, 1996; DUNNET; KIMBER, 1968; PAYNE; FOSTER; HILL, 1967).

1.2 Saliva como matriz biológica alternativa para a determinação de etanol

A determinação de etanol é uma análise muito requisitada em Toxicologia Forense. A análise pode ser feita em indivíduos vivos, para determinar o uso da substância em casos de

acidentes de trânsito ou de fiscalização policial de rotina, ou *post mortem*, para avaliar se a causa da morte pode ter sido causada pelo consumo do etanol (CAPLAN, 1996).

O sangue é a matriz biológica que melhor representa a concentração de etanol no sistema nervoso central, uma vez que se encontra em equilíbrio direto com o local de ação do etanol (ECKARDT et al, 1998; CAPLAN, 1996). Devido à facilidade de difusão do etanol através das membranas celulares, a sua concentração nos tecidos e fluidos corporais entra em equilíbrio rapidamente com a concentração de etanol no sangue, fazendo com que matrizes como saliva, urina e ar exalado sejam fontes adequadas para estimar a concentração de etanol no organismo (KALANT, 1996).

Além do sangue, o ar exalado é outra matriz biológica muito utilizada por policiais para determinar o nível de embriaguez de um motorista. O teste do Etilômetro permite ao policial uma rápida avaliação do nível de etanol no organismo do indivíduo no local da abordagem. Isso por que é necessário apenas que o motorista assopre no Etilômetro para que a determinação alcoólica seja realizada. Já a coleta de sangue, além de requerer um profissional especializado para a coleta, ainda exige o deslocamento do motorista até um posto do IML (DE MARTINIS; OLIVEIRA, 2012).

A saliva constitui uma matriz biológica alternativa ao sangue e ao ar exalado em razão de ser de fácil coleta e de permitir análise de outras drogas de abuso (YONAMINE et al, 2003). O método de coleta de saliva não é invasivo, podendo ser feita depositando-se a matriz diretamente em um tubo coletor ou utilizando-se um estimulante para aumentar a salivação como ácido cítrico, algodão ou parafilm® (CONE; JENKINS, 1997). O procedimento pode ser vigiado, para evitar adulteração da amostra, sem causar invasão de privacidade, como no caso da coleta vigiada de urina (SCHRAMM; SMITH; CRAIG, 1991; CAMPIGLIA; VO-DINH, 1998). Além disso, a coleta pode ser feita por profissional não especializado, no local da abordagem do motorista, necessitando somente de correto armazenamento, à baixa temperatura, para evitar a evaporação do etanol. Além da análise de etanol, na saliva podem ser dosadas outras drogas, cujo uso é proibido por lei, como cocaína, maconha e *ecstasy*, desde que um método específico para estas substâncias seja utilizado. Diferentemente do teste realizado no etilômetro, a análise de etanol e outras drogas na saliva pode ser repetida, caso necessário, se a amostra tiver sido corretamente armazenada. (YONAMINE et al, 2003; KIDWELL; HOLLAND; ATHANASELIS, 1998).

1.3 Análise de etanol em matrizes biológicas por CG-FID utilizando a técnica de *Headspace*

A técnica de *Headspace* é muito utilizada para análise de analitos voláteis como o etanol. O método consiste em aquecer a amostra, inserida em um frasco de vidro com tampa de alumínio e septo, a uma temperatura suficientemente alta para que a substância de interesse e o padrão interno sejam evaporados; a vedação do frasco impede que esses vapores saiam de seu interior. Após um período de aquecimento, é possível perfurar o septo com a agulha de uma seringa, apropriada para a coleta de vapores e coletar os analitos evaporados no interior do frasco (Figura 1). Após a coleta, é feita a introdução das substâncias de interesse no injetor de um cromatógrafo em fase gasosa, sem a presença de interferentes da matriz de origem (KOLB; ETTRE, 2006; SNOW, 2002). Esta técnica pode ser utilizada, por exemplo, para análise de analitos voláteis em sangue, urina, saliva e humor vítreo (DE MARTINIS; RUZZENE; MARTIN, 2004; PLA et al, 1991; LARSSON, 1965).

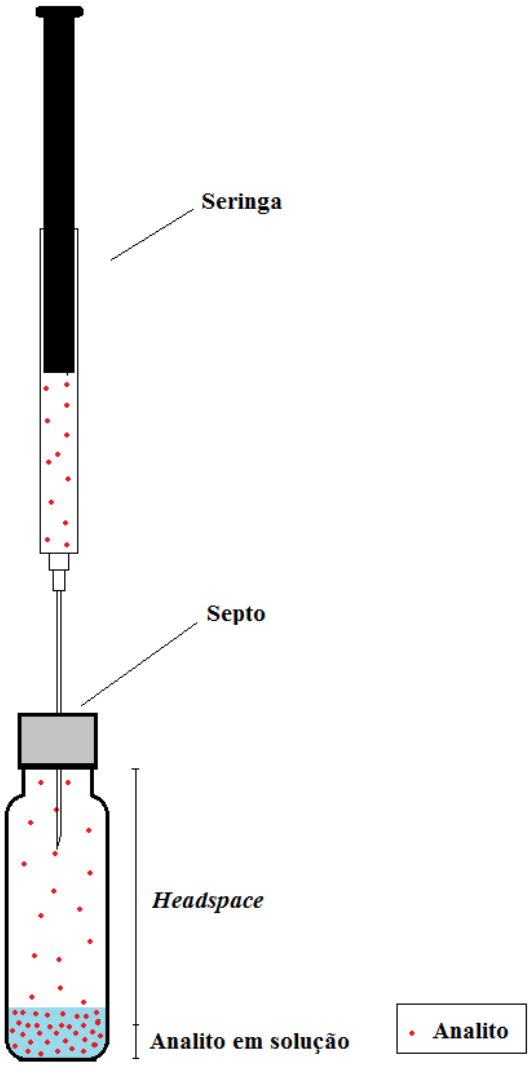


Figura 1 – Representação da coleta do analito na fase vapor utilizando uma seringa, após aquecimento da amostra.

2 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Atendendo à Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, este projeto foi encaminhado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – CEP/FFCLRP número 559/2010-2010.1.2664.59.5 e pelo comitê de ética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – CEP/FMRP número 7712/99.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a possibilidade do uso de saliva como matriz biológica alternativa para análise de etanol no monitoramento da ingestão do etanol por motoristas.

3.2 Objetivos específicos

i. Validar o método de análise de etanol em saliva e urina por cromatografia em fase gasosa com detector de ionização por chama (FID).
ii. Avaliar a curva de concentração de etanol no ar exalado, urina e na saliva pelo tempo após a ingestão de bebidas alcoólicas por voluntários sadios de ambos os gêneros.
iii. Avaliar a interferência de etanol presente em produtos de higiene oral (enxaguatórios bucais) no ar exalado por exame feito com etilômetro e na análise de saliva por cromatografia em fase gasosa

4 MATERIAL

Etanol (J.T. Baker, México), grau HPLC, foi utilizado no preparo das soluções de calibração; Isobutanol (Merck, Alemanha), grau analítico, foi utilizado como padrão interno; NaCl (Synth, São Paulo), reagente analítico. Frascos para *Headspace* de 20 mL foram adquiridos da Sun Sri (Espanha); os dispositivos de coleta de saliva, Salivette®, da Sarstedt AG & Co (Alemanha). Para coleta de urina, foram utilizados frascos de plásticos de 80 mL e bocais descartáveis para a realização da análise de etanol no etilômetro.

4.1 Soluções-Padrão

Foram utilizadas soluções de etanol para calibração nas concentrações 0,1, 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 g L^{-1} preparadas em saliva e urina, a partir de soluções concentradas de etanol preparadas em água, de acordo com a Tabela 3:

Tabela 3 - Procedimento de preparação das soluções padrão de etanol em saliva ou urina.

Preparo das soluções padrão de etanol em urina ou saliva			
Concentração de Etanol (g L^{-1})	**Volume de solução estoque de 100 g L^{-1}**	**Volume de saliva ou urina**	**Volume Total**
4,0	40 µL	960 µL	1 mL
3,0	30 µL	970 µL	1 mL
2,0	20 µL	980 µL	1 mL
1,0	10 µL	990 µL	1 mL
Concentração de Etanol (g L^{-1})	**Volume de solução estoque de 10 g L^{-1}**	**Volume de saliva ou urina**	**Volume Total**
0,5	50 µL	950 µL	1 mL
0,2	20 µL	980 µL	1 mL
0,1	10 µL	990 µL	1 mL

A solução estoque de 10 g L^{-1} foi preparada com 125 µL de etanol completando-se o volume com água deionizada em um balão de 10 mL. A de 100 g L^{-1} foi preparada com 629 µL de etanol completando-se o volume com água deionizada em um balão de 5 mL.

O padrão interno foi preparado transferindo-se 150 µL de Isobutanol e 1,0 g de NaCl para um balão de 500 mL, completando-se o volume com água deionizada. O NaCl foi utilizado para aumentar a concentração do analito na fase vapor por efeito *salting-out*.

4.2 Amostras de saliva e urina

As amostras "branco" de saliva e urina foram coletadas do próprio pesquisador e dos colegas de laboratório, que não haviam feito ingestão de bebidas alcoólicas por no mínimo doze horas, e que apresentaram nível zero de concentração de etanol no ar exalado (saliva) e resultado negativo na análise cromatográfica (urina). As amostras de saliva e urina positivas para etanol foram coletadas de indivíduos sadios e maiores de dezoito anos, que aceitaram participar da pesquisa, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido e apresentaram nível zero de etanol no teste do etilômetro antes do início do experimento.

As amostras de saliva e urina foram armazenadas nos tubos Salivettes e coletor universal, respectivamente, a – 20ºC até o momento da análise.

4.3 Bebidas alcoólicas e enxaguatórios bucais

A bebida alcoólica utilizada nos experimentos foi cerveja de teor alcoólico 4,7%. Os enxaguatórios bucais utilizados estão descritos na Tabela 4:

Tabela 4 - Enxaguatórios bucais utilizados nos experimentos e sua composição (dados informados no rótulo).

Enxaguatório	Composição
Anapyon®	Tirotricina, tintura de aroeira (equivale a 15 mg de ácido tânico) 0,77 mL e veículo q.s.p. 1,00 mL, tintura diluída de Guaçatunga, essência de menta, mentol, metilparabeno e álcool etílico.
Periogard®	Gluconato de clorexidina 0,12%, água, álcool, glicerina, peg-40, diisostearato de sorbitan, aroma, sacarina de sódio, FD&C azul nº 1.
Listerine Cool Mint®	Timol (0,064%), eucaliptol (0,092%), salicilato de metila (0,060%), mentol (0,042%), água purificada, solução de sorbitol, álcool, poloxamer 407, ácido benzóico, aroma de hortelã, sacarina sódica, benzoato de sódio, n-propanol, corante verde n° 3.
Listerine Cuidado Total®	Timol, eucaliptol, salicilato de metila, mentol, água purificada, álcool, poloxamer 407, ácido benzóico, benzoato de sódio, aroma de caramelo.
Cepacol®	Cloreto de certilpiridíneo 0,5 mg, EDTA disódico, sacarina sódica, polisorbato 80, glicerina, fostato de sódio, eucaliptol,

	mentol, metilsalicilato, aroma, perfume, cl 19140, álcool, água.
Oral B Complete®	Cloreto de certilpiridíneo 0,053%, fluoreto de sódio 0,050%, água, glicerina, peg-40, metilparabeno, aroma, sacarina sódica, benzoato de sódio, propil parabeno, ci 42090.

4.4 Equipamentos e acessórios

Uma centrífuga D-78532 Tuttligen (Hettich, Alemanha), balança analítica BL 1500S (Sartorius, EUA) e deionizador de água (Simplicity, Millipore, EUA) foram utilizados.

As análises de etanol em saliva e urina foram feitas no Cromatógrafo em fase gasosa modelo CP 3380 (Varian) acoplado a detector de ionização por chama (FID), com amostrador automático modelo CombiPAL (CTC Analytics AG) operando no modo *Headspace*. A quantificação de etanol em ar exalado foi feita em um Etilômetro 7410 (Dräger, Alemanha).

5 MÉTODO

5.1 Validação do método

A validação da metodologia foi baseada nas recomendações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) apresentados nas resoluções RE n° 899 de 29 de maio de 2003 e RE n° 27 de 17 de maio de 2012. Os cálculos foram realizados utilizando o programa Microsoft® Excel® 2007. (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003, 2012).

5.1.1 Efeito residual (*Carry over*)

É a verificação da contaminação proveniente da amostra mais concentrada analisada anteriormente. O efeito residual foi avaliado com a injeção de três amostras branco, uma antes da injeção da solução padrão de menor concentração (0,1 g L^{-1}), as outras duas, após a injeção da solução padrão de maior concentração (4,0 g L^{-1}). As amostras branco foram preparadas diretamente no frasco para *Headspace* adicionando-se 500 µL de água deionizada e 100 µL de saliva ou urina isenta de etanol.

5.1.2 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Limite de detecção é a menor concentração de um analito capaz de gerar um resultado positivo e que um método consegue diferenciar do ruído de fundo de forma

confiável. Para a determinação desse limite, foi utilizada a relação 3:1 do sinal em relação ao ruído.

Limite de quantificação é a menor concentração do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis. Para esta determinação foram aceitas concentrações que com valores de precisão abaixo de 20 % e de exatidão dentro da faixa de ± 20%.

5.1.3 Linearidade

Característica do método de gerar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo de concentração pré-determinado. Foi verificada pela análise de soluções padrão em saliva e urina nas seguintes concentrações de etanol 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 g L^{-1}. A curva de calibração foi construída e foram calculados desvio padrão e equação da reta. O coeficiente de determinação (r^2) também foi estimado, sendo aceitos valores acima de 0,99.

5.1.4 Precisão

É a capacidade do método em gerar resultados de grande proximidade quando amostras de mesma concentração do analito são analisadas múltiplas vezes.

Foram utilizados quatro controles de qualidade (CQ) em saliva e urina, nas concentrações 0,5 (CQB), 2,0 (CQM), 3,0 (CQA) e 10,0 g L^{-1} (CQD) analisados em quintuplicata. Os CQs foram analisados no mesmo dia (intraensaio), e em três dias diferentes (interensaios) com o mesmo analista e instrumentação.

A precisão foi estimada pelo Desvio Padrão Relativo (DPR) utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\mathbf{DPR} = \frac{\mathbf{DP}}{\mathbf{CME}} \times \mathbf{100}$$

Onde:

DPR: Desvio padrão relativo

DP: Desvio padrão

CME: Concentração média experimental

Não foram aceitos DPRs acima de 15% do valor nominal, exceto para o LQ no qual se admitiu valores até 20%.

5.1.5 Exatidão

Um método analítico é considerado preciso quando os resultados obtidos são muito próximos ao valor verdadeiro.

Foram utilizados quatro controles de qualidade (CQ) em saliva e urina, nas concentrações 0,5 (CQB), 2,0 (CQM), 3,0 (CQA) e 10,0 g L^{-1} (CQD) analisados em quintuplicata. Os CQs foram analisados no mesmo dia (intraensaio), e em três dias diferentes (interensaios) com o mesmo analista e instrumentação.

A exatidão foi estimada pelo Erro Percentual Relativo (EPR) utilizando-se a seguinte formula:

$$\mathbf{EPR} = \frac{(\mathbf{CME} - \mathbf{VN})}{\mathbf{VN}} \times \mathbf{100}$$

Onde:

CME: Concentração média experimental

VN: Valor nominal

Foram aceitos EPRs dentro da faixa de ± 15% do valor nominal, exceto para o LQ no qual se admitiu valores na faixa de ± 20%.

5.1.6 Estabilidade

Ensaio que visa determinar se um analito em determinada amostra, sob condições específicas e em determinado período de tempo, se mantém inalterado, não sofrendo mudanças em sua estrutura química ou em sua concentração.

No caso do etanol, que é um analito volátil, foi verificada a sua volatilização na amostra quando armazenada à temperatura e condições diferentes em um determinado período de tempo. Foram consideradas estáveis as amostras que apresentaram desvio padrão na faixa de ± 15% em relação às recém-preparadas.

5.1.6.1 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento

Neste ensaio, foi avaliada a estabilidade do etanol, quando a amostra é descongelada e 100 µL da amostra são retirados para análise repetidas vezes.

Amostras de saliva e urina, de concentração 0,5 g L^{-1} (CQB) e 3,0 g L^{-1} (CQA) foram armazenadas nos seus respectivos dispositivos de coleta, (Salivette®) e frasco coletor de urina

de 80 mL), congeladas e mantidas no freezer por 24 horas. Após esse período, as amostras foram descongeladas à temperatura ambiente (22°C). Quando completamente descongeladas, foram analisadas em triplicata e os resultados foram comparados ao de amostras recém-preparadas de mesma concentração. As amostras foram então congeladas novamente e mantidas pelo mesmo período, descongeladas e analisadas. O ciclo de congelamento, descongelamento e análise foi repetido até completar três ciclos.

5.1.6.2 Estabilidade de curta duração

Verifica a estabilidade do analito, após certo período de armazenamento à temperatura ambiente, antes de serem processadas analisadas.

Amostras de saliva e urina, nas concentrações 0,5 g L^{-1} (CQB) e 3,0 g L^{-1} (CQA), foram armazenadas nos seus respectivos dispositivos de coleta, (Salivette® e frasco coletor de urina de 80 mL), e mantidas à temperatura ambiente por 12 horas. Após esse período, as amostras foram analisadas em triplicata e os resultados foram comparados ao de CQB e CQA recém-preparados.

5.1.6.3 Estabilidade pós-processamento

O processo de preparo de amostra para injeção por *Headspace* envolve a adição de padrão interno (500 µL) e amostra (100 µL) à um frasco apropriado para a técnica que é vedado. Quando o processo é automatizado, as amostras são posicionadas no injetor automático, onde permanecem até as análises. No injetor automático, podem ser armazenados 64 frascos. Com um tempo de injeção entre uma amostra e outra de aproximadamente 11 min, a última amostra é analisada em aproximadamente 11,7 h após ter sido posicionada no injetor automático. Sendo assim, o ensaio visa determinar a estabilidade de amostras processadas que permanecem no injetor automático por 12 e 24 h até a análise.

Foram preparadas amostras de saliva e urina com etanol na concentração 0,5 g L^{-1} (CQB) e 3,0 g L^{-1} (CQA). Uma alíquota de 100 µL de CQ e 500 µL de padrão interno (Isobutanol) foram adicionadas ao frasco para *Headspace*, que foi vedado com tampa com septo, foram preparadas três amostras de cada CQ para análise em triplicata. As amostras permaneceram no injetor automático por 12 e 24 h. Após esse período, as amostras foram analisadas e os resultados foram comparados ao de amostras recém-preparadas.

5.1.6.4 Estabilidade de longa duração

Estudo da estabilidade do analito em amostras armazenadas por um longo período de tempo.

Amostras de saliva e urina, de concentração 0,5 g L^{-1} (CQB) e 3,0 g L^{-1} (CQA) foram armazenadas nos seus respectivos dispositivos de coleta, (Salivette® e frasco coletor de urina de 80 mL) e mantidas em freezer a -5°C por 1, 2, 3, 7 e 30 dias. Após esse período as amostras foram descongeladas e analisadas em triplicada. O resultado foi comparado com os de CQs recém-preparados.

5.2 Voluntários

O número de voluntários participantes dos experimentos está discriminado abaixo:

5.2.1 Ingestão controlada de bebidas alcoólicas

Dez voluntários de ambos os gêneros (cinco homens e cinco mulheres), na faixa etária de 20 a 31 anos e peso entre 53 a 95 kg, participaram do experimento. Para a segurança dos envolvidos, só foi permitida a saída do local do experimento após a confirmação pelo teste do etilômetro de concentração de etanol zero no ar exalado.

5.2.2 Uso de produtos de higiene oral

Para a realização do experimento de verificação da interferência de etanol presente em produtos de higiene oral no teste do bafômetro, foram formados três grupos sendo: Grupo Controle A (bochecho com água) no qual foram utilizados quatro indivíduos (dois homens e duas mulheres), Grupo Controle B (bochecho com enxaguatório bucal sem etanol – Oral B Complete®) no qual foram utilizados vinte indivíduos (dez homens e dez mulheres) e, Grupo Experimental (bochecho com enxaguatório bucal contendo etanol). No Grupo Experimental foram utilizados vinte indivíduos (dez homens e dez mulheres) para cada enxaguatório, sendo Grupo Experimental 1 (Listerine Cuidado Total®), Grupo Experimental 2 (Listerine Cool Mint®), Grupo Experimental 3 (Periogard®), Grupo Experimental 4 (Cepacol®), Grupo Experimental 5 (Anapyon®).

No estudo da interferência do etanol oriundo de enxaguatórios bucais na dosagem do etanol na saliva, foi utilizado somente Listerine Cool Mint®. Essa escolha foi feita mediante a

disponibilidade desse produto na maioria dos estabelecimentos comerciais. Foram selecionados quinze voluntários para participarem desse experimento.

5.3 Procedimento experimental

5.3.1 Coleta de amostras

Os procedimentos de coleta adotados e os dispositivos utilizados estão descritos nos itens a seguir

5.3.1.1 Ar exalado

As amostras de ar exalado de cada indivíduo foram coletadas diretamente no Etilômetro, através de um sopro continuo por alguns segundos (até que o aparelho indicasse o término da coleta). Nesse caso, a coleta da amostra e a análise da concentração de etanol são feitas simultaneamente.

5.3.1.2 Saliva

Foi utilizado o dispositivo Salivette® (Figura 2) para a coleta das amostras de saliva. Esse dispositivo contém um algodão em seu interior, que estimula a secreção de saliva através da sua mastigação. Os voluntários mastigaram o algodão por 1 min e transferiram o mesmo, embebido em saliva de volta ao dispositivo, que foi centrifugado a 2500 rpm por 5 min, transferindo assim a saliva do algodão para o tubo.

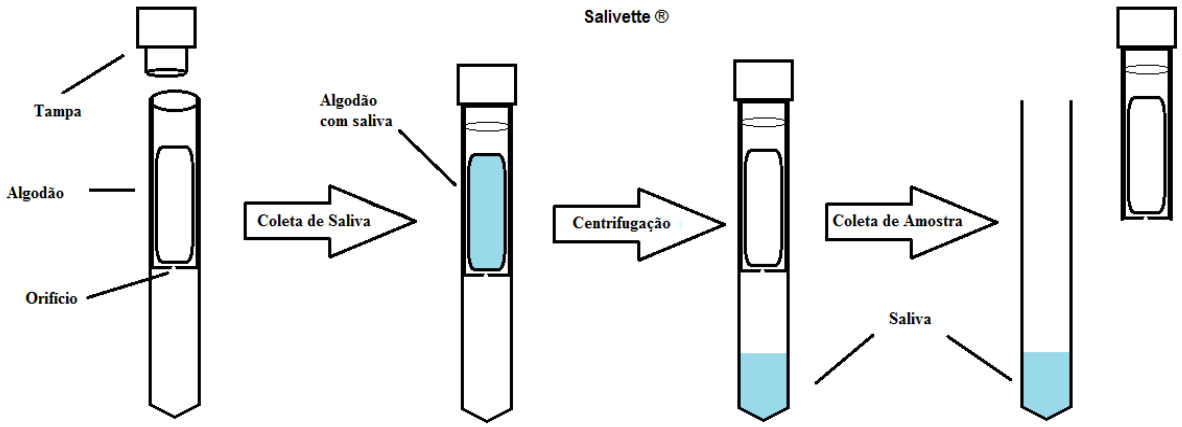


Figura 2 - Representação do dispositivo utilizado na coleta de saliva (Salivette®)

5.3.1.3 Urina

As amostras de urina foram coletadas em coletor de plástico universal de 80 mL (Figura 3).

Figura 3 - Urina no frasco coletor universal

5.3.2 Ingestão controlada de bebidas alcoólicas

A quantidade que cada voluntário ingeriu se restringiu a 0,5 g etanol por kg de massa corporal e a bebida escolhida foi cerveja, com porcentagem alcoólica de 4,7%. A Tabela 5 apresenta informações sobre os voluntários tais como: gênero, massa, volume de cerveja e quantidade de etanol ingerido. O tempo médio de ingestão da bebida foi de 20 min. Para segurança dos voluntários da pesquisa que estavam conduzindo automóvel, a liberação do local do experimento foi permitida apenas após a verificação, através do etilômetro, da concentração zero de etanol. A coleta de amostra de saliva, urina e ar exalado ocorreu nos tempos de 10, 30, 60 e 90 min após a ingestão da bebida. As amostras de saliva e urina coletadas foram armazenadas em freezer a -20 °C até a análise cromatográfica.

Tabela 5 - Descrição dos voluntários, quanto ao gênero, massa corporal, volume de cerveja e quantidade de etanol ingerido.

Voluntário	Gênero	Massa (Kg)	Volume de cerveja Ingerido (mL)	Quantidade de etanol (g)
1	Feminino	64	838	32,0
2	Feminino	54	707	27,0
3	Feminino	67	877	33,5
4	Feminino	66	864	33,0
5	Feminino	71	930	35,5
6	Masculino	90	1178	45,0
7	Masculino	95	1244	47,5
8	Masculino	74,5	975	37,2
9	Masculino	89	1165	44,5
10	Masculino	53	694	26,5

5.3.3 Uso de enxaguatórios bucais

Para a realização do experimento com enxaguatórios bucais, cada sujeito da pesquisa seguiu os protocolos experimentais mostrados a seguir:

Esquema 1 – Protocolo experimental do uso de enxaguatórios bucais na avaliação da interferência do etanol residual no teste do Etilômetro.

Assoprar no etilômetro
(análise do ar exalado antes do uso do enxaguatório)

↓

Ceder uma amostra de saliva no tubo Salivette®
(amostra coletada antes do uso do enxaguatório)

↓

Usar o enxaguatório bucal
(15 mL do produto e bochecho por 1 min)

↓

Assoprar no etilômetro
(análise imediatamente após o uso do enxaguatório)

↓

Ceder uma amostra de saliva no tubo Salivette®
(amostra coletada imediatamente após o uso do enxaguatório)

↓

Assoprar no etilômetro
(análise do ar exalado 5 min após o uso do enxaguatório)

↓

Assoprar no etilômetro
(análise do ar exalado 10 min após o uso do enxaguatório)

↓

Assoprar no etilômetro
(análise do ar exalado 15 min após o uso do enxaguatório)

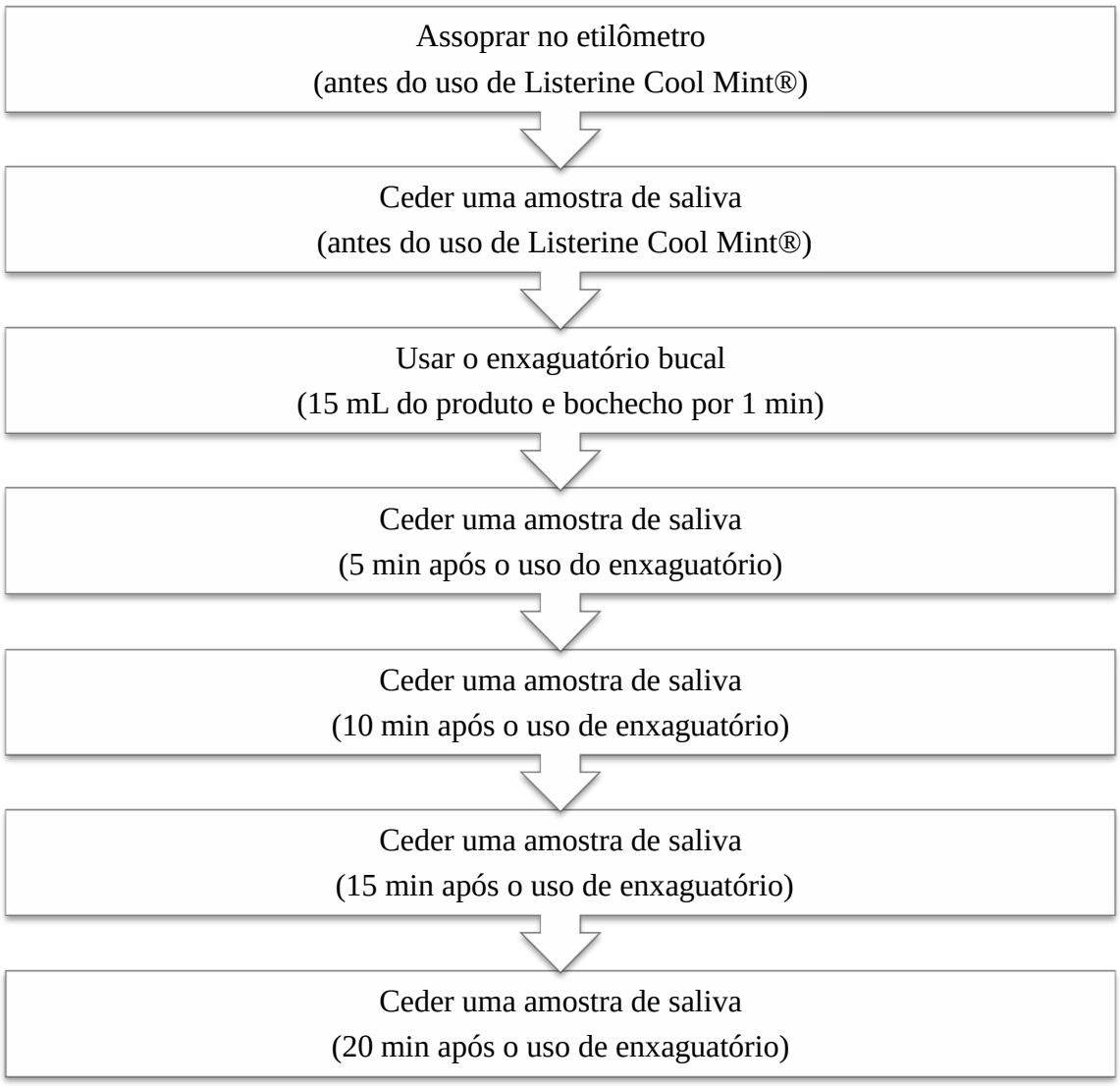
↓

Usar do enxaguatório bucal
(15 mL do produto e bochecho por 1 minuto)

↓

Ceder uma amostra de saliva no tubo Salivette®
(amostra coletada imediatamente após o uso do enxaguatório)

Esquema 2 - Protocolo experimental do uso de enxaguatórios bucais na avaliação da interferência do etanol residual na análise de saliva.



5.4 Preparo de amostras

O preparo de amostra foi idêntico para as amostras de urina e saliva. Em um frasco de vidro de volume 20 mL para *Headspace* foram adicionados 500 µL de padrão interno e 100 µL de amostra, e o frasco foi selado com tampa de rosca de alumínio com septo.

5.5 Condições cromatográficas

Foi utilizada coluna capilar de sílica fundida (OV - 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm de polietilenoglicol). O nitrogênio foi utilizado como gás de arraste a um fluxo de 1 mL min^{-1}. O

detector foi mantido à temperatura de 300°C e o injetor à 250°C, o modo de injeção foi *split* e a temperatura da coluna foi ajustada de 50°C (2 min) a 200°C, a uma taxa de aquecimento de 20°C min^{-1}. O tempo de incubação do frasco foi de 10 min a uma temperatura de 80°C. Foram coletados 400 µl da amostra na fase vapor para injeção. Foram utilizados hidrogênio e ar sintético para a manutenção da chama do detector FID.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Validação do método

A Figura 4 apresenta o cromatograma da análise da urina do voluntário nº 7 no tempo de 30 min, como exemplo do perfil cromatográfico das análises. Pode ser observado que os picos do analito de interesse (etanol) e do padrão interno (isobutanol) estão bem resolvidos e com ótima seletividade.

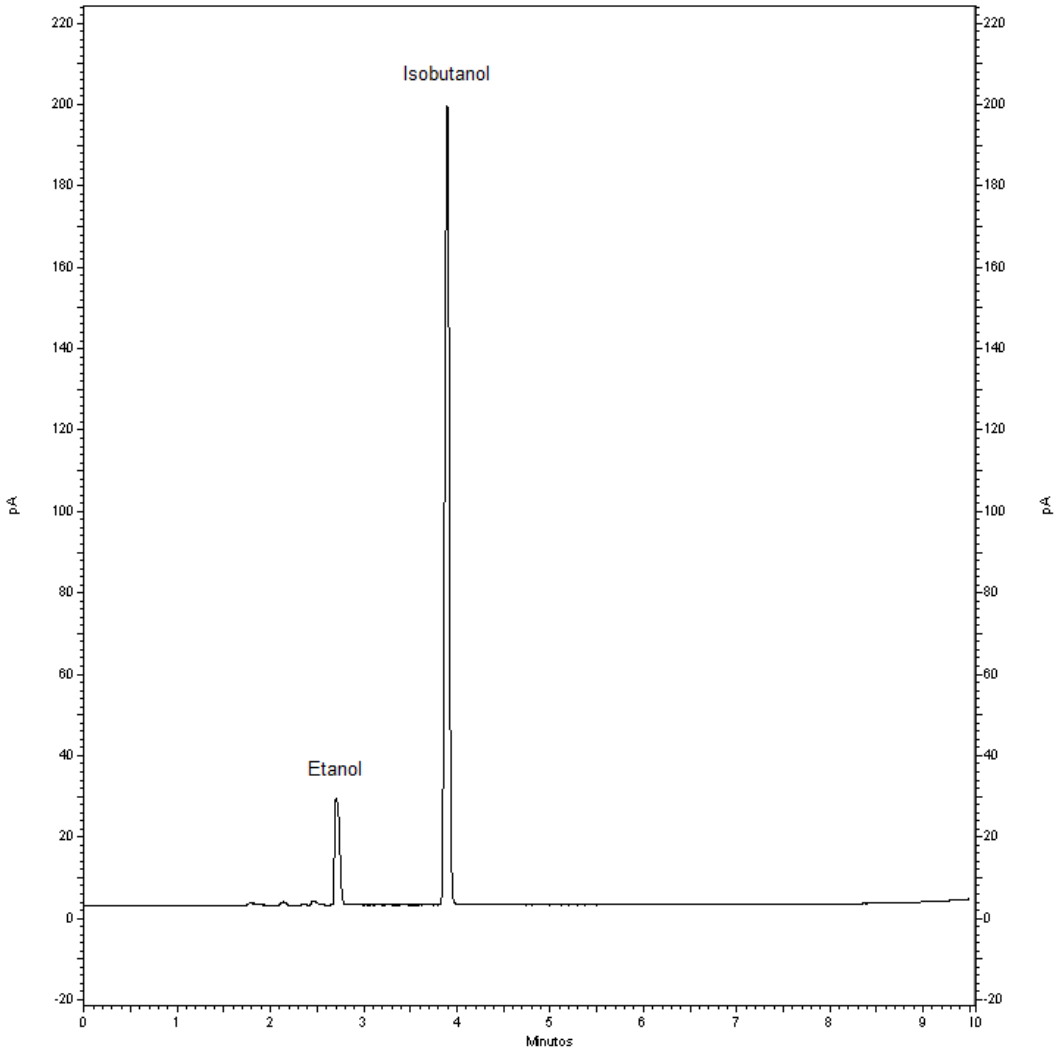


Figura 4 - Perfil cromatográfico da análise de etanol em amostra de urina do voluntário n° 7 após 30 min da ingestão da bebida.

6.1.1 Efeito residual (*Carry Over*)

Não foi observado efeito residual quando a amostra "branco" foi analisada após a injeção da maior concentração da curva (4,0 g L^{-1}).

6.1.2 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Para a determinação do limite de detecção, foram injetadas amostras de saliva e urina nas concentrações 0,005; 0,001; 0,05 e 0,1 g L^{-1} em duplicata. A concentração que apresentou relação sinal ruído de 3:1 foi de 0.005 g L^{-1} e foi estabelecida como o limite de detecção do método tanto para a saliva quanto para a urina.

O limite de quantificação do método foi determinado pela injeção de cinco amostras de saliva e urina na concentração de 0.1 g L^{-1}. Para a saliva a precisão foi de 6,8 % e a exatidão de 12,7 %, para a urina a precisão foi de 1,42 % e a exatidão de 22 %.

6.1.3 Linearidade

A linearidade foi obtida pela injeção de soluções de etanol em saliva e urina nas concentrações 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; e 4,0 g L^{-1}. As curvas analíticas obtidas em saliva e urina se encontram nas figuras 5 e 6, respectivamente. O eixo y representa a razão entre a área do pico do etanol pela área do pico do isobutanol (padrão interno), e o eixo x representa a concentração de etanol (g L^{-1}). As equações de regressão linear e coeficientes de determinação foram: saliva: y = 0,1907x - 0,0103 , r^2 = 0,997 ; urina: y = 0.1871x - 0,0104 , r^2 = 0,996.

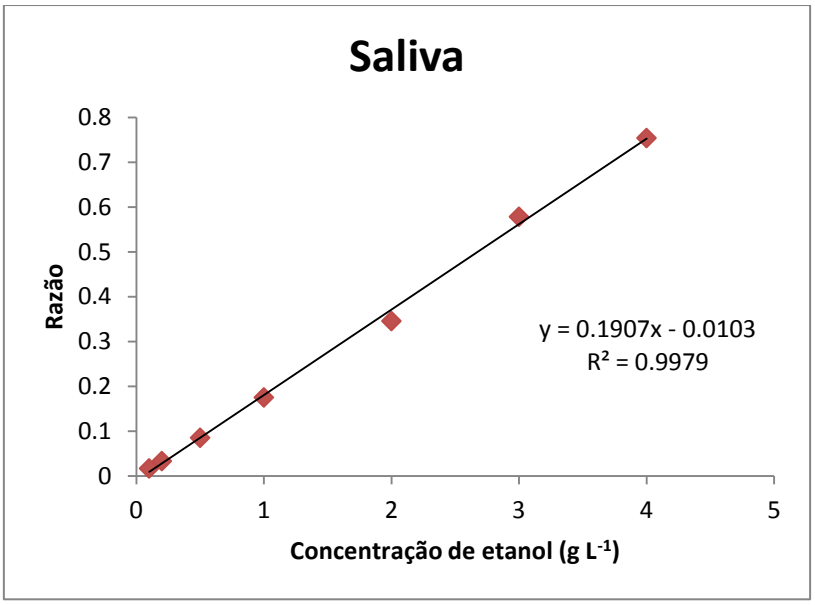


Figura 5 – Curva analítica da razão (área do pico do etanol divida pela área do isobutanol) versus concentração de etanol em saliva.

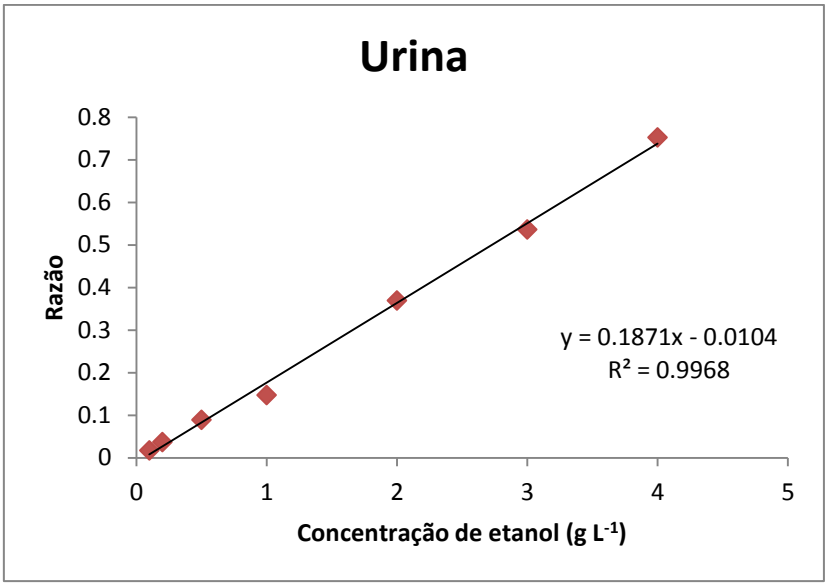


Figura 6 – Curva analítica da razão (área do pico do etanol divida pela área do isobutanol) versus concentração de etanol em urina.

6.1.4 Precisão (DPR) e exatidão (EPR) inter e intraensaio

A Tabela 6 apresenta os dados correspondentes à precisão e exatidão intra e interensaio. Os valores foram adequados para os fins do presente estudo. A precisão intraensaio variou de 0,42 a 2,13% para saliva e 0,27 a -1,12% para urina e a precisão interensaio variou de 0,21 a -3,62% para saliva e de 2,48 a 5,47% para a urina. Já a exatidão intraensaio variou de -10,38 a 0,73% para a saliva e de -4,77 a 7,09% para a urina e a interensaio de -10,84 a 0,63% para a saliva e de -2,36 a 3,03% para a urina.

Tabela 6 - Precisão (DPR) e exatidão (EPR) intra (n=5) e interensaio (n=15).

	Saliva		**Urina**	
	DPR	**EPR**	**DPR**	**EPR**
Intra-ensaio				
CQB	0,42%	-5,2%	1,00%	-4,77%
CQM	2,13%	0,73%	1,06%	-0,35%
CQA	1,72%	0,72%	1,12%	0,89%
CQD	0,59%	-10,38%	0,27%	7,09%
Inter-ensaio				
CQB	3,62%	-4,18%	2,48%	-2,36%
CQM	1,69%	-0,52%	7,38%	-0,61%
CQA	0,21%	0,63%	4,08%	2,88%
CQD	0,58%	-10,84%	5,47%	3,03%

6.1.5 Estabilidade

Os resultados obtidos nos testes de estabilidade estão descritos nos itens seguintes.

6.1.5.1 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento

Os controles de qualidade em urina não sofreram grande variação em sua concentração etanol após três ciclos de congelamento, descongelamento e análise, com EPR variando entre -9,29% a 3,61%. Já os CQB em saliva sofreu significativa variação em sua concentração de etanol com EPR de -16,61% no ciclo de 24 h e de -43,6% no ciclo de 36 h (Tabela 7).

Tabela 7 – Concentração de etanol dos CQB e CQA (saliva e urina) e o erro percentual após cada ciclo de congelamento (12, 24 e 36 h).

	Ciclo	**CQB**	**EPR**	**CQA**	**EPR**
Saliva	12 horas	0,53	6,38%	3,40	13,6%
	24 horas	0,41	-16,61%	3,02	0,89%
	36 horas	0,28	-43,6%	2,66	-11,1%
Urina	12 horas	0,49	-0,47%	2,98	-0,61%
	24 horas	0,51	3,61%	3,07	2,35%
	36 horas	0,47	-5,40%	2,72	-9,29%

6.1.5.2 Estabilidade de curta duração

O etanol em solução de urina não sofreu significativa redução após um período de 12 h à temperatura ambiente. Contudo o CQB em saliva sofreu uma grande variação de concentração com EPR de -35,25%. Essa grande variação mostra a importância de armazenar as amostras à temperatura reduzida para evitar perdas do etanol por evaporação (Tabela 8).

Tabela 8 – Concentração de etanol dos CQB e CQA (saliva e urina) e o erro percentual após serem armazenados a temperatura ambiente por 12 h.

	CQB	**EPR**	**CQA**	**EPR**
Saliva	0,32	-35,25%	2,79	-6,68%
Urina	0,45	-9,48%	2,97	-0,93%

6.1.5.3 Estabilidade pós-processamento

Este teste revelou que uma amostra de saliva ou urina não sofre variação significativa em sua concentração de etanol original, quando, após ser preparada e inserida em um frasco para *headspace*, é mantida por um período de 24 h no injetor automático (Tabela 9).

Tabela 9 – Concentração de etanol dos CQB e CQA (saliva e urina) e o erro percentual após serem preparados e armazenados no injetor automático por um período de 12 e 24 h.

	Período	CQB	EPR	CQA	EPR
Saliva	12 horas	0,53	5,54%	2,82	-5,97%
	24 horas	0,36	-27,8%	2,84	-5,45%
Urina	12 horas	0,47	-6,17%	3,13	4,36%
	24 horas	0,41	-18,2%	3,30	10,1%

6.1.5.4 Estabilidade de longa duração

Os controles de qualidade em saliva obtiveram significativa variação em sua concentração de etanol após trinta dias de armazenamento no freezer com EPR de -50% para o CQB e de -40,3% para o CQA. Já os controles de qualidade em urina reduziram significativamente a sua concentração de etanol em um período mais curto, de apenas sete dias, com EPR de -32,8% para o CQB e de -32,72% para o CQA (Tabela 10).

Tabela 10 – Concentração de etanol dos CQB e CQA (saliva e urina) e o erro percentual após serem armazenados por 1, 2, 3, 7 e 30 dias.

	Período	CQB	EPR	CQA	EPR
Saliva	1 dia	0,54	8,14%	3,22	7,41%
	2 dias	0,58	16,5%	3,26	8,69%
	3 dias	0,57	15,6%	3,41	13,81%
	7 dias	0,55	11,09%	3,21	6,87%
	30 dias	0,25	-50,0%	1,78	-40,3%
Urina	1 dia	0,51	1,52%	3,13	4,47%
	2 dias	0,49	-1,81%	2,95	-1,70%
	3 dias	0,47	-5,66%	3,07	2,40%
	7 dias	0,34	-32,8%	2,02	-32,72%
	30 dias	0,39	-21,0%	2,52	-15,21%

6.2 Ingestão controlada de bebidas alcoólicas

As concentrações de etanol encontradas em ar exalado, saliva e urina em função do tempo após a ingestão das bebidas alcoólicas estão apresentadas na Tabela 11.

Tabela 11 - Concentração de etanol em ar exalado, saliva e urina em 10, 30, 60 e 90 min após o término de ingestão da cerveja, e antes do início do experimento (tempo 0) para os voluntários do sexo feminino (de 1 a 5) e masculino (de 6 a 10).

	Concentração de Etanol em função do tempo de coleta (min)														
	Ar Exalado (mg L^{-1})					**Urina (g L^{-1})**					**Saliva (g L^{-1})**				
	0	10*	30	60	90	0	10	30	60	90	0	10	30	60	90
1	0	0,25	0,27	0,19	0,10	0	0,26	0,25	0,51	0,19	0	0,02	0,01	0,03	0,04
2	0	0,50	0,25	0,23	0,20	0	0,14	0,42	0,32	0,18	0	0,01	0,20	0,39	0,06
3	0	0,93	0,25	0,23	0,20	0	0,10	0,37	0,23	0,14	0	0,07	0,15	0,08	0,02
4	0	0,99	0,26	0,19	0,20	0	0,04	0,38	0,41	0,27	0	0,10	0,02	0,16	0,09
5	0	0,59	0,20	0,21	0,20	0	0,01	0,52	0,18	0,26	0	0,45	0,40	0,40	0,29
Média	0	0,65	0,26	0,21	0,18	0	0,11	0,39	0,33	0,21	0	0,13	0,16	0,21	0,10
6	0	0,26	0,27	0,15	0,10	0	0,01	0,12	0,11	0,17	0	0,42	0,39	0,26	0,05
7	0	0,22	0,27	0,26	0,20	0	0,52	0,57	0,61	0,49	0	0,07	0,21	0,12	0,15
8	0	0,49	0,27	0,23	0,20	0	0,05	0,54	0,26	0,32	0	0,02	0,05	0,15	0,02
9	0	0,59	0,25	0,22	0,20	0	0,04	0,41	0,46	0,29	0	0,03	0,01	0,07	0,06
10	0	0,70	0,25	0.16	0,10	0	0,39	0,56	0,26	0,34	0	0,04	0,04	0,07	0,01
Média	0	0,45	0,25	0,20	0,16	0	0,20	0,44	0,34	0,32	0	0,12	0,14	0,13	0,05

Para mostrar o perfil de absorção e eliminação de etanol no organismo, as concentrações médias foram relacionadas com o tempo após a ingestão da bebida. Como pode ser observado pela Tabela 11, houve no tempo de 10 min uma concentração de etanol muito alta, porém como o esperado para um indivíduo em jejum é que o máximo de concentração de etanol no ar exalado ocorra em 30 min (como um reflexo da concentração máxima de etanol no sangue), altas concentrações de etanol em 10 min sugere que o etilômetro sofreu interferência de etanol residual da cavidade bucal dos voluntários (MANSON; DUBOWSKI, 1996). Barquin et al (2008) utilizou o mesmo etilômetro, o Alcotest 7410 da Dräger, e reportou que o aparelho falhou em medir a concentração de etanol em ar exalado quando a medição foi feita logo em seguida à ingestão de bebidas alcoólicas. Dessa forma, a fim de evitar erros de interpretação, os resultados serão discutidos a partir de 30 min da ingestão de etanol. Para efeito de comparação, as Figuras 7 e 8 apresentam as concentrações de etanol na saliva e ar exalado, e as Figuras 9 e 10 na saliva e na urina para os gêneros feminino e masculino.

Em um estudo realizado por Gubala et al. (2002), saliva e ar exalado foram utilizados para determinação de etanol após a ingestão controlada de bebidas. Observou-se que as curvas

de concentração de etanol em função do tempo para as amostragens para a saliva e ar exalado eram muito semelhantes. No presente estudo, o mesmo perfil foi observado para a saliva e ar exalado, e saliva e urina, com pequenas diferenças quanto ao gênero.

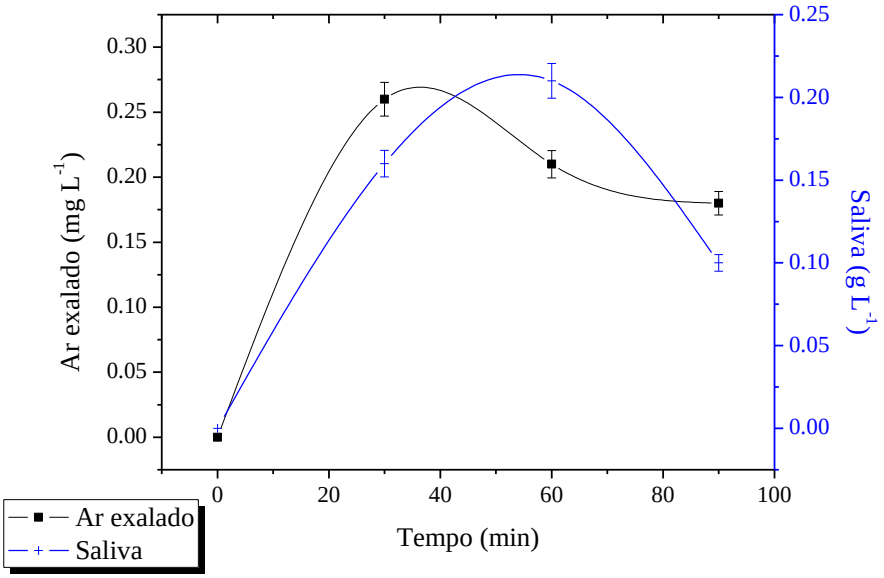


Figura 7 - Concentração de etanol no ar exalado e na saliva nos tempos 30, 60 e 90 min após a ingestão da cerveja para os voluntários do sexo feminino.

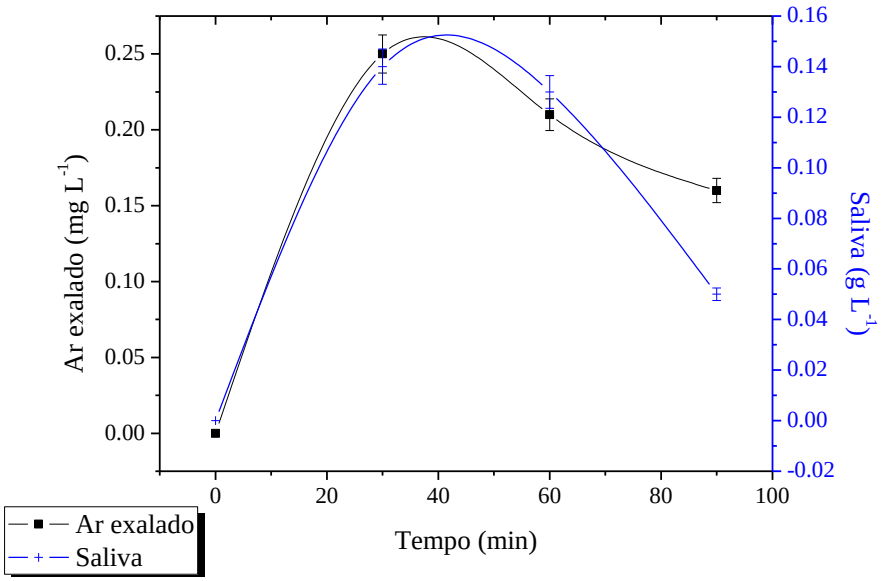


Figura 8 - Concentração de etanol no ar exalado e na saliva nos tempos 30, 60 e 90 min após a ingestão da cerveja para os voluntários do sexo masculino.

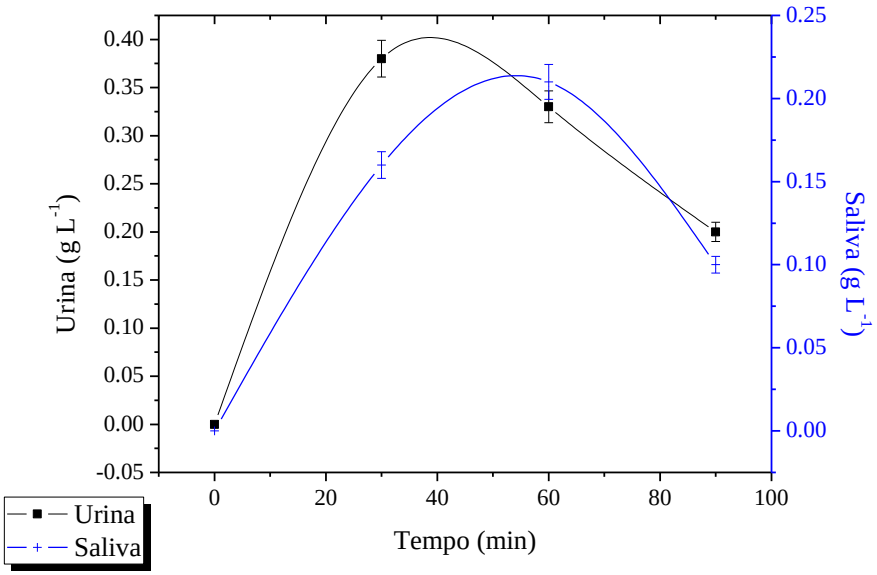


Figura 9 - Concentração de etanol na urina e saliva nos tempos 30, 60 e 90 min após a ingestão de cerveja para o sexo feminino.

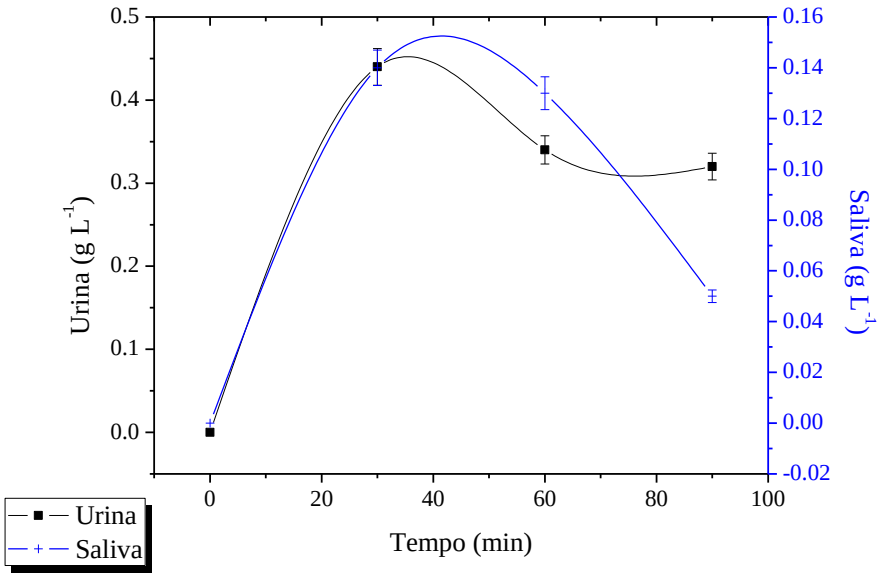


Figura 10 - Concentração de Etanol na urina e saliva nos tempos 30, 60 e 90 min após a ingestão de cerveja para o sexo masculino.

Pode ser observado na Tabela 11, que a concentração máxima média de etanol na urina ocorre em 30 min, atingindo os valores de 0,39 g L^{-1} para mulheres e 0,44 g L^{-1} para homens. No estudo de De Martinis et al. (2004), no qual a mesma quantidade de etanol foi

ingerida (0,5 g de etanol/kg de peso corporal), as concentrações máximas obtidas na amostra de urina foram menores, 0,35 g L^{-1} para homens e 0,28 g L^{-1} para mulheres, e ocorreram entre os tempos maiores de 90 a 120 minutos.

No estudo de De Martinis et. al. (2004), o experimento foi realizado após os voluntários terem ingerido alimento, o que pode ter retardado a absorção do etanol pelo intestino delgado, alterando o tempo no qual ocorreu a concentração máxima e o valor da concentração máxima.

De acordo com Baselt (1996) a presença de alimento no estômago resulta em uma diminuição na concentração e tempos maiores para a ocorrência de pico de concentração máxima de etanol no sangue devido à diminuição na velocidade de absorção. Assim, a presença de alimento pode influenciar também nas concentrações de etanol em fluídos corporais, uma vez que a presença de etanol em outros locais do organismo depende da presença de etanol no sangue.

As concentrações máximas de etanol na saliva para gêneros diferentes ocorrem em tempos distintos (Tabela 11). Para o sexo feminino o valor 0,21 g L^{-1} corresponde ao tempo de 60 min, enquanto que o valor 0,14 g L^{-1} para o masculino ocorre em 30 min.

O trabalho realizado por Jones (1993) mostrou que valores máximos de concentração de etanol em saliva foram atingidos em um tempo de 40 min, depois da ingestão de quantidade de etanol de 0,68 g kg^{-1} em homens que haviam se alimentado antes da realização do experimento. No estudo conduzido por Giang (2007), a concentração máxima de etanol foi obtida após 60 min para ambos os gêneros, com ingestão prévia de alimentos e de concentração de etanol ainda maior (0,8 g kg^{-1} para as mulheres e 1,0 g kg^{-1} para os homens).

Verifica-se que a concentração de etanol máxima para o sexo masculino no presente estudo, foi atingida em um tempo menor em comparação a Jones (1993) e Giang (2007) cujos estudos foram realizados na presença de alimento. Porém, o tempo de concentração máxima encontrada para o sexo feminino não foi afetado pela ausência de alimento, ocorrendo no tempo de 60 minutos como no estudo de Giang (2007).

Sabe-se que, assim como a urina, a saliva é um espécime de alta variabilidade, o que provavelmente explica os dados divergentes nos tempos de concentração máxima para a saliva (Caplan, 1996).

Com a finalidade de verificar a correlação existente entre a concentração de etanol em saliva e ar exalado e, saliva e urina foram calculadas a associação linear entre as concentrações através da correlação de Pearson (Tabela 12).

Tabela 12 - Correlação de Pearson entre saliva e os fluídos corporais ar exalado e urina para homens e mulheres.

	Correlação de Pearson	
Gênero	**Saliva/ar exalado**	**Saliva/urina**
Feminino	0,88	0,93
Masculino	0,96	0,91

Pode ser observado na Tabela 12 que a amostra de saliva apresenta correlação significativa com o ar exalado e com urina. Quanto mais próximo da unidade 1 (em módulo) estiver o valor da correlação, maior o grau de dependência estatística linear entre as variáveis (Filho, 2009). Sendo assim podemos dizer que as concentrações de etanol na saliva possuem forte correlação com as concentrações no ar exalado e urina, pois os valores de correlação de Pearson variaram entre 0,88 a 0,96.

6.3 Avaliação da interferência do etanol presente em enxaguatórios bucais no teste do Etilômetro

A Figura 11 apresenta os resultados das análises cromatográficas de etanol presente nos enxaguatórios bucais utilizados no projeto.

O enxaguatório com maior concentração de etanol utilizado no trabalho foi o Anapyon® (190,7 g L^{-1}), seguido pelo Listerine Cuidado Total® (124,0 g L^{-1}), Listerine Cool Mint® (121,9 g L^{-1}), Cepacol® (101,0 g L^{-1}), Periogard® (76,40 g L^{-1}). Apesar de não informar a porcentagem de etanol no produto, todos estes apresentam em sua composição etanol. Não foi detectada a presença de etanol no enxaguatório bucal Oral B®.

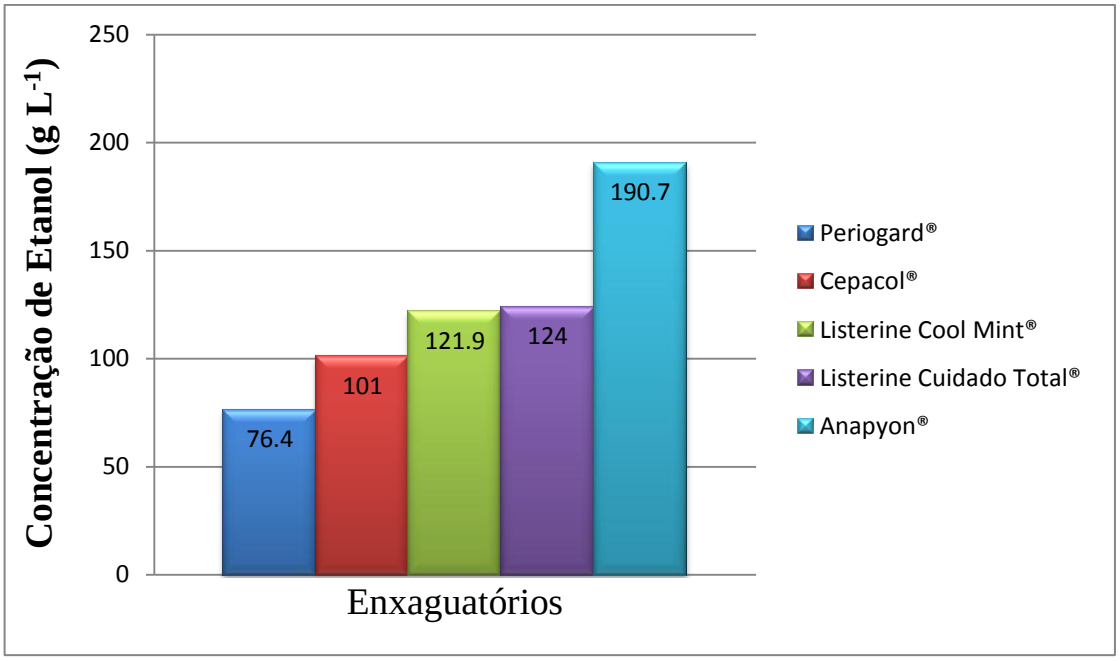


Figura 11 - Concentração de etanol (g L^{-1}) dos enxaguatórios utilizados na análise de interferência no teste do etilômetro.

As Tabelas 13, 14, 15, 16 e 17 apresentam os resultados das análises de etanol no ar exalado com o etilômetro e nas amostras de saliva de cada voluntário para cada enxaguatório bucal com etanol em sua composição. As análises tanto do ar exalado como da saliva dos voluntários que fizeram uso de enxaguatório bucal sem etanol (Oral B®) e de água apresentaram resultados negativos para etanol.

Tabela 13 – Concentração de etanol no ar exalado (mg L^{-1}) em 1, 5, 10 e 15 min e concentração de etanol na saliva (g L^{-1}) em 1 min após o uso de Listerine Cuidado Total®.

Voluntário	**Concentração de etanol no ar exalado (mg L^{-1}) após o uso de Listerine Cuidado Total®**				**Concentração de etanol na saliva após o uso de Listerine Cuidado Total® (g L^{-1})**
	1 min	5 min	10 min	15 min	1 min
36	1,67	0,25	0,06	0	3,07
32	2,99	0,95	0,17	0	16,62
38	1,84	0,27	0	0	7,58
83	2,42	0,27	0	0	5,75
47	2,29	0,41	0,05	0	3,98
3	1,13	0,19	0	0	1,31
137	1,44	0,14	0	0	1,78
120	1,92	0,28	0,05	0	1,49
41	1,42	0,2	0	0	2,99
112	1,68	0,16	0	0	3,26
7	1,13	0,19	0	0	0,97
136	1,22	0,17	0	0	3,94
81	0,67	0,07	0	0	1,93
120	2,3	0,57	0,08	0	5,36
90	1,9	0,63	0,06	0	5,81
2	2,04	0,25	0	0	1,87
25	2,18	0,64	0,26	0,09	6,17
52	1,59	0,16	0	0	1,49
72	1,55	0,14	0	0	1,72
131	1,54	0,21	0	0	2,06
Média	1,75	0,31	0,04	0,00	3,96

Tabela 14 – Concentração de etanol no ar exalado (mg L^{-1}) em 1, 5, 10 e 15 min e concentração de etanol na saliva (g L^{-1}) em 1 min após o uso de Listerine Cool Mint®.

Voluntário	**Concentração de etanol no ar exalado (mg L^{-1}) após o uso de Listerine Cool Mint®**				**Concentração de etanol na saliva após o uso de Listerine Cool Mint® (g L^{-1})**
	1 min	5 min	10 min	15 min	1 min
98	1,05	0,12	0	0	1,811
128	0,77	0,44	0,09	0	2,97
117	1,75	0,58	0,06	0	1,1
110	1,7	0,45	0,06	0	6,69
30	0,62	0,15	0	0	0,75
103	2,53	0,42	0,1	0	5,22
8	1,31	0,18	0,05	0	3,15
138	2,23	0,29	0,05	0	4,33
55	2,12	0,33	0,06	0	6,09
107	2,03	0,34	0,08	0	4,09
38	1,93	0,32	0	0	3,37
19	1,58	0,16	0	0	1,27
9	1,29	0,18	0	0	4,18
94	2,78	0,42	0,05	0	1,68
23	0,86	0,3	0,1	0	2,23
7	1,35	0,31	0	0	1
105	0,89	0,13	0	0	2,4
74	1,77	0,23	0	0	4,12
3	0,69	0,14	0	0	2,09
125	0,54	0,06	0	0	2,22
Média	1,49	0,28	0,04	0,00	3,04

Tabela 15 – Concentração de etanol no ar exalado (mg L^{-1}) em 1, 5, 10 e 15 min e concentração de etanol na saliva (g L^{-1}) em 1 min após o uso de Periogard®.

Voluntário	**Concentração de etanol no ar exalado (mg L^{-1}) após o uso de Periogard®**				**Concentração de etanol na saliva após o uso de Periogard® (g L^{-1})**
	1 min	5 min	10 min	15 min	1 min
108	1,68	0,41	0,08	0	2,44
103	0,97	0,18	0	0	5,12
54	1,23	0,13	0	0	2,51
114	1,42	0,2	0	0	2,06
29	1,29	0,09	0	0	1,36
102	1,27	0,32	0,14	0	2,25
14	2,03	0,38	0	0	1,46
35	1,42	0,22	0	0	5,45
108	1,33	0,12	0	0	2,07
98	1,45	0,29	0	0	4,34
9	1,51	0,09	0	0	2,48
94	1,54	0,2	0	0	2,62
25	1,03	0,1	0	0	0,62
12	1,35	0,17	0	0	2,24
20	1,12	0,3	0,05	0	0,57
131	1,08	0,23	0,06	0	1,48
75	1,11	0,08	0	0	0,78
45	0,81	0,06	0	0	0,59
36	1,46	0,15	0	0	1,65
68	1,27	0,2	0	0	3,14
Média	1,32	0,20	0,02	0,00	2,26

Tabela 16 – Concentração de etanol no ar exalado (mg L^{-1}) em 1, 5, 10 e 15 min e concentração de etanol na saliva (g L^{-1}) em 1 min após o uso de Anapyon®.

Voluntário	**Concentração de etanol no ar exalado (mg L^{-1}) após o uso de Anapyon®**				**Concentração de etanol na saliva após o uso de Anapyon® (g L^{-1})**
	1 min	5 min	10 min	15 min	1 min
128	2,34	0,31	0	0	9,41
47	1,17	0,15	0	0	4,87
132	1,29	0,08	0	0	5,2
38	2,52	0,6	0,13	0	4,05
34	1,51	0,18	0,05	0	5,14
16	1,16	0,11	0,05	0	3,04
87	2,51	0,38	0,12	0	10,06
46	2,99	0,78	0,18	0	8,14
127	2,04	0,09	0	0	5,91
128	2,36	0,21	0,05	0	6,98
27	1,8	0,34	0	0	6,97
101	1,25	0,12	0,06	0	1,78
79	2,19	0,31	0,12	0	8,01
19	2,75	0,42	0,05	0	5,99
8	2,06	0,33	0	0	4,55
18	1,85	0,34	0,07	0	7,11
92	1,08	0,09	0	0	1,7
51	0,89	0,15	0	0	6,89
66	1,76	0,13	0	0	5,96
70	0,71	0,05	0	0	4,95
Média	1,81	0,26	0,04	0,00	5,84

Tabela 17– Concentração de etanol no ar exalado (mg L^{-1}) em 1, 5, 10 e 15 min e concentração de etanol na saliva (g L^{-1}) em 1 minuto após o uso de Cepacol®.

Voluntário	**Concentração de etanol no ar exalado (mg L^{-1}) após o uso de Cepacol®**				**Concentração de etanol na saliva após o uso de Cepacol® (g L^{-1})**
	1 min	5 min	10 min	15 min	1 min
47	2,29	0,59	0,14	0	5,13
33	2,7	0,36	0,05	0	3,04
62	2,6	0,52	0,07	0	1,84
116	2,33	0,65	0,17	0,05	2,88
107	1,62	0,13	0,05	0	1,37
101	1,39	0,28	0,07	0	2,23
38	1,32	0,22	0	0	1,74
63	1,84	0,5	0,1	0	6,26
15	1,66	0,47	0,12	0	2,33
60	1,41	0,16	0	0	1,56
122	1,24	0,22	0	0	2,2
14	1,74	0,14	0	0	2,37
76	2,72	0,36	0,06	0	1,56
118	1,72	0,05	0	0	2,36
1	2,39	0,32	0,07	0	2,01
28	1,78	0,25	0,05	0	1,64
19	2,47	0,26	0,06	0	3,63
78	2,09	0,32	0,08	0	7,06
113	1,51	0,15	0,06	0	1,79
93	1,62	0,14	0	0	1,37
Média	1,92	0,30	0,04	0	

Observa-se que o etanol presente nos enxaguatorios bucais interferiu no teste do Etilômetro. A maioria das concentrações de etanol no ar exalado permaneceram altas até 10 min após o uso dos produtos, variando de 0,02 à 0,26 mg L^{-1}, e cinco minutos depois todas as concentrações atingiram níveis zero. Apenas dois voluntários, os de número 25 e 116, obtiveram resultados positivos no teste do etilômetro ainda em 15 min, com concentração de etanol no ar exalado de 0,05 e 0,09 mg L^{-1}, respectivamente, e suficientemente altas para extrapolar ou igualar o limite permitido por lei de 0,05 mg L^{-1}, que caracteriza o ato como infração administrativa.

6.4 Avaliação da interferência do etanol presente em enxaguatórios bucais na dosagem do etanol na saliva

A interferência do etanol oriundo dos enxaguatórios bucais também foi verificada para a dosagem de etanol em saliva. Para este ensaio foi utilizado somente um tipo de enxaguatório, o Listerine Cuidado Total®, que contém a maior concentração de etanol depois do Anapyon®. As concentrações de etanol na saliva (g L^{-1}) com o tempo após o uso do enxaguatorio encontram-se na Tabela 18.

Tabela 18– Concentração de etanol na saliva (g L^{-1}) com o tempo após o uso de Listerine Cuidado Total®.

	Concentração de etanol na saliva g L^{-1}			
Voluntário	**5 min**	**10 min**	**15 min**	**20 min**
1	0,80	0,17	0,10	0,00
2	0,80	0,17	0,10	0,00
3	0,53	0,11	0,07	0,00
4	0,48	0,09	0,06	0,00
5	0,89	0,21	0,09	0,00
6	0,50	0,09	0,06	0,00
7	0,62	0,11	0,07	0,00
8	0,52	0,08	0,05	0,00
9	0,35	0,09	0,07	0,00
10	0,93	0,14	0,06	0,00
11	0,74	0,12	0,06	0,00
12	1,61	0,27	0,09	0,00
13	0,55	0,08	0,07	0,00
14	2,03	0,34	0,12	0,00
15	0,80	0,11	0,07	0,00

Verifica-se que houve interferência de etanol oriundo do enxaguatório bucal na análise da saliva até 15 minapós o uso. A legislação brasileira não regulamenta o limite de etanol presente na saliva, mas existe um limite legal para a concentração de etanol no sangue que pode ser estimada a partir da concentração de etanol na saliva. Caplan (1996) em um estudo com 21 voluntários sadios encontrou que a partir de 30 min de ingestão de bebida alcoólica, a concentração de etanol na saliva em relação ao sangue se manteve constante a uma razão de 1,10. Sendo assim, para que se pudesse verificar a implicação legal que a presença de etanol na saliva pudesse gerar, a concentração de etanol no sangue foi estimada a partir da concentração de etanol na saliva, os resultados se encontram na Tabela 19.

Tabela 19 – Concentração de etanol no sangue (dg L^{-1}) estimada a partir da concentração de etanol na saliva utilizando a razão 1,10 (saliva/sangue) com o tempo após o uso de Listerine Cuidado Total®.

	Concentração de etanol no sangue dg L^{-1} estimada a partir da saliva			
Voluntário	**5 min**	**10 min**	**15 min**	**20 min**
1	7,27	1,55	0,91	0
2	7,27	1,55	0,91	0
3	4,82	1,00	0,64	0
4	4,36	0,82	0,55	0
5	8,09	1,91	0,82	0
6	4,55	0,82	0,55	0
7	5,64	1,00	0,64	0
8	4,73	0,73	0,45	0
9	3,18	0,82	0,64	0
10	8,45	1,27	0,55	0
11	6,73	1,09	0,55	0
12	14,64	2,45	0,82	0
13	5,00	0,73	0,64	0
14	18,45	3,09	1,09	0
15	7,27	1,00	0,64	0

Pela concentração de etanol no sangue estimada pela saliva, de acordo com a Tabela 19, nota-se que o limite de etanol no sangue, que caracteriza o ato como infração administrativa, ou seja, limite zero é ultrapassado em até 15 min após o uso do enxaguantório bucal. Em 5 min após o uso, a maioria das concentrações de etanol ultrapassam o limite de 6 dg L^{-1}, caracterizando o ato como crime. Somente em vinte minutos após o uso, nenhuma concentração de etanol é observada, excluindo qualquer risco de penalidade para quem fez o uso do enxaguatório.

7 CONCLUSÃO

O método desenvolvido para análise de etanol em saliva e urina, utilizando-se a técnica de extração por *Headspace* e a análise por cromatografia gasosa acoplada a detector FID, se demonstrou eficiente, sensível e com resultados reprodutíveis para o fim proposto.

Os resultados da ingestão controlada de bebidas alcoólicas mostram que os perfis de metabolização de etanol em função do tempo da saliva é semelhante ao perfil do ar exalado e urina para ambos os gêneros.. A correlação de Pearson confirmou essa semelhança revelando alta dependência linear entre as variáveis, com valores muito próximos a 1 variando de 0,88 a 0,96. Sendo assim a saliva é uma matriz adequada para a avaliação da embriaguez de motoristas no trânsito.

A análise de etanol em ar exalado demonstrou ser suscetível à interferência de etanol oriundo dos produtos dos produtos de higiene oral. A concentração de etanol no ar exalado, para a maioria dos voluntários, permaneceu alta até o tempo de 10 min, baixando a zero 5 min depois. Porém, para dois voluntários a concentração em 15 min, ainda se mostrou alta e atingiu o limite permitido por lei de 0,05 mg L^{-1}. Isso mostra que se deve esperar no mínimo 20 minutos entre o uso do enxaguatório bucal e a realização do teste do etilômetro.

O etanol oriundo dos enxaguatórios, assim como na análise de ar exalado, interferiu na análise de saliva. As concentrações de etanol na saliva permaneceram altas até 15 min, e todos os resultados atingiram níveis zero em 20 min. Sendo assim, para evitar um resultado falso positivo para a ingestão de bebidas alcoólicas, é necessário esperar 20 min entre o uso dos enxaguatórios e a coleta de saliva.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução n° 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027_17_05_2012.html>. Acesso em: 18 jun. 2014.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução n° 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos bioanaliticos. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br>. Acesso em: 18 jun. 2014.

BARQUÍN, J.; LUNA, J. D.; HERNÁNDEZ, A. F. A controlled studiof the time-course of breath alcohol concentration after moderate ingestion of ethanol following a social drinking session. **Forensic Science International**, v. 177, p. 140-145, 2008.

BASELT, R. Disposition of Alcohol in Man. In: GARRIOT, J. C. **Medicolegal Aspects of Alcohol**. 3 Ed.Tucson: Lawyers & Judges Publishing Company, 1996. cap. 3, p. 65-78.

BRASIL. **Conselho Nacional de Trânsito**. Resolução nº 432, de 23 de janeiro de 2013. Dispõe sobre os procedimentos a serem adotados pelas autoridades de trânsito e seus agentes na fiscalização do consumo de álcool ou de outra substância psicoativa que determine dependência, para aplicação do disposto nos arts. 165, 276, 277 e 306 da Lei nº 9.503, de 23 de setembro de 1997 – Código de Trânsito Brasileiro (CTB). Disponível em: <http://www.denatran.gov.br/download/Resolucoes/(resolu%C3%A7%C3%A3o%20432.2013c).pdf>. Acesso em: .16 jun. 2014.

BRASIL. **Presidência da República**. Lei n° 9503, de 23 de setembro de 1997, que institui o Código de Trânsito Brasileiro. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l9503.htm. Acesso em: 16 jun. 2014.

BRASIL. **Presidência da República**. Lei n° 12760, de 20 de dezembro de 2012. Altera a Lei n° 9503, de 23 de setembro de 1997, que institui o Código de Trânsito Brasileiro. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2011-2014/2012/Lei/L12760.htm#art1>. Acesso em : 16 jun. 2014.

CAMPIGLIA, A. D.;VO-DINH, T. Rapid screening method for cocaine and benzoylecgonine in saliva samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 372, p. 349-355, 1998.

CAPLAN, Y. Blood, Urine, and Other Fluid and Tissue Specimens for Alcohol Analyses. In: GARRIOT, J. C. 3 Ed. **Medicolegal Aspects of Alcohol**. Tucson: Lawyers & Judges Publishing Company, 1996. cap. 5, p. 137-144.

CONE, E. J.; JENKINS, A. J. Saliva drug analysis. In: WONG, S. H. Y.,; SUNSHINE, I. **Handbook of analytical therapeutic drug monitoring and toxicology**. Boca Raton: CRC press, 1997, cap. 18, p. 303-334.

DE MARTINIS, B. S.; OLIVEIRA, M. F. Exame do teor alcoólico em acidentes de trânsito. In: BRUNI, A. T.;VELHO, J. A., *et al*. **Fundamentos de Química Forense**. 1 Ed. Campinas: Millennium, 2012. cap. 6, p.106-121.

DE MARTINIS, B. S.; RUZZENE, M. A. M.; MARTIN, C. C. S. Determination of ethanol in human blood and urine by automated *Headspace* solid-phase microextraction and capillary gas chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, p 163-168, 2004.

DEL RIO, M. C.; ALVAREZ, F. J. Alcohol use among fatally injured drivers in Spain. **Forensic Science International,** v. 104, p. 117-125, 1999.

DUNNETT, N.; KIMBER, K. J. Urine-Blood Alcohol Ratio. **Journal of the Forensic Science Society**, Newcastle upon Tyne, v. 8, n. 1, pg. 15-24, 1968.

ECKARDT, M. J.; FILE, S. E.; GESSA, G. L.; GRANT, K. A.; GUERRI, C.; HOFFMAN, P; L.; KALANT, H.; KOOB, G. F.; LI, T.; TABAKOFF, B. Effects of Moderate Alcohol Consumption on the Central Nervous System. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 22, n. 5, p. 998-1040, 1998.

FILHO, D. **Desvendando os Mistérios do Coeficiente de Correlação de Pearson (r)** Revista Política Hoje. 18 2009.

GARCÍA, J. M. I.; GARCÍA, J. .M. I.; BARRIOS, J. A.; GIRALDEZ, M. J. C.; IGLESIAS, C. H. A Comparison of Standard Inhalers for Asthma With and Without Alcohol as the Propellant on the Measurement of Alcohol in Breath. **Journal of Aerosol Medicine**, v. 18, n. 1, p. 193-197, 2005.

GARRIOTT, J. C. Pharmacology and Toxicology of Ethyl Alcohol. In: GARRIOTT, J. C. **Medicolegal Aspects of Alcohol.** 3 Ed. Tucson: Lawyers & Judges Publishing Company, 1996. cap. 2, p. 35-54.

GIANG, Y.; WANG, S.; TSAI, C.; LEE, M.; NG, C. Analyzing alcohol in breath, blood, saliva, and urine for forensic purposes: Taiwanese population. **Forensic Science International,** v. 6, n.1, p. 1-9, 2007.

GUBALA, W.; ZUBA, D. Saliva as an alternative specimen for alcohol determination in human body. **Polish Journal of Pharmacology**, v. 54, p. 161-165, 2002.

HOLMGREN, P.; HOLMGREN, A.; AHLNER, J. Alcohol and drugs in drivers fatally injured in traffic accidents in Sweden during the years 2000-2002. **Forensic Science International,** v. 151, n. 1, p. 11-17, 2005.

JONES, A. W.; BEYLICH, K. M.; BJØRNEBOE, A.; INGUM, J.; MØRLAND, J. Measuring Ethanol in Blood and Breath for Legal Purposes: Variability between Laboratories and between Breath-Test Instruments. **Clinical Chemistry**, v 38, n. 5, p. 743-747, 1992.

JONES, A. W. Pharmacokinetics of ethanol in saliva: comparison with blood and breath alcohol profiles, subjective feeling of intoxication, and diminished performance. *Clin. Chem.*, Washington, v.39, 1837-1844, 1993.

KALANT, H. Pharmacokinetics of ethanol: absorption, distribution, and elimination. In: BEGLEITER, H.; KISSIN, B. **The Pharmacology of Alcohol and Alcohol Dependence**. Oxford: Oxford University Press, 1996, cap.1 ,pp. 15–58.

KIDWELL, D. A.; HOLLAND, J. C.; ATHANASELIS, S. Testing for drugs of abuse in saliva and sweat. **Journal of Chromatography B**, v. 713, p. 111-135, 1998.

KOLB, B.; ETTRE, L. S. **Static *Headspace*-Gas Chromatography:** Theory and Practice**.** 2 Ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. 332 p.

LARSON, B. T. Gas chromatography of organic volatiles in human breath and saliva. **Acta Chemica Scandinavica**. v. 19, p. 159-164, 1965.

LIDE, D.R. CRC Handbook of Chemistry and Physics. 90th Ed. Boca Raton: CRC Press, 2009.

MANSON, M.; DUBOWSKI, K. Breath as a Specimen for Analysis for Ethanol and Other Low Molecular Weight Alcohols. In: GARRIOT, J. C. **Medicolegal Aspects of Alcohol**. 3 Ed. Tucson: Lawyers & Judges Publising Company, 1996. cap. 7,

McANALLEY, B. H. Chemistry of Alcoholic Beverages. In: GARRIOT, J. C. **Medicolegal Aspects of Alcohol**. 3 Ed. Tucson: Lawyers & Judges Publishing Company, 1996. cap. 1, p. 1-27.

MODELL, J. G.; TAYLOR, J. P.; LEE, J. Y. Breath alcohol values following mouthwash use. **Journal of the American Medical Association.** v. 270, n. 24, p. 2955-2956, 1993.

PAYNE, J. P.; FOSTER, D. V.; HILL, D. W. Observations on interpretation of blood alcohol levels derived from analysis of urine. **British Medical Journal**, v. 3, n. 5569, p. 819-823, 1967.

PEREIRA, R. E.; PERDONÁ, G. S. C.; ZINI, L. C. CURY, M. B. S.; RUZZENE, M. A. M.; MARTIN, C. C. S.; De MARTINIS, B. S. Relation between alcohol consumption and traffic violations and accidents in the region of Ribeirao Preto, Sao Paulo State. **Forensic Science International**, v. 207, n. 1-3, p. 164-169, 2011.

PLA, A.; HERNANDEZ, A. F.; GIL, F.; ALONSO, M. G.; VILLANUEVA, E. A fatal case of oral ingestion of methanol. Distribution in postmortem tissues and fluids including pericardial fluid and vitreous humor. **Forensic Science International**, v. 49, p 193-196, 1991.

PONCE, J. C.; MUÑOS, D. R.; ANDREUCCETTI, G.; CARVALHO, D. G.; LEYTON, V. Alcohol-related traffic accidents with fatal outcomes in the city of Sao Paulo. **Accident Analysis and Prevention,** v. 43, n. 3, p. 782-787, 2011.

POULSEN, H.; MOAR, R.; TRONCOSO, C. The incidence of alcohol and other drugs in drivers killed in New Zealand road crashes 2004-2009. **Forensic Science International,** v. 223, n. 1-3, p. 364-370, 2012.

SCIVOLETTO, S.; MALBERGIER, A. Etanol. In: OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia.** 1 Ed. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo, 1996. cap. 4, pg. 285-296.

SCHRAMM, W.; SMITH, R. H.; CRAIG, P.A. Drugs of abuse in saliva: A review. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 16, n.1, p.1-9, 1991.

SCHUCKIT, M. A. Etanol e Metanol. In: BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As Bases Farmacológicas e Terapêuticas de *Goodman & Gilman*.** 12 Ed. Porto Alegre: AMGH EDITORA LTDA, 2012. cap. 23, p.629-647.

SNOW, N. H.; SLACK, G. C. Head-space analysis in modern gas chromatography. **Trends in analytical chemistry**, v. 21, n. 9-10, p-608-617, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global status report on alcohol and health. Geneva, 2014. 376 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global status report on road safety. Geneva, 2013. 303 p.

YONAMINE, M.; TAWIL, N.; MOREAU, R. L. M.; SILVA, O. A. Solid-phase micro-extraction-gas chromatography-mass spectrometry and *Headspace*-gas chromatography of tetrahydrocannabinol, amphetamine, methamphetamine, cocaine and ethanol in saliva samples. **Journal of Chromatography B**, v. 789, p. 73-78, 2003.

9 ANEXOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Capítulo IV, itens 1 a 3 da Resolução 196/96 – Conselho Nacional de Saúde)

Nós, Bruno Spinosa De Martinis e Ricardo Henrique Alves da Silva, docentes da Universidade de São Paulo, convidamos você, _____, RG: _____, para participar, como voluntário, da pesquisa intitulada **"AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ETANOL EM AMOSTRAS DE SALIVA E AR EXALADO APÓS A UTILIZAÇÃO DE PRODUTOS DE HIGIENE ORAL**", sob nossa responsabilidade.

Para participar na pesquisa você não receberá qualquer valor em dinheiro, mas terá a garantia de que todas as despesas necessárias para a sua participação não serão de sua responsabilidade. Seu nome não aparecerá em qualquer momento do estudo, preservando assim, sua identidade, pois suas informações pessoais serão mantidas sob absoluto sigilo. Esta pesquisa tem como finalidade avaliar, utilizando o teste do bafômetro, a concentração de álcool no ar exalado (sopro no bafômetro) e a concentração do mesmo álcool em amostras de saliva (o qual será coletado através de coleta de saliva em um pote, onde o voluntário irá, reservadamente, "cuspir" saliva (aproximadamente 1 mL). Para participar, você não poderá ter ingerido bebidas alcoólicas 24 horas antes das coletas de ar exalado e saliva. A coleta destas amostras não trará nenhum risco à sua saúde e, o único desconforto será "cuspir" 1 mL de sua saliva e assoprar em um canudinho descartável. Este trabalho tem como importância a busca pelo desenvolvimento científico, social e legal do país, permitindo o acesso à informação a respeito das técnicas utilizadas na rotina policial e sua confiabilidade, sendo de grande importância sua participação.

_____	_____	_____
Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis	Sujeito da Pesquisa	Prof. Dr. Ricardo Henrique Alves da Silva
CPF: 58876634649		CPF: 222.048.008-99
Pesquisador Responsável		Pesquisador