**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA
ÁREA DE ANÁLISES TOXICOLÓGICAS**

**Validação da urina para análise toxicológica de etanol
em “Programas de Controle e Prevenção do Uso de
Álcool e Drogas no Local de Trabalho”**

CRISTIANA LESLIE CORRÊA

**Dissertação para obtenção do grau de
Mestre**

**Orientador
Prof. Dr. Rosemary Custódio Pedroso**

**São Paulo
1997**

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

C824v	<p>Corrêa, Cristiana Leslie</p> <p>Validação da urina para análise toxicológica de etanol em "Programas de controle e prevenção do uso de álcool e drogas no local de trabalho" / Cristiana Leslie Corrêa. -- São Paulo, 1997. 99p.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.</p> <p>Orientador: Pedroso, Rosemary Custódio</p> <p>1. Toxicologia ocupacional 2. Toxicologia social 3. Álcool : Toxicologia 4. Etanol : toxicologia I. T. II. Pedroso, Rosemary Custódio, orientador.</p> <p style="text-align: right;">615.902 CDD</p>
-------	---

CRISTIANA LESLIE CORRÊA

**Validação da urina para análise toxicológica de
etanol em “Programas de Controle e Prevenção do
Uso de Álcool e Drogas no Local de Trabalho”**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Profa. Dra. Rosemary Custódio Pedrosa
Presidente e Orientador

Profa. Dra. Célia Regina Garlipp
2º Examinador

Prof. Tit. Seizi Oga
3º Examinador

São Paulo, 23 de maio de 1997.

Aos meus pais
Antonio e Laura (*em memória*),
e ao meu namorado
Reinaldo Nogueira,
Todo o meu amor e gratidão.

À Prof^ª Dra Rosemary Custódio Pedroso,
pelos valiosos ensinamentos, pela
dedicada orientação e pelo constante
apoio, a mais profunda gratidão e carinho.

AGRADECIMENTOS

Ao Coordenador e professores do Programa de Pós-graduação em Farmácia, área de Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP) pela oportunidade;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de estudo;

Aos professores Ovandir Silva e Yara Cretella pelas sugestões dadas no Exame de Qualificação e especialmente ao prof. Ovandir pela inestimável colaboração em diversos momentos;

Ao Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da PUCCAMP pela realização das determinações de AST, ALT, uréia e creatinina, em especial à professora Sheila Yumi Nakamura;

Ao professor Massayoshi Yoshida pela viabilização na aquisição do padrão de etanol Sigma;

À Fundação Banco do Brasil pelo financiamento dos equipamentos;

Aos voluntários que participaram deste trabalho, pela incrível colaboração e ajuda;

À Maria Auxiliadora A. Corrêa, pelo incentivo e colaboração durante o trabalho com os voluntários;

À P. Dattler pela gentileza na concessão do uso do monitor de álcool, em especial ao orientador técnico Alexandre Tavares;

À minha grande amiga Silvia de Oliveira Santos Cazenave pelo incentivo, colaboração, amizade e apoio;

À Fernanda Bozolla pela ajuda no armazenamento das amostras;

À Sueli Moreira de Mello, Iris Martins, Maria Paula Banwart e Ana Paula Fonseca pelo auxílio prestado no procedimento de colheita das amostras;

À todos os amigos e colegas da pós-graduação pelos bons momentos que tivemos juntos durante o curso;

Aos funcionários do setor de Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (USP) pela amizade e apoio, particularmente a Luísa Cardillo Ferolla, Marli Neves Assunção e Maurício Yonamine.

À Biblioteca do Conjunto das Químicas pela normalização das referências bibliográficas deste trabalho, em especial à Moema Rodrigues, e pelas inúmeras pesquisas bibliográficas, na pessoa de Adriana de Almeida Barreiros;

À todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Nos dias atuais tem havido uma crescente preocupação com o consumo de álcool, bem como de outras drogas de abuso, no local de trabalho. Com isso, começaram a ser implantados programas que visam o controle e a prevenção do uso de álcool e drogas neste ambiente. De um modo geral, esses programas utilizam a urina dos trabalhadores para a realização de análises toxicológicas. O presente trabalho procurou validar a urina como amostra para determinação do etanol, através da (1) padronização de um método de análise e (2) estudo das correlações entre concentrações sanguínea, urinária e no ar exalado, obtidas de 10 voluntários saudáveis, após administração oral única de bebida alcoólica na dose de 0,68 g de etanol por kg de peso corpóreo, em coletas realizadas durante período de 7 horas. Foi utilizado 1 mL de amostra adicionada de n-propanol (padrão interno), separação por *head space* e cromatografia em fase gasosa com coluna Poraplot Q 25m x 0,32mm, tendo sido obtidos os seguintes resultados: tempo de retenção do etanol $2.718 \pm 0,0024$ min., limite de detecção em sangue e urina, 0,07 e 0,01 g/l, respectivamente, precisão intra e interensaio igual a 11,4 e 10,0% para o sangue e 5,9 e 6,5% para a urina e recuperação relativa, $55,88 \pm 8,03$ a $146,35 \pm 13,07\%$ para o sangue e $91,60 \pm 0,81$ a $103,28 \pm 1,79\%$ para a urina. A comparação da técnica padronizada com a de imunofluorescência polarizada forneceu um r de 0,9976 para o sangue e 0,9949 para a urina. O estudo de conservação demonstrou que não houve produção in vitro de etanol nas amostras de urina, após permanência à temperatura ambiente por 1 semana. Os resultados de estabilidade mostraram que não houve variação estatisticamente significativa entre os resultados de análises feitas em intervalo de 30 dias, quando armazenadas em freezer com adição de fluoreto de sódio a 1% ($p=0,1088$ e $0,1548$, para sangue e urina, respectivamente). A técnica padronizada foi utilizada nas amostras de sangue e urina colhidas dos voluntários, mostrando-se adequada para a detecção de etanol, em concentrações que variaram de 0,03 a 1,44 g/L. Os valores de correlação urina : sangue nos diferentes tempos de coleta mostraram menor variação que os de sangue : ar exalado, sendo que no período entre 2 e 5 horas após a ingestão do álcool houve os menores desvios de valores de correlação, em todos os indivíduos estudados. Assim sendo, a urina colhida no tempo de 3 horas após o início ou reinício da jornada de trabalho pode ser recomendada para análise de etanol, em programas de controle e prevenção do uso de álcool e drogas no local de trabalho.

CONTEÚDO

1. INTRODUÇÃO	1
2. GENERALIDADES	4
2.1. Programas de prevenção e controle do uso de álcool e drogas no local de trabalho	4
2.1.1. Exames laboratoriais	5
2.1.2. A análise toxicológica do etanol	7
2.2. Toxicodinâmica do etanol	9
2.2.1. Sistema nervoso	9
2.2.2. Sistema cardiovascular	12
2.2.3. Sistema hepático	14
2.2.4. Fatores genéticos	16
2.2.4. Malnutrição e câncer	17
2.2.5. Hormônios	19
2.2.6. Barreira placentária	19
2.2.7. Atividade plaquetária	20
2.3. Toxicocinética do etanol	21
2.4. Aspectos analíticos	24
3. OBJETIVOS E PLANO DE TRABALHO	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Material	29
4.1.1. Solução-padrão	29
4.1.1.1. Solução estoque	29
4.1.1.2. Soluções de trabalho	29
4.1.2. Equipamentos e acessórios	30
4.1.3. Reagentes e outros materiais	30
4.1.4. Amostras	31
4.1.4.1. Voluntários sob administração de etanol	31
4.1.4.1.1. Amostras de sangue	32
4.1.4.1.2. Amostras de urina	32
4.1.4.1.3. Amostras de ar exalado	33
4.1.4.2. Voluntários utilizados como referência	33
4.2. Métodos	35
4.2.1. Padronização das condições cromatográficas para análise de etanol	35
4.2.1.1. Otimização dos parâmetros cromatográficos	35
4.2.1.2. Avaliação da especificidade da técnica	35
4.2.1.3. Estudo da linearidade da técnica	36

4.2.2. Padronização do procedimento para a determinação de etanol em sangue e urina com separação por <i>head space</i> e cromatografia em fase gasosa	36
4.2.2.1. Curvas de calibração	38
4.2.2.2. Estudo de recuperação	38
4.2.2.2.1. Recuperação relativa	38
4.2.2.2.2. Recuperação absoluta	39
4.2.2.3. Avaliação da precisão do método	39
4.2.2.4. Limite de detecção e limite de quantificação	40
4.2.2.5. Estudo de conservação e estabilidade das amostras	40
4.2.2.6. Precisão interindividual	41
4.2.2.7. Análise de amostras de referência	42
4.2.3. Comparação da técnica cromatográfica com a de imunofluorescência polarizada para determinação de etanol em sangue e urina	42
4.2.4. Determinação de etanol nas amostras provenientes dos voluntários	43
4.2.4.1. Amostras de sangue e urina	43
4.2.4.2. Amostras de ar exalado	43
4.2.5. Correlação entre as concentrações de etanol presentes no sangue, urina e ar exalado	44
5. RESULTADOS	45
5.1. Padronização das condições cromatográficas para análise de etanol	45
5.1.1. Otimização dos parâmetros cromatográficos	45
5.1.2. Avaliação da especificidade da técnica	46
5.1.3. Estudo da linearidade da técnica	47
5.2. Padronização do procedimento para a determinação de etanol em sangue e urina com separação por <i>head space</i> e cromatografia em fase gasosa	48
5.2.1. Curvas de calibração	49
5.2.2. Estudo de recuperação	53
5.2.2.1. Recuperação relativa	53
5.2.2.2. Recuperação absoluta	53
5.2.3. Avaliação da precisão do método	54
5.2.4. Limite de detecção e limite de quantificação	57
5.2.5. Estudo de conservação e estabilidade das amostras	57
5.2.6. Precisão interindividual	60
5.2.7. Análise de amostras de referência	61

5.3. Comparação da técnica cromatográfica com a de imunofluorescência polarizada para determinação de etanol em sangue e urina	62
5.4. Determinação de etanol nas amostras provenientes dos voluntários	63
5.4.1. Amostras de sangue e urina	63
5.4.2. Amostras de ar exalado	64
5.5. Correlação entre as concentrações de etanol presentes no sangue, urina e ar exalado	68
6. DISCUSSÃO	75
7. CONCLUSÕES	86
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
9. ANEXOS	98

1. INTRODUÇÃO

O uso abusivo de etanol entre os homens tem ocorrido desde a antiguidade, provavelmente a partir do momento em que as primeiras bebidas alcoólicas foram produzidas, acidentalmente, por fermentação natural^{2,27,28,80}.

Nos dias atuais, o consumo de álcool, bem como de drogas de abuso, apresenta estreita relação com o local de trabalho. É indiscutível o fato de que a maioria dos usuários de álcool e de drogas são trabalhadores, apesar de alguns estudos epidemiológicos sugerirem um grande índice de uso abusivo de substâncias psicoativas entre os indivíduos desempregados²⁷.

As alterações que estes fármacos causam no desempenho individual, assim como na habilidade de percepção de estímulos, coordenação visual, motora e no comportamento interpessoal são evidentes e citadas como fatores responsáveis por grandes transtornos no ambiente de trabalho, baixa produtividade, aumento do risco de acidentes, alto índice de ausência, entre outros problemas^{15,24,27,54,68,75}.

A detecção de drogas e álcool com propósitos epidemiológicos e toxicológicos surgiu há séculos, acreditando-se que os testes em urina datam do tempo de Hippócrates. Exames em trabalhadores, visando a avaliação da exposição a xenobióticos, iniciaram-se em 1916 nos EUA, com o movimento de Medicina Ocupacional²⁷. Contudo, apenas nas últimas décadas, começaram a ser implantados programas que visam controlar o uso de álcool e outras drogas no ambiente de trabalho⁹¹.

As inovações tecnológicas alcançadas nesse período trouxeram uma expansão muito grande das análises toxicológicas e, em 1986, o governo americano começou a juntar esforços para

oficializar programas de prevenção e controle do uso de álcool e drogas no trabalho⁹¹.

No Brasil, não há oficialmente nenhum projeto com objetivo similar. Todavia, diversas empresas, principalmente aquelas ligadas a trabalhos desenvolvidos em outros países, têm buscado por iniciativa própria implantar programas semelhantes entre seus trabalhadores. Algumas empresas de transporte rodoviário de derivados do petróleo já iniciaram o controle de seus funcionários, com resultados satisfatórios quanto à redução de acidentes^(*).

O “programa de controle e prevenção do uso de álcool e drogas no ambiente de trabalho” apresenta característica própria, envolvendo uma série de procedimentos e condutas laboratoriais^{27,41,58,68}.

A determinação do etanol neste contexto tem merecido um destaque especial em relação a outras drogas e fármacos, devido às suas propriedades físico-químicas e analíticas⁴¹.

Na Toxicologia Forense, a dosagem alcoólica é feita utilizando-se sangue e algumas vezes ar exalado, e a interpretação dos resultados apoia-se na Resolução nº 737, de 12/09/1989 que disciplina as ações e os meios para a comprovação de embriaguês do condutor de veículo, do Conselho Nacional de Trânsito do Ministério da Justiça. No caso de análises feitas em trabalhadores, poucos estudos foram conduzidos para estabelecer o melhor procedimento para a análise do etanol. De um modo geral, a urina tem sido a amostra de escolha nestes projetos, mas a sua utilização na determinação do etanol requer mais estudos^{13,70}.

O presente trabalho procurou validar a urina como amostra biológica na determinação do etanol, através da padronização e validação da metodologia analítica e da correlação do nível de etanol

(*) COSTA, C. A. L. Política de álcool e drogas na Esso Brasileira de Petróleo Ltda. In: A UTILIZAÇÃO DE TESTES PARA VERIFICAR A PRESENÇA DE DROGAS COMO PARTE DA POLÍTICA DE PREVENÇÃO E TRATAMENTO DE DEPENDÊNCIA QUÍMICA NA EMPRESA NO BRASIL, São Paulo, 1994, [trabalho apresentado].

no sangue, urina e ar exalado. Além disso, foi feita a comparação de duas técnicas analíticas, bastante utilizadas na determinação do etanol.

Os objetivos propostos surgiram para assegurar resultados confiáveis na análise do etanol, através da interpretação correta dos dados, tendo em vista o caráter ético e legal envolvido nestes programas.

2. GENERALIDADES

2.1. Programas de prevenção e controle do uso de álcool e drogas no local de trabalho

A prevenção e o controle do uso de álcool e drogas no ambiente de trabalho têm sido defendidos principalmente como uma forma de aumentar a segurança e a produtividade nestes locais, diminuir o problema com drogas e consequentemente melhorar a qualidade de vida. Esses programas também visam a identificação do usuário, encorajando-o a receber assistência e tratamento, além de diminuir a probabilidade de se envolver com atividades ilegais^{27,75}.

Porém, eles podem trazer alguns problemas como o abandono do local de trabalho e a invasão de privacidade. Além disso, podem ser utilizados de forma incorreta para intimidar os trabalhadores^{27,75}.

Para um programa dessa natureza ser eficiente, a empresa deve familiarizar-se com as leis e as condutas a serem aplicadas anteriormente à implantação do mesmo. Deve ser desenvolvido conjuntamente, entre funcionários e dirigentes da empresa, e possuir um médico responsável que trabalhe pelos seus pacientes em estrita colaboração com o laboratório toxicológico. Em países onde o programa já está implantado, esse médico é denominado “medical review officer” (médico revisor), cabendo a ele a interpretação dos resultados e o encaminhamento dos casos. As metas e os procedimentos do programa devem ser claros e comunicados a todas as partes envolvidas antes da implementação do mesmo^{27,75}.

As implicações éticas, morais e legais deste programa precisam ser amplamente discutidas, para que os resultados não sirvam apenas para afetar a manutenção do emprego ou ser um componente na seleção dos candidatos a um novo emprego, não devendo ferir a privacidade do indivíduo e a confidencialidade entre paciente e médico. Busca trazer soluções para problemas de responsabilidade para com a sociedade (ex. segurança), proteção dos interesses coletivos e da empresa, e garantir os direitos individuais, inclusive os de eventuais vítimas de acidentes provocados por indivíduos sob uso de drogas^{15,16,67}. A saúde do trabalhador, a segurança no trabalho e a qualidade do mesmo, a produtividade e o reflexo que este controle possa ter para reduzir o uso e o abuso de álcool e drogas na sociedade são objetivos a serem frequentemente discutidos nos programas^{15,58,68}.

Os laboratórios toxicológicos que conduzem os exames de amostras biológicas desses funcionários e dirigentes devem estar preparados para os padrões de confiabilidade exigidos, sendo essencial a implantação de procedimentos de controle de qualidade^{27,68}.

2.1.1. Exames laboratoriais

A avaliação do desempenho psicomotor tem sido uma alternativa à detecção laboratorial das substâncias proibidas em material biológico. Sendo extremamente útil em algumas situações, esta conduta apresenta restrições devido às grandes diferenças individuais que dificultam o seu êxito na avaliação das condições de segurança no local de trabalho⁵⁸.

Os testes de drogas e álcool no ambiente de trabalho visam informar se o indivíduo fez uso ou não de determinada substância, pela identificação da mesma ou de produtos de sua biotransformação em material biológico colhido do trabalhador. Não há condições técnicas para informar quando houve o consumo ou qual foi a dose ingerida, sendo qualitativo de um modo geral^{41,58}.

Dois tipos de procedimento analítico são realizados: os testes de triagem e os de confirmação. Na triagem, geralmente utilizam-se técnicas de imunoensaio, onde um resultado positivo deve ser necessariamente confirmado por métodos mais confiáveis, como a espectrometria de massa. Os testes confirmatórios são requeridos em todas as análises laboratoriais, sendo inaceitável um resultado falso-positivo, pelos aspectos morais, éticos e legais já discutidos^{13,41,58,68,77}.

O laboratório deve estabelecer medidas de segurança para garantir que o material biológico seja devidamente documentado, processado e armazenado. Este procedimento para manter a integridade do espécime biológico a ser testado é conhecido como cadeia de custódia e tem como objetivo garantir a segurança da amostra desde a coleta e transporte até o armazenamento e a análise laboratorial^{13,41,68,76,77}.

A amostra biológica recomendada para os programas é a urina, pois apresenta concentração relativamente maior de drogas e/ou de seus produtos de biotransformação quando comparada com o sangue. Na urina, estes podem ser detectados por um período de tempo maior após o consumo, embora o tempo varie em

função do agente tóxico considerado. Além disso a colheita da urina é um processo não invasivo, que não necessita de pessoas especializadas, e é uma matriz menos complicada que o sangue em relação aos constituintes e ao volume disponível, simplificando desta maneira a preparação da amostra e análise^{5,13,41,70,76,77}.

2.1.2. A análise toxicológica do etanol

O problema da legalidade e da aceitação social do álcool faz com que os testes de álcool e drogas sejam vistos separadamente, embora ambos sejam designados para detectar substâncias psicoativas⁶⁷.

Intoxicação aguda decorrente do consumo de etanol está presente em aproximadamente 10% das injúrias fatais ocupacionais e em 5% das injúrias não fatais associadas ao trabalho, portanto extremamente associada aos problemas ocupacionais⁹¹.

No caso do etanol, a determinação dos níveis sanguíneos são aceitos como indicadores da influência deste no comportamento, ou seja, são indicadores de efeito. A análise deve indicar se houve consumo e quanto o nível de álcool no sangue do trabalhador está acima do limite estabelecido pelo programa⁶⁷.

O ar exalado é uma amostra bastante usada para estimar a concentração sanguínea de etanol por apresentar fácil obtenção, utilizando-se de métodos não invasivos de colheita e rapidez nos resultados. Um índice de correlação médio (ar exalado / sangue) igual a 2 100 é o mais utilizado para conversão entre os teores nestas amostras, sendo este determinado através de estudos *in*

vitro, onde considera-se a concentração sanguínea como 2 100 vezes maior do que a concentração no ar exalado⁸⁶. A grande variabilidade analítica e fisiológica é o fator limitante no uso deste espécime^{5,37,41}.

A urina tem sido proposta como um fluido alternativo na determinação do etanol, principalmente nestes programas e também na reabilitação de usuários em tratamento³⁴. A determinação de etanol na urina está sendo bastante utilizada em alguns países, como na Inglaterra, e em alguns estados dos E.U.A., onde uma relação urina / sangue de aproximadamente 1,35 tem sido adotada para todos os indivíduos^{5,34}. Segundo Jones, a concentração urinária correlaciona-se com os níveis sanguíneos de etanol durante um certo período de tempo após o consumo³⁴. BIASOTTI e VALENTINE⁵ descrevem algumas vantagens da utilização da urina nos testes de álcool. Dentre estas, temos que a urina é uma amostra não invasiva, que não necessita de pessoas qualificadas para a coleta; pode ser preservada por um razoável período de tempo sem apreciáveis perdas de álcool; e ela pode ser analisada na presença de outros fármacos ou agentes tóxicos. Porém muitas avaliações ainda necessitam ser feitas para validar esta amostra para as análises toxicológicas do etanol.

2.2. Toxicodinâmica do etanol

Entre as consequências orgânicas do consumo agudo e crônico de etanol surgem diversos efeitos tóxicos sobre o organismo, sendo o sistema nervoso, cardiovascular e hepático, entre outros, os principais alvos deste fármaco^{2,64,85}.

2.2.1. Sistema nervoso

A ação depressora do etanol sobre o sistema nervoso central (SNC) reduz significativamente o estado de alerta e o desempenho. Não obstante, alguns fatores relacionados ao indivíduo, como a sua expectativa pelos efeitos, a experiência anterior com o etanol e a motivação do uso são conhecidos como moduladores desses efeitos sobre o desempenho⁶⁹.

Bebedores crônicos de doses excessivas de álcool podem apresentar a *Síndrome de Wernicke-Korsakoff* que é uma combinação da encefalopatia de Wernicke, caracterizada por paralisia do músculo ocular externo, ataxia, distúrbio na locomoção e confusão, com a psicose de Korsakoff, uma desordem permanente no cérebro decorrente de anormalidades nas funções cognitivas e emocionais, com incapacidade de apreender novas informações, de lembrar, reter eventos recentes e de reconhecer emoções^{2,20}.

Embora existam inúmeras evidências sobre os diversos efeitos do álcool em neurotransmissores específicos e/ou em receptores, a sua ação farmacológica sobre o cérebro é muito ampla, sendo os

mecanismos psicoativos ainda muito pouco elucidados^{60,71}.

A demência alcoólica, por exemplo, que é um quadro que envolve severa deterioração intelectual, mudança de personalidade e de comportamento, provavelmente ocorre por desordens nutricionais e não apenas em decorrência do efeito tóxico direto do álcool no cérebro².

A Neuropatia periférica alcoólica é uma deficiência sensorial e motora, que afeta as regiões distais, principalmente as pernas, ocorrendo em mais de 80 % dos pacientes com severas desordens neurológicas, como as observadas na síndrome de Wernicke. Embora o efeito tóxico direto do álcool não possa ser excluído como agente causal, a deficiência de tiamina, que também ocorre na encefalopatia de Wernicke, é possivelmente a principal razão desta neuropatia periférica. Em indivíduos alcoolistas, a deficiência da tiamina pode advir de dieta inadequada, debilidade na absorção intestinal e decréscimo no estoque hepático desta vitamina^{2,20}.

Resumidamente, pode-se dizer que as pesquisas farmacológicas e bioquímicas a respeito dos principais mecanismos envolvidos nos efeitos do etanol sobre o SNC, alcançaram até o presente momento os seguintes resultados:

- A influência sobre eventos relacionados a membranas celulares parece estar ligada às intoxicações agudas, tolerância e síndrome de abstinência. Os canais de íons, 2º mensageiro, neurotransmissores, receptores, proteínas G e reguladores da expressão dos genes

sofrem alterações fisiopatológicas na neuroadaptação ao uso do etanol²⁰.

- O etanol aumenta a capacidade de inibição sináptica mediada pelo GABA, assim como o influxo de íons cloreto. Os efeitos sedativos do etanol são inibidos por antagonistas específicos dos receptores gabaérgicos, como a bicuculina^{20,28,60,71}.

- O etanol pode inibir a corrente de íons cálcio ativada pelo glutamato, agindo predominantemente nos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), em concentrações alcançadas nas intoxicações de intensidade média^{20,60,71}. O etanol é um antagonista potente junto ao receptor NMDA, provavelmente por sua ação sedativa^{60,80}.

- Alterações nos canais de cálcio induzidas pelo etanol explicam alguns sinais e sintomas da abstinência a esta substância^{20,49}. Em administrações crônicas, para compensar o reduzido fluxo de cálcio e transmissão sináptica, ocorre uma mudança adaptativa com o aumento do número de canais. A exposição ao etanol por vários dias aumenta a despolarização, estimulando a recaptação de cálcio. Na privação do etanol, há um excesso de canais e um aumento do fluxo de cálcio, resultando numa situação de excessiva transmissão, que contribui para a síndrome de abstinência. Isto pode ser bloqueado pela administração de antagonistas adequados, como a nifedipina⁶⁰. Antagonistas dos canais de cálcio reduzem a incidência de tremores, ataques e mortes em ratos dependentes de álcool privados do mesmo, e reduzem os sintomas da abstinência em pacientes alcoolistas²⁰.

- O etanol, em baixas concentrações potencializa a ativação do receptor 5HT₃ e os antagonistas deste receptor reduzem a recaptação de etanol, sugerindo que a serotonina quando age nos receptores 5HT₃ pode mediar alguns aspectos da intoxicação e do comportamento de busca do etanol^{20,60}.

- A exposição aguda ao etanol inibe a recaptação de adenosina por um tipo específico de transportador de nucleosídeo. Isto causa uma acumulação extracelular de adenosina, que ativa os receptores de adenosina A₂, aumentando os níveis de AMP cíclico. Os antagonistas dos receptores de adenosina agem em sítios específicos no cérebro, podendo inibir muito dos efeitos agudos e crônicos do etanol e também as intoxicações agudas e a síndrome de abstinência^{20,60}.

2.2.2. Sistema cardiovascular

O uso abusivo do etanol tem sido associado a uma variedade de alterações no sistema cardiovascular, variando de hipertensão à falência cardíaca e morte súbita¹. Alguns estudos têm demonstrado que o consumo regular de mais de 200 g de etanol por dia está associado com aumento de pressão sanguínea (hipertensão), que é o maior fator de risco para o infarto hemorrágico e cerebral^{1,2,64}.

O consumo agudo e crônico de etanol diminui a contratilidade do miocárdio, enquanto o consumo crônico altera também a resposta do miocárdio a vários agentes inotrópicos e produz uma cardiomiopatia secundária^{2,64}.

A cardiomiopatia alcoólica ou secundária é uma síndrome tipicamente encontrada em homens entre 30 e 40 anos de idade, usuários crônicos de etanol que, por um longo período de tempo, tenham obtido de 30 a 40% de suas calorias através da oxidação do etanol. É caracterizada por baixo rendimento cardíaco, reduzida contratilidade do miocárdio e dilatação de todas as câmaras do coração ^{2,85}. Alguns dos mecanismos que levam a um efeito tóxico nos músculos estriados e alterações na síntese de proteínas cardíacas incluem acumulação de triglicérides, alteração na composição dos ácidos graxos livres, peroxidação lipídica, alterações de membrana com decréscimo da resposta ao cálcio e às catecolaminas, interferências nos processos oxidativos assim como na atividade glicolítica, com subsequente decréscimo nos níveis de ATP e creatinina fosfato^{2,64}.

Segundo Ahmed, o consumo moderado de álcool, avaliado através de estudos epidemiológicos, demonstra uma associação positiva com níveis sanguíneos de lipoproteínas de alta densidade (HDL), isto é, o uso de álcool promove elevação do HDL, um fator que protege o organismo contra a formação das placas de ateroma e, conseqüentemente, reduz a probabilidade de doenças cardiovasculares^{2,73}. Pesquisas recentes mostram que consumidores moderados de álcool apresentam menos infartos do miocárdio e hemorrágico do que os não usuários².

2.2.3. Sistema hepático

O fígado é sabidamente um outro alvo importante dos efeitos tóxicos do etanol. O etanol presente no organismo humano é quase totalmente biotransformado no fígado por processos oxidativos^{2,80}.

O acetaldeído formado nos referidos processos, liga-se covalentemente às proteínas microssômicas do fígado de ratos, "in vivo", e forma aductos nestas proteínas, com indução do P450 II E₁. Estudos em animais e humanos tem mostrado que esses aductos servem como "antígenos", e geram uma resposta imune podendo contribuir para a severidade do dano hepático^{2,20,47}.

O acetaldeído tem afinidade pelos grupos sulfidríla de resíduos de cisteína e pela lisina, o que pode alterar a capacidade da tubulina de se polimerizar, resultando em deficiência na polimerização e alteração dos microtúbulos. Isso leva à inibição da secreção de proteínas, lipoproteínas e gliceroproteínas no plasma e seu acúmulo no fígado, aumentando os danos hepáticos².

Sendo a cisteína um constituinte da glutathione (GSH), a afinidade do acetaldeído por este aminoácido pode causar uma deficiência de GSH no fígado. A GSH é importante na defesa do organismo pois age na eliminação de radicais livres tóxicos, particularmente de espécies reativas de oxigênio. Os radicais livres gerados durante o metabolismo do acetaldeído, por ação da aldeído oxigenase, são suspeitos de serem os iniciadores da injúria hepática induzida pelo álcool².

A oxidação do etanol aumenta a relação de NADH e NAD, que por sua vez aumenta a concentração de glicerofosfato, causando um acúmulo de triglicérides no fígado por quebra de ácidos graxos. Além disso, o excesso de NADH promove a síntese de ácidos graxos. Depósito de ácidos graxos no fígado, somente é observado após acentuado consumo de etanol. Moderada hiperlipemia pode ser observada em estágios precoces da injúria alcoólica hepática².

O álcool pode afetar o metabolismo de colágeno pois promove um desequilíbrio entre sua produção e degradação, causando depósito deste nos hepatócitos e nos lipócitos, que são células que contribuem para a produção de colágeno no fígado, e assim, induzem ao aparecimento de fibrose e cirrose hepáticas^{2,47}.

O sexo é um dos fatores que determinam as diferenças no metabolismo do etanol, tendo como consequência variações na intensidade do dano hepático entre homens e mulheres. Segundo Lieber, a dose média de etanol que pode causar cirrose é menor em mulheres do que entre homens, e a incidência de doenças hepáticas crônicas é bem maior entre mulheres do que entre homens, com história similar de abuso de etanol. Uma das explicações para essa diferença no metabolismo de etanol é a inibição “in vivo” e “in vitro” da enzima álcool desidrogenase (ADH) pela testosterona e seus derivados. Além disso, as mulheres possuem baixa atividade de ADH gástrica, tendo como consequência um nível sanguíneo de etanol mais alto⁴⁷.

Fatores genéticos e ambientais podem influenciar a susceptibilidade individual ao desenvolvimento de

doenças hepáticas, incluindo cirrose hepática. Entre estes estão as diferenças individuais existentes no processo de biotransformação de álcool, o padrão de consumo, a histocompatibilidade antigênica, a história familiar de alcoolismo, a resposta imune e nutrição deficiente. A cirrose alcoólica hepática é correlacionada tanto com a magnitude como com a duração do uso de álcool. Dietas ricas em ácidos graxos poliinsaturados aumentam a patogênese dos danos hepáticos provocados pela ingestão de etanol devido à indução da isoenzima P450 II E₁².

2.2.4. Fatores genéticos

Embora os mecanismos ainda sejam desconhecidos, grandes descobertas foram feitas nos últimos 10 anos em relação às propriedades catalíticas e às estruturas das formas moleculares das enzimas ADH e aldeído desidrogenase (ALDH) e seus genes. Esses avanços tornaram possível identificar no genótipo dos indivíduos qual “loci” que era polimorfo e estudar a influência da ADH e ALDH polimorfas na fisiologia normal e anormal do uso de etanol⁶. O polimorfismo foi observado em 2 dos 5 “loci” que codificam as subunidades da álcool desidrogenase: ADH2 (produzindo 3 β subunidades), ADH3 (produzindo 2 Γ subunidades) e também um “locus” que codifica a importante forma metabólica da aldeído desidrogenase, ALDH2¹⁹. Estudos da relação do genótipo da ADH e ALDH com a velocidade de eliminação do etanol, comportamento de uso abusivo, alcoolismo e doenças

hepáticas mostraram a influência do ALDH2*2 e ADH2*2 no comportamento de busca do etanol e no alcoolismo, assim como a influência do ADH2*2 na velocidade de eliminação e do ALDH2*2 na susceptibilidade de doenças hepáticas⁶. Os estudos realizados com as formas polimorfas sugerem que as diferenças no metabolismo do etanol, determinadas geneticamente, podem explicar em parte a predisposição aos danos orgânicos promovidos pelo álcool¹⁹. De acordo com POUPON e cols.⁶⁵, além dos fatores relacionados a isoenzimas, as modificações da atividade enzimática induzida pelo próprio etanol também trazem como consequências danos hepáticos de graus variados⁶⁵.

2.2.5. Malnutrição e Câncer

O álcool pode causar malnutrição por deslocar nutrientes devido ao consumo excessivo de calorias sem valor nutricional ou ainda, secundariamente, por prejudicar a digestão e/ou a absorção de nutrientes, resultando em complicações gastrintestinais durante seu consumo crônico^{2,47,80}. No caso do álcool, a toxicidade pode exacerbar a malnutrição por aumentar a degradação de nutrientes e a malnutrição pode afetar o processo de detoxificação do organismo².

Na dieta de consumidores “sociais”, as calorias do álcool são adicionadas à energia derivada dos carboidratos e gorduras, mas na dieta de consumidores moderados a excessivos, as calorias do álcool repõem outras fontes de energia de uma maneira dose-dependente. Como o consumo de álcool fornece mais de

41% das calorias, a porcentagem de energia derivada das proteínas, gorduras e carboidratos decresce, assim como o aproveitamento de vitamina A, C e E, tiamina, cálcio, ferro e fibras, sendo que as perdas de nitrogênio na urina aumentam^{2,47}.

O álcool pode depletar o estoque de vitamina A, afetando o nível tecidual e sanguíneo de retinol e seus metabólitos, que podem influenciar vários tipos de câncer induzidos quimicamente em animais^{2,47}.

O risco de câncer parece aumentar com o aumento do consumo de bebidas alcoólicas, como é observado nos casos de câncer oral e de faringe. Isso pode ser devido à diminuição do estado nutricional e à carência de importantes vitaminas, minerais e outros nutrientes. Há também uma forte associação entre a cirrose hepática e o câncer de fígado primário^{2,47,80}.

Estudos epidemiológicos e trabalhos experimentais sustentam as seguintes hipóteses sobre o potencial do álcool em induzir o câncer ²:

- A presença de aditivos e de outros contaminantes nas bebidas alcoólicas, com atividade carcinogênica;
- A sua interferência no metabolismo de carcinógenos e de outros compostos;
- A sua atividade como solvente, que pode causar um aumento da penetração de outros carcinógenos, como é visto através do aumento do risco de câncer em tecidos topicamente expostos ao álcool;
- Pela influência que exerce no metabolismo, na função e nos níveis hormonais, o que pode causar um

aumento da exposição de órgãos- alvo, susceptíveis a esses compostos;

- Pela supressão da função imune através de seus efeitos no estado nutricional, no fígado e em outros órgãos;

- Pelo aumento das deficiências nutricionais, que pode influenciar no processo de carcinogênese.

2.2.6. Hormônios

O etanol afeta o metabolismo microssômico de hormônios, causando um decréscimo dos níveis de testosterona no sangue, devido ao aumento da degradação e conversão deste a estrógeno e ao decréscimo da capacidade dos testículos em sintetizar esteróides. Além disso, o etanol altera o metabolismo de compostos estruturalmente similares, como o da vitamina D, e sendo substrato para as enzimas microssômicas leva a alterações na capacidade oxidativa do organismo^{2,28}.

2.2.7. Barreira Placentária

O etanol atravessa facilmente a barreira placentária. As enzimas necessárias para a biotransformação de drogas estão ausentes no embrião, ocorrendo em pequenas quantidades durante o desenvolvimento fetal. Portanto, o líquido amniótico age como uma reserva de etanol e acetaldeído como resultado da circulação deste líquido. Assim, o embrião ou o feto, estão expostos a esses compostos até que o

organismo materno promova sua eliminação. Os efeitos deletérios do etanol no feto são dose-dependentes e variam de acordo com o estágio da gestação, podendo sofrer influência de outros agentes tóxicos⁸¹. O etanol pode causar uma série de efeitos teratogênicos, cujos mecanismos ainda não estão bem elucidados. A síndrome alcoólica fetal causa um padrão de anomalias físicas e comportamentais, caracterizada por defeitos cranio-facial, dos membros, do SNC e cardiovasculares nos fetos, em adição ao atraso no crescimento e retardo mental^{26,28,29,80,81}. As evidências mundiais da Síndrome Alcoólica Fetal são 1,9 casos por 1000 nascimentos. Porém, não é um fenômeno que possa ser facilmente relacionada ao etanol ou seus metabólitos, como causas primárias, uma vez que inúmeros outros fatores devem ser considerados quando se trata de uma população de mães dependentes de álcool⁸¹.

2.2.8. Atividade plaquetária

Há um decréscimo nos níveis de atividade das monoaminoxigenases (MAO) em alcoolistas. O etanol inibe a atividade plaquetária da MAO e foi demonstrado em um estudo bem conduzido, que esta inibição é maior em plaquetas de indivíduos alcoolistas do que em grupos controles. Esta diferença parece não estar associada com a duração da abstinência ao etanol, sugerindo que a inibição da atividade da MAO possa envolver fatores genéticos²⁰.

2.3. Toxicocinética do etanol

O etanol é rapidamente absorvido através do estômago (20%) e do intestino delgado (80%), sendo que a concentração plasmática máxima é atingida entre 30 a 90 minutos após a ingestão^{28,71}.

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 desta variação^{28,84}.

Após a absorção, o álcool distribui-se uniformemente e rapidamente por todos os tecidos e líquidos corporais devido às suas propriedades químicas e físico-químicas, necessitando de um pequeno intervalo de tempo para que o equilíbrio seja atingido nos compartimentos aquosos do organismo. O etanol se difunde rapidamente através da barreira hematoencefálica, atingindo o sistema nervoso central, que é um dos principais alvos de ação deste fármaco^{28,61,73,80}.

Noventa a 98% do etanol que entra no organismo são completamente oxidados. A taxa de oxidação do etanol difere da maioria das substâncias pois segue uma cinética de ordem zero, ou seja, é relativamente constante ao longo do tempo e independe das suas concentrações plasmáticas^{28,41,71,84}. A figura 1 mostra as vias de biotransformação do etanol.

A principal via de biotransformação do álcool envolve a enzima álcool desidrogenase (ADH) presente no fígado, embora a álcool desidrogenase gástrica, responsável pelo metabolismo de 1ª passagem do etanol, também seja um fator capaz de afetar a concentração sanguínea de etanol^{28,63,71,84}. Neste processo, o álcool dá origem ao acetaldeído, sendo que

uma molécula de NAD (dinucleotídeo adenina nicotinamida) recebe o hidrogênio do etanol, formando NADH .

Figura 1 - Vias de biotransformação do etanol: **A** - Sistema de oxidação microssômica (MEOS), **B** - Enzima álcool desidrogenase (ADH) e **C**- Enzima catalase^{48,61}

Em concentrações mais altas de etanol, ou em usuários regulares de bebidas alcoólicas, a biotransformação é feita também pelo sistema de oxidação microssômica (MEOS),

utilizando NADPH como cofator. A catalase presente no hepatócito também contribui para a oxidação do etanol^{2,28,61,73}.

Normalmente cerca de 2 a 10% do álcool ingerido é excretado inalterado, principalmente através dos rins e pulmões^{28,60,73}. Porém, após a ingestão de altas doses de etanol, quantidades maiores que 10% podem não ser biotransformadas. A relação média de eliminação está entre 15 mg e 20 mg/100 ml de urina (0,015-0,02 %) por hora. A concentração de álcool na urina, que representa a média de concentração de álcool no sangue, tem o potencial de ser positivo enquanto o sangue pode ser negativo para o etanol^{28,41,71,84}.

2.4. Aspectos analíticos

O etanol é rapidamente distribuído para todos os compartimentos do organismo logo após o consumo, e portanto diferentes fluidos biológicos, como sangue, soro, plasma, urina, saliva, humor vítreo e ar exalado, podem ser utilizados para a sua determinação. A escolha da matriz biológica pode ser feita com base na praticabilidade ou no objetivo da determinação, embora o parâmetro de referência seja sempre a concentração de etanol no sangue total ⁵².

Um fator importante na confiabilidade dos dados é o cuidado necessário na coleta e armazenamento das amostras biológicas, em virtude da natureza volátil do etanol. Como exemplo, temos o problema do uso de antisséptico contendo etanol na coleta de sangue, que pode ser a causa de um valor superestimado. Cuidados especiais devem ser tomados com o armazenamento, em relação ao tempo, temperatura e tipo de conservante utilizado ^{52,91}.

Por mais de 30 anos, a cromatografia gasosa tem sido utilizada na determinação do etanol, sendo considerada nos dias atuais como método de referência ^{3,18,23,30,32,42,52,56,57,62,72,82,84,87,88,89}. Uma das grandes vantagens desta técnica é que ela permite a determinação simultânea de uma ampla faixa de analitos voláteis, como outros álcoois, aldeídos, cetonas, glicóis, etc ⁸⁴.

Devido ao grande número de métodos empregando a cromatografia para determinação do etanol, TAGLIARO e cols ⁸⁴, fizeram uma revisão das condições cromatográficas presentes nos métodos mais interessantes, destacando o uso

de diferentes colunas, espécimes biológicos, gases de arraste, detectores e padrões internos.

A injeção direta e o uso de *head space* são as técnicas mais difundidas, embora esta última seja a mais utilizada, devido à sua vantagem em prolongar a vida útil da coluna e prevenir a contaminação do injetor, que é de grande valia, principalmente nos laboratórios de rotina^{3,21,23,42,53,55,56,66,82,88,89}.

O etanol pode ser separado eficientemente em diferentes colunas cromatográficas e frequentemente a escolha baseia-se em considerações práticas, como tempo total de análise, custo, tempo de vida da coluna e a possibilidade de utilização da mesma coluna para diferentes análises⁸⁴. A tabela I mostra algumas colunas cromatográficas utilizadas na determinação do etanol e o tipo de padrão interno utilizado.

A detecção é universalmente realizada pelo detector de ionização de chama (FID), pois promove bons resultados em termos de sensibilidade e custo⁸⁴.

Embora os métodos cromatográficos sejam considerados os favoritos na determinação do etanol, alguns métodos químicos e enzimáticos (imunoensaios) tem sido utilizados, pelo menos como triagem, na toxicologia clínica, na urgência toxicológica e nos testes de drogas no local de trabalho^{8,17,38,39,40,46,83,87}.

TABELA I - Colunas cromatográficas e padrões internos utilizados na determinação do etanol em material biológico, em análises toxicológicas.

Coluna cromatográfica	Padrão interno	Referência	Ano
1. HP-FFAP (cross-linked) - 50m x 0,2 mm x 0,33 μ m	*	Macchia, T. <i>et al.</i> [52]	1995
2. Carbowax 20M 5% - Carbopack B - 60/80 0,9m x 2mm di ^a	n-propanol	Saady, J.J. <i>et al.</i> [70]	1993
3. SBP-1 (cross-linked) - 60m x 0,53 mm x 5 μ m	etilbenzeno e 1,1,2-tricloroetano	Streete, P.J. <i>et al.</i> [82]	1992
4. Carbopack B - Carbowax 5% - 1,2m x 3 mm di	n-propanol	Urry, F.M. <i>et al.</i> [87]	1993
5. Carbowax 1500 0,2% - 2m x 3 mm di	n-propanol	Kunsman, G.W. <i>et al.</i> [46]	1991
6. Carbopack C- Carbowax 1500 - 80/100 -2m x 3mm di	n-propanol	Jones, A.W. <i>et al.</i> [33]	1989
7. Carbowax 20M 5% -Carbopack B - 1,8 m x 2 mm di	n-propanol	Christmore, D.S. <i>et al.</i> [12]	1984
8. Carbowax 1500 0,2% -Carbopack - 60/80-1,8m x 3 mm di	n-propanol	Winek, C.L. <i>et al.</i> [90]	1981
9. Porapack Q 100/200 - 1,8m x 2mm di	isopropanol	Mendenhall, C.L. [56]	1980
10. Porapack S 100/120- 1,8m x 3mm di	n-propanol	Karnitis, L. <i>et al.</i> [42]	1972

* Não foi utilizado padrão interno

^a di - diâmetro interno

3. OBJETIVOS E PLANO DE TRABALHO

A presente dissertação tem por objetivo validar a urina como amostra a ser utilizada para a análise quantitativa de etanol, em “Programas de Controle e Prevenção do Uso de Álcool e Drogas no Ambiente de Trabalho”, entendendo-se como validação o estudo sobre a correlação existente entre a concentração urinária e sanguínea durante um período de tempo compatível com a jornada de trabalho, a aplicabilidade de métodos para as análises de urina, entre outros.

Para atingir este objetivo foram desenvolvidas as seguintes etapas de planejamento:

1. Padronização do método para análise de etanol em amostras de sangue e urina, utilizando a cromatografia a gás com separação por *head space*;
2. Validação do método padronizado:
 - estudo de linearidade do detector, especificidade, recuperação, precisão, limite de detecção, limite de quantificação e estudo de conservação e estabilidade das amostras;
 - variação interindividual e análise de calibradores;
 - comparação da técnica cromatográfica padronizada com a de imunofluorescência polarizada;
3. Administração de etanol a voluntários saudáveis para coleta simultânea de urina, sangue e ar exalado, durante período correspondente a uma jornada de trabalho;
4. Análise de sangue e urina pelo método padronizado;
5. Análise do ar exalado pelo uso de monitor de álcool;
6. Cálculo das relações (razões) entre as concentrações de etanol encontradas nas amostras, tendo como referência o sangue (urina / sangue e sangue / ar exalado);

7. Avaliação da validade dessas razões, em diferentes intervalos de tempo entre a administração do etanol e a coleta das amostras;
8. Proposição das condições adequadas para a análise de etanol em urina, em “Programas de Controle e Prevenção do Uso de Álcool e Drogas no Local de Trabalho”.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Soluções-padrão

4.1.1.1. Soluções- estoque

- Solução de etanol a 4 % v/v e a 9,6 % v/v (Sigma)
- Soluções a 20 g/L de acetaldeído, acetona, etanol, isopropanol, metanol e n-propanol (p.a. Merck)

4.1.1.2. Soluções de trabalho

- Soluções aquosas de etanol preparadas a partir da solução estoque, nas concentrações: 0,013; 0,032; 0,064; 0,128; 0,319; 0,638; 1,596 e 3,192 g/L.
- Solução aquosa do padrão interno de n-propanol a 0,08 g/L;
- Solução aquosa única de acetaldeído, acetona, etanol, isopropanol, metanol e n-propanol preparadas a partir das soluções estoque nas respectivas concentrações: 0,04; 0,04; 0,08; 0,08; 0,10 e 0,08 g/L.

4.1.2. Equipamentos e acessórios

- Cromatógrafo à gás modelo 6890 com injetor split / splitless e detector de ionização de chama (Hewlett-Packard, Wilmington, EUA);
- Integrador modelo 3395 (Hewlett-Packard, Wilmington, EUA);
- Coluna capilar de sílica fundida Poraplot Q[®], com 10 m de comprimento e 0,32 mm de diâmetro interno (Chrompack, Holanda);
- Analisador de imunofluorescência polarizada modelo TDX Flx[®] (Abott, Wiesbaden, Alemanha)
- Monitor de álcool (bafômetro) modelo Alcotest 7410 (P.Dattler, Lubeck, Alemanha)
- Destilador-desionizador de água Milli-Q (Millipore, São Paulo, Brasil);
- Estufa (Ética Equipamentos Científicos, São Paulo, Brasil);

4.1.3. Reagentes e outros materiais

- Sulfato de sódio, p.a. (Merck)
- Fluoreto de sódio, pa. (Merck)
- Gases especiais para a cromatografia em fase gasosa: hélio, nitrogênio, ar sintético e hidrogênio (Air Liquide);
- Microsiringa gas-tight 250 uL (Scientific Glass Engineering);
- Frascos de vidro, capacidade para 10 mL (Hewlett-Packard);
- Tampas de borracha, lacre de alumínio e lacrador (Hewlett-Packard)

- Kit de reagentes do TDX Flix® (Abbott Diagnósticos)
- Calibradores e controles para o TDX Flix® (Abbott Diagnósticos)
- Tiras reagentes para uroanálise (Bayer Diagnósticos)
- Coletor tipo “scalp” para uso com “Vacutainer” 23G ¾ (Becton Dickinson)
- Tubos tipo “vacutainer” de 5 ml com NaF (Labnew Indústria e Comércio Ltda)

4.1.4. Amostras

4.1.4.1. Voluntários sob administração de etanol

Voluntários saudáveis (n=10), do sexo masculino, com idade entre 20 e 35 anos, foram submetidos aos protocolos do experimento (anexo A) após 30 horas de abstenção de bebidas alcoólicas. Foram administrados na forma de uísque gelado, 0,68 g de etanol por kg de peso corpóreo, ingeridos num prazo máximo de 15 minutos. Os voluntários estavam em jejum por pelo menos 3 horas antes do início do experimento. Através de uma declaração (anexo B), todos mostraram-se cientes do procedimento do experimento. A avaliação da função renal e hepática destes pacientes, utilizada como critério de exclusão, foi feita através de exames bioquímicos automatizados, realizados no Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da Puccamp, cujos dados estão apresentados na *Tabela II*. A certificação do teor de etanol no uísque foi feita pela análise cromatográfica do mesmo.

4.1.4.1.1. Amostras de sangue

O sangue foi coletado de ½ em ½ hora, nas 2 primeiras horas e durante as 5 horas seguintes de 1 em 1 hora. Anteriormente à administração de etanol, foi coletado uma primeira amostra de sangue que serviu como referência branco para cada indivíduo. A coleta foi feita com auxílio de scalp e seringas descartáveis e o sangue armazenado em frascos do tipo vacutainer, contendo fluoreto de sódio como anticoagulante e conservante. A assepsia do local onde coletou-se o sangue foi feita com água e sabão. No intervalo de tempo entre coleta e análise, as amostras foram mantidas em freezer, à - 20°C.

4.1.4.1.2. Amostras de urina

A urina foi coletada durante 7 horas, de 1 em 1 hora, e uma última coleta foi feita 12 horas após a ingestão, sendo que durante todas as coletas, houve orientação para o esvaziamento completo da bexiga. Uma primeira amostra de urina, utilizada como referência branco, foi coletada anteriormente à administração de etanol. As amostras de urina foram coletadas em béquer de 250 mL, sendo verificados o volume de urina, o pH e

a densidade. As amostras foram armazenadas em frasco de polietileno contendo fluoreto (NaF) para fornecer concentração de aproximadamente 1% em urina. No intervalo de tempo entre coleta e análise, as amostras foram mantidas em freezer, à - 20°C.

4.1.4.1.3. Amostras de ar exalado

O ar exalado foi determinado após cada coleta de sangue, quando o voluntário deveria inalar profundamente e então soprar o bocal do bafômetro firme e constantemente, até que o aparelho indicasse o final do procedimento.

4.1.4.2. Voluntários utilizados como referência

Foram coletadas amostras de sangue e urina de voluntários, alunos do curso de pós graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, não expostos ao etanol por pelo menos 72 horas. Tais amostras foram utilizadas como “brancos” de referência após serem analisadas e apresentarem resultados negativos para o etanol nas análises cromatográficas.

TABELA II - Avaliação da função renal e hepática através dos seguintes exames bioquímicos : Aspartato-aminotransferase (AST) ^a, Alanina-aminotransferase (ALT) ^b, Creatinina ^c e Uréia ^d.

Voluntário	AST (U/L)	ALT (U/L)	Creatinina (mg/dL)	Uréia (mg/dL)
1	13,0	6,5	1,2	31,0
2	19,0	9,7	1,1	19,0
3	14,5	16,2	1,1	30,0
4	16,0	16,2	0,9	25,0
5	16,0	13,0	1,0	28,0
6	24,6	28,9	1,0	25,0
7	19,0	19,0	1,1	26,0
8	16,5	17,8	0,9	23,0
9	16,0	16,0	1,0	20,0
10	23,8	28,0	0,9	24,0

^a - Referência normal = até 25 U/L - homens*

^b - Referência normal = até 29 U/L - homens *

^c - Referência normal = 0,8 - 1,4 mg/dL *

^d - Referência normal = 10 - 50 mg/dL **

* - Manual de procedimento da *Boeringer Mannheim*

** - Manual de procedimento da *Labtest*

4.2. Métodos

4.2.1. Padronização das condições cromatográficas para análise de etanol

4.2.1.1. Otimização dos parâmetros cromatográficos

Soluções de trabalho de etanol foram utilizadas para a padronização das análises através da cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama. Foram testadas corridas isotérmicas para a escolha da temperatura, utilizando-se como gás de arraste o hélio, com o fluxo recomendado para as características da coluna. As injeções foram feitas em “split”, tendo sido testadas diferentes razões de divisão, no sentido de otimizar a sensibilidade da técnica para os objetivos do trabalho.

4.2.1.2. Avaliação da especificidade da técnica

A solução de trabalho contendo acetaldeído, acetona, etanol, isopropanol, n-propanol e metanol foi utilizada para verificar a separação destas substâncias na coluna Poraplot Q[®] e avaliar a potencial interferência destas, quando submetidas ao procedimento descrito no item 4.2.2.

4.2.1.3. Estudo da linearidade da técnica

O estudo da linearidade, para definir o intervalo de concentração no qual a intensidade de resposta do detector é diretamente proporcional à concentração de etanol, foi feito através da análise cromatográfica de soluções aquosas contendo etanol nas concentrações de 0,01; 0,03; 0,07; 0,13; 0,32; 0,64; 1,60 e 3,2 g/L, e 0,08 g/L de n-propanol, padrão interno, submetidas ao procedimento de *head space* descrito no item 4.2.2.

4.2.2. Padronização do procedimento para determinação de etanol em sangue e urina com separação por *head space* e cromatografia em fase gasosa:

A técnica utilizada para separação do etanol da matriz biológica consiste na adição de 1,0 mL de amostra (sangue ou urina) e 1,0 mL de padrão interno em um frasco de vidro com capacidade para 10 mL, contendo 2,0 g de sulfato de sódio anidro. Este frasco é fechado com tampa de borracha, lacrado com um anel de alumínio e a seguir colocado por 30 minutos em estufa previamente aquecida a 70°C. A camada superior é homogeneizada através de 3 operações de tomada e devolução do vapor, usando a própria seringa de injeção no cromatógrafo. Após este procedimento, retira-se, por punção através da tampa, 250 µL da camada de vapor e injeta-se no cromatógrafo

gasoso. O fluxograma da técnica de separação por *head space* está apresentada na *Figura 2*.

Obs: A seringa foi mantida ligeiramente aquecida com auxílio de uma segunda estufa para evitar condensação de vapores.

Figura 2 - Fluxograma da técnica de separação por *head space* para quantificação de etanol em amostras de sangue e urina por cromatografia gasosa.

4.2.2.1. Curvas de calibração

As curvas de calibração foram obtidas pela análise de amostras de sangue e urina (item 4.1.4.2.), adicionadas com alíquotas da solução estoque de etanol para obter as concentrações de 0,01 a 3,20 g/L de amostra. As amostras adicionadas foram submetidas ao procedimento descrito em 4.2.2 e analisadas em triplicata. Cada curva foi construída com a média dos valores encontrados para cada concentração, utilizando-se as relações de área do etanol e do padrão interno. Outras curvas de calibração foram construídas em duplicata a cada dia de trabalho e a variabilidade destas analisadas.

4.2.2.2. Estudo de recuperação

4.2.2.2.1. Recuperação relativa

A recuperação relativa do método foi calculada para diferentes concentrações, através da comparação das relações de áreas de etanol e padrão interno obtidas na curva de calibração e as relações obtidas no estudo de linearidade.

4.2.2.2.2. Recuperação absoluta

A recuperação absoluta foi calculada através da comparação entre as áreas dos picos cromatográficos do etanol, utilizando-se as diferentes matrizes biológicas com a solução aquosa de etanol. O mesmo procedimento foi realizado para o cálculo da recuperação do n-propanol.

4.2.2.3. Avaliação da precisão do método

A precisão foi avaliada indiretamente, pela medida da imprecisão da técnica, dada pelo coeficiente de variação (CV) dos resultados. A avaliação da precisão intra e inter-ensaio foi realizada através da determinação de alíquotas de sangue e urina, contendo etanol nas concentrações de 0,08; 0,8 e 2,0 g/L. O estudo foi feito em 6 replicatas, durante 3 dias. Com os dados obtidos, foram calculados os CVs relativos à precisão do método.

4.2.2.4. Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção, definido como a menor concentração da substância que o processo analítico pode diferenciar da linha de base gerado pelo ruído do detector, foi determinado pelo método da diluição progressiva, a partir de várias diluições de uma solução de 0,1 g/L. O limite de quantificação, que é a menor concentração precisamente medida, foi determinado através da escolha de uma concentração que se diferencie da linha de base e que apresente reprodutibilidade na resposta.

4.2.2.5. Estudo de conservação e estabilidade das amostras

Para a verificação da produção de etanol “in vitro”, foram feitas 120 análises de urina “brancos” (item 4.1.4.2.), provenientes de 5 indivíduos. Uma amostra de urina de cada indivíduo foi dividida em 6 alíquotas e estas foram mantidas sob diversas condições de armazenamento:

- temperatura ambiente
- temperatura ambiente + conservante (NaF 1%)
- geladeira
- geladeira + conservante (NaF 1%)

- freezer
- freezer + conservante (NaF 1%)

As análises foram feitas após 24, 72, 96 e 168 horas de armazenamento.

Para o estudo da estabilidade do etanol no sangue e urina foram analisadas, em duplicata, 14 amostras de sangue e 12 amostras de urina, escolhidas aleatoriamente entre as amostras colhidas dos voluntários (procedimento 4.1.4.1.1. e 4.1.4.1.2.). A estabilidade foi verificada para o período de 30 dias, sob condições de armazenamento em freezer com uso do fluoreto como conservante. A avaliação considerou a diferença entre os resultados obtidos na 1ª análise, efetuada nas 2 semanas consecutivas à colheita, e a 2ª análise, realizada exatamente 30 dias após a primeira.

4.2.2.6. Precisão interindividual

A partir da solução de etanol 9,6 % v/v (Sigma) e amostras de urina “branco” (4.1.4.2.), 2 analistas prepararam três amostras adicionadas, nas concentrações teóricas de 3,08; 0,77 e 0,15 g/L. Estas amostras foram submetidas ao procedimento descrito em 4.2.2., para a avaliação dos CVs..

4.2.2.7. Análise de amostras de referência

Para avaliar a exatidão da técnica cromatográfica foram empregadas amostras de sangue comercializadas pela Abbott. Amostras com concentrações iguais a 0,5 g/L, 1,0 g/L e 1,5 g/L, fornecidas como controles “low”, “medium” e “high”, respectivamente, para o analisador de imunofluorescência polarizada (TDXFlx ®) foram submetidas ao procedimento apresentado no item 4.2.2.

4.2.3. Comparação da técnica cromatográfica com a de imunofluorescência polarizada para determinação de etanol em sangue e urina

Quarenta e nove amostras de sangue e 45 amostras de urina foram submetidas à análise utilizando-se a técnica de imunofluorescência polarizada e a técnica cromatográfica. A imunofluorescência polarizada mede o etanol indiretamente, sendo sua concentração proporcional à intensidade da fluorescência produzida por um cromóforo gerado pela combinação de reações catalíticas das enzimas álcool desidrogenase e diaforase, em um certo comprimento de onda. ^(Manual de ensaio do TDXFLx para etanol) Os valores obtidos foram comparados pelas diferentes técnicas.

4.2.4. Determinação de etanol nas amostras provenientes dos voluntários

4.2.4.1. Amostras de sangue e urina

As amostras de sangue e urina obtidas segundo os procedimentos 4.1.4.1.1. e 4.1.4.1.2., foram submetidas à análise para determinação de etanol conforme descrito em 4.2.2. Todas as amostras foram analisadas em duplicata.

4.2.4.2. Amostras de ar exalado

O monitor de álcool utilizado (bafômetro) mede a concentração do álcool no ar exalado usando um sensor eletroquímico, conforme informações do fornecedor do equipamento. O etanol que entra no bafômetro é transformado à acetaldeído, liberando elétrons que produzem uma corrente elétrica no sensor. Os circuitos de medição e de microprocessadores medem este sinal, emitindo um resultado. A escala é apresentada em ‰, sendo os resultados apresentados em mg de etanol / L de ar exalado através do uso de um fator, fornecido pelo fabricante.

4.2.5. Correlação entre as concentrações de etanol presentes no sangue, urina e ar exalado

As concentrações urinárias de etanol e as presentes nas amostras de sangue colhidas ao mesmo tempo, de cada paciente, foram correlacionadas para verificar a confiabilidade do uso do fator de conversão, para todo o período de coleta, e as consequências de sua utilização na interpretação dos resultados. A correlação sangue/ar exalado foi verificada e comparada à relação urina/sangue. Índices de correlação foram calculados para as diferentes fases da cinética do etanol.

5. RESULTADOS

5.1. Padronização das condições cromatográficas para análise de etanol

5.1.1. Otimização dos parâmetros cromatográficos

As condições cromatográficas para análise do etanol foram estabelecidas, conforme descrito no item 5.2.1.1., e estão apresentadas abaixo:

- temperatura: - coluna: 150°C
 - injetor: 250°C
 - detector: 250°C
- fluxo dos gases - hélio: 2,6 mL/min.
 - hidrogênio: 30 mL/min.
 - ar sintético: 300 mL/min.
 - nitrogênio: 20 mL/min.
- relação de split: 1/5
- parâmetros de integração:
 - atenuação: 0
 - limiar de detecção de pico: 0
 - largura do pico: 0,04 min.
 - velocidade do papel: 0,5 cm/min.

5.1.2. Avaliação da especificidade da técnica

Nas condições padronizadas, o etanol foi separado do acetaldeído, acetona, isopropanol, metanol e n-propanol. A *Figura 3* mostra o perfil cromatográfico de uma amostra de urina adicionada de tais substâncias voláteis. A *Tabela III* apresenta os tempos de retenção e tempos de retenção relativos dos picos cromatográficos destas substâncias na coluna Poraplot Q®.

Figura 3 - Perfil cromatográfico de vapores de uma amostra de urina adicionada de acetaldeído, acetona, etanol, isopropanol, metanol e n-propanol.

TABELA III - Tempo de retenção com os respectivos desvios padrão e tempo de retenção relativo ao n-propanol (PI) de algumas substâncias voláteis, nas condições cromatográficas padronizadas.

ordem de eluição	substância	tempo de retenção $\pm$ desvio padrão (min.)*	tempo de retenção relativo
1	metanol	$1.929 \pm 0,0012$	0,38
2	acetaldeído	$2.212 \pm 0,0040$	0,44
3	etanol	$2.718 \pm 0,0024$	0,54
4	acetona	$3.801 \pm 0,0027$	0,75
5	isopropanol	$4.022 \pm 0,0042$	0,79
6	n-propanol	$5.063 \pm 0,0076$	1,00

* = média de 10 determinações

5.1.3. Estudo de linearidade

Ficou demonstrado que houve uma relação linearmente proporcional entre o sinal gerado pelo equipamento e os teores de etanol nos vapores das soluções aquosas, na faixa de concentração de 0,01 a 3,20 g/L.

$$y = 5,261.x - 0,1473; r = 0,9990 \text{ (Figura 4)}$$

Figura 4 - Representação gráfica da linearidade entre concentração de etanol e relação de área de picos cromatográficos.

5.2. Padronização do procedimento para determinação de etanol em sangue e urina com separação por *head space* e cromatografia em fase gasosa

O procedimento para separação do etanol do sangue e da urina foi adequado para a identificação e quantificação deste através da cromatografia gasosa. A *Figura 5* mostra os perfis cromatográficos de vapores gerados de amostras de sangue e urina de um voluntário, colhidas antes e após a ingestão de uma dose de etanol, nas condições analíticas padronizadas.

Figura 5 - Perfil cromatográfico de sangue isento de etanol (I), sangue de indivíduo após 5 horas da ingestão de uma dose de 0,68 g etanol por kg de peso corpóreo (II), urina isenta de etanol (III) e urina de indivíduo após 5 horas da ingestão de uma dose de 0,68 g etanol por kg de peso corpóreo (IV).

5.2.1. Curvas de calibração

As relações entre concentrações do etanol nas diferentes matrizes biológicas e a razão entre as áreas dos picos cromatográficos (etanol/n-propanol) estão representadas nas *Tabelas IV* e *V*. A partir destes valores foram obtidas as seguintes equações de reta: $y = 7,578x -$

0,4710, $r = 0,9986$, para o sangue e $y = 4,828x - 0,06536$, $r = 0,9999$, para a urina.

O método dos mínimos quadrados foi usado para o estabelecimento das equações das retas, as quais foram úteis para a determinação do etanol nas amostras de sangue e urina.

TABELA IV - Relação entre as concentrações sanguíneas de etanol e as razões entre as áreas dos picos cromatográficos (etanol/n-propanol)

Concentração sanguínea (g/L)	Razão entre áreas* (etanol/ n-propanol)
0,00	0,0000
0,07	0,1488
0,13	0,4675
0,32	0,8065
0,64	4,0672
1,60	12,0176
3,20	23,6721

* Média de triplicata

TABELA V - Relação entre as concentrações urinárias de etanol e as razões entre as áreas dos picos cromatográficos (etanol / n-propanol)

Concentração urinária (g/L)	Razão entre áreas * (etanol/n-propanol)
0,00	0,0000
0,01	0,0466
0,03	0,1179
0,07	0,2536
0,13	0,5518
0,32	1,4520
0,64	2,8843
1,60	7,7445
3,20	15,3718

* Média de triplicata

Uma curva de calibração incluindo todos as amostras de sangue adicionadas de etanol (n=24), analisadas em dias diferentes e outra curva incluindo 49 amostras de urina adicionadas, analisadas em dias diferentes, deram as seguintes equações, respectivamente: $y = 7,584.x - 0,2188$ e $y = 4,984.x + 0,004872$, conforme mostram as Figuras 6 e 7.

Na prática, as concentrações do etanol nas amostras foram calculadas com auxílio de curvas realizadas concomitantemente a análise de amostras com concentrações desconhecidas.

Figura 6 - Representação gráfica da curva de calibração em sangue ($r=0,9953$)

Figura 7 - Representação gráfica da curva de calibração em urina ($r=0,9956$)

5.2.2. Estudo de recuperação

5.2.2.1. Recuperação relativa

A *Tabela VI* apresenta as porcentagens de recuperação do etanol relativa ao padrão interno, em amostras de sangue e urina, obtidas pelo procedimento descrito em 4.2.2.2.1.

TABELA VI - Porcentagem de recuperação do etanol relativa ao padrão interno

Concentração (g/L)	Recuperação em % (média* $\pm$ dp)	
	sangue	urina
0,01	-	100,99 $\pm$ 1,04
0,03	-	95,13 $\pm$ 1,90
0,07	55,88 $\pm$ 8,03	96,93 $\pm$ 1,55
0,13	83,55 $\pm$ 3,14	98,62 $\pm$ 0,93
0,32	128,49 $\pm$ 2,75	103,28 $\pm$ 1,79
0,64	137,85 $\pm$ 6,49	97,76 $\pm$ 2,13
1,60	146,35 $\pm$ 13,07	94,31 $\pm$ 1,53
3,20	141,05 $\pm$ 2,69	91,60 $\pm$ 0,81

* Média de triplicata

5.2.2.2. Recuperação absoluta

A porcentagem de recuperação absoluta do etanol está apresentada na *Tabela VII*. O n-propanol apresentou uma recuperação absoluta de 52,5% em sangue e de 100,6% em urina. Este estudo foi feito com uma média de 30 determinações da área do pico de n-propanol, para cada matriz.

TABELA VII - Porcentagem de recuperação absoluta do etanol

Concentração (g/L)	Recuperação em % (média* $\pm$ dp)	
	sangue	urina
0,01	-	93,78 $\pm$ 6,41
0,03	-	97,59 $\pm$ 1,44
0,07	27,23 $\pm$ 4,60	98,93 $\pm$ 2,57
0,13	47,05 $\pm$ 1,77	100,23 $\pm$ 4,48
0,32	69,06 $\pm$ 11,82	100,34 $\pm$ 9,04
0,64	78,24 $\pm$ 1,63	101,49 $\pm$ 10,71
1,60	67,51 $\pm$ 5,25	99,35 $\pm$ 7,32
3,20	79,41 $\pm$ 0,99	100,38 $\pm$ 6,03

* Média de triplicata

5.2.3. Avaliação da precisão do método

Os coeficientes de variação obtidos nas análises de alíquotas de sangue e urina contendo etanol, como descrito em 5.2.2.4., estão expressos nas *Tabelas VIII, IX, X e XI*.

TABELA VIII - Coeficiente de variação intraensaios das concentrações urinárias de etanol em amostras adicionadas

concentração (g/L)	n	x	DP	CV%
0,08	6	0,3895	0,0229	5,9
0,08	6	0,3522	0,0065	1,8
0,08	6	0,3511	0,0116	3,3
0,8	6	4,0101	0,2077	5,2
0,8	6	3,8158	0,0993	2,6
0,8	6	3,7748	0,1395	3,7
2,0	6	10,2857	0,5217	5,1
2,0	6	10,0703	0,5908	5,9
2,0	6	9,9377	0,42288	4,3

n = número de amostras analisadas

x = média das relações de área EtOH / n-PROP

DP = desvio padrão

CV = coeficiente de variação

TABELA IX - Coeficiente de variação interensaios das concentrações urinárias de etanol em amostras adicionadas

concentração (g/L)	n	x	DP	CV%
0,08	18	0,3650	0,0238	6,5
0,8	18	3,8669	0,1802	4,7
2,0	18	10,0979	0,5085	5,0

n = número de amostras analisadas

x = média das relações de área EtOH / n-PROP

DP = desvio padrão

CV = coeficiente de variação

TABELA X - Coeficiente de variação intraensaios das concentrações sanguíneas de etanol em amostras adicionadas

concentração (g/L)	n	x	DP	CV%
0,08	6	0,3064	0,0350	11,44
0,08	6	0,2892	0,0311	10,74
0,08	6	0,2926	0,0239	8,17
0,8	6	6,4132	0,5163	8,05
0,8	6	6,5184	0,5481	8,41
0,8	6	6,3049	0,3456	5,48
2,0	6	16,0827	1,2474	7,76
2,0	6	17,3680	1,5079	8,68
2,0	6	15,7847	0,8896	5,64

n = número de amostras analisadas

x = média das relações de área EtOH / n-PROP

DP = desvio padrão

CV = coeficiente de variação

TABELA XI - Coeficiente de variação interensaios das concentrações sanguíneas de etanol em amostras adicionadas

concentração (g/L)	n	x	DP	CV%
0,08	18	0,2961	0,0295	9,97
0,8	18	6,4122	0,4582	7,15
2,0	18	16,4118	1,3634	8,31

n = número de amostras analisadas

x = média das relações de área EtOH / n-PROP

DP = desvio padrão

CV = coeficiente de variação

5.2.4. Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção do método para determinação de etanol em urina (item 4.2.2.4) foi de 0,01 g/L e o limite de quantificação foi de 0,01 g/L, apresentando um coeficiente de variação de 4,3 %, média e desvio padrão de $0,0129 \pm 0,0005$ g/L, para 10 replicatas. Para o sangue, o limite de detecção foi de 0,06 g/L e o limite de quantificação foi de 0,07 g/L, apresentando um CV de 2,18%, média e desvio padrão de $0,0693 \pm 0,0015$ g/L, para 10 replicatas.

5.2.5. Estudo de conservação e estabilidade das amostras

As análises feitas para o estudo de conservação, demonstraram que não houve produção “in vitro” de etanol nas amostras, mesmo após a urina ter ficado armazenada à temperatura ambiente por 1 semana (168 horas).

Os resultados do estudo de estabilidade estão apresentados nas *Tabelas XII e XIII*.

TABELA XII - Concentrações de etanol em amostras de sangue, em análises realizadas com intervalo de 30 dias, para estudo sobre estabilidade durante armazenamento.

Amostra	Concentração de etanol (g/L)		Variação ^a (%)
	1ª análise	2ª análise	
	média* ± dp	média* ± dp	
1	0,180 ± 0,028	0,190 ± 0,007	+ 5,56
2	0,940 ± 0,014	0,960 ± 0,021	+ 2,13
3	0,750 ± 0,035	0,780 ± 0,057	+ 4,00
4	0,650 ± 0,057	0,680 ± 0,099	+ 4,62
5	0,900 ± 0,007	0,930 ± 0,021	+ 3,33
6	0,670 ± 0,042	0,700 ± 0,028	+ 4,48
7	0,930 ± 0,057	0,940 ± 0,071	+ 1,08
8	0,380 ± 0,07	0,400 ± 0,000	+ 5,26
9	0,070 ± 0,014	0,070 ± 0,000	0,00
10	0,800 ± 0,1131	0,790 ± 0,057	- 1,25
11	0,390 ± 0,064	0,380 ± 0,063	- 2,56
12	0,730 ± 0,028	0,750 ± 0,085	+ 2,74
13	0,330 ± 0,014	0,300 ± 0,064	- 9,09
14	0,270 ± 0,057	0,250 ± 0,035	- 7,41

* Média de duplicata

^a Considerando a média da 1ª análise como 100%

TABELA XIII - Concentrações de etanol em amostras de urina, em análises realizadas com intervalo de 30 dias, para estudo sobre estabilidade durante armazenamento.

Amostra	Concentração de etanol (g/L)		Variação ^a (%)
	1ª análise	2ª análise	
	média* ± dp	média* ± dp	
1	0,960 ± 0,014	1,020 ± 0,057	+ 6,25
2	0,070 ± 0,007	0,070 ± 0,000	0,00
3	0,600 ± 0,035	0,580 ± 0,021	+ 6,67
4	0,850 ± 0,007	0,900 ± 0,099	+ 5,88
5	0,500 ± 0,064	0,550 ± 0,028	+ 10,0
6	0,500 ± 0,007	0,450 ± 0,021	- 10,0
7	1,210 ± 0,070	1,300 ± 0,042	+ 7,43
8	0,490 ± 0,014	0,480 ± 0,035	- 2,04
9	0,870 ± 0,056	0,860 ± 0,021	- 1,15
10	0,530 ± 0,063	0,580 ± 0,035	+ 9,43
11	1,430 ± 0,007	1,490 ± 0,057	+ 4,20
12	0,180 ± 0,078	0,170 ± 0,042	- 5,56

* Média de duplicata

^a Considerando a média da 1ª análise como 100%

A análise dos dados das *Tabelas XII e XIII*, mostraram que não houve variação superior a 10% entre os valores e que portanto a estabilidade no período de 30 dias mostrou-se adequada, após o armazenamento em freezer com adição de

fluoreto. Ao nível de 0,5% de significância, nenhuma diferença estatística na concentração de etanol foi observada entre as 2 análises. Para tal avaliação utilizou-se o teste *t* de Student para dados emparelhados, onde o valor de *p* obtido foi de 0,1088 ($r=0,9984$) para o sangue e de 0,1548 ($r=0,9949$) para a urina.

5.2.6. Precisão interindividual

Os resultados das análises realizadas com soluções de etanol em urina, nas concentrações de 0,15 ; 0,77 e 3,08 g/L, pelos técnicos 1 e 2, estão descritos na *Tabela XIV*. O coeficiente de correlação calculado com os resultados obtidos na análise dos dois técnicos foi igual a 0,9999.

TABELA XIV - Valores de etanol (g/L) encontrados nas análises realizada pelos analistas 1 e 2 para controle de qualidade.

Adicionado (g/L)	analista 1		analista 2	
	Média* $\pm$ DP	CV%	Média* $\pm$ DP	CV%
0,15	0,1593 $\pm$ 0,0000	0,00	0,1522 $\pm$ 0,0066	4,36
0,77	0,8062 $\pm$ 0,0142	1,76	0,7788 $\pm$ 0,0413	5,30
3,08	3,1662 $\pm$ 0,0192	0,61	3,1053 $\pm$ 0,0194	0,63

* - média de triplicata

5.2.7. Análise de amostras de referência

A *Tabela XV* apresenta os valores obtidos na análise dos controles do TDXFix®.

TABELA XV - Valores de concentração de etanol (g/L) encontrados em amostras de referência, comercializadas pela Abbott, em estudo de avaliação da exatidão da técnica cromatográfica.

Valor teórico	Valor aceito pelo fornecedor	Valor encontrado (média*± DP)
g/L		
0,5	0,43 - 0,58	0,5315±0,0117
1,0	0,90 - 1,10	1,0451±0,0146
1,5	1,35 - 1,65	1,5478±0,0189

* - média de duplicata

5.3. Comparação da técnica cromatográfica com a de imunofluorescência polarizada para determinação de etanol em sangue e urina

A *Figura 8* mostra a correlação dos resultados de 49 amostras de sangue e 45 amostras de urina analisadas simultaneamente por CG e pelo TDXFlx .

A análise de regressão linear para as concentrações sanguíneas de etanol medidas pelo CG (x) e pelo TDXFlx (y) forneceu a seguinte equação:

$$y = 0,9064x + 0,0034 \text{ (} r = 0,9976, n = 49 \text{)}$$

A média da diferença (x-y) foi 0,0436 g/l para os 49 pares, cujo intervalo de confiança de 95% apresentou valor mínimo de 0,0307 e máximo de 0,0565. Verificou-se que 36 das diferenças foram positivas, 4 foram negativas e 9 iguais a zero, demonstrando que, na maioria dos casos, as concentrações sanguíneas de etanol por cromatografia gasosa apresentaram valores um pouco maiores do que os obtidos pela técnica de imunofluorescência polarizada.

A análise de regressão linear para as concentrações urinárias de etanol medidas pelo CG (x) e pelo TDXFlx (y) forneceu a seguinte equação :

$$y = 0,9426x + 0,0201 \text{ (} r = 0,9949, n = 45 \text{)}$$

A média da diferença (x-y) foi 0,0471 g/l para os 45 pares, cujo intervalo de confiança de 95% apresentou valor mínimo de 0,0325 e máximo de 0,0617. Verificou-se que 30 das diferenças foram positivas, 5 foram negativas e 9 foram zero, demonstrando que, na maioria dos casos, as concentrações urinárias de etanol por cromatografia gasosa apresentaram

valores um pouco maiores do que os obtidos pela técnica de imunofluorescência polarizada.

Figura 8 - (A) Correlação dos resultados das amostras de sangue, analisadas simultaneamente por CG e pelo TDXFix ($r= 0,9976$); (B) Correlação dos resultados das amostras de urina analisadas simultaneamente por CG e pelo TDXFix ($r= 0,9949$).

5.4. Determinação de etanol nas amostras provenientes dos voluntários.

5.4.1. Amostras de sangue e urina

A determinação de etanol em amostras de sangue e urina, referentes aos 10 voluntários, forneceram resultados descritos nas *Tabelas XVI e XVII*.

5.4.2. Amostras de ar exalado

Os resultados obtidos na determinação do etanol em ar exalado estão descritos na *Tabela XVIII*. A conversão em g de etanol / L de ar exalado foi realizada com o auxílio do fator de 0,476 (1,000 ‰ equivale a 0,476 mg/L), fornecido pelo fabricante.

TABELA XVI - Concentração de etanol (g/L) no sangue dos voluntários, em função do horário de coleta .

Voluntário horário (horas)	1*	2*	3*	4*	5*	6	7	8	9	10
	Concentração de etanol (g/L)									
0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,7	0,59	0,90	1,22	1,04	0,80	1,10	1,18	1,18	1,27	1,31
1,0	0,93	1,15	1,10	0,86	1,20	1,16	1,03	1,37	1,09	1,23
1,5	0,79	0,86	1,03	0,80	0,88	0,87	1,00	•	0,91	1,16
2,0	0,72	0,75	1,00	0,78	0,79	0,73	0,81	0,90	0,82	1,06
3,0	0,60	0,67	0,93	0,67	•	0,61	0,70	0,69	0,52	0,85
4,0	0,37	0,51	0,55	0,33	0,39	0,39	0,55	0,49	0,27	0,68
5,0	0,22	0,36	0,44	0,13	0,22	0,20	0,33	0,27	0,06	0,44
6,0	0,08	0,12	0,18	0,00	0,07	•	0,11	0,07	0,00	0,18
7,0	0,00	0,07	0,07	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00	0,06

*- Entre estes voluntários, exceto nas 1ª e 2ª coletas, os horários de coleta foram atrasados de 15 min. em relação ao protocolo.

• - Amostras de sangue coaguladas.

TABELA XVII - Concentração de etanol (g/L) na urina dos voluntários, em função do horário de coleta.

Voluntário horário (horas)	1*	2*	3*	4*	5*	6	7	8	9	10
	Concentração de etanol (g/L)									
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	0,57	1,11	1,17	0,85	0,84	1,21	1,28	1,44	1,02	1,23
2	0,96	1,04	1,32	1,00	1,22	1,10	1,17	1,24	1,17	1,43
3	0,83	1,02	1,07	0,75	1,01	0,94	0,90	0,87	0,99	1,12
4	0,68	0,69	0,81	0,50	0,69	0,68	0,71	0,53	0,67	0,83
5	0,39	0,50	0,60	0,24	0,40	0,43	0,49	0,32	0,15	0,73
6	0,11	0,28	0,25	0,05	0,18	0,15	0,26	0,15	0,00	0,36
7	0,03	0,07	0,08	0,00	0,00	0,04	0,07	0,03	0,00	0,11
12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

*- Entre estes voluntários, exceto nas 1^a, 2^a e 9^a coletas, os horários de coleta foram atrasados de 15 min. em relação ao protocolo.

TABELA XVIII - Concentração de etanol em amostras de ar exalado (g/L) em função do horário de coleta

Voluntário horário (horas)	1*	2*	3*	4*	5*	6	7	8	9	10
	Concentração de etanol (g/Lx100)									
0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,7	0,30	0,35	0,56	0,36	0,41	0,45	0,44	0,51	0,41	0,52
1,0	0,38	0,33	0,47	0,31	0,41	0,41	0,42	0,50	0,38	0,48
1,5	0,32	0,30	0,42	0,28	0,39	0,35	0,36	0,42	0,31	0,42
2,0	0,28	0,30	0,41	0,25	0,34	0,32	0,29	0,36	0,27	0,35
3,0	0,24	0,24	0,31	0,16	0,26	0,24	0,24	0,28	0,20	0,29
4,0	0,17	0,17	0,22	0,10	0,18	0,16	0,19	0,16	0,08	0,22
5,0	0,08	0,11	0,14	0,00	0,08	0,06	0,10	0,08	0,00	0,13
6,0	0,00	0,03	0,04	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,04
7,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

*- Entre estes voluntários, exceto nas 1ª e 2ª coletas, os horários de coleta foram atrasados de 15 min. em relação ao protocolo.

5.5. Correlação entre as concentrações de etanol presentes no sangue, urina e ar exalado

Com base nos resultados apresentados no item 5.4 para as amostras de sangue e urina (*Tabela XVI e XVII*), foram verificados os perfis de eliminação (*Figura 9*), de cada voluntário que participou do experimento.

As relações entre concentração de etanol na urina e a concentração de etanol no sangue, em função do tempo após ingestão, estão apresentadas na *Tabela XIX*. A representação gráfica das relações presentes na tabela, está demonstrada na *Figura 10*.

Através destes dados, foi calculado um índice de correlação médio igual a 1,46 (intervalo de 0,61 a 2,57). O coeficiente de correlação entre todas as concentrações de etanol no sangue e as respectivas concentrações na urina foi 0,9434 (n=81).

Outros três índices de correlação foram calculados, um correspondente à fase de absorção (considerando o período de 1 hora após ingestão), que apresentou resultado igual a 0,93, um segundo para a fase de pós absorção (2 a 7 horas), com um índice igual a 1,56 e um terceiro, para uma faixa de tempo dentro do período de pós absorção (2 a 5 horas) igual a 1,47.

Considerando somente os valores de etanol em sangue e urina da fase de pós absorção (2 a 7 horas após ingestão), foi obtido um coeficiente de correlação igual a 0,9679. Um índice de correlação igual a 0,9509 foi obtido para o período de 2 a 5 horas.

A correlação sangue / ar exalado apresentou um bom resultado, conforme mostra a *Figura 11*. O coeficiente de correlação foi de 0,9804 (n=97).

Perfil semelhante foi observado quando os valores de concentração de etanol foram expressos em ‰ de ar exalado, com um valor de r igual a 0,9806.

O índice de correlação médio (sangue / ar exalado), calculado a partir dos dados apresentados na *Tabela XX*, foi de 2 805. A representação gráfica das razões presentes na *Tabela XX*, está demonstrada na *Figura 12*.

Considerando as fases de absorção e pós-absorção, obteve-se os seguintes índices de correlação: 2 602 (1 hora após ingestão); 2 937 (2 a 7 horas após ingestão) e 2 829 (2 a 5 horas após ingestão).

Figura 11 - Correlação entre a concentração de etanol no sangue (g/L) e no ar exalado (g/L) ($r = 0,9804$, $n=97$)

Figura 9 - Concentração de etanol em amostras de sangue e urina de cada voluntário, em função do tempo após ingestão de uísque em doses equivalentes a 0,68g de etanol por kg de peso corpóreo.

TABELA XIX - Relação da concentração de etanol na urina (U) e no sangue (S) dos voluntários, em função do horário da coleta^a

Voluntário	1*	2*	3*	4*	5*	6	7	8	9	10
horário (horas)	Relação U / S									
0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1,0	0,61	0,97	1,06	0,99	0,70	1,04	0,93	1,05	0,94	1,00
2,0	1,33	1,39	1,32	1,28	1,55	1,51	1,44	1,38	1,43	1,35
3,0	1,38	1,52	1,15	1,12	•	1,54	1,29	1,26	1,90	1,32
4,0	1,84	1,35	1,47	1,52	1,77	1,74	1,29	1,08	2,48	1,22
5,0	1,77	1,39	1,36	1,85	1,82	2,15	1,49	1,19	2,5	1,66
6,0	1,38	2,33	1,39	0,00	2,57	•	2,37	2,14	0,00	2,00
7,0	0,00	1,00	1,14	0,00	0,00	0,67	0,00	0,00	0,00	1,83

* - Entre estes voluntários, exceto nas 1a e 2a coletas, os horários foram atrasados de 15 min. em relação ao protocolo.

• - Não foi possível fazer a relação U / S, pois o valor da concentração sanguínea de etanol não foi determinada.

TABELA XX - Relação da concentração de etanol no sangue (S) e no ar exalado (Ar) dos voluntários, em função do horário da coleta^a

Voluntário horário (horas)	1*	2*	3*	4*	5*	6	7	8	9	10
Relação S / Ar										
0,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,7	1 967	2 571	2 179	2 889	1 951	2 444	2 682	2 314	3 098	2 519
1,0	2 447	3 485	2 340	2 774	2 927	2 829	2 452	2 740	2 868	2 563
1,5	2 469	2 867	2 452	2 857	2 256	2 486	2 778	•	2 936	2 762
2,0	2 571	2 500	2 439	3 120	2 323	2 281	2 793	2 500	3 037	3 029
3,0	2 500	2 792	3 000	4 188	•	2 542	2 917	2 464	2 600	2 931
4,0	2 177	3 000	2 500	3 300	2 167	2 438	2 895	2 579	3 375	3 091
5,0	2 750	3 273	3 143	0	2 750	3 333	3 300	2 700	0	3 385
6,0	0	4 000	4 500	0	0	0	2 750	0	0	4 500
7,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* - Entre estes voluntários, exceto nas 1a e 2a coletas, os horários foram atrasados de 15 min. em relação ao protocolo.

• - Não foi possível fazer a relação S / Ar, pois o valor da concentração sanguínea de etanol não foi determinada.

Figura 10 - Relação das concentrações urina / sangue obtida com amostras de voluntários, em função do tempo (min.) após administração do etanol.

tempo após ingestão (min.)

Figura 12 - Relação das concentrações sangue / ar exalado obtida com amostras de voluntários, em função do tempo (min.) após administração do etanol.

6. DISCUSSÃO

Visando cumprir os objetivos do trabalho, foi escolhida a cromatografia gasosa com separação por *head space* para determinar a concentração de etanol nas amostras de sangue e urina, uma vez que é uma técnica muito utilizada com esta finalidade nas diversas áreas da Toxicologia^{3,8,23, 30, 32, 42, 52, 56, 57, 84, 87, 88, 89}.

O procedimento analítico é bastante simples e preconizado por diversos autores, apresentando sensibilidade e precisão adequadas, além de ser uma análise rápida. O etanol e o n-propanol (padrão interno), no procedimento padronizado foram eluídos no tempo máximo de 5 minutos. A técnica mostrou linearidade no intervalo de concentração compreendido entre 0,01 e 3,20 g/L (figura 4), que constitui uma faixa que abrange exposição leve a casos de intoxicação.

A capacidade de separação da coluna Poraplot Q, na temperatura de 150°C, permitiu alcançar uma resolução ótima, uma vez que eluíram alguns potenciais interferentes em tempos bem diferentes assim como o acetaldeído proveniente da biotransformação do etanol (figura 3 / TABELA III). TAGLIARO⁸⁴ descreve a presença de metanol como um adulterante comum de bebidas alcoólicas e o 2-propanol como um solvente farmacêutico bastante utilizado. Além disso, a acetona pode estar presente em sangue de indivíduos intolerantes à glicose³¹.

A técnica de *head space*, cujo significado seria “espaço da parte superior do frasco ou espaço ocupado pelo vapor liberado da amostra”, é amplamente utilizada na determinação de substâncias voláteis^{21,22, 23, 42, 53, 56, 88, 89}.

Porém, um grande problema existente na análise quantitativa por *head space* é o efeito de matriz. A composição da amostra influencia a concentração do analito na fase gasosa, e consequentemente a exatidão dos resultados. Para compensar este efeito e obter resultados mais exatos, faz-se uso de padrões internos para a calibração²².

A adição de um sal à matriz biológica no procedimento de separação tem sido frequentemente utilizada para aumentar o coeficiente de volatilização dos compostos em solução, e portanto a concentração na fase de vapor⁸⁸. Nesta técnica chamada de *salting out*, a solubilidade dos voláteis na fase líquida é reduzida. O Na_2SO_4 foi escolhido por liberar múltiplos íons, pela sua efetividade em consequência de seu tamanho, densidade e dos efeitos sobre a estrutura da água. O sulfato é um anion mais efetivo que o cloreto, e o sódio um cation mais efetivo que o amônio¹². O Na_2SO_4 , utilizado como agente de *salting out*, apesar de aumentar a recuperação de todos os compostos em água e sangue, também exagera a diferença existente entre estes fluidos⁸⁸.

As curvas de calibração foram realizadas com amostras de sangue e urina. A curva para uma determinada matriz deve ser somente utilizada para amostras desta mesma matriz, senão os resultados obtidos podem sofrer erros sistemáticos²². As diferenças entre estes 2 materiais foram nitidamente observadas nos estudos sobre exatidão da técnica. Nesses estudos a recuperação foi baseada na comparação da curva feita em água, onde atribui-se um valor de 100% de recuperação, com as curvas feitas em sangue e urina. A recuperação relativa, calculada para cada matriz biológica através da comparação da relação de área etanol / n-propanol com a relação obtida em solução aquosa, apresentou resultados bons para a urina (91,60 a 103,28 %) e discutíveis para o sangue (55,88 a 146,35 %). A recuperação absoluta, avaliando o etanol e o n-propanol separadamente nos fluidos biológicos, também apresentou resultados diferentes frente às 2 matrizes. Ou seja, enquanto a urina apresentou excelentes resultados (93,78 a 101,49 %), o sangue apresentou resultados que variaram de 27,23 a 79,41 % em função da concentração de etanol.

Uma das causas de maior inexatidão verificada para o sangue é que existe uma diferença bastante significativa no coeficiente de partição entre água e sangue, o que já não ocorre com a urina, por ser uma amostra menos complexa e com maior porcentagem de água em sua composição⁶⁸. Além disso, o n-propanol utilizado como padrão interno, apresenta uma substancial diferença no coeficiente de partição quando compara-se sangue e urina⁸⁸.

O n-propanol é uma substância similar ao etanol, com tempo de retenção próximo e que geralmente não faz parte da amostra analisada. A concentração de 0,08 g/L apresenta altura do pico cromatográfico equivalente àquela obtida para a concentração intermediária de etanol na curva de calibração. No estudo de recuperação, o n-propanol apresentou um resultado igual a 52,5% para o sangue e 100,6% para a urina, sendo compatível com as observações acima mencionadas.

A técnica de separação adotada neste trabalho tem sido empregada para análise de sangue, na rotina de muitos laboratórios forenses. No entanto na avaliação da recuperação deste procedimento, não obtivemos resultados tão satisfatórios para esta espécie biológica.

A precisão do método foi verificada através dos coeficientes de variação (CVs), obtidos intra e inter-ensaios, nas análises de alíquotas de sangue e urina contendo etanol. Os CVs, descritos nas tabelas VIII, IX, X e XI, mostraram-se aceitáveis, visto que para o sangue os maiores valores encontrados intra e inter-ensaio foram 11,44% e 9,97%, respectivamente, e para a urina, 5,9% e 6,5%, respectivamente.

Estes valores encontram-se dentro da faixa preconizada, que aceita uma imprecisão menor que 15%, tanto intra como inter testes¹¹.

O limite de quantificação (LQ) obtido para as amostras de sangue foi 7 vezes maior que o LQ da urina. No caso do sangue isto

representa um valor bastante baixo do ponto de vista toxicológico, visto que no Brasil a máxima concentração de etanol permitida por Lei, para condutores de veículos, é de 0,8 g/L. Para o propósito do trabalho, estes valores foram suficientemente adequados para a quantificação de etanol após administração oral única de dose farmacologicamente ativa, no período de 7 horas.

Uma questão comumente discutida na análise de etanol em material biológico é a produção *in vitro* de etanol^{4,7,9,50,70}. O estudo de conservação demonstrou que não houve produção de etanol nas amostras mantidas sob diversas condições de armazenamento. De acordo com alguns autores, a produção de concentrações significativas de etanol *in vitro*, ocorre somente a partir de amostras não preservadas, na presença de grandes quantidades de microorganismos produtores de etanol (ex. *Candida albicans*) e glicose, requerendo mais de 12 horas para o processo se estabelecer^{4, 50, 70}.

A condição requerida para a produção de etanol *in vitro* também pode ser aplicada à produção *in vivo*. Urina contendo glicose, caso comum em pacientes com diabetes mellitus, fornecerá condições favoráveis para a produção de etanol, se houver microorganismos produtores de etanol na bexiga. Contudo, a quantidade máxima de etanol produzida será limitada pela quantidade de glicose presente na urina e pelo tempo de incubação⁵⁰. BALL E LICHTENWALNER⁴ descrevem o caso de um paciente com diabetes, cuja urina continha glicose e *Candida albicans*, onde seus dados demonstram que o nível de etanol aumentou enquanto a taxa de glicose diminuiu com o tempo.

O fluoreto é um inibidor de crescimento microbiano muito utilizado, embora sua concentração e as condições de armazenamento possam alterar sua eficácia⁵⁰.

Um outro item importante referente a conservação da amostra para análise de etanol é a volatilidade deste álcool, cujo teor poderia diminuir com o tempo devido à perdas através da tampa do recipiente.

Em espécimes de sangue, após adição de conservante e armazenamento em temperaturas abaixo de 0°C, a concentração alcoólica não se altera significativamente por pelo menos 12 meses^{7,10,44,59,79}.

Em relação à urina, poucos estudos foram feitos sobre o armazenamento desta amostra biológica. Porém, as mesmas condições utilizadas para o sangue tem sido reproduzidas para a urina, com a vantagem de se utilizar frascos de polietileno para a estocagem⁵⁹. Neste trabalho, o armazenamento de sangue e urina por 30 dias, com conservante e em freezer, não alterou a concentração de etanol.

Embora a determinação do etanol por *head space* e cromatografia gasosa seja considerado o método de escolha nas diversas áreas da Toxicologia devido à simplicidade, sensibilidade e precisão apresentadas, uma grande preocupação deve existir em relação à manipulação das amostras biológicas, uma vez que o resultado da análise depende de todo um conjunto de procedimentos adotados, principalmente pelas características físico-químicas do etanol.

Os coeficientes de variação obtidos no estudo de precisão interindividual não foram superiores a 5,3%, quando as amostras de urina foram analisadas por outros técnicos, confirmando os resultados da padronização.

Em relação à análise de amostras de referência, no caso amostras de sangue fornecidas como controles do TDXFix®, as concentrações de etanol determinadas por cromatografia encontraram-se dentro da faixa de valor aceito pelo fornecedor. Com isso, ficou demonstrado que o uso de curvas de calibração feitas no mesmo material biológico a ser usado para análise, é capaz de eliminar

problemas decorrentes da inexatidão observada para a análise de etanol no sangue.

A comparação da técnica padronizada com a de imunofluorescência polarizada forneceu ótimos coeficientes de correlação, tanto para o sangue quanto para a urina.

Os métodos enzimáticos são bastante utilizados na determinação de etanol e de outras drogas em material biológico. Como são usualmente considerados apenas para triagem, vários estudos são feitos com o intuito de compará-los à cromatografia gasosa, que é a técnica de escolha na análise de etanol^{8,38,39,40,46,83,87}. Neste trabalho, a comparação teve um sentido inverso, ou seja, foi utilizada como uma forma de validar a técnica cromatográfica padronizada. Na maioria dos casos observados na literatura, os resultados da comparação são satisfatórios, apresentando bons coeficientes de correlação, confirmando que o uso de equipamentos de imunoensaio pode ser feito com segurança.

Os voluntários selecionados para o trabalho, representados por um grupo de homens com idade entre 20 e 35 anos, não reproduzem a situação real da diversidade existente no ambiente de trabalho. Situações tais como alcoolismo crônico ou uso de mais drogas de abuso, exposição concomitante a outros solventes e a medicamentos, alterações fisiopatológicas, idade superior a faixa acima mencionada, o estresse, o calor, a atividade física, entre outras, poderiam potencialmente alterar as concentrações de etanol no sangue, urina e ar exalado.

No entanto, conhecer estes valores, em uma situação cuidadosamente planejada, onde os indivíduos apresentavam-se como um grupo bastante homogêneo, em condições de exposição também controladas, foi necessário para as conclusões pretendidas neste experimento. A extrapolação delas para a rotina dos programas de

controle e prevenção do uso de álcool e drogas no ambiente de trabalho, requerem diversos cuidados por parte do toxicologista.

A escolha da dose de 0,68 g de etanol por kg de peso corpóreo foi baseada nos estudos feitos por Jones ^{34,35}, que obteve como concentração sanguínea máxima, valores em torno de 0,8 a 1,2 g/L. Essa dose equivale a mais ou menos 150 mL de uísque, para indivíduo de 70 kg. Esta dose é viável para ser ingerida por trabalhadores durante a jornada de trabalho, principalmente no intervalo de almoço.

A determinação do etanol em amostras de sangue e urina dos voluntários resultou nos valores descritos nas tabelas XVI e XVII. A figura 9 fornece uma visão geral do comportamento do etanol nas diferentes fases da cinética, em sangue e urina. O pico máximo no sangue ocorreu por volta de 1 hora após a ingestão e na urina este foi atingido em torno de 2 horas. Isto porque durante a fase de absorção, é suposto que a quantidade de etanol absorvida seja maior do que a eliminada. Na fase de pós absorção, estes valores se inverteram, ocorrendo maiores concentrações de etanol na urina. É importante destacar também que o decréscimo nos níveis sanguíneos de etanol não implica necessariamente no final da fase de absorção. Esta diminuição pode indicar que a velocidade de eliminação por outras vias está ocorrendo mais rápido que a velocidade de absorção e redistribuição do etanol entre os compartimentos periféricos e centrais³³.

Através das tabelas XVI e XVII, verifica-se que nas últimas coletas a urina tem a propriedade de ser positiva, mesmo abaixo de 0,10 g de etanol / L, enquanto o sangue já está negativo,

Na população estudada, a correlação entre as concentrações de etanol no sangue e na urina apresentou um valor médio igual a 1,46, portanto acima do oficialmente estabelecido em alguns países, onde a urina tem sido usada como amostra para determinação do etanol ³⁴. Utilizando-se deste fator de conversão, foi calculada a concentração de

etanol no sangue a partir dos dados obtidos em urina e esta comparada com a determinada experimentalmente, sendo verificado que em 44% dos casos os valores estavam subestimados, e em 35% a concentração calculada excedia o valor obtido no laboratório. Os valores subestimados encontravam-se principalmente nas coletas de 1 e 2 horas.

A despeito dos fatores já mencionados e que poderiam influenciar esta relação, um outro fator importante a considerar é o tipo do sangue coletado. Por exemplo, na fase de pós absorção, a concentração de etanol no sangue venoso é um pouco mais alta que no sangue capilar. Isto deve ser lembrado toda vez que a relação urina/sangue for comparada em diferentes investigações³⁴. No trabalho foi utilizado sangue venoso, ao passo que em várias outras pesquisas o sangue capilar tem sido usado.

A relação urina/sangue foi menor que 1 na fase de absorção, tendo esta relação um índice médio de 1,56 na fase seguinte. Isto significa que se a urina for coletada logo após a ingestão, pode ocorrer do índice de correlação médio subestimar o valor da concentração sanguínea existente. Quando avaliamos o terceiro índice estudado, igual a 1,47, que inclui o período de 2 a 5 horas após ingestão, verificamos que ele se aproxima do valor médio obtido, principalmente por não incluir no seu cálculo os valores da fase de absorção (geralmente abaixo de 1,0) e aqueles obtidos nos últimos horários da coleta (valores em torno de 2,0).

Os coeficientes de correlação: 0,9434 (todo o período), 0,9679 (período de 2 a 7 horas após absorção) e 0,9509 (período de 2 a 5 horas após absorção), mostraram-se pouco eficientes para demonstrar as diferenças destas relações nos diferentes períodos, não podendo pontuar os problemas da utilização dos mesmos.

Existem diferentes opiniões sobre a validade e utilidade da urina como amostra biológica na análise do etanol com propósitos legais.

Alguns autores sugerem que a concentração urinária de etanol não deva presumir a concentração sanguínea, devido à grande variação inter e intra indivíduo na relação urina/sangue³⁴.

A concentração urinária dividida pelo índice de correlação fornece um valor de concentração sanguínea. Todavia, a urina sofre um período de armazenamento antes de sua eliminação e a concentração de etanol nesta amostra não reflete necessariamente a concentração sanguínea naquele momento³⁴.

O valor utilizado de 1,35 é um valor médio e depende, entre outras coisas, da quantia de água presente no sangue e urina. Embora a concentração de água no sangue seja quase constante (80%p;p), a gravidade específica da urina é mais variável e depende da dieta do indivíduo, do balanço fluido-água, da função renal e o estado geral de saúde. Porém, a concentração relativa de etanol na fase aquosa do sangue ou da urina não sofre alteração com o aumento da diurese^{34,35}.

BIASOTTI e VALENTINE⁵ sugerem que o uso de uma segunda amostra de urina, coletada após esvaziamento completo da bexiga, num prazo de 20 a 60 minutos da primeira, seria a forma correta de amostragem para se estimar a concentração sanguínea. Isto porque existe uma preocupação com a urina existente na bexiga que pode super ou subestimar a concentração de etanol. Se a coleta é feita logo após o consumo de bebidas alcoólicas, e o indivíduo já continha um certo volume de urina isenta de etanol na bexiga, a primeira coleta forneceria uma relação errônea e abaixo do real. Por outro lado, quando o indivíduo já atingiu a fase de pós-absorção e não houve esvaziamento completo da bexiga, pode ocorrer da urina formada se contaminar com o pequeno "pool" de urina velha, que contém maior concentração de etanol do que a formada⁵.

O uso de ar exalado como amostra já está bastante divulgado na Toxicologia. Neste trabalho foi empregado para que a relação sangue:ar exalado pudesse servir de referência para o estudo da

relação urina:sangue, que é um procedimento importante para validar a urina conforme proposto.

A determinação de etanol em ar exalado feita pelo alcômetro, forneceu resultados na unidade ‰. Estes podem ser convertidos para mg/L através do fator fornecido pelo fabricante. Porém, neste trabalho os valores da concentração de etanol no ar exalado foram estimados em g/L (tabela XVIII) para facilidade de comparação.

Um inconveniente encontrado no uso deste alcômetro é a utilização de uma unidade diferente da preconizada (g/L), o que dificulta a interpretação dos resultados, principalmente se estes forem usados numa operação de campo para controle do uso de álcool. Deve ser esclarecido aos usuários do mesmo, que os valores referem-se a g/L de ar exalado e não g/L de sangue, como inadvertidamente tem ocorrido.

Em relação à correlação sangue / ar exalado, obtivemos um ótimo coeficiente de correlação ($r=0,9806$) e um índice de correlação médio de 2 805. Porém, houve uma grande variação intra e interindividual nestas razões, como pode ser visto na *Figura 12*.

Quando não é possível utilizar o sangue, o ar exalado é bastante indicado para a estimativa da concentração sanguínea de etanol. Considera-se a constante de correlação como 2 100, ou seja, a concentração sanguínea sendo 2 100 vezes maior que a concentração no ar exalado. Porém, vários estudos feitos com amostras de sangue e ar exalado, coletadas simultaneamente, demonstraram o mesmo problema observado quando a urina é utilizada, isto é, a relação sangue/ar exalado não é constante, podendo super ou subestimar os valores de etanol no sangue^{5, 34, 78, 86}.

Muitos fatores devem ser considerados quando a relação sangue/ar exalado é calculada, como as diferenças arteriais e venosas na concentração de etanol, a fase da cinética, o tipo de bafômetro

utilizado, a sua calibração, o formato do bocal, podendo explicar discrepâncias nos resultados^{37,78}.

Erros potenciais na análise do ar exalado podem ser causados pela presença de vapores de etanol na boca do indivíduo. Imediatamente após ingestão, há vapores de álcool na boca suficientes para fornecer resultados elevados de etanol no ar exalado^{25,41}.

Do mesmo modo que a urina, para o ar exalado existe um índice de correlação para todas as fases da cinética do etanol, podendo subestimar ou superestimar a concentração sanguínea, visto que este índice não é um valor constante. Um segundo ponto de semelhança refere-se aos erros oriundos do horário da coleta, pois no período de eliminação a urina tem a propriedade de ser positiva enquanto o sangue pode estar negativo, superestimando o resultado. Com o ar exalado ocorre exatamente o inverso, ou seja, a concentração sanguínea apresenta valores positivos enquanto o ar exalado já está negativo, subestimando o resultado.

A vantagem do etanol sobre outros fármacos dentro dos programas de controle e prevenção do uso de álcool e drogas no local de trabalho é que sua rápida biotransformação faz com que este não permaneça por muito tempo no organismo, podendo-se avaliar portanto se o consumo foi feito durante a jornada de trabalho ou em um tempo próximo a esta.

No entanto, verificamos que a interpretação dos resultados, independentemente das amostras biológicas empregadas, deve ser feita tomando-se precauções, principalmente em relação ao horário da coleta, sobretudo para evitar a fase inicial subsequente ao uso, sendo o período de 3 horas após início ou reinício da jornada um tempo adequado para a detecção do uso.

Convém ressaltar que o uso do etanol no ambiente de trabalho nunca é permitido, ou seja, qualquer quantidade encontrada vai ser passível de interpretação por parte do médico revisor.

CONCLUSÕES

- a) O método analítico utilizado, semelhante à maioria dos métodos existentes na literatura para análise de etanol, aplica-se melhor à urina que ao sangue, entre outros fatores, pela menor complexidade desta matriz: recuperação relativa - 91,60 a 103,28% para a urina e 55,88 a 146,35% para o sangue; recuperação absoluta - 93,78 a 101,49% para a urina contra 27,23 a 79,41% para o sangue; precisão intra e interensaio - 5,9 e 6,5% para urina contra 11,4 e 10,0% para o sangue. O limite de quantificação foi 7 vezes menor para a urina quando comparada ao sangue (LQ= 0,01g/L e 0,07g/L, respectivamente).
- b) Diferentemente do sangue, a produção de etanol *in vitro* é pouco favorecida quando se utiliza a urina. O estudo sobre conservação demonstrou que não houve produção de etanol em amostras mantidas sob diversas condições de armazenamento. Em relação à estabilidade, o uso de fluoreto a 1% e o armazenamento em freezer mostraram-se adequados.
- c) O excelente coeficiente de correlação entre a técnica de imunofluorescência polarizada e a cromatografia a gás permite a indicação desta última como técnica de escolha tanto para triagem como confirmação, uma vez que apresenta a sensibilidade da primeira sem os inconvenientes de resultados falso-positivos sabidamente conhecidos nas técnicas de imunoensaio. A cromatografia a gás, nas condições padronizadas, pode analisar até 100 amostras ao dia, com um custo inferior à imunofluorescência polarizada.

- d) O pico máximo de concentração de etanol ocorreu por volta de 1 hora para o sangue e 2 horas para a urina, permanecendo positiva nesta amostra durante período de 7 horas.
- e) A correlação urina:sangue variou muito, mesmo para um único indivíduo, em função do tempo decorrido entre ingestão e coleta. A fase mais homogênea e portanto, melhor para o uso do índice de correlação, ficou entre 2 e 5 horas após a fase de ingestão do álcool, em todos os indivíduos estudados.
- f) A comparação entre as correlações urina:sangue e sangue:ar exalado durante todo o período entre ingestão do etanol e coleta, mostrou que a segunda correlação apresentou uma flutuação maior entre indivíduos e em função do tempo, indicando que o uso da urina pode ser mais fidedigno do que o de ar exalado, quando da extrapolação dos dados para a determinação da concentração sanguínea.
- g) O período de 3 horas após o início ou reinício da jornada de trabalho mostra-se adequado para a detecção do uso de etanol no ambiente de trabalho, evitando coleta em período subsequente ao uso e consequentemente, resultados de difícil interpretação. Período posterior aumentaria a possibilidade de erro, pelos motivos apresentados nas conclusões d) e e).
- h) Com os dados obtidos nas curvas de eliminação do etanol na urina, para todos os voluntários deste experimento (Figura 9), ficou comprovado que o modelo toxicocinético de sua excreção urinária permite a prática sugerida por alguns autores, de coleta sucessiva de 2 amostras de urina para uma avaliação do uso recente (fase de absorção) de bebidas alcoólicas.

- i) A validação do uso de amostras de urina para análise de etanol nos programas de prevenção e controle do uso de álcool e drogas no ambiente de trabalho significa minimizar os problemas existentes na interpretação das análises. O conhecimento das influências que podem ocorrer na fase da toxicocinética, e/ou toxicodinâmica é todavia sempre necessário, cabendo ao toxicologista a interpretação correta dos resultados, quaisquer que sejam as amostras utilizadas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS^(*)

1. AHLAWAT, S. K., SIWACH, S. B. Alcohol and coronary artery disease. **Int. J. Cardiol.**, Amsterdam, v.44, p.157-162, 1994.
2. AHMED, F. E. Toxicological effects of ethanol on human health. **Crit. Rev. Toxicol.**, Boca Raton, v.25, n.4, p.347-367, 1995.
3. ANTHONY, R. M., SUTHEIMER, C. A., SUNSHINE, I. Acetaldehyde, methanol and ethanol analysis by headspace gas chromatography. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, v.4, p. 43-45, 1980.
4. BALL, W., LICHTENWALNER, M. Ethanol production in infected urine. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.30, n.11, p.614, 1979.
5. BIASOTTI, A. A., VALENTINE, T. E. Blood alcohol concentration determined from urine samples as a practical equivalent or alternative to blood and breath alcohol tests. **J. Forensic Sci.**, Philadelphia, v.30, n.1, p.194-207, 1985.
6. BOSROM, W. F., EHRIG, M. D., LI, T. K. Genetic factors in alcohol metabolism and alcoholism. **Semin. Liver Dis.**, New York, v.13, n.2, p.126-135, 1993.
7. BROWN, G. A., NEYLAN, D., REYNOLDS, W. J., SMALLDON, K. W. The stability of ethanol in stored blood. Part I. Important variables and interpretation of results. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v.66, p. 271-283, 1973.
8. CAPLAN, Y. H., LEVINE, B. The analysis of ethanol in serum, blood, and urine: a comparison of the Td_x REA ethanol assay with gas chromatography. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, v.10, p. 49-52, 1986.
9. CHANG, J., KOLLMAN, E. The effect of temperature on the formation of ethanol by *Candida albicans* in blood. **J. Forensic Sci.**, Philadelphia, v.34, n.1, p.105-109, 1989.
10. CHANG, R., SMITH, W.A., WALKIN, E., REYNOLDS, P. C. The stability of ethyl alcohol in forensic blood specimens. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, v.8, p.66-67, 1984.

^(*) De acordo com a norma NBR 6023/89 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 1996.

11. CHASIN, A. A. M., CHASIN, M., SALVADORI, M. Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas. **Rev. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo**, São Paulo, v.30, n.2, p.49-53, 1994.
12. CHRISTMORE, D. S., KELLY, R. C., DOSHIER, L. A. Improved recovery and stability of ethanol in automated headspace analysis. **J. Forensic Sci.**, Philadelphia, v.29, n.4, p.1038-1044, 1984.
13. CHRISTOPHERSEN, A. S., MORLAND, J. Drug analysis for control purposes in forensic toxicology, workplace testing, sports medicine and related areas. **Pharmacol. Toxicol.**, New York, v.74, p.202-210, 1994.
14. COFFMAN, N. B. Efficient extraction of volatile compounds from solvent matrix for head space analysis. **Clin. Chem.**, Winston-Salem, v.39, n.6, p.1241, 1993.
15. CONRY, P. B. Drugs and alcohol in the workplace. **AAOHN Am. Assoc. Occup. Health Nurses J.**, Atlanta, v.39, n.10, p.461-465, 1991.
16. COSTA, C. A. L. A ética e a testagem de drogas no trabalho. In: FORUM NACIONAL SOBRE DEPENDÊNCIA QUÍMICA NAS EMPRESAS, 3., São Paulo, 1996. **Relatos e Conferências**. São Bernardo do Campo, EMS, s.d. p.49-55.
17. COX, R. A., CRIFASI, J. A. A comparison of a commercial microdiffusion method and gas chromatography for ethanol analysis. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, v.14, p.211-212, 1990.
18. CURRY, A. S., WALKER, G. W., SIMPSON, G. S. Determination of ethanol in blood by gas chromatography. **Analyst**, London, v. 91, p. 742-743, 1966.
19. DAY, C. P., BASHIR, R., JAMES, O. F. W., BASSENDINE, M. F., CRABB, D. W., THOMASSON, H. R., LI, T., EDENBERG, H. J. Investigation of the role of polymorphisms at the alcohol and aldehyde Dehydrogenase loci in genetic predisposition to alcohol-related end-organ damage. **Hepatology**, Baltimore, v.14, n.5, p.798-801, 1991.
20. DIAMOND, I., MESSING, R. O. Neurologic effects of alcoholism. **West. J. Med.**, San Francisco, v.161, p. 279- 287, 1994.

21. DROZD, J., NOVÁK, J. Headspace gas analysis by gas chromatography. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.165, p.141-165, 1979.
22. DROZD, J., VODÁKOVÁ, Z., KOUPIK, P. Systematic errors with the use of internal standard calibration in gas chromatographic headspace analysis. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 518, p.1-8, 1990.
23. DUBOWSKI, K. M. Alcohol determination in the clinical laboratory. **Am. J. Clin. Pathol.**, Philadelphia, v.74. n.5, p.747-750, 1980.
24. FERREIRA, I. M. Alcoolismo e trabalho. **Rev. Bras. Saúde Ocup.**, São Paulo, v.18, n.70, p.51-53, 1990.
25. GULLBERG, R. G. The elimination rate of mouth alcohol: mathematical modeling and implications in breath alcohol analysis. **J. Forensic Sci.**, Philadelphia, v.37, n.5, p. 1363-1372, 1992.
26. HADDAD, J., MESSER, J. Fetal alcohol syndrome: report of three siblings. **Neuropediatrics**, Stuttgart, v.25, p.109-111, 1994.
27. HANSON, M. Overview on drug and alcohol testing in the workplace. **Bull. Narc.**, New York, v.45, n.2, p. 3-44, 1993.
28. HOBBS, W. R., RALL, T. W., VERDOORN, T. A. Hypnotics and sedatives; ethanol. In: HARDMAN, J. G., LIMBIRD, L. E., eds. **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 9.ed. New York: McGraw Hill, 1996, p.386-390.
29. JACOBSON, J. L., JACOBSON, S. W., SOKOL, R. J., MARTIER, S. S., AGER, J. W., KAPLAN-ESTRIN, M. G. Teratogenic effects of alcohol on infant development. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, Baltimore, v.17, p. 174-183, 1993.
30. JONES, A. W. A rapid method for blood alcohol determination by head space analysis using an electrochemical detector. **J. Forensic Sci.**, Philadelphia, v.23, n.2, p.283-291, 1978.
31. JONES, A. W., SAGARDUY, A., ERICSSON, E., ARNQVIST, H. J. Concentrations of acetone in venous blood samples from drunk drivers, type I-diabetic outpatients, and health blood donors. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, v.17, p.182-185, 1993.

32. JONES, A. W., SCHUBERTH, M. D. Computer-aided headspace gas chromatography applied to blood-alcohol analysis: importance of online process control. **J. Forensic Sci.**, Philadelphia, v.34, n.5, p.1116-1127, 1989.
33. JONES, A. W. Disappearance rate of ethanol from the blood of human subjects: implications in forensic toxicology. **J. Forensic Sci.**, Philadelphia, v.38, n.1, p.104-118, 1993,
34. JONES, A. W. Ethanol distribution ratios between urine and capillary blood in controlled experiments and in apprehended drinking drivers. **J. Forensic Sci.**, Philadelphia, v.37, n.1, p.21-34, 1992.
35. JONES, A. W. Excretion of alcohol in urine and diuresis in healthy men in relation to their age, the dose administered and the time after drinking. **Forensic Sci. Int.**, Lausanne, v.45, p.217-224, 1990.
36. JONES, A. W. Salting-out effect of sodium fluoride and its influence on the analysis of ethanol by headspace gas chromatography. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, v.18, p.292-293, 1994.
37. JONES, A. W., ANDERSSON, L. Variability of the blood/breath alcohol ratio in drinking drivers. **J. Forensic Sci.**, Philadelphia, v.41, n.6, p.916-921, 1996.
38. JORTANI, S. A., POKLIS, A. Emit® ETS ® Plus ethyl alcohol assay for the determination of ethanol in human serum and urine. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, v.16, n.6, p. 368-371, 1992.
39. JORTANI, S. A., POKLIS, A. Evaluation of Syva ETS® Plus urine drug and serum ethanol analyser. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, v.17, n.1, p. 31-33, 1993.
40. JORTANI, S. A., POKLIS, A. Evaluation of the ADx™ REA® assay for determination of ethanol in serum and urine. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, v.17, p.307-309, 1993.
41. KAPUR, B. M. Drug-testing methods and clinical interpretations of test results. **Bull. Narc.**, New York, v.45, n.2, p.115-154, 1993.
42. KARNITIS, L., PORTER, L. J. A gas chromatographic method for ethanol determination in vapors of biological fluids. **J. Forensic Sci.**, Philadelphia, v.17, n.2, p.318-322, 1972.

43. KAYE, S., CARDONA, E. Errors of converting a urine alcohol value into a blood alcohol level. **Am. J. Clin. Pathol.**, Philadelphia, v.52, p.577-584, 1969.
44. KAYE, S. The collection and handling of the blood alcohol specimen. **Am. J. Clin. Pathol.**, Philadelphia, v.74, n.5, p.743-746, 1980.
45. KOLB, B. Application of an automated head-space procedure for trace analysis by gas chromatography. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.122, p. 553-568, 1976.
46. KUNSMAN, G. W., MANNO, J. E., COCKERHAM, K. R., MANNO, B. R. A modification and validation of two urine ethanol procedures for use with the Monarch® 2000 Chemistry System. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, v.15, p.130-135, 1991.
47. LIEBER, C. S. Alcohol and the liver: 1994 update. **Gastroenterology**, New York, v.106, n.4, p.1085-1105, 1994.
48. LIMA, I. V. **Humor vítreo em toxicologia forense - determinação de álcool etílico em cadáveres de morte traumática e em estado de putrefação**. São Paulo, 1996, 96p. (Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).
49. LITTLE, H. J. The role of calcium channels in drug dependence. **Drug Alcohol Depend.**, Lausanne, v.38, p.173-194, 1995.
50. LOUGH, P. S., FEHN, R. Efficacy of 1% sodium fluoride as a preservative in urine samples containing glucose and *Candida albicans*. **J. Forensic Sci.**, Philadelphia, v.38, n.2, p. 266-271, 1993.
51. LUCKEY, M. J. Headspace analysis for ethyl alcohol in blood, breath, and urine specimens using a specialized gas chromatography. **J. Forensic Sci.**, Philadelphia, v.16, n.1, p.120-127, 1971.
52. MACCHIA, T., MANCINELLI, R., GENTILI, S., LUGARESI, E. C., RAPONI, A., TAGGI, F. Ethanol in biological fluids: headspace GC measurement. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, v.19, p. 241-246, 1995.
53. MANNO, B. R., MANNO, J. E. A simple approach to gas chromatographic microanalysis of alcohols in blood and urine by a direct-injection technique. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, v.2, n.6, p.257-261, 1978.

54. MARINI, G. A. Comprehensive Drug Abuse Program Can Prove Effective in the Workplace. **Occup. Health Saf.**, Waco, v. 60, n.4, p.54-59, 1991.
55. MARQUES, E. G. P., ÁVILA, M. T. P. Deteminação de etanol em sangue por cromatografia gasosa utilizando a técnica de fase de vapor. **Bol. Fac. Farm. Coimbra**, Coimbra, v.15, n.1, p.53-60, 1991.
56. MENDENHALL, C. L., MacGEE, J., GREEN, E. S. Simple rapid and sensitive method for the simultaneous quantitation of ethanol and acetaldehyde in biological materials using head-space gas chromatography. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.190, p.197-200, 1980.
57. MONTAGNE, M., PUGH, C. B., FINK, J. L. Testing for drug use, part 1: analytical methods. **Am. J. Hosp. Pharm.**, Washington, v.45, p.1297-1305, 1988.
58. MORLAND, J. Types of drug testing programmes in the workplace. **Bull. Narc.**, New York, v.45, n.2, p.83-114, 1993.
59. NEUTEBOOM, W., ZWIEPFENNING, P. G. M. The stability of the alcohol concentration in urine specimens. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, v.13, n.3, p.141-143, 1989.
60. NUTT, D. J., PETERS, T. J. Alcohol : the drug . **Br. Med. Bull.**, London, v.50, n.1, p.5-17, 1994.
61. PARKINSON, A. Biotransformation of xenobiotics. In: KLASSEN, C. D., AMDUR, M. O., DOULL, J. eds. **Casarett & Doull's Toxicology: the basis science of poisons**. 5. ed. New York: McGraw-Hill, 1996. cap.6, p.113-186.
62. PARKER, K. D., FONTAN, C. R., YEE, J. L., KIRK, P. L. Gas chromatographic determination of ethyl alcohol in blood for medicolegal purposes. **Anal. Chem.**, Washington, v. 34, n. 10, p.1234-1236, 1962.
63. PETERS, T. J. Metabolism and toxicity of ethanol. **Molecule**, London, v.3, p.16-18, 1995.
64. PIANO, M. R.; SCHWERTZ, D. W. Alcoholic heart disease: a review. **Heart Lung**, St. Louis, v.23, n.1, p.3-17, 1994.

65. POUPON, R. E. Polymorphism of alcohol dehydrogenase, alcohol and aldehyde dehydrogenase activities: implication in alcoholic cirrhosis in white patients. **Hepatology**, Baltimore, v.15, n.6, p.1017-1022, 1992.
66. RAMSEY, J. D., FLANAGAN, R. J. Detection and identification of volatile organic compounds in blood by headspace gas chromatography as an aid to the diagnosis of solvent abuse. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.240, p.423-444, 1982.
67. RASKIN, C. Drug and alcohol testing in the workplace: moral, ethical and legal issues. **Bull. Narc.**, New York, v.45, n.2, p.45-82, 1993.
68. REYNOLDS, J. L. Minnesota workplace drug testing - analysis of policy and procedures. **AAOHN Am. Assoc. Occup. Health Nurses J.**, Atlanta, v.39, n.11, p.523-533, 1991.
69. ROEHRS, T., BEARE, D., ZORICK, F., ROTH, T. Sleepiness and ethanol effects on simulated driving. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, Baltimore, v.18, n.1, p.154-158, 1994.
70. SAADY, J. J., POKLIS, A., DALTON, H. P. Production of urinary ethanol after sample collection. **J. Forensic Sci.**, Philadelphia, v.38, n.6, p.1467-1471, 1993.
71. SAMSON, H. H., HARRIS, A. Neurobiology of alcohol abuse. **Trends Pharm. Sci.**, Amsterdam, v.13, p.206-211, 1992.
72. SAVORY, J., SUNDERMAN, F. W., ROSSEL, N. O., MUSHAK, P. An improved procedure for the determination of serum ethanol by gas chromatography. **Clin. Chem.**, Winston-Salem, v. 14, n. 2, p. 132-144, 1968.
73. SCIVOLETTO, S., MALBERGIER, A. Etanol. In: OGA, S. **Fundamentos da toxicologia**, São Paulo, Atheneu, 1996. p.284-296.
74. SENKOWSKI, C. M., THOMPSON, K. A. The accuracy of blood alcohol analysis using headspace gas chromatography when performed on clotted samples. **J. Forensic Sci.**, Philadelphia, v.35, n.1, p.176-180, 1990.
75. SHOHENFELD, R. S. Drug and alcohol testing in the workplace - Objectives, pitfalls and guidelines. **Am. J. Drug Alcohol Abuse**, New York, v.15, n.4, p.413-427, 1989.

76. SILVA, O. A. Análise toxicológica de drogas de abuso e programas de assistência ao empregado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALCOOLISMO E OUTRAS DEPENDÊNCIAS, 11, Belo Horizonte, 1995. **Anais**. Belo Horizonte, Associação Brasileira de Estudos do Álcool e outras Drogas, s.d. p.58-59.
77. SILVA, O. A. Implantação de um programa de controle da dependência química na empresa. In: FORUM NACIONAL SOBRE DEPENDÊNCIA QUÍMICA NAS EMPRESAS, 2., São Bernardo do Campo, 1994. **Relatos e Conferências**. São Bernardo do Campo, Editora IMS, s.d. p.49-55.
78. SIMPSON, G. Medicolegal alcohol determination: comparison and consequences of breath and blood analysis. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, v.13, p.361-366, 1989.
79. SMALLDON, K. W., BROWN, G. A. The stability of ethanol in stored blood. Part II. The mechanism of ethanol oxidation. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v.66, p. 285-290, 1973.
80. SNYDER, R., ANDREWS, L. S. Toxic effects of solvents and vapors. In: KLASSEN, C. D., AMDUR, M. O., DOULL, J. eds. **Casarett & Doull's Toxicology: the basis science of poisons**. 5. ed. New York: McGraw-Hill, 1996. cap.24, p.737-771.
81. SPAGNOLO, A. Teratogenesis of alcohol. **Ann. Ist. Super. Sanità**, Rome, v.29, n.1, p.89-96, 1993.
82. STREETE, P. J., RUPRAH, M., RAMSEY, J. D., FLANAGAN, R. J. Detection and identification of volatile substance by headspace capillary gas chromatography to aid the diagnosis of acute poisoning. **Analyst**, London, v.117, p.1111-1127, 1992.
83. SUTHEIMER, C. A., LAVINS, E., KING, T. Evaluation of the Syva ETS-Plus ethyl alcohol assay with application to the analysis of antemortem whole blood, routine postmortem specimens, and synovial fluid. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, v.16, p.119-124, 1992.
84. TAGLIARO, F., LUBLI, G. Chromatographic methods for blood alcohol determination. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.580, p.161-190, 1992.
85. THOMAS, A. P., NALPAS, B., COUTELLE, C., FLEURY, B. Effects of ethanol on the contractile function of the heart: a review. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, Baltimore, v.18, n.1, p. 121-131, 1994.

86. TRAFFORD, D. J. H., MAKIN, H. L. J. Breath-alcohol concentration may not always reflect the concentration of alcohol in blood. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, v.18, p.225-228, 1994.
87. URRY, F. M., KRALIK, M., WOZNIAK, E., CROCKETT, H., JENNISON, T. A. Application of the technicon Chem 1+ TM chemistry analyser to the Syva Emit® Ethyl alcohol assay in plasma and urine. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, v.17, p.287-291, 1993.
88. WATTS, M. T., McDONALDS, O. L. The effect of biologic specimen type on the gas chromatography headspace analysis of ethanol and other volatile compounds. **Am. J. Clin. Pathol.**, Philadelphia, v.87, p.79-85, 1987.
89. WILKINSON, P. K., WAGNER, J. G., SEDMAN, A. J. Sensitive head-space gas chromatographic method for the determination of ethanol utilizing capillary blood samples. **Anal. Chem.**, Washington, v. 47, n.9, p.1506-1510, 1975.
90. WINEK, C. L., PAUL, L. J. Effect of short-term storage conditions on alcohol concentrations in blood from living human subjects. **Clin. Chem.**, Winston-Salem, v.29, n.11, p.1959-1960, 1983.
91. ZWERLING, C. Current practice and experience in drug and alcohol testing in the workplace. **Bull. Narc.**, New York, v.45, n.2, p. 155-196, 1993.

ANEXO A**NORMAS E ORIENTAÇÕES PARA OS VOLUNTÁRIOS PARTICIPANTES
DO PROJETO DE PESQUISA SOBRE ETANOL**

Coleta : / /

Início :

Término:

- 1) É proibido ingerir qualquer tipo de bebida alcoólica no dia anterior, e também não se deve fazer uso excessivo de álcool dois dias antes do experimento.
- 2) O café da manhã deve ser tomado até no máximo às 6:30 hs, e este pode ser constituído de leite, pão, manteiga, queijo, frutas, ou seja, sem restrições, porém estes alimentos não devem ser ingeridos em quantidades excessivas.
- 3) A alimentação será padronizada para todos os voluntários, constando de almoço e lanche da tarde.
- 4) O trabalho vai se basear na ingestão de whisky gelado, na quantidade de 0,68 g de etanol por kg de peso corpóreo (aproximadamente 150 mL), que deve ser ingerido num prazo máximo de 15 min.
- 5) O sangue será coletado durante as 2 primeiras horas de ½ em ½ hora, e durante as 5hs seguintes de 1 em 1 hora. Esta coleta será feita com o auxílio de scalp (butterfly) e seringas descartáveis.
- 6) A urina será coletada durante 7 horas, de 1 em 1 hora, e mais uma coleta após 12 horas da ingestão, sendo que em todas estas coletas deve haver o esvaziamento completo da bexiga.
- 7) Todo este procedimento será acompanhado por uma enfermeira responsável.

Desde já agradeço pela colaboração,

Cristiana Leslie Corrêa

Farmacêutica Responsável

ANEXO B**DECLARAÇÃO**

Eu, _____,
portador do R.G. _____, estou ciente de estar participando como voluntário em um projeto de pesquisa, onde serei submetido à várias coletas de sangue (1 coleta de 10 mL e 9 coletas de 4 mL) e de urina (9 coletas), após a ingestão de uma dose de 0,68 g de etanol por kg de peso corpóreo, na forma de whisky gelado (320 g/L).

As coletas de sangue serão feitas com o auxílio de scalp (butterfly) e seringas descartáveis, onde durante as 2 primeiras horas a coleta será feita de ½ em ½ hora e durante as 5 horas seguintes de 1 em 1 hora. A urina será coletada de 1 em 1 hora, em frascos de polietileno apropriados, durante 8 horas.

Todo este procedimento será acompanhado por uma enfermeira responsável.

Data :

Local:

Assinatura :

Enfermeira responsável:

Farmacêutica responsável:

Data : / /