UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e
Análises Toxicológicas

Verificação da janela de detecção de etilglicuronídeo
urinário entre usuários crônicos e bebedores sociais de
etanol por cromatografia em fase gasosa acoplada à
espectrometria de massas.

Ana Verónica Flores Marín

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dra. Regina Lúcia de Moraes Moreau

São Paulo
2006

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

F634j	<p>Flores Marín, Ana Verónica</p> <p>Verificação da janela de detecção de etilglicuronídeo urinário entre usuários crônicos e bebedores sociais de etanol por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas / Ana Verónica Flores Marín. -- São Paulo, 2006. 115p.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.</p> <p>Orientador: Moreau, Regina Lúcia de Moraes</p> <p>I. Etanol : Toxicologia 2. Análise toxicológica 3. Farmacodependência : Medicina 4. Cromatografia em fase gasosa : Análise : Toxicologia 5. Espectrometria de massa : Análise : Toxicologia I. T. II. Moreau, Regina Lúcia de Moraes, orientador.</p> <p style="text-align: right;">615.35131 CDD</p>
-------	---

Ana Verónica Flores Marín

Verificação da janela de detecção de etilglicuronídeo urinário entre usuários crônicos e bebedores sociais de etanol por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas.

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Regina Lúcia de Moraes Moreau
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Relatório de Defesa

Relatório de defesa pública de Dissertação do(a) Senhor(a) Ana Verônica Flores Marin no Programa: Toxicologia e Análises Toxicológicas, do(a) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Aos 6 dias do mês de julho de 2006, no(a) Auditório - Bloco 13A realizou-se a Defesa da Dissertação do(a) Senhor(a) Ana Verônica Flores Marin, apresentada para a obtenção do título de Mestre em Toxicologia e Análises Toxicológicas, intitulada:

"Janela de detecção do etilglicuronídeo urinário de usuários crônicos de etanol mediante extração em fase sólida e análise por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Vínculo do Docente	Sigla da Unidade	Resultado
Regina Lucia de Moraes Moreau	Presidente	FCF - USP	<i>aprovada</i>
Alice Aparecida da Matta Chasin	Titular	FOC - Externo	<i>Aprovada</i>
André Malbergier	Titular	USP - Externo	<i>Aprovada</i>
Resultado Final:			
Parecer da Comissão Julgadora *			

Comentários da Defesa (opcional)

Eu, Maria Roseli Ramos *[assinatura]*, secretária, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as). São Paulo, aos 6 dias do mês de julho de 2006.

[assinatura]
Alice Aparecida da Matta Chasin

[assinatura]
André Malbergier

[assinatura]
Regina Lucia de Moraes Moreau
Orientador(a)

Comissão de Pós-Graduação
HOMOLOGADO

07 JUL. 2006

[assinatura]
Presidente

* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

Nos termos do artigo 110, do RG-USP, encaminhe-se o presente relatório à CPG, para homologação

*"Hay hombres que luchan un día y son buenos.
Hay otros que luchan un año y son mejores.
Hay quienes luchan muchos años y son muy buenos.
Pero hay los que luchan toda la vida:
Esos son los imprescindibles".
-Bertolt Brecht-*

À minha Mãe
pelo amor e exemplo de luta frente à adversidade

*À Professora Dra. Regina Lúcia de Moraes Moreau,
sempre disponível, por sua grande dedicação,
amizade e proteção, nas horas mais difíceis.
Agradeço por ser um exemplo de trabalho árduo,
tenacidade, pela grande paixão que demonstra
em seus projetos e pela infinita paciência.*

Ao Roberto, pelo amor e apoio incondicional

AGRADECIMIENTOS

A todos os docentes da USP que contribuíram para minha formação: Professora Dra. Elizabeth de Souza Nascimento, Professora Dra. Alice Chasin, Professor Dr. Mauricio Yonamine, Professora Dra. Ana Paula, Professor Dr. Ernani Pinto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pelo subsídio financeiro.

À Professora Dra. Elizabeth de Souza Nascimento e ao Professor Dr. Valdemir Melechco Carvalho pelas sugestões dadas no exame de qualificação que contribuíram para o enriquecimento deste trabalho.

Aos voluntários que participaram deste estudo, pela valiosa e impagável contribuição.

À equipe médica da Clínica de Tratamento de Dependentes Químicos Vila Serena, São Paulo, SP, em especial a Eleny Regina Roncati e a Silze Morgado Roque.

Ao Engenheiro Fábio Jose de Camargo Moreau, pela valiosa contribuição na proposta do modelo matemático.

À Leila Aparecida Bonadio pela normalização das referências bibliográficas.

À Renata Chaves Albuquerque e Carmen Lúcia G. Antunes pelo auxílio técnico.

A todos os amigos e colegas do Laboratório de Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo: Ângelo Balestrin, Karla Maria de Souza, Maria Roseli Ramos, Carmen Lúcia G. Antunes, Dalva C. Moura, Luzia Valderrama, Helena Maria de S. Francisco, Mônica C. Sampaio, Daniela Mendes, Vania Rodriguez, Fabiana dos Anjos, Tiago Peixe, Virginia M. Carvalho e Kátia de M. Cypriano pelo carinho com que me receberam.

A meus amigos: Any, Marco Antonio, Ricardo, Andrea, Elisa, Clarissa, Iara e Ricardo, Vania, Roberto, William, Damião, Moises.

Obrigada pela amizade e carinho que nunca esquecerei.

Finalmente não posso deixar de agradecer ao povo brasileiro pela sua hospitalidade e pela sua alegria. Obrigada Brasil.

Meus agradecimentos.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	8
2.1. Toxicocinética do etanol.....	9
2.2. Efeitos tóxicos.....	15
2.3. Marcadores de consumo de etanol.....	24
2.4. Aspectos analíticos da determinação de etilglicuronídeo na urina.....	34
3. OBJETIVO E PLANO DE TRABALHO.....	42
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	44
4.1. Material.....	45
4.1.1. Soluções – padrão.....	45
4.1.2. Reagentes.....	45
4.1.3. Equipamentos e acessórios.....	46
4.1.4. Amostras.....	47
4.2. Métodos.....	52
4.2.1. Aplicação de questionário.....	52
4.2.2. Determinação de creatinina.....	52
4.2.3. Determinação do teor real de etanol na cerveja.....	52
4.2.4. Teste de triagem de drogas de abuso em amostras de urina.....	52
4.2.5. Desenvolvimento de método para determinação de etilglicuronídeo na urina.....	53
4.2.5.1. Preparação da amostra.....	53
4.2.5.2. Extração.....	53
4.2.5.3. Derivatização.....	55
4.2.5.4. Condições cromatográficas.....	55
4.2.6. Validação do método.....	56
4.2.6.1. Limite de Detecção.....	56
4.2.6.2. Limite de Quantificação.....	56
4.2.6.3. Linearidade.....	57
4.2.6.4. Precisão intra-dia e inter-dias.....	57
4.2.6.5. Exatidão.....	58
4.2.6.6. Recuperação.....	58

4.2.7. Análise de EtG em amostras de urina.....	59
4.2.8. Proposta de modelo matemático e estatístico para as curvas de decaimento da concentração urinária de EtG.....	59
5. RESULTADOS.....	61
5.1. Determinação do teor real de etanol na cerveja.....	62
5.2. Otimização das condições cromatográficas.....	62
5.3. Resultados dos parâmetros da validação do método para determinação de etilglicuronídeo na urina.....	63
5.3.1. Limites de Detecção e Quantificação.....	63
5.3.2. Linearidade.....	63
5.3.3. Precisão intra-dia e inter-dias.....	64
5.3.4. Exatidão.....	64
5.3.5. Recuperação.....	64
5.4. Determinação de etilglicuronídeo e creatinina em amostras de urina de voluntários sob administração controlada de etanol.....	65
5.5. Determinação de etilglicuronídeo e creatinina em amostras de urina de pacientes internados em clínica de recuperação.....	68
5.5.1. Aplicação do questionário e teste de triagem de drogas.....	68
5.6. Aplicação do modelo matemático proposto.....	71
6. DISCUSSÃO.....	74
7. CONCLUSÕES.....	87
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90
ANEXOS.....	104

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Vias de biotransformação do etanol.....	10
FIGURA 2 - Esquema de extração em fase sólida do etilglicuronídeo.....	54
FIGURA 3 - Estrutura química de EtG espectro de massa da fragmentação do derivado trimetilsilil.....	55
FIGURA 4 - Perfil cromatográfico obtido pela análise por GC-MS de uma amostra de urina adicionada de: (A) padrão de EtG na concentração de 4 µg/µL e (B) padrão interno, d ₅ -EtG, na concentração de 2 µg/µL.....	62
FIGURA 5 - Curva de calibração, equação da reta e coeficiente de correlação linear do etilglicuronídeo em urina.....	63
FIGURA 6 - Perfil cromatográfico obtido de uma amostra de urina de uma voluntária: (A) colhida no tempo zero e (B) 6 horas após a ingestão de 0,5 g/kg de etanol (EtG na concentração de 50,76 mg/L). Em (C) amostra de urina de um paciente (EtG na concentração de 17,76 mg/L, após diluição 1/10).....	65
FIGURA 7 - Perfil individual da concentração urinária de EtG e EtG/creatinina em função do tempo após ingestão de cerveja em volume equivalente a 0,5 g/kg de etanol pelas cinco voluntárias.....	67
FIGURA 8 - Curvas de concentração urinária de EtG/creatinina em função do tempo, após ingestão de cerveja em volume equivalente a 0,5 g/kg por todas as cinco voluntárias participantes.....	68

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Métodos cromatográficos utilizados para determinação e quantificação de etilglicuronídeo em amostras biológicas	37
TABELA 2 – Dados antropométricos de voluntários sob administração controlada de etanol (0,5 g/kg) e correspondente volume de cerveja ingerido	49
TABELA 3 – Dados antropométricos de pacientes internados em clínica de recuperação.	51
TABELA 4 – Precisão intra-dia e inter-dias do método analítico na determinação de EtG urinário, expressas pelo coeficiente de variação percentual.	64
TABELA 5 – Resultados obtidos das análises realizadas em amostras de urina de voluntárias após a administração de cerveja em volume equivalente a 0,5 g/kg de etanol.	66
TABELA 6 – Resultados obtidos das análises realizadas em amostras de urina de pacientes internados	69
TABELA 7 – Informações obtidas pela aplicação do questionário aos 14 pacientes internados e resultados de teste de triagem de drogas	70
TABELA 8 – Valores dos parâmetros λ , C_0 e r para a curva de decaimento da concentração urinária de EtG por paciente, conforme a equação $C = C_0 e^{-\lambda t}$	71
TABELA 9 – Valores dos parâmetros λ , C_0 , r , tempo de meia vida ($t_{1/2\beta}$) e janela de detecção (t_j) para a curva de decaimento da concentração urinária de EtG de cada paciente, para coeficientes de correlação $r < -0,85$, e duas faixas de valores de $t_{1/2\beta}$	72
TABELA 10 – Valores dos parâmetros λ , C_0 e r para a curva de decaimento da concentração urinária de EtG para cada voluntário, conforme a equação $C = C_0 e^{-\lambda t}$. Valores calculados de $t_{1/2\beta}$ e t_j .	73
TABELA 11 – Valores dos parâmetros λ , C_0 e r para a curva de decaimento da concentração urinária de EtG/crea (urinários) para cada voluntário, conforme a equação $C = C_0 e^{-\lambda t}$. Valores calculados de $t_{1/2\beta}$ e t_j .	73

LISTA DE ABREVIATURAS

ABDETRAN	Associação Brasileira dos Departamentos de Trânsito
ADH	Álcool Desidrogenase
ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
BSTFA	N, O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide
CDT	Carbohydrate-Deficient Transferrin/ Transferrina Deficiente em Carboidratos
CEBRID	Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas
CREA	Creatinina
DALY	Disability Adjusted Life Years
EtG	Etilglicuronídeo
EtS	Etilsulfato
FAEEs	Fatty Acids Ethyl Esters/ Etil Ésteres de Ácidos Graxos
FA	Fatty acids / Ácidos Graxos
FACoA	Fatty Acyl Coenzyme A/Ácido Graxo Coenzima A
FIESP	Federação das Indústrias do Estado de São Paulo
GABA	Gamma-Amino Butyric Acid/Ácido Gamma Amino Butirico
GGT	Gamma Glutamyl Transferase.
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
HFBA	Heptafluorobutyric Anhydride
5-HTOL	5-hidroxitriptofol
5-HIIA	Ácido 5-hidroxiindol acético
IML	Instituto Medico Legal de São Paulo
LAT	Laboratório de Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas
MEOS	Microsomal Ethanol Oxidative System / Sistema Microsomal de Oxidação do Etanol
MSTFA	N-Methyltrimethylsilyltrifluoroacetamide
NMDA	N-metil-D-Aspartato
PFPA	Pentafluoropropionic acid
PFPOH	2,2,3,3,3 Pentafluoropropanol

SAA	Síndrome de Abstinência Alcoólica
SAF	Síndrome Alcoólica Fetal
SAMHSA	Substance Abuse and Mental Health Services Administration
TMCS	Trimethylchlorosilane
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
UGT	UDP-Glucuronosyltransferase
VCM	Mean Corpuscular Volume / Volume Corpuscular Médio das Hemácias
WHO	World Health Organization/ Organização Mundial da Saúde

RESUMO

Verificação da janela de detecção de etilglicuronídeo urinário entre usuários crônicos de etanol e bebedores sociais por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas.

Ana Verônica Marin, Regina Lúcia de Moraes Moreau - Mestrado

A janela de detecção de etilglicuronídeo (EtG) parece variar de acordo com a intensidade de consumo de etanol. Assim sendo, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver e validar uma metodologia empregando extração em fase sólida e GC-MS para a determinação de EtG urinário, no sentido de verificar sua janela de detecção entre um grupo de bebedores sociais e usuários crônicos. Os limites de detecção e quantificação obtidos foram 0,1 e 0,2 mg/L respectivamente. O método proposto demonstrou ser linear no intervalo de 0,2 a 100,0 mg/L ($r^2 > 0,99$), exato e preciso. A janela de detecção de EtG em amostras de urina de cinco voluntárias após ingestão única e controlada de 0,5 g/kg de etanol variou de 24 a 35 horas. Amostras de urina foram coletadas de 14 pacientes internados em clínica de recuperação. Os resultados mostraram que a maioria deles provavelmente consumiu etanol, prejudicando a interpretação dos resultados. Nos casos em que a concentração urinária de EtG foi decaindo no decorrer do tempo, a janela de detecção variou de 72 a 120 horas. O método mostrou ser útil para monitorar a abstinência durante o tratamento de pacientes dependentes de etanol ou o consumo após uma única exposição em baixa dose.

Unitermos:

- Etilglicuronídeo
- Etanol
- Marcador de consumo de etanol
- Extração em fase sólida
- Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas

E-mail: vmaflo@yahoo.com

SUMMARY

Detection range verification of urinary ethyl glucuronide between chronic ethanol users and social drinkers by gas chromatography/mass spectrometry analysis.

Ana Verónica Marín, Regina Lúcia de Moraes Moreau - Master

The detection range of the ethylglucuronide (EtG) seems to vary in accordance to the intensity of ethanol consumption. Thus, the objective of the present work was to develop and validate a method using extraction in solid phase and GC-MS for the determination of urinary EtG, in order to verify its detection window in a group of social drinkers and chronic ethanol users. The limits of detection and quantification were 0,2 and 0.1 mg/L, respectively. The method showed to be linear in the interval of 0,2 to 100,0 mg/L ($r^2 > 0,99$), and presented good accuracy and precision. The urinary EtG detection range in samples of five volunteers after controlled ingestion of 0,5 g/kg of ethanol varied between 24 to 35 hours. Urine samples were also collected from 14 patients from a recovery clinic. The results showed that the majority of them probably consumed ethanol, which compromised the interpretation of the results. In the cases where the urinary concentration of EtG decayed with time, the detection window varied from 72 to 120 hours. The method showed to be useful to monitor the ethanol abstinence during treatment of alcoholic patients or the consumption of only one ethanol low dose.

UNITERMS:

- Ethylglucuronide
- Ethanol
- Biomarker for ethanol consumption
- Solid phase extraction
- Gas Chromatography/Mass spectrometry

E-mail: vmaflo@yahoo.com

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O consumo abusivo do etanol se configura como um dos maiores problemas de saúde pública no mundo. De acordo com a *World Health Organization* (WHO) a mortalidade e as limitações funcionais causadas por este consumo são maiores do que aquelas produzidas pelo tabagismo, sendo que a cerveja, bebida alcoólica mais consumida no Brasil, é responsável pelas maiores taxas. Para o *Disability Adjusted Life Years* (DALY) um indicador criado pela WHO, com base não apenas na mortalidade como também no nível de incapacidade relacionado à doença, o etanol seria responsável pela perda de quase 16% de anos saudáveis de usuários, em países em desenvolvimento como o Brasil (WHO, 2000, 2002).

No Brasil, o alcoolismo é responsável por mais de 90% dos casos de internações por dependência nos hospitais (CARLINI & NOTO, 1995) e, conforme um levantamento domiciliar realizado em 107 cidades do país (CARLINI *et al.*, 2002), cerca de 11,2% da população é dependente do etanol.

No ano de 2004, o Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas, CEBRID/UNIFESP, realizou o V Levantamento Nacional sobre o Consumo de Drogas Psicotrópicas entre Estudantes do Ensino Fundamental e Médio em 27 capitais, com a participação de 48.155 estudantes. Esse levantamento mostrou que a média de idade do primeiro uso de etanol foi 12,5 anos, sendo menor do que a idade de início em relação às outras drogas ilícitas. Os resultados sugerem que as intervenções para diminuir o abuso de drogas deveriam ser paralelas aos esforços para adiar o primeiro uso de etanol e tabaco (GALDURÓZ *et al.*, 2004).

As conseqüências do uso problemático de etanol podem ser freqüentemente vinculadas com atos de violência, com a ocorrência de acidentes com trauma, com o aumento dos acidentes de trânsito provocados por motoristas alcoolizados, assim como no absenteísmo e acidentes no trabalho, levando a grandes perdas sócio-econômicas. Um exemplo considerado um dos maiores desastres ecológicos de todos os tempos, foi aquele ocorrido em 1989 envolvendo o petroleiro *Exxon Valdez*, que bateu em um recife na costa do Alasca e despejou 42 milhões de litros de óleo no mar. A guarda costeira constatou que o capitão do navio estava alcoolizado (FOLHA ONLINE, 2001).

A associação entre etanol e ocorrência de acidentes com traumas foi avaliada por um projeto da WHO, considerado o mais abrangente sobre este tema, onde foram escolhidos centros de 10 países (n=4.320) (BORGES *et al.*, 2006); o Hospital São Paulo (SP) foi o único representante no Brasil. O estudo foi desenvolvido com 518 pessoas atendidas no pronto-socorro desse hospital; destas, 493 foram submetidas ao teste do etilômetro. Em 13% destes casos, o etanol apareceu como um dos fatores que provocaram o acidente. Dos 56 pacientes que se acidentaram por causa de terceiros, 64% suspeitavam que o causador das lesões havia consumido bebidas alcoólicas. Entre os traumas físicos sofridos associados ao consumo abusivo de etanol estão, desde contusões e cortes superficiais - mais freqüentes - até casos graves de politraumatismo. Os acidentes que causaram traumas, relatados por 497 pacientes, ocorreram em estradas e ruas (40,0%), no local de trabalho (31,6%) e nos domicílios (16,1%) (UNIFESP, 2001; BORGES *et al.*, 2006).

A relação entre o consumo de etanol e acidentes de trânsito foi comprovada em um estudo multicêntrico realizado pela Associação Brasileira dos Departamentos de Trânsito (ABDETRAN). A coleta das amostras foi feita em serviços de emergência e Institutos Médicos Legais de quatro cidades: Brasília, Curitiba, Recife e Salvador. Do total de 831 vítimas não fatais incluídas no estudo, 61,4% dos casos apresentaram algum teor de

etanol no sangue. Das 34 vítimas fatais incluídas, 52,9% tinham alcoolemia positiva. Quanto aos níveis de alcoolemia encontrados, 27,2% dos casos apresentaram níveis de, no mínimo, 0,6 g/L, limite estabelecido pelo Código de Trânsito Brasileiro de 1997 (NERY *et al.*, 1997).

Um trabalho realizado no Pronto Socorro Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, entre agosto de 1998 e agosto de 1999, com 464 pacientes vítimas de causas externas, mostrou que 28,9% apresentaram alcoolemias positivas; 219 eram vítimas de acidentes de trânsito (GAZAL-CARVALHO *et al.*, 2002). Um levantamento realizado no Instituto Médico Legal de São Paulo, em 1999, com 2.360 vítimas fatais de acidentes de trânsito, mostrou que 47% delas apresentavam algum teor de etanol no sangue. Destas, somente 3% apresentavam alcoolemia igual ou inferior a 0,6 g/L. O valor médio de alcoolemia nesses casos foi igual a 2,4 g/L, indicando um consumo excessivo de bebida alcoólica (LEYTON & GREVE, 2001).

O alcoolismo é um dos principais problemas de saúde ocupacional enfrentados pelas empresas. Um operário sob influência de drogas de abuso está mais propenso a cometer atos inseguros responsáveis por danos à sua própria vida, à de terceiros e ao patrimônio da empresa. Um estudo realizado pela Federação das Indústrias do Estado de São Paulo (FIESP) em 1993, sobre os problemas relacionados com o consumo abusivo do etanol e outras drogas no ambiente de trabalho, aponta que 10% a 15% dos empregados têm problemas de dependência alcoólica. Essa condição é responsável por três vezes mais licenças médicas, aumento de cinco vezes da probabilidade de acidentes de trabalho, está relacionado com 15 a 30% de todos os acidentes no trabalho, responde por 50% de absenteísmo e licenças médicas, leva à utilização de oito vezes mais diárias hospitalares e conduz a família a procurar três vezes mais assistência médica e social (VAISSMANN, 1999; CAMPANA, 1997).

A implantação de programas de prevenção e controle de uso de drogas no ambiente de trabalho é uma alternativa para diminuir o impacto negativo

no usuário e no ambiente ocupacional. Visa proteger a saúde do trabalhador, prevenir acidentes, reduzir custos financeiros e sociais à empresa e à sociedade. Recomenda-se que nenhuma medida disciplinar ou demissionária deva ser tomada antes que o funcionário passe por um programa de reabilitação. A implantação de Programas com esta finalidade teve início em 1983, nos Estados Unidos; de 1983 a 1986 diversas empresas, principalmente aquelas ligadas ao ramo petroquímico, de transporte e nuclear, voluntariamente implantaram Programas de Controle por meio de exames toxicológicos (SILVA, 1999).

No Brasil, em 1990, a Esso Brasileira foi a pioneira na implantação de um Programa dessa natureza, com a realização de análises toxicológicas, de forma sistemática e rotineira. A seguir, em 1992, o Laboratório de Análises Toxicológicas (LAT) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo iniciou o Programa “Controle e Prevenção do Uso de Drogas em Empresas”. Desde então, tem atendido várias empresas de todo território nacional que vêm adotando programas de controle de uso de drogas no ambiente de trabalho. É utilizada a urina como amostra biológica e o protocolo padrão inclui análises de anfetamina, metanfetamina, canabinóides e cocaína, mas não de etanol (SILVA & YONAMINE, 2004).

Além do ambiente ocupacional, existem outras situações onde é importante monitorar o consumo de etanol, tais como:

- reabilitação de usuários em tratamento, seja em regime de internação em clínicas de recuperação, seja em regime ambulatorial (detecção de recaída);
- âmbito forense (detecção de indivíduos que estejam dirigindo sob influência do etanol, envolvidos em acidentes e violência, inclusive doméstica e em investigações *post-mortem*);
- outras situações onde o consumo de etanol é inadequado (gravidez, crianças e adolescentes expostos etc.).

Nesse contexto, marcadores biológicos sensíveis e específicos, capazes de monitorar o consumo de etanol e fornecer informações sobre o padrão de uso, constituem uma ferramenta extremamente valiosa para prevenir e reduzir as consequências do uso abusivo de etanol, tanto em relação ao indivíduo quanto à sociedade.

A detecção direta do etanol no sangue, ar expirado, saliva e urina só é possível por um período de tempo relativamente curto, ou seja, algumas horas após a sua ingestão (SWIFT, 2003). Portanto, a aplicação desse marcador é mais restrita, podendo ser útil para o diagnóstico de uma intoxicação aguda (concentração de etanol no sangue) e na detecção de indivíduos que estejam dirigindo sob influência do etanol ou envolvidos em acidentes e violência.

Os marcadores bioquímicos tradicionais como Volume Corpuscular Médio das Hemácias (VCM), Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanina Aminotransferase (ALT) têm aplicação na clínica médica, na identificação e acompanhamento de pacientes consumidores crônicos de etanol. Seus níveis aumentam somente após vários meses de consumo excessivo e regular (CONIGRAVE *et al.*, 2003).

Outros marcadores, como Transferrina Deficiente em Carboidratos (CDT) e Gama Glutamil Transferase (GGT), monitoram o consumo de etanol que ocorreu nas 2 últimas semanas, mas necessitam que seja constante e intenso durante esse período. Portanto, não possuem sensibilidade e especificidade adequadas para terem significado clínico ou legal no monitoramento da abstinência (SOMMERS *et al.*, 2003; WURST *et al.*, 2005).

Após uma exposição a curto prazo ou na reabilitação de alcoólicos em tratamento, é importante a existência de um marcador que seja capaz de monitorar o consumo e a abstinência em um tempo posterior à eliminação do etanol do organismo.

A relação urinária 5-hidroxitriptofol/ácido 5-hidroxiindol-3-acético (5-HTOL/5-HIIA) e níveis séricos de Etil Ésteres de Ácidos Graxos (FAEEs) refletem a ingestão de etanol nas últimas 24 horas, sendo que a sensibilidade de ambos decai com o decorrer do tempo, atingindo valores próximos de 47% para a relação urinária 5-HTOL/5-HIIA e 24% para níveis séricos de FAEEs após 39 horas (BORUCKI *et al.*, 2005).

Portanto, existe a necessidade de um marcador confiável capaz de detectar o consumo de etanol por, no mínimo, alguns dias, similar à análise de outras drogas de abuso, tais como cocaína, *cannabis* ou estimulantes.

Nesse contexto, a utilização de etilglicuronídeo (EtG) como marcador, recentemente introduzido nos Estados Unidos, preenche essas necessidades, pois pode ser detectado em um período de tempo maior do que o etanol e dos marcadores de consumo recente de etanol, cuja janela de detecção é de até um dia, aproximadamente. Pesquisas mostram que a janela de detecção de EtG parece variar de acordo com a intensidade de consumo de etanol e ainda não foi realizado um estudo dirigido relativo à variação na janela de detecção de EtG conforme o grau de exposição (DAHL *et al.*, 2002; WURST *et al.*, 2000, 2003).

Assim sendo, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver e validar uma metodologia empregando extração em fase sólida e GC-MS, alternativa menos onerosa, para a determinação de EtG urinário, no sentido de verificar sua janela de detecção entre um grupo de bebedores sociais após ingestão única e controlada de etanol e consumidores crônicos em abstinência, internados em clínica de recuperação.

Revisão da literatura

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Toxicocinética do etanol

O etanol é rapidamente absorvido por difusão no estômago (20%) e no intestino delgado (80%) atingindo máxima concentração plasmática entre 30 a 90 minutos após a ingestão (RAMCHANDANI, BOSRON e LI, 2001).

Após administração oral, a velocidade de absorção do etanol é fortemente influenciada pela natureza, volume, teor da bebida alcoólica, tempo de ingestão, plenitude gástrica e por fatores genéticos e ambientais (FRASER *et al.*, 1995; RAMCHANDANI, BOSRON e LI, 2001).

Como o etanol é uma molécula pequena, polar e hidrossolúvel, distribui-se e equilibra-se rapidamente em função da quantidade de água presente nos tecidos e fluidos corporais. O volume de distribuição do etanol é comparável à água corporal total (0,5-0,7 L/kg). As mulheres apresentam concentrações máximas mais altas do que os homens, pelo fato de terem um menor conteúdo de água corporal total. A ligação às proteínas plasmáticas não tem sido relatada (MASTERS, 2003; LADERO QUESADA, 1998).

Cerca de 90% do etanol é oxidado quase que exclusivamente no fígado, por três vias, que formam acetaldeído (Figura 1):

- a) Álcool desidrogenase (ADH);
- b) Sistema Microsomal de Oxidação do Etanol (SMOE);
- c) Catalase.

Figura 1 – Vias de biotransformação do etanol.

ADH – álcool desidrogenase; SMOE – sistema microssomal de oxidação do etanol; ALDH – aldeído desidrogenase; FAEE – etil éster de ácido graxo; FA – ácido graxo; TG – triglicerídeo; FACoA - ácido graxo Coenzima A; EtG – etilglicurônido; EtS – etilsulfato; UDP-GT – Uridina 5' – difosfo - glicuroniltransferase.

Adaptado de SODERBERG et al., 2003.

A enzima citossólica álcool desidrogenase (ADH) catalisa a conversão do etanol a acetaldeído, utilizando nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) como cofator, formando NADH. Esta enzima localiza-se principalmente no fígado, mas também pode ser encontrada em outros órgãos, como cérebro e estômago (MASTERS, 2003). Várias isoformas da ADH gástrica têm sido identificadas, contribuindo para um metabolismo de primeira passagem do etanol. Verifica-se que nas mulheres há uma menor atividade desta enzima, o que explica, em parte, porque elas apresentam maiores concentrações sangüíneas de etanol do que os homens (LADERO QUESADA, 1998; RAMCHANDANI, BOSRON e LI, 2001).

O sistema de álcool desidrogenase torna-se saturável devido à depleção do NAD^+ . Há muitas variações na velocidade de metabolismo do etanol, que é aproximadamente proporcional ao peso corporal e ao peso do fígado. Em média, para uma pessoa saudável que não beba habitualmente, esta taxa varia de 60 a 150 mg/kg.hora ou 7 a 10 g de etanol por hora (RANG, 2001; MASTERS, 2003).

Quando o consumo supera determinado limite (10 mg%) e especialmente no uso crônico, o Sistema Microssomal de Oxidação do Etanol (SMOE) participa de forma significativa, pois não depende de NAD^+ ; utiliza o NADPH como cofator. A isoenzima CYP2E1 do sistema citocromo P450 é a principal responsável pela atividade do SMOE. É induzível, desempenhando um papel importante na tolerância metabólica ao etanol desenvolvida pelos bebedores crônicos. Também mostra uma capacidade única e não usual de gerar intermediários reativos de oxigênio, tais como radicais superóxidos e de ativar muitos xenobióticos em seus metabólitos tóxicos, que são geralmente radicais livres, como é o caso do paracetamol (MASTERS, 2003; LIEBER & ABITAN, 1999).

Existe, ainda, uma terceira via, catalisada pela enzima catalase, que se encontra no interior dos peroxissomas e que depende da disponibilidade do peróxido de hidrogênio no citossol; porém, a importância prática no ser humano é mínima (RAMCHANDANI, BOSRON e LI, 2001).

Quase todo o acetaldeído produzido pelas vias acima descritas, é convertido em acetato, no fígado, pela enzima aldeído desidrogenase (ALDH), presente na mitocôndria e que utiliza o NAD^+ como cofator. Grande parte deste ácido acético participa como acetil CoA no ciclo de Krebs, oxidando-se totalmente a CO_2 e água. Assim sendo, pela biotransformação, 1 g de etanol gera cerca de 7 calorias; no entanto são calorias “vazias”, pois o etanol pode substituir carboidratos, proteínas e gorduras em valor energético mas não possui nutrientes essenciais (MASTERS, 2003; RANG, 2001).

A velocidade de biotransformação do etanol mostra um considerável grau de variabilidade interindividual e étnica, em parte devido às variantes dos genes que codificam ADH e ALDH produzindo diferentes isoenzimas; o polimorfismo funcional dos genes ADH1B e ALDH2 influenciam a eliminação do etanol (LADERO QUESADA, 1998; LIEBER & ABITAN, 1999).

Entre 2 a 10% da quantidade do etanol consumido é eliminado de forma inalterada na urina, no ar exalado e em secreções como suor e saliva (JONES, 2000; LIEBER & ABITAN, 1999; LADERO QUESADA, 1998).

O etanol também pode ser biotransformado de forma não oxidativa pelas seguintes vias (Figura 1):

- a) Etil Ésteres de Ácidos Graxos (FAEEs);
- b) Fosfatidiletanol;
- c) Etilglicuronídeo (EtG);
- d) Etilsulfato (EtS).

Os FAEEs são formados pela esterificação do etanol com ácidos graxos ou acil graxo coenzima-A endógenos. Muitas enzimas conhecidas parecem catalisar esta síntese; porém, as características enzimáticas desta síntese não são bem conhecidas (SODERBERG *et al.*, 2003). Como são encontradas elevadas concentrações de FAEEs no fígado, coração, pâncreas e cérebro após consumo de etanol, formula-se a hipótese que os danos lesivos observados nestes órgãos, em dependentes de etanol,

possam ser devidos aos FAEEs e não exclusivamente ao metabolismo oxidativo do etanol (SODERBERG *et al.*, 2003).

O fosfatidil etanol é um fosfolípídeo aberrante formado nas membranas celulares na presença de etanol, resultante da ação catalítica da enzima fosfolipase D sobre a fosfatidilcolina (ARADOTTIR, MOLLER e ALLING, 2004).

O etilglicuronídeo (EtG) é um produto de biotransformação do etanol formado diretamente pela reação de conjugação de fase II com ácido glicurônico via UDP-glucuroniltransferases (UGTs). Esta reação representa uma via de eliminação de etanol menos expressiva em humanos, uma vez que somente cerca de 0,02 a 0,06% da dose administrada é recuperada como EtG na urina, como recentemente demonstrado (DAHL *et al.*, 2002; GOLL *et al.*, 2002).

As UGTs são glicoproteínas localizadas no retículo endoplasmático e nas membranas nucleares. A principal função da glicuronidação é transformar a natureza hidrofóbica de compostos para derivados mais hidrofílicos, facilitando a excreção de diversos substratos, entre eles, xenobióticos (ex. fármacos) e moléculas endógenas (ex. bilirrubina, hormônios esteroidais, ácidos biliares, vitaminas solúveis em gordura) (OUZZINE *et al.*, 2003).

A super família de UGTs humanas corresponde à várias isoenzimas, reguladas independentemente, algumas das quais têm sido identificadas sobre as bases da purificação de proteínas (MINERS, MCKINNON e MACKENZIE, 1991; MATERN *et al.*, 1994). Conforme a sequência de aminoácidos são divididas em duas famílias (UGT1 e UGT2) e três subfamílias (UGT1A, UGT2A e UGT2B). O gene da UGT1 expressa 12 isoformas, produzidas de um único gene e cada isoforma tem substratos específicos. A família do gene UGT2 se diferencia pelo fato de que os mRNAs UGT2 são transcritos por genes diferentes (KIANG, ENSOM e CHANG, 2005).

A expressão de um tipo individual de enzima da família UGT está sujeito ao polimorfismo genético, podendo ser inibidas ou induzidas por diferentes xenobióticos (MACKENZIE *et al.*, 2005). Atualmente, as isoformas UGT1A1 e 2B7 da UGT têm sido identificadas como as mais prevalentes na conjugação de ácido glicurônico ao etanol (FOTI & FISHER, 2005).

O Etilsulfato (EtS) também representa uma via metabólica menor (< 0,1%) na eliminação de etanol em humanos. A formação do EtS foi conhecida inicialmente por experimentos desenvolvidos com animais de laboratório, onde os resultados mostraram que o etanol sofre uma reação de conjugação com o sulfato ativado, ao reagir com 3'-fosfoadenosina 5'-fosfosulfato, uma reação que é mediada pela enzima citossólica sulfotransferase (VESTERMARK & BOSTROM, 1959). Posteriormente, em um outro experimento com animais, foi sugerido que o EtS poderia ser excretado na urina durante as primeiras 24 h (BOSTROM & VESTERMARK, 1960). No entanto, estes estudos foram limitados devido à falta de métodos analíticos adequados para permitir uma identificação confiável deste metabólito. Recentemente e com o desenvolvimento de novas metodologias analíticas como LC-MS e LC-MS/MS, o EtS foi identificado na urina de humanos, após a ingestão de etanol (POLITI *et al.*, 2005; DRESEN, WEINMANN e WURST, 2004; HELANDER & BECK, 2004, 2005).

2.2. Efeitos tóxicos do etanol

Os efeitos tóxicos do etanol podem ser classificados em agudos e crônicos. Nos efeitos agudos, os critérios de diagnóstico de intoxicação estão baseados em evidências recentes de ingestão alcoólica que resultam em alterações temporárias do comportamento e das funções motoras. A intoxicação aguda pode ser leve, moderada ou grave, podendo levar ao coma e à morte com o progressivo aumento da dose. Esta relação pode sofrer influência de vários fatores, como sexo, idade, peso corporal, tolerância individual, padrão anterior ao uso de etanol e plenitude estomacal no momento da ingestão (MASTER, 2003).

Os efeitos crônicos são responsáveis por alterações morfológicas em praticamente todos os órgãos, especialmente fígado, pâncreas, coração e cérebro, podendo resultar em dano irreversível ou morte (FLEMING; MIHIC e HARRIS, 2001).

- **Efeitos sobre o sistema nervoso central**

Por muito tempo acreditou-se que os efeitos devidos ao etanol no sistema nervoso central eram causados pelo desequilíbrio nos componentes lipídeos das membranas neuronais (KALANT & KHANNA, 1989). Mais recentemente, sabe-se que o etanol altera seletiva e especificamente a função de várias proteínas ligadas à membrana, que participam de vias de sinalização. Altera também vários sistemas de neurotransmissores, que poderiam explicar suas ações psicoativas (RANG, 2001).

O etanol é um depressor do sistema nervoso central; isto ocorre, em princípio, devido à ação exercida nos sistemas inibitório e excitatório do SNC, onde atua potencializando a ação do ácido gama-aminobutírico (GABA), principal neurotransmissor inibitório do SNC, em seus receptores específicos. Ao mesmo tempo, inibe a ação do glutamato, um dos principais neurotransmissores excitatórios, nos receptores N-metil-D-aspartato

(NMDA). Com isso, ocorrem inicialmente euforia e excitação, devido à depressão dos mecanismos de controle inibitório central (FLEMING; MIHIC e HARRIS, 2001). O receptor de glutamato, NMDA também está implicado em muitos aspectos da função cognitiva, incluindo aprendizado e memória. Assim, altos níveis de etanol podem resultar em períodos de perda de memória que ocorrem pela inibição desses receptores (ROGAWSKI, 2005).

O consumo de grandes quantidades de etanol por um longo período, leva ao desenvolvimento de déficits neurológicos, com lesão nervosa periférica simétrica generalizada, que se inicia por parestesias distais nas mãos e nos pés. O córtex, sob o efeito do etanol, é liberado da função integradora, resultando em desorganização mental e descontrole da função motora (BRADY & SONNE, 1999).

Nos dependentes de etanol, é freqüente observar uma deficiência de tiamina (vitamina B1) devido à dieta inadequada, debilidade na absorção intestinal e decréscimo no estoque hepático desta vitamina. O cerebelo é particularmente sensível aos efeitos dessa deficiência; devido a isto, alguns desses pacientes podem desenvolver graves desordens cerebrais, tais como a síndrome de Wernicke–Korsakoff, uma doença neurológica nutricional (KALANT & KHANNA, 1989). No desenvolvimento dessa síndrome parece ter importância a excitotoxicidade mediada pelos receptores GLU-érgicos (MARTIN; SINGLETON e HILLER-STURMHOFEL, 2003; MORGAN, 1982).

O uso freqüente de etanol é acompanhado por tolerância, dependência e síndrome de abstinência. Quando a dependência é instalada, a abstinência da droga resulta em um período de hiperexcitabilidade caracterizada por taquicardia, tremores, agitação psicomotora, confusão mental, desordens no sono, episódios de alucinações e, aproximadamente, 5% desses pacientes podem evoluir para uma síndrome conhecida como "*delirius tremens*" (RANG, 2001). Os sinais e sintomas da síndrome de abstinência alcoólica (SAA) estão relacionados à alteração nos níveis de liberação de noradrenalina e dopamina. A hiperestimulação adrenérgica, que pode ser intensa na SAA, deve-se a uma redução da atividade de

adrenoreceptores inibitórios pré-sinápticos do subtipo α_2 (ROGAWSKI, 2005).

Em administrações crônicas, para compensar o reduzido fluxo de cálcio e de transmissão sináptica, ocorre uma mudança adaptativa que leva ao aumento do número de canais de cálcio. Durante a privação do etanol, o excesso desses canais e o aumento do fluxo de cálcio, resultam numa excessiva transmissão que contribui para a síndrome de abstinência (KENNEDY & LIU, 2003).

- **Efeitos sobre o fígado**

A lesão hepática é uma das conseqüências mais sérias do consumo excessivo do etanol a longo prazo (LIEBER, 2004).

Uma vez que ambas as fases de biotransformação do etanol dependem da presença de NAD^+ , esta via torna-se saturada quando a regeneração deste cofator é insuficiente. Nos pacientes dependentes de etanol, a deficiência do NAD^+ e o aumento maciço na concentração de NADH citossólico afetam outros processos metabólicos intermediários dependentes de NAD^+ (KALANT & KHANNA, 1989). O excesso de NADH promove a esteatose hepática ao estimular a síntese de ácidos graxos, enquanto a oxidação via ciclo do ácido tricarboxílico está bloqueada. Os níveis altos de NADH e acetil-CoA, promovem a síntese de triglicérides a partir dos ácidos graxos livres, contribuindo para o acúmulo de gordura no parênquima hepático; isto progride para hepatite, necrose hepática irreversível e fibrose (LIEBER, 2004). Também o etanol promove um desequilíbrio no metabolismo do colágeno, causando depósito deste nos hepatócitos e nos lipócitos, contribuindo ao processo de fibrose e cirrose hepáticas (AHMED, 1995).

A atividade do CYP2E1 é induzível pelos ácidos graxos em excesso; o metabolismo por esta via gera radicais livres, que causam estresse

oxidativo, com peroxidação dos lipídeos e dano na membrana, incluindo atividade enzimática alterada (LIEBER, 2004).

O aumento do NADH mediado pelo etanol faz com que os intermediários da gliconeogênese sejam desviados para rotas alternativas de reação: redução de piruvato em lactato e oxalacetato em malato (KALANT & KHANNA, 1989). Essa diminuição da síntese de glicose pode acarretar em hipoglicemia, particularmente em indivíduos com depósitos de glicogênio diminuídos. A mobilização de glicogênio hepático é a primeira defesa do corpo contra a hipoglicemia; assim, os indivíduos em jejum ou desnutridos apresentam depleção de depósitos de glicogênio.

O aumento do lactato, produto da redução do piruvato, estimula a síntese de colágeno nos miofibroblastos. Por outro lado, o lactato aumentado acarreta em acidose láctica, interferindo com a excreção do ácido úrico, levando a uma hiperuricemia que pode desencadear ou agravar um ataque de gota (KALANT & KHANNA, 1989).

Os dependentes de etanol que sofrem de hepatopatia crônica podem apresentar distúrbios do equilíbrio hidroeletrolítico, incluindo ascite, edema e derrames. Esses fatores podem estar relacionados à diminuição da síntese de proteínas e à ocorrência de hipertensão porta (MASTER, 2003). O desvio do fluxo sangüíneo portal ao redor do fígado fibrótico causa varizes esofágicas que podem sangrar repentinamente.

Por outro lado, o acetaldeído liga-se covalentemente às proteínas microssômicas do fígado de ratos *in vivo* e forma adutos nestas proteínas, que atuam como antígenos e geram uma resposta imune, contribuindo para o dano hepático (LIEBER & ABITAN 1999).

- **Efeitos sobre o sistema cardiovascular**

O consumo alto e prolongado de etanol está associado a miocardiopatia dilatada, com hipertrofia e fibrose ventricular. Tanto o

consumo de etanol a curto prazo como o crônico, diminui a contratilidade do miocárdio, enquanto o consumo crônico altera também a resposta do miocárdio a vários agentes inotrópicos e produz uma cardiomiopatia secundária (AHMED, 1995; SPIES, *et al.*, 2005).

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 (AHMED, 1995; WALSH *et al.*, 2002).

A circulação sangüínea também é afetada com o uso de etanol. Alguns estudos têm demonstrado que o consumo diário de mais de 200 g de etanol é associado a um aumento na pressão arterial, que é o maior fator de risco para o infarto hemorrágico e cerebral (AHMED, 1995).

- **Efeitos sobre o sistema gastrointestinal**

A patologia gastrointestinal mais comumente associada com o consumo de etanol é a inflamação aguda da mucosa esofágica e do estômago, responsável pela esofagite, refluxo gastresofágico e gastrite aguda. Se a gastrite ocorre na presença de varizes esofágicas dilatadas com cirrose hepática, pode haver um sangramento potencialmente fatal (TEYSSEN & SINGER, 2003).

- **Efeitos sobre o pâncreas**

A exposição prolongada ao etanol (mais que 10 anos) é uma condição necessária para o desenvolvimento de uma pancreatite crônica. No entanto, não é uma condição suficiente, pois há pacientes com um consumo mais importante e prolongado de etanol que apresentam cirrose hepática, mas não pancreatite crônica (LEVY, 2001).

Muitas incertezas ainda existem em torno da fisiopatologia da pancreatite crônica, embora sabe-se que há um desencadeamento de processos que convergem para um mecanismo central – independente da etiologia - caracterizado pela ativação de enzimas pancreáticas, com conseqüente autodigestão tissular e inflamação local. Nas últimas décadas, quatro teorias sobre a etiologia da pancreatite crônica têm sido propostas: metabólico tóxico, estresse oxidativo, obstrução do ducto e necrose-fibrose (STEVENSON *et al.*, 2004).

Estudos usando culturas celulares acinares do pâncreas têm estabelecido que este órgão pode metabolizar etanol pela via oxidativa, envolvendo a enzima álcool desidrogenase (ADH) e, possivelmente, o citocromo P450-2E1 (APTE & WILSON, 2003; STEVENSON *et al.*, 2004). O estresse oxidativo induzido pelo metabolismo do etanol pode gerar radicais livres nas células acinares, resultando na secreção de proteínas anormais, necrose, inflamação e fibrose (STEVENSON *et al.*, 2004).

O metabolismo não oxidativo do etanol resultante na formação dos FAEEs, também tem sido vinculado na patogênese da pancreatite alcoólica. Werner *et al.*, 2002, caracterizaram o dano induzido pelo etanol em ratos e avaliaram a contribuição dos metabólitos oxidativos e não oxidativos do etanol na pancreatite aguda. A atividade da enzima FAEE sintetase, enzima que cataliza a formação dos FAEEs, foi encontrada principalmente no pâncreas; assim, a síntese excessiva dos FAEEs durante o abuso crônico do etanol pode ser associado com dano pancreático, de acordo com os resultados de estudos *in vivo* e em culturas celulares (WERNER *et al.*, 2002).

O etanol modula a função exócrina aumentando a litiogenicidade do fluido pancreático, sabe-se que ocorre um aumento da concentração protéica no suco pancreático levando a formação de “rolhas protéicas”, decorrente da precipitação das proteínas. O contato crônico destas formações com o epitélio do ducto produz ulceração, com conseqüente obstrução. Eventualmente, atrofia e fibrose desenvolvem-se como resultado

deste processo obstrutivo, constituindo-se em matriz para a deposição de cálcio, que originam as calcificações pancreáticas. (STEVENSON *et al.*, 2004).

A teoria da necrose-fibrose baseia-se no fato de que a pancreatite alcoólica se inicia com um processo agudo de necroinflamação pancreática e progride a um dano pancreático crônico irreversível em consequência de repetidos episódios agudos (atrofia acinar e fibrose) (APTE & WILSON, 2003).

Embora o etanol seja a etiologia mais comum de pancreatite crônica em países desenvolvidos, é provável que múltiplos cofatores genéticos e ambientais possam interagir para o desenvolvimento deste dano (STEVENSON *et al.*, 2004).

- **Efeitos sobre o sistema endócrino**

Existe evidência recente de que o etanol atua como um mensageiro neuroquímico que influencia a intercomunicação entre o sistema nervoso e endócrino; especificamente, atua como regulador do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), modulando a liberação de hormônios, particularmente de adrenocorticotrófica (ACTH) e corticosterona (HADDAD, 2004).

O etanol promove um aumento da diurese mediada pela inibição da secreção de hormônio antidiurético (ADH). Uma inibição semelhante observa-se na secreção de oxitocina, podendo causar retardo no parto a termo (KALANT & KHANNA, 1989).

A ginecomastia e a atrofia testicular também foram observadas em dependentes de etanol. Esse efeito está associado a uma redução na síntese de esteróides testiculares, havendo uma contribuição da indução das enzimas microssomais hepáticas pelo etanol e de uma taxa aumentada de inativação da testosterona (RANG, 2001; KALANT & KHANNA, 1989).

- **Efeitos do etanol sobre o sistema hematológico**

O etanol produz efeitos múltiplos no tecido hematopoiético, resultante de deficiências nutricionais, secundários às causas hepáticas e por ação direta do etanol e de seus metabólitos na medula óssea, resultando em anemia, leucopenia e trombocitopenia (AHMED, 1995).

- **Efeitos carcinogênicos**

Dados epidemiológicos têm identificado o consumo crônico de etanol como um importante fator de risco para desenvolver câncer da orofaringe, laringe, esôfago, estômago e fígado. A evidência acumulada aponta que o etanol pode atuar como promotor tumoral e que o acetaldeído seria o responsável (NAVASUMRIT *et al.*, 2000).

O consumo de etanol também está associado com um aumento no risco de desenvolvimento de câncer de mama; isto pode ser explicado pela presença das enzimas que metabolizam o etanol no tecido da mama. As espécies reativas de oxigênio resultantes do metabolismo do etanol podem gerar adutos com o DNA e proteínas (DUMITRESCU & SHIELD, 2005).

Outro mecanismo pelo qual o etanol estimula a carcinogênese é a indução do citocromo P450-2E1, que está associado com um aumento na produção de radicais livres e aumento na ativação de vários pró-carcinógenos presentes nas bebidas alcoólicas (POSCHL & SEITZ, 2004).

- **Efeitos da exposição pré-natal ao etanol.**

A exposição pré-natal ao etanol causa comprometimento do desenvolvimento fetal, observando-se anormalidades estruturais e funcionais, denominada Síndrome Alcoólica Fetal (SAF). Essa síndrome está associada a um tamanho diminuído do feto, desenvolvimento anormal da face, malformações e dano ao desenvolvimento do SNC, que incluem defeitos na migração neuronal, perda de células em várias regiões cerebrais e déficits no número de neurônios e conexões sinápticas (MILLER, 1997). O consumo

de doses maiores que 42,5 g de etanol por dia (aproximadamente 3 latas de cerveja), aumenta o risco de anormalidades fetais e maiores de 60 g esporadicamente durante a embriogênese, está fortemente associado com a SAF (CORREA, FERREIRA e LEMONICA, 2000).

Ao atravessar facilmente a placenta, o etanol alcança concentrações que se assemelham aos níveis sangüíneos maternos, dependendo somente das enzimas maternas e placentárias para eliminá-lo. As anormalidades neuropatológicas indicam que o etanol causa migração neuronal e glial aberrante no sistema nervoso em desenvolvimento; isto foi observado tanto em seres humanos quanto em experimentos em animais trazendo como consequência problemas de aprendizado e comportamento (SODERPALM & de WIT, 2002). O retardo mental apresentado em crianças que estiveram expostas a etanol durante a gestação é considerado maior do que aquele encontrado na Síndrome de Down (CORREA, FERREIRA e LEMONICA, 2000).

2.3. Marcadores de consumo de etanol

Os marcadores de consumo do etanol não podem efetivamente diagnosticar a dependência; no entanto, podem ter várias aplicações no âmbito médico: indicadores de dano tecidual decorrente do consumo crônico, monitoramento e motivação de pacientes em programas de tratamento e prevenção, medida objetiva do efeito do etanol durante ensaios clínicos e comportamentais, constatação do uso recente em situações de alto risco tais como na gestação (Síndrome Alcoólica Fetal), na condução de veículos e no ambiente ocupacional (WURST *et al.*, 2005; SHARPE, 2001).

- **Etanol**

A análise direta do etanol em fluidos corporais como sangue, urina ou ar exalado não permite diferenciar um consumo agudo de um crônico; no entanto, é específica para avaliar uma exposição muito recente. Devido ao fato do etanol ter uma taxa de eliminação rápida, da ordem de 0,10 g/kg/h, sendo que este valor aumenta em bebedores crônicos (BORUCKI *et al.*, 2005) esta análise está restrita no monitoramento de consumo dentro de um curto período, aproximadamente 6-8 horas após a ingestão (LAPOSATA, 1997).

Adicionalmente, os resultados da concentração de etanol urinário podem ser superestimados pela possibilidade de um processo de fermentação *in vitro*, a partir de glicose e leveduras presentes na urina, probabilidade que aumenta nos casos de pacientes diabéticos, de infecção no trato urinário, ou de um armazenamento não adequado da amostra (SOMMERS *et al.*, 2003).

- **Adutos de acetaldeído**

O acetaldeído é um produto intermediário do metabolismo do etanol; é uma molécula altamente reativa, que pode interagir com proteínas de

diferentes tecidos por meio de uniões covalentes formando adutos de acetaldeído – proteínas, que podem permanecer por vários dias após a eliminação do etanol (MUSSHOFT, 2002). Acetaldeído associado ao sangue total inclui adutos de albumina e hemoglobina; a concentração deste último sendo 5-10 vezes maior que os adutos com proteínas plasmáticas (SHARPE, 2001).

A determinação de acetaldeído unido às proteínas de membrana das células vermelhas ou outros componentes do sangue tem sido utilizada para avaliar o consumo de etanol. Lin (1990), por exemplo, demonstrou que os pacientes dependentes de etanol têm níveis séricos significativamente maiores de albumina modificada pelo acetaldeído em comparação com os abstinentes. No entanto, este marcador não tem sido adotado no meio clínico, devido à variabilidade individual existente na quantidade de adutos de acetaldeído que são formados, agravado pela dificuldade desta determinação (SWIFT, 2003).

- **Etilglicuronídeo (EtG)**

O EtG é um metabólito direto do etanol e não um produto de fermentação *in vivo*, capaz de ser detectado na urina após uma única exposição em baixa dose, mesmo que o etanol já tenha sido eliminado do organismo, devido a sua maior meia vida de eliminação, $t_{1/2\beta}$. Por essa característica, esse biomarcador de uso de etanol é de particular interesse no âmbito forense.

O EtG é um composto estável, que tem sido determinado na urina, sangue, cabelo e tecidos *post-mortem* (SCHLOEGL *et al.*, 2006a, 2006b; WURST *et al.*, 1999, 2005; KLYS *et al.*, 2005; MORINI *et al.*, 2006; JURADO *et al.*, 2004; YEGLES *et al.*, 2004; JANDA *et al.*, 2001; SKOPP *et al.*, 2000; ALT *et al.*, 2000; PRAGST *et al.*, 2000; SKOOP *et al.*, 2000).

No sentido de avaliar a eficiência de detecção de EtG em cabelo, foram realizados estudos *post-mortem* de casos de diagnóstico comprovado de

dependência ao etanol. Os resultados mostraram que nem sempre é possível determinar EtG em todas estas amostras, como seria o esperado, conforme os achados obtidos por Alt *et al.*, (2000) (2 amostras negativas em um total de 16), Skoop *et al.*, (2000) (2 amostras negativas em um total de 4), Pragst *et al.*, (2000) (3 amostras negativas em um total de 3), Janda *et al.*, (2001) (38 amostras negativas em um total de 97), Yegles *et al.*, (2004) (11 amostras positivas em um total de 11).

Estes resultados sugerem que a ausência de EtG no cabelo, não é certeza de abstenção ao etanol; por outro lado, a presença de EtG em amostras de cabelo *post-mortem* indica que, de fato, houve um consumo crônico de etanol até acontecer o óbito.

Tecidos queratinizados incorporam xenobióticos e fornecem uma retrospectiva maior da janela de detecção do que fluidos biológicos. Substâncias básicas e lipofílicas são incorporadas preferencialmente às substâncias neutras ou ácidas. Cabelo queratinizado é ácido em sua natureza, o que implica em baixa ligação do EtG às fibras e facilita sua remoção nos procedimentos de rotina de lavagem e cuidados ao cabelo (SKOOP *et al.*, 2000).

A falta de correlação entre a detecção de EtG em cabelo e o perfil de consumo de etanol sugere que esta molécula pode ter sido formada localmente. O folículo capilar é um tecido com moderada atividade metabólica onde é observada a atividade de glicuronosil transferases. Além do mais, outras enzimas conhecidas que biotransformam o etanol foram detectadas nas raízes. Como consequência, pode-se esperar uma oxidação do etanol (SKOOP *et al.*, 2000). Além do mais, a distribuição do EtG em diferentes segmentos de cabelo, provenientes de dependentes de etanol não é uniforme (YEGLES *et al.*, 2004). Estes trabalhos levam a concluir que são necessários estudos mais específicos com relação à incorporação do EtG no cabelo *in vivo*.

Considerando bebedores sociais, alguns estudos conseguem detectar EtG no cabelo e outros não. Alt *et al.*, (2000) não detectaram EtG em amostras de cabelos de bebedores sociais que consumiam até 20 g de etanol por dia, sugerindo que estes resultados poderiam discriminar bebedores sociais (com consumo até 20g de etanol/dia) de dependentes de etanol.

A estabilidade do EtG em condições de degradação foi examinada em amostras de tecidos *post-mortem* como fígado, músculo esquelético e sangue femoral. As amostras foram estocadas 4 semanas sob condições de degradação, sendo observada uma lenta diminuição na concentração de EtG. Nas amostras em que a concentração de EtG era maior que 1µg/g, a determinação de EtG após 4 semanas, ainda foi positiva (SCHLOEGL *et al.*, 2006a).

Em diabéticos não controlados é comum a possibilidade do etanol ser produzido na bexiga, na presença de carboidratos fermentáveis tais como a glicose e também de ser oriundo de infecções frequentes do trato urinário, o que aumenta o risco de formação *post-mortem* de etanol (JONES, EKLUND e HELANDER, 2000). Portanto, se o etanol foi produzido no corpo após da morte, não deve ser encontrada nenhuma quantidade mensurável de EtG nas amostras. No estudo desenvolvido por Schloegl *et al.*, (2006a) também foi estudado se era possível acontecer a formação *post-mortem* de EtG e foi comprovado que a presença de EtG nos fluidos e tecidos corporais foram originados exclusivamente a partir do etanol consumido prévio ao óbito (SCHLOEGL *et al.*, 2006a). Høiseth *et al.*, (2006) avaliaram a sensibilidade e especificidade do EtG em amostras de sangue e comprovaram que a determinação de EtG nesta matriz pode ser usado, como um marcador de ingestão de etanol *ante-mortem* nos casos onde a produção *post-mortem* de etanol é questionada.

Schloegl *et al.*, (2006b) fizeram a determinação de EtG em medula óssea fígado, músculo, bile, sangue e urina de amostras *post mortem*.

Comparada às outras matrizes a medula óssea apresenta maiores concentrações de EtG (0,77-9,36 µg/g), sendo uma alternativa adequada nos casos em que outras matrizes não estejam disponíveis.

- **Etilsulfato (EtS)**

Assim como o EtG, o EtS representa uma via metabólica menor de eliminação de etanol em humanos e apresenta as mesmas características físico-químicas. O perfil de excreção urinária do EtS é similar ao EtG, podendo ser detectado em um período maior após a completa eliminação do etanol no organismo, razão pela qual também tem sido considerado como um marcador específico e sensível de consumo recente de etanol (POLITI *et al.*, 2005; DRESEN, WEINMANN e WURST, 2004; HELANDER & BECK, 2004, 2005).

- **Etil Ésteres de Ácidos Graxos (FAEEs)**

Os FAEEs são formados pela reação do etanol com ácidos graxos livres no sangue e tecidos. Como estes compostos são relativamente estáveis e persistem no sangue e tecidos horas após o etanol ter sido eliminado, têm sido propostos como marcadores de consumo recente de etanol (DOYLE *et al.*, 1996; LAPOSATA, 1997). Doyle *et al.*, (1996) determinaram que níveis séricos de FAEEs poderiam ser detectados até 24 horas após um consumo controlado de etanol. Borucki *et al.*, (2005), demonstraram que os níveis inicialmente altos de FAEEs decrescem rapidamente em 24 horas; após este período, não declinam até zero ou até o limite de quantificação, mas permanecem estáveis em um nível baixo por até 78,5 h. A sensibilidade é de 100% após 7 horas, diminuindo para 24% após 29 h, declinando para 6% após 54 h e permanecendo neste valor até 78,5 horas. Os FAEEs também podem ser considerados como um marcador *post-mortem* de ingestão de etanol, pois são depositados no sebo e incorporados no cabelo. Estudos demonstraram que os FAEEs foram detectados em níveis muito maiores em amostras *post-mortem* de cabelo e tecidos

corporais provenientes de dependentes de etanol quando comparados com não bebedores (SODERBERG *et al.*, 2003; SWIFT, 2003).

- **Fosfatidil etanol**

O *pool* de fosfolípídeo celular total pode acumular, em algumas células, em até 1-2% na presença prolongada de etanol, porque a velocidade de degradação do fosfatidil etanol é baixa comparada à sua síntese. Já foi determinado em vários tecidos, especialmente em cérebro e fígado e também em sangue (GUSTAVSSON, 1995). Devido à sua alta especificidade e baixa eliminação, tem sido proposto como um marcador de uso crônico de etanol (GUNNARSSON *et al.*, 1998).

- **Cocaetileno**

É formado por uma reação de esterificação entre a cocaína e etanol, nas células do fígado e rins (SOBEL & RILEY, 1999). O cocaetileno tem alta taxa de distribuição no cérebro/sangue e causa efeitos tóxicos similares ao da cocaína; sua meia-vida plasmática é 150-250 minutos (CAMI *et al.*, 1998). A correlação entre etanol e cocaetileno ainda não está claramente estabelecida e sua determinação na urina e outros espécimes como um marcador de consumo de etanol está limitada ao consumo de ambos os fármacos (MUSSHOFT, 2002).

- **Transferrina Deficiente em Carboidratos (CDT)**

CDT é uma isoforma da transferrina, globulina que liga e transporta ferro. Isoforma é uma proteína que tem a mesma função e composição similar que uma outra proteína, mas é o produto de um gene diferente. A CDT contém menos moléculas de ácido siálico que a transferrina normal, sendo por este motivo denominada de transferrina *deficiente* em carboidratos, indicando sua forma anormal (SOMMERS *et al.*, 2003).

Ainda não é conhecido muito bem o mecanismo desta anormalidade estrutural, mas sabe-se que envolve alterações de catabolismo e biossíntese que leva à completa perda de uma cadeia inteira de oligossacarídeos. É estimado que a quantidade mínima de etanol para elevar os valores da CDT, seja da ordem de 50 a 80 g por dia durante pelo menos uma semana (LITTEN, ALLEN e FERTIG, 1995; SOMMERS *et al.*, 2003). Durante a abstinência, os níveis de CDT retornam ao normal com uma meia vida de 15 dias; permanece elevado por várias semanas (SHARPE, 2001).

A CDT apresenta sensibilidade entre 50% e 80% e especificidade entre 80% e 100%, sendo considerada um marcador específico para identificar uma exposição crônica ao etanol (ELOMACE *et al.*, 1996; FLAHAUT *et al.*, 2003). Os poucos resultados falsos positivos relatados, foram associados com cirrose biliar primária ou com variantes genéticas de transferrina (HELANDER, CARLSSON e BORG, 1996).

- **Relação urinária 5-hidroxitriptofol (5-HTOL) / ácido 5-hidroxiindol acético (5-HIAA)**

O 5-HTOL e o 5-HIAA são produtos do metabolismo da serotonina. Inicialmente, a serotonina é oxidada pela monoaminoxidase (MAO) para formar o 5-hidroxiindolacetaldeído (5-HIAL); este intermediário pode ser oxidado pela aldeído desidrogenase (ALDH) formando o 5-HIAA ou pode ser reduzido pela aldeído redutase (ALR) ou pela álcool desidrogenase (ADH) para 5-HTOL, que é eliminado na urina como glucuronídeo ou sulfato (MUSSHOF, 2002). Quando não há exposição ao etanol, a relação urinária 5-HTOL/5-HIAA é muito pequena ($< 0,01$). No entanto, nos dependentes de etanol, a via redutiva domina devido ao excesso de NADH ou inibição da ALDH. Conseqüentemente, a relação urinária 5-HTOL/5-HIAA aumenta - de 50 a 100 vezes do normal - e permanece elevada 11 a 19 horas após uma ingestão de etanol. É utilizada a relação urinária 5-HTOL/5-HIAA e não somente a concentração de 5-HTOL, no sentido de melhorar a exatidão da análise, pois a medida da relação compensa as variações na concentração

de 5-HTOL devida à diluição da urina ou pela ingestão de serotonina, proveniente da dieta (frutas). Portanto, a relação urinária 5-HTOL/5-HIAA pode ser usada como um marcador de uso recente de etanol; é uma análise muito mais sensível do que a determinação apenas do etanol, podendo detectar o consumo de quantidades moderadas de etanol nas últimas 24 horas. A sensibilidade é de 100% após 7 horas, diminuindo para 71% após 29 h, declinando para 24% após 54 h e nula até 78,5 horas (HELANDER *et al.*, 1999; SHARPE, 2001; SOMMERS *et al.*, 2003; JOHNSON *et al.*, 2005; BORUCKI *et al.*, 2005).

- **Gamma Glutamil Transferase (GGT)**

GGT é uma enzima lipoprotéica situada na membrana celular de vários tecidos. Está possivelmente envolvida na síntese protéica, na regulação dos níveis de glutathione intracelular (proteção contra o estresse oxidativo) e no transporte de aminoácidos através das membranas celulares. Normalmente, pequenas quantidades de GGT são liberadas da membrana celular para a circulação; porém, quando há um período de grande consumo de etanol, ocorre um aumento da liberação de GGT, devido à toxicidade hepática celular. Clinicamente, tem sido utilizada como uma medida da função ou dano hepático, mas também é encontrada nos rins, cérebro, pâncreas e coração. Este é um dos motivos pelo qual o aumento de GGT não é específico para um consumo excessivo de etanol.

Embora a GGT seja considerada um dos mais sensíveis indicadores de um consumo excessivo de etanol (mais que 2 drinques por dia) ou de dependência, sua sensibilidade para identificar consumidores “pesados” é somente 70%, pois apesar do nível de GGT ser de 2 a 3 vezes maior que o normal nestes indivíduos, geralmente retornam ao normal após 3 a 6 semanas de abstinência. Este marcador também pode ser usado como um instrumento de triagem para identificar consumidores que não apresentam sintomas físicos aparentes, pois, geralmente, o aumento de níveis séricos de GGT ocorre previamente a estas alterações.

Outras causas da GGT aumentada incluem ingestão de café, fármacos indutores do sistema enzimático do citocromo P450 (anticonvulsivantes, digitálicos, entre outros), hepatopatias das mais diversas etiologias, além de condições como atividade física, obesidade, diabetes, pancreatite e insuficiência renal e cardíaca. Mulheres podem ser mais vulneráveis do que os homens com relação aos efeitos tóxicos do etanol sobre o fígado, podendo apresentar uma elevação dos níveis de GGT com um padrão de consumo menor do que o homem (SHARPE, 2001; SOMMERS *et al.*, 2003; CONIGRAVE *et al.*, 2003).

- **Alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST)**

Estas enzimas estão envolvidas com o metabolismo de aminoácidos; representam um bom índice do dano ao hepatócito; porém, não existe correlação do nível de enzimas com o grau de lesão (GLUUD *et al.*, 1981; PRATT & KAPLAN, 2000). Os níveis de aminotransferases não aumentam após um único episódio de ingestão excessiva de etanol; é necessária uma exposição prolongada para ocorrer este aumento (NEMESANSZKY, LOTT e ARATO, 1988). Os níveis de AST costumam elevar-se mais do que os de ALT, porque no alcoolismo há deficiência de piridoxina, cofator necessário à síntese de ALT. No entanto, a AST tem uma menor especificidade para lesão hepática comparada com a ALT porque, além de estar presente no hepatócito, também esta presente na musculatura estriada (coração e músculos esqueléticos), rins, cérebro, pâncreas, pulmão, leucócitos e eritrócitos. A ALT apresenta distribuição mais restrita, estando presente no hepatócito e em pequena quantidade na musculatura estriada (PRATT & KAPLAN, 2000).

- **Volume Corpuscular Médio (VCM)**

VCM é o volume médio de um eritrócito, sendo calculado pela razão entre o valor do hematócrito e o número de eritrócitos. Encontra-se elevado

em consumidores excessivos de etanol e em dependentes, devido ao efeito do etanol sobre a membrana do eritrócito e provavelmente pela deficiência de ácido fólico encontrada em dependentes de etanol. Mesmo nos indivíduos bem nutridos, pode haver síndrome carencial de ácido fólico, porque o etanol prejudica a sua biodisponibilidade. O etanol parece ter uma toxicidade direta sobre a medula causando uma redução dos precursores. A causa mais comum de macrocitose (uma condição em que os eritrócitos estão maiores que o normal; VCM>100 fL) é a dependência ao etanol, na presença ou ausência de cirrose hepática. Segundo Paladino (2000) em revisão sobre o tema, a presença de macrocitose foi encontrada em 20% a 96% dos pacientes que ingeriam elevadas quantidades de etanol todos os dias. No entanto, a macrocitose também é observada em outras causas, incluindo deficiências de vitamina B e na anemia aplásica. A sensibilidade do VCM não é tão alta como a de outros indicadores biológicos, atinge 30%; mas é de alta especificidade e de fácil análise (SHARPE, 2001). Como a vida média de um eritrócito é de 120 dias, são necessários vários meses para que um consumo excessivo e regular de etanol acarrete em aumento dos níveis de VCM; ou seja, este marcador não é útil para monitorar episódios agudos de consumidores crônicos.

• Ácido siálico no soro

Ácido siálico é o nome de uma família de 36 derivados de ácidos neuramínicos de ocorrência natural, que são resíduos de cadeias de carboidratos de glicoproteínas ou glicolipídeos em fluidos biológicos e membranas celulares. A função do ácido siálico é modular a função glicoproteica; servem como sítios de reconhecimento quando outras células ou outros compostos entram em contato com a célula. Como o consumo de etanol diminui a ligação do ácido siálico com a transferrina e outras glicoproteínas, seus níveis se elevam. Este marcador pode ser analisado no soro, saliva e urina; porém, no soro a sensibilidade e especificidade são maiores (SOMMERS *et al.*, 2003).

2.4. Aspectos analíticos da determinação de etilglicuronídeo na urina

- Estrutura química do etilglicuronídeo

- Nome químico: ácido etil-β-D-6 glicurônico
- Fórmula molecular: $C_8H_{14}O_7$
- Peso Molecular: 222 g/mol
- Ponto de fusão: 163-164°C (decomposição)
- Solubilidade (20°C): água +++, metanol +++, éter -, clorofórmio -
- Não é um composto volátil
- Armazenamento: ao resguardo da luz a 2-8°C
- pK_a : 3,21

A via de conjugação do ácido glicurônico com etanol foi confirmada em 1952, quando Kamil *et al.*, pela primeira vez, isolaram o EtG em urina de coelho. Em 1967, Jaakonmaki *et al.*, detectaram este metabólito também na urina humana; porém, como representava uma via de eliminação de etanol menos expressiva, não houve maior interesse em estudos subseqüentes sobre sua cinética.

Somente a partir de 1993, vários grupos de pesquisadores voltaram a atenção para o EtG devido ao seu potencial uso como marcador de consumo recente do etanol e vários métodos analíticos começaram a ser desenvolvidos (Tabela 1) empregando a cromatografia a gás ou a

cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (GC-MS, LC-MS ou LC-MS/MS).

Em 1995, Schmidt *et al.* (1995, 1997) descreveram, pela primeira vez, a síntese do etilglicuronídeo e o quantificaram em amostras de soro e urina por GC-MS, após derivação com anidrido acético e sem utilização de padrão interno. Esta síntese foi baseada na reação do etanol com o metil éster do ácido triacetil- α -D-6-bromoglicusidurônico, com formação de metil éster do ácido etil-D-6-triacetil-glicusidurônico, o qual é desacetilado para formar o etilglicuronídeo.

Em 1997, o composto etilglicuronídeo pentadeuterado (d_5 -EtG) tornou-se disponível comercialmente e começou a ser utilizado como padrão interno. Compostos deuterados são considerados como padrão-ouro na diluição isotópica devido às propriedades físicas e químicas idênticas do analito, com exceção de seu peso molecular.

Wurst *et al.*, (1999, 2000, 2003) utilizaram EtG deuterado (d_5 -EtG) como padrão interno e derivaram com BSTFA para a quantificação de amostras de soro e urina por GC-MS.

No entanto, tanto o método preconizado por Schmidt *et al.*, (1995) como o de Wurst *et al.*, (1999, 2000, 2003) não extraem EtG da urina, acarretando a presença de interferentes. Conforme Schmidt *et al.*, (1995), 1 mL de urina foi evaporada à secura e derivada com anidrido acético; a mistura foi incubada, evaporada, o resíduo dissolvido em metanol e injetado no GC-MS. Wurst *et al.*, (1999, 2000, 2003) adicionaram o d_5 -EtG à urina (100 a 300 μ L) e metanol (1 mL), misturaram, evaporaram, derivaram com BSTFA e injetaram no GC-MS.

Com a finalidade de eliminar a interferência causada na determinação de EtG na urina e soro, Janda & Alt (2001) desenvolveram um método, propondo extração de EtG em fase sólida, prévio ao processo de derivação com BSTFA.

Em 1999, Nishikawa propôs pela primeira vez o emprego da cromatografia líquida associada à espectrometria de massas para a determinação de EtG em soro, após precipitação de proteínas da amostra com metanol, centrifugação, evaporação do sobrenadante à secura e dissolução do resíduo em água destilada. Esta técnica permite analisar compostos muito polares sem necessitar da fase de derivação. Pode ser realizada por injeção direta (DAHL *et al.*, 2002; STEPHANSON *et al.*, 2002; BERGSTROM, HELANDER e JONES, 2003; SARKOLA *et al.*, 2003), após extração em coluna de fase sólida de troca iônica (GOLL *et al.*, 2002), após diluição com metanol, centrifugação, evaporação do sobrenadante e redissolução na fase móvel (WEINMANN *et al.*, 2004; SKIPPER *et al.*, 2004) ou após diluição em água destilada e centrifugação (POLITI *et al.*, 2005).

Além da urina e soro, o EtG também tem sido detectado em amostras de cabelo e tecidos *post-mortem* empregando GC-MS (ALT *et al.*, 2000; SKOPP, SCHMITT e POTSCH, 2000; JURADO *et al.*, 2004; YEGLES *et al.*, 2004) ou LC-MS/MS (MORINI *et al.*, 2006; WURST, *et al.*, 1999; SCHLOEGL *et al.*, 2006a, 2006b).

Zimmer, Schmitt e Aderjan (2002) desenvolveram uma técnica baseada no imunoensaio (ELISA), na tentativa de encontrar um procedimento analítico simples e rápido para detectar o EtG. No entanto, esta análise apresentou reação cruzada com vários outros derivados glicuronídeos (metil glicuronídeo, propil glicuronídeo, butil glicuronídeo, ácido glicurônico, D-glicose) com um alto grau de falsos positivos (23%) e falsos negativos (24%). Como consequência, esta técnica tem um uso limitado em urina e qualquer resultado positivo deve ser confirmado por GC-MS.

Recentemente, Krivánková *et al.*, (2005) determinaram EtG no soro por eletroforese capilar e Kaushik, Lacourse e Levine (2006), desenvolveram um método usando cromatografia líquida em fase reversa com detecção eletroquímica pulsada (PED) para a determinação de EtG na urina.

Tabela 1 - Métodos cromatográficos utilizados para determinação e quantificação de etilglicuronídeo em amostras biológicas

Técnica: GC-MS; Matriz: urina, soro						
Amostra	Extração	Derivação	Características cromatográficas	Padrão Interno	Observações	Referência
Soro, urina 1 mL		Anidrido acético	Coluna CP-Sil 5 SIM (m/z 115, 157)		LD: 0,1 mg/L	SCHMITT <i>et al.</i> , 1995
Soro 200 µL		Anidrido acético/ piridina	Coluna CP-Sil 5 SIM (m/z 115, 157, 183, <u>243</u>)		LD: 0,1 mg/L	SCHMITT <i>et al.</i> , 1997
Urina, soro 100 a 300 µL		BSTFA	Coluna HP-Ultra 2 SIM (m/z 160, 261, 405)	d ₅ EtG	LD: 0,03 mg/L LQ: 0,1 mg/L	WURST <i>et al.</i> , 1999, 2000, 2003
Urina, soro 1,5 mL	Fase sólida aminopropil NH ₂	BSTFA	Coluna DB-1701 SIM (m/z 160, 261, 405)	d ₅ EtG	LD: 168 ng/mL (urina) 37 ng/mL (soro) LQ: 560 ng/mL (urina) 173 ng/mL (soro)	JANDA & ALT, 2001
Técnica: GC-MS; Matriz: cabelo						
Amostra	Extração	Derivação	Características cromatográficas	Padrão Interno	Observações	Referência
Cabelo 50 mg	H ₂ O destilada, MeOH	MSTFA	Coluna CP-Sil 5 SIM (m/z 261, 292, 375, 405)	Metil glicuronídeo	LD: 2,2 ng/mg LQ: 5 ng/mg	SKOPP <i>et al.</i> , 2000
Cabelo 100 mg	H ₂ O desmineralizada	Piridina/BSTFA	Coluna HP-5MS SIM (m/z 160, 261, 405)	d ₅ EtG		ALT <i>et al.</i> , 2000

Tabela 1 – cont.

Técnica: GC-MS; Matriz: cabelo						
Amostra	Extração	Derivação	Características cromatográficas	Padrão Interno	Observações	Referência
Cabelo 100 mg	H ₂ O	PFPA	Coluna DB-1, SIM (m/z 333, 234, 495)	d ₅ EtG	LD: 0,025 ng/mg LQ: 0,050 ng/mg	JURADO <i>et al.</i> , 2004
Cabelo 30 mg	H ₂ O, <i>clean-up</i> : fase sólida aminopropil NH ₂	PFPA/ PFPOH	Coluna HP-Ultra 2, SIM (m/z 496, 347)	d ₅ EtG	LD: 2 pg/mg LQ: 4 pg/mg	YEGLES <i>et al.</i> , 2004
Técnica: LC-MS; Matriz: urina, soro						
Amostra	Preparação	Características cromatográficas		Padrão Interno	Observações	Referência
Soro	Precipitação de proteínas com MeOH, centrifugação, evaporação, redissolução com H ₂ O destilada	Coluna TSK gel Amide-80 Fase móvel: NH ₄ Ac/ACN SIM (m/z 221)			LD: 0,03 µg/mL	NISHIKAWA <i>et al.</i> , 1999
Urina	Injeção direta	Coluna Hypercarb Fase móvel: ác. fórmico/ACN SIM (m/z 221)		d ₅ EtG	LQ: 0,1 mg/L	DAHL <i>et al.</i> , 2002
Urina 10 µL	Injeção direta	Coluna Hypercarb Fase móvel: ác. fórmico/ACN SIM (m/z 221)		d ₅ EtG	LQ: 0,1 mg/L	BERGSTROM <i>et al.</i> , 2003
Urina	Injeção direta	SIM (m/z 221, 226)		d ₅ EtG	LQ: 0,1 mg/L	SARKOLA <i>et al.</i> , 2003

Tabela 1 – cont.

Técnica: LC-MS; Matriz: cabelo					
Amostra	Extração	Características cromatográficas	Padrão Interno	Observações	Referência
Cabelo 50 mg	H ₂ O, ACN, <i>clean-up</i> : fase sólida aminopropil NH ₂	Coluna LiChroCART (RP18) Fase móvel: A: ác. fórmico 0,1% e B: ACN 95% + 5 % fase A EtG, m/z 221; d ₅ EtG m/z 226	d ₅ EtG	LQ: 0,05 ng/mg LD: 0,04 ng/mg	KLYS <i>et al.</i> , 2005
Técnica: LC-MS/MS; Matriz: urina, soro					
Amostra	Preparação	Características cromatográficas	Padrão Interno	Observações	Referência
Soro 200 µL	Precipitação de proteínas com MeOH, centrifugação, evaporação, redissolução em NH ₄ Ac	Coluna C-18 Fase móvel: ác. fórmico 1% e MeOH MS/MS (m/z 221>75) EtG MS/MS (m/z 226>75) d ₅ EtG	d ₅ EtG	LD: 0,05 mg/L LQ: 0,1 mg/mL	WURST <i>et al.</i> , 1999, 2000
Urina 100 µL	Injeção direta				
Urina 500 µL	Fase sólida SAX	Coluna Zorbax Eclipse XDB-C8 Fase móvel: NH ₄ Ac/MeOH/ACN MS/MS (m/z 221>75)	d ₅ EtG	LD: 0,04 mg/L LQ: 0,13 mg/L	GOLL <i>et al.</i> , 2002
Urina 10 µL	Injeção direta	Coluna Hypercarb Fase móvel: ác. fórmico/ACN MRM (m/z 221>75)	d ₅ EtG	LD: 0,05 mg/L LQ: 0,1 mg/mL	STEPHANSON <i>et al.</i> , 2002

Tabela 1 – *cont.*

Técnica: LC-MS/MS; Matriz: urina, soro					
Amostra	Preparação	Características cromatográficas	Padrão Interno	Observações	Referência
Urina 100 µL	Diluição com MeOH, centrifugação, evaporação, redissolução em fase móvel	Coluna Synergy Polar – RP (fase reversa fenil propil) Fase móvel: ác. fórmico 0,1% MS/MS (m/z 221/75; 221/85)	d ₅ EtG	LD: 52 ng/mL LQ: 152 ng/mL	WEINMANN <i>et al.</i> , 2004
Urina 200 µL	Diluição com MeOH, centrifugação, evaporação, redissolução em fase móvel	Coluna Synergy Polar – RP (fase reversa fenil propil) Fase móvel: ác. fórmico 0,1% MS/MS (m/z 221/75)	d ₅ EtG	LD: 0,1 mg/L LQ: 0,3 mg/L	SKIPPER <i>et al.</i> , 2004
Urina 50 µL	H ₂ O desionizada, centrifugação	Coluna Chrompack Inertsil ODS-3 MRM (m/z 221>75)	d ₅ EtG	LQ: 0,05 mg/L LD: 0,025 mg/L	POLITI <i>et al.</i> , 2005
Técnica: LC-MS/MS; Matriz: cabelo					
Amostra	Preparação	Características cromatográficas	Padrão Interno	Observações	Referência
Cabelo 100 mg	H ₂ O, ACN, <i>clean-up</i> : fase sólida aminopropil NH ₂	Coluna Sinergy Polar- RP (fenil hexil) Fase móvel: ACN 1% + ác. fórmico 0,1% MRM (m/z 221>75)	d ₅ EtG	LD: 51 pg/mg LQ: 102 pg/mg	JANDA <i>et al.</i> , 2002
Cabelo 100 mg	H ₂ O, MeOH	Coluna Chrompack Inertsil ODS-3 Fase móvel: ác. fórmico 0,1% e ACN (v/v) MRM (m/z 221>75)	d ₅ EtG	LQ: 3 pg/mg LD: 2 pg/mg	MORINI <i>et al.</i> , 2006

Tabela 1 – *cont.*

Técnica: LC-MS/MS; Matriz: tecidos e fluidos corporais post-mortem					
Amostra	Preparação	Características cromatográficas	Padrão Interno	Observações	Referência
Tecidos <i>post-mortem</i> 1 g	MeOH, H ₂ O, centrifugação, evaporação, redissolução com NH ₄ Ac 5 mM, centrifugação	Coluna C-18 Fase móvel: ác. fórmico 1% e MeOH MS/MS (m/z 221>75) EtG MS/MS (m/z 226>75) d ₅ EtG	d ₅ EtG		WURST <i>et al.</i> , 1999
Tecidos <i>post-mortem</i> (fígado, músculo esquelético, tecido adiposo, medula) 1 g	H ₂ O desionizada, homogeneização, ultrassonicação, centrifugação, filtração, precipitação com MeOH, centrifugação, evaporação, redissolução ACN/HCl, extração fase sólida aminopropil NH ₂ , eluato seco, redissolução em fase móvel	Coluna Synergy Polar – RP Fase móvel: ác. fórmico 0,1% MS/MS (m/z 221>75) EtG	d ₅ EtG	LD: 0,052 µg/mL LQ: 0,152 µg/mL	SCHLOEGL <i>et al.</i> , 2006a,b
Urina, sangue e bile <i>post-mortem</i> 100 µL	Diluição com MeOH, centrifugação, evaporação, redissolução em fase móvel				

Objetivo e plano de trabalho

3. OBJETIVO E PLANO DE TRABALHO

O presente trabalho tem como objetivo geral desenvolver e validar uma metodologia empregando extração em fase sólida e cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas para quantificar o etilglicuronídeo (EtG) na urina. Também será verificado se há diferença na janela de detecção de EtG urinário após ingestão controlada (dose única) e após consumo crônico do etanol.

Para alcançar o objetivo proposto, foi elaborado o seguinte plano de trabalho:

- Otimização de um método para determinação de EtG em amostras de urina, empregando extração em fase sólida e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas;
- Validação analítica: estudo da linearidade, limite de detecção e quantificação, precisão intra-dia e inter-dias, exatidão e recuperação;
- Administração de dose única de etanol a voluntários e coleta de amostras de urina;
- Coleta de amostras de urina provenientes de pacientes internados em clínica de recuperação para o tratamento de dependência de etanol e drogas de abuso, usuários crônicos de etanol em abstinência;
- Aplicação do método validado nas amostras de urina coletadas para a quantificação e verificação da janela de detecção de EtG.

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Soluções – padrão

- Soluções-padrão estoque em metanol de etilglicuronídeo (EtG) e etilglicuronídeo pentadeuterado (d_5 -EtG; padrão interno) na concentração de 2 mg/mL, obtidos da *Medichem* (2 mg cada);
- Soluções-padrão de trabalho de EtG e de d_5 -EtG, preparadas a partir de diluições das soluções estoque em metanol, nas concentrações de 100 μ g/mL e 10 μ g/mL para EtG e na concentração de 100 μ g/mL para d_5 -EtG.

Todas as soluções-padrão foram armazenadas a -20°C .

4.1.2. Reagentes

- Ácido clorídrico (MERCK);
- Acetato de etila (MERCK);
- Metanol (MERCK);
- n-Hexano (MERCK);
- Solução de amônia 25% (MERCK);
- Acetonitrila (VETEC QUÍMICA FINA);
- BSTFA: N,O-Bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide + 1% TMCS (trimetilclorosilano) (SIGMA).

4.1.3. Equipamentos e acessórios

- Espectrômetro de massa modelo 5972 associado a um equipamento de cromatografia em fase gasosa modelo 6890 (GC-MS), ambos da Hewlett Packard (Little Falls, EUA) e injetor *split/splitless*. O equipamento foi operado pelo GC ChemStation, *software* responsável pela integração e processamento dos cromatogramas;
- Coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (Hewlett Packard) com as dimensões de 30 m x 0,25 mm x 0,10 μ m;
- Microseringa de 10 μ L (Hamilton);
- Coluna de extração em fase sólida SAX 500 mg/3 mL (Phenomenex, Strata);
- Bloco de aquecimento marca PIERCE, modelo 18780, com fluxo de nitrogênio para evaporação;
- Bloco de aquecimento para derivação (Digi-block);
- Tubos de derivação de 3,0 mL (Reacti-vials Pierce)
Foram descontaminados com solução alcoólica de hidróxido de potássio (10%), silanizados com diclorodimetilsilano em tolueno e lavados com metanol e acetona antes de cada procedimento analítico;
- Vórtex;
- Tubo de ensaio de vidro de 15 mL, com tampa esmerilhada;
- Pipetas automáticas com volume regulável (LabSystems);
- Centrífugas: Universal 16 A e Eppendorf refrigerada, Modelo 5804R;
- Espectrofotômetro B 380 (Micronal);
- Ultra-som USC700 (Unique).

4.1.4. Amostras

- **Amostras de urina utilizadas como referência negativa**

Amostras de urina coletadas de voluntários, não usuários de etanol, foram utilizadas como referência negativa.

- **Amostras de urina como referência positiva**

Amostras de urina como referência negativa adicionada de soluções-padrão de trabalho de EtG foram utilizadas como referência positiva, para estudos de extração e validação.

- **Amostras de urina certificadas**

Conjunto contendo 10 frascos de urina humana liofilizada na concentração de 6,5 mg/L, obtidos da *Medichem*, 41074 (Medidrug® ETG 1/04-B U-plus, 10 x 2,5 mL), para estudos de exatidão e precisão na concentração de 6,5 mg/L.

- **Amostras de urina de voluntários sob administração controlada de etanol**

Cinco voluntárias saudáveis, bebedoras sociais, com idade variando de 20 a 31 anos (25 ± 4 anos), massa corporal de 54 a 71 kg (59 ± 7 kg) altura de 1,63 a 1,73 m ($1,67 \pm 0,04$ m) se reuniram às 9:00 h da manhã, em um mesmo local, em jejum, para participar de um experimento controlado (Tabela 2). Todas assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para participarem do protocolo de pesquisa, previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, conforme modelo anexo. De acordo com relato das participantes, estavam em abstinência absoluta de etanol há, pelo menos, 5 dias antes do início do experimento e se comprometeram

em mantê-la até o final do protocolo. Um desjejum padronizado constituído de fruta, café, leite, pão, manteiga e queijo, foi servido para todas as voluntárias e, após 1,5 h, administrou-se etanol na forma de cerveja gelada de um mesmo lote (teor nominal de 5% v/v), na dose de 0,5 g de etanol por kg de massa corpórea (correspondendo ao intervalo de 687,5 a 887,5 mL). Essa dose foi ingerida em um período máximo de 30 minutos (das 10:30 às 11:00 h aproximadamente). Uma primeira amostra de urina foi coletada imediatamente antes da ingestão alcoólica. As amostras subsequentes foram coletadas por volta de 6, 8, 12, 24, 30, 35, 48 e 72 horas após a ingestão, com orientação para o esvaziamento completo da bexiga. Cada coleta foi realizada com o auxílio de um béquero e uma proveta de 500 mL. Após o volume ser medido e registrado, cerca de 20 mL de urina foi transferido para um recipiente de polietileno (determinação de etilglicuronídeo) e cerca de 1 mL para um frasco *eppendorf* (análise de creatinina); o remanescente da urina foi descartado. Além do volume urinário, a data e a hora de cada coleta também foram anotadas. Após a ingestão do álcool, as voluntárias foram liberadas e realizaram as próximas coletas individualmente, seguindo o protocolo. As amostras de urina foram armazenadas em freezer à -20°C, até o momento da análise. Para o transporte até o Laboratório, foram utilizadas embalagens de isopor, contendo “gelo” reutilizável, para conservar a temperatura. Foi realizada a quantificação do teor real do etanol na cerveja.

Tabela 2 – Dados antropométricos de voluntários sob administração controlada de etanol (0,5 g/kg) e correspondente volume de cerveja ingerido.

Voluntário Nº	Sexo	Idade (anos)	Massa corpórea (kg)	Altura (m)	Volume de cerveja ingerido (mL)
1	F	31	57	1,63	712,5
2	F	26	60	1,73	750,0
3	F	21	71	1,66	887,5
4	F	25	55	1,63	687,5
5	F	20	55	1,70	697,5
Média		25	59	1,67	
D.P.		4	7	0,04	

- **Amostras de urina de pacientes internados em clínica de recuperação**

Foram selecionados 14 pacientes que haviam feito uso de etanol nas últimas 24 horas, pela equipe de enfermagem do Centro de Tratamento de Dependência Química Vila Serena, localizado na Capital de São Paulo, durante a entrevista que normalmente é realizada no momento da internação. Os pacientes foram informados quanto ao procedimento de coleta e assinaram um consentimento pós-informação, para participarem do protocolo de pesquisa previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, conforme modelo anexo. Embora não fosse intencional, todos os 14 pacientes selecionados dentro destes critérios foram do sexo masculino. A idade desses voluntários variou de 20 a 53 anos (38 ± 9 anos), massa corporal de 60 a 95 kg (74 ± 10 kg - calculado para $n=13$, pois um deles não informou a idade) e altura de 1,62 a 1,84 m ($1,73 \pm 0,07$ m - calculado para $n=12$, pois dois deles não informaram a altura) (Tabela 3). Foi coletada uma primeira amostra de urina no momento da internação e a cada 24 horas, durante 5 dias, totalizando 6 coletas; houve orientação para o esvaziamento completo da bexiga. Cada coleta foi realizada com o auxílio de uma proveta de 500 mL e, após o volume ser medido e registrado, cerca de 20 mL de urina foi transferido para um recipiente de polietileno para análise do etilglicuronídeo e cerca de 1 mL para um frasco *ependorf* para posterior análise de creatinina; o remanescente da urina foi descartado. A data e a hora de cada coleta também foram anotadas. As amostras de urina foram armazenadas em freezer à -20°C , até o momento da análise. Para o transporte até o Laboratório, foram utilizadas embalagens de isopor, contendo “gelo” reutilizável para conservar a temperatura. Foram realizadas análises para verificar a presença de drogas de abuso na urina.

Tabela 3 – Dados antropométricos de pacientes internados em clínica de recuperação.

Paciente N°	Sexo	Idade (anos)	Massa corpórea (kg)	Altura (m)
1	M	39	85	1,73
2	M	51	95	1,68
3	M	34	85	1,79
4	M	41	63	1,84
5	M	41	NI	NI
6	M	39	73	1,72
8	M	23	68	1,78
9	M	20	75	1,63
10	M	53	68	NI
11	M	40	60	1,68
12	M	31	70	1,75
14	M	34	80	1,82
16	M	39	71	1,72
17	M	47	65	1,62
Média		38	74	1,73
D.P.		9	10	0,07

4.2. Métodos

4.2.1. Aplicação do questionário

Os 14 pacientes internados no Centro de Tratamento de Dependência Química Vila Serena que foram selecionados para participar do protocolo de estudo, responderam um questionário, conforme modelo anexo, com o intuito de verificar o padrão de consumo de etanol (tempo e frequência de uso e quantidade utilizada na última exposição).

4.2.2. Determinação de creatinina

A creatinina urinária foi determinada em todas as amostras pelo método Larsen (picrato alcalino) e realizadas no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

4.2.3. Determinação do teor real de etanol na cerveja

O teor real de etanol na cerveja foi determinado por cromatografia gasosa por *headspace*, de acordo com o método proposto por Correa & Pedroso, 1997.

4.2.4. Teste de triagem de drogas de abuso em amostras de urina

Foi realizado um teste de triagem por enzimaímunoensaio (ETS plus DADE Behring) com a finalidade de detectar a possível presença de drogas de abuso (cocaína, canabinóides, anfetamina, metanfetamina) nas amostras de urina dos 14 pacientes internados no Centro de Tratamento de Dependência Química Vila Serena.

4.2.5. Desenvolvimento de método para determinação de etilglicuronídeo na urina

Um método foi desenvolvido para determinação de EtG em amostras de urina, utilizando a técnica de extração em fase sólida e identificação por espectrometria de massa associada à cromatografia em fase gasosa (Figura 2).

4.2.5.1. Preparação da amostra

Uma alíquota de 40 μ L de solução padrão de trabalho de d_5 -EtG, correspondente a 4 μ g, foi adicionada a uma alíquota de 1 mL de urina previamente centrifugada. Após acidificação do meio para pH = 2 com HCl 3M e adição de 1 mL de acetonitrila, a amostra foi homogeneizada com auxílio de um vórtex.

Nos casos em que houve necessidade de diluir a amostra de urina, foi adotado o seguinte procedimento: em um tubo de ensaio, 100 μ L de urina previamente centrifugada foi diluída com 900 μ L de água ultrapura.

4.2.5.2. Extração

A amostra preparada conforme descrito em 4.2.5.1 foi extraída utilizando uma coluna em fase sólida SAX (500 mg / 3 ml) condicionada com 1 mL de metanol, 1 mL de água e 1 mL de acetonitrila. A coluna foi lavada com 1mL de n-hexano e seca por meio da aplicação de vácuo durante 5 minutos para remover qualquer líquido residual. O EtG foi eluído utilizando 1 mL de solução de amônia (25%) em metanol (1:10, v/v, pH 12) com um fluxo aproximado de 1 mL/minuto. A seguir, o eluato foi centrifugado a 11.000 rpm por 30 minutos a 4°C e evaporado até secar sob fluxo N_2 , intercalado com períodos de homogeneização por meio de vórtex e ultrassom.

Figura 2 – Esquema de extração em fase sólida do etilglicuronídeo.

4.2.5.3. Derivatização

O resíduo obtido foi derivatizado com 100 μL de BSTFA por 30 minutos a 90°C e uma alíquota de 2 μL foi injetado no GC-MS.

4.2.5.4. Condições cromatográficas

As seguintes condições foram selecionadas para análise:

- Injetor: temperatura: 270°C;
razão de divisão: *splitless*.
- Coluna: fluxo de hélio constante: 0.6 mL / minuto;
temperatura inicial do forno: 100°C por 1 minuto;
rampa de temperatura: 10°C por minuto;
temperatura final do forno: 270°C por 3 minutos.
- Interface temperatura: 270 °C.
- Gás de arraste: hélio.
- Detector: espectrômetro de massa (Modo de operação: fragmentação por Impacto de Elétrons e monitoramento seletivo de íons - SIM). Os seguintes íons foram selecionados: massas m/z 160, 261 e 405 para EtG-BSTFA e m/z 165, 266 e 410 para d_5 -EtG-BSTFA (derivados). Íons sublinhados foram usados para quantificação.

Figura 3 – Estrutura química de EtG e espectro de massa da fragmentação do derivado trimitilsilil.

4.2.6. Validação do método

Para realização do estudo de validação do método para quantificação de EtG em urina seguiu-se, em parte, a Resolução RDC n° 899/03 publicada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária / MS (BRASIL, 2003).

Para validação do método determinaram-se os seguintes parâmetros: limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão e exatidão intra-dia e inter-dias e recuperação.

4.2.6.1. Limite de Detecção

O limite de detecção (LD) foi estabelecido por meio da análise de EtG em diluições sucessivas de amostras de urina referência positiva até a menor concentração determinável com precisão aceitável, ou seja, com um coeficiente de variação não excedendo a 20%. Essa determinação foi realizada por meio de cinco replicatas segundo procedimento descrito no item 4.2.5.

O LD também pode ser definido como a menor concentração detectável com sinal três vezes maior do que o ruído da linha de base.

4.2.6.2. Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LQ) foi estabelecido por meio da análise de EtG em diluições sucessivas de amostras de urina referência positiva até a menor concentração quantificável com precisão aceitável; ou seja, com um coeficiente de variação abaixo de 10%. Essa determinação foi realizada por meio de cinco replicatas segundo procedimento descrito no item 4.2.5.

O LQ também pode ser definido como a menor concentração detectável com sinal cinco vezes maior que o ruído da linha de base.

4.2.6.3. Linearidade

A linearidade é a capacidade de um método analítico demonstrar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado.

O estudo de linearidade foi realizado pela análise de amostras de urina com 6 (seis) pontos em triplicata, submetidas ao método proposto, conforme descrito no item 4.2.5., nas seguintes concentrações: 0,2; 2,0; 4,0; 8,0; 20,0 e 100,0 mg/L.

O valor nominal das concentrações urinárias de EtG foi plotado em função da razão de área obtida para os picos de EtG e seu padrão interno deuterado, obtendo-se o coeficiente de correlação linear ($R^2 \geq 0,98$) e sua respectiva equação da reta $y = ax + b$.

4.2.6.4. Precisão intra-dia e inter-dias

A repetibilidade do método analítico foi avaliada em um mesmo dia (precisão intra-dia) e em dias diferentes (precisão inter-dias) conforme o procedimento analítico descrito no item 4.2.5. A precisão intra-dia foi avaliada por meio da análise de amostras de urina de referência negativa adicionadas de solução-padrão de EtG em três concentrações: alta, média e baixa (10 mg/L; 6,5 mg/L e 1,0 mg/L) em cinco replicatas ($n=5$); enquanto que, para a precisão inter-dias, as cinco replicatas de cada concentração foram avaliadas em três dias consecutivos ($n=15$).

A precisão foi expressa como o coeficiente de variação percentual (CV%), estabelecendo-se como aceitáveis valores inferiores a 15%.

$$CV \% = \frac{\text{desvio padrão}}{\text{média das replicatas}} \times 100$$

4.2.6.5. Exatidão

A exatidão do método foi determinada por meio da análise de amostra de urina certificada (concentração 6,5 mg/L) em 15 replicatas, conforme o procedimento analítico descrito no item 4.2.5., obtendo-se um valor médio de concentração. Determinou-se o erro sistemático para esta análise por meio da porcentagem de inexatidão, calculado de acordo com a equação:

$$\text{Inexatidão \%} = \frac{(\text{média das concentrações encontradas} - \text{concentração teórica})}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

4.2.6.6. Recuperação

O estudo de recuperação foi realizado para avaliar a quantidade de analito recuperado pelo procedimento analítico descrito em 4.2.5., comparando as respostas obtidas quando soluções-padrão de etilglicuronídeo são adicionadas em amostras de urina como referência negativa, antes e após a extração em fase sólida (no eluato). As análises foram realizadas em cinco replicatas nas concentrações de 10 mg/L e 1,0 mg/L de EtG.

Para calcular as proporções dos analitos recuperados, foram utilizadas as médias das razões entre as áreas obtidas, tomando-se como 100% (cem por cento) a média das áreas dos analitos adicionados após a extração.

A porcentagem de recuperação do EtG foi obtida aplicando-se a equação:

$$\text{Recuperação \%} = \frac{\text{média do valor obtido}}{\text{média do valor adicionado}} \times 100$$

4.2.7. Análise de EtG em amostras de urina

As amostras de urina provenientes de voluntários sob administração controlada de etanol e de pacientes internados em clínica de recuperação foram analisadas pelo método descrito em 4.2.5.

4.2.8. Proposta de modelo matemático e estatístico para as curvas de decaimento da concentração urinária de EtG

A eliminação do EtG segue um padrão exponencial, conforme proposto por Droenner *et al.*, 2002. Com base nessa premissa, é proposto um modelo matemático e estatístico, onde é possível calcular o $t_{1/2}\beta$ da concentração urinária de EtG e a janela de detecção teóricos (t_j). Para esta modelagem é utilizada a seguinte função exponencial:

$$C = C_0 e^{-\lambda t}$$

onde,

C é a concentração de EtG na urina, dentro da janela de detecção;

C_0 é a concentração inicial de EtG na urina;

$e \cong 2,72$;

λ é o fator de decaimento;

t é o tempo, expresso em horas decimais.

A partir desta equação, substituindo C por $C_0/2$, é possível obter a meia vida teórica do decaimento da concentração urinária ($t_{1/2}\beta$):

$$t_{1/2}\beta = (-\ln 1/2) / \lambda$$

Também é possível obter-se a janela de detecção teórica (t_j), pela substituição de C por C_L , que é a concentração definida como o limite de detecção de EtG no método analítico proposto:

$$t_j = (\ln C_0 - \ln C_L) / \lambda$$

Os parâmetros C_0 e λ são obtidos pelo método dos mínimos quadrados, linearizando a função proposta, a partir dos valores de $(\ln C \times t)$. É também apresentado o fator de correlação – r – como uma medida do ajuste dos dados à equação exponencial. Como a função é decrescente, os valores de r são negativos.

Resultados

5. RESULTADOS

5.1. Determinação do teor real de etanol na cerveja

O teor real de etanol na cerveja consumida pelos voluntários, determinado pelo método de Correa & Pedroso (1997) foi de 4,88%. O rótulo da cerveja indicava teor nominal de 5% v/v.

5.2. Otimização das condições cromatográficas

O perfil cromatográfico obtido da análise de uma amostra de urina adicionada de etilglicuronídeo (EtG) e de etilglicuronídeo pentadeuterado (d_5 -EtG; padrão interno) encontra-se ilustrado na Figura 4.

Figura 4 – Perfil cromatográfico obtido pela análise por GC-MS de uma amostra de urina adicionada de: (A) padrão de EtG na concentração de 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e (B) padrão interno, d_5 -EtG, na concentração de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

5.3. Resultados dos parâmetros da validação do método para determinação de etilglicuronídeo na urina

5.3.1. Limites de Detecção e Quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) obtidos para a determinação de etilglicuronídeo na urina e seus respectivos coeficientes de variação (CV%) foram os seguintes:

- LD: 0,1 mg/L (CV = 13,5%)
- LQ: 0,2 mg/L (CV = 7,9%)

5.3.2. Linearidade

O método validado mostrou-se linear no intervalo dinâmico considerado, de 0,2 – 100,0 mg/L, com um coeficiente de correlação linear calculado pela regressão linear dentro dos limites estabelecidos ($R^2 \geq 0,98$).

Figura 5 - Curva de calibração, equação da reta e coeficiente de correlação linear do etilglicuronídeo em urina.

5.3.3. Precisão intra-dia e inter-dias

Os estudos de precisão intra-dia e inter-dias analisadas para o EtG estão apresentadas na Tabela 4, expressos como o coeficiente de variação percentual (CV%).

Tabela 4 – Precisão intra-dia e inter-dias do método analítico na determinação de EtG urinário, expressas pelo coeficiente de variação percentual

Concentração nominal (mg/L)	Precisão (CV%)	
	<i>Intra-dia</i>	<i>Inter-dias</i>
1	13,8	9,5
6,5	9,6	7,2
10	8,2	11,7

5.3.4. Exatidão

A exatidão do método, representada pela inexatidão, foi determinada pela análise em 15 replicatas da amostra de urina certificada na concentração de 6,5 mg/L de EtG, obtendo-se um valor de 10,8%.

5.3.5. Recuperação

Os resultados obtidos no estudo de recuperação para a determinação de EtG em amostras de urina por meio da extração em fase sólida foi de 39% para a concentração de 1 mg/L e de 35% para a concentração de 10 mg/L.

5.4. Determinação de etilglicuronídeo e creatinina em amostras de urina de voluntários sob administração controlada de etanol

A Figura 6 ilustra o perfil cromatográfico da análise de amostras de urina de uma das voluntárias antes e após a ingestão de 0,5 g/kg de etanol na forma de cerveja. A análise da amostra de urina de um paciente também é ilustrada como comparação.

Figura 6 – Perfil cromatográfico obtido de uma amostra de urina de uma voluntária: (A) colhida no tempo zero e (B) 6 horas após a ingestão de 0,5 g/kg de etanol (EtG na concentração de 50,76 mg/L). Em (C) amostra de urina de um paciente (EtG na concentração de 17,76 mg/L, após diluição 1/10).

Os resultados obtidos na determinação do EtG e EtG/creatinina em amostras de urina das 5 voluntárias, imediatamente antes e 6, 8, 12, 24, 30, 35, 48 e 72 horas após a ingestão de cerveja em volume equivalente a 0,5 g/kg de etanol estão transcritos na Tabela 5.

Tabela 5 – Resultados obtidos das análises realizadas em amostras de urina de voluntárias após a administração de cerveja em volume equivalente a 0,5 g/kg de etanol.

Tempo (horas após ingestão etanol)	voluntária 1		voluntária 2		voluntária 3		voluntária 4		voluntária 5	
	EtG (mg/L)	EtG/ Crea (mg/g)	EtG (mg/L)	EtG/ Crea (mg/g)	EtG (mg/L)	EtG/ Crea (mg/g)	EtG (mg/L)	EtG/ Crea (mg/g)	EtG (mg/L)	EtG/ Crea (mg/g)
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	57,00	57,00	50,76	72,51	19,06	19,06	30,83	30,83	60,75	60,75
8	18,84	10,47	29,13	32,37	14,09	12,81	8,80	8,00	22,87	20,79
12	12,04	ND	10,24	10,24	9,24	8,40	4,12	3,75	7,59	6,90
24	1,80	2,57	3,15	6,30	5,24	7,48	2,14	1,95	3,83	5,47
30	1,13	1,03	1,69	1,30	4,63	4,21	0	0	1,90	1,73
35	0	0	0,73	1,83	1,40	0,61	ND	ND	0	0
48	ND	ND	0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
72	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND : não determinado

A Figura 7 ilustra o decaimento urinário individual da concentração de EtG e EtG/creatinina em função do tempo, após a administração de 0,5 g/kg de etanol na forma de cerveja pelas cinco voluntárias e a Figura 8 ilustra as curvas de concentração EtG/creatinina urinária de todas as participantes em conjunto.

Figura 7 – Perfil individual da concentração urinária de EtG e EtG/creatinina em função do tempo após ingestão de cerveja em volume equivalente a 0,5 g/kg de etanol pelas cinco voluntárias.

Figura 8 – Curvas de concentração urinária de EtG/creatinina em função do tempo, após ingestão de cerveja em volume equivalente a 0,5 g/kg por todas as cinco voluntárias participantes.

5.5. Determinação de etilglicuronídeo e creatinina em amostras de urina de pacientes internados em clínica de recuperação

A determinação da concentração de EtG e da relação EtG/creatinina urinárias para cada amostra de urina coletada dos 14 pacientes internados em clínica de recuperação, estão apresentados na **Tabela 6**.

5.5.1. Aplicação do questionário e teste de triagem de drogas

As informações obtidas pela aplicação do questionário aos 14 pacientes internados em clínica de recuperação estão sintetizadas na **Tabela 7**, de acordo com as resposta originais. Adicionalmente, na última coluna desta tabela, é apresentado o resultado do teste de triagem de drogas de abuso realizado, para confrontar com o relato do próprio paciente sobre o uso de drogas.

Tabela 6 - Resultados obtidos das análises realizadas em amostras de urina de pacientes internados.

PACIENTE nº	COLETAS											
	1ª coleta		2ª coleta		3ª coleta		4ª coleta		5ª coleta		6ª coleta	
	EtG mg/L	EtG/Crea mg/g	EtG mg/L	EtG/Crea mg/g	EtG mg/L	EtG/Crea mg/g	EtG mg/L	EtG/Crea mg/g	EtG mg/L	EtG/Crea mg/g	EtG mg/L	EtG/Crea mg/g
1	310,69*	167,04	14,76	12,73	1,14	2,33	0,35	0,10	1,46	0,46	0,86	0,85
2	29,13	18,44	7,01	14,60	2,52	4,07	NC		0	0		
3	17,76*	8,03	0,24	0,07	NC		0,41	0,12	0	0		
4	424,81*	301,28	136,50*	76,26	1,50	1,88	1,51	2,33	1,39	1,51	0,40	0,60
5	900,71*	726,38	18,39	11,57	6,77	2,10	1,30	0,57	2,08	0,64	1,42	2,46
6	20,23*	4,76	5,27	3,01	1,60	1,01	0,81	0,42	1,35	0,80		
8	12,87	32,18	11,95	4,63	2,53	1,25	2,73	0,48	1,34	0,58	0	0
9	58,16*	20,33	18,25	5,00	2,17	0,93	0,65	0,37	3,16	0,85	0,31	0,16
10	1059,23*	315,25	36,92	10,83	6,85	2,21	2,62	1,48	0,56	0,52	0	0
11	24,41	27,12	50,46	25,23	6,91	6,28	1,54	3,86	4,88	9,77	1,62	1,47
12	349,58*	158,90	5,73	14,32	1,97	0,85	0	0				
14	845,49*	1409,14	14,08	23,47	3,69	1,42	0	0				
16	1020,42*	566,90	2,25	5,61	2,17	0,78	0	0				
17	111,19	61,77	7,20	5,54	1,12	2,79	3,38	6,77	1,70	2,83	0	0

*medida após diluição 1/10

NC: não colhida

Tabela 7 – Informações obtidas pela aplicação do questionário aos 14 pacientes internados e resultados de teste de triagem de drogas.

Paciente nº	Tipo de bebida alcoólica/ quantidade	Freqüência de uso	Tempo de Exposição	Tipo de bebida/quantidade Última vez, antes da internação	Uso de outras drogas	Resultado Triagem Drogas
1	2 Cerveja, Vodka/ NE	Diária	1 ano	Vodka/ ½ garrafa	Não	(-)
2	5 Cerveja, 3 Pinga	Dia sim, dia não	1 ano	Cerveja, Pinga/NE	Não	(-)
3	1 Cerveja, 2 Vodka, Vinho, Uísque/NE	?	15 anos	1 garrafa cerveja, 2 doses Vodka	Maconha, efedrina	Maconha, Cocaína
4	Pinga até 1 litro	Diária	16 meses	Pinga, 1 litro	Não	(-)
5	Cerveja, Pinga Uísque, Vodka Conhaque/ NE	Diária	?	Cerveja, Pinga/NE	Cocaína	Cocaína
6	Cerveja, Conhaque/ NE	Diária	1 ano	Cerveja, Conhaque, ½ litro/ NE	Não	(-)
8	Licor/NE	Diária	9 anos	Cerveja, Vodka/NE	Maconha	Maconha, Cocaína
9	Cerveja, Vodka, Vinho, Conhaque/ NE	Diária	8 meses	Pinga, Vodka, 2 litros/ NE	Não	(-)
10	4 Cerveja, 6 Conhaque	NE	NE	5 Cerveja	Não	(-)
11	Cerveja, Pinga, Vodka, Vinho, Conhaque. 1 dose cada 2h	Diária	1 ano	4 doses Maria Mole, 1½ dose pinga, ½ cinzano, 2 copos cerveja	Não	(-)
12	4 garrafas Cerveja, 4 a 5 Vodka	Diária	2 anos	4 Cervejas, 5 Vodka	Não	(-)
14	Cerveja, Vinho Uísque, Vodka Conhaque/NE	Diária	12 anos	NE	Não	(-)
16	2 a 4 latas Cerveja, 2 a 4 doses São Francisco, Vodka/ NE	Diária	6 meses	4 latas Cervejas, 2 doses destilado São Francisco	Não	(-)
17	3 doses Pinga Cerveja/ NE	Diária	1 ano	2 doses Pinga	Não	(-)

NE: não especifica; (-): negativo

5.6. Aplicação do modelo matemático proposto

A Tabela 8 mostra os coeficientes λ , C_0 , e r , calculados a partir dos valores ($\ln C \times t$) para os pacientes internados. A Tabela 9 mostra os mesmos coeficientes, acrescidos dos valores calculados de $t_{1/2}\beta$ e t_j , com as respectivas médias e desvios padrões, apenas dos pacientes cujos valores de r foram menores do que -0,85.

Em relação aos voluntários, estes mesmos parâmetros foram levantados e registrados na Tabela 10. Adicionalmente, conforme mostra a Tabela 11, foram calculados estes coeficientes para a relação EtG/Crea, para os voluntários, assim como os valores de meia vida, com a respectiva média e desvio-padrão.

Tabela 8 – Valores dos parâmetros λ , C_0 e r para a curva de decaimento da concentração urinária de EtG por paciente, conforme a equação $C = C_0 e^{-\lambda t}$

Paciente	λ	C_0	r
1	0,0447	33,89	-0,7528
2	0,0601	20,96	-0,9427
3	0,0273	3,40	-0,5757
4	0,0574	149,11	-0,8873
5	0,0330	141,96	-0,8687
6	0,0270	10,84	-0,8466
8	0,0273	14,03	-0,9307
9	0,0411	33,32	-0,8786
10	0,0718	623,29	-0,9864
11	0,0279	31,26	-0,8380
12	0,1208	200,97	-0,9406
14	0,0790	252,14	-0,8529
16	0,1263	352,44	-0,8616
17	0,0399	28,93	-0,7598

Tabela 9 - Valores dos parâmetros λ , C_0 , r , tempo de meia vida ($t_{1/2}\beta$) e janela de detecção (t_j) para a curva de decaimento da concentração urinária de EtG de cada paciente, para coeficientes de correlação $r < -0,85$

Paciente	λ	C_0 – mg/L	r	$t_{1/2}\beta$ – horas decimais	t_j – horas decimais (dias – horas)
2	0,0601	20,96	-0,9427	11,53	77,41 (3 d 5 h)
4	0,0574	149,11	-0,8873	12,10	115,23 (4 d 19 h)
5	0,0330	141,96	-0,8687	21,01	198,94 (8 d 7 h)
8	0,0273	14,03	-0,9307	25,39	155,83 (6 d 12 h)
9	0,0411	33,32	-0,8786	16,87	124,47 (5 d 5 h)
10	0,0718	623,29	-0,9864	9,65	112,04 (4 d 16 h)
12	0,1208	200,97	-0,9406	5,74	57,22 (2 d 9 h)
14	0,0790	252,14	-0,8529	8,77	90,37 (3 d 18 h)
16	0,1263	352,44	-0,8616	5,49	59,18 (2 d 11 h)
$t_{1/2}\beta$ médio = 12,95 $\pm$ 6,84 h – t_j médio* = 110,08 $\pm$ 46,19 h					

*Equivale aprox. a 4 dias e 14 h

Tabela 10 - Valores dos parâmetros λ , C_0 e r para a curva de decaimento da concentração urinária de EtG para cada voluntário, conforme a equação $C = C_0 e^{-\lambda t}$. Valores calculados de $t_{1/2}\beta$ e t_j .

Voluntário	λ	C_0	r	$t_{1/2}$ horas decimais	t_j – horas decimais (dias – horas)
1	0,1497	85,39	-0,9701	4,63	40,46 (1d 16 h)
2	0,1338	78,50	-0,9866	5,18	44,64 (1d 20 h)
3	0,0734	27,09	-0,9516	9,44	66,88 (2d 18 h)
4	0,1232	32,64	-0,8674	5,62	41,36 (1d 17 h)
5	0,1252	90,49	-0,9378	5,54	48,84 (2d h)
$t_{1/2}\beta$ médio = 6,08 $\pm$ 1,92 h – t_j médio = 48,44 $\pm$ 10,82 h (2 d 27 min)					
$t_{1/2}\beta$ médio* = 5,24 $\pm$ 0,45 h – t_j médio* = 43,83 $\pm$ 3,80 h (1 d 20 h)					

*Médias excluindo voluntária 3.

Tabela 11 – Valores dos parâmetros λ , C_0 e r para a curva de decaimento da relação EtG/crea (urinários) para cada voluntário, conforme a equação $C = C_0 e^{-\lambda t}$. Valores de $t_{1/2}\beta$ e t_j

Voluntário	λ	C_0	r	$t_{1/2}$ – horas decimais	t_j – horas decimais (dias – horas)
1	0,1497	65,21	-0,9432	5,08	38,66
2	0,1338	84,50	-0,9468	5,69	45,19
3	0,0734	31,48	-0,8772	7,89	68,92
4	0,1232	31,59	-0,8585	5,48	41,09
5	0,1252	82,00	-0,9067	5,83	48,05
$t_{1/2}$ médio = 6,00 $\pm$ 1,10 h – t_j médio = 48,38 $\pm$ 12,04 h (2 d 23 min)					
$t_{1/2}$ médio* = 5,52 $\pm$ 0,33 h – t_j médio* = 43,25 h (1 h 19 h)					

* Médias excluindo voluntária 3.

Discussão

6. DISCUSSÃO

A medida mais comumente utilizada para avaliar uma exposição recente ao etanol e que oferece muitas vantagens, é a determinação direta deste analito: ele é o próprio agente de intoxicação (melhor do que empregar uma medida indireta); os efeitos patológicos estão relacionados à concentração tecidual; os métodos analíticos existentes são pouco onerosos e amplamente distribuídos nos laboratórios em geral e vários fluidos podem servir como amostra, tais como sangue, saliva, urina, suor e ar expirado, devido à rápida e uniforme distribuição do etanol na água corporal. O conhecimento da concentração etanólica é fundamental para certas aplicações médicas e forenses, tal como a alcoolemia na detenção de motorista com suspeita de estar alcoolizado.

No entanto, a limitação da medida direta do etanol para avaliação da exposição é sua meia vida biológica curta; são necessárias análises freqüentes para determinar a quantidade e o tempo decorrido após uma ou várias exposições repetidas. Por esse motivo, a análise de etanol na urina, sangue ou ar expirado não se configura, por exemplo, como um marcador sensível de abstinência no controle da farmacodependência no ambiente ocupacional. Caso fosse empregado, a programação do horário de coleta de urina de funcionários de uma empresa seria dificultada. Correa (1997) sugeriu que o período mais adequado seria de 3 horas após o início ou reinício da jornada de trabalho, enquanto que Biasotti & Valentine (1985), sugerem a coleta de uma segunda amostra de urina após esvaziamento completo da bexiga, em um intervalo de 20 a 60 minutos da primeira coleta. De qualquer maneira, são medidas que desestimulam as empresas a incluir o etanol, com as outras drogas de abuso, no rol de substâncias a serem

analisadas nos programas de prevenção e controle do uso de drogas no ambiente de trabalho.

De igual forma, a análise direta do etanol também é inadequada para monitorar a abstinência durante o tratamento de pacientes dependentes de etanol ou o consumo após uma única exposição em baixa dose.

Dentre os marcadores propostos para avaliar a exposição recente ao etanol, estão os FAEEs, a relação urinária 5-HTOL/5-HIAA, o EtG e o EtS. Estes dois últimos preenchem essas necessidades, pois podem ser detectados em um período de tempo maior do que o etanol, com maior sensibilidade. A pesquisa de Dahl *et al.*, (2002), ilustra muito bem a diferença de cinética relacionada ao EtG. Bebedores sociais participaram de um experimento controlado consumindo 0,5 g/kg de etanol, na forma de cerveja. A concentração urinária de etanol alcançou valor máximo 1,5 h após ingestão, sendo detectável até 6,0 h após. Já o EtG atingiu uma concentração urinária *plateau* entre 2 a 6 horas, com valor máximo em 4 horas, sendo detectável até 22,5 – 31,5 h após. Ou seja, o EtG pôde ser detectado na urina por um período de cerca de 15 a 25 horas a mais do que o etanol.

A janela de detecção de EtG parece variar de acordo com a intensidade de consumo de etanol pois, considerando consumidores de altas doses, o EtG pôde ser detectado em até 60 horas após a hospitalização de três pacientes que se mantiveram em abstenção (WURST *et al.*, 2000). Esses resultados estão de acordo com outro estudo anterior obtido por esse mesmo grupo de pesquisadores, que encontraram um tempo de detecção de EtG de até 75 horas em amostras de urina de 23 pacientes em abstenção de etanol, conforme relatado por Wurst *et al.*, (2003). Entretanto, esses achados preliminares não têm sido confirmados ou examinados em detalhe.

Com relação à determinação de EtG na urina, por ser um composto muito hidrofílico, a técnica de eleição é a cromatografia líquida associada à espectrometria de massas (LC-MS) ou *tandem* (LC-MS/MS). É rápida,

sensível e não necessita da fase de derivação. No caso do EtS, o método de escolha é o LC-MS/MS (DRESEN; WEINMANN; WURST, 2004). No entanto, a cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas pode ser empregada como uma alternativa menos onerosa somente para a determinação de EtG urinário.

Antes de serem analisadas por métodos cromatográficos, amostras biológicas requerem um pré-tratamento com a finalidade de melhorar a seletividade, detecção, exatidão e precisão da análise. Dentre as várias etapas envolvidas no preparo da amostra, destacam-se, entre outras: extração (remoção do analito da matriz), *clean-up* (isolamento do analito, para evitar a interferência de contaminantes da matriz) e concentração do analito. Até recentemente, a extração líquido-líquido era muito usada para essa finalidade; atualmente, a extração em fase sólida tem sido cada vez mais empregada, por apresentar as seguintes características: menor tempo de extração, menor volume total de solvente orgânico utilizado, melhor recuperação e precisão, além de ser facilmente automatizada, permitindo a extração de várias amostras simultaneamente (LANÇAS, 2004; WALKER & MILLS, 2002).

Frente a essas considerações, o protocolo do presente trabalho pretendeu preencher a lacuna da falta de um estudo dirigido relativo à variação na janela de detecção de EtG conforme o grau de exposição ao etanol. Foi desenvolvida uma metodologia utilizando a extração em fase sólida pelas vantagens apresentadas em relação à extração líquido-líquido e a quantificação por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas, pelo fato de que muitos laboratórios ainda não dispõem de LC-MS ou LC-MS/MS, principalmente entre nós.

A extração de um composto polar, não volátil e estável em meio aquoso, com a possibilidade de co-eluição de interferentes na urina, junto com a necessidade da derivatização do composto, dificultam a quantificação de EtG por GC-MS.

A derivatização consiste na modificação das funcionalidades químicas dos analitos para melhorar a separação cromatográfica. Como o EtG é um composto contendo grupos funcionais com hidrogênios ativos como carboxila e hidroxila, o emprego de um reagente derivatizante é fundamental para aumentar a volatilidade, diminuir a polaridade da molécula e o tempo de corrida e, como consequência, melhorar a detecção, seletividade e eficiência cromatográfica.

A sililação é o procedimento de derivação mais amplamente usado para as análises de amostras por GC. Reagentes de sililação, como BSTFA, são populares porque são fáceis de manipular, reagem eficientemente com ácidos orgânicos e prontamente substituem o hidrogênio ativo pelo grupo trimetilsilil $[\text{Si}(\text{CH}_3)_3]$. A adição de trimetilclorosilano (TMCS) catalisa a reação de grupos funcionais escondidos e outras funções, tais como hidroxilas secundárias e aminas, que têm uma reatividade diminuída. Os derivados silil são muito voláteis, de baixa polaridade e termicamente estáveis, resultando em uma melhor separação cromatográfica.

Reagentes de acilação oferecem os mesmos tipos de vantagens disponíveis pelos agentes de silanização, com a diferença de que atingem mais os compostos altamente polares e multifuncionais, tais como carboidratos e aminoácidos. Geralmente estes reagentes estão disponíveis como anidridos ácidos, acil derivados ou acil haletos. Anidridos ácidos $[\text{R}(\text{C}=\text{O})-\text{O}-(\text{C}=\text{O})\text{R}]$ são normalmente fluorinados como anidrido trifluoroacético (TFAA; $\text{R}=\text{CF}_3$), anidrido pentafluoropropiônico (PFPA; $\text{R}=\text{C}_2\text{F}_5$) e anidrido heptafluorobutírico (TFAA; $\text{R}=\text{C}_3\text{F}_7$). Reagem prontamente com álcoois, aminas e fenóis. Como introduzem grupos eletronegativos, são usados principalmente com detector de captura de elétrons. Sua natureza acídica requer que qualquer excesso de produtos seja removido antes da análise, para prevenir deterioração da coluna. O pentafluoropropanol é usado em combinação com PFPA para derivar a maioria dos grupos funcionais, especialmente compostos bioorgânicos polifuncionais.

No presente trabalho, foram testados os seguintes agentes de derivação: a) mistura PFPA / PFPOH (100 μ l / 70 μ l) por 30 min a 90°C; b) PFPA (100 μ l) por 30 minutos à temperatura ambiente e c) BSTFA:TCMS (90:10) (100 μ l) por 30 minutos à 90°C. A derivação com a mistura PFPA / PFPOH não foi efetiva, pois não apresentou resposta cromatográfica. Muito provavelmente, o duplo bloqueio da hidroxila e da carboxila com esses agentes dificultam a reação de derivação. A derivação com BSTFA forneceu cromatogramas com maior abundância quando comparado com a derivação com PFPA e foram identificados três íons para identificação dos derivados silanizados, ao passo que foram identificados somente dois íons para identificação dos derivados pentafluoropropiônicos e não três íons, como conseguiu Jurado *et al.*,(2004). Frente a esses resultados, foi selecionado o BSTFA como agente de derivação.

O emprego de uma coluna em fase sólida pode ser útil na extração de EtG, considerando que suas características físico-químicas não colaboram para uma extração líquido-líquido. É uma pequena coluna aberta, denominada cartucho de extração, recheada com uma fase sólida, constituída por sílicas modificadas. Essas sílicas em seus grupos silanóis apresentam substituintes que podem interagir com o analito por intercâmbio catiônico, aniônico ou devido a um determinado grau de hidrofobicidade, permitindo assim a separação de analitos de natureza ácida, básica e neutra. A escolha da fase sólida adequada deve ser guiada em função da natureza do analito e da matriz onde se encontra, levando-se em conta os principais modos de separação como: adsorção, partição (fase normal e fase reversa), troca iônica e exclusão por tamanho. Para o isolamento de compostos de caráter ácido presente em soluções aquosas, como é o caso de EtG na urina, emprega-se a troca iônica. Compostos ácidos são retidos por trocadores fortes de ânions (SAX – *strong anion exchanger*) que possuem aminas quaternárias [$\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$] ligadas à superfície da sílica por meio de uma cadeia alquílica curta (propil). Trocadores mais fracos têm aminas primárias, secundárias ou grupos aminopropil e podem ser utilizados

quando o analito se liga tão fortemente à fase, que sua eluição é prejudicada.

Janda & Alt (2001) desenvolveram um método para a determinação de EtG na urina, propondo uma extração em fase sólida, mediante o emprego de um trocador aniônico com grupo aminopropil e utilizando cartuchos de 1 g / 6 mL. Posteriormente, essa mesma fase sólida foi utilizada como um processo de *clean-up* na determinação de EtG em cabelo por LC-MS/MS (JANDA *et al.*, 2002), por GC-MS (YEGLES *et al.*, 2004), em cartuchos de 1 g / 6 mL e por LC-MS (KLYS *et al.*, 2005) em cartuchos de 200 mg. Recentemente, Kaushik *et al.*, (2006), também empregaram essa fase para remover interferentes na urina antes da análise por HPLC com detecção eletroquímica. Selecionaram cartuchos de 500 mg / 3 mL para melhorar a recuperação. Goll *et al.*, (2002), extraíram amostras de urina usando um trocador forte de ânions (SAX) antes da análise por LC-MS/MS. Não é relatado o tamanho do cartucho.

Com o objetivo de estabelecer a resina e o tamanho de cartucho mais adequados para o procedimento analítico a ser adotado neste trabalho, foram realizados testes utilizando-se as duas fases e dois tamanhos de cartuchos (1 g / 6 mL e 500 mg / 3 mL). Optou-se pela resina SAX, em cartuchos de 500 mg / 3 mL, pela maior eficiência de extração, recuperação, além de fornecer eluatos mais limpos. De fato, trocadores fracamente aniônicos apresentam menor retenção pelo composto ácido, quando comparados com trocadores fortes (LANÇAS, 2004; WALKER & MILLS, 2002).

A extração em fase sólida (SPE) é uma técnica de separação líquido-sólido, usada para o isolamento, purificação e pré-concentração de compostos orgânicos presentes em amostras biológicas. Ocorre a retenção sobre um sorvente sólido dos compostos desejados, que se encontram dissolvidos em uma amostra líquida, enquanto que os interferentes da matriz são eliminados. Está organizada em várias etapas: a) condicionamento da coluna, utilizando o mesmo solvente da matriz, para permitir a interação

entre o analito e a fase estacionária; b) retenção: as interações entre as moléculas da amostra e a fase estacionária determinam a retenção no sorvente. Os componentes de interesse ficaram retidos enquanto que a matriz e os interferentes são eliminados; c) lavagem: esta etapa tem o intuito de eliminar as interferências que possam ter ficado no sorvente, mediante o uso de solventes adequados; d) eluição: nesta etapa, o analito é liberado do sorvente. A escolha do solvente de eluição está determinada pelas interações entre analito e sorvente e pelo tipo de sorvente.

Para o condicionamento, retenção da amostra e lavagem da coluna a ser adotado no presente trabalho, tomou-se, inicialmente como referência, o procedimento preconizado por Janda & Alt, (2001), com algumas modificações. Como utilizou-se um cartucho menor, o condicionamento e a lavagem foram realizados com um volume menor de solventes (1 mL de metanol, 1 mL de água e 1 mL de acetonitrila para o condicionamento e 1 mL de n-hexano para a lavagem, ao invés de 3 mL de cada solvente, conforme JANDA & ALT, 2001). Com relação ao volume total da amostra, também foi diminuído, sendo utilizado 1 mL de urina diluída com 1 mL de acetonitrila. Nessa etapa, foi adicionado o padrão interno deuterado. Há a necessidade de se estabelecer um pH 2, para protonar o glicuronídeo e permitir que ele fique retido na resina durante a passagem da amostra. Portanto, adicionou-se HCl 3M até alcançar pH 2 após a diluição da urina com acetonitrila, conforme Goll *et al.*, (2002). Após a fase da lavagem da coluna, é necessário fazer um vácuo para remover qualquer líquido residual.

A utilização do pH correto no solvente de eluição é um fator preponderante na separação envolvendo troca iônica. O método preconizado por Janda & Alt, (2001) utiliza 1,8 mL de água contendo 2% de solução de amônia (25%). Embora esses pesquisadores não informem o pH, a medida do pH dessa solução foi realizada, resultando em pH 10. Yegles *et al.*, (2004), modificaram apenas o volume de água para 2,0 mL; Klys *et al.*, (2005) e Kaushik *et al.*, (2006), trocaram a água por metanol, resultando em pH semelhante. Goll *et al.*, (2002), utilizaram uma solução de amônia 25%

em metanol, em pH 12. Para testar a influência do pH, foram eluídas alíquotas de água ultra pura adicionadas de padrão e solução de amônia 25%, acertadas para pH 10 e pH 12. Obteve-se resposta cromatográfica apenas com a solução em pH 12, revelando que este pH é fundamental para que haja a eluição do analito. Sendo assim, utilizou-se como solvente de eluição, uma solução de amônia 25% em metanol (1:10, v/v, pH 12), para facilitar a evaporação do eluato, conforme já proposto por Goll *et al.*, (2002).

A dificuldade encontrada na eluição de amostras de urina como referência negativa adicionadas de padrão de EtG e submetidas ao procedimento analítico descrito, foi a formação de um precipitado esbranquiçado, de consistência de um gel. É provável que parte da fase sólida seja capaz de se dissolver no eluato (LANÇAS, 2004), o que dificulta sua evaporação. Para contornar essa situação, o eluato foi centrifugado a 11.000 rpm por 30 minutos a 4°C antes da evaporação, obtendo-se melhores resultados; Weinmann *et al.*, (2004) analisando EtG em amostras de urina por LC-MS-MS e fizeram um tratamento prévio da amostra, diluindo-a com metanol e centrifugando a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C.

Estabelecidas as condições de extração, pôde-se iniciar os estudos de validação do método. Apesar da recuperação do método ter sido baixa, apresentou uma alta linearidade no intervalo dinâmico estabelecido (0,2-100,0 mg/L de EtG) com coeficiente de correlação linear maior que 0,99. Kaushik, LaCourse e Levine (2006) também obtiveram uma recuperação baixa, de aproximadamente $50 \pm 2\%$, no desenvolvimento de um método usando cromatografia líquida em fase reversa com detecção eletroquímica pulsada (PED) para a determinação de EtG na urina empregando extração em fase sólida com aminopropil.

Os resultados de precisão intra-ensaio e interensaio foram adequados, pois foram obtidos valores de coeficientes de variação menores que 10% para a precisão inter-dias e menor que 20% para intra-dia. O estudo, realizado com amostras certificadas, mostrou que o método é exato. Além do mais, os limites de quantificação e detecção de EtG foram sensíveis o

suficiente para esta determinação. Janda & Alt, (2001) utilizando extração em fase sólida em amostras de urina e quantificação por GC-MS, relataram LQ de 0,56 mg/L e LD de 0,168 mg/L.

Os estudos de estabilidade não foram desenvolvidos, uma vez que as amostras foram mantidas congeladas e analisadas em menos de 4 semanas. De acordo com Schloegl *et al.*, (2006a), amostras de urina estocadas a 4°C mostraram ser estáveis por 5 semanas, permanecendo as concentrações de EtG relativamente constantes.

Conforme protocolo proposto neste trabalho, foram selecionadas cinco voluntárias saudáveis, bebedoras sociais, para serem submetidas à administração controlada de etanol. A intenção foi formar um grupo homogêneo e a escolha do sexo feminino foi devida à maior disponibilidade, maior adesão e, proporcionalmente, pela menor dose de etanol a ser administrada, visto que as mulheres apresentam concentrações máximas alcoólicas mais altas do que os homens.

Foi realizada a medida de creatinina para compensar a diluição urinária. Dahl *et al.*, (2002) e Goll *et al.*, (2002) verificaram que o perfil de eliminação de EtG é altamente influenciado pela ingestão de grandes volumes de água; porém, a relação EtG/creatinina permanece constante. De acordo com Needleman, Porvaznik e Ander, (1992) os valores de creatinina obtidos de coletas únicas, mostram forte coincidência com os valores geralmente informados para um *pool* de urina de 24 horas; portanto, são úteis para prever uma possível adulteração da urina, com o objetivo de evitar a detecção de drogas de abuso.

De acordo com o relato das voluntárias, todas estavam em abstinência de etanol há, pelo menos, 5 dias antes do início do experimento. Este fato pôde ser comprovado pelo resultado negativo para o EtG de todas as amostras de urina coletadas imediatamente antes da ingestão de etanol (Tabela 5). As curvas de eliminação urinária de EtG/Crea (Figura 8) ilustram um perfil homogêneo, com algumas variações. A concentração máxima

ocorreu após 6 horas ($48,03 \pm 22,23$ mg/L de EtG/Crea; variação de 19,06 a 72,51); em seguida houve um decaimento exponencial, comprovado pela aplicação do modelo matemático. Após 24 horas, foi possível quantificar o EtG em todas as amostras das voluntárias e, após 48 horas, em nenhuma; portanto, a janela de detecção variou de 24 a 35 horas. Estes dados estão de acordo com aqueles encontrados por Dahl *et al.*, (2002).

Foram selecionados 14 pacientes do Centro de Dependência Vila Serena, usuários crônicos de etanol, internados para tratamento. Ao contrário dos voluntários, estes pacientes mostraram valores de creatinina bastante elevados em várias coletas de urina, atingindo até 4,25 g/L, como foi o caso da primeira coleta do paciente 6, o que acarretou uma diferença grande entre os valores de EtG e EtG/creatinina (Tabela 6). Provavelmente, a função renal desses indivíduos está prejudicada, devido ao uso de etanol, medicamentos e outras drogas.

A primeira coleta foi realizada em até 24 horas após o último uso, de acordo com o relato do paciente. As coletas subseqüentes foram realizadas em intervalos de 24 horas, aproximadamente. Das 14 amostras, 10 tiveram que ser diluídas, em um fator 1/10, para a determinação de EtG na primeira coleta, com valores variando de 12,87 a 1059,23 mg/L (4,76 a 1409,14 mg/L para EtG/Creatinina).

Os resultados apresentados na Tabela 6 sugerem que, muito provavelmente, alguns pacientes fizeram uso de etanol, uma vez que a concentração urinária de EtG decai e, em seguida, aumenta ou estabiliza e depois volta a decair e ainda é detectável na 6ª coleta (teoricamente, em torno de 144 horas após a última ingestão). Isto é possível pelo fato de que o regime de internação dos pacientes, na clínica de recuperação, é aberto. Portanto, a avaliação da janela de detecção ficou prejudicada. Por outro lado, este método mostrou-se útil para monitorar a abstinência durante o tratamento.

Nos demais pacientes em que, aparentemente, não houve exposição ao etanol, o EtG pôde ser detectado pelo menos até a 3^a coleta, correspondendo a uma janela de detecção aproximadamente de 72 horas, como é o caso dos pacientes 12, 14 e 16. No caso do paciente 10, o EtG pôde ser detectado até a 5^a coleta, o que corresponde a uma janela de detecção da ordem de 120 horas. Estes resultados estão de acordo com aqueles encontrados por Wurst *et al.*, (2000, 2003).

Com relação ao padrão de consumo de etanol relatado pelos próprios pacientes (Tabela 7) parece não haver correlação entre a intensidade de uso com a janela de detecção. É o caso do paciente 14 com relato de 12 anos de uso diário de etanol comparado com o paciente 16, com 6 meses; ambos apresentaram a mesma janela de detecção. De qualquer forma, após a abstenção de etanol, é nítida a diferença de perfil de eliminação urinária entre os voluntários e os pacientes internados, conforme demonstra os resultados da aplicação do modelo matemático.

Interessante notar que o relato do próprio paciente sobre o uso de drogas coincide com o resultado obtido pelo teste de triagem de drogas, revelando uma confiabilidade no relato (Tabela 7).

A aplicação do modelo matemático corrobora as possíveis recaídas dos pacientes, pelo não ajuste dos valores de EtG a um decaimento exponencial, em diversos casos. Também foi constatada uma grande variabilidade nos valores de meia-vida da concentração urinária de EtG e dos valores da janela de detecção teóricos. Esses mesmos parâmetros, calculados para as voluntárias, apresentaram baixa variabilidade.

Também pôde ser constatado, pelo modelo, que a janela de detecção entre usuários crônicos é menor que entre as voluntárias, apesar da grande variabilidade já comentada.

Alguns fatores podem levar a níveis alterados de EtG, entre eles as interações com outros xenobióticos ou compostos endógenos, meio

ambiental ou polimorfismo genético apresentado pelas enzimas UGTs, responsáveis diretas pela taxa de formação de EtG.

Um estudo feito por Foti & Fisher, (2005) desenvolvido com microsomas de fígado humano, o etanol foi incubado em uma variedade de isoformas recombinantes de UGT, para verificar qual isoforma seria responsável pela adição de ácido glicurônico ao etanol. Os resultados mostraram que todas as isoformas formam EtG, mas a isoforma UGT1A1 e UGT2B7 são as mais importantes na glicuronização do etanol.

O etanol pode atuar como um indutor da UGT1A1 hepática em humanos e ratos (KARDOM *et al.*, 2000), sugerindo que esta isoforma pode estar aumentada nos pacientes dependentes de etanol crônicos.

Estudos posteriores devem ser delineados no sentido de identificar outros parâmetros que podem influenciar na janela de detecção de etilglicuronídeo após abstenção do etanol.

Conclusões

7. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que:

- O emprego da extração em fase sólida e cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas foram eficientes para a determinação de etilglicuronídeo em amostras de urina;
- O método validado apresentou um alto coeficiente de correlação linear, precisão, exatidão e sensibilidade suficientes para determinar o etilglicuronídeo em amostras de urina;
- O perfil da eliminação urinária de etilglicuronídeo apresentou um decaimento semelhante entre as voluntárias sob administração controlada de 0,5 g/kg de etanol;
- A janela de detecção de etilglicuronídeo em amostras de urina de voluntárias que participaram do experimento controlado variou de 24 a 35 horas;
- Os resultados de alguns dos pacientes internados não foram conclusivos pela provável ingestão de etanol durante o tratamento de desintoxicação;
- Nos casos em que a concentração urinária de etilglicuronídeo foi decaindo no decorrer do tempo, a janela de detecção variou de 72 a 120 horas;
- Pela aplicação do modelo matemático, a janela de detecção dos pacientes internados que provavelmente se mantiveram em

abstenção (110 ± 46 h) foi maior em comparação com o grupo dos voluntários (48 ± 11 h);

- O método mostrou ser útil para monitorar a abstinência durante o tratamento de pacientes alcoólicos e o consumo após uma única exposição em baixa dose.

Referências bibliográficas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

AHMED, F.E. Toxicological effects of ethanol on human health. **Critical Reviews in Toxicology**, v.25, p.347-367, 1995.

ALT, A.; JANDA, I.; SEIDL, S.; WURST, F.M. Determination of ethyl glucuronide in hair samples. **Alcohol and Alcoholism**, v.35, p.313-314, 2000.

APTE, M.V.; WILSON, J.S. Alcohol – induced pancreatic injury. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**. v.17, p.593-612, 2003.

ARADOTTIR, S.; MOLLER, K.; ALLING, C. Phosphatidylethanol formation and degradation in human and rat blood. **Alcohol and Alcoholism**, v.39, p.8-13, 2004.

BERGSTROM, J.; HELANDER, A.; JONES, A.W. Ethyl glucuronide concentrations in two successive urinary voids from drinking drivers: relationship to creatinine content and blood and urine ethanol concentrations. **Forensic Science International**, v.23, p.86-94, 2003.

BIASOTTI, A.A.; VALENTINE, T.E. Blood alcohol concentration determined from urine samples as a practical equivalent or alternative to blood and breath alcohol test. **Journal of Forensic Sciences**, v.30, p.194-207, 1995.

BORGUES, G.; CHERPITEL, CH.; OROZCO, R.; BOND, J.; YE, Y.; MACDONALD, S.; REHM, J.; POZNYAK, V. Multicentre study of acute alcohol use and non-fatal injuries: data from the WHO collaborative study on alcohol and injuries. **Bulletin of the World Health Organization**; 84; p. 453-460; 2006.

BORUCKI, K.; SCHREINER, R.; DIERKES, J.; JACHAU, K.; KRAUSE, D.; WESTPHAL, S.; WURST, F.M.; LULEY, C.; SCHMIDT-GAYK, H. Detection of recent ethanol intake with new markers: comparison of fatty acid ethyl esters in serum and of ethyl glucuronide and the ratio of 5-

* De acordo com a NBR6023/2000, preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT)

- hydroxytryptophol to 5-hydroxyindole acetic acid in urine. **Alcoholism, Clinical and Experimental Research**, v.29, p.781-787, 2005.
- BOSTROM, H.; VESTERMARK, A. Studies on ester sulfates. VII. On the excretion of sulphate conjugates of primary aliphatic alcohols in the urine of rats. **Acta Physiologica Scandinavica**, v.48, p.88-94, 1960.
- BRADY, K.T.; SONNE, S.C. The role of stress in alcohol use, alcoholism treatment, and relapse. **Alcohol Research & Health: the journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism**, v.23, p.263–271, 1999.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Medicamentos. Legislação. Resolução-RE nº899, de 29 de maio de 2003.** Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word> Acesso em: 01 mar 2006.
- CAMI, J.; FARRE, M.; GONZALEZ, M.L.; SEGURA, J.; de la TORRE, R. Cocaine metabolism in humans after use of alcohol. **Clinical and Research Implications. Recent Dev Alcohol**, v.14, p.437-455, 1998.
- CAMPANA, A.A.M. Álcool e empresas. In: RAMOS, S.P.; BERTOLETE, J.M., ed. **Alcoolismo hoje**. 3.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. p.223-240.
- CARLINI, E.A.; GALDUROZ, J.C.F.; NOTO, A.R.; NAPPO, S.A.; BARBOSA, M.T.S.; FARIAS, A.M.L. **Primeiro levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 107 maiores cidades do país: 2001.** São Paulo: CEBRID, UNIFESP, 2002. 380p.
- CARLINI, E.A.; NOTO, A.R. Internações hospitalares provocadas por drogas: análise de sete anos consecutivos (1987-1993). **Revista ABP/APAL**, v.17, p.107-114, 1995.
- CONIGRAVE, K.M.; DAVIES, P.; HABER, P.; WHITFIELD, J.B. Traditional markers of excessive alcohol use. **Addiction**, v.98, suppl.2, p.31-43, 2003.
- CORREA, C.L.; PEDROSO, R.C.P. Headspace gas chromatography with capillary column for urine alcohol determination. **Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications**, v.704, p.365-368, 1997.
- CORREA, C.L.; FERREIRA, M.G.; LEMONICA, I.P. Consumo de álcool e gravidez: riscos decorrentes desta associação. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v.13, p.5-10, 2000.

- DAHL, H.; STEPHANSON, N.; BECK, O.; HELANDER, A. Comparison of urinary excretion characteristics of ethanol and ethyl glucuronide. **Journal of Analytical Toxicology**, v.26, p.201-204, 2002.
- DOYLE, K.M.; CLUETTE-BROWN J.E.; DUBE, D.M.; BERNHARDT, T.G.; MORSE, C.R.; LAPOSATA, M. Fatty acid ethyl esters in the blood as markers for ethanol intake. **The Journal of the American Medical Association**. v.276, p.1152-1156, 1996.
- DRESEN, S.; WEINMANN, W.; WURST, F.M. Forensic confirmatory analysis of ethyl sulfate-a new marker for alcohol consumption-by liquid-chromatography / electrospray ionization/tandem mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v.15, p.1644-1648, 2004.
- DROENNER, P.; SCHMITT, G.; ADERJAN, R.; ZIMMER, H. A kinetic model describing the pharmacokinetics of ethyl glucuronide in humans. **Forensic Science International**; v.126; p.24-29; 2002.
- DUMITRESCU, R.G.; SHIELDS, P.G. The etiology of alcohol-induced breast cancer. **Alcohol**, v.35, p.213-225, 2005.
- ELOMACE, W.; LOYTTYNIEMI, E.; KARKKAINEN, P.; SALASPURO, M.; LAITINEN, K. Biological markers of alcohol consumption and effect of calcitonin in non alcoholic men: a prospective, double-blind study. **Alcoholism, Clinical and Experimental Research**, v.20, p.830-835, 1996.
- FLAHAUT, C.; MICHALSKI, J.C.; DANIEL, T.; HUMBERT, M.H.; KLEIN, A. The effects of ethanol on the glycosylation of human transferrin. **Glycobiology**, v.13, p.191-198, 2003.
- FLEMING, M.; MIHIC, S.J.; HARRIS, R.A. Ethanol. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E., GILMAN, A.G., eds. **Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics**. 10.ed. New York: McGraw-Hill, 2001. p.429-446.
- FOLHA ONLINE. Imprescindível da semana Database (on line). 2001. Disponível em <http://www1.folha.Uol.com.br/folha/dimenstein/imprescindível/semana/gd080701a150701.h.t.m>. Acesso em: 25 jan. 2006.
- FOTI, R.; FISHER, M. Assessment of UDP-glucuronosyltransferase catalyzed formation of ethyl glucuronide in human liver microsomes and recombinant UGTs. **Forensic Science International**, v.153, p.109-116, 2005.

- FRASER, A.G.; ROSALKI, S.B.; GAMBLE, G.D.; POUNDER, R.E. Inter-individual and intra-individual variability of ethanol concentration-time profiles: comparison of ethanol ingestion before or after an evening meal. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v.40, p.387-392, 1995.
- GALDURÓZ, J.C.; NOTO, A.; CARLINI, E. IV **Levantamento sobre uso de drogas entre estudantes de 1º e 2º graus em 10 capitais brasileiras – 1997**. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas, 1997. 130p.
- GALDURÓZ, J.C; CAETANO, R. Epidemiologia do uso de álcool no Brasil. **Revista Brasileira de Psiquiatria**; 26 (Supl I):3-6; 2004.
- GALDURÓZ, J.C; NOTO, R.; FONSECA, A.M.; CARLINI, E.A.; V **Levantamento Nacional sobre o consumo de drogas psicotrópicas entre estudantes do ensino fundamental e médio da rede pública de ensino nas 27 capitais brasileiras 2004**. Centro Brasileiro de Informações sobre drogas Psicotrópicas-CEBRID/UNIFESP.
- GAZAL-CARVALHO, C.; CARLINI-COTRIM, B.; SILVA, O.A.; SAUAIA, N. Prevalência de alcoolemia em vítimas de causas externas admitidas em centro urbano de atenção ao trauma. **Revista de Saúde Pública**, v.36, p.47-54, 2002.
- GLUUD, C.; ANDERSEN, I.; DEITRICHSON, O.; GLUUD, B.; JACOBSEN, A.; JUHL, E. Gamma-glutamyltransferase, aspartate aminotransferase and alkaline phosphatase as markers of alcohol consumption in out-patient alcoholics. **European Journal of Clinical Investigation**, v.11, p.171-176, 1981.
- GOLL, M.; SCHMITT, G.; GANSSMANN, B.; ADERJAN, R.E. Excretion profiles of ethyl glucuronide in human urine after internal dilution. **Journal of analytical toxicology**, v.26, p.262-266, 2002.
- GUNNARSSON, T.; KARLSSON, A.; HANSSON, P.; JOHNSON, G.; ALLING, C.; ODHAM, G. Determination of phosphatidylethanol in blood from alcoholic males using high-performance liquid chromatography and evaporative light scattering or electrospray mass spectrometric detection. **Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications**, v.705, p.243-249, 1998.
- GUSTAVSSON, L. ESBRA 1994 Award Lecture. Phosphatidylethanol formation: specific effects of ethanol mediated via phospholipase D. **Alcohol and Alcoholism**, v.30, p.391-406, 1995. [Review]

- HADDAD, J.J. Alcoholism and neuro-immune-endocrine interactions: physiochemical aspects. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.323, p.361–371, 2004.
- HELANDER, A.; CARLSSON, A.V.; BORG, S. Longitudinal comparison of CDT and GGT: complementary markers of excessive alcohol consumption., **Alcohol and Alcoholism**, v.31, p.101-107, 1996.
- HELANDER, A.; VON WACHENFELDT, J.; HILTUNEN, A.; BECK, O.; LILJEBERG, P.; BORG, S. Comparison of urinary 5-hydroxytryptophol, breath ethanol, and self-report for detection of recent alcohol use during outpatient treatment: a study on methadone patients. **Drug and Alcohol Dependence**, v.56,p.33-38,1999.
- HELANDER, A.; BECK, O. Mass spectrometric identification of ethyl sulfate as an ethanol metabolite in humans. **Clinical Chemistry**, v.50, p.936-937, 2004.
- HELANDER, A.; BECK, O. Ethyl sulfate: a metabolite of ethanol in humans and a potential biomarker of acute alcohol intake. **Journal of Analytical Toxicology**, v.29, p.270-274, 2005.
- HOISETH, G.; KARINEN, R.; CHRISTOPPHERSEN, A.; OLSEN, L.; NORMANN, P.; MORLAND, J. A study of ethyl glucuronide in *post-mortem* blood as a marker of *ante-mortem* ingestion of alcool. **Forensic Science International**. 2006 Mar 23; [Epub ahead of print].
- JAAKONMAKI, P.I.; KNOX, K.L.; HORNING, E.C.; HORNING, M.G. The characterization by gas-liquid chromatography of ethyll beta-D-glucosiduronic acid as a metabolite of ethanol in rat and man. **European Journal of Pharmacology**, v.1, p.63-70, 1967.
- JANDA, I.; ALT, A. Improvement of ethyl glucuronide determination in human urine and serum by solid-phase extraction. **Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications**, v.758, p.229-234, 2001.
- JANDA, I.; WEINMANN, W.; KUCHNLE, T.; LAHODE, M.; ALT, A. Determination of ethyl glucuronide in human hair by SPE and LC-MS/MS. **Forensic Science International**, v.128, p.59-65, 2002.
- JONES, A.W. Aspects of *in-vivo* pharmacokinetics of etanol. **Alcoholism, Clinical and Experimental Research**, v.24, p.400-402, 2000.
- JONES, A.W.; EKLUND, A.; HELANDER, A. Misleading results of ethanol analysis in urine specimens from rape victims suffering from diabetes. **Journal Clinical Forensic Medical**, v.7, p.144-146, 2000.

- JOHNSON, R.D.; LEWIS, R.J.; CANFIELD, D.V.; DUBOWSKI, K.M.; BLANK, C.L. Utilizing the urinary 5-HTOL/5-HIAA ratio to determine ethanol origin in civil aviation accident victims. **Journal of Forensic Sciences**, v.50, p.670-675, 2005.
- JURADO, C.; SORIANO, T.; GIMENEZ, M.P.; MENENDEZ, M. Diagnosis of chronic alcohol consumption. Hair analysis for ethyl-glucuronide. **Forensic Science International**, v.29, p.161-166, 2004.
- KALANT, H.; KHANNA, J.M. Os alcoóis. In: KALANT, H. **Principios de Farmacologia Medica**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p.198-205.
- KAMIL, I.A.; SMITH, J.N.; WILLIAMS, R.T. A new aspect of ethanol metabolism: isolation of ethyl glucuronide. **The Biochemical Journal**, v.51, p.32-33, 1952.
- KARDON, T.; COFFEY, M.J.; BÁNHEGYI, G.; CONLEY, A.A.; BURCHELL, B.; MANDL, J.; BRAUN, L. Transcriptional induction of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase by ethanol in rat liver. **Alcohol**, v.21, p.251-257, 2000.
- KAUSHIK, R.; LACOURSE, W.R.; LEVINE, B. Determination of ethyl glucuronide in urine using reversed-phase HPLC and pulsed electrochemical detection (Part II). **Analytica Chimica Acta**, v.556, p.267-274, 2006.
- KENNEDY, R.H.; LIU, S.J. Sex differences in L-type calcium current after chronic ethanol consumption in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.189, p.196-203, 2003.
- KIANG, M.H.; ENSOM, M. H.; CHANG, T.K. UDP-glucuronosyltransferases and clinical drug-drug interactions. **Pharmacology & Therapeutics**, v.106, p.97-132, 2005.
- KLYS, M.; SCISLOWSKI, M.; ROJEK, S.; KOLODZIEJ, J. A fatal clomipramine intoxication case of a chronic alcoholic patient: application of postmortem hair analysis method of clomipramine and ethyl glucuronide using LC/APCI/MS. **Legal Medicine**, v.7, p.319-325, 2005.
- KRIVANKOVA, L.; CASLAVSKA, J.; MALASKOVA, H.; GEBAUER, P.; THORMANN, W. Analysis of ethyl glucuronide in human serum by capillary electrophoresis with sample self-stacking and indirect detection. **Journal of Chromatography A**, v.1081, p.2-8, 2005.
- LADERO-QUESADA, J.M. Alcohol (I): farmacología del alcohol: intoxicación aguda. In: LORENZO, P.; LADERO, J.M.; LEZA, J.C.; LIZASOAIN, I. **Drogodependencias**. Madrid: Médica Panamericana, 1998. p.233-248.

- LANÇAS, F.M. **Extração em Fase Sólida (SPE)**. São Carlos: RiMa, 2004. 96p.
- LAPOSATA, M. Fatty acid ethyl esters: short-term and long-term serum markers of ethanol intake. **Clinical Chemistry**, v.43, p.1527-1534, 1997.
- LEVY, P. Álcool et pâncreas. **Pathologie et Biologie**; v. 49; p.753-758; 2001.
- LEYTON, V.; GREVE, J. M.D. Álcool em vítimas fatais de acidentes de trânsito no Estado de São Paulo, 1999. In: CONGRESSO NACIONAL DE TRÂNSITO, 6, São Paulo, 2001. **Anais**. São Paulo: CONATRAN, 2001. 1 CD-ROM.
- LIEBER, C.S.; ABITTAN, C.S. Pharmacology and metabolism of alcohol, including its metabolic effects and interactions with other drugs. **Clinics in Dermatology**, v.17, p.365-379, 1999.
- LIEBER, C.S. Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. **Alcohol**, v.34, p.9-19, 2004.
- LIN, R.C.; LUMENG, L. Formation of the 37KD protein-acetaldehyde adduct in liver during alcohol treatment is dependent on alcohol dehydrogenase activity. **Alcoholism, Clinical and Experimental Research**, v.14, p.766-770, 1990.
- LITTEN, R.Z.; ALLEN, J.P.; FERTIG, J.B. Gamma-glutamyltranspeptidase and carbohydrate deficient transferrin: alternative measures of excessive alcohol consumption. **Alcoholism, Clinical and Experimental Research**, v.19, p.1541-1546, 1995.
- MACKENZIE, P.I.; WALTER, B.K.; BURCHELL, B.; GUILLEMETTE, C.; IKUSHIRO, S.; IYANAGI, T.; MINERS, J.O.; OWENS, I.S.; NEBERT, D.W. Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily. **Pharmacogenetics and Genomics**, v.15, p.677-685, 2005.
- MARTIN, P.R.; SINGLETON, C.K.; HILLER-STURMHÖFEL, S.H. The role of thiamine in alcoholic brain disease. **Alcohol Research & Health: the Journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism**, v.27, p.134-142, 2003.
- MASTERS, S.B. Os álcoois. In: KATZUNG, B.G., eds. **Farmacologia: básica & clínica**. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.23, p.334-345, 2003.

- MATERN, H.; HEINEMANN, H.; MATERN, S.; BONGARTZ, M. Radioassay of UDP-Glucuronosyltransferase Activities toward endogenous substrates using labeled UDP-glucuronic acid and an organic solvent extraction procedure. **Analytical Biochemistry**, v.219, p.182-188, 1994.
- MILLER, M.W. Effects of prenatal exposure to ethanol on callosal projection neurons in rat somatosensory cortex. **Brain Research**, v.766, p.121-128, 1997.
- MINERS, J.O.; MCKINNON, R.A.; MACKENZIE, P.I. Genetic polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferases and their functional significance. **Toxicology**, v.181, p.453-456, 2002.
- MORGAN, M.Y. Alcohol and nutrition. **British Medical Bulletin**, v.38, p.21-29, 1982.
- MORINI, L.; POLITI, L.; GROPPi, A.; STRAMESI, C.; POLETTINI, A. Determination of ethyl glucuronide in hair samples by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v.41, p.34-42, 2006.
- MUSSHOFT, F. Chromatographic methods for the determination of markers of chronic and acute alcohol consumption. **Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.781, p.457-480, 2002.
- NAVASUMRIT, P.; WARD, H.; DODD, J.F.; O'CONNOR, J. Ethanol-induced free radicals and hepatic DNA strand breaks are prevented *in vivo* by antioxidants: effects of acute and chronic ethanol exposure. **Carcinogenesis**, v.21, p.93-99, 2000.
- NEEDELEMAN, S.D.; PORVAZNIK, M. Creatinine analysis in single collection urine specimens. **Journal of Forensic Sciences**, v.37; p.1125-1133; 1992.
- NERY FILHO, A.; MEDINA, M.G.; MELCOP, A.G.; OLIVEIRA, E.M. **Impacto do uso de álcool e outras drogas em vítimas de acidentes de trânsito**. Brasília: Associação Brasileira dos Departamentos Estaduais de Trânsito, 1997.
- NEMESANSZKY, E.; LOTT, A.; ARATO, M. Changes in serum enzymes in moderate drinkers after an alcohol challenge. **Clinical Chemistry**, v.34, p.525-527, 1988.
- NISHIKAWA, M.; TSUCHIHASHI, H.; MIKI, A.; KATAGI, M.; ZIMMER, H.; KELLER, T.; ADERJAN, R. Determination of ethyl glucuronide, a minor metabolite of ethanol, in human serum by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of**

- Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications**, v.728, p.105-110, 1999.
- OUZZINE, M.; BARRE, L.; NETTER, P.; MAGDALOU, J.; FOURNEL-GIGLEUX, S. The human UDP-glucuronosyltransferases: structural aspects and drug glucuronidation. **Drug Metabolism Reviews**, v.35; p.287-303; 2003.
- PALADINO, S.F. Alterações hematológicas ligadas ao alcoolismo. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v.27, p.36-42, 2000.
- POLITI, L.; MORINI, L.; GROPPA, A.; POLONI, V.; POZZI, F.; POLETTINI, A. Direct determination of the ethanol metabolites ethyl glucuronide and ethyl sulfate in urine by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM**, v.19, p.1321-1331, 2005.
- POSCHL, G.; SEITZ, H.K. Alcohol and câncer. **Alcohol and Alcoholism**, v.39, p.155-165, 2004.
- PRAGST, F.; SPIEGEL, K.; SPORKERT, A.; BOHNENKAMP, M. Are there possibilities for the detection of chronically elevated alcohol consumption by hair analysis? A report about the state of investigation. **Forensic Science International**, v.10, p. 201-223, 2000.
- PRATT, D.S.; KAPLAN, M.M. Evaluation of abnormal liver-enzyme results in asymptomatic patients. **The New England Journal of Medicine**, v.342, p.1266-1271, 2000.
- RAMCHANDANI, V.A.; BOSRON, W.F.; LI, T.K. Research advances in ethanol metabolism. **Pathologie et Biologie**, v.49, p.676-682, 2001.
- RANG H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. Dependência e abuso de drogas. In: RANG H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. eds. **Farmacologia**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001a. cap. 39, p.515-531.
- ROGAWSKI, M.A. Update on the neurobiology of alcohol withdrawal seizures. **Epilepsy currents / American Epilepsy Society**, v.5, p.225–230, 2005.
- ROGAWSKI, M.A. Update on the neurobiology of alcohol withdrawal seizures. **Epilepsy currents / American Epilepsy Society**, v.5, p.225–230, 2005.
- SANCHES, Z.M.; NAPPO, S.A. Progression on drug use and its intervening factors among crack users. **Revista de Saúde Pública**; v. 36; p. 420-430; 2002.

- SARKOLA, T.; DAHL, H.; ERIKSSON, P.C.J.; HELANDER, A. Urinary ethyl glucuronide and 5-hydroxytryptophol levels during repeated ethanol ingestion in healthy human subjects. **Alcohol and Alcoholism**, v.38, p.347-351, 2003.
- SCHLOEGL, H.; DRESEN, S.; SPACZYNSKI, K.; STOERTZEL, M.; WURST, F.M.; WEINMANN, W. Stability of ethyl glucuronide in urine, post-mortem tissue and blood samples. **International Journal of Legal Medicine**, v.120, p.83-88, 2006a.
- SCHLOEGL, H.; ROST, T.; SCHMIDT, W.; WURST, F.M.; WEINMANN, W. Distribution of ethyl glucuronide in rib bone marrow, other tissues and body liquids as proof of alcohol consumption before death. **Forensic Science International**, v.156, p.213-218, 2006b.
- SCHMITT, G.; ADERJAN, R.; KELLER, T.; WU, M. Ethyl glucuronide: an unusual ethanol metabolite in humans. Synthesis, analytical data, and determination in serum and urine. **Journal of Analytical Toxicology**, v.19, p.91-94, 1995.
- SCHMITT, G.; DROENNER, P.; SKOPP, G.; ADERJAN, R. Ethyl glucuronide concentration in serum of human volunteers, teetotalers, and suspected drinking drivers. **Journal of Forensic Sciences**, v.42, p.1099-1102, 1997.
- SHARPE, P.C. Biochemical detection and monitoring of alcohol abuse and abstinence. **Annals of Clinical Biochemistry**, v.38, p.652-664, 2001.
- SILVA, O.A. Consumo de drogas de abuso no ambiente de trabalho no Brasil. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v.11, suppl.1, p.7-10, 1999.
- SILVA, O.A.; YONAMINE, M. Drug abuse among workers in Brazilian regions. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v.38, p.552-556, 2004.
- SKIPPER, G.E.; WEINMANN, W.; THIERAUF, A.; SCHAEFER, P.; WIESBECK, G.; ALLEN, J.P.; MILLER, M.; WURST, F.M. Ethyl glucuronide: a biomarker to identify alcohol use by health professionals recovering from substance use disorders. **Alcohol and Alcoholism**, v.39, p.445-449, 2004.
- SKOPP, G.; SCHMITT, G.; POTSCHE, L.; DROENNER, P.; ADERJAN, R.; MATTERN, R. Ethyl glucuronide in human hair. **Alcohol and Alcoholism**, v.35, p.283-285, 2000.
- SOBEL, B.F.; RILEY, A.L. The interaction of cocaethylene and cocaine and of cocaethylene and alcohol on schedule-controlled responding in rats. **Psychopharmacology**, v.145, p.153-161, 1999.

- SODERBERG, B.L.; SALEM, R.O.; BEST, C.A.; CLUETTE-BROWN, J.E.; LAPOSATA, M. Fatty acid ethyl esters. Ethanol metabolites that reflect ethanol intake. **American Journal of Clinical Pathology**, v.119, suppl., p.S94-S99, 2003.
- SODERPALM, A.H.; de WIT, H. Effects of stress and alcohol on subjective state in humans. **Alcoholism, Clinical and Experimental Research**, v.26, p.818–826, 2002.
- SOMMERS, M.S.; SAVAGE, C.; WRAY, J.; DYEHOUSE, J.M. Laboratory measures of alcohol (ethanol) consumption: strategies to assess drinking patterns with biochemical measures. **Biological Research for Nursing**, v.4, p.203-217, 2003.
- SPIES, C.D.; SANDER, M.; STANGEL, K.; FERNANDEZ-SOLA, J.; PREEDY, V.R.; RUBIN, E.; ANDREASSON, S.; HANNA, E.Z.; KOX, W.J. E Effects of alcohol on the heart. **Current Opinion in Critical Care**, v.7, p.337-343, 2001. [Review]
- STEPHANSON, N.; DAHL, H.; HELANDER, A.; BECK, O. Direct quantification of ethyl glucuronide in clinical urine samples by liquid chromatography–mass spectrometry. **Therapeutic Drug Monitoring**, v.24, p.645–651, 2002.
- STEVENS, T.; DARWIN, L.; CONWELL, D; ZUCCARO, G. Pathogenesis of chronic pancreatitis: an evidence – based review of past theories and recent development. **American Journal of Gastroenterology**; v.99, p.2256–2270, 2004.
- SWIFT, R. Direct measurement of alcohol and its metabolites. **Addiction**, v.98, suppl.2, p.73-80, 2003.
- TEYSSEN, S.; SINGER, M.V. Alcohol-related diseases of the oesophagus and stomach. **Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology**, v.17, p.557-573, 2003. [Review].
- UNIFESP. Estudo relaciona uso de álcool com acidentes. **Jornal da Paulista**. Ano.15, n.162, 2001. Disponível em: <http://www.unifesp.br/comunicacao/jpta/ed162/pesq1.htm>. Acesso em: 17 set. 2004.
- VAISSMAN, M. **Alcoolismo como problema de saúde no trabalho: avaliação de um programa de tratamento para funcionários de uma universidade**. Rio de Janeiro, 1999. 167p. Tese de Doutorado - Instituto de Psiquiatria - Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- VESTERMARK, A.; BOSTRÖM H. Studies on ester sulfates. V. On the enzymatic formation of ester sulfates of primary aliphatic alcohols. **Experimental Cell Research**, v.18, p.174-177, 1959.

- WALKER, V.; MILLS, G.A. Solid-phase extraction in clinical biochemistry. **Annals of Clinical Biochemistry**, v.39, p.464-477, 2002.
- WALSH, C.R.; LARSON, M.G.; EVANS, J.C; DJOUSSE, L.; ELLISON, R.C.; VASAN, R.S.; LEVY, D. Alcohol consumption and risk for congestive heart failure in the Framingham heart study. **Annals of internal medicine**, v.136, p.181-191, 2002.
- WEINMANN, W.; SCHAEFER, P.; THIERAUF, A.; SCHREIBER, A.; WURST, F.M. Confirmatory analysis of ethylglucuronide in urine by liquid-chromatography/electrospray ionization/tandem mass spectrometry according to forensic guidelines. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v.15, p.188-193, 2004.
- WERNER, J.; SAGHIR, M.; WARSHAW, A.; LEWANDROWSKI, K.; LAPOSATA, M.; IOZZO, R; CARTER, E.; SCHATZ, R.; FERNANDEZ-del CASTILLO, C. Alcoholic pancreatitis in rats: injury from nonoxidative metabolites of ethanol. **American Journal Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v.283, G.65-73, 2002.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Health Report 2000. **Health systems: improving performance**. Geneva: World Health Organization, 2000. Disponível em: http://www.who.int/whr/2000/media_centre/en/. Acesso em: 26 set. 2004.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **About Global Alcohol Database** [online]. 2002. Disponível em: http://www3.who.int/whosis/alcohol_about_us.cfm?path=whosis,alcohol,alcohol_about&language=english. Acesso em: 25 jan. 2006.
- WURST, F.M.; KEMPTER, C.; SEIDL, S.; ALT, A. Ethyl glucuronide-a marker of alcohol consumption and a relapse marker with clinical and forensic implications. **Alcohol and Alcoholism**, v.34, p.71-77, 1999.
- WURST, F.M.; SCHUTTLER, R.; KEMPTER, C.; SEIDL, S.; GILD, T.; JACHAU, K.; ALT, A. Can ethyl glucuronide be determined in post-mortem body fluids and tissues? **Alcohol and Alcoholism**, v.34, p.262-263, 1999.
- WURST, F.M.; KEMPTER, C.; METZGER, J.; SEIDL, S.; ALT, A. Ethyl glucuronide: a marker of recent alcohol consumption with clinical and forensic implications. **Alcohol**, v.20, p.111-116, 2000.
- WURST, F.M.; VOGEL, R.; JACHAU, K.; VARGA, A.; ALLING, C.; ALT, A.; SKIPPER, G.E. Ethyl glucuronide discloses recent covert alcohol use not detected by standard testing in forensic psychiatric inpatients.

Alcoholism, Clinical and Experimental Research, v.27, p.471-476, 2003.

WURST, F.M.; ALLING, C.; ARADOTTIR, S.; PRAGST, F.; ALLEN, J.P.; WEINMANN, W.; MARMILLOT, P.; GHOSH, P.; LAKSHMAN, R.; SKIPPER, G.E.; NEUMANN, T.; SPIES, C.; JAVORS, M.; JOHNSON, B.A.; AIT-DAOUD, N.; AKHTAR, F.; ROACHE, J.D.; LITTEN, R. Emerging biomarkers: new directions and clinical applications. **Alcoholism, Clinical and Experimental Research**, v.29, p.465-473, 2005.

YEGLES, M.; LABARTHE, A.; AUWÄRTER, V.; HARTWIG, S.; VATER, H.; WENNIG, R.; PRAGST, F. Comparison of ethyl glucuronide and fatty acid ethyl ester concentrations in hair of alcoholics, social drinkers and teetotallers. **Forensic Science International**, v.145, p.167-173, 2004.

ZIMMER, H.; SCHMITT, G.; ADERJAN, R. Preliminary immunochemical test for the determination of ethyl glucuronide in serum and urine: comparison of screening method results with gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Analytical Toxicology**, v.26, p.11–16, 2002.

Anexos

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 18 de março de 2005.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP nº 131/2004

São Paulo, 07 de dezembro de 2004.

Ilmo(a). Sr(a).
Ana Verônica Flores Marin

Vimos informar que o Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 06 de dezembro p.p., **APROVOU** o projeto "Determinação de etilglicuronídeo em urina como indicador de exposição recente ao etanol" (Protocolo nº 265) apresentado por Vossa Senhoria, devendo apenas ser informados os critérios estatísticos utilizados para determinação do "n".

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 – item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

Prof. Dr.ª. Valentina Porta
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa da FCF/USP

Orientador: Prof. Regina Lucia de Moraes Moreau
FBC

DECLARAÇÃO

Declaramos que o Centro para Tratamento de Dependência Química Vila Serena - SP está de acordo em colaborar com o projeto de pesquisa intitulado "Determinação de etilglicuronídeo em urina como Indicador de exposição recente ao etanol" a ser desenvolvido no Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

A equipe de enfermagem está autorizada a aplicar um questionário e coletar amostras urina em pacientes internados que utilizaram etanol.

P.S.: Salientamos que faz parte de nossa metodologia de tratamento (Modelo Minnesota), que o paciente procure nossa Instituição de forma voluntária, assinando ele próprio o consentimento para seu tratamento internado ou ambulatorialmente, sendo o único responsável por sua recuperação.

São Paulo, 23 de novembro de 2004

Silze Morgado
Coordenadora de Assessoria e Terapia

Renilde Cardoso Parriarca
Coordenadora Administrativa

Paciente internado

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU LEGAL RESPONSÁVEL

1. Nome do Paciente:.....

Documento de Identidade Nº :..... Sexo: () M () F

Data de Nascimento:...../...../.....

Endereço:.....Nº:.....Apto:.....

Bairro:.....Cidade:.....

CEP:.....Telefone:.....

2. Responsável

Legal:.....

Natureza (grau de parentesco, tutor, curador, etc.):.....

Documento de Identidade Nº:.....Sexo: () M () F

Data de Nascimento:...../...../.....

Endereço:.....Nº:.....Apto:.....

Bairro:.....Cidade:.....CEP:.....Tel:.....

II – DADOS SOBRE A PESQUISA

1. Título do Protocolo de Pesquisa:
Determinação de Etilglicuronídeo em urina como indicador de exposição recente ao álcool
2. Pesquisador: Ana Veronica Flores Marin.
Cargo/Função:Químico-Farmacêutica
Inscrição Conselho Regional Nº

Departamento da FCF/USP: Análises Clínicas e Toxicológicas.

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA

Sem Risco () Risco Mínimo (x) Risco Médio ()

Risco Baixo () Risco Maior ()

(Obtenção de amostra de urina considerada não invasiva.)

III – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA:

Esta pesquisa tem o objetivo de padronizar uma metodologia para a determinação de etilglicuronídeo na urina. Trará benefícios no sentido de ajudar no esclarecimento de casos onde é necessário comprovar o uso de álcool.

O voluntário, que fez uso de etanol dentro de 24 horas, será selecionado pela equipe de enfermagem do Centro de Tratamento de Dependência Química Vila Serena, localizado em São Paulo, Capital, durante a entrevista que é realizada quando o paciente é internado. Será coletada uma primeira amostra de urina neste momento e a cada 24 horas, até que não seja possível detectar o etilglicuronídeo. Durante as coletas deverá haver um esvaziamento completo de bexiga. As amostras de urina coletadas em frascos plásticos fornecidos pela pesquisadora responsável, e serão armazenados em freezer, à -20 °C e transportadas para o Laboratório em embalagens de isopor, contendo gelo para conservar a temperatura. Este tipo de coleta não apresenta risco ou desconforto para o voluntário, por se tratar de um procedimento seguro e não invasivo. Também será aplicado um questionário aos voluntários para verificar o padrão de consumo de etanol.

IV – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA

1. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
 2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
 3. Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.
-

V – INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA

Pesquisadoras responsáveis: Prof.^a. Dr.^a. Regina Lúcia de Moraes Moreau

Ana Veronica Flores Marín

Endereço: Universidade de São Paulo

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - São Paulo - SP

CEP: 05508-900

Fone: 3091-2194 / 3031-9055

VI – OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

.....

.....

.....

.....

VII – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de _____.

Assinatura do sujeito de pesquisa
ou responsável legal

Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
Programa de pós-graduação em
Toxicologia e Análises Toxicológicas

QUESTIONARIO

I INFORMAÇÕES SOBRE O VOLUNTARIO

Nome: _____

Sexo: Masculino ☐ Feminino ☐

Idade: Peso: Estatura:

Data Entrevista:

II INFORMAÇÕES SOBRE O USO DO ÁLCOOL

1. Tipo de bebida que consome normalmente:

☐ pinga	☐ conhaque
☐ cerveja	☐ vodka
☐ vinho	_____
☐ uísque	

2. Quantidade:

3. Frequência de consumo

- ☐ diária ☐ semanal

Há quanto tempo faz utilização com esta frequência?

4. Utiliza outras drogas

- ☐ Sim ☐ Não

Quais?

III INFORMAÇÕES SOBRE O USO DE MEDICAMENTOS

1. Você recebe uma terapia medicamentosa para o tratamento de alguma doença crônica?

- ☐ Não ☐ Sim

2. Quais medicamentos ?

3. Dose desses medicamentos:

IV INFORMAÇÕES SOBRE O ÚLTIMO CONSUMO DE ÁLCOOL

- 1. Quando ingeriu bebida alcoólica pela última vez?

- ☐ Últimas 6-12 horas
☐ Últimas 12-18 horas
☐ Últimas 18-24 horas
☐ Mais de 24 horas

2. Que tipo de bebida consumiu nessa ocasião ?

☐ pinga	☐ conhaque
☐ cerveja	☐ vodka
☐ vinho	☐ _____
☐ uísque	

3. Quantidade:

- 4. Nessa ocasião uso outro tipo de drogas?

- ☐ Sim ☐ Não

- 5. Quais?

- 6. Quantidade:

Voluntário

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU LEGAL RESPONSÁVEL

2. Nome do Paciente:.....

Documento de Identidade Nº :..... Sexo: () M () F

Data de Nascimento:...../...../.....

Endereço:.....Nº:.....Apto:.....

Bairro:.....Cidade:.....

CEP:.....Telefone:.....

2. Responsável Legal:.....

Natureza (grau de parentesco, tutor, curador, etc.):.....

Documento de Identidade Nº:.....Sexo: ()M ()F

Data de Nascimento:...../...../.....

Endereço:.....Nº:.....Apto:.....

Bairro:.....Cidade:.....CEP:.....Tel:.....

II – DADOS SOBRE A PESQUISA

1. Título do Protocolo de Pesquisa:

Determinação de Etilglicuronideo em urina como indicador de exposição recente ao álcool

2. Pesquisador: Ana Veronica Flores Marin.

Cargo/Função: Químico-Farmacêutica

Inscrição Conselho Regional Nº

Departamento da FCF/USP: Análises Clínicas e Toxicológicas.

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA

Sem Risco ()

Risco Mínimo (x)

Risco Médio ()

Risco Baixo ()

Risco Maior ()

(Obtenção de amostra de urina considerada não invasiva.)

III – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA:

Esta pesquisa tem o objetivo de padronizar uma metodologia para a determinação de etilglicuronídeo na urina. Trará benefícios no sentido de ajudar no esclarecimento de casos onde é necessário comprovar o uso de álcool.

Antes de começar o experimento, o voluntário deve estar em abstinência absoluta de álcool pelo menos 7 dias prévio à coleta das amostras.

No dia do experimento todos os participantes irão se reunir em um local onde será servido um café da manhã leve, aproximadamente 1,5 h antes do início do experimento.

Será administrada uma dose fixa de 0,5 g de etanol por kg de peso corpóreo de cerveja (5% v/v) de um mesmo lote, em um prazo máximo de 30 minutos. A quantidade (volume) de álcool será ajustada conforme ao peso corpóreo do voluntário. Como a faixa de peso varia de 55 a 65 kg, o volume de álcool irá variar entre 550 a 650 ml de cerveja (aproximadamente 1.5 a 2 latas de cerveja). Uma primeira amostra de urina será coletada imediatamente antes da ingestão alcoólica. A urina será coletada durante 6, 8, 12, 24, 30, 35 e 48 horas após a ingestão, em cada uma destas coletas deve haver o esvaziamento completo da bexiga.

As amostras de urina serão coletadas em frascos plásticos fornecidos pela pesquisadora responsável, serão armazenados em freezer, à -20 °C e transportadas para o Laboratório em embalagens de isopor, contendo gelo para conservar a temperatura.

Este tipo de coleta não apresenta risco ou desconforto para o voluntário, por se tratar de um procedimento seguro e não invasivo.

IV – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA

1. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
3. Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.

**V – INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS
PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA**

Pesquisadoras responsáveis: Prof^a. Dr^a. Regina Lúcia de Moraes Moreau

Ana Veronica Flores Marín

Endereço: Universidade de São Paulo

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - São Paulo - SP

CEP: 05508-900

Fone: 3091-2194 / 3031-9055

VI – OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

.....

.....

.....

VII – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de _____.

Assinatura do sujeito de pesquisa
ou responsável legal

Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)