UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em

Toxicologia e Análises Toxicológicas

DETERMINAÇÃO DE ETANOL EM SALIVA ATRAVÉS DO SISTEMA ENZIMÁTICO Q.E.D.® E DA CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA

NÁDIA TAWIL

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. OVANDIR ALVES SILVA

São Paulo

2004

NÁDIA TAWIL

DETERMINAÇÃO DE ETANOL EM SALIVA ATRAVÉS DO SISTEMA ENZIMÁTICO Q.E.D.® E DA CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA

Comissão Julgadora da Dissertação

para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Ovandir Alves Silva

Orientador/presidente

_____

1°. examinador

_____

2°. examinador

São Paulo,_____de_____.

“Aquele que nada sabe, e não sabe que não sabe, é tolo – evita-o.

Aquele que nada sabe, e sabe que nada sabe, é simples – ensina-o

Aquele que sabe, e não sabe que sabe – desperta-o.

Aquele que sabe, e sabe que sabe, é sábio – segue-o."

(Provérbio árabe)

A **Deus**, que é essa luz maior e inigualável,
por ter me dado a força para finalizar esse trabalho,
acompanhando-me a todo o momento.

Ao **Santo Expedito** por ter me auxiliado nas situações que pareciam impossíveis.

Aos meus pais **Younan e Alidis** pela excelente educação que me proporcionaram, muito importante para minha formação.E também pelo amor, incentivo, força e compreensão.

Aos meus queridos irmãos **Cristiane e Alessandro**

pelo amor, amizade e companheirismo.

Ao Professor **Ovandir Alves Silva**,
pela orientação e oportunidade.
E por ter acreditado no meu trabalho,
dando-me os incentivos necessários
para que eu pudesse finalizar esse
trabalho.

AGRADECIMENTOS

À minha avó **Genoefa** pelo carinho e pela constante torcida nessa etapa da minha vida.

As minhas tias **Adelina** e **Maria** pelo carinho, apoio e torcida.

À minha amiga **Simone**, grande companheira de graduação e de pós-graduação, pelo apoio, amizade e por toda a assistência dispensada nos momentos em que mais necessitei.

Ao amigo **Maurício Yonamine,** que desde o início da minha jornada no **LAT,** compartilhou seus sábios ensinamentos que foram bastante importantes para a concretização desta dissertação.

Ao **Fernando Santos** pelo carinho, apoio, incentivo e amizade.

Às minhas amigas "superpoderosas", **Michela, Eliane** e **Cláudia** pela convivência, carinho e experiências compartilhadas.

Às amigas **Vanessa, Patrícia, Isa Rita** e **Danielle**, companheiras de Pós Graduação, pela convivência e incentivo para a realização desse trabalho.

A todos os meus **amigos** do curso de pós-graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas pelo carinho e pela troca de conhecimentos.

Aos funcionários do **LAT** e de todo bloco **13B** da Farmácia pela ajuda e colaboração.

À bibliotecária **Leila Bonadio** pelas explicações e correções das referências bibliográficas.

Ao **Dr. Anthony Wong** e a **Carla M. C. Hess Von Gabriel** pela assistência, apoio e incentivo ao meu trabalho.

A todos os meus colegas de trabalho do **Laboratório Maxilab**, pelo convívio, amizade e constante colaboração.

Aos professores da **UNESP** pelos ensinamentos passados, contribuindo para a minha formação profissional na graduação.

Ao **Comitê** em **Ética** e **Pesquisa** pela aprovação do meu trabalho.

Ao **Dr. André Malbergier** e a **Dra. Cristiana Leslie Corrêa**, membros da minha banca de qualificação, pelas correções e sugestões fornecidas, contribuindo para o enriquecimento do meu trabalho.

Aos **voluntários** que destinaram uma parte do seu tempo, contribuindo e ajudando para a finalização desse estudo.

A **todos** que de maneira direta ou indireta contribuíram positivamente para a conclusão desse desafio que parecia impossível.

CONTEÚDO

1. INTRODUÇÃO..... 01
2. ASPECTOS TOXICOLÓGICOS..... 05
2.1. Consumo de Bebidas alcoólicas..... 05
2.2. Abuso e Dependência ao álcool..... 16
2.3. Toxicocinética do Etanol..... 24
2.4. Efeitos do Etanol..... 29
2.4.1. No Sistema Nervoso Central (SNC)..... 31
2.4.2. No Sistema Cardiovascular..... 34
2.4.3. No Sistema Hematológico 35
2.4.4. No Sistema Endócrino..... 36
2.4.5. No Sistema Geniturinário..... 36
2.4.6. No Sistema Gastrintestinal..... 37
2.4.7. No Desenvolvimento Fetal..... 39
2.5. Interação do Etanol com Fármacos..... 41
3. ASPECTOS ANALÍTICOS..... 48
4. OBJETIVO E PLANO DE TRABALHO..... 65
5. MATERIAL E MÉTODOS..... 66
5.1 Material..... 66
5.1.1. Soluções – padrão..... 66
5.1.2. Equipamentos e acessórios..... 67
5.1.3. Outros materiais..... 68
5.1.4. Amostras de saliva..... 69
5.1.4.1. Referência negativa (Grupo I A) 69
5.1.4.2. Referência positiva (Grupo II B)..... 69
5.1.4.3. Amostras de Voluntários..... 69
Grupo II A..... 69
Grupo II B..... 70
5.2 Métodos..... 71
5.2.1. Seleção do tempo de coleta para determinação de etanol através do sistema Q.E.D. A 150..... 71

5.2.2. Padronização e validação do método para determinação de etanol em amostras de saliva pela cromatografia gasosa, após separação por *headspace*..... 71
5.2.2.1. Padronização do método..... 71
5.2.2.2.Curvas de calibração..... 73
5.2.3. Validação do método..... 74
Linearidade da técnica..... 74
Limite de quantificação (LOQ)..... 74
Limite de detecção (LOD)..... 75
Precisão intra e interensaio..... 75
5.2.4. Determinação de etanol em amostras de saliva de voluntários, Grupo II B após a ingestão de bebida alcoólica..... 76
5.2.4.1 Método enzimático (Q.E.D. A 150)..... 77
5.2.4.2 Cromatografia gasosa, após separação por *headspace*..... 77
5.2.5. Determinação de etanol por Q.E.D A 150 e GC/HS em amostras de voluntários (Grupo II A) coletadas com Salivette com e sem ácido cítrico..... 78
5.2.6. Estudo para verificar a estabilidade do etanol através do sistema Q.E.D. A – 150..... 79
6. RESULTADOS..... 80
6.1 Seleção do tempo de coleta para determinação de etanol através do sistema Q.E.D. A – 150..... 80
6.2 Padronização e validação do método para determinação de etanol pela cromatografia gasosa, após separação por *headspace*..... 80
6.2.1. Padronização do método..... 80
6.2.2. Validação do método..... 82
Linearidade da técnica..... 82
Limite de quantificação (LOQ)..... 84
Limite de detecção (LOD)..... 85
Precisão intra e interensaio..... 86

6.3. Determinação de etanol em amostras de saliva dos voluntários do Grupo II B..... 88
6.3.1.Método enzimático (Q.E.D. A 150)..... 88
6.3.2 Cromatografia gasosa após separação por *headspace*..... 89
6.4. Determinação de etanol por Q.E.D A 150 e GC/HS por amostras de voluntários (Grupo II A) coletadas com Salivette com e sem ácido cítrico..... 92
6.5 Estudo para verificar a estabilidade do etanol através do sistema Q.E.D. A – 150..... 95
7. DISCUSSÃO..... 96
8.CONCLUSÃO..... 108
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 109
10. ANEXOS..... 129

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Teores alcoólicos das principais cervejas produzidas no Brasil..... 07

TABELA 2. Faixa de teor alcoólico dos principais destilados consumidos no Brasil..... 08

TABELA 3. Comparação de valores entre as doses de bebidas consumidas nos países europeus com o lanche da rede mundial de *fast food*..... 10

TABELA 4. Consumo de bebidas alcoólicas por pessoa no Brasil, no período de 1961 até o ano de 2000..... 11

TABELA 5. Classificação do consumidor de bebidas alcoólicas, de acordo com a quantidade em determinados períodos..... 14

TABELA 6. Concentração sanguínea obtida por kilograma, após meia hora de ingestão das quantidades de bebidas alcoólicas observadas em indivíduos de diferentes pesos corpóreos..... 15

TABELA 7. Os critérios para diagnóstico do uso abusivo de álcool, conforme DSM – IV..... 17

TABELA 8. Critérios para diagnóstico da dependência de álcool, conforme a DSM-IV..... 21

TABELA 9. Parâmetros químicos-toxicológicos do etanol..... 28

TABELA 10. Efeitos do consumo de álcool, apresentado por dois autores de acordo com a alcoolemia..... 30

TABELA 11. Interações entre o álcool e várias classes de medicamentos..... 42

TABELA 12. Medicamentos e antissépticos bucais e suas respectivas concentrações de etanol 46

TABELA 13. Os resultados obtidos em mg/dL de etanol, após ingestão controlada de bebida alcoólica..... 80

TABELA 14. Valores da relação das áreas (etanol/n-propanol) obtidos no experimento, para padronização da técnica..... 80

TABELA 15. Resultados obtidos em mg/dL, após ingestão controlada de etanol..... 82

TABELA 16. Valores obtidos nos experimentos para verificar a linearidade da técnica..... 83

TABELA 17. Resultados obtidos para o valor do limite de quantificação (LOQ)..... 84

TABELA 18. Valores obtidos na determinação do limite de detecção (LOD)..... 85

TABELA 19. Coeficientes de variação intra e interensaio do etanol, na concentração de 0,03 g/L..... 86

TABELA 20. Coeficientes de variação intra e interensaio do etanol, na concentração de 0,3 g/L..... 87

TABELA 21. Coeficientes de variação intra e interensaio do etanol, na concentração de 1,2 g/L..... 87

TABELA 22. Resultados das concentrações de etanol obtidos nas amostras de saliva dos voluntários, através do Q.E.D. A 150... 88

TABELA 23. Resultados obtidos nas amostras de saliva de voluntários por CG/FID, após técnica de *headspace*..... 89

TABELA 24. Resultados obtidos em mg/dL, na técnica enzimática (Q.E.D. A-150) e cromatográfica (CG/HS), nas amostras coletadas com a utilização de Salivettes® com e sem ácido cítrico..... 92

TABELA 25. Média das concentrações de etanol para verificar a estabilidade do etanol na amostra obtida com o sistema Q.E.D. A-150..... 95

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Processos de biotransformação do etanol..... 27

FIGURA 2. Foto ilustrada do coletor de saliva, e de seus compartimentos dispostos separadamente..... 61

FIGURA 3. Foto ilustrada do coletor de apresentação do teste rápido Q.E.D A 150..... 62

FIGURA 4. Fotos ilustradas do procedimento de coleta de fluido oral através do Q.E.D A 150..... 62

FIGURA 5. Reações químicas desenvolvidas, após a utilização do Q.E.D A 150..... 63

FIGURA 6. Fluxograma da técnica de separação por *Headspace* para determinação de etanol em fluido oral..... 72

FIGURA 7. Perfil cromatográfico dos vapores da amostra de fluido oral, adicionada de solução de etanol e n – propanol..... 81

FIGURA 8. Representação gráfica da linearidade da técnica entre a concentração de etanol e as médias das áreas (etanol/n-propanol)..... 61

FIGURA 9. Gráficos obtidos individuais, comparando os resultados com as duas técnicas empregadas..... 91

FIGURA 10. Gráfico das médias dos resultados das duas técnicas empregadas..... 91

FIGURA 11. Gráfico das médias obtidas na determinação de etanol realizada com Q.E.D A-150 e na determinação cromatográfica nos mesmos tempos, utilizando o coletor de saliva com ácido cítrico..... 93

FIGURA 12. Gráfico das médias obtidas na determinação de etanol realizada com Q.E.D A-150 e na determinação cromatográfica nos mesmos tempos, utilizando o coletor de saliva sem ácido cítrico..... 93

FIGURA 13. Gráfico das médias obtidas na determinação de etanol realizada com Q.E.D A-150 no Salivette® sem ácido cítrico e na determinação cromatográfica..... 94

FIGURA 14. Gráfico das médias obtidas na determinação de etanol realizada com Q.E.D A-150 no Salivette® com ácido cítrico e na determinação cromatográfica..... 94

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ADH	Álcool desidrogenase
AMP	Monofosfato de adenosina
AMPA	α amino- 3 hidroxi – 3 metil isocozal
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAS	Concentração de álcool no sangue
CEBRID	Centro Brasileiro de Investigações Domiciliares
CONTRAN	Conselho Nacional de Trânsito
CV	Coeficiente de variação
Dp	Desvio padrão
EAA	Aminoácidos excitatórios
EMIT	Técnica de enzimoimunoensaio homogêneo
f.o	fluid once
FRAT	Free Radical Assay Technique
GABA	Ácido gama – aminobutírico
GC/FID	Cromatografia gasosa com detector de ionização em chama
HDL	Lipoproteína de alta eficiência
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HS	*Headspace*

Kcal	Quilocaloria
LDL	Lipoproteína de baixa eficiência
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
MEOS	Sistema de oxidação microssomal do etanol
NADH	β – nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	β – nicotinamida dinucleotídeo fosfato
NCADD	National Council on Alcoholism and Drug Dependence
NIAA	National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism
NMDA	n- metil-d-aspartato
OMS	Organização Mundial de Saúde
PM	Peso molecular
Q.E.D A - 150	Detector quantitativo de etanol
R^2	Coeficiente de determinação
SAF	Síndrome alcoólica fetal
SENAD	Secretaria Nacional Antidrogas
SNC	Sistema nervoso central
TDX (FPIA)	Fluorescência polarizada
VCM	Volume corpuscular médio

Resumo

O uso nocivo do álcool acarreta problemas de saúde para o usuário e prejuízos na sociedade. Vários espécimes biológicos podem ser utilizados para verificar a exposição a bebidas alcoólicas. No trabalho foi investigada a utilização da saliva na determinação de etanol através das técnicas: enzimática Q.E.D. A-150 – de triagem - e cromatografia em fase gasosa, após separação por aquecimento, *Headspace* – de confirmação. O método foi padronizado, validado e aplicado em amostras de saliva provenientes de voluntários que ingeriram de maneira controlada bebida alcoólica. Em todas as amostras analisadas foi possível detectar a concentração de etanol, observando a existência de uma diferença entre os respectivos resultados das duas técnicas. Os resultados interindividuais apresentaram grande variabilidade nos mesmos tempos de coleta, apesar da ingesta equivalente de etanol. No estudo foi verificado que a saliva é uma matriz alternativa adequada para verificar a concentração de etanol em indivíduos expostos às bebidas alcoólicas.

Summary

The abuse of alcohol leads to health injury and causes damage to the society. Several biological matrices can be used to monitor exposure to alcoholic beverages. In this work, saliva was used in the determination of ethanol for both techniques: enzymatic Q.E.D. A-150 – screening test -, and headspace-gas chromatography - confirmation test -. The method was developed, validated and used for the analysis of saliva samples from volunteers who ingested alcoholic beverages in a controlled schedule. Ethanol was detected and in all samples, noticing a difference between the results of both techniques. Inter-volunteers results showed high variability for the same collection times, although the amount of ethanol ingested was equivalent. These results suggest that saliva is a good option for the in field determination of ethanol in exposed individuals to alcoholic beverages.

1. INTRODUÇÃO

O álcool é uma droga psicoativa, cujo consumo excessivo resulta em efeitos nocivos para o usuário e para a sociedade. É uma droga legalizada, tolerada sócio-culturalmente por todos os povos, sendo seu uso incentivado na sociedade (OLIVEIRA, 1999).

É a droga que provoca maior número de danos à saúde da população: é responsável por 90% das internações psiquiátricas e a cerveja - bebida alcoólica mais consumida no Brasil - é classificada pela Organização Mundial de Saúde como produto responsável pela mais alta taxa de mortalidade e de morbidade do mundo (NOTO, 1999; EPIDEMIOLOGIA, 2000; WHO, 2000).

Entre as conseqüências sócio-econômicas decorrentes de seu abuso é responsável por 60% dos acidentes de trânsito e está presente em 75% dos acidentes de trânsito com vítimas fatais (MOURÃO, *et al.,* 2000; CARVALHO *et al.,* 2002) No ambiente de trabalho o alcoolismo é responsável por 50% das faltas ao trabalho, aumenta três vezes o risco de acidentes e é a oitava causa de concessão do auxílio – doença pela Previdência Social (SÃO PAULO, s.d.).

O consumo de bebidas alcoólicas tem se tornado cada vez mais abusivo pela população e a faixa etária do início de sua utilização tem diminuído causando grande preocupação nas áreas de saúde e segurança pública (HADFIELD; MERCER & PARR, 2001; CARLINI, *et al.,* 2002).

Na área da segurança pública é citado em 70% dos laudos cadavéricos por mortes violentas na Grande São Paulo, 92% dos homicídios ocorrem próximos a bares ou com pessoas alcoolizadas e está relacionado em 39% das ocorrências policiais por ano (NOTO, 1999; MOURÃO, *et al.,* 2000).

Em termos de consumo só perde para a cafeína, gerando um grande contingente de dependentes, que no Brasil é de 11,2% da população (CARLINI, *et al.,* 2002). O alcoolismo foi responsável por 3.621 óbitos em indivíduos com idade inferior aos 40 anos , sendo destes 89% do sexo masculino (OLIVEIRA, 1999; PESSINI, 1999; BITTENCOURT, 2000).

Devido a esse contexto preocupante, medidas de prevenção, controle e redução do seu consumo têm sido adotadas, principalmente no trânsito e no ambiente de trabalho.

O Código Brasileiro de Trânsito, que entrou em vigor em 1997 (Lei n° 9.503, de 23 de setembro de 1997) apresenta na área de substâncias psicoativas o seguinte: proíbe dirigir sobre a influência de álcool ou de qualquer substância entorpecente; define o grau de alcoolemia que impede os motoristas de dirigir veículos automotores; permite a realização de análises para identificar os indivíduos infratores; e refere as penalidades para aqueles que infringirem o Código (BRASIL, 1997).

Um novo projeto de lei – PL 0735-03 - mais rígido sobre o assunto está em tramitação no Congresso Nacional, onde diminui o índice que comprova que o condutor se acha impedido de dirigir, de 0,6g/L para 0,3g/L.

No ambiente de trabalho a aplicação de Programas de prevenção e controle do uso de álcool e outras drogas, está bem estabelecida em muitos países, inclusive no Brasil (SILVA, 1999).

Uma das medidas eficazes para alcançar êxito na aplicação destes programas é a utilização das análises toxicológicas, que é considerada um importante instrumento para verificar o consumo de substâncias psicoativas. Diversas matrizes podem ser utilizadas para tal finalidade: urina, sangue, ar expirado e outras (CHROUCH, 1998; SILVA; YONAMINE & ODO, 1999).

As análises toxicológicas utilizadas para verificar a exposição a drogas são divididas em dois tipos: uma é de resposta imediata (triagem) e a outra de confirmação do resultado, considerada imprescindível para este tipo de finalidade.

Atualmente, para determinação de etanol na fase de triagem geralmente é utilizado o etilômetro, que mede a concentração no ar expirado e para a confirmação da alcoolemia é realizada a análise em sangue através da cromatografia em fase gasosa, após separação por aquecimento - *headspace.*

O uso do etilômetro é possível através da aplicação de um fator de conversão para estimar a concentração sanguínea. Esses equipamentos para terem assegurado a validade de seus resultados devem ser homologados pelo órgão competente de cada país e calibrados de acordo com normas estabelecidas pelo fabricante. Infelizmente, essa conduta não tem sido rotineiramente adotada no país (CARVALHO & LEYTON, 2000).

O sangue, embora seja considerada uma amostra de referência para verificação de intoxicação alcoólica do indivíduo apresenta algumas restrições para a sua ampla utilização – coleta invasiva e riscos de contaminação para o doador e para responsável pela coleta (SCHRAMM; SMITH & CRAIG, 1992; KIDWELL; HOLLAND & ATHANASELIS, 1998).

Recentemente, a saliva tem sido recomendada como matriz alternativa para análise de agentes terapêuticos, químicos e drogas de abuso como o álcool, devido às vantagens que apresenta com relação às amostras convencionais: coleta não invasiva e facilidade para aplicação em campo (DROBITCH & SVENSSON, 1992; JONES, 1995).

Na quase totalidade dos trabalhos encontrados na literatura os objetivos foram dirigidos para analisar possíveis correlações entre as concentrações de etanol existentes no sangue, ar expirado e/ou saliva. Os resultados demonstraram uma boa correlação entre a concentração no sangue e saliva (JONES, 1979a 1993; BATES & MARTIN, 1997; BENDTSEN, *et al.,* 1999; GUBALA & ZUBA, 2003).

No estudo foi investigada a utilização da saliva para verificar a exposição a bebidas alcoólicas através do desenvolvimento de um método analítico que englobasse as duas fases da análise: triagem e confirmação.

Na fase de triagem foi utilizado um sistema enzimático denominado de Q.E.D. A – 150, que consiste em um teste rápido para etanol, onde a leitura é feita diretamente na escala do dispositivo em miligramas por decilitro ou em porcentagem. Na fase de confirmação a técnica escolhida foi à cromatografia em fase gasosa, após separação por aquecimento, conhecida por *headspace.* Esta técnica é considerada de referência para análise de substâncias voláteis em materiais biológicos (MACCHIA *et al.,* 1995; CORRÊA & PEDROSO, 2000; GUBALA & ZUBA, 2002).

O sistema enzimático foi adotado por alguns autores na literatura científica como método de detecção de etanol em saliva em comparação com os resultados encontrados na utilização de outras técnicas em matrizes como o sangue e ar expirado (JONES, 1995; BATES & MARTIN, 1997; BENDTSEN *et al.,* 1999; BIWASAKA *et al.,* 2001).

Em levantamento bibliográfico realizado foi encontrado um número reduzido de trabalhos, onde se utilizou a cromatografia gasosa, após separação por *headspace* para determinar a concentração de álcool em saliva (MACCHIA *et al.,* 1995; GUBALA & ZUBA, 2002). Assim, foi desenvolvido este estudo para avaliar o uso da saliva como amostra para verificar a exposição a bebidas alcoólicas.

2. ASPECTOS TOXICOLÓGICOS

2.1. Consumo de bebidas alcoólicas

Registros arqueológicos revelam que os primeiros indícios sobre o consumo de álcool pelo ser humano datam de aproximadamente 6.000 a.C., sendo, portanto um costume extremamente antigo e que tem persistido por milhares de anos (AHMED, 1995).

Nas primeiras civilizações, as bebidas alcoólicas eram consideradas nutritivas, medicinais ou sagradas. A palavra uísque, originária do antigo gaulês *usquebaugh,* significa “água da vida” (HADFIELD; MERCER & PARR, 2001).

Na Idade Média os árabes introduziram na Europa a técnica de destilação para aumentar a concentração de etanol nas bebidas alcoólicas. Nesta época os alquimistas acreditavam que era o “elixir da longa vida”, e empregavam a palavra *al - kuhul* para a substância, significando também “água da vida” (HADFIELD; MERCER & PARR, 2001; FLEMING; MIHIC & HARRIS, 2001; LIMA, 2003).

No Brasil, os índios antes da chegada dos portugueses produziam o “cauim” - do tupi “ka wi” -, que era uma bebida fermentada obtida da mandioca cozida ou do suco de frutos como o caju ou milho. Com a chegada dos portugueses foram introduzidos outros tipos de bebidas como os vinhos, as cervejas, as aguardentes e outros destilados, de alto teor alcoólico (ACIOLI, 1999; SCIVOLETTO & MALBERGIER, 2003).

As bebidas alcoólicas são misturas geralmente constituídas de etanol, água, cereais, vegetais ou frutas e de outras substâncias: ácidos orgânicos, ésters, óleos essenciais e acetaldeído. São classificadas de acordo com o processo de fabricação - fermentação e destilação - e de seu teor alcoólico (ABEL, 1983; OSBORN, 1994).

Entre as bebidas fermentadas as mais consumidas são cerveja, vinhos e entre os destilados a cachaça, gim, rum, vodka, uísque, conhaque e outros.

A concentração de álcool varia muito de acordo com o tipo bebida. As cervejas têm graduação alcoólica em geral de 4 a 5%, mas apresentam outros tipos como *light* ou forte e ainda as denominadas *ice* ou d*ry* com maior teor alcoólico (WILLIANS, *et al.,* 1997). No Brasil, as cervejas têm graduação que variam de 3,0% a 6,2% (TABELA 1).

Outra bebida bastante consumida em nosso país são os diversos tipos de “chopp”, cujo teor de álcool é de aproximadamente 5%. Os vinhos – bebida também fermentada – apresentam concentração de etanol de 11 a 14% e do tipo *light* de aproximadamente 7%.

Os destilados são tipos de bebidas com teor alcoólico superior as bebidas fermentadas – de 35 a 54% - devido ao seu processo de obtenção (TABELA 2).

TABELA 1. Teores alcoólicos das principais cervejas produzidas no Brasil

TEOR ALCOÓLICO	MARCA DA CERVEJA	TEOR ALCOÓLICO	MARCA DA CERVEJA
< 0,5	BAVARIA (SEM ÁLCOOL)	4,7	NOVA SCHIN PILSEN
	KRONENBIER		SKOL PILSEN
			CINTRA
3,0	BRAHMA LIGHT		NOVA SCHIN MUNICH
		5,0	ANTARTICA PILSEN
3,7	MALZBIER (BRAHMA)		BOHEMIA PILSEN
			BRAHMA PILSEN
			ORIGINAL
			XINGU EXTRA
4,0	MALZBIER (ANTARCTICA)		
		5,07	POLAR EXPORT
4,3	BAVÁRIA	5,2	SKOL BEATS
	NOVA SCHIN MALZBIER		CARACU
4,4	XINGU		
		5,3	CERPA
4,5	CRYSTAL	5,5	BAVARIA PREMIUM
	ITAIPAVA		BRAHMA EXTRA
	KAISER SUMMER DRAFT		POLAR
			SERRA MALTE
4,6	KAISER PILSEN	5,6	BOHEMIA WEISS
4,7	PRIMUS	6,2	KAISER BOCK

Fonte: Levantamento efetuado nas embalagens originais dos produtos.

TABELA 2. Faixa de teor alcoólico dos principais destilados consumidos no Brasil.

DESTILADO	TEOR ALCOÓLICO
UÍSQUE	39 – 40%
CONHAQUE	38 – 39%
RUM	35 – 38%
GIM	43,5 – 45,3%
AGUARDENTE DE CANA	39 – 40%
CACHAÇA	39 – 43%

Fonte: Levantamento efetuado nas embalagens originais dos produtos.

A aguardente de cana surgiu no Brasil no período colonial, a partir das impurezas retiradas durante a fervura do caldo de cana, no processo de produção do açúcar (FERRAZ, 2003).

Na legislação - decreto n° 4.072 de 3 de janeiro de 2002 – é definida como produto alcoólico, obtido a partir da destilação do caldo de cana fermentado, podendo ser adicionada de açúcares até 6 gramas por litro e com teor alcoólico entre 38° e 54° GL. Já a cachaça é a denominação típica e exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil com graduação alcoólica de 38° a 48° GL, a 20°C e com características sensoriais peculiares (BRASIL, 2002a; FERRAZ, 2003).

A cachaça é a segunda bebida alcoólica mais consumida no país - mais de 70 milhões de doses diariamente -, perdendo apenas para a cerveja. A sua produção segundo dados apresentados pelo Programa de Desenvolvimento da Aguardente de Cana, Caninha e Cachaça tem representado cerca de 1,3 bilhões de litros com previsão para 2003 de 1,5 bilhões, faturando mais de 600 milhões de dólares (OLIVEIRA *et al.,* 2001).

Desde 1997, este destilado vem recebendo incentivo do Governo Federal, sendo incluída no Programa Especial de Exportação – PEE - com estimativas de exportação de 30 milhões de litros, ultrapassando os 14,5 milhões do ano de 2002 (OLIVEIRA *et al.,* 2001).

No Brasil grande consumo de bebidas alcoólicas também está associado ao fator econômico, por exemplo, uma garrafa de pinga pode custar menos que um litro de leite. A Organização Mundial de Saúde apresenta uma tabela de preços de bebidas alcoólicas em diversos países europeus comparando – os com o preço do lanche da principal rede mundial de *fast food.* Esses dados são apresentados na TABELA 3 (WHO, 2003b).

Como a Organização Mundial de Saúde não apresenta o perfil de preços no Brasil, foi verificado que o preço do lanche em questão é de aproximadamente 1,30 euros.

TABELA 3. Comparação de valores entre as doses de bebidas alcoólicas consumidas nos países europeus com o lanche da principal rede mundial de *fast food.*

PAÍS	DESCRIÇÃO DA DOSE	PREÇO – EUROS*
PORTUGAL	500 mL cerveja	0,53
	750 mL vinho	1,50
	700 mL destilado	4,67
	lanche	2,50
ITÁLIA	500 mL cerveja	1,66
	750 mL vinho	3,00
	700 mL destilado	14,85
	lanche	2,80
FRANÇA	500 mL cerveja	0,66
	750 mL vinho	2,29
	700 mL destilado	11,00
	lanche	3,00
ALEMANHA	500 mL cerveja	0,80
	750 mL vinho	2,20
	700 mL destilado	5,00
	lanche	2,65
IRLANDA	500 mL cerveja	2,10
	750 mL vinho	9,07
	700 mL destilado	13,09
	lanche	3,00
FINLÂNDIA	500 mL cerveja	1,87
	750 mL vinho	5,00
	700 mL destilado	20,09
	lanche	3,20

Fonte: WHO, 2003a.

* Euro = R$3,54 (cotação em 02/12/2003).

A TABELA 4 apresenta o consumo de bebidas alcoólicas em litros por pessoa no Brasil, de 1961 até 2000.

TABELA 4. Consumo de bebidas alcoólicas - cerveja, vinho e destilados - em litros por pessoa no Brasil, no período de 1961 até o ano de 2000.

ANO	CONSUMO TOTAL (L) POR PESSOA	CERVEJA	VINHO	DESTILADOS
2000	4.79	2.40	0.36	2.03
1999	5.03	2.56	0.39	2.07
1998	5.07	2.62	0.31	2.14
1997	5.15	2.64	0.32	2.19
1996	4.91	2.61	0.29	2.01
1995	5.27	2.82	0.41	2.04
1990	4.35	2.04	0.42	1.89
1985	3.79	1.42	0.44	1.93
1980	3.45	1.37	0.46	1.63
1975	2.97	0.87	0.44	1.66
1970	2.82	0.83	0.46	1.61
1965	2.62	0.72	0.44	1.46
1961	1.88	0.67	0.45	0.76

Fonte: WHO, 2003c

No Brasil, devido ao consumo crescente de bebidas alcoólicas, legislações específicas foram elaboradas como a lei nº 9.294 de 15 de julho de 1996, que dispõe sobre as restrições ao uso e à propaganda de produtos fumígeros, bebidas alcoólicas, medicamentos, terapias e defensivos agrícolas (BRASIL, 1996). Esta teve alguns dispositivos alterados, pela lei 10.167 de 27 de dezembro de 2000, que por sua vez foi recentemente modificada pela lei 10.702 de 14 de julho de 2003 (BRASIL, 1996; 2000b; 2003b).

Todos estes dispositivos legais regulamentam a propaganda sobre álcool no rádio e televisão em certos horários, restringe a inclusão de jovens e adolescentes vinculados a essas propagandas, além da proibição de venda de bebidas alcoólicas a menores de 18 anos (BRASIL, 2000b; 2003b).

Apesar dessas restrições, um número preocupante de adolescentes entre 10 e 12 anos consome em excesso bebidas alcoólicas (GALDUROZ & NOTO, 2000).

O Conselho Superior do CONAR, no dia 12 de setembro de 2003 aprovou uma completa revisão das normas éticas que regulamentam a publicidade de bebidas alcoólicas, no sentido de proibir a utilização de indivíduos menores de 25 anos em peças publicitárias e restringir o uso das figuras que possam ser associadas ao erotismo ou ao público infanto - juvenil nesse tipo de propaganda (CONSELHO NACIONAL DE AUTO – REGULAMENTAÇÃO PUBLICITÁRIA, 2003 a,b,c).

Este Código estabelece a distinção entre 3 categorias de bebidas: as normalmente consumidas nas refeições - cervejas e vinhos -; as demais bebidas alcoólicas, fermentadas ou destiladas (servida por doses) e a da categoria das *ice, coolers* apresentadas misturadas com água, suco ou refrigerante (CONSELHO NACIONAL DE AUTO – REGULAMENTAÇÃO PUBLICITÁRIA, 2003 a,b,c).

Apesar dessas leis, de campanhas de educação e advertência e até mesmo de restrições ao seu uso, o consumo tem aumentado de maneira preocupante e a dependência ao álcool é um problema que afeta milhões de indivíduos no Mundo. No Brasil o contingente de consumidores excessivos é de aproximadamente 10 milhões, representando um grave problema de saúde pública (LIMA, 2003).

Os critérios utilizados para determinar os conceitos de uso, abuso e dependência são complexos, sendo influenciados pela cultura, sociedade e variações individuais (CAETANO, 2002).

Segundo Glantz, (1992) o uso é definido como consumo controlado em termos de freqüência e quantidade, sem que sejam observados efeitos adversos para o usuário, ao contrário do uso abusivo.

Geralmente, os conceitos sobre os consumidores de bebidas alcoólicas são classificados de acordo com a quantidade – drinques - ingerida por dia ou por semana. A denominação de drinque e respectiva concentração de etanol são bastante variáveis entre os países. Na Inglaterra um drinque padrão equivale a 8g de etanol, no Japão a 19,75g e nos Estados Unidos a 12 g - 0,5 fluid once ou 11,61 mL. Contudo, na Inglaterra 1 *once* equivale a 28,41mL ou 22,30g de etanol (UNITED STATES, 1995; DUFOUR, 1999).

No Brasil, segundo a Secretaria Nacional Anti Droga (SENAD), um drinque padrão é representado por uma lata de cerveja - ± 300 mL -; ou uma taça de vinho - 120 mL -; ou 36 mL de uísque, pinga ou vodka - um pouco menos que uma dose comum no Brasil, que é de 50 mL - (BRASIL, 2000a).

Dawson, (1995) criou uma escala para diferenciar os consumidores de álcool, tendo por base o consumo de drinques em determinados períodos.

TABELA 5. Classificação do consumidor de bebidas alcoólicas de acordo com a quantidade ingerida em determinados períodos.

DENOMINAÇAO DO CONSUMIDOR	QUANTIDADE DE ÁLCOOL INGERIDA
“ABSTÊMIO”	Menos que 12 doses/ano
“LEVE”	1-13 doses/mês
“MODERADO”	4 – 14 doses/semana
“PESADO”	Mais de 2 doses/dia

Fonte: DAWSON, 1995.

O padrão de consumo de álcool também pode ser medido por unidades de bebida – UB -. Uma unidade de bebida equivale a 10 gramas de álcool puro. A obtenção das unidades-equivalentes de uma determinada bebida é feita multiplicando-se a quantidade da mesma por seu teor alcoólico, que é expresso em porcentagem ou em GL - Gay Lussac -. Obtido esse valor faz-se à conversão das unidades de bebida em gramas de etanol (MARQUES & RIBEIRO, 2002).

Entretanto, este tipo de abordagem não correlaciona a quantidade ingerida com a alcoolemia. A concentração sanguínea é variável, dependendo de vários fatores entre estes o metabolismo individual, raça e sexo. Por exemplo, nas populações asiáticas - chinesas e japonesas -, ocorre uma variação na ALDH – genes modificados que codificam a ALDH para ALDH2 -, sendo estes deficientes dessa enzima e dessa forma demonstram uma reação de sensibilidade ao álcool. Nas mulheres essa concentração é geralmente maior devido à diminuição do metabolismo de primeira passagem no estômago e da quantidade de partição de água ser menor que a do homem (JULIEN, 1998; RAMCHANDANI ; BOSRON & LI, 2001).

A tabela 6 apresenta a concentração sanguínea obtida de acordo com a quantidade e respectiva dose de bebida alcoólica ingerida.

TABELA 6. Concentração sanguínea de etanol, após meia hora da ingestão de quantidades variáveis de bebidas alcoólicas observadas em indivíduos com diferentes pesos corpóreos.

	PESO CORPORAL		
QUANTIDADE INGERIDA	**60 Kg**	**70 Kg**	**80 Kg**
		g/ L	
1 lata de cerveja 1 copo de vinho tinto 1 dose de uísque	0,27	0,22	0,19
2 latas de cerveja 2 copos de vinho 2 doses de uísque	0,54	0,44	0,38
3 latas de cerveja 3 copos de vinho 3 doses de uísque	0,81	0,66	0,57

Fonte: Extraída de Marques & Ribeiro, 2002

2.2 Abuso e dependência ao álcool

O álcool apresenta a capacidade de desenvolver um padrão de comportamento de uso abusivo devido aos seus efeitos farmacológicos agradáveis - reforço primário -, da aversão à síndrome de abstinência, do desenvolvimento de tolerância e de fatores individuais, ambientais e sociais - reforços secundários – (MÍDIO, 1992).

Estima-se que 90% da população adulta dos países civilizados consomem álcool com periodicidade, sendo que aproximadamente 50% possuem problemas temporários e 10 a 12% são dependentes (MARQUES & RIBEIRO, 2002).

Segundo levantamento domiciliar realizado em 107 cidades do país, 11,2% da população pesquisada é dependente de álcool, sendo responsável por mais de 90% dos casos de internações por dependência de drogas nos hospitais. O álcool é a droga que mais prejuízos trazem a sociedade, ocasionando 6,5 vezes mais mortes do que outras drogas ilícitas (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 1999; CARLINI, *et al.,* 2002).

Os problemas relacionados ao consumo de álcool não estão restritos ao uso crônico, pois qualquer padrão de consumo pode trazer complicações para o indivíduo. Mesmo os que bebem eventualmente podem abusar, levando a problemas sociais, físicos e psicológicos (MARQUES & RIBEIRO, 2002).

A Associação Psiquiátrica Americana apresenta os critérios para diagnosticar o uso abusivo de álcool (TABELA 7).

TABELA 7. Critérios para o diagnóstico de uso abusivo de álcool, conforme o DSM – IV.

A. Preenchimento de pelo menos 1 dos critérios, ocorrendo em um período de 12 meses

1. Uso recorrente da substância resultando em problemas no trabalho, escola (Ex: ausências, suspensões, indisciplina, ou expulsão); ou no lar (negligência dos deveres domésticos).

2. Uso recorrente de substâncias em situações em que há risco físico (dirigir veículos, operar máquinas).

3. Problemas legais pelo uso de drogas.

4. Uso persistente apesar de problemas interpessoais ou sociais causados ou exacerbados pelo uso de drogas.

B. Nunca ter preenchido os critérios para o diagnóstico de dependência.

Tabela baseada em American Psychiatric Association – Diagnostics and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition, Washington, DC, 1994. **Fonte:** Scivoletto & Malbergier, 2003.

Existem variações individuais qualitativas e quantitativas quanto à quantidade para causar a sensação de prazer, bem como no tempo de consumo para ocorrer dependência. A experiência clínica sugere que são necessários 10 anos ou mais para o desenvolvimento da dependência ao álcool. O número de anos varia de paciente a paciente e está relacionado como outros fatores: quantidade consumida, ambiente sócio–cultural e histórico familiar de problemas com o álcool (CAETANO, 2002).

Os critérios para definir a dependência a substâncias psicoativas são apresentados pela DSM – IV e por diversos autores e Instituições governamentais.

O conceito de dependência é apresentado na DSM-IIIR como: “sintomas comportamentais e fisiológicos que indica que uma pessoa tem prejuízo do controle do uso de uma substância psicoativa ou o uso contínuo dessa substância a leva para conseqüências adversas”. Este termo é utilizado alternadamente com o vício e com o alcoolismo (WHO, 1994).

A Organização Mundial de Saúde no Código Internacional de Doenças, designado - CID-10 - define a dependência como: “Conjunto de fenômenos comportamentais, cognitivos e fisiológicos que se desenvolvem, após repetido consumo de uma substância psicoativa, associados ao desejo incontrolável de usar a droga, à dificuldade de controlar o consumo, à utilização persistente apesar das suas conseqüências negativas, a uma maior prioridade dada ao uso da droga em detrimento de outras atividades e obrigações, a um aumento da tolerância pela droga e por vezes, a um estado de abstinência física (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1993).

Segundo a mesma Organização outra terminologia utilizada é a adicção ao álcool - ou outra droga -, que é caracterizada pelo uso freqüente desta substância de maneira que o usuário - denominado adicto - é periodicamente ou cronicamente intoxicado, apresenta compulsão ao uso da substância, tem grande dificuldade em cessar ou modificar o seu consumo e apresenta determinação em obter a droga através de qualquer meio. Tipicamente, há desenvolvimento da tolerância e quando há interrupção do uso é observada a síndrome de abstinência (WHO, 1994).

Os termos dependência física ou fisiológica e dependência psíquica ou psicológica são também, freqüentemente referidos, o primeiro está associado a o desenvolvimento de tolerância e síndrome de abstinência e o segundo aos fenômenos de desejo intenso e a compulsão (WHO, 1994).

Dá-se preferência ao uso do termo neuroadaptação, que é a alteração observada no sistema nervoso central devido a presença de uma substância psicoativa, após exposição única ou repetida, que se manifesta pelo aparecimento de transtornos físicos intensos quando o uso é interrompido - síndrome de abstinência - ou pela resposta diminuída para uma mesma concentração no sito de ação - tolerância farmacodinâmica – (MÍDIO, 1992).

Em resumo a essência da dependência é a incontrolável procura e uso compulsivo da droga, mesmo na presença de conseqüências negativas, sociais e à saúde do usuário (LESHNER, 2001).

O termo alcoolismo foi originariamente utilizado por Magnus Huss, em 1849 e foi reconhecido como doença psiquiátrica há 38 anos – 1965 - pela Associação Psiquiátrica Americana. Em meados de 1970, foi definido como doença crônica, progressiva e potencialmente fatal (JULIEN, 1998; UNITED STATES, 2002). Pela Organização Mundial de Saúde (OMS), como consumo de bebida alcoólica de forma continuada, causando prejuízos emocionais, sociais e físicos ao indivíduo (WHO, 1994).

Segundo o *National Council on Alcoholism and Drug Dependence* (NCADD) e a *American Society of Addiction Medicine* (ASAM), o alcoolismo é uma doença primária - não é sintoma de outras doenças -, crônica cuja manifestação e desenvolvimento são influenciados por fatores genéticos, psicossociais e ambientais (NCADD, 1990).

De acordo com Manual Diagnóstico e Estatístico da Associação Psiquiátrica Americana, 4° edição - DSM – IV - o estabelecimento do diagnóstico da dependência ao álcool requer a presença de pelo menos 3 dos 7 sintomas, em um período de um ano. Esses sintomas são apresentados na TABELA 8 (DESHMUKH, *et al.,* 2003).

A redução ou suspensão da ingestão de álcool em usuários crônicos, leva ao aparecimento de um conjunto de sinais e sintomas definidos como síndrome de abstinência do álcool. (MASTERS, 2003).

Os sintomas e severidades dessa síndrome são determinados pela quantidade e duração do consumo de álcool, sendo que no primeiro estágio ocorre tremores, náuseas, diarréia, sudorese, febre, insônia, irritabilidade, hipertensão e pupila dilatada. Essa fase pode ser acompanhada por convulsões tónico-clónicas e em casos severos por derrame cerebral, cerca de 12 a 48 horas após a última ingestão da bebida (CAETANO, 1996; BRIEN, 2001; FLEMING; MIHIC & HARRIS, 2001; RANG, *et al.,* 2001a; DESHMUKH, *et al.,* 2003).

Nas primeiras 48 horas, após a abstinência ao álcool, alguns indivíduos podem apresentar síndrome de abstinência com *delirium - delirium tremens -,* que é um estado neuropatológico caracterizado por confusão, alucinações - tipicamente visual ou táctil, menos comumente olfativa ou auditiva -, agitação, tremores, delírio, febre, taquicardia e hipertensão (FLEMING; MIHIC & HARRIS, 2001; RANG, *et al.,* 2001a).

Esses sintomas podem não aparecem isoladamente no dependente, ocorrendo em conjunção com infecções, traumas e desnutrição (BRIEN, 2001).

TABELA 8. Critérios para diagnóstico da dependência de álcool, conforme o DSM – IV.

Ocorrência de 3 ou mais critérios, em um período de 12 meses:

1. Tolerância caracterizada por uma das seguintes situações:
   a) Necessidade de aumentar a quantidade da substância utilizada para a obtenção dos mesmos efeitos.
   b) Diminuição do efeito, devido ao uso contínuo de mesma quantidade da substância.

2. Abstinência:
   a) Síndrome de Abstinência.
   b) Utilização da substância para aliviar ou evitar os sintomas de abstinência

3. A substância é utilizada freqüentemente em quantidades maiores ou por períodos maiores do que o indivíduo deseja.

4. Desejo persistente ou tentativas malsucedidas para diminuir ou controlar o uso.

5. O indivíduo gasta grande parte do seu tempo em atividades para a obtenção da substância, para usá-la ou recuperar-se de seus efeitos.

6. As atividades sociais, profissionais ou recreativas anteriormente importantes são abandonadas ou reduzidas devido ao uso da droga.

7. O uso da substância é mantido, apesar de problemas físicos e psicológicos recorrentes, sabidamente causados ou exacerbados pela droga.

Tabela baseada em American Psychiatric Association – Diagnostics and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition, Washington, DC, 1994. **Fonte:** Scivoletto & Malbergier, 2003.

O consumo excessivo de álcool por um extenso período de tempo leva ao desenvolvimento de tolerância (DRUMMER, 2001; MASTERS, 2003). Os consumidores crônicos não somente podem adquirem tolerância, mas também desenvolver a dependência, o que explicaria o intenso desejo de consumir a bebida pela manhã, devido à diminuição dos níveis de etanol no organismo durante a noite (BRIEN, 2001).

A tolerância é definida pela adaptação do sistema biológico a um agente químico que resulta na necessidade de doses maiores deste agente para obtenção de efeitos de mesma intensidade e duração que os obtidos originariamente Existem diversos tipos de tolerância: metabólica, farmacodinâmica, cruzada, aguda, crônica e reversa (KOSTEN & HOLLISTER, 2003; MÍDIO, 1992).

Segundo Julien, (1998) o desenvolvimento da tolerância ao álcool depende da quantidade consumida, do tipo de bebida e do tempo de consumo. Essa pode ser classificada em 2 tipos: tolerância metabólica, responsável por 25% dos casos e a tolerância farmacodinâmica - Tecidual ou Funcional -, sendo o tipo mais comum.

A tolerância cruzada é observada com o álcool e outras substâncias de mesma estrutura química e mecanismos de ação como os barbitúricos de baixa solubilidade lipídica e os benzodiazepínicos (KHANNA; CHAU & SHAH, 1996).

A tolerância crônica é desenvolvida depois da administração repetida de álcool por um período de dias ou semanas (HILTUNEN, 1996).

Além desses tipos é referida a existência de tolerância aguda, que seria dependente da dose e da experiência anterior no consumo de álcool. Moskowitz e Coworkers concluíram que a ocorrência da tolerância aguda independe da existência da tolerância crônica em consumidores crônicos (HILTUNEN, 1996).

Outra forma de tolerância, que difere das anteriores é a tolerância rápida, observada em resposta a segunda dose, ou seja, 8-24 horas, depois da exposição prévia a 1ª dose (KHANNA; CHAU & SHAH, 1996).

Brust, (1999) relata a existência de tolerância reversa, pois o organismo se encontra mais sensível a alguns efeitos do álcool e a experiência positiva causada por ela - “memórias emocionais” -, levaria o indivíduo ao uso contínuo ou até mesmo as recaídas. Este tipo de tolerância é caracterizado por uma hipersusceptibilidade adquirida pela utilização contínua de uma droga ou fármaco, quando os efeitos obtidos são de maior intensidade que os originalmente obtidos, nas mesmas condições de exposição.

Segundo Brien, (2001) outro tipo de tolerância observada é a inata, determinada geneticamente, podendo ocorrer no primeiro momento que a droga é utilizada, representando uma característica biológica que contribui para o desenvolvimento do alcoolismo.

2.3. Toxicocinética do etanol

O etanol é uma pequena molécula - <100 dalton -, solúvel em água e em gordura. Dessa forma é rapidamente permeável em todos os órgãos do corpo e afeta muito de suas funções vitais (LIEBER,1999; JONES & POUNDER, 1998; PIANO, 2002; MASTERS, 2003).

O etanol é rapidamente absorvido através do estômago - 20% - e do intestino delgado - 80% -, atingindo a concentração máxima sanguínea entre 30 e 90 minutos (JULIEN, 1998; SCIVOLETTO & MALBERGIER, 2003; LIEBER, 1999; RAMCHANDANI; BOSRON & LI, 2001).

Entre os fatores que podem influenciar na absorção são citados a presença de alimento no trato gastrintestinal e o teor alcoólico ingerido. A absorção é mais rápida quando nas concentrações de 15 a 30% de etanol e é comprometida em concentrações maiores que 30% devido à redução da motilidade gástrica, estimulação do suco gástrico e prejuízo da mucosa gástrica (ABEL, 1983).

Devido as suas características químicas e físico-químicas, o etanol é rapidamente distribuído por todos os fluidos corpóreos e tecidos. A quantidade de etanol nos tecidos pode variar, dependendo da massa corpórea e da quantidade de água entre os diferentes indivíduos (ABEL, 1983).

As barreiras hematencefálica e hematoplacentária são livremente permeáveis ao álcool. Os níveis de etanol no feto são semelhantes aos da mãe (JULIEN, 1998; PARKINSON, 2001; SCIVOLETTO & MALBERGIER, 2003;).

A biotransformação do etanol ocorre primeiramente no fígado, e uma pequena quantidade ocorre nos pulmões, rins e intestino (ABEL, 1983; BRUCKNER & WARREN, 2001).

Aproximadamente de 90 a 98% do álcool ingerido é biotransformado no fígado pela ação da enzima álcool desidrogenase. Essa biotransformação é relativamente constante na taxa de 15 – 18 mg/dL por hora (CONE, 1993; PARKINSON, 2001; PIANO, 2002; SCIVOLETTO & MALBERGIER, 2003).

A quantidade de etanol oxidada em um certo intervalo de tempo é proporcional ao peso corpóreo do indivíduo. Entretanto, uma pequena quantidade de etanol - 15% - é biotransformado pela enzima álcool desidrogenase gástrica responsável pelo metabolismo de primeira passagem do etanol. Esse metabolismo gástrico reduz a concentração de etanol no sangue. As mulheres apresentam menor nível da enzima álcool desidrogenase gástrica e conseqüentemente maiores níveis de etanol no sangue (JULIEN, 1998; JONES & POUNDER, 1998; WEATHERMON & CRABB, 1999).

Frezza *et al.,* em 1990 para comprovar esse fato realizaram um estudo comparativo entre homens e mulheres, que consumiram as mesmas quantidades de etanol. As mulheres apresentaram maior concentração de álcool no sangue do que os homens. Isso ocorre nas mulheres devido a menor quantidade de água no organismo e menor metabolismo de primeira passagem por apresentarem quantidades diminuídas da enzima álcool desidrogenase gástrica.

O metabolismo do etanol ocorre por 3 vias de ação: álcool desidrogenase – ADH -, no sistema de oxidação microssomal do etanol – MEOS - e no sistema da catalase. A principal via de biotransformação do etanol envolve a álcool desidrogenase, enzima que contém zinco e que catalisa a conversão do etanol para acetaldeído (OSBORN, 1994; AHMED, 1995; MOSLEN, 2001; PARKINSON, 2001; SCIVOLETTO & MALBERGIER, 2003; MASTERS, 2003).

O etanol em concentrações maiores também sofre biotransformação pela ação do citocromo P450, principalmente a isoforma CYP2E1, do sistema de oxidação microssomal – MEOS - utilizando o NADPH como cofator. A CYP2E1 também tem uma alta capacidade para biotransformar algumas drogas conhecidas, como o paracetamol, para seu metabólico tóxico que pode promover a carcinogênese. Por outro lado a ingestão aguda de etanol pode inibir a biotransformação de algumas drogas por competição através de uma pequena parcela da via microssomal. As interações do álcool com outros medicamentos serão abordados mais a diante (OSBORN, 1994; AHMED, 1995; LIEBER, 1999; MOSLEN, 2001; PARKINSON, 2001; SCIVOLETTO & MALBERGIER, 2003; MASTERS, 2003).

A terceira via do metabolismo do etanol, a catalase, contribui com 10% da biotransformação do etanol. No interior dos peroxissomas, o etanol é oxidado com formação de acetaldeído, sendo necessário o consumo de peróxido de hidrogênio que é transformado em água (LIEBER & ABITTAN, 1999).

O acetaldeído resultante das 3 vias de biotransformação do etanol é convertido em ácido acético pela enzima aldeído desidrogenase, utilizando o NADH como cofator. Grande parte desse ácido acético entra como acetil coA no ciclo de Krebs, oxidando totalmente o CO_2 e a H_2O. Durante esse processo ocorre o desprendimento de 7,2 calorias por grama de álcool. Os processos de biotransformação são mostrados na FIGURA 1 (OSBORN, 1994; AHMED, 1995; ABBOTT, 1996 MOSLEN, 2001; PARKINSON, 2001; SCIVOLETTO & MALBERGIER, 2003; MASTERS, 2003).

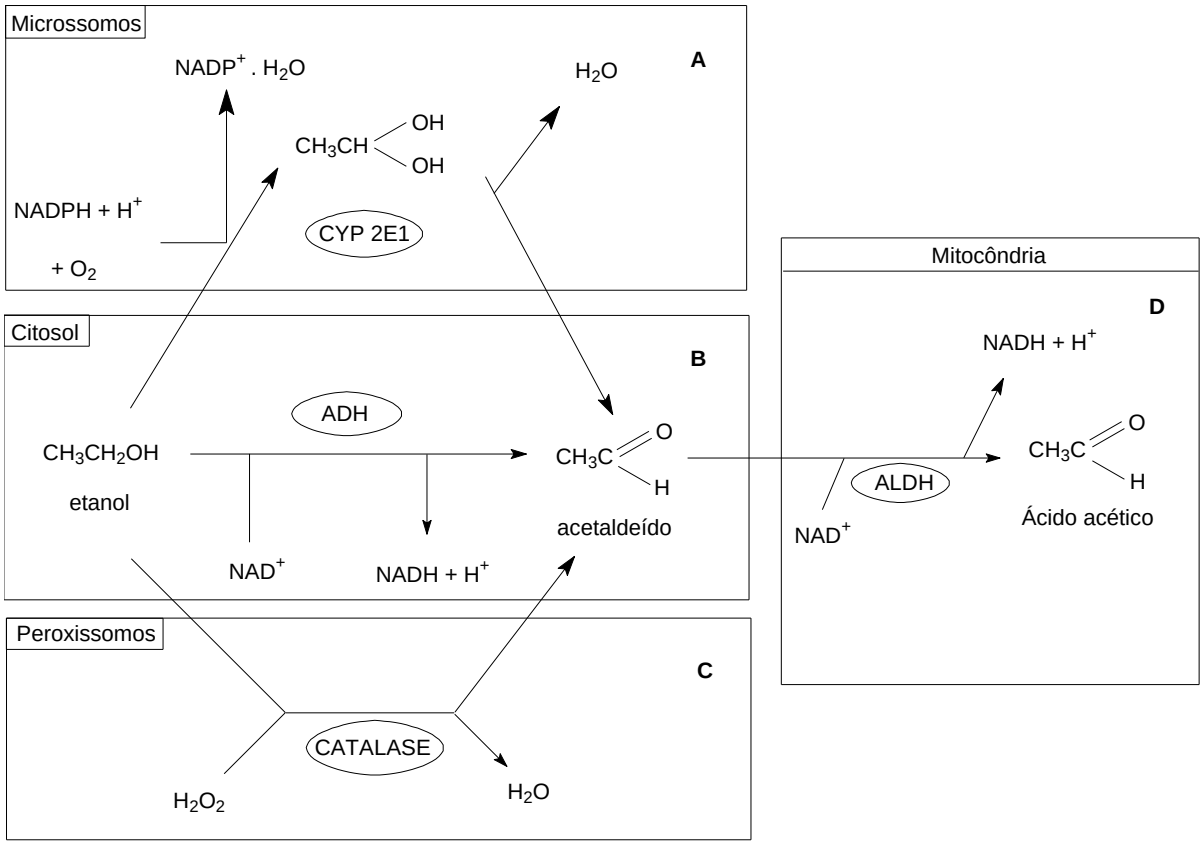


FIGURA 1. Processos de biotransformação do etanol: **A** - Sistema de oxidação microssômica – MEOS -, **B** – Enzima álcool desidrogenase – ADH -, **C** – Sistema de catalase e **D** – Enzima aldeído desidrogenase (PARKINSON, 2001).

A biotransformação do etanol pode ser afetada por diversos fatores como o aumento da enzima álcool desidrogenase, após o consumo crônico. Outro fator que afeta a biotransformação é a dieta. A frutose, por exemplo, estimula a oxidação do álcool e a deficiência de proteínas causa a diminuição de ADH - álcool desidrogenase - (ABEL,1983; MASTERS, 2003).

Aproximadamente, 2% do álcool ingerido são excretados inalterados principalmente através dos rins e pulmões. Quando grandes quantidades de etanol são ingeridas cerca de 10% não são oxidados. Pequenas quantidades de etanol podem ser encontradas no suor, lágrima, bile, suco gástrico, na saliva e outras secreções (LARINI & SALGADO,1997; HOBBS; RALL & VERDOORN, 1996; RAMCHANDANI; BOSRON & LI, 2001).

Na TABELA 9 são apresentados os parâmetros químicos - toxicológicos do etanol (ABBOTT, 1996).

TABELA 9. Parâmetros químico-toxicológicos do etanol.

peso molecular	46,07
solubilidade em água	SOLÚVEL
estrutura	C_2H_6O
vias de administração	ORAL
duração do efeito (h)	2-6
meia vida plasmática (h)	2-14
volume de distribuição (l/kg)	0,6
clearence (ml/min/kg)	DEPENDE DA DOSE
% excretada	2-10%
dose tóxica (mg/dl)	100
níveis sanguíneos tóxicos (mg/dl)	100-400

Fonte: MOFFAT, *et al.,* 1986

2.4. Efeitos do etanol

O álcool pode provocar intoxicações agudas e crônicas. A expectativa de vida para os dependentes é menor em 10 a 12 anos em comparação com a população geral (LIMA,2003).

Os sinais e sintomas da intoxicação alcoólica ocorrem por níveis crescentes de depressão do sistema nervoso central. Inicialmente há um estado de excitação e euforia leve, evoluindo para tontura, ataxia e incoordenação motora. Depois, para confusão e desorientação, atingindo graus variáveis de anestesia, com dificuldades de respiração, estupor e finalmente o coma alcoólico (MARQUES & RIBEIRO, 2002)

Os efeitos psicológicos e comportamentais dos vários níveis de alcoolemia são apresentados na TABELA 10, de acordo com dois autores diferentes.

TABELA 10. Efeitos do consumo de álcool apresentado por dois autores de acordo com a alcoolemia.

Concentração de álcool no sangue (g/L)	Sinais e Sintomas	
	MILHORN, 1990	**MARQUES & RIBEIRO,2003**
0,2	Sensação de calor e relaxamento	
0,3		Excitação e euforia
0,4	Relaxamento e pele ruborizada	
0,5	Vertigem, desinibição, diminuição do autocontrole e da capacidade de julgamento, coordenação levemente comprometida	Incoordenação motora discreta, alteração do humor, personalidade e comportamento
0,6	Julgamento e crítica prejudicados, processos de tomada de decisões afetados – como dirigir-	
0,8	Coordenação motora comprometida, diminuição dos reflexos, sensação de dormência na face e extremidades do corpo	
1,0	Dificuldades nas articulações das palavras, "lentificação dos reflexos, deterioração do controle dos movimentos voluntários	Incoordenação motora pronunciada com ataxia, piora dos reflexos e do humor
1,5	Prejuízo do equilíbrio e movimento	
2,0	Fala pastosa, perda do equilíbrio, visão dupla	Piora da ataxia, náuseas, vômitos
3,0	Confusão, estupor, pode ocorrer perda da consciência	Amnésia, hipotermia, anestesia
4,0	Inconsciência, pele fria e úmida	Coma morte (bloqueio respiratório central)
4,5	Freqüência respiratória diminuída	
5,0	Morte por depressão do centro respiratório	

Fonte: Adaptada de MILHORN, 1999 e MARQUES & RIBEIRO, 2003**.**

2.4.1. No Sistema Nervoso Central (SNC)

Os principais efeitos agudos do etanol ocorrem no sistema nervoso central, onde suas ações depressoras assemelham-se às dos anestésicos voláteis (MASTERS, 2003). O seu consumo crônico afeta negativamente o cérebro, podendo causar lesões de origem múltipla e multifatorial (NEIMAN, 1998).

Na célula, o efeito do etanol é puramente depressor, embora ele aumente a atividade dos impulsos por desinibição em algumas partes do SNC, principalmente nos neurônios dopaminérgicos mesolímbicos envolvidos nas vias de gratificação (RANG *et al.,* 2001a).

As principais teorias sobre a ativação do etanol são:

• exacerbação da inibição mediada pelo GABA, semelhante à ação dos benzodiazepínicos;

• inibição do ingresso de cálcio através dos canais de cálcio controlados por voltagem;

• inibição da função dos receptores de glutamato (HOBBS; RALL & VERDOORN, 1996; FLEMING; MIHIC & HARRIS, 2001).

O álcool potencializa a ação do GABA - ácido gama-aminobutírico - por atuar sobre os receptores $GABA_A$ semelhante à ação dos benzodiazepínicos, que mimetizam ou intensificam muitos dos efeitos agudos causados por ele (OSBORN, 1994; JONES & POUNDER, 1998; MORROW *et al.,* 2001).

O etanol aumenta a inibição sináptica mediada pelo GABA e pelo fluxo de cloreto, sendo esta ação também considerada como mecanismo de ação. Esse efeito e outras ações sedativas e motoras são inibidos pela bicuculina, um antagonista específico dos receptores GABAérgicos. No uso crônico, foi constatada nos níveis plasmáticos uma diminuição da função dos receptores $GABA_{A,}$ resultando na síndrome de abstinência (OSBORN, 1994; HOBBS; RALL & VERDOORN, 1996; BITTENCOURT, 2000; FLEMING; MIHIC & HARRIS, 2001; MORROW *et al.,* 2001).

O etanol inibe a liberação de transmissores que ocorre como resposta à despolarização da terminação nervosa, sem afetar a liberação provocada pelos ionóforos do cálcio. Em consonância, com esta ação verificou-se que o etanol inibe nos neurônios abertura dos canais de Ca^+ - elemento importante na função de neurotransmissão -, sensíveis à voltagem (HOFFMAN & TABAKOFF, 1993; LITTLE, 1995; DIAMOND, 1994).

Na privação do etanol, ocorre um excesso de canais e aumento do fluxo de Ca^+, resultando em uma situação excessiva de transmissão, que contribui para a Síndrome de Abstinência (NUTT & PETERS, 1994).

Os efeitos excitatórios do glutamato são inibidos pelo etanol em concentrações semelhantes aquelas que produzem efeitos no SNC. A ativação do receptor NMDA - N-metil-D-aspartato - é inibida por concentrações menores de etanol do que aquelas necessárias para afetar os receptores AMPA - α amino-3-hidroxi-3-metil-isoxazol -. Esses receptores fazem parte dos subtipos dos aminoácidos excitatórios denominados EAA, ou seja, transmissores que medeiam respostas sinápticas excitatórias rápidas do SNC (HOFFMAN & TABAKOFF, 1993; FLEMING; MIHIC & HARRIS, 2001; HADFIELD; MERCER & PARR, 2001).

Esses efeitos possivelmente contribuem para as suas ações depressoras, inclusive, para os distúrbios de memória, pois os receptores do NMDA desempenham importante papel no tipo de plasticidade sináptica ao longo prazo, responsável pela memória (JULIEN, 1998).

Outros efeitos do etanol atuantes sobre diversos sistemas de neurotransmissores e neuroreceptores:

• Sistema adrenérgico: o uso crônico de álcool aumenta a síntese e liberação de noradrenalina, com isso ocorre uma diminuição da sensibilidade pós-sináptica, evidenciada pela diminuição da resposta de AMPcíclico à noradrenalina.

• Serotonina: elevação dos níveis de serotonina através do uso de inibidores seletivos da recaptura da serotonina diminui a preferência e o consumo de álcool nos animais.

• Acetilcolina: em uso agudo, o álcool diminui a atividade colinérgica, no uso crônico ocorre tolerância (RANG *et al.,* 2001a; SCIVOLETTO & MALBERGIER, 2003).

Além dos efeitos agudos do etanol sobre o sistema nervoso, a administração crônica também gera diversas síndromes neurológicas irreversíveis como o quadro de encefalopatia de *Wernicke* caracterizada por paralisia do músculo ocular externo, ataxia, distúrbio na locomoção e confusão e/ou Síndrome de *Korsakoff*, que constitui em uma desordem permanente do cérebro decorrente de anormalidades nas funções cognitivas e emocionais, com incapacidade de aprendizado, de memorização e de reconhecimento de emoções (AHMED, 1995; THERAPONDOS; DELAHOOKE & HAYES, 1999; DRUMMER, 2001; HADFIELD; MERCER & PARR, 2001; MASTERS, 2003).

Essas síndromes podem ser devidas ao próprio etanol ou a seus produtos de biotransformação como o acetaldeído ou os ésteres de ácidos graxos - metabolismo não oxidativo -. A maioria dos dependentes evidencia um grau de demência, tornando-se apáticos e com pensamentos empobrecidos. Também se observa ocorrência de degeneração cerebelar que leva a incoordenação motora, neuropatias periféricas e miopatia. Algumas dessas alterações não são devidas ao álcool propriamente, mas a uma deficiência concomitante de tiamina, associado a traumas freqüentes, a deficiência de vitaminas e a desnutrição (THERAPONDOS; DELAHOOKE & HAYES, 1999; DRUMMER, 2001; HADFIELD; MERCER & PARR, 2001; MASTERS, 2003).

2.4.2. No Sistema Cardiovascular

O álcool age no sistema cardiovascular produzindo uma vasodilatação cutânea, de origem central, diminuindo a temperatura corpórea – hipotermia -. Também causa depressão da atividade celular, podendo ocasionar arritmias cardíacas, fibrilação atrial, inflamação do músculo cardíaco – miocardite -, semelhante aos sintomas da doença congestiva cardíaca, depressão da contratilidade do miocárdio, hipertensão e elevação do colesterol sérico. O uso crônico está associado a doenças do coração que pode resultar em fibrose miocárdica (LORIMIER, 2000; DRUMMER, 2001; RANG *et al.,* 2001b; BRUCKNER & WARREN, 2001; RAMOS, *et al.,* 2001; PIANO, 2002; MASTERS, 2003; MUKAMAL; CONIGRAVE & MITTLEMAN, 2003).

Em contrapartida vários estudos têm relatado que o consumo moderado de bebida alcoólica, doses pequenas de etanol consumidas diariamente, poderia reduzir o risco de problemas cardíacos, arteriosclerose e certos tipos de doenças, bem como, a redução do risco de osteoporose em mulheres na fase de menopausa. Esse efeito protetor ocorre porque o álcool induz o aumento de HDL no sangue com correspondente decréscimo da LDL (JULIEN, 1998; DUFOUR, 1999; LORIMIER, 2000; MUKAMAL; CONIGRAVE & MITTLEMAN, 2003).

A HDL é um fator de proteção do organismo contra a formação de placas de ateroma, e conseqüentemente reduz a probabilidade de doenças cardiovasculares. E também porque ele age sobre as lipoproteínas plasmáticas, que são moléculas transportadoras de colesterol e outros lipídios na corrente sanguínea (THERAPONDOS; DELAHOOKE & HAYES*,* 1999; RANG, *et al.,* 2001b; SCIVOLETTO & MALBERGIER, 2003).

É possível que o etanol tenha um efeito protetor em relação à cardiopatia isquêmica por inibir a agregação plaquetária. No homem a magnitude desse efeito depende crucialmente da ingesta de gordura na dieta, e a extensão de sua importância clínica ainda não foi esclarecida (THERAPONDOS; DELAHOOKE & HAYES, 1999; RANG, *et al.,* 2001b).

2.4.3. No Sistema Hematológico

No uso crônico de etanol pode ocorrer elevação do volume corpuscular médio – VCM - devido à deficiência de ácido fólico, levando em muitos casos a anemia megaloblástica, plaquetopenia e leucopenia. A intoxicação pode predispor para trombocitopenia e a disfunção plaquetária (THERAPONDOS; DELAHOOKE & HAYES, 1999; FLEMING; MIHIC & HARRIS, 2001; MASTERS, 2003).

2.4.4. No Sistema Endócrino

O uso crônico de álcool pode provocar diminuição da libido, impotência, esterilidade e hipoglicemia. Aumenta o débito de hormônios esteroides suprarrenais por estimular a hipófise anterior a secretar ACTH. Contudo, o aumento da hidrocortisona plasmática observada nos dependentes deve-se parcialmente a inibição do metabolismo hepático da hidrocortisona pelo etanol (AHMED, 1995; HOBBS; RALL & VERDOORN, 1996).

Os dependentes crônicos do sexo masculino costumam evidenciar sinais de feminização, associados a uma disfunção da síntese testicular de esteroides. Contudo, a indução das enzimas microssômicas hepáticas pelo etanol e conseqüentes aumento da taxa de inativação da testosterona também contribui para a feminização (RANG, *et al.,* 2001a; HOBBS; RALL & VERDOORN, 1996).

2.4.5. No Sistema Geniturinário

O álcool exerce um efeito diurético, bastante peculiar no corpo por aumentar a excreção de fluidos como resultado de um efeito da função renal por decréscimo de reabsorção tubular de água e decréscimo da secreção de vasopressina, ou seja, do hormônio antidiurético. Essa diurese não é persistente, desenvolvendo rapidamente tolerância a esse efeito (DRUMMER, 2001; FLEMING; MIHIC & HARRIS, 2001).

2.4.6. No Sistema Gastrintestinal

O etanol aumenta a secreções de saliva e gástrica. Isso ocorre, parcialmente devido a um efeito reflexo produzido pelo paladar e pela sua ação irritante. Também pode provocar secreção gástrica por ação indireta sobre o estômago que inclui possivelmente a liberação de gastrina (OSBORN, 1994).

O consumo intenso gera uma lesão direta da mucosa gástrica que pode resultar em gastrite; úlceras de estômago, duodeno e pancreatite aguda e crônica. Também apresentam diarréias crônicas, decorrentes da má absorção de alimentos no intestino delgado (ABBOTT, 1996; FLEMING; MIHIC & HARRIS, 2001; RANG *et al.,* 2001a).

Existem relatos que o consumo de bebidas alcoólicas pode estar associado a cânceres de boca, faringe, laringe e esôfago, especialmente em tabagistas (LORIMIER, 2000; BUCKENER & WARREN, 2001; DRUMMER, 2001; FLEMING; MIHIC & HARRIS, 2001).

Para o fígado as conseqüências mais comuns do consumo excessivo de álcool são: esteatose hepática; hepatite alcoólica e cirrose, sendo essa última de caráter irreversível. Aproximadamente de 15 a 20% dos dependentes crônicos desenvolvem cirrose no período de 20 a 30 anos e destes cerca de 20% podem apresentar infecção de hepatite C , devido ao fato destes estarem mais expostos a fatores de risco, como uso de drogas injetáveis e necessidade de transfusões sanguíneas (DRUMMER, 2001; FLEMING; MIHIC & HARRIS, 2001; JAMAL & MORGAN, 2003; MASTERS, 2003).

No fígado ocorre um aumento do acúmulo de gordura - fígado gorduroso -, que progride para uma hepatite - inflamação do fígado - e termina por conduzir a necrose e fibroses hepáticas irreversíveis, que constitui a cirrose, onde ocorre uma deposição de fibras ao redor das veias centrais - esclerose hialina central - (FLEMING; MIHIC & HARRIS, 2001; MOSLEN, 2001).

Segundo, Rang *et al.,* (2001a), os principais fatores para o acúmulo de gordura no fígado são:

• aumento da liberação de ácidos graxos pelo tecido adiposo decorrente do aumento da tensão, gerando uma descarga simpática.

• disfunção da oxidação dos ácidos graxos em virtude da carga metabólica imposta pelo próprio etanol.

O desvio de fluxo sanguíneo do sistema porta pode gerar o desenvolvimento de varizes esofagianas, que podem sangrar de maneira súbita e catastrófica.

Outros fatores podem contribuir para a lesão hepática, como a desnutrição, pois um dependente supre suas necessidades calóricas com o próprio etanol. Duzentos gramas de etanol - 1 garrafa de uísque - produzem cerca de 1400 Kcal. Contudo, ao contrário de uma dieta normal, não fornecem vitaminas, aminoácidos ou ácidos graxos (RANG *et al.,* 2001a).

A insuficiência hepática pode provocar um quadro de encefalopatia grave e potencialmente letal, além de outros efeitos sistêmicos de falência hepática. A incidência global de hepatopatia crônica parece ser uma função do consumo cumulativo de etanol com o passar dos anos (SCIVOLETTO & MALBERGIER, 2003).

2.4.7. No Desenvolvimento Fetal

No início da década de 70, ficou demonstrado que o etanol e seus metabólitos apresentavam múltiplos efeitos bioquímicos e fisiopatológicos, com potencial de causar alterações no desenvolvimento fetal nos vários estágios da gravidez (ROSETT, 1979).

Em 1973, o termo Síndrome Alcoólica Fetal – SAF- foi elaborado para designar um padrão específico de dimorfismos e retardo do crescimento em crianças de mães dependentes (JULIEN, 1998; DRUMMER, 2001).

A síndrome é caracterizada por combinações de vários componentes, incluindo mútiplos abortos espontâneos e alguns aspectos característicos como:

- Desenvolvimento anormal da face, com olhos afastados, fissuras palpebrais encurtadas, lábio leporino e malares pequenos.

- Redução da circunferência craniana – microencefalia -.

- Retardo na taxa de crescimento corpóreo.

- Retardo mental de gravidade variável e anormalidades comportamentais como hiperatividade e dificuldade de integração social.

- outras anormalidades anatômicas como, por exemplo, anormalidades cardíacas congênitas - defeito do septo ventricular -, mal formação dos olhos, ouvidos, pés e mãos (BRIEN, 2001; DRUMMER, 2001; SCIVOLETTO & MALBERGIER, 2003).

Estima-se que a incidência global de SAF, seja de 1 a 2 por 1000 nascimentos vivos. Essa incidência correlaciona-se fortemente com consumo materno de álcool durante a gravidez e é de cerca de 19% em mães que bebem – em média - um mínimo de 4 unidades diárias de bebidas durante a gestação (RANG *et al.,* 2001a).

2.5. Interação do Etanol com Fármacos

Numerosos medicamentos interagem com o etanol podendo ocasionar alterações no metabolismo ou nos efeitos do álcool e/ou dos fármacos, resultando em sérias conseqüências para a saúde do indivíduo. O uso concomitante de álcool e medicamentos pode causar náusea, vômitos, cefaléias, perda da coordenação motora, problemas cardíacos, dificuldades respiratórias e outros sintomas (DEITRICH & PETERSEN, 1979; UNITED STATES, 2002).

As interações álcool-medicamentos podem ser classificadas em 2 categorias gerais: farmacocinética e farmacodinâmica. A interação farmacocinética ocorre quando o álcool interfere diretamente com o metabolismo normal da medicação de 2 formas: diminuindo a excreção do medicamento por competição com a enzima P_{450} ou acelerando o metabolismo do medicamento, porque o álcool aumenta a atividade do citocromo P_{450} (ADAMS, 1995; WEATHERMON & CRABB, 1999).

A interação farmacodinâmica não envolve a ativação ou inibição da enzima, mas se refere aos efeitos aditivos do álcool e de certos medicamentos. Nesse tipo de interação, que ocorre mais comumente no Sistema Nervoso Central, o álcool altera os efeitos do medicamento sem alterar a concentração desse no sangue. Por exemplo, os efeitos depressores causados pelo consumo moderado de álcool, como comprometimento da oordenação motora e da capacidade de julgamento, são potencializados pela ingestão de sedativos-hipnóticos, anticonvulsivantes, antidepressivos, ansiolíticos ou narcóticos. As várias interações entre o álcool eos medicamentos são mostrados na TABELA 6 (ADAMS, 1995; WEATHERMON & CRABB, 1999; SCIVOLETTO& MALBERGIER, 2003).

TABELA 11. Interações entre o álcool e várias classes de medicamento.

Classe de medicamentos	Princípio Ativo	Especialidade	Tipo de interação
Antihistamínicos	Difenidramina Clorfeniramina Hidroxizina Prometazina	Benadryl Benegrip Hidroxine Fenergan	* O álcool aumenta os efeitos desses medicamentos no SNC, como sonolência, sedação e diminuição da coordenação motora. * As interações são mais pronunciadas em idosos.
Antidiabético	Clorpropamida Glipizida Metformina	Diabinese Glipgen Glifage	* O consumo de álcool por diabéticos que tomam esses medicamentos pode aumentar o risco de hipoglicemia. * A metformina pode causar aumento dos níveis de ácido lático no sangue depois do consumo de álcool.
Anticonvulsivante (Barbitúricos)	Fenobarbital	Gardenal	* Consumo crônico de álcool aumenta a biotransformação do barbitúrico pelo citrocromo P450. * O álcool aumenta os efeitos sedativo e hipnótico no SNC.
Hipnóticos-sedativos (Benzodiazepínicos)	Clordiazepóxido Clonazepam Diazepam Lorazepam Midazolam	Menotensil Rivotril Valium Lorax Dormonid	* O álcool aumenta os efeitos desses medicamentos no SNC, como, sonolência, sedação e diminuição da coordenação motora.

Continuacão da Tabela 11.

Histamínicos H_2	Cimetidina Ranitidina	Tagamet Antak Logat	* Esses medicamentos inibem a ADH gástrica, dessa forma reduzem o metabolismo de primeira passagem para o álcool. Como resultado há maior nível de álcool no sangue para aquela determinada dose.
Relaxantes musculares	Carisoprodol Ciclobenzaprina	Tandrilax Miosan	* O consumo de álcool aumenta o prejuízo das abilidades físicas como dirigir e aumenta a sedação. * O Carisoprodol produz um efeito semelhante aos opióides quando tomado com álcool. Utilizado algumas vezes como uma droga de rua – *street drug*
iinflamatórios não-esteróides	Ibuprofeno Naproxeno Diclofenaco	Reuplex Flanax Voltaren	* O consumo de álcool associado a esses medicamentos aumenta o risco de sangramento gastrintestinal.
Opióides	Codeína Morfina Meperidina Fentanila	Tylex Dimorf Dolantina Durogesic	* O álcool aumenta os efeitos desses medicamentos no SNC, como sonolência, sedação e diminuição da coordenação motora.
Sedativos e hipnóticos	Meprobamato Hidrato de Cloral	Equanil Noctec	*** O álcool inibe o metabolismo desses medicamentos e produz um efeito depressor no SNC que inclui sonolência, desorientação e confusão .**
Antidepressivos tricíclicos	Amitriptilina Imipramina Nortriptilina	Anafranil Tofranil Pamelor	*** O consumo de álcool aumenta o risco de sedação e queda abrupta de pressão quando a pessoa está de pé.**
Medicamentos fitoterápicos	Camomila Echinacea purpúrea	Várias preparações	* O álcool pode acentuar a sonolência, associado com essas preparações fitoterápicas.

Fonte: Adaptada de WEATHERMON & CRABB, 1999 e DEF 2002/03.

Existem no mercado alguns medicamentos e soluções orais antissépticas que contêm etanol em suas composições, estes não deveriam ser administrados ou utilizados por pessoas com distúrbios hepáticos ou até mesmo nas populações asiáticas - japoneses e chineses - com variações no gene da enzima ALDH, apresentando reações desagradáveis na presença de etanol (LIEBER & ABITTAN, 1999; RAMCHANDANI; BOSRON & LI, 2001).

Com a finalidade de identificar medicamentos que contém álcool em sua formulação, sendo vendidos livremente e sem prescrição médica foi realizada uma pesquisa em farmácias de São Paulo, apresentando os seguintes resultados:

- A maioria das bulas e embalagens não fornecia informações precisas sobre a presença de álcool em sua formulação.

- Biotônico Fontoura®, Água Inglesa® e Tônico Blumen® especialidades farmacêuticas indicadas como estimulantes do apetite relatam apenas a utilização de tintura, que é um veículo com teor alcoólico na faixa de 50 a 70%, sendo posteriormente diluído na preparação das especialidades. O Biotônico Fontoura® apresentou durante décadas em sua formulação a presença de álcool em concentrações apreciáveis.

- A Água de Melissa® utilizada como calmante e antiflatlulento apresenta em sua embalagem a seguinte informação:

A cada 5 mL: álcool.....3,750 mL
excipiente.....5 mL

O produto apresenta um volume total de 50 mL e a posologia para diluir 1 colher de “chá” - 5 mL - em água. A quantidade de água para a diluição não é mencionada.

- Também foram encontradas as especialidades indicadas como calmantes Maracugina®, Pasalix® e Calman® - que apresentam em sua composição extratos fluidos ou alcoolato, com teores alcoólicos semelhantes às tinturas.

- Nos medicamentos homeopáticos, o álcool etílico está presente na tintura – mãe, na qual é utilizada para as suas manipulações. Os Florais de Bach são exemplos desse tipo de medicamento, onde há associações de essências de flores e conhaque.

- Os fitoterápicos também utilizam soluções alcoólicas para extrair o princípio ativo das ervas medicinais empregadas em sua formulação, recebendo a denominação de alcoolato.

Zago, *et al.,* (2003) relata um caso clínico de reincidência de abuso de álcool por uso de especialidade farmacêutica. O paciente do sexo masculino, com antecedentes de alcoolismo, abstinente há 4 anos e 7 meses e que começou a se automedicar com um produto fitoterápico – alcoolato – a base de camomila para aliviar sintomas digestivos. Com o decorrer do tempo foi aumentando a freqüência e quantidade de consumo, chegando a ingerir 600 mL por dia do produto. Neste período apresentou comportamentos agressivos semelhantes à época em que bebia.

Estes fatos alertam para a necessidade de um cuidado especial ao se indicar o uso de determinados produtos para indivíduos com antecedentes de alcoolismo.

Weathermon & Crabb, (1999) relacionaram medicamentos e antissépticos bucais, encontrados no mercado dos Estados Unidos, que contém etanol em suas composições. No mercado brasileiro foram encontrados alguns desses produtos.

TABELA 12. Medicamentos e antissépticos bucais e suas respectivas concentrações de etanol - em porcentagem -.

PRODUTO	CONCENTRAÇÃO DE ETANOL (%)
Solução Oral de Cimetidina (GlaxoSmithKline)	2,8
Solução Oral de Ciclosporina (Abbott) *	9,5-12,5
Elixir de Digoxina (GlaxoSmithKline)	10,0
Elixir de Fenobarbital (Neovita)	14,0
Xarope de Ranitidina (Leofarma)	7,5
Cepacol (Aventis) *	14,0
Listerine (Pfizer) *	26,9
Listerine Cool Mint ou Freshburst (Pfizer) *	21,6
Plax – Advanced (Colgate) *	8,7
Oral – B Anti placas *	8,0

Fonte: WEATHERMON & CRABB, 1999;

* Produtos encontrados no mercado brasileiro.

Outro tipo de interação observada é a combinação de álcool e cocaína, prática muito comum entre os usuários dessa última droga (CHASIN, 1998). Segundo Farre *et al.,* (1993) a administração conjunta aumenta a concentração plasmática da cocaína, possivelmente porque a ingestão aguda de álcool inibiria o metabolismo da mesma.

No fígado, na presença de etanol, uma parte da cocaína presente sofre uma reação de transesterificação mediada por uma carboxilesterase hepática. Isso resulta em alguns metabólitos: etilbenzoilecgonina, cocaína etiléster, etilcocaína e no mais conhecido cocaetileno (DEAN, *et al.,* 1992; SCHECHTER & MEEHAN, 1995).

O cocaetileno tem propriedades farmacológicas semelhantes às da cocaína, mas com meia vida plasmática de 3 a 5 vezes maior. Tem maior seletividade com transportador dopaminérgico e menor afinidade com a serotonina, o que justifica o seu intenso efeito euforizante. Também está associado com isquemias, infartos, hipertensão e arritmias, apresentando graves conseqüências para o indivíduo (HEARN *et al.,* 1991).

3. ASPECTOS ANALÍTICOS

A disposição dos fármacos no organismo é dependente de suas propriedades físico-químicas, da via de administração, dos processos metabólicos e da duração e freqüência da exposição. A concentração do fármaco nos tecidos é influenciada pelo grau de ligação às proteínas plasmáticas, pois somente a fração livre pode ser transferida do sangue para os tecidos (HUESTIS & CONE, 1998).

O etanol é uma substância psicoativa rapidamente absorvida no estômago e intestino delgado, tem baixo PM - < 100 Dalton - é muito solúvel na água e não se liga às proteínas plasmáticas, sendo amplamente distribuído por todos os tecidos do corpo. Essa distribuição no organismo é proporcional à quantidade de água existente nos tecidos. Esses fatores o tornam um composto favorável para análise em fluidos corporais (MACCHIA *et al.,* 1995; BATES & MARTIN, 1997; GUBALA & ZUBA, 2002).

O sangue e o ar expirado são conhecidos como matrizes convencionais e a saliva, humor vítreo, o cabelo e o suor como alternativas para determinação de etanol.

Análise utilizada em espécimes biológicos alternativos requer uma tecnologia tradicional, mas que seja adaptada para as necessidades e limitações impostas por essas matrizes. Espécimes alternativos normalmente são obtidos em pequenos volumes, além das substâncias serem encontradas em baixas concentrações, dificultando a realização das análises (CONE, 2001).

A escolha da matriz biológica para determinação de etanol pode ser feita baseada na aplicabilidade ou no objetivo da determinação (MACCHIA *et al.,* 1995).

SANGUE

A determinação da concentração de etanol no sangue total é considerada o parâmetro de referência no campo forense e na legislação de trânsito (MACCHIA *et al.,* 1995). A concentração que define o estado de embriaguez do motorista tem sido estabelecida em legislações de trânsito específicas de cada país. Os limites são derivados de estudos controlados e de dados epidemiológicos a respeito dos sinais e sintomas da intoxicação por álcool etílico *versus* a concentração de etanol no sangue (MOSKOWITZ; BURNS & FERGURSON 1999; HADFIELD; MERCER & PARR, 2001).

O Código de Trânsito Brasileiro de 23/09/97**,** no seu artigo 276, estabelece que: a concentração de seis decigramas de álcool por litro de sangue comprova que o condutor se acha impedido de dirigir veículo automotor. Na mesma legislação, no artigo 277, está determinado que todo condutor de veículo automotor, envolvido em acidente de trânsito ou que tenha excedido os limites previstos no artigo anterior, será submetido a testes de alcoolemia, exames clínicos, perícia ou outro exame que, por meios técnicos ou científicos, em aparelhos homologados pelo Contran, permitam certificar seu estado (BRASIL, 1997).

A Câmara dos Deputados aprovou um projeto de lei que se encontra em tramitação no Congresso Nacional para reduzir a concentração máxima de álcool no sangue de 0,6g/L para 0,3g/L. Essa medida de reduzir o limite máximo permitido para os condutores de veículos automotores tem como finalidade diminuir os acidentes e os índices de mortalidade ocorridos no trânsito.

Na Europa limite máximo permitido de alcoolemia varia entre os países. A França, Itália e Portugal têm seus limites estabelecidos em 50 mg/dL. Na Espanha o limite é o mesmo, mas difere para aqueles que acabaram de retirar a carta de habilitação, sendo de 30 mg/dL. Na Polônia o limite é de 20 mg/dL e em Luxemburgo é de 80 mg/dL. Alguns países, principalmente do leste europeu são bastantes rigorosos, pois não admitem nenhuma concentração alcoólica no sangue de motoristas (WHO, 2003b).

O sangue embora, seja um excelente material para verificar o estado de intoxicação do indivíduo, apresenta algumas restrições para a sua utilização: a coleta é invasiva, há riscos de contaminação para o responsável pela coleta e para o doador da amostra; exige local e pessoal treinado, tornando inviável sua aplicação em testes de rotina em campo aberto. É uma matriz complexa que necessita de agentes conservantes no momento da coleta e de desproteinização para a realização da análise (SCHRAMM; SMITH & CRAIG, 1992; KIDWELL; HOLLAND & ATHANASELIS, 1998).

O primeiro método quantitativo de análise de etanol em sangue aceita pela ciência forense e pela Toxicologia foi publicado em 1922, conhecido como o micrométodo de Widmark's, que consistia em uma oxidação química com mistura de dicromato de potássio e ácido sulfúrico em excesso. Após 1950, métodos químicos foram modificados com o uso de determinação fotométrica (ABBOTT Cientifica, 1996; JONES & POUNDER, 1998).

A necessidade de desenvolvimento de sistemas que permitissem a análise de um grande número de amostras para verificar a exposição às drogas aumentou consideravelmente na década de 70, devido à guerra entre os Estados Unidos e o Vietnam (SUNSHINE, 1998).

Uma das técnicas pioneiras denominadas *Free Radical Assay Technique – FRAT -,* foi amplamente empregada nas forças armadas americanas em 1971. Em 1972, um novo método imunológico foi introduzido no mercado o enzimaimunoensaio - *homogeneous enzyme-multiplied immunoassay – EMIT -.* Em seguida foi desenvolvido o imunoensaio por fluorescência polarizada - Florescence Polarization Immunoassay – TDX - (SUNSHINE, 1998).

Estes métodos possibilitaram um grande avanço das análises toxicológicas na área da Toxicologia Social, incluindo a determinação do álcool no sangue e na urina.

Também foram reportados outros métodos para medir a concentração de etanol em sangue, após separação por aquecimento - *headspace* - com sensor eletroquímico ou dispositivo semicondutor de óxido de metal. Esses métodos não são suficientemente seletivos quando substâncias interferentes podem estar presentes (JONES, 1978; JONES & POUNDER, 1998).

Existem marcadores de abuso crônico de álcool que podem ser facilmente detectados no sangue por imunoensaio: gama glutamil transpeptidade – GGT -, transaminase glutâmica pirúvica - TGP -, transaminase glutâmica oxalacética – TGO - e transferrina deficiente em carbohidrato. Contudo, a maioria desses são inespecíficos e poucos sensíveis. A porcentagem de isoformas da transferrina deficiente em carbohidrato é um dos mais específicos, pois permite a detecção do consumo excessivo de álcool - de pelo menos 60g de etanol/por dia - por um período de várias semanas - pelo menos 14 dias -. A abstinência ao álcool leva a normalização da porcentagem dessa enzima (GOLDBERGER *et al.,* 1997; MUSSHOFF & DALDRUP, 1998; BREWER, 1999; DEGUTI & GONÇALVES, 2000).

AR EXPIRADO

A exposição ao etanol também pode ser verificada através de medições no ar expirado com o uso de equipamentos denominados etilômetros – bafômetros - (JONES, 1992a; JONES, 1992b; JONES, 1993; JONES, 1995; BENDTSEN, *et al.,* 1999; MOSKOWITZ; BURNS & FERGUSON, 1999; SILVA, 1999; CARVALHO & LEYTON, 2000).

A substituição da análise de etanol em sangue pelo ar expirado foi proposta por Harger em 1938, quando desenvolveu um equipamento denominado *Drunkometer.* Alguns anos após foram apresentados o *Alcometer* e o Intoximeter, que apresentavam resultados insatisfatórios (BORKENSTEIN, 1998).

Em 1954, Borkenstein desenvolveu o *Breathalyzer* considerado um instrumento adequado para a finalidade proposta. O fundamento da técnica era a passagem de 52,5 mL de ar expirado numa ampola de vidro que continha uma solução de dicromato de potássio e ácido sulfúrico que sofria uma mudança de cor pela oxidação do etanol que passava por essa.

Devido a sua aplicabilidade em campo os etilômetros rapidamente passaram a ser amplamente utilizado na área de segurança pública e no trânsito para verificar o grau de consumo de bebidas alcoólicas por condutores de veículos. Este equipamento também é utilizado por empresas preocupadas com o consumo de álcool no ambiente de trabalho evitando que seus funcionários exerçam suas funções embriagados (SILVA, 1999; CARVALHO & LEYTON, 2000).

Os resultados das determinações pelo etilômetros podem ser expressos diretamente pelas concentrações de álcool no ar ou, indiretamente, pelas concentrações no sangue, nesse caso, um fator de conversão -2.100:1- determinado por meio de várias pesquisas experimentais deve ser aplicado.

Esse fator significa que 2.100 partes de ar alveolar contêm a mesma quantidade de álcool que uma parte de sangue (SCHRAMM; SMITH & CRAIG, 1992; BRASIL, 1997; CHURCH & WITTING, 1997; CARVALHO & LEYTON, 2000).

Há várias marcas no mercado como o Intoxilyzer 5000S, o Alcotest 7410 $_{plus}$ da Dräger®, etiloteste descartável da Contralco®, entre outras (JONES & ANDERSON, 2003).

O Intoxilyzer 5000S é um etilômetro infravermelho quantitativo originário dos Estados Unidos, com seu uso aprovado pela justiça Sueca para verificar a alcoolemia em motoristas de trânsito desde, 1989. Embora, esse equipamento tenha finalidade comprobatória, apresenta alguns problemas que devem ser analisados. Dependendo do comprimento de onda utilizado, podem ser sensíveis a outras substâncias que não o álcool, por exemplo, instrumentos de onda única, podem detectar acetona, se presente. A acetona pode advir da *diabette mellitus,* de um jejum prolongado e de dietas pobres em carbohidratos (CARVALHO & LEYTON, 2000; JONES & ANDERSON, 2003).

Também se verificou em um estudo realizado por Jones & Anderson, (2003) que o Intoxilyzer 5000S quase sempre apresentou leituras mais baixas quando comparado com as concentrações de etanol no sangue venoso, dando vantagens para o indivíduo que estava sendo analisado.

A análise de ar expirado embora aceitável para a rotina de triagem apresenta algumas restrições para o seu uso devido à possível interferência de outros solventes orgânicos, da erupção de gases do estômago – “eructação” -, da grande variação na taxa dos níveis de álcool no sangue e ar expirado e por ser de difícil obtenção em casos de pacientes febris e hipotérmicos, em vítimas inconscientes ou em pacientes com doenças broncopulmonares (CHRISTOPHER & ZECCARDI, 1992; GUILBAULT & PALLESCHI, 1995).

URINA

A urina é utilizada em Programas para verificar exposição a drogas pelo *Correctional Service of Canada* que é uma agência federal responsável pelo acompanhamento de indivíduos condenados pela justiça. A determinação de etanol nesse Programa é realizada somente quando há requisição (FRASER, *et al.,* 2001).

Também é um espécime biológico proposto como fluido alternativo na determinação de etanol em funcionários nos Programas de Controle e Prevenção do Uso de Drogas no ambiente de trabalho e em usuários em clínicas de tratamento e reabilitação, sendo bastante utilizado em alguns países como Inglaterra e Estados Unidos (JONES, 1992a)

Esse tipo de amostra apresenta algumas vantagens e limitações para a detecção de etanol. As vantagens incluem maior concentração da droga, maior período de detecção e sua coleta é menos invasiva que a do sangue, embora deva ser realizada sob observação direta do responsável pela coleta a fim de evitar adulterações e substituições da amostra. Sua coleta em campo é dificultada pela necessidade de um local adequado que inclui existência de água para higiene e vaso sanitário (WINECKER & GOLDBERGER, 1998).

Também apresenta como desvantagem um possível erro para estimar a alcoolemia. Isso é explicado devido a presença de urina remanescente na bexiga que pode super ou subestimar a concentração de etanol. Para tal dever ser exigido duas coletas de urina, uma primeira para o esvaziamento total da bexiga e uma segunda coleta, após 20 a 60 minutos da primeira (CORRÊA & PEDROSO, 2000).

Para a utilização desse espécime um fator de correção de aproximadamente 1,35 deve ser aplicado para avaliar a alcoolemia nos indivíduos (JONES, 1992a; CORRÊA, 1997).

SUOR

O suor é secretado naturalmente, na taxa de 20 mL/hora, quantidade que pode ser aumentada, por exemplo, em práticas de exercícios físicos. É composto por solução aquosa hipotônica - 99% -, lactato, uréia, íons de amônio e enzimas. A sudorese é verificada no tronco - aproximadamente 50% -, nas pernas - 20% - e na cabeça e extremidades superiores - 30% - (HUESTIS & CONE, 1998; UNDCP, 2001).

É uma amostra utilizada para verificar a exposição recente ao etanol, com aplicabilidade no controle de indivíduos em clínicas e hospitais; em prisioneiros em liberdade condicional; em motoristas ou em empregados no ambiente de trabalho (KIDWELL; HOLLAND & ATHANASELIS, 1998).

Apresenta boa correlação com os níveis sanguíneos e sua coleta é realizada através de adesivos aderidos na pele, não sendo invasiva. Como desvantagens: concentração e período de detecção do etanol menor que na urina e a análise quantitativa é prejudicada devido à quantidade de suor coletada ser desconhecida (INOUE; SETA & GOLDBERGER, 1995).

CABELO

O cabelo é outro tipo de espécime utilizado para identificar uso crônico de drogas de abuso. Desde 1979 tem sido utilizado para verificar exposição a drogas por semanas a meses, dependendo do seu comprimento (UNDCP, 2001).

Em alguns países como Alemanha, Irlanda e Estados Unidos têm regulamentos que permitem a utilização do cabelo como amostra biológica para determinação de drogas. Essa matriz pode ser utilizada no ambiente de trabalho, investigações criminais, custódia de crianças e em casos de divórcio (CONE, 2001).

O etanol e seus metabólitos desaparecem rapidamente do corpo e outros tecidos, sendo difícil a sua monitoração, requerendo técnicas indiretas de detecção. Contudo existem marcadores provenientes de seu metabolismo não oxidativo, que podem ser utilizados para verificar o seu consumo crônico. Como marcadores desse tipo de consumo têm-se os ésteres de ácidos graxos e o etil glicuronídeo que são detectados no sangue somente após 24 horas da última exposição ao álcool e depois se depositam no cabelo. Devido a essa característica, essa matriz pode ser utilizada para verificar o consumo de etanol por períodos mais extensos, como no caso de dependentes (BREWER, 1999; WURST *et al.,* 1999; PRAGST *et al.,* 2001).

O cabelo apresenta algumas dificuldades para sua utilização: desconhecimento dos mecanismos de incorporação das drogas e necessidade de uma demorada preparação prévia, como os processos de descontaminação e digestão, anterior à fase de extração (TOLEDO, 1999).

HUMOR VÍTREO

O etanol também pode ser detectado *postmortem,* através da análise do humor vítreo. Essa amostra é muito útil para detectar uma intoxicação que ocorreu antes do óbito, permitindo distinguir uma possível produção de álcool no *postmortem.* Também pode ser utilizada como uma matriz alternativa em casos, onde o sangue for insuficiente para análise ou se estiver contaminado (ENGELHART & JENKINS, 2001).

O humor vítreo é um fluido sérico que não contém glicose ou microorganismos que possam levar a proliferação microbiana. É límpido e fácil de trabalhar analiticamente, sendo anatomicamente isolado, protegido de putrefação bacteriana e de traumas (POUNDER & JONES, 1998).

SALIVA

A saliva é um espécime biológico alternativo atualmente recomendado para análise de drogas de abuso, agentes terapêuticos, químicos encontrados no ambiente e substâncias endógenas (DROBITCH & SVENSSON, 1992; JONES, 1995).

No caso do etanol a saliva tem sido usada com uma variedade de propósitos incluindo testes em motoristas, servindo como suporte para as evidências clínicas e para diagnósticos médico-legais da intoxicação alcoólica (JONES, 1979a; CONE, 2001).

Essa matriz apresenta vantagens sobre as matrizes convencionais, pois a sua coleta não é invasiva, pode ser obtida sem o potencial de risco de infecção para os envolvidos - responsável pela coleta e o doador da amostra -, não causa constrangimento, assim pode ser feita sob supervisão direta, impedindo recursos de adulterações ou até mesmo de substituições da amostra. Essas características são de extrema importância para a aceitação em exames de rotina (SCHRAMM; SMITH & CRAIG, 1992; KIDWELL; HOLLAND & ATHANASELIS, 1998; SPIEHLER; BALDWIN & HAND, 2002).

A saliva é uma mistura complexa, de aspecto incolor excretado dentro da cavidade oral por três principais glândulas: a parótida - 25% -, existente na parte superior da boca que secreta saliva derivada do sangue plasmático - fluido de soro -; a sublingual - 4% -, existente nas laterais da boca que secreta ambos fluidos séricos e mucina e a submandibular - 71% -, existente na base da língua, também secreta fluido sérico e mucina (GUILBAULT & PALLESCHI, 1995; INOUE, SETA & GOLDBERGER, 1995; KIDWELL *et al.,* 1998).

A saliva é produzida cerca de 500-1500 mL/dia, sendo seu fluxo controlado pelo Sistema Nervoso Parassimpático. Efeitos colaterais de medicamentos como os anticolinérgicos, anticonvulsivantes, anti-parkinsonianos, drogas ilícitas como a maconha, doenças como a diabetes *Mellitus*, o alcoolismo e a doença sistêmica de supressão de saliva em idosos provoca a xerostomia – "boca seca" , dificultando a coleta de saliva (DUBOWSKY, 2002).

Sua composição é de aproximadamente 99% de água, 0,3% de proteínas - principalmente enzimas - e 0,3% de mucinas com um balanço de sais. Também contém bactérias, leucócitos, hormônios e células epiteliais modificadas. (GUILBAULT & PALLESCHI, 1995; INOUE; SETA & GOLDBERGER, 1995; KIDWELL; HOLLAND & ATHANASELIS, 1998).

O transporte de substâncias para a saliva é feito através de membranas biológicas por transporte ativo – secreção -, difusão através dos poros de membrana ou difusão passiva através da membrana devido ao gradiente de concentração (CONE, 1993; KIDWELL; HOLLAND & ATHANASELIS, 1998).

Uma fina camada de células epiteliais separa os ductos salivares do sistema circulatório. A membrana lipídica dessas células que determinam a transferência de moléculas do plasma para a saliva. A passagem através dessas membranas é limitada para as moléculas de PM acima de 500 e sua entrada é influenciada pela ligação às proteínas plasmáticas. O etanol tem baixo PM - < 100 dalton -, o que favorece sua passagem por ultrafiltração, além da difusão passiva que é aparentemente o mecanismo dominante (HUESTIS & CONE, 1998; UNDCP 2001).

A concentração das drogas ou metabólitos lipofílicos na saliva são influenciados pelo pk_a da droga ou pelo pH do plasma e saliva. Para verificar a relação das concentrações saliva/plasma é aplicacada a equação de Henderson-Hasselbalch: $pH= pk_a + \log [A^-]/ [HÁ]$, onde o $[A^-]$ é a concentração da droga na forma aniônica e [HÁ] é a concentração na forma não ionizada para as drogas ácidas (KIDWELL; HOLLAND & ATHANASELIS, 1998).

Devido as características físico – químicas do etanol, a sua concentração em saliva não é influenciada por esses fatores (JONES, 1993).

Estudos recentes demonstraram que muitos fármacos são transferidos rapidamente do plasma para a saliva, sendo a concentração da droga na saliva proporcional a do plasma. Como a velocidade do fluxo sanguíneo nos tecidos das glândulas é muito alta, a quantidade de etanol que alcança a saliva deve refletir a concentração encontrada no sangue arterial (GUBALA & ZUBA, 2002).

Gubala e Zuba, (2003) realizaram um trabalho farmacocinético, comparando a concentração de etanol em sangue e saliva, após a ingestão de álcool e verificaram que a concentração de etanol é maior na saliva no período de absorção e distribuição e significativamente menor na fase de eliminação.

O Coeficiente de correlação entre concentração de etanol na saliva/ concentração de etanol no sangue varia de 1,04 a 1,14 (JONES, 1979a, 1993; MCCOLL *et al.*, 1979; HAECKEL & PEIFFER, 1992; KIESOW; SIMONS & LONG, 1993 BATES & MARTIN, 1997).

Somente a fração livre da droga no plasma é transportada para a saliva, e é essa fração livre responsável pelo efeito farmacológico. Dessa forma é o material biológico mais indicado para avaliar o estado de intoxicação, entre 12 e 24 horas, embora o período de detecção e a concentração da droga na saliva serem freqüentemente menores em relação à urina (SCHRAMM; SMITH & CRAIG, 1992; GUILBAULT & PALLESCHI, 1995; KIDWELL; HOLLAND & ATHANASELIS, 1998).

Os primeiros trabalhos de pesquisa de álcool em saliva são de Nicloux (SÁ,1969). Embora, suas vantagens tenham sido reconhecidas já na década de 30, sua utilização não despertou interesse, pois os métodos inicialmente desenvolvidos - de oxidação química - necessitavam grande volume de amostra para sua aplicação. A partir da década de 70 foram desenvolvidos métodos enzimáticos que requeriam apenas 10 µL de amostra (JONES, 1995).

A coleta de saliva pode ser efetuada através dos seguintes métodos:

Drenagem – a amostra é drenada do lábio inferior para um tubo de ensaio pré-pesado;

Lançamento – a saliva é acumulada na boca e depois lançada em um tubo de ensaio;

Sucção – a amostra é continuamente aspirada da boca através de um sistema apropriado;

Absorção – a saliva é absorvida através de um *swab* ou material absorvente similar durante um período adequado (DUBOWSKI, 2002).

Antes da coleta é necessário verificar se a cavidade oral encontra-se livre de resíduos de alimentos ou outros materiais, que possam interferir na análise ou apresentar um resultado falso-positivo (UNDCP, 2001). De acordo com Jones, (1993) os indivíduos não devem fumar, beber ou se alimentar nos minutos que precedem a coleta - de 10 a 30 min -.

No mercado estão disponíveis coletores que estimulam a formação de saliva e facilitam a coleta: *Salivette®, Orasure® , Saliva Sampler® e Saliva Lollipop®* (UNDCP, 2001).

A figura 2 mostra uma foto ilustrada do coletor de saliva - Salivette® - que apresenta como característica um chumaço de algodão impregnado de ácido cítrico para estimular a salivação.

FIGURA 2. Foto ilustrada do coletor de saliva, com seus compartimentos dispostos de maneira separada para a sua melhor visualização.

Em estudo realizado por Haeckel e Buckltsch as concentrações de etanol encontradas em amostras de saliva obtidas com e sem estímulo de ácido cítrico foram semelhantes (HUESTIS & CONE, 1998).

A saliva pode ser armazenada a 4°C por 7 dias ou a -20°C por meses, sem perda da quantidade de etanol. Após a coleta é recomendada a centrifugação das amostras para obtenção de um homogeneizado (MACCHIA *et al.,* 1995).

A determinação de etanol na saliva geralmente tem sido efetuada através de métodos de triagem, apesar da constatação que o valor da concentração dessa substância nesse espécime ser semelhante aos encontrados no sangue (SCHRAMM; SMITH & CRAIG, 1992; BATES & MARTIN, 1997).

No mercado estão disponíveis vários testes rápidos de fácil aplicação - Q.E.D. A 150, Alcoscan™, Alço-Screen 02 e On-Site Alcohol® - para identificação de etanol em saliva (DUBOWSKI, 2002).

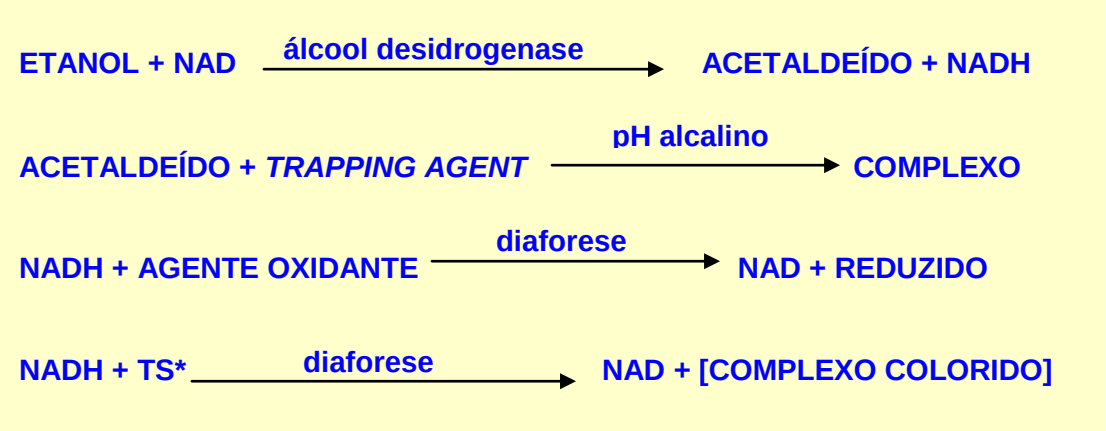
O Q.E.D. A 150 - Orasure Technologies, Inc - é um teste rápido para análise quantitativa de etanol em saliva, segundo seu fabricante e apresenta-se como o mais recomendado em trabalhos da literatura. Tem como princípio de operação a oxidação enzimática com o álcool desidrogenase, ocorrendo várias reações, tendo como ponto final o aparecimento da cor púrpura - figuras 3; 4 e 5 - (CHRISTOPHER & ZECCARDI, 1992; JONES, 1995; BATES & MARTIN, 1997; BENDTSEN *et al.,* 1999; BIWASAKA *et al.,* 2001).

FIGURA 3. Foto ilustrada do teste rápido Q.E.D. A 150

FIGURA 4. Fotos ilustradas do procedimento de utilização do teste rápido .Q.E.D. A 150, com aparecimento de cor púrpura para verificar a concentração de etanol.

Na Figura 5 são apresentadas as reações químicas desenvolvidas, após a utilização do Q.E.D. A 150.

FIGURA 5. Reações químicas que ocorrem no Q.E.D A 150, na presença de etanol.



Ts* = Sal de Tetrazolina

Fonte: Christopher & Zeccardi, 1992

O Q.E.D. A 150 consiste de um dispositivo, onde há uma escala quantitativa de medição de etanol - em mg ou porcentagem - e de um coletor de algodão – *swab* -, hermeticamente embalados - FIGURA 3 -. O coletor deve ser inserido na cavidade oral em movimentos circulares por cerca de um minuto, até que fique saturado com a saliva - FIGURA 4 -. Após esse procedimento, o mesmo é inserido no local indicado no dispositivo do teste, sendo necessário que a saliva atinja o controle de qualidade do teste, denominado de QA Spot®. Se saliva contiver etanol, uma cor púrpura aparecerá no dispositivo capilar, cerca de 2 minutos, podendo ser lido diretamente na escala quantitativa (BIWASAKA *et al.,* 2001).

O limite de concentração alcoólica para uso do Q.E.D. A 150 é de aproximadamente 10-15 mg/dL (JONES, 1995). Este teste pode ser utilizado para determinação de etanol por outras matrizes como: soro, urina, fluido cerebroespinhal e humor vítreo.

As variações individuais encontradas na composição da saliva - viscosidade e quantidade de material particulado - podem influenciar o preenchimento do tubo capilar do Q.E.D. A 150 e conseqüentemente no resultado. Segundo Jones, (1995) o controle existente no teste indicará esta ocorrência devido ao não aparecimento da cor. A presença de bolhas no tubo capilar, devido à entrada de ar, também pode dificultar interpretação do resultado.

Outro teste comercial utilizado como triagem é o Alcoscan™, que apresenta metodologia colorimétrica, sendo útil para verificar intoxicação em casos de urgência (BUCHWAD & SMITH*,* 1990).

Na análise confirmatória de etanol são utilizados métodos cromatográficos. Em 1960 métodos físico-químicos foram aplicados para análise de álcool nos fluidos corpóreos como o espectrômetro de infravermelho, oxidação eletroquímica, ensaios enzimáticos e cromatografia gás-líquido – GLC - (JONES & POUNDER, 1998; RODIONOV; KEPPEN & SUKHACHEVA*,* 2002).

A separação do etanol da matriz por aquecimento em recipiente fechado, denominada *Headspace,* têm sido recomendada como técnica de escolha para determinação posterior de etanol e outras substâncias voláteis por cromatografia em fase gasosa. De acordo com Macchia *et al.,* (1995) a determinação é eficiente nas diversas amostras biológicas, obtendo uma boa linearidade, reprodutibilidade e praticidade.

Alguns trabalhos encontrados na literatura relatam a utilização deste método para determinação de etanol em saliva, obtendo bons resultados, pois as concentrações encontradas mostraram excelente correlação com a alcoolemia (MACCHIA *et* al.,1995*;* GUBALA & ZULA, 2002)

4- OBJETIVO E PLANO DE TRABALHO

O objetivo da pesquisa foi investigar a utilização de amostras de saliva na determinação de etanol para verificar a exposição a bebidas alcoólicas.

Para atingir essa finalidade foram elaboradas as seguintes diretrizes:

- Pesquisa bibliográfica referente às técnicas de triagem e confirmação em saliva;

- Padronização e validação das técnicas selecionadas;

- Aplicação dos métodos em amostras de saliva provenientes de voluntários após ingestão controlada de bebidas alcoólicas;

- Com base nos resultados da pesquisa verificar a possibilidade de aplicação de um método para determinação de etanol em saliva que compreenda a fase de triagem, passível de aplicação em campo, e posterior confirmação dos resultados em laboratório.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Material

5.1.1. Soluções -padrão

Solução de referência certificada de etanol a 10,3% v/v (Sigma)

Soluções de referência certificadas de etanol nas concentrações de 25, 50 e 100mg (Radian)

n - propanol 99,5% grau HPLC (Aldrich)

Solução aquosa de etanol a 15g/L obtida a partir da solução de referência certificada a 10,3% v/v

Solução aquosa de n – propanol a 15g/L obtida a partir da solução padrão

Soluções-padrão de etanol em saliva nas concentrações de 0,01g/L; 0,03g/L; 0,06g/L; 0,15g/L; 0,3g/L; 0,6g/L; 1,2g/L; 1,5g/L e 3,0g/L preparadas a partir da solução aquosa de 15g/L

Solução aquosa de n – propanol a 0,6g/L preparada a partir da solução estoque de 15g/L

5.1.2. Equipamentos e acessórios

Cromatógrafo a gás modelo 6890N (Agilent) com injetor split/spliteless equipado com detector de ionização em chama – GC/FID (Hewlett – Packard, Wilmington, EUA)

Coluna Capilar de sílica fundida Poraplot Q®, com as dimensões de 10 m de comprimento x 0,32 mm de diâmetro interno (Chrompack, Holanda)

Sistema enzimático de determinação de etanol em saliva Q.E.D. A 150 (OraSure Technologies, Inc)

Dispositivo para coleta de saliva Salivette® (Sarsted)

Centrífuga (Tecnal)

Estufas (Ética Equipamentos Científicos)

Destilador – deionizador de água Milli – Q (Milliporel)

5.1.3. Outros materiais

Água destilada

Gases especiais para cromatografia em fase gasosa: nitrogênio, ar sintético e hidrogênio (Air Liquide)

Microsseringa gas – tight 250µL (Scientific Glass Engineering)

Pipetas automáticas com volumes reguláveis (Labsystems)

Pipetas volumétricas

Vidrarias

Frascos de vidro, capacidade para 10mL (Hewlett Packard)

Tampas de borracha, lacre de alumínio e lacrador (Hewlett Packard)

5.1.4. Amostras de saliva

5.1.4.1 Amostras de referência negativa (Grupo I - A)

Amostras de saliva obtidas através do coletor de saliva impregnado de ácido cítrico – para estimular a salivação - de indivíduos saudáveis que não consumiram bebidas alcoólicas nas 24 horas que precederam as coletas. Após a centrifugação dos coletores, as amostras foram reunidas para a formação de um *"pool".*

5.1.4.2 Amostras de referência positiva (Grupo I - B)

Amostras obtidas a partir da adição da solução-padrão de etanol (15g/L) em quantidades necessárias de saliva de referência negativa - *"pool"* (Grupo I-A) para obtenção das concentrações de: 0,01g/L; 0,03g/L; 0,06g/L; 0,15g/L; 0,3g/L; 0,6g/L; 1,2g/L; 1,5g/L e 3,0g/L, utilizadas na padronização e validação do método.

5.1.4.3 Amostras de voluntários

Grupo II - A

Amostras obtidas de voluntários (n=5), colegas de trabalho, que foram utilizadas nos experimentos prévios realizados nesse trabalho. Os voluntários receberam bebida alcoólica – uísque- administrada de maneira controlada, para que todos obtivessem a mesma concentração alcoólica (0,68g/Kg). Foi aplicado o sistema enzimático Q.E.D e o coletor de saliva (Salivette®) para posteriores análises do CG/DIC, na qual pode-se estabelecer alguns parâmetros e padronizar os métodos.

Grupo II - B

Amostras de saliva (n=50) foram obtidas de voluntários (n=10) de ambos os sexos, faixa etária entre 21 e 40 anos, alunos do curso de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP selecionados por não apresentarem problemas de consumo abusivo de bebidas alcoólicas. Estes ingeriram de forma controlada, uísque, após abstinência de álcool pelo menos nas 24 horas que precederam a coleta. Foi realizada uma anamnese para verificar possível histórico de alcoolismo na família.

Antes do início do experimento os indivíduos responderam um questionário e assinaram um termo de consentimento pós – informação.Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP (anexo).

5.2. MÉTODOS

5.2.1 Seleção do tempo de coleta para determinação de etanol através do sistema Q.E.D. A 150

Foi realizado um estudo piloto com a finalidade de selecionar os tempos de coleta mais adequados para verificar a presença de etanol em saliva, após ingestão controlada de bebida alcoólica. Foram obtidas amostras de saliva (n=16) de voluntários do Grupo II - A (n=3) que ingeriram no prazo máximo de 20 minutos, uísque ou cerveja. Após a ingestão da bebida alcoólica foram coletadas amostras nos tempos de 10, 60 e 90 minutos para aplicação dos testes de Q.E.D. A 150.

5.2.2 Padronização e validação do método para determinação de etanol em amostras de saliva pela cromatografia gasosa após extração por *headspace*

5.2.2.1 Padronização do método

Foi investigada a possibilidade de aplicação do método proposto por CORRÊA (1997) e CORRÊA (2001) para determinação de etanol em sangue e urina na matriz saliva.

Foram realizados experimentos com solução aquosa de etanol para verificar os melhores parâmetros cromatográficos.

Para atingir esta finalidade foram realizados inicialmente experimentos com amostras de saliva (Grupo I-A) preparadas nas concentrações de: 0,15g/L; 0,60g/L e 1,50g/L, em 3 replicatas, a partir da adição de volumes apropriados da solução aquosa de 15g/L em amostras de saliva de referência negativa.

Um mL das amostras e 1 mL da solução aquosa de n-propanol a 0,6g/L foram transferidos para frascos específicos (10 mL) para a separação do etanol por aquecimento - *headspace.* Estes foram devidamente lacrados com septo de borracha e tampa de alumínio e colocados em estufa a 70°C por 30 minutos.

Os vapores formados na parte superior do frasco foram retirados através de uma seringa do tipo *gas – tight* mantida na temperatura de 40°C em outra estufa. Foram realizados 3 punções na camada de vapor como forma de homogenização da amostra antes de injetar a quantidade de 250µL do vapor no cromatógrafo a gás. O fluxograma da técnica é descrito na figura 6.

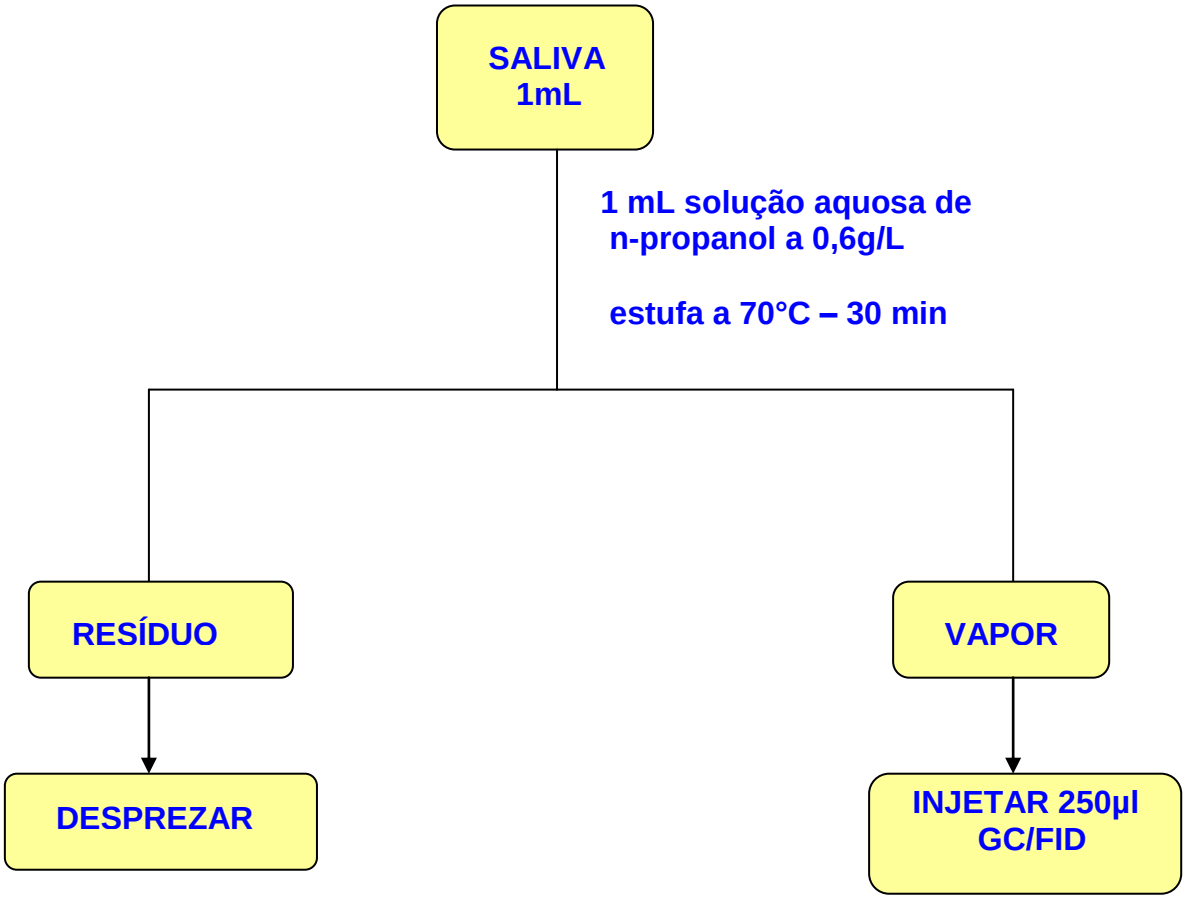


FIGURA 6 – Fluxograma da técnica de separação por aquecimento - h*eadspace* para determinação de etanol em saliva, através da cromatografia em fase gasosa por ionização em chama.

Em fase posterior, amostras de saliva (n=15) provenientes de voluntários (n=3 do Grupo I-C) que ingeriram no prazo máximo de 20 minutos, uísque foram obtidas através do coletor denominado Salivette®, nos seguintes tempos, após a ingestão de etanol: 20; 50; 80; 110 e 130 minutos. O coletor permaneceu na cavidade bucal até a completa saturação de saliva, sendo colocado novamente no recipiente do Salivette®. No momento da análise este foi levado à centrifugação a 700g por 10 minutos. Foram obtidos cerca de 3 mL de saliva submetidos ao procedimento descrito acima.

5.2.2.2 Curvas de calibração

Foram obtidas a partir da análise de amostras de saliva do Grupo I-B, as concentrações de 0,15; 0,6 e 1,5 g/L. As amostras foram submetidas ao procedimento descrito em 5.2.2.1 em 3 replicatas. A curva foi construída através da média dos valores encontrados para cada concentração, utilizando a relação de divisão das áreas absolutas do etanol pelo padrão interno n – propanol. O desvio padrão foi calculado, obtendo a equação da reta e o coeficiente de determinação. Outras curvas de calibração foram igualmente obtidas durante o desenvolvimento do trabalho nas mesmas concentrações acima referidas.

5.2.3 Validação do método

Linearidade da técnica

Foi feito o estudo da linearidade da técnica para se verificar o intervalo de concentração, onde a intensidade da resposta do detector é diretamente proporcional à concentração de etanol.

Para tal foram utilizadas amostras de referência positiva como referido em 5.1.4.2 para se obter concentrações (0,01g/L; 0,06g/L; 0,15g/L; 0,6g/L; 1,5g/L e 3,0g/L), juntamente com o padrão interno de n – propanol a 0,6g/L.

As análises foram realizadas em três replicatas através do procedimento descrito no item 5.2.2.2. A curva foi obtida pela divisão da área absoluta de cada concentração de etanol pela área do padrão interno n - propanol. Com os valores das áreas foram efetuados a média, o desvio padrão, o coeficiente de variação e a equação da reta.

Limite de Quantificação (LOQ)

O limite de quantificação é definido como a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser quantitativamente determinada com aceitável precisão, ou seja, com o coeficiente de variação menor e/ou igual a 10% e que apresente reprodutibilidade na resposta.

A determinação do limite de quantificação foi feita através de concentrações variadas da solução aquosa de etanol de 15g/L, em amostras de saliva de referência negativa. Cada concentração testada foi feita em seis replicatas.

Limite de Detecção (LOD)

O limite de detecção é referido como a menor concentração de um analito, na qual o processo bioanalítico pode diferenciar da linha de base gerada pelo ruído de detector.

A determinação do limite de detecção também foi feita realizando-se diluições progressivas de várias concentrações de etanol da solução aquosa de 15g/L na matriz biológica. O processo ocorreu em seis replicatas como no limite de quantificação.

Precisão intra e interensaio

A precisão de um método analítico descreve a proximidade de medidas individuais de um analito quando o procedimento é aplicado repetidamente a múltiplas alíquotas de um único volume homogêneo de uma matriz biológica.

Para avaliar a precisão intra ensaio foram adicionadas nas amostras de saliva, solução de etanol para se obter 3 concentrações diferentes: 0,03g/L; 0,3g/L e 1,2g/L, escolhidas através do estudo da linearidade que foi realizado em seis replicatas no mesmo dia.

A precisão interensaio foi direcionada nas mesmas condições da precisão intraensaio, porém realizadas em 3 dias diferentes. A imprecisão foi medida pelo coeficiente de variação (CV).

5.2.4 Determinação de etanol em amostras de saliva de voluntários, Grupo II - B após ingestão de bebida alcoólica

Participaram do estudo voluntários do Grupo II - B (n=10) que foram previamente instruídos a não ingerir bebidas alcoólicas nas 24 horas que precederam o experimento e a não consumir alimentos por no mínimo nas 3 horas anteriores à experiência.

Os voluntários ingeriram uísque na quantidade necessária para se obter à concentração de 0,68g de etanol por quilograma de peso corpóreo, no prazo máximo de 20 minutos. As amostras foram obtidas após o período de ingestão nos seguintes tempos: 20, 50, 80, 110 e 130 minutos.

Após o estudo, foi fornecido lanche aos voluntários e os mesmos permaneceram no local por mais 1 hora ou até que a concentração de etanol no sangue tenha sido 0 mg/L, avaliada através da aplicação do teste rápido Q.E.D A – 150.

Os voluntários, após terem sido informados sobre os objetivos, riscos, e o procedimento do teste assinaram um termo de consentimento pós-informação (anexos I e II). O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

5.2.4.1 Método Enzimático (Q.E.D. A 150)

A coleta foi feita de acordo com a orientação técnica do fornecedor e os voluntários foram instruídos a não comer e nem beber por pelo menos 10 minutos antes da coleta.

A validade do resultado do Q.E.D. A 150 é comprovada através de um sistema de controle de qualidade denominado Q A spot®, que deve desenvolver a cor púrpura em até 2 minutos da realização do teste.

O resultado colorimétrico com o teste rápido Q.E.D. A 150 foi visualizado no período de 2 minutos após ter sido inserido o bastão de algodão no dispositivo Q.E.D. A 150 com escala de 10-150mg/dL .

5.2.4.2 Cromatografia gasosa após extração por *headspace*

A coleta de saliva nos voluntários foi realizada através do coletor denominado Salivette® após ter sido utilizado o teste rápido Q.E.D. A 150.

O coletor Salivette® consiste de um algodão impregnado de ácido cítrico, onde deve permanecer na cavidade oral até a sua completa saturação, sendo colocado novamente no recipiente do coletor (Figura 2).

Os coletores foram mantidos refrigerados a 4°C até o momento da análise. Para a análise os tubos coletores foram centrifugados a 700g por 10 minutos e foram submetidos ao procedimento descrito na figura 6 (5.2.2.1).

5.2.5 Determinação de etanol por Q.E.D. A-150 e GC/HS em amostras de voluntários (Grupo II – A) coletadas com Salivette®, com e sem ácido cítrico.

Para investigar uma possível interferência nos resultados das amostras coletadas foi realizado um experimento com voluntários, após a ingestão controlada de bebida alcoólicas, nos mesmos moldes das análises anteriores.

Nos tempos de 20; 50; 80; 110 e 130 minutos foi aplicado o seguinte esquema de coleta em cada voluntário:

a) coleta e respectiva determinação de etanol através do sistema enzimático Q.E.D A-150.
b) Imediatamente, após a coleta para aplicação do Q.E.D® foram realizadas duas coletas em série com o Salivette®, com e sem ácido cítrico

As amostras de saliva coletadas com o Salivette® foram armazenadas em refrigerador, para análise posterior (24 horas). Após esse período os Salivettes® foram submetidos à centrifugação de 700g por 10 minutos. As amostras obtidas (cerca de 3 mL) foram divididas, sendo 1 mL utilizado para determinação de etanol no GC/FID e na saliva remanescente foi aplicado o sistema enzimático Q.E.D.

5.2.6 Estudo para verificar a estabilidade do etanol através do sistema Q.E.D. A 150

Foi realizado um estudo *in vitro* para verificar a estabilidade do etanol na saliva, através da utilização do sistema enzimático Q.E.D® A – 150 após 24 e 48 horas.

Inicialmente foi obtido um “pool’ de saliva de voluntários (Grupo II - A), através do coletor Salivette® contendo ácido cítrico. Estes coletores foram imediatamente centrifugados para a obtenção do homogeneizado de saliva. Após, esse procedimento o ”pool” de saliva foi dividido em alíquotas nas quais foram adicionados a solução padrão de etanol a 15g/L para a obtenção das concentrações de 30; 60; 90 e 120 mg/dL.

Essas soluções foram mantidas em frasco âmbar, sob-refrigeração. Foi realizada a medição em três replicatas nos tempos 0, 24 e 48 horas. Os *swabs* do Q.E.D® foram colocados nas amostras adicionadas de etanol até a absorção adequada e depois inseridos no canal onde ocorre a reação química do teste, sendo realizada a leitura após 2 minutos da inserção.

6. RESULTADOS

6.1 Seleção do tempo de coleta para determinação de etanol através do sistema Q.E.D. A 150

Os resultados do estudo piloto para a seleção do tempo ideal de coleta de saliva, após a ingestão de etanol são mostrados na tabela 13.

TABELA 13. Os resultados obtidos em mg/dL de etanol, após a ingestão controlada de bebida alcoólica.

	Tempo (min)		
VOLUNTÁRIO	**10**	**60**	**90**
1	70	90	80
2	45	65	50
3	50	85	70
4	40	50	42

6.2 Padronização e validação do método de determinação de etanol por cromatografia gasosa após extração por h*eadspace*

6.2.1 Padronização do método

Foram verificadas melhores condições cromatográficas para análise de etanol em saliva. Os parâmetros adotados foram:

temperatura do injetor: 250°C;
temperatura da coluna: 130°C (isoterma);
temperatura do injetor: 250°C;
fluxo do gás de arraste - hidrogênio: 2,6 mL/min;
modo split: 1/10.

A figura 7 mostra o cromatograma obtido na determinação de etanol em saliva, utilizando o n – propanol como padrão interno. O tempo de retenção do etanol foi 2.284 e do n - propanol de 5.311.

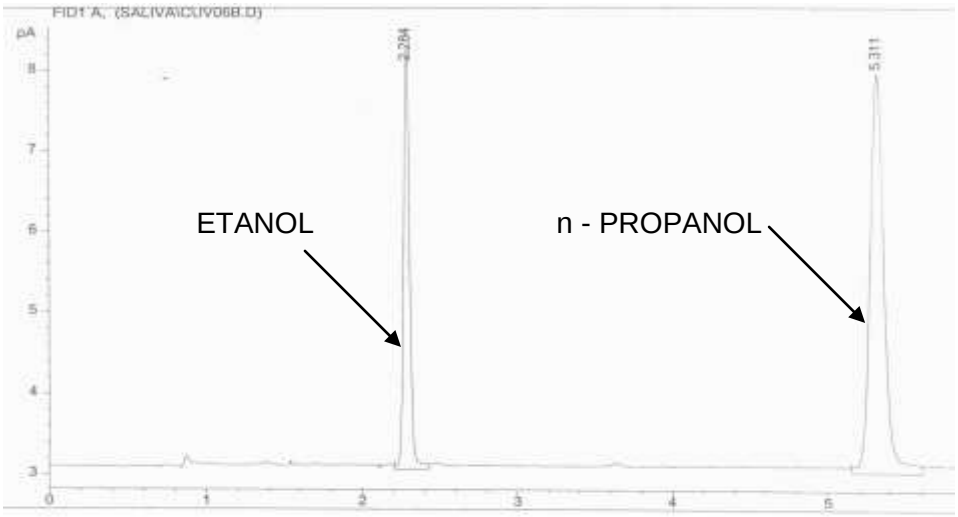


FIGURA 7. Perfil cromatográfico dos vapores da amostra de saliva, adicionada de solução de etanol e de n – propanol.

Os resultados obtidos através da análise das amostras nas concentrações de 0,15; 0,60 e 1,50 por GC/HS são apresentados na tabela 14.

TABELA 14. Valores de relação das áreas (etanol/n – propanol) obtidos no experimento, após preparação de concentrações pré-estabelecidas de etanol para a padronização da técnica.

Concentrações	**Replicatas**			
etanol (g/L)	**1**	**2**	**3**	**Média**
0,15	0,14	0,13	0,14	0,137
0,6	0,48	0,46	0,48	0,473
1,5	1,37	1,38	1,33	1,36

Os resultados obtidos através da análise das amostras de voluntários (Grupo II – A) por GC/HS são mostrados na tabela 15.

TABELA 15. Os resultados obtidos em mg/dL, após a ingestão controlada de etanol.

	Tempo (min)				
VOLUNTÁRIO	**20**	**50**	**80**	**110**	**130**
1	169	120	102	82	76
2	75	78	88	80	75
3	76	83	97	89	84

6.2.2 Validação do método

Linearidade da técnica

A linearidade da técnica foi obtida utilizando seis concentrações diferentes (0,01; 0,06; 0,15; 0,6; 1,5 e 3g/L) realizadas em três replicatas.

A tabela abaixo apresenta os valores obtidos no estudo: média, desvio, padrão e coeficiente de variação. Os resultados demonstraram uma relação linear proporcional entre o sinal gerado no equipamento e as concentrações de etanol.

TABELA 16. Valores obtidos nos experimentos para verificar a linearidade da técnica, a partir das concentrações estabelecidas. Os valores são apresentados pela razão das áreas absolutas de etanol pela do padrão interno (n – propanol).

Concentrações	Replicatas					
etanol (g/L)	1	2	3	Média	Dp	CV
0,01	0,031	0,029	0,03	0,03	0,001	3,33
0,06	0,061	0,064	0,066	0,064	0,003	4,69
0,15	0,14	0,14	0,14	0,14	0	0
0,6	0,43	0,43	0,45	0,437	0,012	2,75
1,5	1,09	1,11	1,12	1,107	0,015	1,36
3,0	2,31	2,37	2,38	2,353	0,038	1,61

A equação da reta e o coeficiente de correlação (R^2) são mostrados na figura 10.

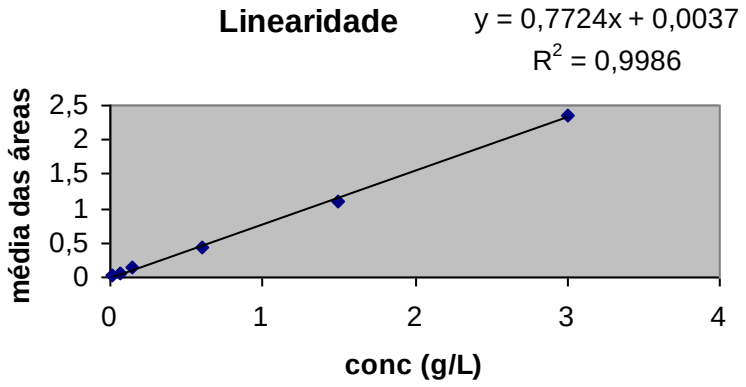


FIGURA 8. Representação gráfica da linearidade da técnica entre a concentração de etanol e as médias das áreas (etanol/n – propanol).

Limite de Quantificação (LOQ)

O limite de quantificação do método para determinação de etanol em saliva foi de 0,010g/L.

A tabela abaixo mostra os valores obtidos: média; desvio padrão (Dp) e coeficiente de variação (CV) para o etanol.

TABELA 17. Apresentação dos resultados obtidos para o valor do limite de quantificação (0,010g/L): média; desvio padrão e coeficiente de variação.

REPLICATAS	Razão entre as áreas etanol/n - propanol
1	0,023
2	0,027
3	0,028
4	0,027
5	0,025
6	0,027
MÉDIA	0,026
Dp	0,002
CV (%)	7,69

Limite de Detecção (LOD)

O limite de detecção do método para o etanol foi de 0,006g/L.

A tabela abaixo apresenta os valores obtidos: a média, o desvio padrão (Dp) e o coeficiente de variação (CV), para o etanol.

TABELA 18. Os valores obtidos na determinação do limite de detecção do etanol (0,006g/L): média, desvio padrão e coeficiente de variação.

REPLICATAS	Razão entre as áreas Etanol/ n - propanol
1	0,017
2	0,027
3	0,022
4	0,023
5	0,025
6	0,022
MÉDIA	0,023
Dp	0,003
CV (%)	13,04

Precisão intra e interensaio

As tabelas abaixo apresentam os coeficientes de variação intra e interensaio, para cada concentração escolhida. Os valores obtidos em cada dia expressam a relação de áreas absolutas do etanol/ n – propanol.

TABELA 19. Coeficientes de variação intra e interensaio do etanol, na concentração de 0,03g/L .

	DIAS		
REPLICATAS	**1°**	**2°**	**3°**
1	0,044	0,057	0,057
2	0,04	0,05	0,042
3	0,044	0,042	0,046
4	0,046	0,043	0,047
5	0,046	0,043	0,043
6	0,044	0,043	0,043
CV_1 (inter)	3,2%		
CV_2 (intraensaio)	10,7%		

TABELA 20. Coeficientes de variação intra e interensaio do etanol, na concentração de 0,3g/L .

	DIAS		
REPLICATAS	**1°**	**2°**	**3°**
1	0,31	0,29	0,30
2	0,30	0,28	0,30
3	0,30	0,28	0,31
4	0,30	0,27	0,30
5	0,30	0,29	0,31
6	0,28	0,27	0,30
CV_1 (inter)	4,0%		
CV_2 (intraensaio)	2,8%		

TABELA 21. Coeficientes de variação intra e interensaio do etanol, na concentração de 1,2g/L .

	DIAS		
REPLICATAS	**1°**	**2°**	**3°**
1	1,10	1,08	1,13
2	1,10	1,09	1,18
3	1,14	1,10	1,18
4	1,09	1,11	1,16
5	1,09	1,13	1,16
6	1,09	1,11	1,16
CV_1 (inter)	3,1%		
CV_2 (intraensaio)	1,7%		

6.3. Determinação de etanol em amostras de saliva dos voluntários do Grupo II - B

6.3.1. Método Enzimático (Q.E.D. A 150)

Os resultados obtidos nas amostras de saliva dos voluntários do Grupo II - B em diferentes tempos, após o término da ingestão de bebidas alcoólicas são mostrados na tabela 22.

TABELA 22. Resultados das concentrações de etanol obtidos nas amostras de saliva dos voluntários, através da aplicação do QED A – 150.

	TEMPO DE COLETA (min)				
VOLUNTÁRIO	20	50	80	110	130
	CONCENTRAÇÕES (mg/mL)				
A	50	75	90	70	80
B	110	80	70	65	45
C	50	60	55	35	40
D	60	90	80	70	70
E	45	50	50	50	40
F	70	65	60	55	50
G	80	110	100	80	90
H	45	50	65	70	60
I	50	60	50	45	35
J	95	100	70	60	50

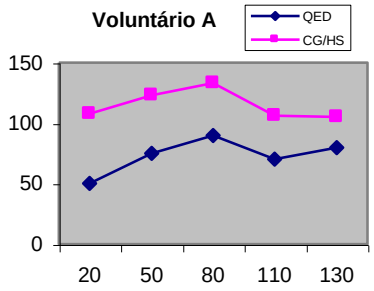
6.3.2. Cromatografia gasosa após separação por *headspace*

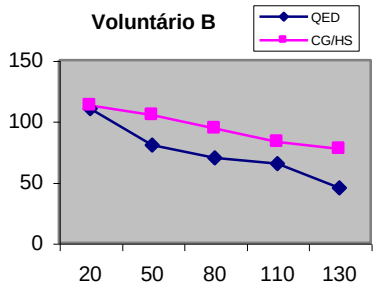
Os resultados obtidos nas amostras de saliva dos voluntários através da aplicação de GC/FID, em diferentes tempos, após o término da ingestão de bebidas alcoólicas são mostrados na TABELA 23.

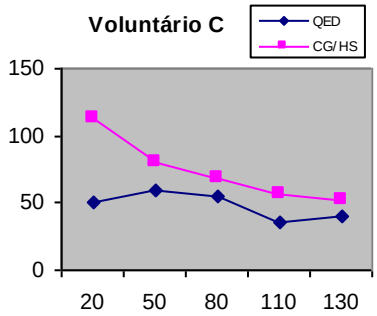
TABELA 23. Resultados obtidos nas amostras de saliva dos voluntários por CG/FID após *headspace*.

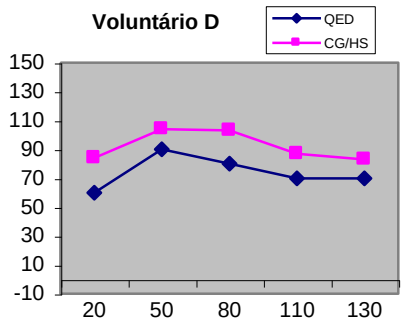
	TEMPO DE COLETA (min)				
VOLUNTÁRIO	20	50	80	110	130
	CONCENTRAÇÕES (mg/mL)				
A	108	123	133	106	105
B	113	105	94	83	77
C	113	80	69	57	52
D	84	104	103	87	83
E	65	67	66	67	61
F	78	78	68	56	42
G	111	135	132	107	114
H	53	74	89	83	80
I	72	78	52	47	30
J	107	99	79	75	69

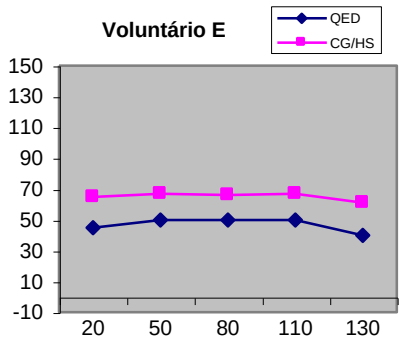
Na figura 9 são apresentados os gráficos com os resultados das análises enzimáticas (Q.E.D. A – 150) e cromatográficas (GC/HS) das amostras dos voluntários do Grupo II – B.

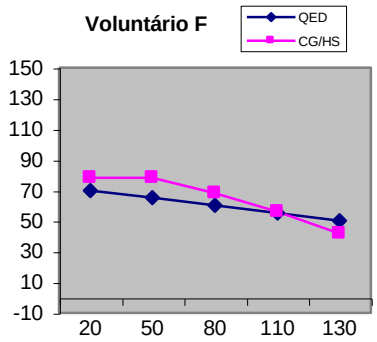












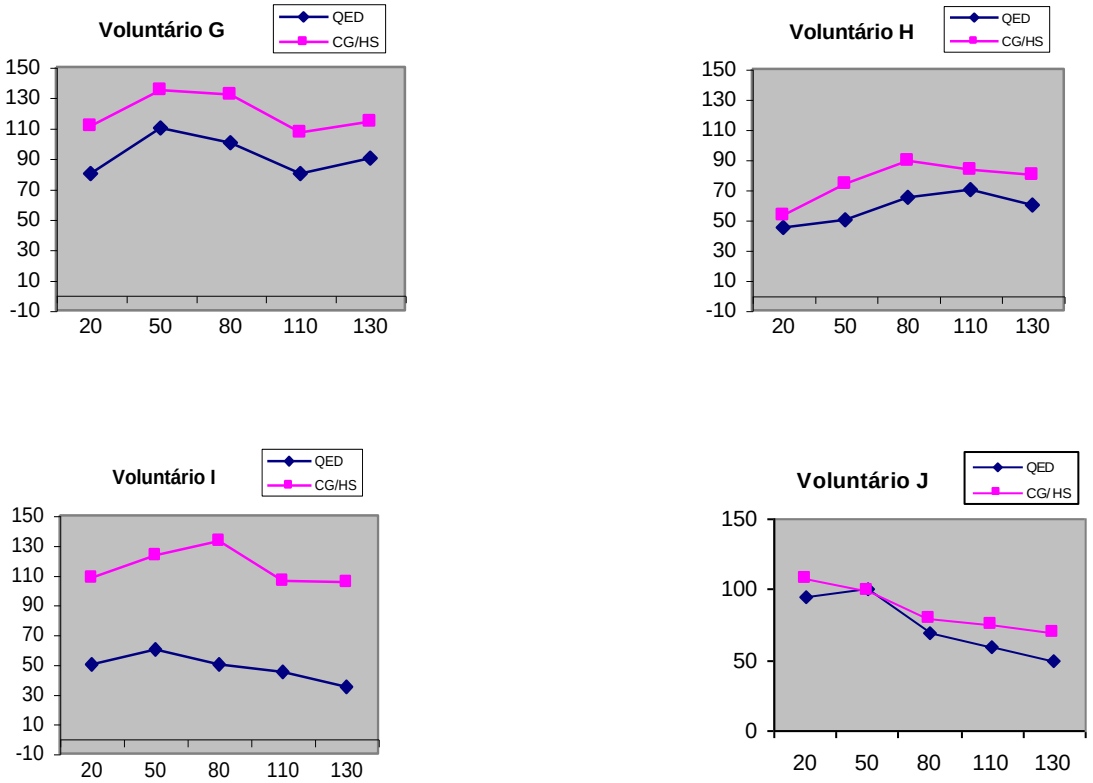


FIGURA 9. Gráficos obtidos individuais, comparando os resultados com as duas técnicas empregadas.

Na figura 10 são apresentados os perfis das médias das concentrações pelo tempo do etanol nas amostras analisadas por Q.E.D. A –150 e GC/HS.

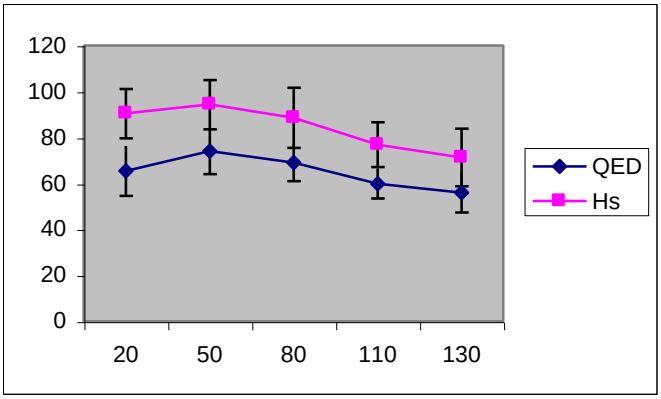


FIGURA 10. Gráfico das médias dos resultados das duas técnicas empregadas.

6.4 Determinação de etanol por Q.E.D. A-150 e GC/HS em amostras de voluntários (Grupo II – A) coletadas com Salivette®, com e sem ácido cítrico.

Os resultados obtidos nesse experimento são mostrados na tabela 24.

TABELA 24. Resultados obtidos em mg/dL — imediatamente após a coleta e/ou em 24 horas — na técnica enzimática (Q.E.D. A – 150) e cromatográfica (CG/HS), nas amostras coletadas com a utilização de Salivettes®, com e sem ácido cítrico.

.

tempo de coleta (min)	Voluntário A					Voluntário B				
	Q.E.D A - 150			CG/HS		Q.E.D A - 150			CG/HS	
	I	24 h		24 h		I	24 h		24 h	
		S/E	C/E	S/E	C/E		S/E	C/E	S/E	C/E
20	70	AI	75	77	90	65	78	81	83	91
50	70	77	80	88	91	60	72	81	82	81
80	68	75	78	78	82	60	67	70	73	78
110	58	60	65	73	76	58	62	61	65	67
130	55	60	62	66	72	48	51	53	61	62

I = imediatamente após coleta S/E = sem estimulação C/E = com estimulação
AI = amostra insuficiente

Os gráficos relacionando os valores encontrados na determinação de etanol na saliva, utilizando as técnicas: enzimática e cromatográfica são apresentados., nas figuras 11 e 12. Os resultados são mostrados no gráfico através da média obtida na quantificação das amostras pelas duas técnicas.

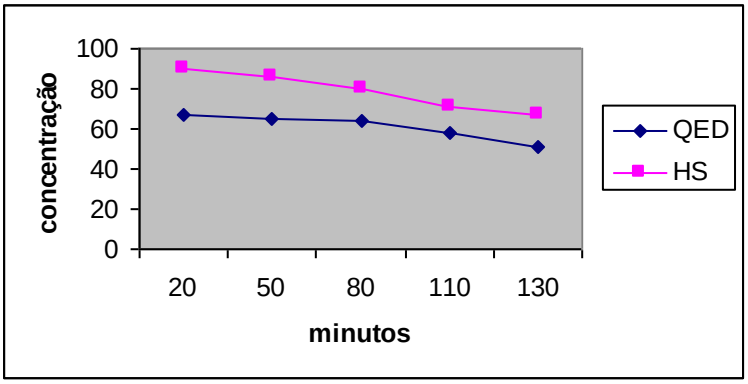


FIGURA 11. Gráfico das médias obtidas na determinação de etanol realizada com Q.E.D A-150, imediatamente após a coleta, e na determinação cromatográfica – após 24 horas -, nos mesmos tempos, utilizando o coletor de saliva com ácido cítrico.

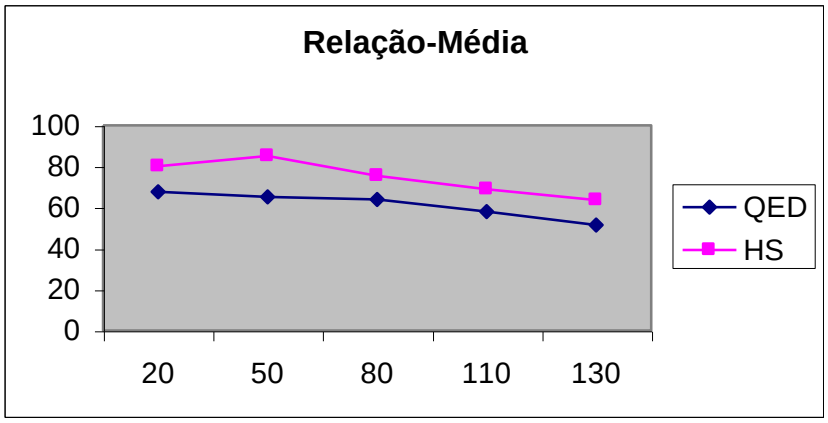


FIGURA 12. Gráfico das médias obtidas na determinação de etanol realizada com Q.E.D A-150, imediatamente após a coleta, e na determinação cromatográfica após 24 horas -, nos mesmos tempos, utilizando o coletor de saliva sem ácido cítrico.

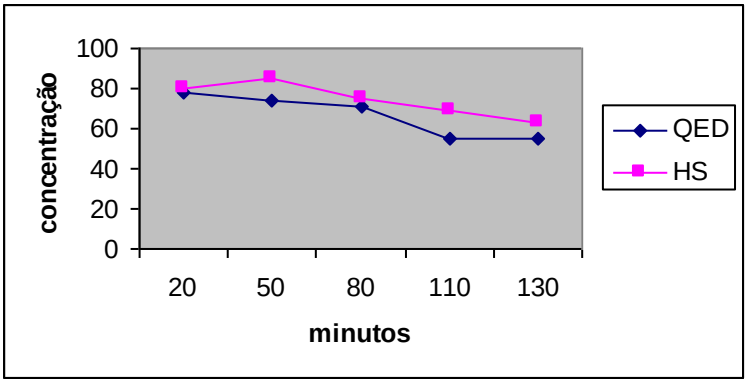


FIGURA 13. Gráfico das médias obtidas na determinação de etanol realizada com Q.E.D A-150, após sua inserção na saliva remanescente do Salivette® sem ácido cítrico – após 24 horas -, e na determinação cromatográfica, nos mesmos tempos, utilizando o mesmo coletor.

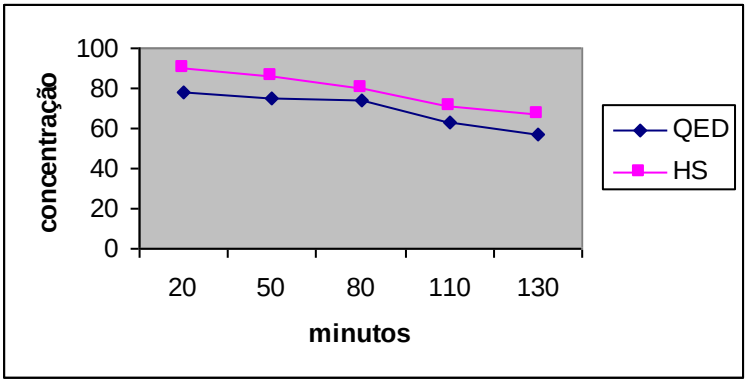


FIGURA 14. Gráfico das médias obtidas na determinação de etanol realizada com Q.E.D A-150, após sua inserção na saliva remanescente do Salivette® com ácido cítrico – após 24 horas -, e na determinação cromatográfica, nos mesmos tempos, utilizando o mesmo coletor.

6.5 Estudo para verificar a estabilidade do etanol através do sistema Q.E.D. A 150

Os resultados (média das concentrações) obtidos em três replicatas, nos tempos de 0; 24 e 48 horas para verificar a estabilidade da concentração de etanol na saliva são apresentados na TABELA 25.

TABELA 25. Média das concentrações de etanol para verificar a estabilidade do etanol na amostra obtida com o sistema Q.E.D A-150.

CONCENTRAÇÃO DE ETANOL(mg/dL)	Tempo de coleta 0 h	24 h	48 h
30	30,67	30	26,67
60	58,33	57	56,33
90	82,33	80	79,66
120	110	110,66	109,33

7. DISCUSSÃO

Nas análises toxicológicas realizadas para verificar o consumo de bebidas alcoólicas o sangue e o ar expirado são as matrizes biológicas mais empregadas, principalmente em condições nas quais há necessidade de verificar a alcoolemia em trabalhadores, motoristas e indivíduos envolvidos em acidentes.

A utilização da saliva tem sido recentemente recomendada, pois muitas substâncias são transferidas rapidamente do plasma para essa matriz, existindo uma estreita correlação nas concentrações encontradas simultaneamente nesses meios (GUBALA & ZUBA, 2000).

A partir dessas premissas foi desenvolvida esta pesquisa para investigar a utilização de amostras de saliva para determinação de etanol em duas fases ─ triagem e confirmação ─ com a finalidade de verificar a exposição a bebidas alcoólicas.

Na fase de triagem foi aplicada uma técnica enzimática ─ sistema Q.E.D. A 150 ─ e na fase de confirmação a cromatografia em fase gasosa, após separação do etanol da matriz por aquecimento ─ *Headspace* ─, técnica considerada de referência para determinação de etanol em fluidos biológicos.

O sistema Q.E.D. A 150 foi selecionado devido à existência na literatura especializada de recomendações de pesquisadores que realizaram estudos com esta técnica e por ter a aprovação do Departamento de Transportes dos Estados Unidos (DOT - USA). Essa instituição governamental é responsável nos EUA, pelo estabelecimento de matrizes biológicas e técnicas analíticas que podem ser utilizadas para determinação da alcoolemia em motoristas profissionais.

O sistema escolhido se enquadra nas condições do DOT, que define uma técnica de triagem para determinação de álcool como “um sistema para detectar a presença de 20 mg/dL ou mais de álcool no sangue, podendo ser utilizado para esta finalidade qualquer fluido biológico, porém o resultado deve expressar a alcoolemia” (DUBOWSKI, 2002).

Durante o desenvolvimento do trabalho foi verificado que o Q.E.D. A 150 permitiu uma coleta simples e rápida. A sua forma de apresentação, em embalagens individuais e hermeticamente fechadas, além da praticidade em sua utilização, também transmitiu uma sensação de segurança ao doador da amostra em termos de uso absolutamente único e individual e, portanto, isento de contaminação.

A coleta foi efetuada pelos próprios doadores que foram instruídos para inserir na cavidade oral os *swabs* do sistema Q.E.D., mantendo-os em movimentos circulares durante um minuto. No geral, esse procedimento foi adequado para a completa saturação do algodão e também garantiu a obtenção de um homogeneizado de saliva provenientes das secreções das glândulas existentes na cavidade oral.

Em alguns casos foi verificado que este tempo não foi suficiente para a obtenção da quantidade de saliva necessária para a realização da análise. Nestes, uma nova coleta foi efetuada com a orientação de que os doadores da amostra deveriam permanecer com o bastão coletor — *swab* — na boca por um período maior. O controle de qualidade do Q.E.D. A 150 permitiu evidenciar com segurança quando o volume de amostra fornecido era insuficiente.

Na realização das análises através do sistema Q.E.D. A – 150 foi observado em algumas análises uma certa dificuldade no preenchimento do tubo capilar do teste com a saliva coletada. Segundo JONES, (1995) esse fato reflete as variações interindividuais na composição da saliva, devido as diferenças na viscosidade e a presença de material particulado.

As leituras foram realizadas exatamente após 2 minutos da inserção do *swab* no canal onde ocorre a reação química, pois findo esse tempo poderia haver uma retração no volume da amostra na coluna que indica a concentração de etanol, levando a uma leitura abaixo do valor real.

Durante o intervalo de tempo entre a inserção do *swab* no local determinado do Q.E.D. e a leitura do resultado final foi observado em alguns casos o aparecimento de bolhas de ar no sistema, dificultando a interpretação do resultado. O critério adotado foi a leitura do ponto mais alto da coluna, independentemente da presença de bolhas.

Os experimentos iniciais foram realizados com a finalidade de selecionar os tempos de coleta adequados para verificar a presença de etanol em saliva. O tempo inicial de 10 minutos foi adotado de acordo com a orientação técnica que acompanha o sistema Q.E.D A – 150. O tempo final foi estabelecido tendo por base a concentração plasmática máxima que varia de 30 - 60 minutos (JONES, 1993; 1995) e ao provável tempo que um indivíduo poderia ser submetido a um controle do uso de bebidas alcoólicas em algumas situações, como no trânsito ou no ambiente de trabalho.

Nos tempos selecionados todos os voluntários apresentaram concentrações de etanol bem acima do limite de detecção do teste (10 mg/dL). Assim, com base nesses resultados e devido aos tempos recomendados por Dubowsky, (2002) — 15 minutos — e Jones, (1995) — 20 minutos — entre a ingestão de bebida e o início da coleta, foi adotado o tempo maior a fim de evitar a possibilidade da presença de qualquer resquício de álcool na cavidade oral. Nos experimentos posteriores o tempo final foi estendido para 130 minutos para uma melhor avaliação do período de detecção do etanol nessa matriz.

Os estudos de otimização das condições cromatográficas foram iniciados com a aplicação dos parâmetros propostos por Corrêa, (1997; 2001). A temperatura selecionada para a operação da coluna foi a de 130°C e a razão da divisão *split* foi alterada para 1/10. O modo *split* foi adotado prevendo a possibilidade da ocorrência nas análises de elevadas concentrações de etanol, devido a sua facilidade de volatilização. Assim, a divisão da amostra impediria uma possível saturação da coluna capilar e permitiria uma melhor resolução cromatográfica, tendo como conseqüência a obtenção de "picos" mais adequados.

Os tempos de retenção obtidos, 2.28 min para o etanol e 5.31 min para o padrão interno foram adequados à finalidade. O uso do n-propanol, como padrão interno, foi apropriado por ser da mesma função química do etanol. Nos experimentos realizados a sua concentração de referência foi fixada em 0,6 g/L, por apresentar como resultado uma área apropriada aos cálculos da concentração de etanol.

As concentrações utilizadas para obtenção das curvas da calibração – 0,15; 0,6 1,5 – foram selecionados de acordo com a faixa de linearidade e o ponto médio foi adotado tendo por base a concentração que qualifica a incapacidade do indivíduo em conduzir um veículo automotor, segundo o Código de Trânsito Brasileiro.

A separação do etanol da saliva, através do aquecimento da matriz, foi um procedimento analítico simples e rápido conforme relatado na literatura especializada para outras matrizes biológicas.

Em todas as análises realizadas não foi observado nenhum tipo de interferência nos resultados cromatográficos devido às substâncias normalmente presentes na saliva, que poderiam eventualmente ser separadas da matriz durante a fase de aquecimento e/ou coeluirem com os álcoois.

Na fase de padronização também foram realizados experimentos *in vivo* com a utilização de salivas coletadas em diferentes tempos – 20, 50, 80, 110 e 130 minutos – após a ingestão controlada de bebidas alcoólicas pelos voluntários (Grupo II – A).

A coleta das amostras foi efetuada através da utilização do coletor de saliva Salivette® com ácido cítrico, para estimular a salivação. Esse tipo de coletor é indicado em casos de xerostomia, observada em pessoas com diabetes *Mellitus*, alcoolismo, portadores de doença sistêmica de supressão de saliva – comum em idosos – ou em usuários de drogas ilícitas como a maconha.

Durante a coleta com o Salivette® alguns indivíduos relataram um pequeno desconforto quando ocorria a liberação do ácido cítrico, devido ao sabor característico dessa substância.

O procedimento de coleta apresentou praticidade, rapidez – 1 minuto de duração – e facilidade na obtenção da amostra em quantidade necessária para análise. Outras vantagens foram a impossibilidade de adulteração durante a coleta e risco mínimo de perda na manipulação, pois o tubo utilizado para armazenamento do material coletado é levado diretamente para centrifugação no momento da análise.

Os Salivettes® com as respectivas amostras foram mantidos sob-refrigeração desde a coleta até o início da análise, realizada após 24 horas. Após esse período, os coletores foram submetidos à centrifugação, sendo obtido um volume de aproximadamente 3 mL, quantidade suficiente para aplicação do método e realização de uma nova análise, se necessário.

Em todas as amostras coletadas nos diferentes tempos foi possível determinar a concentração de etanol, não foi observado a presença de interferentes devido as substâncias presentes na saliva, mostrando a aplicabilidade do método padronizado e os valores de relação das áreas (etanol / n-propanol) obtidos nos experimentos *in vitro* (5.2.2.1) e *in vivo* foram satisfatórios demonstrando que o método para determinação de etanol proposto por Correa, 1997 para sangue e urina pode ser aplicado em saliva.

No processo de validação do método para determinação de etanol em amostras de saliva por GC/HS foram verificados os seguintes parâmetros: linearidade da técnica, limite de quantificação, limite de detecção e precisão intra e interensaio (período de 3 dias) de acordo com o Guia para Validação de Métodos Analíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2002b; BRASIL, 2003a).

O método se mostrou linear nas concentrações de 0,01 a 3,0 g/L (TABELA 18); a concentração inicial foi escolhida por ser o limite de quantificação do método e a final por ser uma concentração bem acima das concentrações passíveis de serem encontradas em análises realizadas com essa finalidade. O coeficiente de variação (CV) obtido foi menor que 5% e o coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,9986 (FIGURA 10).

O limite de quantificação do analito foi de 0,01g/L, com coeficiente de variação de 7,69%. Esse valor está muito abaixo dos 0,6g/L preconizado pela legislação brasileira como concentração sanguínea máxima de etanol permitida para dirigir veículos automotores.

O estudo do limite de detecção foi realizado em seis replicatas com o objetivo de encontrar a menor concentração detectável do analito. Esse limite foi de 0,006g/L com o coeficiente de variação de 13,04%, valor adequado para o método.

A precisão do método foi avaliada, segundo seus coeficientes de variação, através da análise de 3 níveis de concentrações 0,03; 0,3 e 1,5 g/L, que apresentaram os seguintes valores, respectivamente intraensaio 1,7; 2,8 e 10,7% e interensaio 3,1; 3,2 e 4,0%. Os valores encontrados foram adequados a finalidade de análise.

Com a conclusão do processo de validação do método cromatográfico, o mesmo foi aplicado em voluntários - Grupo II – B -, após o consumo de bebidas alcoólicas. Os voluntários selecionados constituíram um grupo relativamente homogêneo: quatro do sexo feminino e seis do sexo masculino; idade entre 24 e 41 anos (média de 30,6); todos com formação universitária.

Aos voluntários foram apresentados dois esquemas de consumo de bebida alcoólica (uísque): ingestão da quantidade necessária para obtenção de 0,5 gramas de etanol por quilograma corpóreo (0,5g/Kg) — escolhida por quatro voluntários — ou a ingestão para se alcançar 0,68g/Kg — escolhida por seis voluntários—. A concentração maior foi selecionada por ter sido utilizada em estudos anteriores (JONES, 1995; CORRÊA, 1997) e a de 0,5g/Kg para possibilitar a participação dos voluntários menos afeitos às bebidas alcoólicas.

Durante o desenvolvimento do estudo não foi observada no Grupo de voluntários nenhuma dificuldade em consumir no tempo determinado — 20 minutos — a quantidade escolhida da bebida alcoólica.

Na comparação dos resultados obtidos nas duas técnicas estudadas foi observado que no geral as concentrações interindividuais, obtidas no mesmo tempo de coleta, foram aproximadamente 30% maiores pela técnica cromatográfica (GC/HS). Contudo, foi observado que as curvas obtidas pelas concentrações de etanol x tempo (minutos), em ambas as técnicas, apresentaram perfil semelhante. Este fato foi evidenciado com a utilização das médias dos resultados dos voluntários nos respectivos tempos de coleta (FIGURA 11).

Considerando o esquema de tempo adotado para a coleta foi observado que a concentração máxima de etanol na saliva foi atingida aos 70 minutos após o início do consumo da bebida, — leituras efetuadas aos 50 min — , resultado próximo dos relatados em estudos anteriores.(JONES, 1995; GUBALA & ZUBA, 2002).

Analisando os resultados obtidos através da cromatografia em fase gasosa das amostras coletadas aos 50 min, após o término da ingestão de bebidas alcoólicas foi verificado que a faixa dos valores esteve entre 67 a 135 mg/dL com CV de 23%. Esses resultados estão próximos dos obtidos por Jones, (1993) — de 57 a 135 mg/dL e CV de 20% — em trabalho realizado com as mesmas características de ingesta — obtenção de concentração de etanol de 0,68gKg de peso corpóreo —.

Os resultados interindividuais obtidos nas amostras dos voluntários pelas técnicas aplicadas foram bastante dispersos, apesar da homogeneidade do grupo, das condições prandiais semelhantes e da proporcionalidade da quantidade ingerida de bebida alcoólica, estando de acordo com resultados interindividuais de estudo encontrado na literatura (JONES, 1979b; JONES, 1995).

Esta observação pode ser constatada na comparação dos resultados de 2 voluntários - G e H - que ingeriram quantidade de uísque equivalente aos seus respectivos pesos corpóreos: o voluntário G — peso 60 Kg, do sexo feminino, ingesta de 126 mL de uísque — apresentou resultados de 107 a 135 mg/dL, média de 119,8 mg/dL e CV de 11%; o voluntário H — peso de 92 kg, sexo masculino, ingesta de 193 mL de bebida — apresentou resultados de 53 a 89 mg/dL, média de 75,8 mg/dL e CV de 18%.

Diversos fatores contribuem para explicar essas diferenças interindividuais como o sexo; volume de distribuição e raça. Outro fator a ser considerado é a diferença na velocidade de eliminação do etanol entre bebedores não habituais — de 12 a 15 mg/dL por hora — e bebedores contumazes — de 30 a 50 mg/dL por hora.

Estes resultados levam ao questionamento da existência de tabelas que correlacionam consumo de uma determinada quantidade de bebidas alcoólicas com obtenção de uma determinada concentração alcoólica no sangue.

Devido as diferenças observadas foram investigados alguns fatores que poderiam estar contribuindo para obtenção desses resultados: a presença de ácido cítrico na coleta realizada com estímulo da salivação e a influência do tempo decorrido entre as análises realizadas através do Q.E.D. e da cromatografia em fase gasosa.

Um experimento foi delineado para se verificar a influência dos fatores mencionados acima. Voluntários do Grupo II – A ingeriram bebida alcoólica e posteriormente forneceram amostras de saliva nos tempos de 20, 50, 80, 110 e 130 min. As coletas foram realizadas de acordo com o procedimento descrito em 5.2.4: primeiramente a amostra foi coletada com o *swab* para análise com o Q.E.D.; em seguida foram coletadas imediatamente duas amostras do mesmo voluntário com a utilização do Salivette® — a primeira sem ácido cítrico e a segunda com a presença do ácido —.

Esses coletores foram mantidos sob-refrigeração durante aproximadamente 24 horas. Decorrido esse tempo foram submetidos à centrifugação sendo obtidas aproximadamente 3 mL de saliva, que foram divididas em duas alíquotas para análise nas técnicas – enzimática e cromatográfica –.

Os resultados obtidos nas amostras coletadas com ácido cítrico foram semelhantes ao experimento realizado com voluntários do Grupo II – B, pois a diferença entre as técnicas - cromatográfica e sistema Q.E.D. A 150 -, foi de 29% maior. Contudo, essa diferença diminuiu para 22% quando se utilizou o Salivette® sem o ácido cítrico.

As diferenças dos resultados obtidos com o Q.E.D. A – 150 após 24 horas, e os respectivos resultados obtidos com a técnica cromatográfica foram: de aproximadamente 13% no coletor sem ácido cítrico e com a saliva obtida sob estimulação essa porcentagem foi 14%, sendo uma diferença de 15% com a saliva obtida no momento da coleta.

Também foram observados alguns resultados distintos entre as leituras obtidas com o Q.E.D. A – 150 no momento da coleta e após 24 horas. A leitura do Q.E.D. após 24 h foi aproximadamente 14% maior no coletor com ácido cítrico e cerca de 9% maior no coletor sem ácido cítrico.

Os fatos acima discutidos levam a inferir que o tempo decorrido entre a coleta e a análise e a presença do ácido cítrico seriam fatores que influenciariam nas diferenças observadas nos resultados, sendo que aproximadamente 9% estaria relacionado ao tempo e 6% à presença do ácido cítrico. Com base nessas considerações a diferença real entre os resultados das duas técnicas seria cerca de 14%. Este nível de diferença encontra-se dentro do padrão aceitável de análise, considerando que uma é técnica de triagem e a outra de referência.

Para dirimir a dúvida relativa ao fator do tempo foi realizado um experimento *in vitro* para verificar a estabilidade do etanol na saliva em 24 e 48 horas, utilizando o Q.E.D. A – 150. Os resultados mostraram que não houve diferença entre as concentrações observadas nos tempos 0, 24 e 48 horas, ou seja, não foi verificado aumento de etanol. A análise destes resultados levaria a suposição que o fator principal que explicaria as diferenças observadas seria o tempo de permanência da amostra no coletor antes da centrifugação.

No experimento para verificar a estabilidade, os coletores utilizados para a obtenção do “pool” de saliva foram imediatamente centrifugados após a coleta, o que não acontecia nos experimentos anteriores, já que estes eram centrifugados no momento da análise, realizada após 24 horas. Provavelmente o procedimento de centrifugação promove um rompimento das paredes das bactérias encontradas na cavidade oral e assim impediria que estes microorganismos interferissem na concentração de etanol pelo processo de fermentação devido a presença de açúcares existentes nessa amostra.

Durante a permanência da amostra no coletor - Salivette® - foi constatado um aumento na concentração de etanol após as 24 horas, mostrando uma desvantagem desse tipo de coletor. Na literatura especializada consultada não foi encontrado nenhum estudo realizado com esse tipo de coletor, assim novos trabalhos deverão ser realizados para equacionar esse problema, principalmente para aplicação no trânsito. Uma possível solução seria a utilização de um coletor de saliva contendo um agente conservante, que impossibilitaria a proliferação de bactérias e conseqüentemente o aumento da concentração de etanol na amostra, pois a centrifugação logo após a coleta é impraticável em campo.

Para verificar o consumo de bebidas alcoólicas por motoristas de trânsito, essa metodologia poderia ser aplicada com restrições, pois nesse setor há um índice que caracteriza perante a lei se houve ou não uma infração gravíssima. O sistema Q.E.D. poderia ser aplicado como técnica de triagem, assim como são utilizados os etilômetros, com algumas vantagens, pois possui algumas características desejáveis: embalagem hermeticamente embalada; data de validade; um controle QA spot - que garante a qualidade dos resultados; facilidade de obtenção da amostra e por não causar constrangimento ao doador.

A análise dos resultados obtidos demonstra o quanto é complicado estabelecer uma legislação com aplicações de sanções tendo por base a alcoolemia. Contudo, em todas as amostras coletadas nos diferentes tempos foi possível determinar a concentração de etanol, mostrando a aplicabilidade do método padronizado.

O projeto de lei aprovado pela Câmara dos Deputados, que se encontra em tramitação no Congresso Nacional, para reduzir o limite máximo de 0,6g/L para 0,3g/L provavelmente será eficaz na redução dos acidentes e mortalidade no trânsito. Com essa nova legislação todos os voluntários do estudo poderiam sofre sanções, pois os mesmos tiveram leituras superiores a esse novo índice. Entretanto, para surtir os efeitos desejados essa legislação deve ser colocada em prática através da fiscalização por órgãos competentes com a utilização das análises toxicológicas para comprovar o grau de alcoolemia.

De acordo com Gubala & Zuba, (2002) a determinação de etanol em saliva era até o presente utilizada como método de triagem, apesar do valor da concentração de etanol nessa matriz ser amplamente correlacionada com os encontrados no sangue. Na opinião desses autores a saliva constitui de uma matriz adequada para verificar a sobriedade com propósitos forenses.

O método estudado pode ser utilizado para diferentes finalidades, a fim de comprovar a sobriedade de indivíduos expostos ao álcool, como por exemplo no ambiente de trabalho, em clínicas de tratamento e recuperação de usuários de drogas e em casos emergenciais, inclusive de pacientes inconscientes.

No presente estudo foi possível determinar a concentração de etanol em amostras de saliva de indivíduos para verificar a sua exposição a bebidas alcoólicas..

8. CONCLUSÕES

- O sistema enzimático Q.E.D A – 150 pode ser utilizado em campo, como um indicativo da alcoolemia e para estimar a exposição de indivíduos expostos às bebidas alcoólicas.

- A cromatografia em fase gasosa, após separação do etanol por aquecimento - *Headspace* - foi eficaz para determinação dessa substância na saliva.

- Não foi observado na análise cromatográfico nenhum tipo de interferência devido às substâncias normalmente presentes na amostra de saliva.

- O método validado se mostrou linear e preciso, com limites de detecção e quantificação bem inferiores aos valores necessários para verificar a exposição a bebidas alcoólicas.

- O coletor de saliva denominado Salivette® foi de fácil aplicação, sendo obtida a quantidade suficiente de saliva para a análise. A presença de ácido cítrico como agente de estimulação da salivação, bem como a permanência da amostra no coletor interferiram nos resultados.

- Os respectivos resultados interindividuais nos experimentos realizados com voluntários, que ingeriram bebidas alcoólicas nas duas técnicas foram bastante dispersas, mas com o perfil de eliminação semelhante.

- O método proposto com as duas técnicas de triagem e confirmação demonstrou praticidade e permitiu identificar o etanol em todas as amostras de saliva provenientes de voluntários que ingeriram bebidas alcoólicas.

- A saliva é uma amostra alternativa que poderia ser utilizada para verificar a exposição de indivíduos a bebidas alcoólicas.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT CIENTÍFICA. Drogas de abuso. In:_____. Drogas de abuso. Madri, 1996, cap.4, p.43-131.

ABEL, E.L. Pharmacology of alcohol. In: _____, ed. *Marihuana, tobacco, alcohol and reproduction*. Boca Raton: CRS Press, 1983. cap.10, p.113-117.

ACIOLI, M. Alcoolismo e o universo feminino: uma leitura na perspectiva da antropologia médica. *Álcool e Drogas – Rev. ABEAD,* São Paulo, n.1, p.61-71, 1999.

ADAMS, W.L. Interactions between alcohol and other drugs. *Int. J. Addict.,* New York, v.30, p.1903-1923, 1995.

AHMED, F.E. Toxicologial effects of ethanol on human health. *Crit*. *Rev. Toxicol.,* Lauderdale, v.25, p.347-367, 1995.

BATES,M.E.; MARTIN, C.S. Immediate quantitative estimation of blood alcohol concentration from saliva. *J. Stud. Alcohol*, Piscataway, v.58, n.5, p.531-538, 1997.

BENDTSEN, P.; HUHBERG, J.; CARLSSON, M.; JONES, A.W. Monitoring ethanol exposure in a clinical setting by analysis of blood, breath, saliva, and urine. *Alcohol.: Clin. Exp. Res.,* Baltimore, v.23, n.9, p.1446-1451, 1999.

BITTENCOURT, A.L. Mecanismo de ação do etanol: envolvimento de glutamato, gaba e dopamina. *Rev. Psiquiatr. Clin.,* São Paulo, v.27, n.1, 2000. Disponível em: http://www.hcnet.usp.br/ipq/revista/index.html. Acesso em: 15 nov. 2003.

BIWASAKA, H.; TOKTA, T.; SASAKI, Y.; NIITSU, H.; KUMAGAI, R.; AOKI, Y. Application of quantitative ethanol detector (QED) test kit to measure ethanol concentration in blood samples. *Forensic Sci. Int.,* Amsterdam, v. 124, p.124-129, 2001.

BORKENSTEIN, R.F. The Breathalyzer. In: SUNSHINE, I. *Was it a poisoning?* S.I. American Academy of Forensic Sciences, 1998. p.155-156.

BRASIL. Lei n° 9.294, 15 de julho de 1996. Dispõe sobre as restrições ao uso e à propaganda de produtos fumígeros, bebidas alcoólicas, medicamentos, terapias e defensivos agrícolas. Disponível em: http;//www.cremesp.org.br/legislação/codame/lei_9.294_integra.htm. Acesso em: 18 jul. 2003.

BRASIL. Departamento Nacional de Trânsito. Código de Trânsito Brasileiro instituído pela Lei n° 9.503, 23 de setembro de 1997. In: _____. *Trânsito livre à vida*. Brasília: Imprensa Nacional, 1997. 189 p.

BRASIL. Presidência da República. Gabinete de Segurança Institucional. Secretaria Nacional Antidrogas. Publicações. Álcool: o que você precisa saber. “As coisas boas da vida”. 2000a. Disponível em: http://www.senad.gov.br. Acesso em: 20 de mar. 2003.

BRASIL. Lei n.10.167, de 27 de dezembro de 2000. Altera dispositivos da Lei nº 9.294, de 15 de julho de 1996, que dispõe sobre as restrições ao uso e à propaganda de produtos fumígenos, bebidas alcoólicas, medicamentos, terapias e defensivos agrícolas. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2000b. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/leis/10167_00.htm. Acesso em: 05 set. 2003.

BRASIL. Decreto n.4.072, de 03 de janeiro de 2002. Dá nova redação aos arts. 81, 91 e 93 do decreto n.2.314, de 4 de setembro de 1997, que dispõem sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. *Diário Oficial da União*, Brasília. 2002a Disponível em: http://207.21.196.110/decretos/d-004072-03-01-2002.htm. Acesso em: 17 set. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. Resolução n.475, de 19 de março de 2002. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/475_02.htm. Acesso em: 12 de jul. 2002b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. Resolução n.899, de 29 de maio de 2003. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/899_03.htm. Acesso em: 16 set. 2003a.

BRASIL. Presidência da República. Casa Civil. Subchefia para Assuntos Jurídicos. Lei n° 10.702, de 14 julho de 2003. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2003b. Disponível em: http://www.presidência.gov.br/ccivil_03/leis/2003/l10.702.htm. Acesso em: 02 set. 2003.

BREWER, C. Novel biological and mechanical analysis techiques for alcohol and other drug of abuse: their role in addiction management and psychiatric treatment. In: MIECZKOWSKI, T., ed. *Drug testing technology sssessment of field applications.* New York: CRC Press, 1999. cap.2, p.33-47.

BRIEN, C.P.O. Drug addiction and drug abuse. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E., eds. *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics.* 10. ed. New York: McGraw Hill, 2001. cap.24, p.621-644.

BRUCKENER, J.V.; WARREN, D.A. Toxic effects of solvents and vapors. In: KLASSEN, C.D., ed. *Casarett & Doull's Toxicology:* the basis science of poisons. 6. ed. New York: MacGraw – Hill, 2001. cap.24, p.869-916.

BRUST, J.C.M. Substance abuse, neurobiologic, and ideology. *Arch. Neurol.,* Chicago, v.56, p.1528-1531, 1999.

BUCHWAD, A.; SMITH, J. Saliva teststrips for alcohol testing. *Ann. Emerg. Med.,* Irving, v. 19, n.3, p.342-343, 1990.

CAETANO, R. Recent thinking about the concept of alcohol dependence. *Ann. Epidemiol.,* New York, v.6, p.458-462, 1996.

CAETANO, R. A identificação de critérios para dependência de álcool na população geral. *J. Bras. Dep. Quim.,* São Paulo, v.3, n.1, p.4-16, 2002.

CARLINI, E.A.; GALDUROZ, J.C.F.; NOTO,A.R.; NAPPO, S. I Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil-2001. São Paulo: CEBRID, 2002.

CARVALHO, C.G.; COTRIM, B.C.; SILVA, O.A.; SAVAIA, N. Prevalência de alcoolemia em vítimas de causas externas admitidas em centro urbano de atenção ao trauma. *Rev. Saúde Pública,* São Paulo, v.36, p.47-54, 2002.

CARVALHO, D.G.; LEYTON, V. Avaliação das concentrações de álcool no ar exalado: considerações gerais. *Rev. Psiquiatr. Clin.,* São Paulo, v.27, n.2, 2000. Disponível em: http://www.hcnet.usp.br/ipq/revista/index.html. Acesso em: 4 jun. 2003.

CHASIN, A.M.; LIMA, I.V. Detecção de cocaine, cocaetileno e benzoilecgonina em urina por técnicas cromatográficas (HPTLC, GC-FID e GC-MS). *Rev. Bras. Toxicol*., v.11, supl.2, p.45-49, 1998.

CHRISTOPHER, T.A.; ZECCARDI, J.A. Evaluation of the QED saliva alcohol test a new, rapid, accurate device for measuring ethanol in saliva. *Ann. Emerg.* Med., Irving, v.21, n.9, p.1135-37, 1992.

CHROUCH, D. Alternative drugs, specimens and approaches for non-regulated drug testing. In: KARCH, S.B., ed. *Drug Abuse Handbook.* Boca Raton: CRC Press, 1998, p.776-793.

CHURCH, A.S.; WITTING, M.D. Laboratory testing in ethanol, methanol, ethylene glycol, and isopropanol toxicities. *J. Emerg. Med.,* New York, v.15, n.5, p.687-692, 1997.

CONSELHO NACIONAL DE AUTO-REGULAMENTAÇÃO PUBLICITÁRIA. Ética na Prática. Cód. AutoReg. Public. Código e anexos. Anexo "A" – Bebidas alcoólicas. S.I.: CONAR, 2003. Disponível em: http://www.conar.org.br/adCmsDocumentoShow.aspx?documento=274. Acesso em: 22 set. 2003.

CONSELHO NACIONAL DE AUTO-REGULAMENTAÇÃO PUBLICITÁRIA. Ética na Prática. Cód. AutoReg. Public. Código e anexos. Anexo "P" – Vinhos e cervejas. S.I.: CONAR, 2003. Disponível em: http://www.conar.org.br/adCmsDocumentoShow.aspx?documento=289. Acesso em: 22 set. 2003.

CONSELHO NACIONAL DE AUTO-REGULAMENTAÇÃO PUBLICITÁRIA. Ética na Prática. Cód. AutoReg. Public. Código e anexos. Anexo "T" – Ices e bebidas assemelhadas. S.I.: CONAR, 2003. Disponível em: http://www.conar.org.br/adCmsDocumentoShow.aspx?documento=707. Acesso em: 22 set. 2003.

CONE, E.J. Saliva testing for drugs of abuse. *Ann. N. Y. Acad. Sci.,* New York, v.694, p.91-127, 1993.

CONE, E. J. Legal, workplace, and treatment drug testing with alternative biological matrices on global scale. *Forensic Sci. Int,,* Amsterdam, v.121, p. 7-15, 2001.

CORRÊA, C.L. *Validação da urina para análise toxicológica de etanol em programas de controle e prevenção do uso de álcool e drogas no local de trabalho.* São Paulo, 1997. 97p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

CORRÊA, C.L. *Influência do gênero e da variação dos hormônios femininos (estrógeno e progesterona) na farmacocinética do etanol.* São Paulo, 2001. 107p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

CORRÊA, C.L.; PEDROSO, R.C. Vantagens e limitações do uso da urina como amostra biológica na dosagem alcoólica. R*ev. Psiq. Clín.,* São Paulo, v.27, n.1, 2000. Disponível em: **http://www.hcnet.usp.br/ipq/revista/27(1)/artigo27(22).htm**. Acesso em: 12 Nov. 2003.

DAWSON, D.A.; GRANT, B.F.; CHOU, P.S. Gender differences in alcohol intake. In: HUNT, W.A.; ZAKHARI, S., eds. *Stress, gender, and alcohol-seeking behavior*. National Institute on Alcohol, 1995. p. 1-21. (Abuse and Alcoholism Research Monograph, n.29).

DEAN, R.A.; HARPER, E.T.; DUMAUAL, N.; STOECKEL, D.A.; BOSRON, W.F. Effects of ethanol on cocaine metabolism: formation of cocaethylene and norcocaethylene. *Toxicol. Appl. Pharmacol.,* Orlando, v.117, p. 1-8, 1992.

DEITRICH, R.A.; PETERSEN, D.R. Interaction of ethanol with other drugs**.** In: MAJCHOROWICZ, E.; NOBLE, E.P., eds. *Biochemistry and pharmacology of ethanol.* New York: Plenum Press, New York, 1979. cap.17, p.283-323.

DEGUTI, M.M.; GONÇALVES, L.L. Marcadores biológicos do alcoolismo. R*ev. Psiq. Clín.,* São Paulo, v.27, n.1, 2000. Disponível em: http://www.hcnet.usp.br/ipq/revista/27(1)/artigo27(5).htm. Acesso em: 16 Nov. 2003.

DIAMOND, I.; MESSING, R.O. Neurologic effects of alcoholism. *West. J. Med.,* San Francisco, v.161, p.279-287, 1994.

DEF 2002/2003: Dicionário de especialidades farmacêuticas. 31.ed. Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 2002. 1224p.

DESHMUKH, A.; ROSENBLOOM, M.J.; SASSOON, S.; O'REILLY, A.; PFEFFERBAUM, A.; SULLIVAN, E.V. Alcoholic men endorse more DSM – IV withdrawal symptoms than alcoholic women matched in drinking history. *J. Stud. Alcohol*, Piscataway, v.64, p.375-379, 2003.

DROBITCH, R.K.; SVENSSON, C.K. Therapeutic drug monitoring in saliva: an update. *Clin. Pharmacokinet.,* Auckland, v. 23, p.365-379, 1992.

DRUMMER, O.H.; ODELL, M. Ethanol. In:_____, eds. *The forensic pharmacology of drugs of abuse.* London: Arnold, 2001. cap.6, p.274-320.

DUBOWSKI, K.M. Analysis of ethanol in saliva. In: JENKINS, A.J.; GOLDBERGER, B.A., eds. *On – site drug testing.* Totowa: Humana Press, 2002. cap.7, p.77-93.

DUFOUR, M.C. What is moderate drinking? Defining "drinks" and drinking levels. *Alcohol Res. Health*, Rockville, v.23, n.1, p.5-14, 1999.

ENGELHART, D.A.; JENKINS, A.J. Evaluation of an onsite alcohol testing device for use in postmortem forensic toxicology. *J. Anal. Toxicol.,* Niles, v. 25, p. 612-615, 2001.

EPIDEMIOLOGIA: internações por problemas com drogas psicotrópicas no Brasil: O álcool é ainda o grande vilão. Bol. CEBRID, São Paulo, n.41, 2000. Disponível em:http://www.unifesp.br/dpsicobio/boletim/ed41/14.htm. Acesso em: 16 Jan. 2003.

FARRE, M.; DELATORRE, R., LLORENTE, M.; LAMAS, X.; UGENA, B.; SEGURA, J.; CAMI, J. Alcohol and cocaine interactions in humans. *J. Pharmacol. Exp. Ther.,* Bethesda, v. 266, n.3, p.1364-73, 1993.

FERRAZ, H. Aguardente de cana. *Rev. Eletron. Cienc.*, São Carlos, n.19, 2003. Disponível em: http://www.cdcc.sc.usp.br/ciencia/artigos/aguardente.html. Acesso em: 13 nov. 2003.

FLEMING, M.; MIHIC, S.J.; HARRIS, R.A. Ethanol. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD., L.E., eds. *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics.* 10.ed. New York: McGraw Hill, 2001, cap.18, p.429-445.

FRASER, A.D.; ZAMECNIK, J.; KERAVEL, J.; McGRATH, L.; WELLS, J. Experience with urine drug testing by the Correctional Service of Canada. *Forensic Science Int.,* Amsterdam, v.121, p.16-22, 2001.

FREZZA, M.; PADOVA, C.; POZZATO, G.; TERPIN, M.; BARAONA, E.; LIEBER, C.S. High blood alcohol levels in women: the role of decreased gastric alcohol dehydrogenase activity and first – pass metabolism. *N. Engl. J. Med.,* Waltham, v.322, p.95-99, 1990.

GALDUROZ, J.C.; NOTO, A.R. Uso pesado de álcool entre estudantes de 1° e 2° graus da rede pública de ensino em dez capitais brasileiras. *J. Bras. Dep. Quim.,* São Paulo, v.1, n.1, p.25-32, 2000.

GLANTZ, M.D. A developmental psychopathology model of drug abuse vulnerability. In: GLANTZ, M.; PICKENS, R.W., eds. *Vulnerability to drug abuse.* Washington: American Psychological Association, 1992. p.398-418.

GOLDBERGER, B.A.; ROPERO-MILLER, J.O.; ZAWTA, B.; JACKSON, R. Drug of abuse testing. Mannheim: Roche Diagnostics, 1997. 70p.

GUBALA, W.; ZUBA, D. Saliva as an alternative specimen for alcohol determination in the human body. *Pol. J. Pharmacol.,* Warsaw, v.54, p.161-165, 2002.

GUBALA, W.; ZUBA, D. Gender differences in the pharmacokinetics of ethanol in saliva and blood after oral ingestion. *Pol. J. Pharmacol.,* Warsaw, v.55, n.4, p.639-644, 2003.

GUILBAULT, G.G.; PALLESCHI, G. Non-invasive biosensors in clinical analysis. *Biosens. Bioelectron.,* Amsterdam, v. 10, p. 379-392, 1995.

HADFIELD, R.J.H.; MERCER, M.; PARR, M.J.A. Alcohol and drug abuse in trauma. *Resuscitation.,* Amsterdam, v.48, p.25-36, 2001.

HAECKEL, R.; PEIFFER, U. Comparison of ethanol concentration in saliva and blood from police controlled persons. *Blutakohol,* Hamburg, v.29, p.342-349, 1992.

HEARN, W.L.; FLYNN, D.D.; HIME, G.W.; ROSE, S., CONFINO, J.C.; MANTERO-ATIENZA, E.; WELTI, C.V.; MASH, D.C. Cocaethylene: a unique cocaine metabolite displays high affinity for the dopamine transporter. *J. Neurochem.,* Oxford, v.52, p.698-701, 1991.

HILTUNEN, A.J. Acute alcohol tolerance in socialdrinkers: changes in subjective effects dependent on the alcohol dose and prior alcohol experience. *Alcohol,* New York, v.14, n.4, p.373-378, 1996.

HOBBS, W.R.; RALL, T.W.; VERDOORN, T.A. Hypnotics and sedatives; ethanol. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; MOLINOFF, P.B.; RUDDON, R.W.; GILMAN, A.G., eds. *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics.* 9.ed. New York: McGraw Hill, 1996, cap.17, p.361-396.

HOFFMAN, P.L.; TABAKOFF, B. Ethanol, sedative – hypnotics and glutamate receptor function in brain and cultured cells. *Alcohol and Alcohol.,* Oxford, suppl.2, p.345-351, 1993.

HUESTIS, M.A.; CONE.E.J. Alternative testing matrices. In: KARCH, S.B., ed. *Drug abuse handbook.* Boca Raton: CRC Press, 1998. cap.11, p.799-857.

INOUE, T.; SETA, S.; GOLDBERGER, B.A. Analysis of drugs in unconventional samples. In: LIU, R.H.; GOLDBERGER, B. A., eds. *Handbook of workplace drug testing.* Washington: AACC Press, 1995. cap.5, p.131-158.

JAMAL, M.M.; MORGAN, T.R. Liver disease in alcohol and hepatitis C. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.,* Sidcup*,* v.17, n.4, p.649-662, 2003.

JONES, A.W. A rapid headspace method for ethyl alcohol determination in saliva samples. *Anal. Biochem.,* Orlando, v.86, p. 589-596, 1978.

JONES, A.W. Inter and intra-individual in the saliva blood alcohol ratio during ethanol metabolism. *Clin. Chem.,* Washington, v.25, n.8, p.1394-1398, 1979a.

JONES, A.W. Distribution of ethanol between saliva and blood in man. *Clin.Exp. Pharmacol. Phisiol.,* Carlton, v.6, p.53-59, 1979b.

JONES, A. W. Ethanol distribution ratios between urine and capillary blood in controlled experiments and in apprehended drinking drives. *J. Forensic Sci.,.* West Conshohocken, v.37, n.1, p.21-34, 1992a.

JONES, A.W. Blood and breath alcohol concentrations. *Br. Med. J.,* London, v.305*,* p.955-955, 1992b.

JONES, A.W. Pharmacokinetics of ethanol in saliva: comparison with and breath alcohol profiles, subjective feelings of intoxication, and diminished performance. *Clin. Chem.,* Washington, v. 39, n.9, p.1837-1844, 1993.

JONES, A.W. Measuring ethanol in saliva with QED enzymatic test device: comparison of results with blood and breath-alcohol concentrations. *J. Anal.Toxicol*., Niles, v.19, p.169-174, 1995.

JONES, A.W.; POUNDER, D.J. Measuring blood – alcohol concentration for clinical and forensic purposes. In: KARCH, S.B., ed. *Drug abuse handbook.* Boca Raton*:* CRC Press, 1998. p.327-355.

JONES, A.W.; ANDERSSON, L. Comparison of ethanol concentration in venous blood and end-expired breath during a controlled drinking study. *Forensic Science Int.,* Amsterdam, v.132, p. 18-25, 2003.

JULIEN, R.M. A primer of drug action: a concise, nontechinal guide to the actions, uses, and side effects of psychoactive drugs. 8.ed. New York: W.H. Freeman, 1998. p. 64-92.

KHANNA, J.M.; CHAU, A.; SHAH, G., Characterization of the phenomenon of rapid tolerance to ethanol. *Alcohol,* v.13, n.6, p.621-628, 1996.

KIDWELL, D.A.; HOLLAND, J.C.; ATHANASELIS, S. Testing on drugs of abuse in saliva and sweat. *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.,* Amsterdam, v. 713, n.1, p.111-135, 1998.

KIESOW, L.A.; SIMONS, C.T.; LONG, W.B. Quantitative determination and comparison of ethanol in saliva samples of unknown volumes with blood ethanol levels in human test subjects following ethanol ingestion. *Ann. N.Y. Acad. Sci.,* New York, v. 694, p.293-295, 1993.

KOSTEN, T.R.; HOLLISTER, L.E. Abuso de drogas. In: KATZUNG, B.G., *Farmacologia: básica & clínica.* 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003, cap.32, p. 462-476.

LARINI, L.; SALGADO, P.E.T. Compostos voláteis. In: LARINI, L. *Toxicologia.* 3.ed. São Paulo: Manole, 1997. p.73-119.

LESHNER, A. I. The essence of drug addiction. *National Institute on Drug Abuse.,* Maryland, 2001. Disponível em: http://www.drugabuse.gov/Published_Articles/Essence.htm. Acesso em: 05 mar. 2003.

LIEBER, C.S.; ABITTAN, C.S. Pharmacology and metabolism of alcohol including its metabolic effects and interactions with other drugs. *Dermatol. Clin.,* Orlando, v.17, p. 365-379, 1999.

LIEBER, C.S. Microssomal ethanol-oxidizing system (MEOS): the first 30 years (1968-1998) – a review. *Alcohol Clin. Exp. Res.,* Baltimore, v.23, n.6, p.991-1007, 1999.

LIMA, D.R. Alcoolismo. In: _____. *Manual de Farmacologia, terapêutica e toxicologia.* Rio de Janeiro: Medsi, 2003. v.2, p.72-79.

LITTLE, H.J. The role of calcium channels in drug dependence. *Drug Alcohol Depend.,* Amsterdam, v.38, p.173-194, 1995.

LORIMIER, A.A. Alcohol, wine, and health. *Am. J. Surg.,* Philadelphia*,* v.180, n. 5, p.357-361, 2000.

MACCHIA, T.; MANCINELLI, R.; GENTILI, S.; LUGARESI, E.C.; RAPONI, A.; TAGGI ,F. Ethanol in biological fluids: headspace G.C. measurement. *J. Anal. Toxicol*., Niles, v.19, p.241-246, 1995.

MARQUES, A.C.P.R.; RIBEIRO, M. Álcool. abuso e dependência. In: LARANJEIRA, R., *Usuários de substâncias psicoativas: abordagem, diagnóstico e tratamento.* 2.ed. São Paulo: CREMESP/AMB, 2002. cap.2, p.29-47.

MASTERS, S.B. Os álcoois. In: KATZUNG, B.G. *Farmacologia: básica & clínica.* 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003, cap.23, p. 334-345.

McCOLL, K.E.L.; WHITING, B.; MOORE, M.R.; GOLDBERGER, A. Correlation of ethanol concentrations in blood and saliva. *Clin. Sci.,* Colchester, v.56, p.283-286, 1979.

MÍDIO, A.F. coord. *Glossário de toxicologia,* São Paulo: Roca, 1992, 95p.

MILHORN Jr, T.H. CNS Depressants: alcohol. In: *Chemical Dependence – Diagnosis Treatment and Prevention,* New York, p.124-148, 1990.

MOFFAT, A. C.; JACKSON, J.V.; MOSS, M.S.; WIDDOP, B., Part 2 : monographs analytical and toxicological data. In:_____. eds. *Clarke's isolation and identification of drugs,* 2ª . ed. London: Pharmaceutical Press, 1986. p.593-594.

MORROW, A. L.; VANDOREN, M.J.; PENLAND, S.N.; MATTHEWS, D. B. The role for GABAergic neuroactive steroids in ethanol action, tolerance and dependence. *Brain Res. Rev.,* Amsterdam, v.37, p.98-109, 2001.

MOSKOWITZ, H.; BURNS, M.; FERGUSON, S. Police officers detection of breath odors from alcohol ingestion. *Accid. Anal. Prev.,* Oxford, v.31, p.175-180, 1999.

MOSLEN, M.T. Toxic responses of the liver. In: KLASSEN, C.D.; AMDUR, M.O.; DOULL, J. eds. *Casarett & Doull's toxicology:* the basis science of poisons. 6. ed. New York: MacGraw – Hill, 2001. cap.13, p.471-489.

MOURÃO, L.N.G.; MUÑOZ, D.R.; MOURÃO, T.T.G.; ANDRADE, A.G. Aembriaguez e o trânsito: avaliação da nova lei de trânsito no que se refere à abordagem da embriaguez. *Rev. Psiq. Clín.,* São Paulo, v.27(2), 2000, 10p. Disponível em: http://www.hcnet.usp.br/ipq/revista/r27(2)/art83.htm. Acesso em: 15 nov. 2003.

MUKAMAL, K.J.; CONIGRAVE, K.M.; MITTLEMAN, M.A., Roles of drinking pattern and type of alcohol consumed in coronary heart disease in men. *N. Engl. J. Med.,* Watham, v.348, p.109-118, 2003.

MUSSHOFF, F.; DALDRUP, T. Determination of biological markers for alcohol abuse. *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.,* Amsterdam, v.713, p.245-264, 1998.

NATIONAL COUNCIL ON ALCOHOLISM AND DRUG DEPENDENCE. The disease of alcoholism. *NCADD Publications.* New York, 1990. Disponível em: http://www.ncadd.org/pubs/disease.html. Acesso em: 11 set. 2003.

NEIMAN, J. Alchol as a risk factor for brain damage: neurological aspects. *Alcohol Clin. Exp. Res.,* Baltimore, v.22, suppl.7, p.346-351, 1998.

NOTO, A.R. O uso das drogas psicotrópicas no Brasil: última década e tendências. *Mundo Saúde,* São Paulo, v.23, n.1, p.5-9, 1999.

NUTT, D.J.; PETERS, T.J. Alcohol: the drug. *Br. Med. Bull.,* Oxford, v.50, n.1, p.5-17, 1994.

OLIVEIRA, L.A.C. Perfil do dependente químico ontem e hoje. Rev. *Mundo Saúde,* São Paulo, v.23, n.1, p.24-27, 1999.

OLIVEIRA, A.F.; ANEFALOS, L.C.; GARCIA, L.A.F.; ISTAKE, M.; BURNQUIST, H.L. Sistema agroindustrial da cachaça e potencialidades de expansão das exportações. Ribeirão Preto: FEARP/USP, 2001. Disponível em: www.fearp.usp.br/egna/resumos/Oliveira.pdf. Acesso em: 11 set. 2003.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL Da SAÚDE. Classificação de transtornos mentais e de comportamento da CID-10: descrições clínicas e diretrizes diagnósticas. Porto Alegre: Artes Médicas; 1993. p.69-82.

OSBORN, H. Ethanol. In: GOLDFRANK, L.R.; FLOMENBAUM, N.A.L.; LEWIN, N.A.; WEISMAN, R.; HOWLAND, M.A.; HOFFMAN, R.S., eds. *Goldfrank's toxicologic emergencies*. 5.ed. Norwalk: Appleton & Lange, 1994. cap.57, p.813-824.

PARKINSON, A. Biotransformation of xenobiotics. In: KLASSEN, C.D.; AMDUR, M.O.; DOULL, J., eds. *Casarett & Doull's toxicology:* the basis science of poisons. 6. ed. New York: MacGraw – Hill, 2001. cap.6, p.131-224.

PESSINI, L. Drogas: o holocausto silencioso. Rev. *Mundo Saúde,* São Paulo, v.23, n.1, p.3-4, 1999.

PIANO, M. R. Alcohol and heart failure. *J. Card. Failure.,* Orlando, v.8, n.4, p.239-246, 2002.

POUNDER, D.J.; JONES, A.W. Measuring alcohol post mortem. In: KARCH, S.B., ed. *Drug abuse handbook.* Boca Raton: CRC Press, 1998. p.356-374.

PRAGST, F.; AUWAERTER, V.; SPORKERT, F.; SPIEGEL, K. Analysis of fatty acid ethyl esters in hair as possible markers of chronically elevated alcohol consumption by head, space solid-phase microextraction (HS-SPME) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *Forensic Science Int.,* Amsterdam, v.121, p. 76-88, 2001.

RAMCHANDANI, V.A.; BOSRON, W.F.; LI, T.K. Research advances in ethanol metabolis. *Pathol. Biol.,* Paris, v.49, p.676-682, 2001.

RAMOS, K.S.; MELCHERT, R.B.; CHACON, E.; JUNIOR, D.A. Toxic responses of the heart and vascular systems In: KLASSEN, C.D.; AMDUR, M.O.; DOULL, J. eds. *Casarett & Doull's toxicology:* the basis science of poisons. 6. ed. New York: MacGraw – Hill, 2001. cap.18, p.597-651.

RANG H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. Dependência e abuso de drogas. In:_____. eds., *Farmacologia.* 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001a. cap.39, p.515-531.

RANG H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. Sistema vascular. In:_____. eds. *Farmacologia.* 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001b, cap.15, p.229-246.

RODIONOV, Y.V.; KEPPEN, O.I.; SUKHACHEVA, M.V. A photometric assay for ethanol. Appl. Biochem. Microbiol., New York, v.38, n.4, p.395-396, 2002.

ROSETT, L.R. Clinical pharmacology of the fetal alcohol syndrome. In: MAJCHOROWICZ, E.; NOBLE, E.P., eds. *Biochemistry and pharmacology of ethanol.* New York: Plenum Press, 1979, cap.25, p.485-509.

SÁ, L.M. *Identificação rápida do etanol na saliva humana para diagnóstico de embriaguez.* São Paulo, 1969. 57p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

SÃO PAULO (Estado). ASSEMBLÉIA LEGISLATIVA; UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. FACULDADE DE MEDICINA. HOSPITAL DAS CLÍNICAS; SÃO PAULO (Estado). SECRETARIA DE SEGURANÇA. *Mais vida menos álcool.* São Paulo: Faculdade de Medicina, Fundação Zerbini, Grupo Papaiz, s.d.

SCHECHTER, M.D.; MEEHAN, S.M. The letal effects of ethanol and cocaine and their combination in mice: implications for cocaethylene formation. *Pharmacol. Biochem. Behav.,* New York, v.52, n.1, p. 245-248, 1995.

SCHRAMM, W.; SMITH, R.H.; CRAIG, P.A. Drugs of abuse in saliva. *J. Anal. Toxicol.,* Niles, v.16, p.1-9, 1992.

SCIVOLETTO, S.; MALBEGIER, A. Etanol. In: OGA, S. *Fundamentos da Toxicologia*. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2003. p.284-296.

SILVA, O.A. Consumo de drogas de abuso no ambiente de trabalho no Brasil. *Rev. Bras. Toxicol*., São Paulo, v.11, supl.1, p.7-10, 1999.

SILVA, O.A.; YONAMINE, M.; ODO, S. A. Drug abuse testing in the workplace: the Brazilian experience. In: CONGRESS OF TOXICOLOGY IN DEVELOPMENT COUNTRIES, 4, Antalya, 1999. *Abstracts*. Antalya: Turkish Society of Toxicology, 1999. p.21

SPIEHLER, V.; BALDWIN, D.; HAND, C. Analysis of drugs in saliva. In: JENKINS, A.J.; GOLDBERGER, B.A. eds. *On – site drug testing.* Totowa: Humana Press, 2002, cap.8, p.95-109.

SUNSHINE, I. Immunoassy. In: SUNSHINE, I. *Was it a poisoning?* S.I. American Academy of Forensic Sciences, 1998, p.157-160.

THERAPONDOS, G.; DELAHOOKE, T.E.S.; HAYES, P.C. Health effects of alcohol and alcoholism. *Dermatol. Clin.,* Orlando, v.17, p.381-389, 1999.

TOLEDO, F.C.P. *Identificação de benzoilecgonina por imunofluorescência polarizada em cabelo de usuários de cocaína.* São Paulo, 1999. 97p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

UNITED NATIONS OFFICE FOR DRUG CONTROL AND CRIME PREVENTION. Guidelines for testing drugs under international control in hair, sweat and saliva. Austria: United Nations Publications, 2001, 23p.

UNITED STATES. Department of Heath and Human Services. National Institutes of Health. National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism. Publicações. 2002. Disponível em: http://www.niaaa.nih.gov/publications/harmsp.htm. Acesso em: 11 jul. 2003.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Faculdade de Medicina. Hospital das Clínicas. Instituto de Psiquiatria. Grupo Interdisciplinar de Estudos de Álcool e Drogas. *Introdução à problemática do álcool.*, 1999. Disponível em: http://www.rc.unesp.br/conhecer/apostilas/problematica.html. Acesso em 16 janeiro 2003.

UNITED STATES. Department of health and human services; UNITED STATES. Department of agriculture. Nutrition and your health: guidelines for Americans. 4.ed. Washington: USDA, 1995.

WEATHERMON, R.; CRABB, D.W. Alcohol and medication interactions. *Alcohol Res. Health,* Rockville, v.23, n.1, p.40-51, 1999.

WILLIAMS, G.D.; STINSON, F.S.; SANCHEZ, L.L.; DUFOUR, M.C. Apparent per capita alcohol consumption. *Surveillance Report,* Bethesda, n.43, p.1977-1995, 1997.

WINECKER, R.E.; GOLDBERGER, B.A. Urine specimen suitabity for drug testing. In: KARCH, S.B., ed. *Drug abuse handbook.* Boca raton: CRC Press, 1998. p.764-793.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Lexicon of alcohol and drugs terms. W*orld Health Organization.* Geneva, 1994, 65p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. International guide for monitoring alcohol consumption and related harm. W*orld Health Organization.* Geneva, 2000. Disponível em: http://www.who.int/substance_abuse/PDFfiles/guidemontr_alcoholconsum.pdf. Acesso em: 22 dez. 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. search: alcohol country profile: data.euro.who.int/?TabID=2422. *table: price comparison.* Disponível em: http://data.euro.who.int/Default.aspx?TabID=2422. Acesso em: 18 nov. 2003a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. search: alcohol country profile: data.euro.who.int/?TabID=2422. *table: drink drive.* Disponível em: http://data.euro.who.int/Default.aspx?TabID=2422. Acesso em: 18 nov. 2003b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. global alcohol database. Alcohol consumption. Adult per capita alcohol consumption. Brasil. *Country: Brasil* Disponível em: http://www3.who.int/whosis/menu. Acesso em: 23 jul. 2003c.

WURST, F.M.; KEMPTER, C.; SEIDL, S.; ALT, A. Ethyl glucuronide a marker of alcohol consumption and a relapsed marker with clinical and forensic implications. *Alcohol Alcohol.,* Oxford, v. 34, n.1, p.71-77, 1999.

ZAGO, J.A.; SANTOS,S.A.M.; SALZANI, J.C.; ARAÚJO, J.A.S.M. Dependência de álcool por uso indevido de substância fitoterápica. *J. Bras. Psiquiatr.,* São Paulo, 4p. Disponível em:http://www.unifesp.br/dpsiq/polbr/ppm/relato03.htm. Acesso em: 04 nov. 2003.

10. ANEXOS

ANEXO I

PROTOCOLO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FCF/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP nº 63

São Paulo, 24 de junho de 2003.

Ilmo(a) Sr(a).
Nádia Tawil

Vimos informar que o Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 23 de junho p.passado, **APROVOU** o projeto "Determinação de etanol em amostras de saliva" (Protocolo nº 181) apresentado por Vossa Senhoria.

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. Tit. Dulcinéia Saes Parra Abdalla
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP

Orientador: Prof. Ovandir Alves Silva
FBC

Av. Prof. Lineu Prestes, nº 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091-3677 - Fax (11) 3031-8986 - e-mail: rtrigo@usp.br

ANEXO II

QUESTIONÁRIO SUBMETIDO AOS VOLUNTÁRIOS QUE PARTICIPARAM DO ESTUDO CONTROLADO DE INGESTÃO DE BEBIDA ALCOÓLICA

Identificação da amostra: Nº.....

QUESTIONÁRIO

1. Dados pessoais:

Sexo:

( ) Masculino ( ) Feminino

Idade:.....anos

2. Medicamentos utilizados nos últimos 5 dias (remédios para gripe, resfriados, remédios para emagrecimento, etc).

_____

_____

_____

_____

3. Você usou recentemente:

( ) bebidas alcoólicas (etanol)

Caso afirmativo, data (dia e hora) do último uso:

_____

ANEXO III

MODELO DO TERMO DE AUTORIZAÇÃO E CONSENTIMENTO PÓS - INFORMAÇÃO APLICADO AOS VOLUNTÁRIOS DO ESTUDO CONTROLADO DE INGESTÃO DE BEBIDA ALCOÓLICA

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA

1. Nome :
.....
.....

Documento de Identidade Nº :.....Sexo: ( )M ( )F
Data de Nascimento:...../...../.....
Endereço:.....Nº:.....
Apto:.....
Bairro:.....Cidade:.....
CEP:.....Telefone:.....

II – DADOS SOBRE A PESQUISA

1.Título do Protocolo de Pesquisa: "Determinação de etanol *em saliva"*

2.Pesquisadora: Nádia Tawil.
Cargo/Função: Farmacêutica-Bioquímica.
Inscrição Conselho Regional Nº 25. 412
Departamento FCF/USP: Análises Clínicas e Toxicológicas.

3.Avaliação do risco da pesquisa: Risco mínimo
Obtenção de amostra de saliva considerada não invasiva.

4.Duração da Pesquisa: pesquisa considerada de curta duração, pois consta de poucas coletas de amostra.

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO VOLUNTÁRIO OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

O voluntário irá fornecer uma amostra de saliva, coletada por dois meios: bastão de algodão e um coletor específico fornecido pelo pesquisador responsável - Salivette®. Este tipo de coleta não apresenta risco para o voluntário, por se tratar de um procedimento seguro e não invasivo. A amostra de saliva fornecida será submetida ao teste rápido Q.E.D. A 150, e técnica chamada cromatografia em fase gasosa com separação por aquecimento – *headspace* - que irá determinar quantidade de etanol presente. Os resultados obtidos serão analisados juntamente com as respostas dos questionários.

IV – ESCLARECIMENTOS FORNECIDOS 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:

Pesquisadores responsáveis: Prof. Dr. Ovandir Alves Silva
Nádia Tawil
Endereço: Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Av. Prof. Lineu Prestes, 580 Bloco 13B- 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	Assinatura do Pesquisador ou responsável legal (carimbo ou nome legível)

Prezado participante

Meu nome é Nádia Tawil, sou Farmacêutica - Bioquímica e mestranda do Programa de Pós – Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Estou desenvolvendo um estudo para a determinação de álcool (etanol) em saliva e para tal necessito de sua participação.
Sendo o álcool uma droga de uso lícito e o alcoolismo uma doença é importante à adoção de medidas que colaborem na redução de seu consumo, pois a ingestão de álcool está intimamente relacionada com: acidentes no trânsito e ocorrências no ambiente de trabalho e internações em clínicas e hospitais. Dessa forma é necessário desenvolver métodos que permitam verificar a concentração de etanol no organismo, possibilitando que pessoas (inclusive você) bebam de acordo com seus limites biológicos, evitando a exposição a riscos desnecessários.
O objetivo desse estudo é investigar a possibilidade de utilização da amostra de saliva como matriz alternativa para determinação de etanol em campo aberto, substituindo as matrizes convencionais atualmente utilizadas.
O estudo não oferece riscos para participante, pois as coletas de saliva são feitas com coletores individuais e específicos, não tendo caráter invasivo e não transmitindo nenhum risco de contaminação para o participante.
Você poderá escolher entre as bebidas: cerveja e uísque e a quantidade a ser ingerida deve ser proporcional ao seu peso, não ultrapassando 0,68g/Kg de etanol, concentração que não ocasiona embriaguez. A ingestão da bebida ocorrerá em 20 (vinte) minutos e após isso serão realizadas coletas de saliva no intervalo de 50 (cinqüenta) a 130 (cento e trinta) minutos.
O estudo é anônimo e a confidencialidade de sua participação será preservada. A identificação das amostras será feita apenas através de uma numeração impressa nos coletores de saliva e nos testes rápidos aplicados. As dúvidas poderão ser esclarecidas pelo Prof. Dr. Ovandir Alves Silva ou por mim no telefone (11) 3889-8960.

Se você quiser participar do estudo, basta assinar a autorização na página seguinte.

TERMO DE AUTORIZAÇÃO

Eu.....Identidade n°.....
autorizo a coleta de amostras de saliva após ter sido esclarecido pelo responsável pela pesquisa e ter entendido os procedimentos de coleta.

Data...../...../.....

_____

Assinatura do doador
da amostra