

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
ÁREA DE INVESTIGAÇÃO BIOMÉDICA APLICADA À CLÍNICA MÉDICA

GUILHERME VANNUCCHI PORTARI

**Infusão de glicose e tiamina em ratos tratados com dose aguda de  
etanol**

Ribeirão Preto  
2006

GUILHERME VANNUCCHI PORTARI

**Infusão de glicose e tiamina em ratos tratados com dose aguda de etanol**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Clínica Médica.

Área de Concentração: Investigação Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Júnior

Ribeirão Preto  
2006

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Portari, Guilherme Vannucchi

Infusão de glicose e tiamina em ratos tratados com dose aguda de etanol / Guilherme Vannucchi Portari.  
103 f.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo.  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto,  
2006.

Área de concentração: Investigação Biomédica  
Orientador: Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Júnior.

1. Tiamina 2. Etanol 3. Cromatografia Gasosa

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Guilherme Vannucchi Portari

Infusão de glicose e tiamina em ratos tratados com dose aguda de etanol

Dissertação apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Investigação Biomédica.

Aprovação em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

## ***Dedicatória***

Aos meus pais Ricardo (*in memoriam*) e Maria Helena pelo incansável incentivo e esforço aos meus estudos e à minha esposa Maria Laura pela constante presença e compreensão.

## **Agradecimentos**

Ao meu Orientador Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Júnior pela amizade e pelos ensinamentos pacientes com que me conduziu nesta jornada.

Aos professores Dr. Júlio Sérgio Marchini e Dr. Helio Vannucchi pelo acolhimento em seus laboratórios que possibilitaram a realização deste trabalho.

Ao técnico de laboratório Gilberto João Padovan por todo suporte no laboratório de espectrometria de massa.

Aos técnicos do biotério do Departamento de Clínica Médica, Adalberto Verceze, Maurício Arantes e Roni Charles pelas orientações e ajuda em toda parte de experimentação animal.

Às técnicas de laboratório Mônica Meirelles e Renata Lataro pelas coletas de materiais e dosagens realizadas.

À secretária da Pós-Graduação do Departamento de Clínica Médica Adriana pela competência e auxílios prestados.

Às minhas amigas de laboratório Andréa Tannus, Karina Pfrimer e Estela Rabitto pela companhia e trocas de experiência.

Aos meus irmãos e sobrinhos pela compreensão da minha ausência.

À Tia Terê pelo carinho e acolhimento em Ribeirão Preto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP – pela concessão de Auxílio à Pesquisa, processo nº 95/06191-2.

À todos os colegas aqui não citados que direta ou indiretamente ajudaram na execução deste trabalho.

## Sumário

Lista de tabelas	
Lista de figuras	
Resumo	
Abstract	
1. Introdução	10
2. Revisão da literatura	12
2.1. Metabolismo do etanol e radicais livres	12
2.2. Utilização de glicose e tiamina no tratamento da intoxicação aguda por etanol	16
2.3. Cromatografia gasosa na análise da etanolemia e compostos correlatos	21
3. Objetivos	27
3.1. Objetivo geral	27
3.2. Objetivos específicos	27
4. Material e métodos	28
4.1. Material	28
4.2. Delineamento experimental	28
4.3. Gavagem	29
4.4. Tratamentos específicos	29
4.4.1. Grupo EtOH+Glicose (EtOH+Gli)	32
4.4.2. Grupo EtOH+Tiamina (EtOH+B1)	32
4.5. Determinação de etanol no sangue e urina por cromatografia gasosa	32
4.5.1. Preparo da amostra	32
4.6. Reagentes	32
4.7. Equipamentos	33
4.8. Preparo das soluções estoque de etanol e padrão interno (acetonitrila)	34
4.9. Validação do método cromatográfico	35
4.9.1. Tempo de retenção ( $t_r$ ) e resolução ( $R$ ) dos analitos	35
4.9.2. Precisão	35
4.9.3. Exatidão	35

4.9.4. Limites de detecção e quantificação	36
4.9.5. Linearidade	36
4.9.6. Seletividade	36
4.10. Análise por cromatografia gasosa	36
4.11. Preparo da curva de calibração	36
4.12. Determinação da glicemia	37
4.13 Determinação da concentração de vitamina E	38
4.14. Glutathiona reduzida	39
4.15. Determinação da peroxidação lipídica	40
4.16. Determinação de proteína	40
5. Análise estatística	40
6. Resultados	42
6.1. Validação da metodologia	42
6.2. Experimentação animal	56
7. Discussão	82
8. Conclusões	91
Referência bibliográficas	92
Anexo	103



## Lista de tabelas

Tabela 1 – Concentrações de etanol na curva de calibração	38
Tabela 2 – Tempos de retenção dos analitos acetaldeído, etanol e acetonitrila	44
Tabela 3 – Coeficientes de resolução dos analitos acetaldeído, etanol e acetonitrila	46
Tabela 4 – Coeficiente de variação (precisão) das análises de etanol em sangue e urina	48
Tabela 5 – Variação percentual (recuperação) entre valor teórico e valor medido na análise de etanol em sangue e urina	50
Tabela 6 – Limites de detecção e quantificação	52
Tabela 7 – Valores de linearidade e faixa de aplicação das curvas de calibração do etanol, acetaldeído, metanol e acetona	54
Tabela 8 – Volumes de urina coletados nos dois períodos para cada grupo experimental	70
Tabela 9 – Excreção urinária de etanol	72
Tabela 10 - Percentual de etanol excretado na urina em relação à dose inicial	74
Tabela 11 – Concentrações hepáticas de malonaldeído (nmoles de MDA/mg de proteína)	76
Tabela 12 – Valores de glutathiona reduzida hepática ( $\mu\text{mol}$ de GSH/g de proteína)	77
Tabela 13 – Concentrações de vitamina E hepática ( $\mu\text{moles}$ de Vitamina E/g de tecido)	78

## Lista de figuras

Figura 1 – Estágios observados na intoxicação aguda por etanol	11
Figura 2 – Transformação do etanol a acetaldeído pela álcool desidrogenase	13
Figura 3 – Molécula de hidrocloreto de tiamina	18
Figura 4 – Mecanismo de produção dos AGEs	21
Figura 5 – Desenho esquemático da técnica de <i>headspace</i>	23
Figura 6 - Desenho experimental para determinação de alcoolemia	30
Figura 7 – Desenho experimental para a dosagem de álcool na urina	31
Figura 8 – Parâmetros utilizados no cromatógrafo gasoso	39
Figura 9 – Cromatogramas típicos de: a) padrão, b) sangue e, c) urina	43
Figura 10 – Curva de calibração do etanol	55
Figura 11 – Análise temporal da alcoolemia no grupo EtOH	58
Figura 12 – Análise temporal da alcoolemia no grupo EtOH+Gli	59
Figura 13 – Análise temporal da alcoolemia no grupo EtOH+B1	60
Figura 14 – Análise entre grupos das variações na alcoolemia em relação ao período experimental	61
Figura 15 – Variação glicêmica no grupo EtOH	63
Figura 16 – Variação glicêmica no grupo EtOH+Gli	64
Figura 17 – Variação glicêmica no grupo EtOH+B1	65
Figura 18 – Análise entre grupos das variações glicêmicas em relação ao período experimental	66
Figura 19 – Concentrações de etanol urinário	68
Figura 20 – Comparações das variações de MDA, GSH e Vitamina E no Grupo EtOH	79
Figura 21 – Comparações das variações de MDA, GSH e Vitamina E no Grupo EtOH+Gli	80
Figura 22 – Comparações das variações de MDA, GSH e Vitamina E no Grupo EtOH+B1	81

## Resumo

Postula-se que o metabolismo do etanol gera substâncias de alta reatividade como o acetaldeído e radicais livres, que promovem o estresse oxidativo pelo excessivo consumo de substâncias do sistema antioxidante.

Embora não haja consenso na literatura, o uso intravenoso de glicose em casos de intoxicação aguda por álcool é prática rotineira visando restabelecer a sobriedade do paciente através de um possível aumento do metabolismo do etanol.

Apesar de se acreditar em um possível benefício do uso de glicose na intoxicação aguda por etanol, recentes estudos têm apontado que a hiperglicemia causa autooxidação da glicose, glicação de proteínas, e a ativação do metabolismo de polióis. Estas mudanças aceleram a geração de espécies reativas de oxigênio e aumento na oxidação de lipídios, DNA e proteínas em vários tecidos, pela produção de produtos finais de glicação avançada (AGEs - *Advanced glycation end products*).

Recentemente estudos têm apontado para um possível papel antioxidante da tiamina frente ao estresse oxidativo.

Este trabalho teve como objetivo a padronização de uma técnica para dosagem de etanol por cromatografia gasosa a fim de se estudar os efeitos sobre o metabolismo desse álcool em ratos agudamente alcoolizados e submetidos a 3 tratamentos distintos que consistiram na administração de etanol na dose de 5g/kg peso, administração de etanol e posterior infusão endovenosa de glicose (0,06 mL de glicose em solução 50%/100 g de peso) ou administração de etanol e posterior infusão endovenosa de tiamina (0,143 mg/100 g de peso), bem como verificar os efeitos sobre o sistema antioxidante hepático, pela determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB), glutatona reduzida (GSH) e vitamina E.

A padronização da técnica por cromatografia gasosa para dosagem de etanol em sangue e urina foi realizada, obtendo-se bons resultados quanto à, precisão (C.V. entre amostras < 6%), exatidão (variação da recuperação < 15%) e linearidade ( $r=0,9991$ ), o que permitiu analisar a alcoolemia e a excreção urinária dos grupos de ratos com diferentes tratamentos. Nesta determinação também foi possível a detecção de substâncias relacionadas ao metabolismo do etanol como, acetaldeído, acetona e metanol.

Não foram observadas diferenças entre as curvas de etanolemia dos diferentes grupos. Entretanto, verificou-se uma excreção urinária cerca de 4 vezes maior no grupo que recebeu tiamina. Observou-se uma menor produção de substâncias relacionadas com a peroxidação lipídica (SRATB) e um menor consumo de antioxidantes (GSH e vitamina E) nos ratos tratados com tiamina, mesmo tendo-se verificado neste grupo uma manutenção da hiperglicemia até o período final de experimentação.

Desta maneira, conclui-se que o tratamento com glicose no quadro de intoxicação aguda por etanol foi ineficaz na diminuição da etanolemia além de representar maior potencial de dano oxidativo. Em contraste, a tiamina mostrou-se eficaz principalmente no que diz respeito à manutenção do sistema antioxidante hepático.

Palavras chave: etanol, alcoolemia, tiamina, radicais livres, glicose, AGEs, cromatografia gasosa.

## Abstract

It's proposed that the metabolism of ethanol produces substances of high reactivity as acetaldehyde and free radicals, which promote oxidative stress through the excessive consumption of antioxidant substances.

Although, there is no consensus in literature, the intravenous use of glucose in acute alcoholic intoxication, is a common practice, in tenting to recover soberness through the increase of ethanol metabolism.

In spite of this possible benefit of the use of glucose in acute alcoholic intoxication, recent studies has showed that the hyperglycemia causes autoxidation of glucose, glycation of proteins and the activation of polyol metabolism. These changes speed up the generation of reactive oxygen species and the increase of lipid peroxidation, DNA and proteins oxidations in many tissues, through the production of advanced glycation end products (AGEs).

Recently, some studies have pointed out for a possible antioxidant role of thiamine in oxidative stress.

The aim of this study was to standardize a technique in order to dose ethanol using gas chromatography to study its effects in the alcohol metabolism in rats submitted to acute alcoholic intoxication and treatment in three distinct ways: 1) intragastric ethanol administration in dose of 5 g/kg; 2) intragastric ethanol administration in dose of 5 g/kg and, then, intravenous infusion of glucose (0,06 mL of 50% solution of glucose/100 g of weight), and, 3) intragastric ethanol administration in dose of 5 g/kg and, then, intravenous infusion of thiamine (0,143 mg/100 g of weight). Also it has aimed to verify the effects on hepatic antioxidant system through the determination of thiobarbituric acid reactive substances, reduced glutathione and vitamin E.

The standardization of the technique for gas chromatography to dose ethanol in blood and urine had fine results in relation of precision (C.V. among samples < 6%), accuracy (recovery variation < 15%) and linearity ( $r=0,9991$ ), what permitted to analyze the alcoholemia and the urinary excretion of the groups of rats with distinct treatments. In this determination, it was also possible the detection of substances related to ethanol metabolism as acetaldehyde, acetone and methanol.

It was not observed differences between the ethanolemia curves in the distinct groups. Although, it was encountered a urinary excretion about 4 times greater in the group that had received thiamine. It was observed a lesser production of substances related to lipid peroxidation (TBARS) and a lesser consumption of antioxidants (GSH and vitamin E) in rats treated with thiamine, in spite of that this group had kepted hyperglycemia until the last period of experimentation.

Then, it can be concluded that the treatment with glucose in acute alcoholic intoxication was inefficient to diminish ethanolemia, besides it could provoke higher oxidative damage. In contrast, thiamine has showed to be efficient, mainly about the maintenance of hepatic antioxidant system.

Key words: ethanol, alcoholemia, thiamine, free radicals, glucose, AGEs, gas chromatography.

## 1. Introdução:

O consumo mundial de bebidas alcoólicas é crescente nas últimas décadas e, neste contexto, está inserido o Brasil, no qual o consumo per capita duplicou nos últimos trinta anos (Li, Chen *et al.*, 2004). Kypri *et al.* (2005), em estudo com uma comunidade universitária por meio de auto-relato, verificaram que 39% dos entrevistados homens e 37% das mulheres relataram ter bebido uma quantidade de álcool que resultou em intoxicação, utilizando como parâmetro a quantidade de álcool ingerida em um único episódio que levou a uma concentração sanguínea de etanol de 0,08 g%.

Segundo Lieber (2005), o consumo de álcool pode levar a danos no organismo decorrentes de desnutrição primária, ou seja, substituição de outros nutrientes pelo álcool, ou secundária; devido à má digestão e/ou má absorção de nutrientes. Somando-se à desnutrição, o metabolismo do etanol gera substâncias de alta reatividade como o acetaldeído e radicais livres, que provocam injúrias em órgãos inespecíficos, quer por excessivo consumo, quer por modificações em moléculas essenciais à homeostase do organismo.

Embora não haja consenso na literatura, o uso intravenoso de glicose em casos de intoxicação aguda por álcool é prática rotineira visando restabelecer a sobriedade do paciente através de um possível aumento do metabolismo do etanol. Na figura 1 estão representados os estágios da intoxicação aguda por etanol, assim como a concentração sanguínea correspondente.

A detecção e quantificação do etanol são de grande valia tanto em termos de pesquisa quanto para a prática clínica. Os métodos utilizados podem ser químicos, colorimétricos, enzimáticos ou cromatográficos, sendo este último o padrão de

excelência.

<b>Concentração Sanguínea de Etanol (g/L)</b>	<b>Estado</b>	<b>Sinais/Sintomas Clínicos</b>
0,1 – 0,5	Sobriedade	Nenhuma influência aparente Comportamento muito próximo ao normal Mudanças sutis só detectadas por testes especiais
0,3 – 1,2	Euforia	Euforia moderada, sociabilidade, tagarelice Aumento de auto-confiança, diminuição de inibições Diminuição da atenção e raciocínio Perda de eficiência em testes finos
0,9 – 2,5	Excitação	Instabilidade emocional Perda de crítica Deterioração de memória e compreensão Diminuição da resposta sensitiva e aumento do tempo de resposta Alguma incordenação muscular
1,8 – 3,0	Confusão	Desorientação, confusão mental, vertigem Estados emocionais exagerados (medo, irritação) Distúrbios de sensação, percepção de cores, formas, movimentos e dimensões Diminuição do estímulo doloroso
2,7 – 4,0	Estupor	Apatia, inércia, chegando à paralisia Acentuada diminuição na resposta a estímulo Acentuada incordenação muscular Vômito, incontinências urinária e fecal Deterioração do estado de consciência
3,5 – 5,0	Coma	Inconsciência completa, coma, analgesia Reflexos deprimidos ou ausentes Incontinência urinária e fecal Comprometimento circulatório e respiratório Morte

**Figura 1 – Estágios observados na intoxicação aguda por etanol.**

Fonte: Dubowski (1980).

## 2. Revisão da Literatura:

### 2.1. Metabolismo do etanol e radicais livres:

O etanol ou álcool etílico é uma substância orgânica do grupo dos álcoois com fórmula molecular  $C_2H_5OH$ . Possui massa molecular de 46,07 g/mol e densidade 0,789 g/mL. Apresenta-se líquido na temperatura ambiente e tem ponto de ebulição a 78,5 °C.

O etanol está contido em bebidas em que há a fermentação de açúcares e este processo é conhecido desde a antiguidade, datando também desta época o consumo humano de bebidas alcoólicas. No entanto, somente no século passado iniciaram-se pesquisas sistematizadas com respeito aos efeitos do álcool no organismo (Oliveira e Luis, 1996).

Após sua ingestão, o etanol tem sua absorção principalmente no intestino delgado (Yost, 2002) e somente uma pequena fração é absorvida pelo estômago (Levitt, Li *et al.*, 1997), sendo que nos dois órgãos a absorção é dependente do esvaziamento gástrico (Jones, Jonsson *et al.*, 1997; Oneta, Simanowski *et al.*, 1998; Pastino e Conolly, 2000; Klockhoff, Naslund *et al.*, 2002).

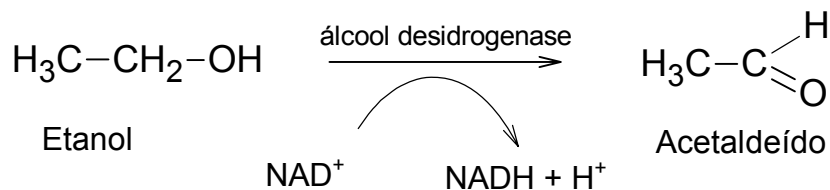
De todo etanol absorvido somente 2 a 10% é eliminado pelos rins e pulmões na sua forma original, ou seja, sem sofrer nenhuma transformação pelo sistema de detoxificação de xenobióticos (Jaeschke, Gores *et al.*, 2002; Lieber, 2005).

Exceto pelo estômago, o fígado é o órgão que possui a capacidade de metabolização do etanol (Oneta, Simanowski *et al.*, 1998; Lieber, 2005).

O metabolismo hepático do etanol é realizado através de três vias enzimáticas: a via da álcool desidrogenase, do sistema microsomal de oxidação do

etanol e a via da catalase (Lieber, 2004, 2005). O primeiro passo do catabolismo do etanol é comum para as três vias e é representado pela produção de um metabólito de maior toxicidade, o acetaldeído.

Quando da ingestão de pequena quantidade de álcool, a via da enzima álcool desidrogenase catalisa a conversão do etanol a acetaldeído e este, por sua vez, é convertido a acetato pela ação da enzima aldeído desidrogenase. Esta via é dependente de nicotinamida adenina dinucleotídeo na sua forma oxidada ( $\text{NAD}^+$ ) que capta hidrogênio transferido do etanol pela álcool desidrogenase formando, assim, NADH (Figura 2) (Maher, 1997; Lieber, 2005).



**Figura 2 – Transformação do etanol a acetaldeído pela álcool desidrogenase.**

Como resultado desta via ocorre um desequilíbrio da razão  $\text{NADH}/\text{NAD}$  intracelular, ocasionando alterações metabólicas danosas ao fígado, como estimulação da lipogênese e decréscimo da taxa de oxidação de ácidos graxos, levando ao acúmulo de gordura, observada como esteatose (Jaeschke, Gores *et al.*, 2002).

A metabolização por meio da álcool desidrogenase inicia-se no estômago, já que este órgão também apresenta esta enzima nas células da mucosa (Lieber, 1997). Ocorre no estômago, portanto, um efeito de primeira passagem do etanol (Pastino e Conolly, 2000; Parlesak, Billinger *et al.*, 2004).

A via da álcool desidrogenase confere uma cinética de eliminação do etanol



de ordem zero, ou seja, há uma relação de dose-dependência na qual, em alta concentração, o sistema torna-se saturado (Winek e Murphy, 1984; Pastino e Conolly, 2000; Fujimiya, Ohbora *et al.*, 2003).

No entanto, alguns autores relatam uma cinética de 1ª ordem para a eliminação do etanol (O'Neill, Tipton *et al.*, 1984; Winek e Murphy, 1984), quando este está presente em níveis de intoxicação  $\geq 500$  mg/L ou pelo consumo crônico (Lieber, 2005), o que indicaria a participação de um sistema enzimático de metabolismo passível de indução nas condições supra citadas.

Assim, em 1966, Lieber e DeCarli, postularam a existência do sistema de oxidação microssomal do etanol (MEOS – microssomal ethanol oxidation system), comprovada em 1968 pelos mesmos autores (Lieber, 2004). Localizado no retículo endoplasmático dos hepatócitos, o MEOS é uma classe de isoenzimas do citocromo P450 que possui alta especificidade pelo etanol, com  $K_m$  5 vezes maior que da enzima álcool desidrogenase, sendo o principal representante, o citocromo P450-2E1 ou CYP2E1 (Lieber, 2005).

Quando ocorre a indução do sistema microssomal pode-se observar um aumento da ordem de 4 a 10 vezes na catabolização do etanol (Lieber, 2004).

Embora esse sistema seja mais eficiente na catabolização do etanol comparado à álcool desidrogenase e à catalase, ele ocasiona maior dano hepático pela maior produção de metabólitos tóxicos (Gonzalez, 2005; Lieber, 2005; Wu e Cederbaum, 2005).

Na transformação do etanol a acetaldeído via CYP2E1 ocorre produção em excesso de espécies reativas de oxigênio, principalmente nas formas de ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxietila ( $CH_3CH^{\cdot} - OH$ ) (Fernandez-Checa, Kaplowitz *et al.*, 1997; Navasumrit, Ward *et al.*, 2000; Wu e

Cederbaum, 2003). Essas moléculas são altamente reativas e, como o acetaldeído, atacam macromoléculas celulares como proteínas, DNA e lipídeos de membrana, ocasionando comprometimento ou perda funcional e, em última instância, morte celular (Patel, Worrall *et al.*, 2005).

O ataque aos lipídeos de membrana ou peroxidação lipídica pode gerar novos radicais e/ou moléculas, perpetuando assim uma cadeia cíclica de reações (Wu e Cederbaum, 2003).

Na tentativa de bloquear a propagação dessa cadeia de reações, o organismo lança mão de substâncias antioxidantes como a glutatona reduzida ( $\gamma$ -glutamilcisteinilglicina, GSH), a vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) e a vitamina C (ácido ascórbico). No entanto, a produção de radicais livres exacerba a ação dos antioxidantes consumindo-os em excesso e gerando um estado de desequilíbrio celular entre radicais livres e antioxidantes. Este fenômeno é conhecido como estresse oxidativo. Jordão Jr. *et al.* (2004), verificaram em ratos agudamente alcoolizados, um decréscimo nos níveis de GSH e vitamina E hepáticos mesmo nos animais suplementados com  $\alpha$ -tocoferol. Em estudo sobre a interação entre o radical hidroxietila e o consumo de antioxidantes celulares, foi verificado a depleção de GSH e vitaminas E e C (Stoyanovsky, Wu *et al.*, 1998)

O malonaldeído (MDA) é a principal molécula formada no processo de peroxidação lipídica pelo ataque de espécies reativas de oxigênio e é considerado um marcador deste processo (Del Rio, Stewart *et al.*, 2005). Masalkar e Abhang (2005), utilizando o MDA como índice de peroxidação lipídica em pacientes com doença hepática ocasionada pelo álcool, encontraram uma correlação positiva entre os níveis de MDA e o aumento na severidade da doença.

Este aldeído, assim como o acetaldeído e os radicais livres, é muito reativo e

ataca macromoléculas como proteínas e DNA, ocasionando uma gama de efeitos deletérios no fígado, que vão de fibrose, cirrose até câncer (Tuma e Casey, 2003; Ahmed, Luthen *et al.*, 2005; Mckillop e Schrum, 2005).

Com o objetivo de minimizar a ação destes radicais livres sobre a membrana celular é comum a utilização de vitaminas antioxidantes (Lieber, 1997). Paradoxalmente, tem-se observado o aumento do dano oxidativo com o uso de vitaminas antioxidantes (Lieber, 1997; Portari, Jordao Junior *et al.*, 2003). Portari *et al.* (2003) observaram efeito pró-oxidante do  $\beta$ -caroteno em ratos tratados com etanol, com diminuição dos níveis de vitamina E e aumento dos níveis de MDA em relação aos seus controles sem suplementação.

São vastos os dados da literatura com respeito às carências de vitaminas em alcoolistas, quer por diminuição de ingestão, quer por deficiência nos processos de absorção/utilização. Entretanto, a suplementação dessas substâncias em grupos específicos, como usuários de álcool, deve ser realizada criteriosamente em virtude do sinergismo com o etanol ser prejudicial, podendo causar iatrogenia.

## **2.2. Utilização de glicose e tiamina no tratamento da intoxicação aguda por etanol:**

A infusão de glicose endovenosa é prática rotineira no tratamento de intoxicação aguda por etanol, visando restabelecer a glicemia e aumentar a taxa de metabolização deste álcool (Masur, De Souza *et al.*, 1982).

A intoxicação aguda por etanol pode produzir hipoglicemia pela inibição da gliconeogênese hepática. O metabolismo do etanol pelas desidrogenases (álcool e aldeído desidrogenases) consome  $\text{NAD}^+$ , resultando em excesso de sua forma

reduzida, o NADH. O organismo lança mão de uma via metabólica alternativa para restaurar o estoque de  $\text{NAD}^+$ , transformando o piruvato em lactato pela ação da enzima lactato desidrogenase, restabelecendo, assim, os níveis de  $\text{NAD}^+$ . No entanto, o aumento de lactato ocasiona outro distúrbio metabólico verificado como acidose láctica. O déficit de piruvato, consumido para a restauração de  $\text{NAD}^+$ , bloqueia a gliconeogênese por falta de substrato, podendo ocasionar hipoglicemia.

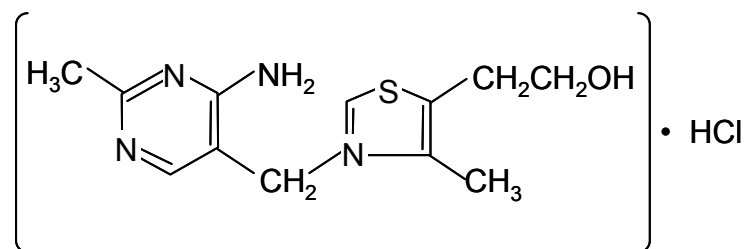
Entretanto, alguns dados na literatura apontam valores glicêmicos normais mesmo em níveis de alcoolemia elevada como 2,6 g/L (Masur, De Souza *et al.*, 1982; Masur, De Souza *et al.*, 1983). Macdonald, Kruse *et al.* (1994) não encontraram correlação entre intoxicação aguda por etanol e acidose láctica, apesar de terem observado valores altos para ambos parâmetros.

Embora se acredite que a infusão de glicose aumente a metabolização do etanol, alguns estudos não comprovam esta ação. Em estudos duplo-cegos não foram observadas diferenças na alcoolemia entre os grupos tratados com glicose (40 mL de glicose 50% no primeiro estudo, e, 40 mL de glicose 25% no segundo) e os controles tratados com soro fisiológico (Masur, De Souza *et al.*, 1982; Masur, De Souza *et al.*, 1983). Li, Mills, Erato (1999) não verificaram efeito significativo na diminuição da alcoolemia em sujeitos tratados com solução salina intravenosa. Em outro estudo, comparando-se o uso intravenoso de glicose e de uma solução contendo mistura de aminoácidos, verificou-se efeito positivo na diminuição da etanolemia com a solução de aminoácidos, enquanto que a solução isocalórica de glicose teve o mesmo efeito observado quando empregada solução de Ringer (Lisander, Lundvall *et al.*, 2005). Parlesak *et al.* (2004) comparando o uso de glicose ou frutose, oral ou intravenosa, verificaram maior eficácia na diminuição da alcoolemia usando frutose ao invés de glicose e, infusão intravenosa em lugar da

administração oral. No entanto, em trabalho semelhante, não foi observado o mesmo efeito na diminuição da alcoolemia com o uso da frutose em relação à glicose, sendo observado um aumento significativo no lactato e ácido úrico sanguíneos (Levy, Elo *et al.*, 1977).

Apesar de se acreditar em um possível benefício do uso de glicose na intoxicação aguda por etanol, recentes estudos têm apontado que a hiperglicemia causa autooxidação da glicose, glicação de proteínas, e a ativação de metabolismo de polióis. Estas mudanças aceleram a geração de espécies reativas de oxigênio e aumento na oxidação de lipídios, DNA e proteínas em vários tecidos (Osawa e Kato, 2005).

Dentre as vitaminas utilizadas comumente no tratamento de alcoolistas, a tiamina ou vitamina B<sub>1</sub> (Figura 3) é essencial ao metabolismo dos carboidratos e apresenta diminuição após intoxicação aguda com etanol (Bonjour, 1980; Takabe e Ito, 1980, 1983). A tiamina não é sintetizada no organismo dos mamíferos sendo obtida por meio da ingestão de alimentos que a contém como carnes, cereais integrais e feijões (Martin, Singleton *et al.*, 2003). A recomendação diária para esta vitamina é de 1,2 mg/dia para o homem e 1,1 mg/dia para mulher. Para roedores adultos a recomendação, segundo o American Institute of Nutrition (AIN-93), é de 0,6 g de hidrocloreto de tiamina/ kg de dieta (Reeves, Nielsen *et al.*, 1993).



**Figura 3 – Molécula de hidrocloreto de tiamina.**

A tiamina é uma vitamina hidrossolúvel e sua forma biologicamente ativa é a tiamina pirofosfato, a qual é formada no fígado pela ação da enzima tiamina fosfoquinase (Bonjour, 1980). Na sua forma ativa, esta vitamina é essencial como coenzima para o funcionamento ótimo da piruvato desidrogenase, da transcetolase e da  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase em reações do catabolismo dos carboidratos pelas vias da pentose fosfato, glicólise e ciclo do ácido cítrico formando NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) e energia na forma de ATP (adenina trifosfato) (Martin, Singleton *et al.*, 2003). O NADPH formado tem sua importância como doador de hidrogênio para reações que resultam na formação de moléculas como esteróides, ácidos graxos, aminoácidos entre outras, bem como na síntese de glutathiona (GSH), importante composto de defesa contra o estresse oxidativo (Martin, Singleton *et al.*, 2003; Reed, 2004).

Dados da literatura apontam diminuição de vitamina B<sub>1</sub> em animais tratados agudamente com etanol (Takabe e Itokawa, 1983; Rindi, Reggiani *et al.*, 1992). Assim, Tabake e Itokawa (1983) verificaram decréscimo maior nos níveis de tiamina sanguínea de coelhos tratados com etanol do que naqueles tratados isocaloricamente com glicose.

Eriksson, Pekkanen e Rusi (1980) observaram, em ratos deficientes em tiamina, diminuição na eliminação do etanol sanguíneo. Em outro estudo, os autores hipotetizaram a participação da tiamina no catabolismo do etanol via sistema microsomal de oxidação do etanol e observaram a diminuição na atividade deste sistema nos microsomos de ratos deficientes em vitamina B<sub>1</sub>. Entretanto, a atividade foi recobrada pela adição de tiamina pirofosfato (Takabe e Itokawa, 1982).

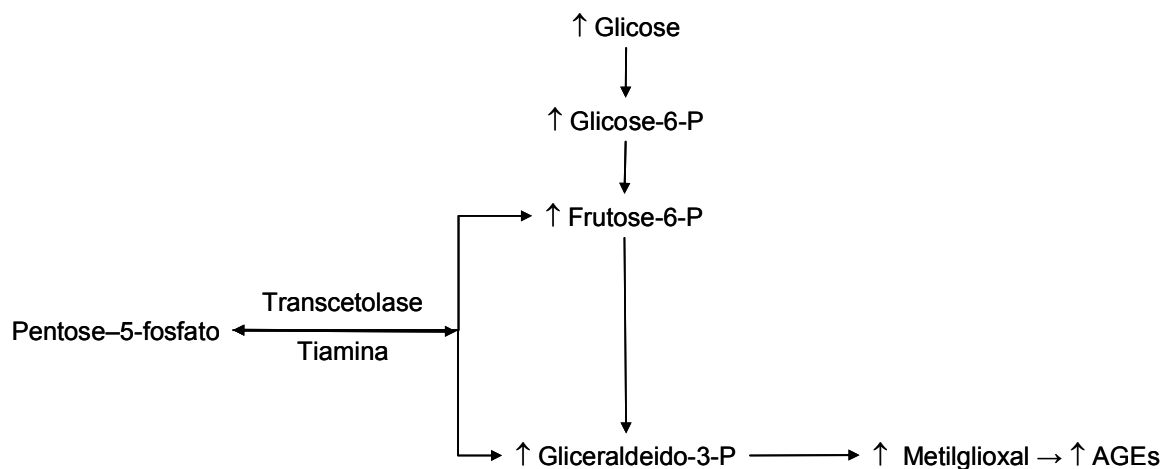
Postula-se o uso de tiamina em pacientes com encefalopatia de Wernicke, principalmente alcoolistas, devido à deficiência dessa vitamina nesse grupo em

particular, em função da má alimentação e sua absorção reduzida devido a alterações do sistema gastrointestinal (Tallaksen, Sande *et al.*, 1993; Lemos, Azevedo *et al.*, 2005). No entanto, Breen *et al.* (1985), não verificaram diminuição na absorção jejunal de tiamina em voluntários sadios recebendo etanol no mesmo perfusato. Os dados sobre a melhor rota de administração ainda não são claros (Agabio, 2005). Tallaksen *et al.* (1993), observaram pronto aumento nos níveis de tiamina após infusão endovenosa de 50 mg de hidrocloreto de tiamina em único bolo.

Recentes estudos têm apontado para um possível papel protetor da tiamina frente ao estresse oxidativo e ao acetaldeído. Singleton e Martin (2001) relatam um aumento do estresse oxidativo em cérebro de ratos devido a deficiência de vitamina B<sub>1</sub>. Em miócitos cardíacos tratados com acetaldeído, a vitamina B<sub>1</sub> diminuiu a formação de carbonilas resultantes do dano em proteínas, ocasionado pelo acetaldeído, diminuindo por consequência o número de células apoptóticas (Aberle, Burd *et al.*, 2004). Ratos submetidos ao estresse oxidativo por infusão de arsênio reverteram este quadro pelo tratamento com tiamina (Nandi, Patra *et al.*, 2005). Gliszczynska-Swiglo (2006), utilizando ensaios *in vitro* verificou alta atividade antioxidante da tiamina podendo-se comparar àquela da vitamina C. As reações de glicação, especialmente as reações de Maillard, ocorrem *in vivo* assim como *in vitro* e são associadas com complicações crônicas pelo aumento de modificações oxidativas de lipídeos, DNA e proteínas, formando produtos finais de glicação avançada (AGEs - *Advanced glycation end products*) pela reação com açúcares redutores (Osawa e Kato, 2005). Obrenovich e Monnier (2003) postulam benefícios da vitamina B<sub>1</sub> frente aos danos causados pela hiperglicemia, principalmente pelo bloqueio na formação de produtos finais de glicação avançada. Na mesma linha,

outros autores verificaram aumento na formação de aductos de metilglioxal, marcadores de estresse oxidativo, em ratos com deficiência de tiamina (Shangari, Depeint *et al.*, 2005). Em ratos com diabetes induzida por estreptozotocina verificou-se um aumento dos produtos finais de glicação avançada na proteína plasmática que foi revertida com altas doses de tiamina ou seu derivado lipofílico, a benfotiamina (Karachalias, Babaei-Jadidi *et al.*, 2005).

Uma possível via pela qual a tiamina bloqueia a produção de produtos finais de glicação avançada em situações de hiperglicemia está esquematizada na figura 4. Hammes *et al.* (2003) postularam que o fornecimento de tiamina favorece a reação da transcetolase na via das pentoses, diminuindo o substrato de formação dos produtos finais de glicação avançada.



**Figura 4 – Mecanismo de produção dos AGEs.**  
Adaptado de Hammes *et al.* (2003).

Conforme exposto, torna-se importante a verificação do efeito da infusão de glicose diante de um quadro de intoxicação aguda por etanol.

### 2.3. Cromatografia gasosa na análise da etanolemia e compostos



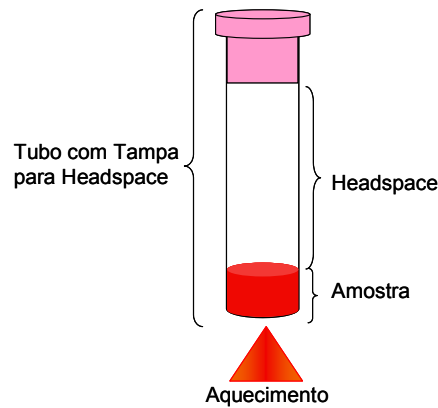
**correlatos:**

Vários métodos e equipamentos são disponíveis para a determinação de etanolemia, tais como os oxidativos – enzimático ou químico – utilizando espectrofotômetro, a osmometria, analisadores enzimáticos do ar expirado e a cromatografia gasosa (Dubowski, 1980; Zuba, Parczewski *et al.*, 2002). Entretanto, a cromatografia gasosa é considerada padrão ouro para dosagem de substâncias voláteis como o etanol e compostos relacionados, tais como, aldeídos e cetonas em fluídos biológicos por apresentar maior seletividade pelos compostos (Dubowski, 1980; Tagliaro, Lubli *et al.*, 1992; Musshoff, 2002).

A cromatografia é um método físico-químico de separação, no qual os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases: a fase estacionária e a fase móvel. Na cromatografia gasosa a fase estacionária contida em uma coluna pode ser sólida ou líquida e a fase móvel é, invariavelmente, um gás inerte.

Na análise de etanol em fluídos biológicos complexos, tais como, sangue, plasma, urina, saliva e leite, a técnica do *headspace* (Figura 5) é preferida, por evitar contaminação da coluna e injetor do cromatógrafo (Musshoff, 2002; Zuba, Parczewski *et al.*, 2002; Jones e Fransson, 2003). Esta técnica consiste na evaporação dos analitos de interesse e amostragem dos vapores acima do fluído (sangue, urina ou outros) após alcançado o equilíbrio térmico e gasoso em um tubo fechado (Jones e Fransson, 2003). Os componentes volatilizados presentes no *headspace* são aspirados por meio de seringa especial (Gastight® - a qual não deixa que o vapor vaze para o ambiente) e injetados no cromatógrafo gasoso para separação (Kolb, 1999). Musshoff (2002) relata que a temperatura de equilíbrio da

amostra é fator crucial na análise de etanol por *headspace*, já que acima de 60°C o etanol começa a sofrer degradação.



**Figura 5 – Desenho esquemático da técnica de *headspace*.**

Como em geral as amostras analisadas são matrizes aquosas, utiliza-se um artifício para diminuir a interação existente entre o álcool e a água, ou seja, as pontes de hidrogênio, e permitir melhor vaporização do etanol. Este artifício consiste na adição de um sal, tornando o sistema saturado, chamado *salting-out* (Watts e Mcdonald, 1990).

Embora haja muitos métodos descritos na literatura para a dosagem de etanol por cromatografia gasosa, cada qual possui suas particularidades com respeito ao equipamento disponível, tipo de coluna, preparação da amostra, gás de arraste, tipo de detector e padrão interno, tornando difícil a implementação destas técnicas (Tagliaro, Lubli *et al.*, 1992). Entretanto, alguns parâmetros são considerados universais ou preferenciais na análise de etanol em fluídos biológicos. Assim, o detector por ionização em chama é a escolha na detecção de etanol e compostos correlatos como acetaldeído, acetona e metanol. As colunas capilares são preferíveis às colunas empacotadas por apresentarem melhor resolução na separação dos compostos. Da mesma maneira, as colunas polares são preferíveis

às apolares ou de polaridade intermediária (Tagliaro, Lubli *et al.*, 1992; Musshoff, 2002). O uso de padrão interno para a calibração da análise também é universal na análise usando *headspace* para correções de imprecisões na amostragem ou na injeção. Esta técnica consiste em adicionar uma quantidade conhecida de uma substância (padrão interno), diferente daquelas que estão sendo analisadas. Para a quantificação, é construída uma curva de calibração utilizando a razão entre a área do analito e a do padrão interno versus a concentração do analito (Drozd, Vodakova *et al.*, 1990).

Para a implementação de uma técnica de análise e seu uso em rotina deve haver um processo de validação que assegure a credibilidade do método (Hubert, Chiap *et al.*, 1999; Brasil, 2003; Lanças, 2004; Ribani, Bottoli *et al.*, 2004).

Com o intuito de padronizar o processo de validação de métodos analíticos, vários documentos têm sido gerados por grupos em todo o mundo. Assim, em 1994 e 1996, um grupo tripartite, representado pela União Européia, Japão e Estados Unidos, reuniu-se para a elaboração de diretrizes para a validação de procedimentos analíticos (ICH, 1994, 1996). Da mesma forma, em 1995, a Société Française Sciences et Techniques Pharmaceutiques (SFSTP), baseando-se nas diretrizes publicadas anteriormente pelo grupo da International Conference on Harmonization, publicou um guia para validação de métodos cromatográficos em análises biológicas (Hubert, Chiap *et al.*, 1999). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – por meio da Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003, publicou o GUIA PARA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E BIOANALÍTICOS, no qual está inserido diretrizes para a validação de métodos utilizando cromatografia gasosa (Brasil, 2003).

Os critérios recomendados pela ANVISA, bem como pelos guias

internacionais para a validação de métodos cromatográficos são seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limites de quantificação e detecção e recuperação.

A seletividade em cromatografia é geralmente tomada pelo tempo de retenção e/ou pela resolução de cada analito em uma corrida cromatográfica e, indica a capacidade do método de determinar de forma inequívoca o analito de interesse, a despeito de possíveis interferentes (De Martinis e Martin, 2002; Zuba, Parczewski *et al.*, 2002). No entanto, somente estes parâmetros não asseguram que haja uma co-eluição no mesmo pico cromatográfico (Lanças, 2004). Recomenda-se a detecção pelo espectro de massas, o qual fragmenta o analito criando uma identidade do mesmo, certificando se há ou não co-eluição no pico cromatográfico (Lanças, 2004; Wasfi, Al-Awadhi *et al.*, 2004).

A linearidade expressa a resposta do aparelho em função da concentração do analito (Brasil, 2003; Lanças, 2004). Em termos práticos, a linearidade é limitada a uma faixa determinada, ou seja, faixa de trabalho, que corresponde à curva de calibração utilizada para a quantificação das amostras (Hubert, Chiap *et al.*, 1999; Brasil, 2003).

A precisão e a exatidão são conceitos semelhantes que, por vezes, podem ser confundidos. Precisão refere-se à variação existente entre valores obtidos para uma mesma amostra, enquanto a exatidão refere-se a quão o valor obtido para determinada amostra se assemelha do valor tido como verdadeiro (Zuba, Parczewski *et al.*, 2002; Lanças, 2004).

Os limites de detecção e quantificação são parâmetros que permitem distinguir ruídos do sistema de sinais gerados pela presença do analito nos níveis inferiores da linearidade. Aceita-se como valor de limite de detecção (LDD) aquele em que a razão entre o sinal gerado pelo analito e o ruído gerado pelo branco for

igual a 3 (ICH, 1996; Lanças, 2004; Wasfi, Al-Awadhi *et al.*, 2004), ou seja:

$$\text{LDD} = \frac{\text{sinal gerado pelo analito}}{\text{sinal gerado pelo branco}} = 3$$

Para o limite de quantificação (LDQ) adota-se o valor da razão do sinal:ruído de 10, ou seja:

$$\text{LDQ} = \frac{\text{sinal gerado pelo analito}}{\text{sinal gerado pelo branco}} = 10$$

O parâmetro de recuperação do método é uma medida da eficiência da quantificação do analito de interesse, presente em uma determinada matriz (Lanças, 2004; Wasfi, Al-Awadhi *et al.*, 2004).

Diante do exposto, pontua-se a importância da padronização de um método padrão-ouro na determinação do etanol sanguíneo e urinário, e da validação deste método em ensaios biológicos que fornecerão subsídios para o melhor entendimento da relação entre a administração do etanol, produção de radicais livres e o papel da tiamina e da glicose neste metabolismo.

### **3. Objetivos:**

#### **3.1. Objetivo Geral:**

Padronização de uma técnica de dosagem de etanol sangüíneo e urinário, por cromatografia gasosa para a verificação do efeito da infusão endovenosa de glicose ou de tiamina sobre a metabolização alcoólica em ratos tratados agudamente com etanol.

#### **3.2. Objetivos Específicos:**

**3.2.1.** Padronização de técnica por cromatografia gasosa para dosagem de etanol em sangue e urina;

**3.2.2.** Verificar alterações na alcoolemia de ratos tratados com uma dose aguda de etanol sem nenhuma intervenção e após infusão de tiamina ou de glicose;

**3.2.3.** Observar alterações na excreção urinária do etanol em ratos tratados com uma dose aguda de etanol sem nenhuma intervenção e após infusão de tiamina ou de glicose;

**3.2.4.** Analisar possíveis alterações no sistema antioxidante através da determinação de vitamina E, glutathiona reduzida e da peroxidação lipídica por meio das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

## **4. Material e Métodos:**

### **4.1. Material:**

Para a coleta de sangue e urina, foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar (3-4 meses) e peso variando entre 250-300 g, oriundos do Biotério Central do Campus da USP-Ribeirão Preto e, posteriormente, mantidos no Biotério do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP. O regime de claro-escuro foi mantido constante, de 12 em 12 horas e a temperatura controlada  $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ .

### **4.2. Delineamento experimental:**

O delineamento experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Anexo 1).

Dois experimentos foram planejados. No primeiro foi verificada a alcoolemia e no segundo a excreção urinária de etanol em ratos submetidos a uma dose aguda de álcool (5g de etanol/kg de peso do animal).

No experimento 1 (figura 6) foram utilizados 72 animais os quais foram separados em três grupos de 24 animais (Grupo EtOH, Grupo EtOH+Glicose e Grupo EtOH+Tiamina). Cada grupo de 24 animais recebeu por gavagem a dose aguda de etanol, sendo considerado este o tempo zero do experimento. Após 15 minutos, os grupos receberam o tratamento específico, exceto o Grupo EtOH, que seguiu sem nenhum tratamento. Cada grupo foi subdividido em 4 subgrupos com 6 animais. Nos 60, 90, 240 e 360 minutos após a gavagem cada animal do subgrupo

foi sacrificado por decapitação. Uma alíquota de 0,5 mL de sangue foi imediatamente pipetada para o tubo com tampa de borracha de 4,5 mL (figura 5) contendo 0,5 mL da solução de padrão interno, 0,5 g de cloreto de sódio (NaCl) e 0,1 g de fluoreto de sódio (NaF).

O experimento 2 (figura 7) 30 animais foram separados em três grupos de 10 animais (Grupo EtOH, Grupo EtOH+Glicose e Grupo EtOH+Tiamina). Cada grupo de animais recebeu por gavagem a dose aguda de etanol, sendo considerado este o tempo zero do experimento. Após 15 minutos, os grupos receberam o tratamento específico, exceto o Grupo EtOH, que seguiu sem nenhum tratamento. Os animais de cada grupo foram colocados individualmente em gaiola metabólica para coleta e medição do volume de urina nas 12 primeiras horas (0 – 12 h) e nas 12 horas subsequentes (12 – 24 h) após a gavagem. Uma alíquota de 0,5 mL de urina foi pipetada para um tubo de 4,5 mL (figura 5) contendo 0,5 mL da solução de padrão interno, 0,5 g de cloreto de sódio (NaCl) e 0,1 g de fluoreto de sódio (NaF).

#### **4.3. Gavagem:**

A técnica de gavagem (aplicação de sonda intragástrica) foi utilizada para garantir a quantidade proposta de etanol. Foi utilizada sonda de polietileno calibre PE 90, entre 8 e 12cm (Becton Dickinson, USA).

#### **4.4. Tratamentos específicos:**

Exceto pelo grupo EtOH, os outros dois grupos receberam infusão endovenosa na veia caudal como descrito abaixo.



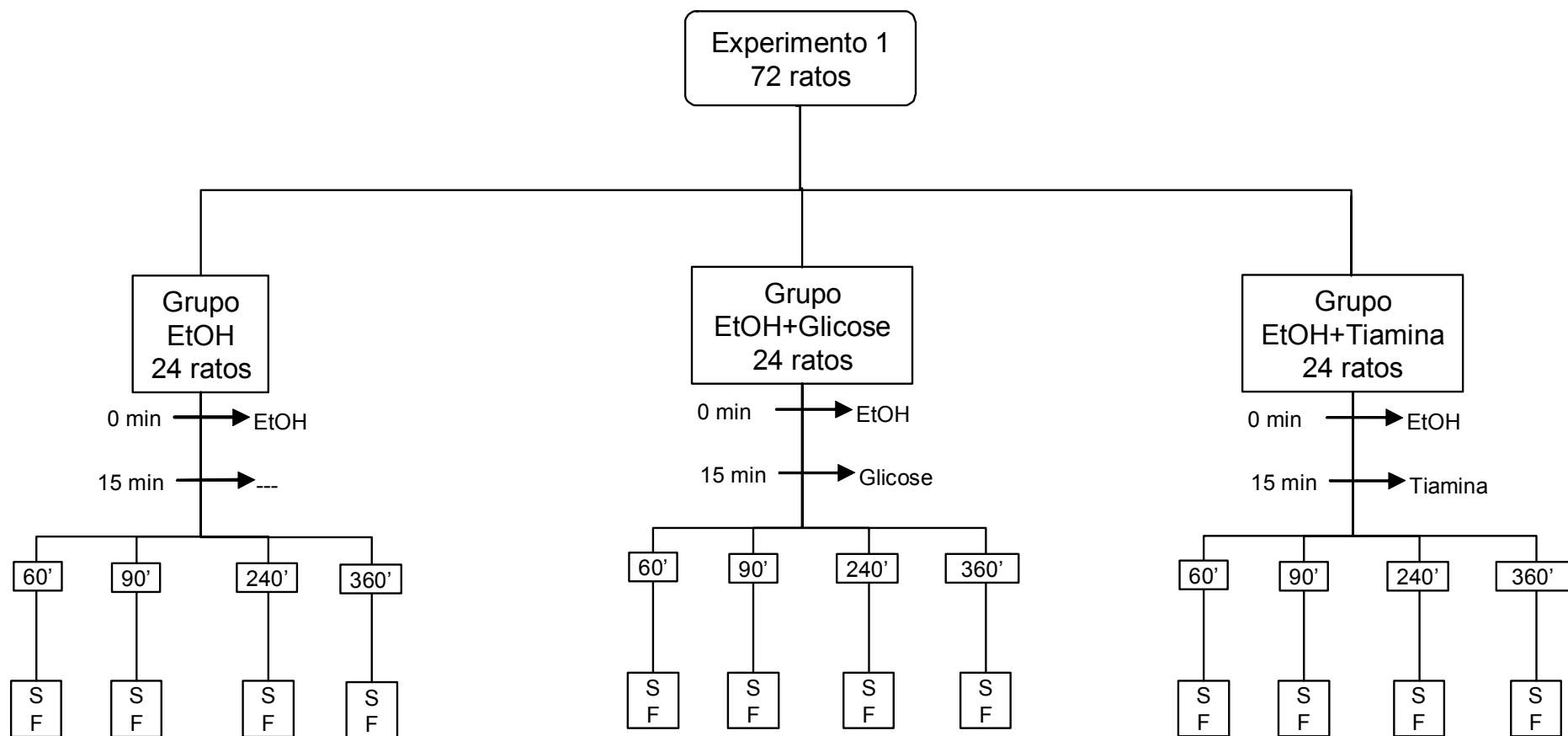


Figura 6 – Desenho experimental para determinação de alcoolemia.

S – sangue; F – fígado.

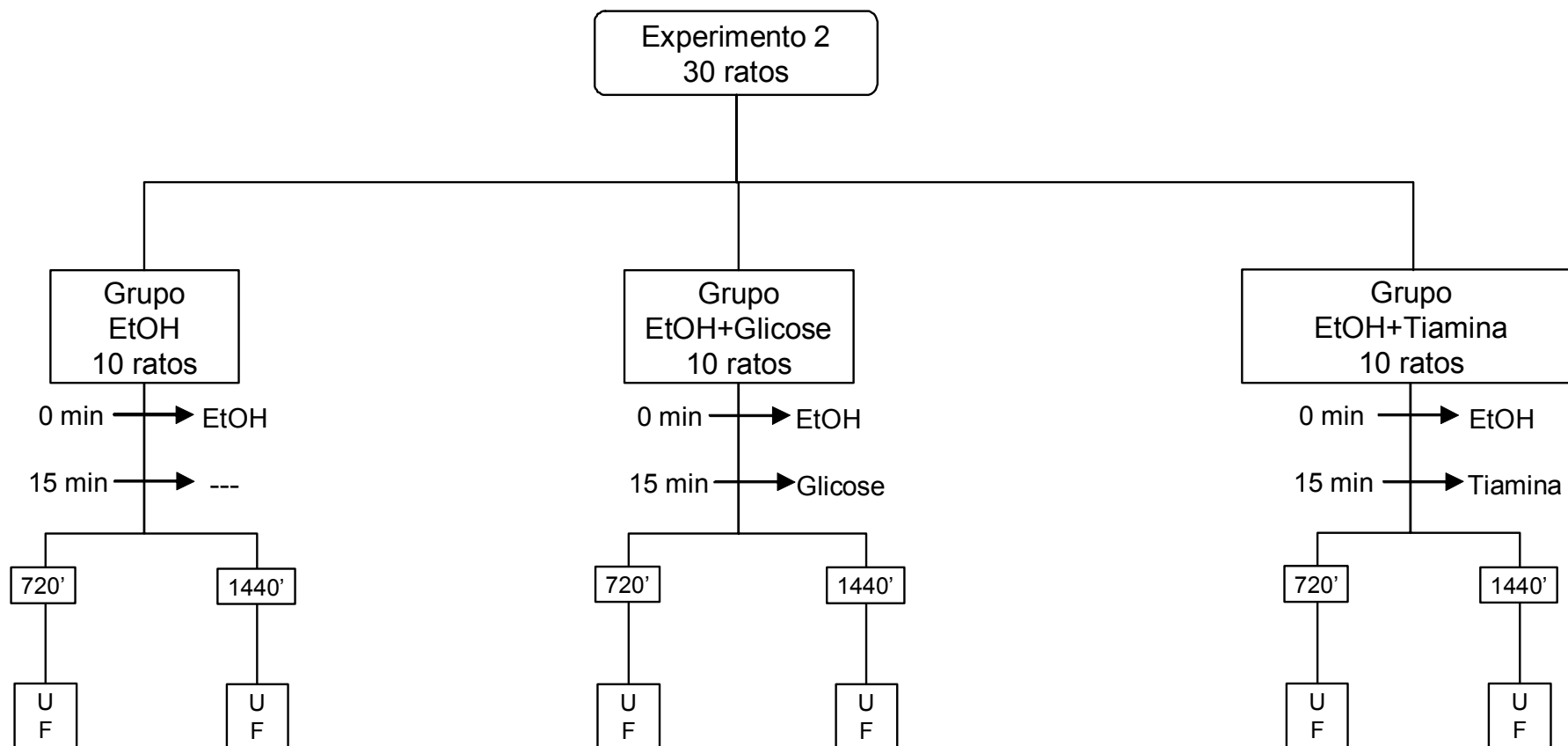


Figura 7 – Desenho experimental para a dosagem de álcool na urina.

U – urina; F – fígado.

**4.4.1. Grupo EtOH+Glicose (EtOH+Gli):** 15 minutos após a gavagem os animais deste grupo receberam infusão endovenosa de 0,06 mL de glicose em solução a 50%/100 g de peso, em um único bolo.

**4.4.2. Grupo EtOH+Tiamina (EtOH+B1):** 15 minutos após a gavagem os animais deste grupo receberam infusão endovenosa de solução aquosa de hidrocloreto de tiamina na dose de 0,143 mg/100 g de peso, em um único bolo.

#### **4.5. Determinação de etanol no sangue e urina por cromatografia gasosa:**

##### **4.5.1. Preparo da amostra:**

Uma alíquota de 0,5 mL de sangue ou urina foi pipetada com o uso de um micropipetador para um tubo com tampa de borracha de 4,5 mL (figura 5) contendo 0,5 mL da solução de padrão interno, 0,5 g de cloreto de sódio (NaCl) mais 0,1 g de fluoreto de sódio (NaF). Este tubo foi imediatamente vedado com a tampa de borracha e armazenado a 4°C para posterior análise.

##### **4.6. Reagentes:**

- Acetaldeído: grau P.A., VETEC, Brasil;
- Acetonitrila: grau cromatográfico, E.M. Science, E.U.A.;
- Ácido tricloroacético: grau P.A., Synth, Brasil;

- $\alpha$ -tocoferol: 95% de pureza, Sigma, E.U.A.;
- Cloreto de sódio: grau P.A., Synth, Brasil;
- Diclorometano: grau cromatográfico, Tedia, E.U.A.;
- DTNB - 5,5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzóico): 98% de pureza, Sigma, E.U.A.;
- EDTA
- Etanol anidro: grau cromatográfico, Carlo Erba, Itália;
- Fluoreto de sódio: grau P.A., Sigma, E.U.A.
- Glicose a 50%:
- Glutaciona reduzida: 99% de pureza, Sigma-Aldrich, E.U.A.;
- Hexano: grau cromatográfico, Mallinckrodt Baker, E.U.A.;
- Tiamina (Hidrocloreto): ampola injetável de 1 mL na concentração de 100 mg/mL, Index Farmacêutica, Brasil;

#### **4.7. Equipamentos:**

- Cromatógrafo à gás GC-17A equipado com detector por ionização em chama e programa de integração de picos Class GC-10 (Shimadzu, Co., Japão);
- Cromatógrafo à gás GC-17A equipado com Espectrômetro de Massas QP-5000 (Shimadzu Co., Japão);
- Coluna capilar DB-WAX 30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m (J&W Scientific, E.U.A.);
- Seringa gastight de 250  $\mu$ L (Hamilton, Co., E.U.A.);
- Chapa de aquecimento em cerâmica (Corning Inc., E.U.A.);
- Banho-maria Mod. 100 (FANEM, Brasil);
- Micro-pipetadores LabMate de 1 mL e 200  $\mu$ L (High Tech Lab, Polônia);
- Tubos com tampa de borracha para coleta de sangue Vacutainer (, Brasil);

- Balança analítica
- Refrigerador R27 (Eletrolux/Prosdócimo, Brasil);
- Glicosímetro Precision QID (Abbott Laboratories, E.U.A.);
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Mod. 10AT VP equipado com detector UV/Visível (Shimadzu Co., Japão);
- Coluna C-18 (Shimpack CLC-ODS 4,6x25 cm);
- Homogeneizador de tecidos Omni TH (Omni International, E.U.A.);
- Centrifuga Sigma 2K15 (*SIGMA* Laboratory Centrifuges, Alemanha);
- Espectrofotômetro DV640 (Beckman, E.U.A.);
- Estantes com gaiolas metabólicas individuais.

#### **4.8. Preparo das soluções estoque de etanol e padrão interno (acetonitrila):**

As soluções estoque foram preparadas usando método gravimétrico-volumétrico que consiste em pesar a quantidade desejada do analito e fazer a diluição de interesse em material volumétrico de precisão. Um balão volumétrico de 100 mL contendo cerca de 20 mL de água destilada foi tarado em balança analítica. Aproximadamente 1 g de etanol foi adicionado e então o balão foi completado com água destilada. Esta se constituiu a solução estoque utilizada para posteriores diluições no preparo da curva padrão. A solução estoque de padrão interno, acetonitrila, foi feita seguindo o mesmo princípio utilizado para a solução estoque de etanol, modificando-se as quantidades. Tarou-se um becker de 100 mL contendo cerca de 30 mL de água destilada e então foi adicionado aproximadamente 1 g de acetonitrila. O conteúdo do becker foi despejado em balão volumétrico de 1 L, seguindo-se várias lavagens do becker com água destilada para arrastar toda a

acetonitrila para o balão. Por fim, o balão foi completado com água destilada obtendo-se assim a solução estoque desejada. As massas exatas de soluto adicionadas foram anotadas para o cálculo preciso da concentração de cada solução. Estas soluções foram mantidas em frascos fechados e em refrigerador à temperatura de 4°C. Foram realizados testes após 6 meses e 1 ano do preparo das soluções para verificação de possível degradação das mesmas.

#### **4.9. Validação do método cromatográfico:**

**4.9.1. Tempo de Retenção ( $t_r$ ) e resolução ( $R$ ) dos analitos:** os cromatogramas gerados no teste de precisão foram utilizados para analisar a variação nos tempo de retenção do etanol bem como suas resolução.

**4.9.2. Precisão:** o teste de precisão foi realizado utilizando o parâmetro de repetibilidade dos valores no sangue e urina utilizando-se 9 replicatas de 3 concentrações diferentes, referentes aos pontos  $P_1$ ,  $P_3$  e  $P_5$  da curva de calibração e referidos como coeficiente de variação em porcentagem.

**4.9.3. Exatidão:** o teste de exatidão foi realizado com 3 replicatas de 3 concentrações distintas em sangue e urina, fortificando-os com concentração conhecida de etanol, correspondente aos pontos  $P_1$ ,  $P_3$  e  $P_5$  da curva de calibração e, então, foram calculadas suas porcentagens de recuperação.

**4.9.4. Limites de Detecção e Quantificação:** para obtenção dos limites de detecção e quantificação foram feitas diluições nos valores de 19,944  $\mu\text{g/mL}$ , 9,972  $\mu\text{g/mL}$ , 3,9888  $\mu\text{g/mL}$ , 1,9944  $\mu\text{g/mL}$ , 0,9972  $\mu\text{g/mL}$ , 0,39888  $\mu\text{g/mL}$  e 0,19944  $\mu\text{g/mL}$ .

**4.9.5. Linearidade:** a linearidade foi estabelecida através da análise do coeficiente de linearidade ( $r$ ) da curva de calibração.

**4.9.6. Seletividade:** o teste de seletividade foi realizado utilizando-se soluções com mistura dos analitos e submetendo-as à cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas.

#### **4.10. Análise por cromatografia gasosa:**

A determinação de álcool foi realizada usando a técnica de *headspace* por Cromatografia Gasosa (Cromatógrafo GC-17A Shimadzu) com Detector por Ionização em Chama (DIC) utilizando uma coluna capilar DB-WAX de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e 0,25  $\mu\text{m}$  de espessura da fase estacionária (J&W Scientific). Após incubação do tubo contendo a amostra em banho de água a 60°C por 20 minutos, 150  $\mu\text{L}$  do vapor foi aspirado com uma seringa própria para *headspace* (Hamilton Gastight 1725) mantida aquecida também a 60°C, e injetado no cromatógrafo. A quantificação de etanol presente nas amostras foi realizada por comparação à uma curva de calibração.

#### **4.11. Preparo da curva de calibração:**

A partir da solução estoque de etanol (aproximadamente 10 mg/mL) foram feitas diluições para obter as concentrações dos pontos P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub>, P<sub>4</sub>, P<sub>5</sub> e P<sub>6</sub>. Os valores exatos são mostrados na Tabela 1. Foram preparadas triplicatas para cada ponto da curva pipetando-se com auxílio de um micropipetador 0,5 mL da diluição e transferido para o tubo com tampa tipo Vacutainer de 4,5 mL (figura 5). Para cada tubo da curva-padrão, 0,5 mL da solução de padrão interno foi adicionado bem como aos que continham amostra de sangue ou urina. Todos os tubos tinham igual volume de líquido. Em seguida, os tubos foram levados ao banho de água por 20 minutos a 60°C para o equilíbrio gasoso. Então, uma alíquota de 150 µL da fase vapor (*headspace*) foi retirada e injetada no CG. Os parâmetros do aparelho são apresentados na figura 8.

Após a separação dos analitos na coluna capilar, os mesmos são eluídos e detectados pelo detector de ionização por chama. Os dados são analisados por meio de software Class-GC 10 (Shimadzu, Co.) que por integração fornece a área relativa a cada pico eluído.

A razão entre a área do pico de etanol pela área do pico do padrão interno versus as concentrações teóricas de cada diluição foram colocadas em gráfico de regressão linear. A quantificação de etanol nas amostras foi realizada por meio da equação da reta  $y=a+bx$  obtida na curva de calibração, onde  $y$  = área do etanol/área do padrão interno e,  $x$  é a concentração de etanol na amostra.

#### **4.12. Determinação da glicemia:**



A glicemias dos animais foram determinadas antes da dose de etanol e antes do sacrifício por meio de glicosímetro (Precisin QID, Abbott) em uma gota de sangue coletada por secção da cauda.

Tabela 1 – Concentrações de etanol na curva de calibração.

Pontos da Curva	Etanol ( $\mu\text{g/mL}$ )
P <sub>1</sub>	20,174
P <sub>2</sub>	100,87
P <sub>3</sub>	201,74
P <sub>4</sub>	1008,7
P <sub>5</sub>	3026,1
P <sub>6</sub>	6052,2

#### 4.13. Determinação da concentração de vitamina E:

A análise de vitamina E foi realizada em amostras de fígado por meio de cromatografia líquida de alta eficiência com uma coluna tipo C-18 (Shimpack CLC-ODS 4,6 x 25 cm), pré-coluna 4 mm x 1 cm e fluxo de 2,0 mL/min (Arnaud, Fortis *et al.*, 1991). Amostra de fígado (0,5 g) foi macerada com 2,0 mL de etanol absoluto por meio de um Potter. Acrescentou-se 1,0 mL de hexano ao homogenato de fígado. Após agitação por 2 minutos, o homogenato foi centrifugado por 15 min a 3000 rpm. Uma alíquota de 1,0 mL do sobrenadante foi retirada e seca com o auxílio de fluxo de nitrogênio. O resíduo seco foi ressuspendido na fase móvel metanol/diclorometano/acetonitrila e submetido à cromatografia com leitura no comprimento de onda 292 nm. A concentração foi calculada por meio de um padrão

externo de  $\alpha$ -tocoferol.

Coluna capilar	DB-WAX (polietilenoglicol) 30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro; espessura da fase estacionária: 0,25 $\mu$ m
Gás de arraste	Hélio
Temperatura do injetor	115°C
Gradiente de temperatura da coluna	45°C-4 minutos 45°C a 125°C (25°C/minuto)
Temperatura do detector	200°C
Split	1:10
Pressão da coluna	70 kPa

**Figura 8 - Parâmetros utilizados no cromatógrafo gasoso.**

#### **4.14. Glutathiona reduzida:**

A quantificação da glutathiona reduzida hepática foi realizada segundo método descrito por Sedlack e Lindsay (1968) e resume-se no seguinte procedimento:

- 200 mg de fígado foram homogeneizados em um homogeneizador tipo Turrax com 8,0 mL de tampão EDTA (0,02 M), sob gelo;
- 5,0 mL do homogenato foram misturados a 4,0 mL de água deionizada e 1,0 mL de ácido tricloroacético (TCA) 50%;
- após 15 minutos com agitação ocasional do tubo, o mesmo foi centrifugado por 15

- minutos (3000g/temperatura ambiente) e 2,0 mL do sobrenadante foram separados;
- acrescentou-se ao sobrenadante 4,0 mL de tampão TRIS (0,4 M pH=8,9) e 0,1 ML de DTNB (0,01 M em metanol);
  - foi realizada a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 412 nm, 5 minutos após a adição do DTND, contra um branco com EDTA (0,02 M) em lugar do sobrenadante;
  - a concentração foi calculada utilizando-se uma curva padrão de GSH em EDTA (0,02 M).

#### **4.15. Determinação da peroxidação lipídica:**

A peroxidação lipídica no fígado foi determinada segundo Buege e Aust (1978) que consiste na reação do malonaldeído com o ácido tiobarbitúrico em meio ácido e sobre aquecimento por 30 minutos a 100°C. Esta reação produz um composto de coloração amarela que é lido em espectrofotômetro no comprimento de onda de 535 nm.

#### **4.16. Determinação de proteína:**

A determinação de proteína no fígado foi realizada pelo método de LOWRY et al. (1951).

### **5. Análise Estatística:**

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. As

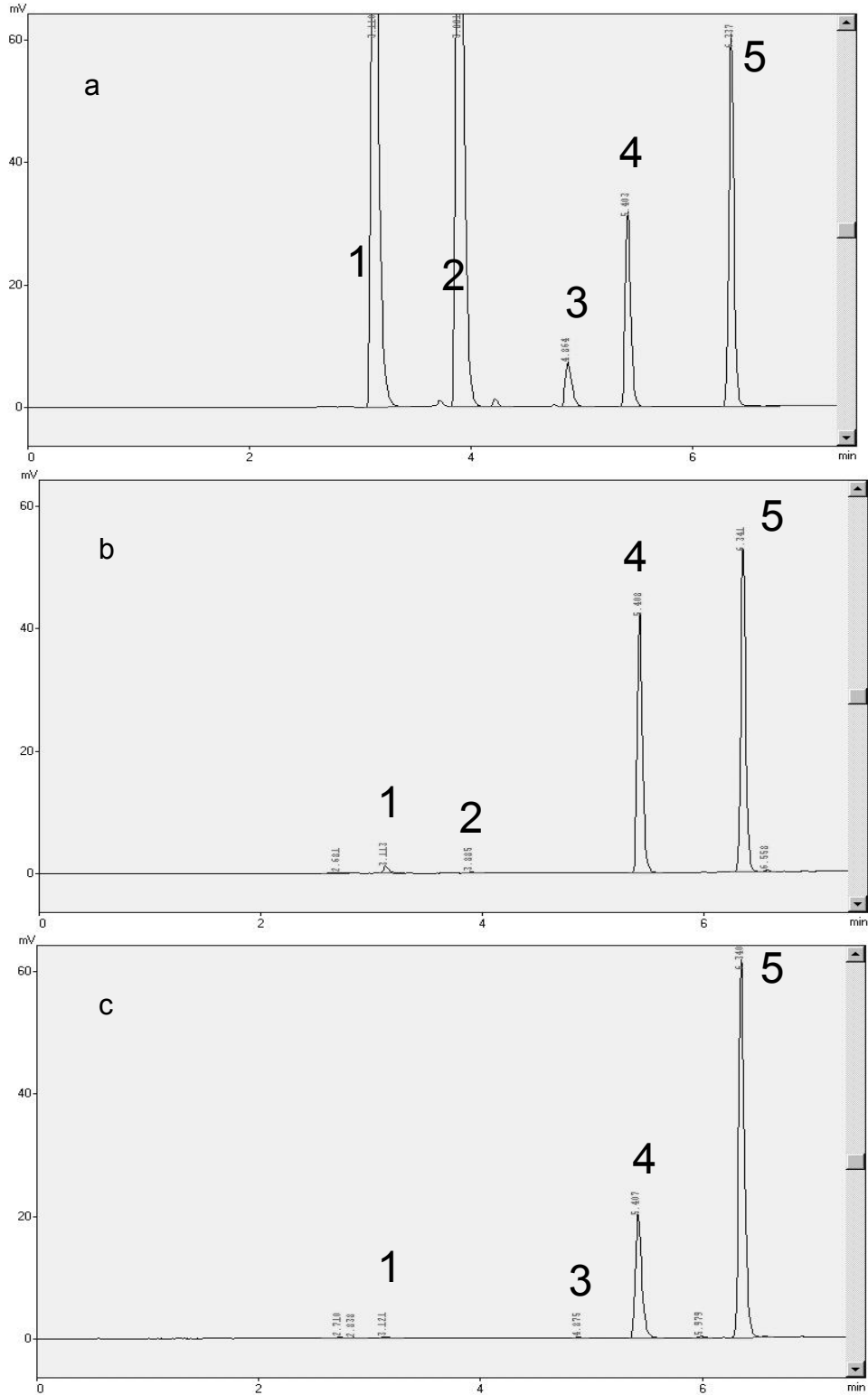
comparações entre grupos foram realizadas por análise de variância (ANOVA) e teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn, estabelecendo como nível de significância  $p < 0,05$ . Quando o mesmo grupo foi comparado em período distinto foi utilizado o teste de Wilcoxon para amostras pareadas.

## **6. Resultados:**

### **6.1. Validação da metodologia:**

A corrida cromatográfica deu-se com 7,5 minutos. Além da eluição do etanol, pode-se observar a eluição de outros compostos voláteis como o acetaldeído, acetona e metanol, mas sem haver interferência entre os mesmos (figura 9).

Os resultados sobre o tempo de retenção são apresentados na Tabela 2. Pode-se notar tempos de retenção distintos para cada analito testado e coeficiente de variação não ultrapassando 0,2%. Quando analisado o tempo de retenção de cada analito não foi observado diferença estatística significativa nas concentrações ensaiadas.



**Figura 9 – Cromatogramas típicos de: a) padrão, b) sangue e, c) urina.**

**1 - acetaldeído; 2 – acetona; 3 – metanol; 4 – etanol; 5 – padrão interno (acetonitrila).**

Tabela 2 – Tempos de retenção dos analitos acetaldeído, etanol e acetonitrila.

Analito	Concentração Testada	t <sub>R</sub> (minutos)			Coeficiente de Variação (%)
		Média±DP	Mínimo	Máximo	
Acetaldeído	P <sub>1</sub> (n=5)	3,110 ± 0,004 <sup>a</sup>	3,106	3,114	0,13
	P <sub>3</sub> (n=5)	3,115 ± 0,005 <sup>a</sup>	3,107	3,121	0,16
	P <sub>5</sub> (n=5)	3,109 ± 0,003 <sup>a</sup>	3,104	3,112	0,10
Acetona	P <sub>1</sub> (n=5)	3,880 ± 0,005 <sup>b</sup>	3,874	3,884	0,13
	P <sub>3</sub> (n=5)	3,883 ± 0,006 <sup>b</sup>	3,875	3,889	0,16
	P <sub>5</sub> (n=5)	3,880 ± 0,003 <sup>b</sup>	3,875	3,883	0,08
Etanol	P <sub>1</sub> (n=5)	5,402 ± 0,004 <sup>c</sup>	5,397	5,407	0,07
	P <sub>3</sub> (n=5)	5,402 ± 0,005 <sup>c</sup>	5,397	5,408	0,09
	P <sub>5</sub> (n=5)	5,403 ± 0,004 <sup>c</sup>	5,398	5,406	0,07
Acetonitrila	N=15	6,336 ± 0,004	6,332	6,342	0,06

Letras iguais para o mesmo analito, p>0,05.

Na Tabela 3 são apresentados os coeficientes de resolução dos picos cromatográficos. Exceto para o acetaldeído, nota-se que o coeficiente de resolução não foi inferior a 1,5 para os outros analitos em qualquer das concentrações utilizadas.



Tabela 3 – Coeficientes de resolução dos analitos acetaldeído, etanol e acetona.

Analito	Concentração Testada	Coeficiente de Resolução (R)
		Média±DP
Acetaldeído	P <sub>1</sub> (n=5)	1,72 ± 0,76
	P <sub>3</sub> (n=5)	2,37 ± 0,68
	P <sub>5</sub> (n=5)	1,58 ± 0,58
Acetona	P <sub>1</sub> (n=5)	6,13 ± 0,05
	P <sub>3</sub> (n=5)	5,79 ± 0,62
	P <sub>5</sub> (n=5)	1,63 ± 0,07
Etanol	P <sub>1</sub> (n=5)	4,55 ± 0,08
	P <sub>3</sub> (n=5)	4,55 ± 0,01
	P <sub>5</sub> (n=5)	4,68 ± 0,03

Na Tabela 4 são apresentados os coeficientes de variação referentes à precisão do método. A maior variação encontrada foi na amostra de sangue na concentração P<sub>1</sub> em que chegou a 5,4%. Nas demais amostras esta variação não ultrapassou os 5%.

Tabela 4 – Coeficiente de variação (precisão) das análises de etanol em sangue e urina.

Concentração	Sangue	Urina
	CV	CV
P <sub>1</sub> (n=9)	5,4	5,0
P <sub>3</sub> (n=9)	1,9	3,5
P <sub>5</sub> (n=9)	3,9	1,0

A Tabela 5 traz os valores percentuais do teste de recuperação realizado em sangue e urina, referente à exatidão do método proposto, realizados em três níveis de concentrações, baixa ( $P_1$ ), média ( $P_3$ ) e alta ( $P_5$ ). Os dados mostraram que a recuperação no sangue não variou mais que 15%, enquanto na urina a recuperação excedeu os 15% em todas as concentrações testadas.

Tabela 5 – Variação percentual (recuperação) entre valor teórico e valor medido na análise de etanol em sangue e urina.

Concentração	Sangue	Urina
P <sub>1</sub> (n=3)	96,6 ± 6,6	108,1 ± 8,4
P <sub>3</sub> (n=3)	105,8 ± 5,4	114,8 ± 7,1
P <sub>5</sub> (n=3)	95,8 ± 6,5	113,8 ± 6,0

Os limites de detecção e de quantificação são mostrados na Tabela 6. Observou-se limite de detecção na faixa de partes por milhão, ou seja, microgramas por litro. O limite de detecção encontra-se 100 vezes menor que o primeiro ponto da curva de calibração ( $P_1$ ), a qual foi construída para detectar valores com significado clínico.

Tabela 6 – Limites de detecção e quantificação.

	Etanol
Limite de Detecção (mg/L)	0,1995
Limite de Quantificação (mg/L)	0,4986

A Tabela 7 e a figura 10 trazem os resultados referentes à linearidade. Foi obtida uma alta linearidade representada pelo coeficiente de linearidade  $r$  próximo de 1,0, o qual representaria a reta teórica perfeita.



Tabela 7 – Valores de linearidade e faixa de aplicação das curvas de calibração do etanol, acetaldeído, metanol e acetona.

	Coeficiente de linearidade (r)	Equação da reta	Faixa de aplicação (g/L)	
			Mínimo	Máximo
Etanol	0,9991	$y = 0,001 x + 0,001$	0,020	6,052
Acetaldeído	0,9985	$y = 0,006 x - 0,040$	0,010	2,951
Metanol	0,9979	$y = 0,0003 x - 0,0008$	0,010	3,081
Acetona	0,9993	$y = 0,007 - 0,036$	0,010	3,072

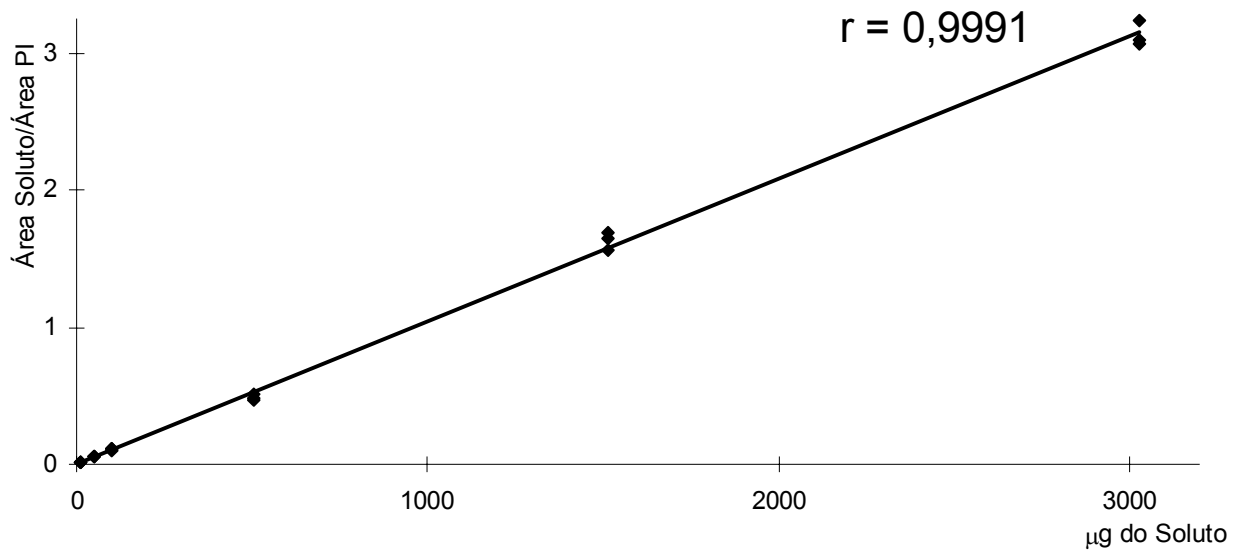


Figura 10 – Curva de calibração do etanol.

## 6.2. Experimentação animal:

Os experimentos foram realizados em sala própria para procedimentos cirúrgicos e sacrifício de animais de laboratório no biotério do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Os procedimentos iniciaram-se sempre pela manhã a fim de manter uma homogeneidade entre os diversos grupos no que se refere à alimentação e ao ciclo circadiano.

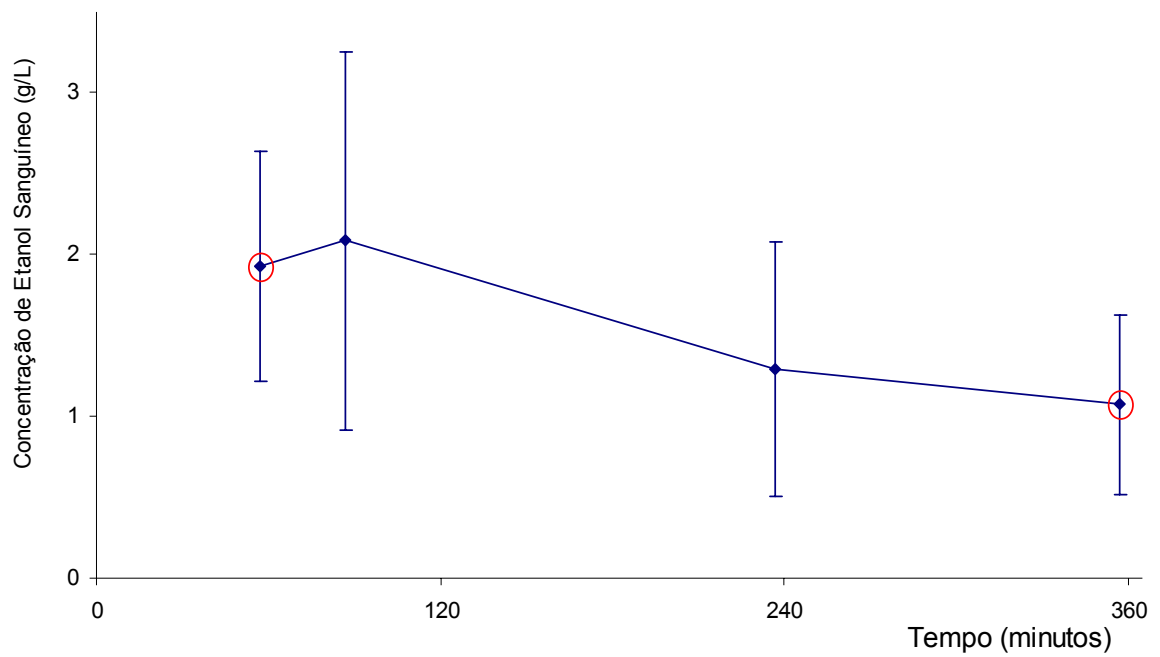
A média de peso dos animais foi de  $274,9 \pm 47,0$  g, sendo a média de peso dos animais do experimento 1 de  $272,1 \pm 54,9$  g e do experimento 2 de  $281,8 \pm 14,1$  g. Não foram observadas diferenças significativas ( $p=0,1671$ ) entre os pesos dos animais nos dois experimentos propostos.

Optou-se nesse estudo pela gavagem de etanol sem diluição visto que em estudo piloto realizado anteriormente a este, observou-se uma mortalidade na ordem de 45% dos animais decorrente de refluxo gastro-esofágico e derramamento de álcool nos pulmões. No presente estudo houve a perda de 3 animais representando 2,2% do total estudado.

As figuras 11, 12 e 13 apresentam as curvas individualizadas da análise das concentrações de etanol sanguíneo dentro do mesmo grupo. No grupo EtOH (figura 11) foi encontrada diferença estatística entre os 60 e 360 minutos ( $p=0,0411$ ). Para o grupo EtOH+Gli (figura 12) não houve diferença significativa entre os períodos. No grupo EtOH+B1 (figura 13) foi observada diferença estatística entre os tempos 60 e 360 minutos ( $p=0,0260$ ).

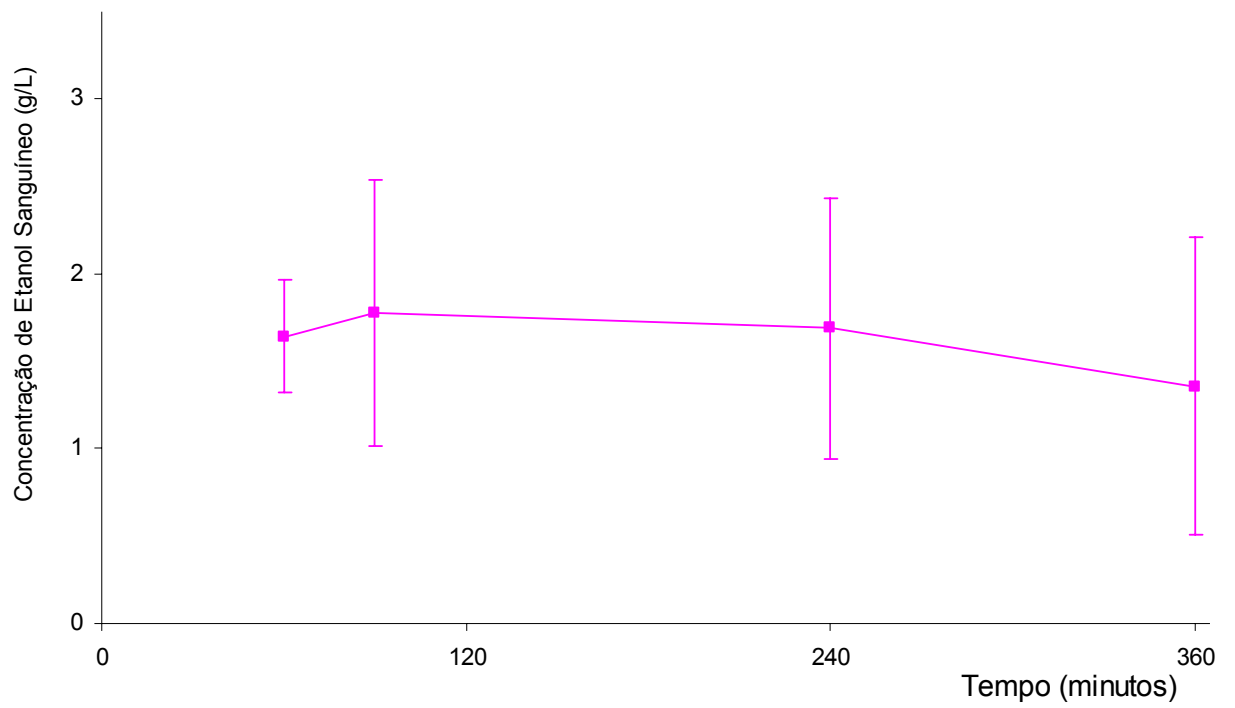
A figura 14 traz as curvas de alcoolemia ensaiadas nos 3 grupos experimentais. Não foram encontradas diferenças significativas quando os grupos

foram analisados entre si em um mesmo período.



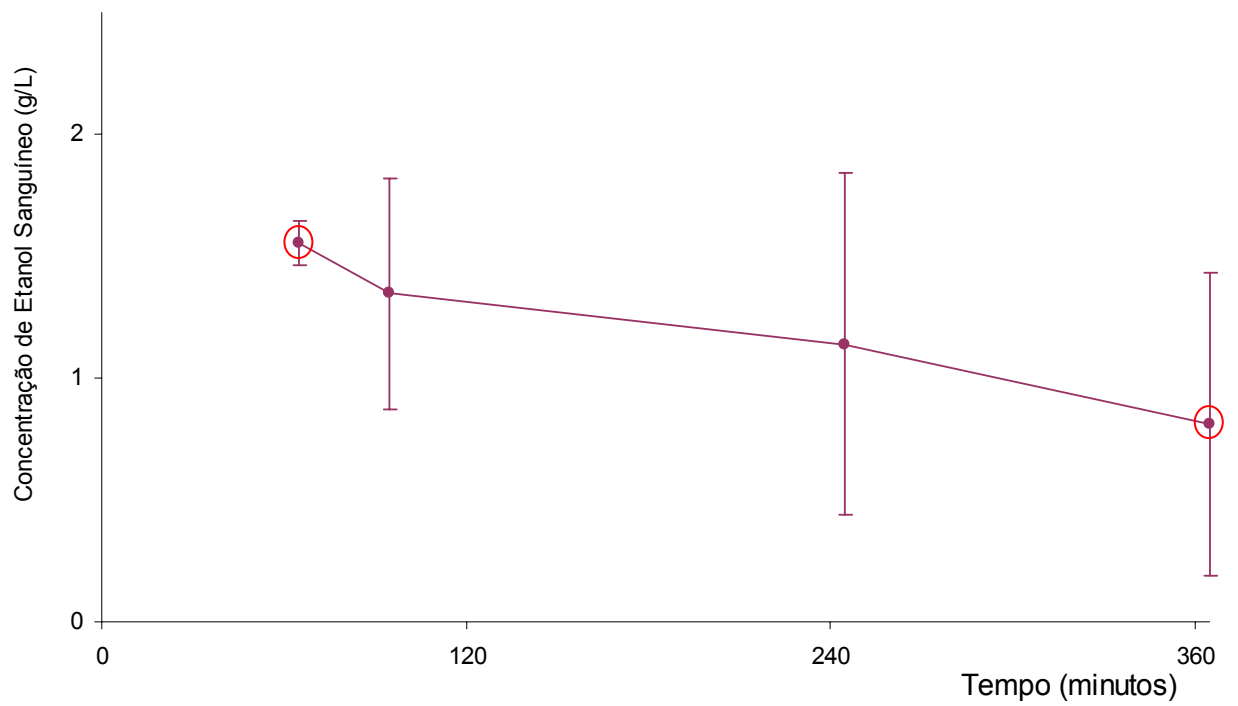
**Figura 11 – Análise temporal da alcoolemia no grupo EtOH.**

**Valores são expressos como média±desvio padrão. Médias circundadas referem-se à diferença estatística comparando os diferentes períodos.**



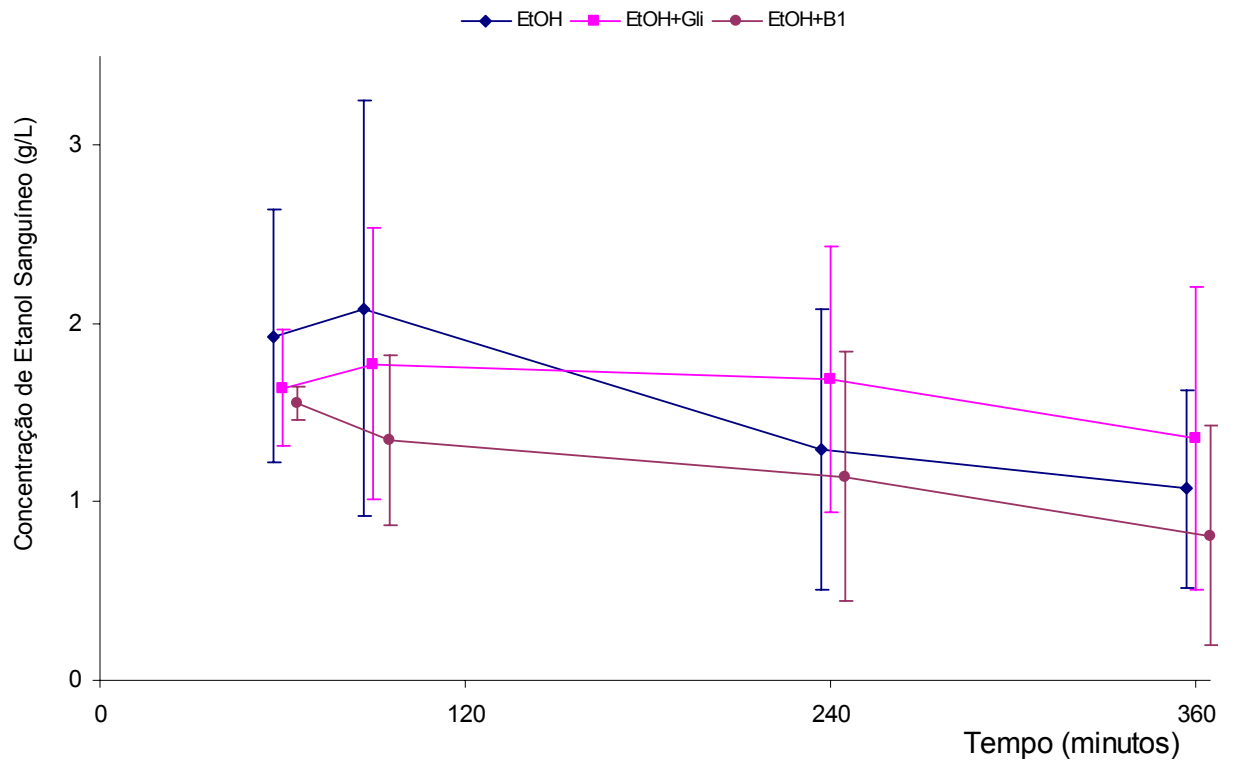
**Figura 12 – Análise temporal da alcoolemia no grupo EtOH+Gli.**

Valores são expressos como média±desvio padrão.



**Figura 13 – Análise temporal da alcoolemia no grupo EtOH+B1.**

Valores são expressos como média±desvio padrão. Médias circundadas referem-se à diferença estatística comparando os diferentes períodos.



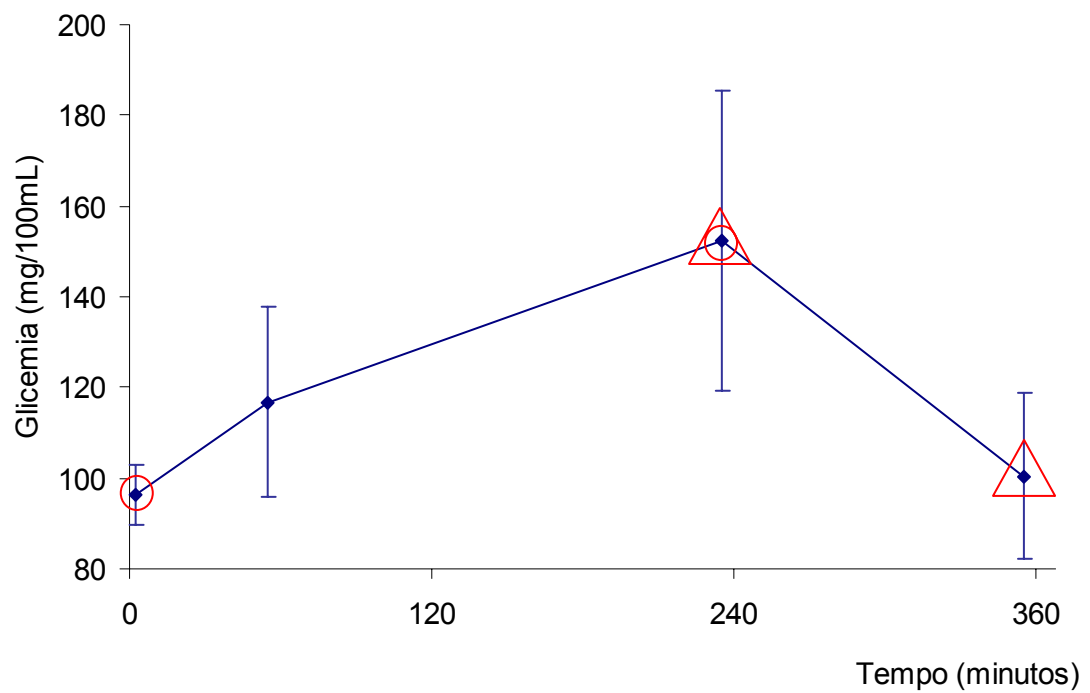
**Figura 14 – Análise entre grupos das variações na alcoolemia em relação ao período experimental.**

**Valores são expressos como média±desvio padrão.**



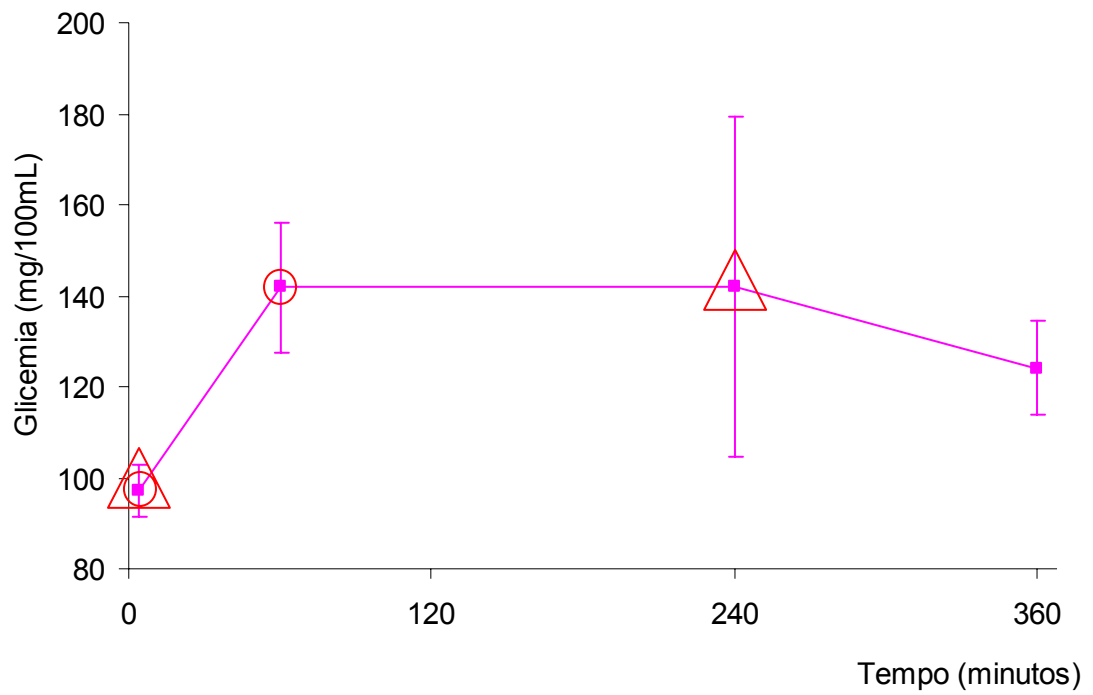
As figuras 15, 16 e 17 trazem as análises individualizadas da variação glicêmica entre períodos em um mesmo grupo. Nota-se no grupo EtOH uma elevação na glicemia alcançada aos 240 minutos voltando ao valor basal aos 360 minutos pós administração do etanol. No grupo EtOH+Gli o aumento da glicemia deu-se mais precocemente, aos 90 minutos, mantendo-se nos 240 minutos e voltando ao valor basal aos 360 minutos após a gavagem com etanol. Para o grupo EtOH+B1 também houve um aumento na glicemia aos 90 minutos que perdurou até o último período experimental.

Na figura 18 são apresentadas as variações glicêmicas analisadas entre grupos. Observou-se diferença significativa ( $p < 0,01$ ) entre o grupo EtOH e o grupo EtOH+B1 quando comparados nos 60 minutos após a administração do etanol. Também foram observadas diferenças estatísticas aos 360 minutos após a administração de etanol entre os grupos EtOH e EtOH+B1 ( $p < 0,001$ ) e EtOH+Gli e EtOH+B1 ( $p < 0,05$ ).



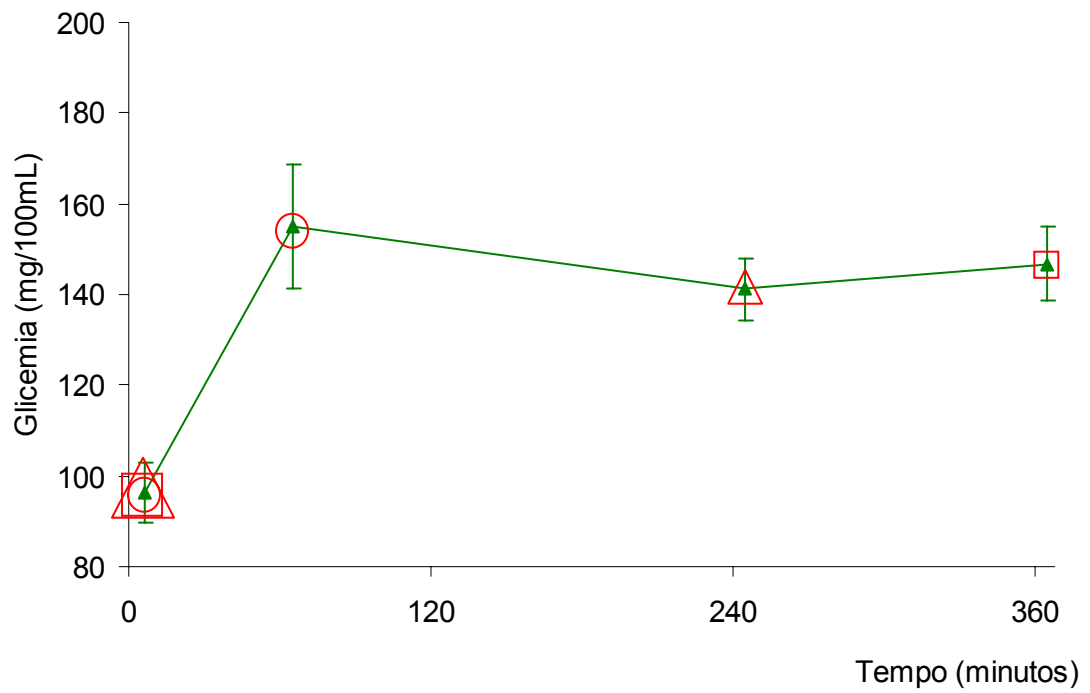
**Figura 15 – Variação glicêmica no grupo EtOH.**

Valores são expressos como média±desvio padrão. Médias circundadas referem-se à diferença estatística comparando os diferentes períodos.



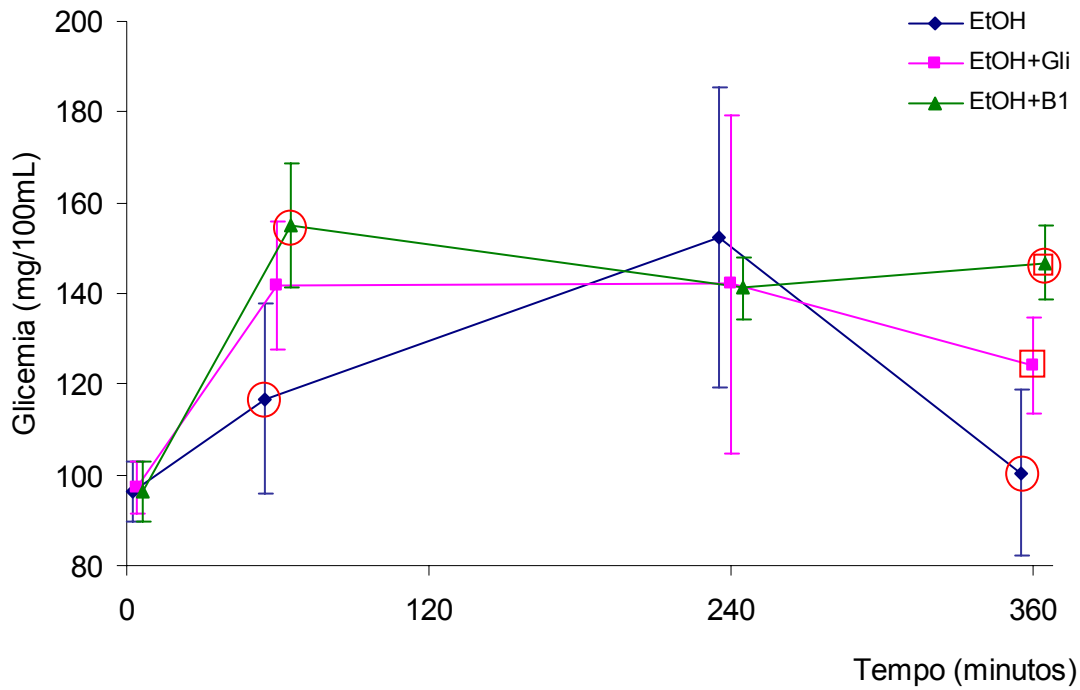
**Figura 16 – Variação glicêmica no grupo EtOH+Gli.**

Valores são expressos como média±desvio padrão. Médias circundadas referem-se à diferença estatística comparando os diferentes períodos.



**Figura 17 – Variação glicêmica no grupo EtOH+B1.**

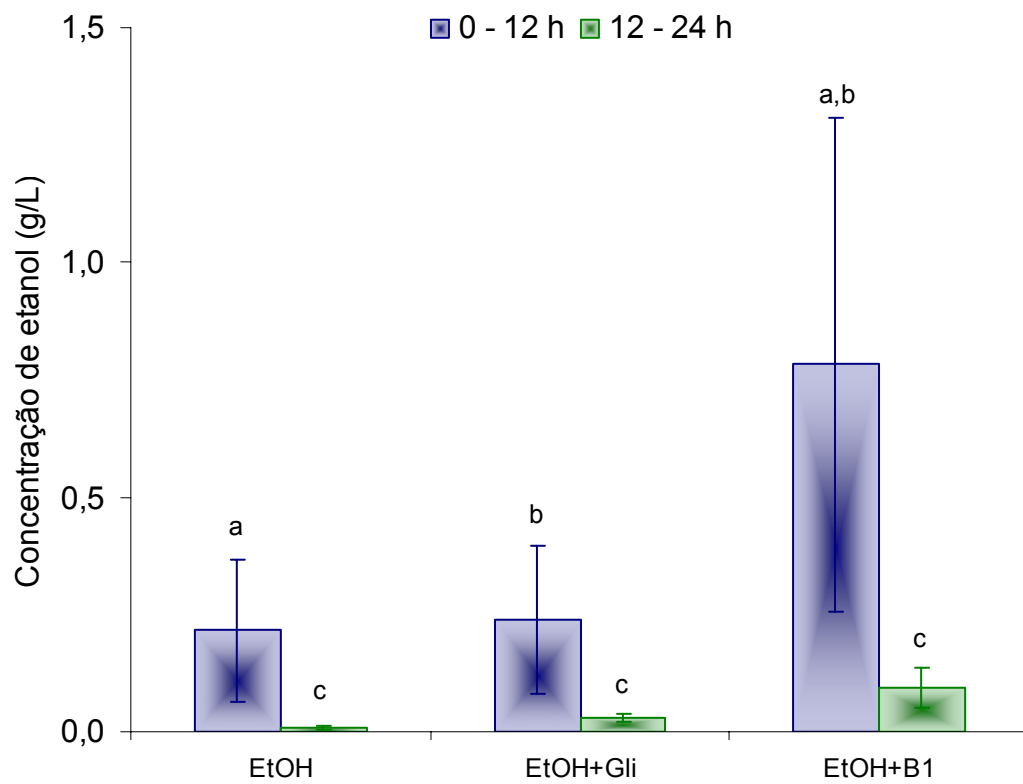
Valores são expressos como média±desvio padrão. Médias circundadas referem-se à diferença estatística comparando os diferentes períodos



**Figura 18 – Análise entre grupos das variações glicêmicas em relação ao período experimental.**

Valores são expressos como média±desvio padrão. Médias circundadas referem-se à diferença estatística comparando os diferentes grupos no mesmo período.

Na figura 19 são apresentados os resultados referentes à concentração urinária de etanol dos grupos experimentais nas 12 primeiras horas (0 – 12 h) e nas 12 horas subseqüentes (12 – 24 h). Para as primeiras 12 horas o grupo EtOH+B1 apresentou maior valor de concentração urinária de etanol, sendo esta diferença significativa ( $p < 0,01$ ). Para as 12 horas subseqüentes todos os grupos apresentaram diferença estatística entre si, com o grupo EtOH+B1 apresentando novamente o maior valor de excreção. Quando comparados os valores da concentração urinária de etanol nos dois períodos de coleta, todos os grupos apresentaram diferença estatisticamente diferente.



**Figura 19 – Concentrações de etanol urinário.**

Valores são expressos como média±desvio padrão. Letras iguais referem-se à presença de diferença estatística.

A Tabela 8 apresenta os volumes urinários nos dois períodos de coleta, bem como a somatória dos volumes dos dois períodos. Os volumes urinários foram todos estatisticamente diferentes quando comparados períodos distintos em um mesmo grupo, sendo o segundo período (12 – 24 h) de maior volume de excreção. Somente apresentaram diferença entre si os grupos EtOH e EtOH+B1 quando comparados nas 12 últimas horas. O volume urinário total não apresentou diferença entre os grupos.



Tabela 8 – Volumes de urina coletados nos dois períodos para cada grupo experimental.

Grupos	Volume urinário (L)		Somatória das 24 h (L)
	0 – 12 h	12 – 24 h	
EtOH	0,0045 ± 0,0014 <sup>a</sup>	0,0153 ± 0,0067 <sup>a,#</sup>	0,0099 ± 0,0075
EtOH+Gli	0,0035 ± 0,0014 <sup>b</sup>	0,0133 ± 0,0074 <sup>b</sup>	0,0085 ± 0,0076
EtOH+B1	0,0045 ± 0,0015 <sup>c</sup>	0,0126 ± 0,0047 <sup>c,#</sup>	0,0083 ± 0,0057

Letras iguais na mesma linha, p<0,05.

# na mesma coluna, p<0,05.

A Tabela 9 traz os valores da concentração urinária normalizados, apresentados como excreção urinária de etanol em miligramas. No primeiro período (0 – 12 h) de coleta de urina o grupo EtOH+B1 apresentou maior excreção de etanol comparando-se com os demais grupos ( $p < 0,05$ ). Para o segundo período (12 – 24 h), somente diferiu significativamente o grupo EtOH quando comparado com o grupo EtOH+B1. Quando verificados os períodos dentro de um mesmo grupo, somente os grupos EtOH e EtOH+B1 apresentaram diferença significativa. Na somatória dos dois períodos de coleta, verificou-se maior excreção de etanol no grupo que recebeu tiamina.

Tabela 9 – Excreção urinária de etanol.

Grupos	Excreção urinária de etanol (mg)		Somatória das 24 h (mg)
	0 – 12 h	12 – 24 h	
EtOH	1,1 ± 1,1 <sup>a,#</sup>	0,2 ± 0,1 <sup>a,#</sup>	1,1 ± 1,1 <sup>a</sup>
EtOH+Gli	0,9 ± 0,7 <sup>b</sup>	0,4 ± 0,3	1,3 ± 0,7 <sup>b</sup>
EtOH+B1	3,5 ± 0,8 <sup>a,b,#</sup>	0,8 ± 0,6 <sup>a,#</sup>	4,0 ± 3,5 <sup>a,b</sup>

Letras iguais na mesma coluna,  $p < 0,05$ .

# na mesma linha,  $p < 0,05$ .

A Tabela 10 traz os valores percentuais de excreção urinária de etanol em relação à dose recebida. Verificou-se que o grupo que recebeu tiamina em seu tratamento excretou mais etanol pela urina que os grupos não tratados com a vitamina.

Tabela 10 - Percentual de etanol excretado na urina em relação à dose inicial.

	EtOH	EtOH+Gli	EtOH+B1
0 – 12 h	0,07±0,07 <sup>a</sup>	0,06±0,05 <sup>b</sup>	0,79±0,72 <sup>a,b</sup>
12 – 24 h	0,01±0,01 <sup>a</sup>	0,03±0,02 <sup>b</sup>	0,22±0,42 <sup>a,b</sup>
24h	0,09±0,08 <sup>a</sup>	0,09±0,05	0,88±0,69 <sup>a</sup>

Letras iguais na mesma linha,  $p < 0,05$ .

Nas Tabelas 11, 12 e 13 são apresentados os valores relativos a alguns parâmetros do sistema antioxidante hepático dos ratos utilizados nos experimentos. A Tabela 11 apresenta os valores de MDA medidos como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e expressos como nmoles de MDA/mg de proteína. Os dados mostram que para os grupos EtOH e EtOH+Gli houve um aumento nos valores de MDA que somente retornaram ao valor basal após 24 h, enquanto que o grupo tratado com tiamina não apresentou nenhum aumento. Na Tabela 12 estão os valores para a glutathiona reduzida. Nota-se que houve um consumo mais acentuado no grupo que não recebeu nenhum tratamento e somente no grupo que recebeu tiamina como tratamento não observou-se nenhuma alteração nos valores da glutathiona. Os valores se igualaram após 24 h, e todos os grupos recobriram o valor basal. Na Tabela 13 estão expressos os valores de vitamina E hepática em  $\mu\text{mol/g}$  de tecido. Pode-se observar que houve consumo de vitamina E em todos os grupos. No entanto, nos grupos EtOH e EtOH+Gli, esse consumo só foi verificado nas 24 h após a administração de etanol, enquanto no grupo EtOH+B1 o consumo foi gradativo e apresentando-se menor que os demais grupos nas 24 h.

As figuras 20, 21 e 22 são complementares aos dados acima expostos e trazem as comparações das variações entre os parâmetros do sistema antioxidante em cada grupo. Observou-se em todos os grupos que à medida que o MDA decaí a GSH tem aumento com conseqüente consumo de vitamina E.

Tabela 11 – Concentrações hepáticas de malonaldeído (nmoles de MDA/mg de proteína).

	EtOH	EtOH+Gli	EtOH+B1
Basal	0,12±0,04 <sup>#</sup>	0,12±0,04 <sup>ω,S</sup>	0,12±0,04
60'	0,37±0,08 <sup>a,#,*</sup>	0,46±0,11 <sup>b,ω,#</sup>	0,11±0,01 <sup>a,b,#</sup>
240'	0,23±0,07 <sup>a,#</sup>	0,31±0,08 <sup>b,S,*</sup>	0,11±0,01 <sup>a,b,*</sup>
24 h	0,14±0,01 <sup>*</sup>	0,13±0,01 <sup>#,*</sup>	0,13±0,01 <sup>#,*</sup>

Letras iguais na mesma linha, p<0,05.

Símbolos iguais na mesma coluna, p<0,05.

Tabela 12 – Valores de glutatona reduzida hepática ( $\mu\text{mol}$  de GSH/g de proteína).

	EtOH	EtOH+Gli	EtOH+B1
Basal	22,7 $\pm$ 3,7 <sup>#,*</sup>	22,7 $\pm$ 3,7	22,7 $\pm$ 3,7
60'	7,2 $\pm$ 2,4 <sup>a,b,#,^</sup>	18,4 $\pm$ 2,8 <sup>a,c,#</sup>	29,7 $\pm$ 3,4 <sup>b,c</sup>
240'	10,9 $\pm$ 3,8 <sup>a,b,*,^</sup>	18,3 $\pm$ 2,8 <sup>a,c,*</sup>	28,1 $\pm$ 3,7 <sup>b,c</sup>
24 h	28,3 $\pm$ 5,6 <sup>^,*</sup>	27,9 $\pm$ 4,5 <sup>#,*</sup>	27,2 $\pm$ 5,4

Letras iguais na mesma linha,  $p < 0,05$ .

Símbolos iguais na mesma coluna,  $p < 0,05$ .



Tabela 13 – Concentrações de vitamina E hepática ( $\mu$ moles de Vitamina E/g de tecido).

	EtOH	EtOH+Gli	EtOH+B1
Basal	76,7 $\pm$ 8,0 <sup>§</sup>	76,7 $\pm$ 8,0 <sup>§</sup>	76,7 $\pm$ 8,0 <sup>§,#,*</sup>
60'	45,7 $\pm$ 15,8 <sup>#</sup>	69,1 $\pm$ 19,6 <sup>a,#</sup>	41,8 $\pm$ 12,4 <sup>a,§</sup>
240'	63,8 $\pm$ 17,0 <sup>a,*</sup>	63,8 $\pm$ 8,7 <sup>b,*</sup>	46,9 $\pm$ 3,1 <sup>a,b,#</sup>
24 h	15,4 $\pm$ 11,3 <sup>a,§,#,*</sup>	8,7 $\pm$ 6,1 <sup>b,§,#,*</sup>	27,2 $\pm$ 5,4 <sup>a,b,*</sup>

Letras iguais na mesma linha,  $p < 0,05$ .

Símbolos iguais na mesma coluna,  $p < 0,05$ .

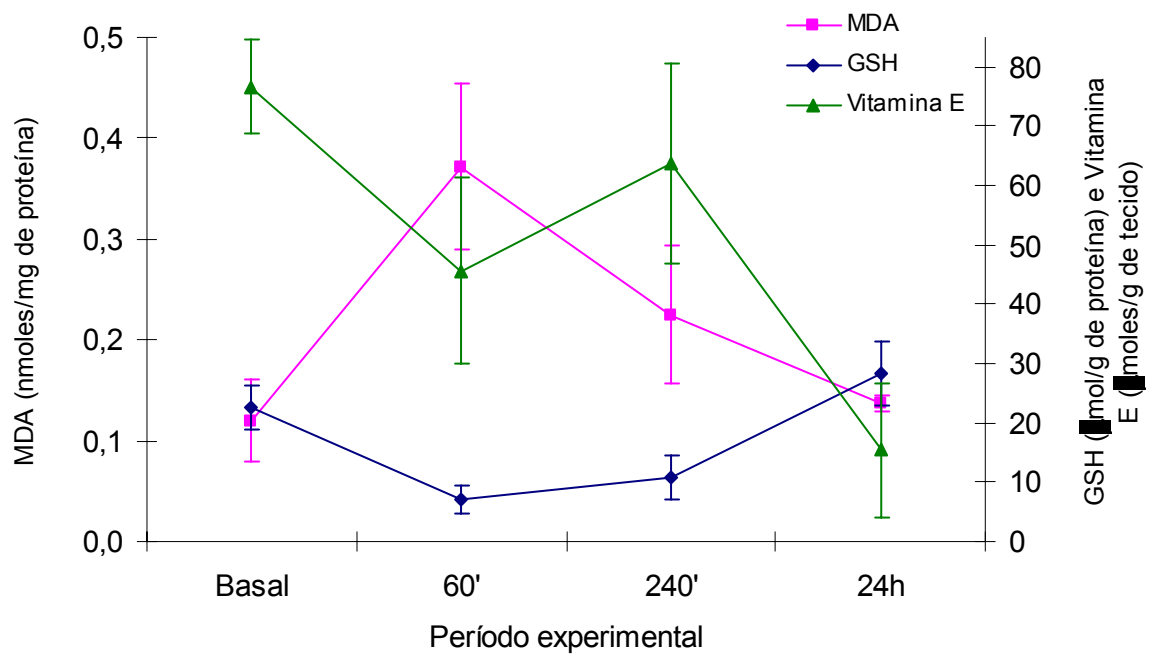
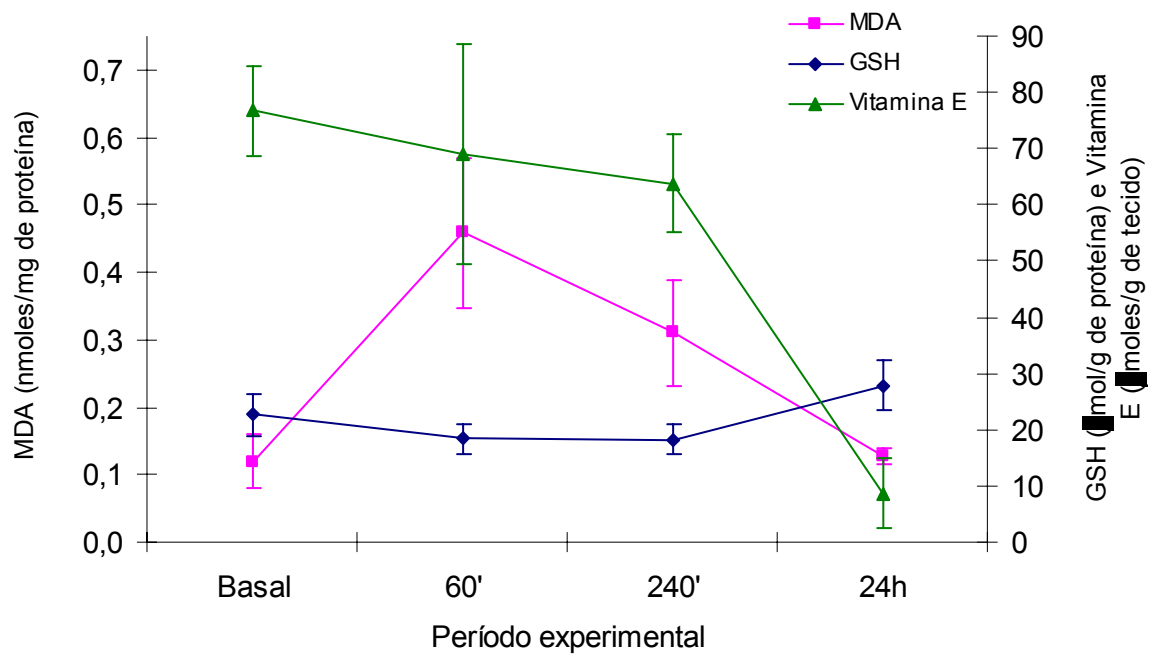
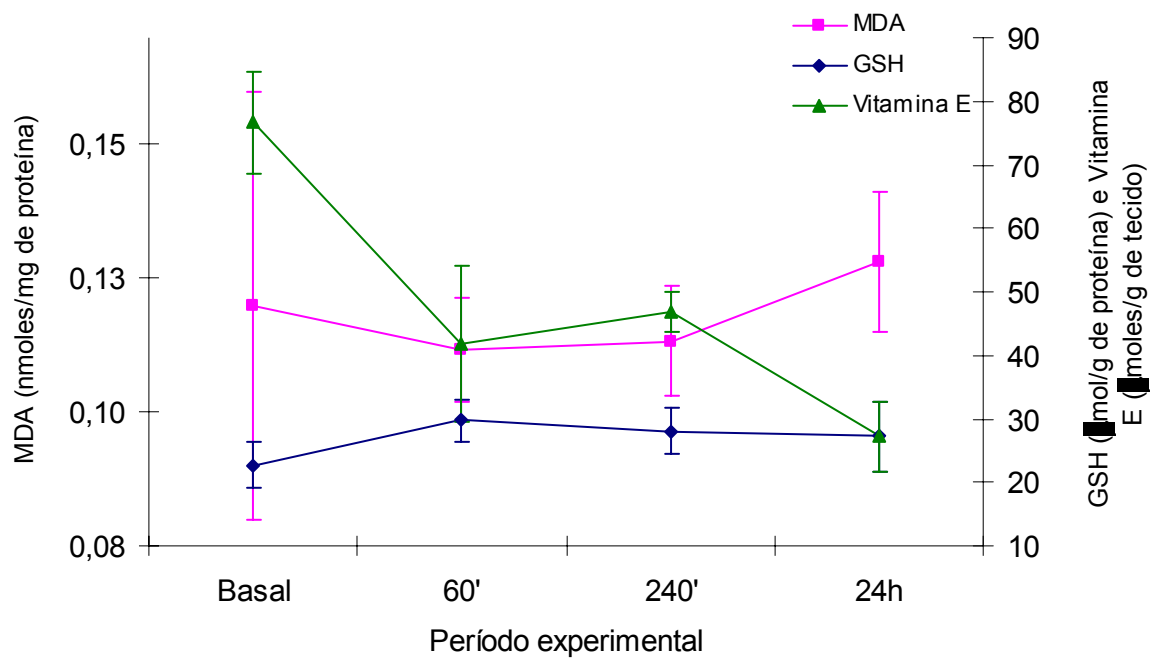


Figura 20 – Comparações das variações de MDA, GSH e Vitamina E no Grupo EtOH.



**Figura 21 – Comparações das variações de MDA, GSH e Vitamina E no Grupo EtOH+Gli.**



**Figura 22 – Comparações das variações de MDA, GSH e Vitamina E no Grupo EtOH+B1.**

## 7. Discussão:

A cromatografia gasosa acoplada à técnica de amostragem do *headspace* tem sido descrita como o método de escolha na dosagem de etanol em fluidos biológicos. Desde a primeira publicação de seu uso em 1963, esta metodologia sofreu várias modificações e melhorias tecnológicas chegando à completa automatização, principalmente em uma etapa fundamental em cromatografia gasosa que é a amostragem e injeção.

Dentre os objetivos deste trabalho, estava incluso a validação de uma metodologia para a dosagem de etanol por cromatografia gasosa. Com base na literatura científica, deu-se a escolha pela técnica do *headspace*, pelo detector e pela fase da coluna. Outros parâmetros foram otimizados para aplicação com a aparelhagem disponível, tais como, volume de amostra, padrão interno e gradiente de temperatura aplicado à coluna. Vale ressaltar que neste estudo não foi utilizada amostragem de *headspace* automática, sendo as amostras injetadas manualmente com auxílio de seringa apropriada mantida aquecida, conforme descrito em materiais e métodos.

Segundo revisão de Tagliaro et al. (1992), constata-se que a acetonitrila é uma substância pouco utilizada como padrão interno, sendo preferencialmente usados o n-propanol e o t-butanol. Os dados obtidos sobre o tempo de retenção mostraram que a acetonitrila ficou bem separada dos outros analitos, principalmente do etanol, e seu coeficiente de resolução foi de um pico bem formado, sem apresentar cauda. Somando-se a isso, a solução de acetonitrila não apresentou degradação por um período testado de 24 meses, tornando seu uso confiável e

desejado. Esses dados também foram relatados em estudo para determinação de etanol urinário (Zilly, Langmann *et al.*, 2003).

As Tabelas 2 e 3 mostraram valores distintos para os tempos de retenção de cada analito e coeficientes de resolução  $\geq 1$ , o que significou uma boa separação do etanol em relação aos outros analitos, demonstrando que não houve interferências na eluição do etanol. Dados semelhantes foram reportados por Zuba *et al.* (2002). Evidenciou-se também que não houve alterações no tempo de retenção quando foi aumentada a concentração do etanol, demonstrando-se que, na faixa de aplicação do método, a eluição do etanol não sofreu o efeito de alargamento de pico, fator que influencia na integração da área do pico cromatográfico e conseqüentemente na quantificação do analito. Esses dados são semelhantes ao relatados por outros autores tais como De Martinis e Martin (2002), Zilly *et al.* (2003) e Wasfi *et al.* (2004), embora os mesmos não relatem seus valores de coeficiente de resolução.

Segundo critérios da ANVISA (Brasil, 2003), o coeficiente de variação na determinação da precisão, assim como o desvio na determinação da exatidão, não devem exceder os 15%. Os valores apresentados nas Tabelas 4 e 5 demonstraram que o método apresentou-se preciso e exato. Resultados semelhantes foram descritos por outros autores utilizando amostradores de *headspace* automático. Assim, Macchia *et al.* (1995) obtiveram para precisão, coeficientes de variação de 2,9% no sangue e 0,9% na urina, utilizando uma concentração teórica de 0,5 g/L para o limite inferior. Com respeito à exatidão, os mesmos autores obtiveram 0,2% de variação na recuperação em sangue e 2,2% para urina, utilizando a mesma concentração teórica de 0,5 g/L. De Martinis *et al.* (2002) utilizando amostrador automático de *headspace* com microextração em fase sólida apresentaram coeficiente de variação de 6,2% em sangue na concentração de 0,02 g/L. Zuba *et al.*

(2002), na mesma linha de equipamento, verificaram um coeficiente de variação de 6,0% e recuperação de 99,2% em amostras de sangue. Utilizando microextração em fase sólida com amostrador automático de *headspace* acoplado à espectrometria de massas na análise de etanol em sangue, Wasfi et al. (2004) encontraram coeficientes de variação de 2,33% e 1,24% para as concentrações de 0,05 e 1,5 g/L, respectivamente e, recuperação de 99% e 101,5% para concentrações de 0,2 e 1,5 g/L, respectivamente.

Os limites de detecção e quantificação mostrados na Tabela 6 encontraram-se dentro da faixa de valores da literatura, que vão de 0,025 mg/L (Zuba, Parczewski et al., 2002) a 10 mg/L (Macchia, Mancinelli et al., 1995) para o limite de detecção e, 0,08 mg/L (Zuba, Parczewski et al., 2002) a 0,25 mg/L (Zilly, Langmann et al., 2003) para o limite de quantificação. Tais diferenças estão provavelmente relacionadas ao equipamento utilizado. No entanto, como salientam Zilly et al. (2003) e Wasfi et al. (2004) esses valores são suficientemente aceitáveis para dosagens de etanol em amostras clínicas ou forenses.

Os dados de linearidade e faixa de aplicação com valores de 0,9991 para a faixa de 0,020 a 6,052 g/L de etanol obtidos neste estudo apresentaram-se satisfatórios e semelhantes aos observados na literatura. Macchia et al. (1995), trabalhando na faixa de 0,01 a 4,0 g/L relatam coeficiente de linearidade  $r=0,99$ . De Martinis e Martin (2002), observaram um  $r=0,9983$  na faixa de 0,001 a 10,0 g/L. Zuba et al. (2002), apresentado seus dados transformados para logarítmicos, relatam a obtenção de  $r>0,980$  para a faixa de 0,0004 g/L a 0,1 g/L, a qual não representa uma faixa ótima de trabalho. Zilly et al. (2003), relatam  $r=0,999$  trabalhando na faixa de 0,025 g/L a 0,5 g/L. Wasfi et al. (2004), obtiveram  $r=0,9994$  na faixa de concentração de 0,05 a 2,0 g/L. Conforme a figura 1 há a possibilidade de se

encontrar alcoolemias na ordem de 5,0 g/L, o que torna de grande relevância o teste de linearidade chegar até essa concentração.

Em modelos de experimentação animal de intoxicação aguda por etanol utiliza-se uma dose de 5 g de etanol por kg de peso do animal preferencialmente por via intragástrica quando não se deseja evitar o efeito de primeira passagem observado no estômago (Navasumrit, Ward *et al.*, 2000; Nanji e French, 2003). Takabe e Itokawa (1983), utilizando dose de 4 g/kg em coelhos observaram uma alcoolemia na faixa de 4,5 g/L, enquanto Rindi *et al.* (1992), com uma dose de 4,7 g/kg em ratos, observaram valores na faixa de 3,0 g/L. Os dados destes autores corroboram com os achados nesse estudo, como apresentado na figura 14.

Dados da literatura sustentam que a absorção do etanol ocorre em função do esvaziamento gástrico, ocasionando uma variabilidade no tempo para se alcançar a concentração sanguínea máxima (Jones, Jonsson *et al.*, 1997; Levitt, Li *et al.*, 1997; Oneta, Simanowski *et al.*, 1998; Ramchandani, Kwo *et al.*, 2001; Klockhoff, Naslund *et al.*, 2002). Somando-se a isso observa-se uma variabilidade natural na concentração sanguínea de etanol (Norberg, Gabrielsson *et al.*, 2000; Jones, Lindberg *et al.*, 2004). Masur *et al.* (1982) encontraram 50% de variação na etanolemia de 40 pacientes que deram entrada em uma unidade de Pronto Socorro por intoxicação alcoólica. MacDonald *et al.* (1994) verificaram em sujeitos com intoxicação aguda por etanol, atendidos em um departamento de emergências, uma variação de alcoolemia da ordem de 43%. Norberg *et al.* (2000) observaram uma variação da concentração sanguínea de 14 e 45% para os tempos de 60 a 240 minutos após a administração do etanol, respectivamente. Jones *et al.* (2004) relatam variação de 21% após 42 minutos da ingestão de uma dose de 0,6 g de etanol por kg de peso. Estes dados também foram verificados no presente estudo. A



maior variação foi de 56% encontrada no grupo EtOH aos 90 minutos, como pode ser observado na figura 14. Duas possíveis explicações são que, conforme o delineamento experimental proposto, os animais continuaram sendo alimentados à vontade até o momento da experimentação, para que não desenvolvessem catabolismo energético. Este fato pode ter levado a uma diferença no consumo de ração, levando a diferentes taxas de esvaziamento gástrico e conseqüente variação na absorção do etanol. A segunda possível explicação está relacionada com a variabilidade natural com que ocorre a absorção do etanol. Como as amostras sanguíneas dos diferentes tempos experimentais foram coletadas de diferentes animais, a variabilidade pode ter influenciado na alcoolemia encontrada.

No presente estudo, não foram observadas diferenças nas curvas de alcoolemia entre os tratamentos com glicose ou com vitamina B<sub>1</sub> comparado com o grupo que não recebeu nenhum tratamento, como se pode verificar na figura 14. Esta ausência de diferença entre os tratamentos também foi relatada por outros autores (De Souza, Laranjeira *et al.*, 1982; Masur, De Souza *et al.*, 1982; Masur, De Souza *et al.*, 1983; Parlesak, Billinger *et al.*, 2004; Lisander, Lundvall *et al.*, 2005).

No entanto, pode-se observar diminuição da alcoolemia no tempo final de experimentação quando comparada com a alcoolemia inicial no grupo sem nenhum tratamento e no grupo que recebeu tiamina, enquanto no grupo tratado com glicose a alcoolemia permaneceu constante durante todo período experimental, sugerindo uma menor metabolização neste grupo (figuras 11, 12 e 13). Dados da literatura (Obrenovich e Monnier, 2003) apontam o consumo de NAD<sup>+</sup> para a metabolização de glicose. Como a enzima álcool desidrogenase é dependente de NAD<sup>+</sup>, essa via de metabolização do etanol possivelmente encontrou-se com atividade reduzida pela falta deste cofator.

Conforme exposto na figura 18, observou-se neste estudo uma hiperglicemia em todos os grupos, a qual instalou-se prontamente no grupo tratado com glicose e no grupo tratado com vitamina B<sub>1</sub>, enquanto no grupo sem nenhum tratamento esse efeito foi mais demorado. Alguns autores (Masur, De Souza *et al.*, 1982; Zilkens, Burke *et al.*, 2003; Aberle, Burd *et al.*, 2004) sugerem um aumento na taxa de glicogenólise hepática e diminuição da utilização da glicose em tecidos periféricos pelo uso de álcool, o que poderia explicar o aumento da glicemia verificada mesmo nos grupos que não receberam o carboidrato.

Norberg *et al.* (2000), relatam uma excreção urinária da ordem de 0,48%. Jones e Holmgren (2003) verificaram uma concentração de 3,59±0,99 g/L em indivíduos em que a causa de morte foi atribuída à intoxicação aguda por etanol. Estes dados diferem dos encontrados no presente estudo como observa-se na figura 19 e nas Tabelas 8 e 9. Pode-se observar que o grupo tratado com vitamina B<sub>1</sub> obteve maior concentração e excreção urinária. Entretanto, não são encontradas referências a respeito na literatura.

A administração aguda de etanol produz um quadro de estresse oxidativo pela formação de radicais livres e consumo de antioxidantes (Stoyanovsky, Wu *et al.*, 1998; Jordao, Chiarello *et al.*, 2004; Masalkar e Abhang, 2005). Stoyanovsky *et al.* (1998), utilizando células hepáticas HepG2, verificaram consumo de vitamina E e GSH na presença de radical hidroxietila. Estes autores também observaram a regeneração da glutathione reduzida quando forneceram NADPH e glutathione reductase. Jordão Júnior *et al.* (2004) relatam aumento do MDA hepático após 24 h da administração de dose aguda de etanol em ratos. Os mesmos autores ainda verificaram um consumo de vitamina E, que inicia-se após 2 horas da administração do etanol o que, provavelmente, explica a manutenção observada dos valores de

GSH. Choi et al. (2000) observaram uma diminuição da ordem de 50% nos níveis da glutathiona reduzida em fígados de ratos tratados com dose de 4,0 g de etanol/kg de peso. Masalkar e Abhang (2005) também verificaram aumento do MDA e queda nos valores de vitamina E plasmáticos em pacientes com doença hepática causada pelo álcool quando comparado com sujeitos controle.

Os dados deste estudo referentes à produção de MDA hepático apresentados na Tabela 11 diferem da literatura somente para o grupo tratado com tiamina, no qual pôde-se verificar a manutenção do valor basal de MDA durante os períodos analisados. Estes dados analisados com os valores de GSH (Tabela 12) e com os de vitamina E (Tabela 13) hepáticas, que decaíram menos no grupo que recebeu vitamina B<sub>1</sub>, sugerem um papel auxiliar dessa vitamina no sistema antioxidativo hepático.

Alguns dados da literatura vêm corroborar com os sugeridos no presente estudo. Assim, Aberle et al. (2004) relatam a proteção conferida pela tiamina comparada com a ausência de proteção com o uso das vitaminas B<sub>6</sub> (piridoxina) e B<sub>12</sub> (cianocobalamina) em miócitos cardíacos de ratos tratados com acetaldeído. Recentemente tem sido descrita uma relação entre a tiamina e glutathiona em que a forma cíclica da vitamina é convertida para a forma tiol em meio alcalino, com abertura do anel tiazólico. A glutathiona oxidada pela ligação com espécies radicalares é reconvertida à forma reduzida por ligação com a forma tiol da tiamina formando uma ponte dissulfeto com a mesma, desativando a espécie radicalar e restaurando a glutathiona reduzida (Stepuro, Piletskaya *et al.*, 2005). Shadyro et al. (2005) verificaram a supressão da formação de MDA à partir da peroxidação lipídica iniciada pelo radical hidroxietila, postulando que o grupamento amino, ligado ao anel aromático da tiamina, é um sítio de reação e desativação do radical hidroxietila.

Gliszczynska-Swiglo (2006) em ensaio *in vitro* verificou uma grande atividade seqüestradora de radicais livres da tiamina comparando-se à atividade encontrada para a vitamina C.

Tem sido demonstrada uma correlação positiva entre o estresse oxidativo e a hiperglicemia, causada especialmente pela autooxidação da glicose e pela glicação de proteínas e/ou lipídeos (Karachalias, Babaei-Jadidi *et al.*, 2005; Osawa e Kato, 2005). Embora todos os grupos tenham apresentado hiperglicemia, o grupo tratado com tiamina manteve este estado por todo período experimental. No entanto, esse grupo apresentou menor produção de malonaldeído e menor consumo de antioxidantes, sugerindo um possível papel antioxidante da vitamina B<sub>1</sub> em situações de hiperglicemia e conseqüente produção de produtos finais de glicação avançada (AGEs). Shangari *et al.* (2005) encontraram menor dano causado por aldeídos (metilglioxal e glioxal) gerados por peroxidação lipídica ou glicolização de proteínas em ratos tratados com tiamina quando comparados com animais deficientes dessa vitamina. Estes autores postularam a interação direta da tiamina com os aldeídos bem como a ativação da enzima transcetolase e conseqüente aumento no fornecimento de NADPH, aumentando a regeneração de GSH e o deslocamento do gliceraldeído para a via das pentoses. Da mesma forma, Karachalias *et al.* (2005) também verificaram, em ratos hiperglicêmicos, aumento de produtos da reação com metilglioxal e glioxal, retornando a normalidade após a administração de tiamina. Berrone *et al.* (2006), também verificaram o efeito da tiamina e da benfotiamina no deslocamento da via dos polióis para a via das pentoses pelo aumento na atividade da transcetolase em cultura de células vasculares tratadas com alta dose de glicose.

Provavelmente este mesmo efeito da tiamina foi encontrado neste trabalho, sendo de vital importância investigarmos mais profundamente o papel desta vitamina como um possível antioxidante dietético, agindo de maneira direta como sequestrante de radicais livres ou de maneira indireta na regeneração ou preservação dos níveis de vitamina E e da glutatona reduzida, ou mesmo tendo interações metabólicas relacionadas aos níveis glicêmicos.

Com os dados apresentados neste estudo, pôde-se verificar um possível benefício no uso da vitamina B<sub>1</sub> perante a intoxicação aguda por etanol, principalmente pelo abrandamento do dano oxidativo verificado nestas situações. Outro aspecto reelevante do trabalho foi a padronização e validação da técnica de determinação do etanol e outras substâncias voláteis (acetona, acetaldeído, metanol, etc), mostrando a aplicabilidade desta metodologia em situações metabólicas como a intoxicação aguda de etanol, descrita neste trabalho.

## 8. Conclusões:

Conforme proposto neste estudo e discutido acima, podemos concluir que:

- a padronização da técnica por cromatografia gasosa para dosagem de etanol em sangue e urina foi realizada, obtendo-se bons resultados quanto a eficiência, precisão e exatidão;
- não foram verificadas diferenças nas curvas de alcoolemia dos grupos com diferentes tratamentos. Somente apresentaram decréscimo na alcoolemia durante o período de experimentação, o grupo sem tratamento e o grupo tratado com vitamina B<sub>1</sub>;
- foi observada maior excreção urinária de etanol no grupo tratado com vitamina B<sub>1</sub>;
- detectou-se menores alterações no sistema antioxidante hepático no grupo que recebeu tiamina.

**Referências bibliográficas:**

Aberle, N. S., 2nd, L. Burd, *et al.* Acetaldehyde-induced cardiac contractile dysfunction may be alleviated by vitamin B1 but not by vitamins B6 or B12. Alcohol Alcohol, v.39, n.5, Sep-Oct, p.450-4. 2004.

Agabio, R. Thiamine administration in alcohol-dependent patients. Alcohol Alcohol, v.40, n.2, Mar-Apr, p.155-6. 2005.

Ahmed, N., R. Luthen, *et al.* Increased protein glycation in cirrhosis and therapeutic strategies to prevent it. Ann N Y Acad Sci, v.1043, Jun, p.718-24. 2005.

Arnaud, J., I. Fortis, *et al.* Simultaneous determination of retinol, alpha-tocopherol and beta-carotene in serum by isocratic high-performance liquid chromatography. J Chromatogr, v.572, n.1-2, Dec 6, p.103-16. 1991.

Berrone, E., Beltramo, E., *et al.* Regulation of intracellular glucose and polyol pathway by thiamine and benfotiamine in vascular cells cultured in high glucose. J Biol Chem. 2006. Disponível em <<http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M600418200>>. Acesso em: 09 mar. 2006.

Bonjour, J. P. Vitamins and alcoholism. IV. Thiamin. Int J Vitam Nutr Res, v.50, n.3, p.321-38. 1980.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. ANEXO.:

D.O.U. 2003.

Breen, K. J., R. Buttigieg, *et al.* Jejunal uptake of thiamin hydrochloride in man: influence of alcoholism and alcohol. Am J Clin Nutr, v.42, n.1, Jul, p.121-6. 1985.

Buege, J. A. e S. D. Aust. Microsomal lipid peroxidation. Methods Enzymol, v.52, p.302-10. 1978.

De Martinis, B. S. e C. C. Martin. Automated headspace solid-phase microextraction and capillary gas chromatography analysis of ethanol in postmortem specimens. Forensic Sci Int, v.128, n.3, Aug 28, p.115-9. 2002.

De Souza, M. L., R. R. Laranjeira, *et al.* [Glucose administration in acute alcoholic intoxication. A double-blind study in volunteers]. AMB Rev Assoc Med Bras, v.28, n.7-8, Jul-Aug, p.171-3. 1982.

Del Rio, D., A. J. Stewart, *et al.* A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. Nutr Metab Cardiovasc Dis, v.15, n.4, Aug, p.316-28. 2005.

Drozd, J., Z. Vodakova, *et al.* Systematic errors with the use of internal standard calibration in gas chromatographic headspace analysis. J Chromatogr, v.518, 1990, p.1-8. 1990.

Dubowski, K. M. Alcohol determination in the clinical laboratory. Am J Clin Pathol,



v.74, n.5, Nov, p.747-50. 1980.

Eriksson, K., L. Pekkanen, *et al.* The effects of dietary thiamin on voluntary ethanol drinking and ethanol metabolism in the rat. Br J Nutr, v.43, n.1, Jan, p.1-13. 1980.

Fernandez-Checa, J. C., N. Kaplowitz, *et al.* Oxidative stress and alcoholic liver disease. Alcohol Health Res World, v.21, n.4, p.321-4. 1997.

Fujimiya, T., Y. Ohbora, *et al.* Pharmacokinetic study of ethanol and its metabolites during ethanol infusion. Leg Med (Tokyo), v.5 Suppl 1, Mar, p.S126-8. 2003.

Gonzalez, F. J. Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1. Mutat Res, v.569, n.1-2, Jan 6, p.101-10. 2005.

ICH - International Conference on Harmonization. ICH Harmonized Tripartite Guideline. Text on validation of analytical procedures. Q2A. International Conference on Harmonization. 27 october 1994, 1994. p.

\_\_\_\_\_. ICH Harmonized Tripartite Guideline. Text on validation of analytical procedures. Q2B. 27 october 1994, 1996. p.

Hubert, P., P. Chiap, *et al.* The SFSTP guide on the validation of chromatographic methods for drug bioanalysis: from the Washington Conference to the laboratory. Anal Chim Acta, v.391, n.2, May, p.138-48. 1999.

Jaeschke, H., G. J. Gores, *et al.* Mechanisms of hepatotoxicity. Toxicol Sci, v.65, n.2, Feb, p.166-76. 2002.

Jones, A. W. e M. Fransson. Blood analysis by headspace gas chromatography: does a deficient sample volume distort ethanol concentration? Med Sci Law, v.43, n.3, Jul, p.241-7. 2003.

Jordao, A. A., Jr., P. G. Chiarello, *et al.* Effect of an acute dose of ethanol on lipid peroxidation in rats: action of vitamin E. Food Chem Toxicol, v.42, n.3, Mar, p.459-64. 2004.

Kolb, B. Headspace sampling with capillary columns. J Chromatogr A, v.842, n.1-2, May, p.163-205. 1999.

Krishel, S., D. Safranek, *et al.* Intravenous vitamins for alcoholics in the emergency department: a review. J Emerg Med, v.16, n.3, May-Jun, p.419-24. 1998.

Lanças, F. M. Validação de métodos cromatográficos de análise. São Carlos: Rima Editora, v.6. 2004. 62 p. (Métodos cromatográficos de análise)

Lemos, C., I. Azevedo, *et al.* Effect of red wine on the intestinal absorption of thiamine and folate in the rat: comparison with the effect of ethanol alone. Alcohol Clin Exp Res, v.29, n.4, Apr, p.664-71. 2005.

Levitt, M. D., R. Li, *et al.* Use of measurements of ethanol absorption from stomach

and intestine to assess human ethanol metabolism. Am J Physiol, v.273, n.4 Pt 1, Oct, p.G951-7. 1997.

Levy, R., T. Elo, *et al.* Intravenous fructose treatment of acute alcohol intoxication. Effects on alcohol metabolism. Arch Intern Med, v.137, n.9, Sep, p.1175-7. 1977.

Lieber, C. S. Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. Clin Chim Acta, v.257, n.1, Jan 3, p.59-84. 1997.

\_\_\_\_\_. The discovery of the microsomal ethanol oxidizing system and its physiologic and pathologic role. Drug Metab Rev, v.36, n.3-4, Oct, p.511-29. 2004.

\_\_\_\_\_. Metabolism of alcohol. Clin Liver Dis, v.9, n.1, Feb, p.1-35. 2005.

Lisander, B., O. Lundvall, *et al.* Enhanced Rate of Ethanol Elimination from Blood after Intravenous Administration of Amino Acids Compared with Equicaloric Glucose. Alcohol Alcohol, Aug 8. 2005.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem, v.193, n.1, Nov, p.265-75. 1951.

Lukienko, P. I., N. G. Mel'nichenko, *et al.* Antioxidant properties of thiamine. Bull Exp Biol Med, v.130, n.9, Sep, p.874-6. 2000.

Macdonald, L., J. A. Kruse, *et al.* Lactic acidosis and acute ethanol intoxication. Am J

Emerg Med, v.12, n.1, Jan, p.32-5. 1994.

Maher, J. J. Exploring alcohol's effects on liver function. Alcohol Health Res World, v.21, n.1, p.5-12. 1997.

Martin, P. R., C. K. Singleton, *et al.* The role of thiamine deficiency in alcoholic brain disease. Alcohol Res Health, v.27, n.2, p.134-42. 2003.

Masalkar, P. D. e S. A. Abhang. Oxidative stress and antioxidant status in patients with alcoholic liver disease. Clin Chim Acta, v.355, n.1-2, May, p.61-5. 2005.

Masur, J., M. L. De Souza, *et al.* [Alcoholic intoxication and glucose. A double-blind study in emergency clinic patients]. AMB Rev Assoc Med Bras, v.28, n.7-8, Jul-Aug, p.168-71. 1982.

\_\_\_\_\_. Lack of effect of intravenous hypertonic glucose on the intensity of alcohol intoxication induced experimentally and observed in patients of an emergency room. Pharmacology, v.26, n.1, p.54-60. 1983.

Mckillop, I. H. e L. W. Schrum. Alcohol and liver cancer. Alcohol, v.35, n.3, Apr, p.195-203. 2005.

Musshoff, F. Chromatographic methods for the determination of markers of chronic and acute alcohol consumption. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, v.781, n.1-2, Dec 5, p.457-80. 2002.

Navasumrit, P., T. H. Ward, *et al.* Ethanol-induced free radicals and hepatic DNA strand breaks are prevented in vivo by antioxidants: effects of acute and chronic ethanol exposure. Carcinogenesis, v.21, n.1, Jan, p.93-9. 2000.

Obrenovich, M. E. e V. M. Monnier. Vitamin B1 blocks damage caused by hyperglycemia. Sci Aging Knowledge Environ, v.2003, n.10, Mar 12, p.PE6. 2003.

Parlesak, A., M. H. Billinger, *et al.* First-pass metabolism of ethanol in human beings: effect of intravenous infusion of fructose. Alcohol, v.34, n.2-3, Oct-Nov, p.121-5. 2004.

Pastino, G. M. e R. B. Conolly. Application of a physiologically based pharmacokinetic model to estimate the bioavailability of ethanol in male rats: distinction between gastric and hepatic pathways of metabolic clearance. Toxicol Sci, v.55, n.2, Jun, p.256-65. 2000.

Patel, V. B., S. Worrall, *et al.* Protein adduct species in muscle and liver of rats following acute ethanol administration. Alcohol Alcohol, v.40, n.6, Nov-Dec, p.485-93. 2005.

Portari, G. V., A. A. Jordao Junior, *et al.* Effect of beta-carotene supplementation on rats submitted to chronic ethanol ingestion. Drug Chem Toxicol, v.26, n.3, Aug, p.191-8. 2003.

Reed, D. J. Mitochondrial glutathione and chemically induced stress including ethanol. Drug Metab Rev, v.36, n.3-4, Oct, p.569-82. 2004.

Reeves, P. G., F. H. Nielsen, *et al.* AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. J Nutr, v.123, n.11, Nov, p.1939-51. 1993.

Rindi, G., C. Reggiani, *et al.* Effect of ethanol on the in vivo kinetics of thiamine phosphorylation and dephosphorylation in different organs of rat--II. Acute effects. Alcohol Alcohol, v.27, n.5, Sep, p.505-22. 1992.

Shangari, N., F. Depeint, *et al.* The effects of partial thiamin deficiency and oxidative stress (i.e., glyoxal and methylglyoxal) on the levels of alpha-oxoaldehyde plasma protein adducts in Fischer 344 rats. FEBS Lett, v.579, n.25, Oct 24, p.5596-602. 2005.

Singleton, C. K. e P. R. Martin. Molecular mechanisms of thiamine utilization. Curr Mol Med, v.1, n.2, May, p.197-207. 2001.

Stepuro, A. I., T. P. Piletskaya, *et al.* Role of thiamine thiol form in nitric oxide metabolism. Biochemistry (Mosc), v.70, n.3, Mar, p.339-49. 2005.

Stoyanovsky, D. A., D. Wu, *et al.* Interaction of 1-hydroxyethyl radical with glutathione, ascorbic acid and alpha-tocopherol. Free Radic Biol Med, v.24, n.1, Jan 1, p.132-8. 1998.

Tagliaro, F., G. Lubli, *et al.* Chromatographic methods for blood alcohol determination. J Chromatogr, v.580, n.1-2, Sep 16, p.161-90. 1992.

Takabe, M. e Y. Itokawa. An experimental study of thiamine metabolism in acute ethanol intoxication. Experientia, v.36, n.3, Mar 15, p.327-8. 1980.

\_\_\_\_\_. Participation of thiamin in hepatic microsomal ethanol oxidizing system. Int J Vitam Nutr Res, v.52, n.3, p.260-5. 1982.

\_\_\_\_\_. Thiamin depletion after ethanol and acetaldehyde administration to rabbits. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), v.29, n.5, Oct, p.509-14. 1983.

Tallaksen, C. M., A. Sande, *et al.* Kinetics of thiamin and thiamin phosphate esters in human blood, plasma and urine after 50 mg intravenously or orally. Eur J Clin Pharmacol, v.44, n.1, p.73-8. 1993.

Tuma, D. J. e C. A. Casey. Dangerous byproducts of alcohol breakdown--focus on adducts. Alcohol Res Health, v.27, n.4, p.285-90. 2003.

Wasfi, I. A., A. H. Al-Awadhi, *et al.* Rapid and sensitive static headspace gas chromatography-mass spectrometry method for the analysis of ethanol and abused inhalants in blood. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, v.799, n.2, Jan 25, p.331-6. 2004.

Watts, M. T. e O. L. McDonald. The effect of sodium chloride concentration, water content, and protein on the gas chromatographic headspace analysis of ethanol in plasma. Am J Clin Pathol, v.93, n.3, Mar, p.357-62. 1990.

Winek, C. L. e K. L. Murphy. The rate and kinetic order of ethanol elimination. Forensic Sci Int, v.25, n.3, Jul, p.159-66. 1984.

Wu, D. e A. I. Cederbaum. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. Alcohol Res Health, v.27, n.4, p.277-84. 2003.

\_\_\_\_\_. Oxidative stress mediated toxicity exerted by ethanol-inducible CYP2E1. Toxicol Appl Pharmacol, v.207, n.2 Suppl, Sep 1, p.70-6. 2005.

Yost, D. A. Acute care for alcohol intoxication. Be prepared to consider clinical dilemmas. Postgrad Med, v.112, n.6, Dec, p.14-6, 21-2, 25-6. 2002.

Zilly, M., P. Langmann, *et al.* Highly sensitive gas chromatographic determination of ethanol in human urine samples. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, v.798, n.2, Dec 25, p.179-86. 2003.

Zuba, D., A. Parczewski, *et al.* Optimization of solid-phase microextraction conditions for gas chromatographic determination of ethanol and other volatile compounds in blood. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, v.773, n.1, Jun 15, p.75-82. 2002.



**ANEXO**

