



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

“Investigação dos níveis de etanol em ar exalado, fluido oral e sangue capilar e correlação com efeitos cognitivos e psicomotores em indivíduos após o consumo de bebidas alcoólicas”.

Bruno Toledo Freitas

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

RIBEIRÃO PRETO - SP

2020

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Bruno Toledo Freitas

Investigação dos níveis de etanol em ar exalado, fluido oral e sangue capilar e correlação com efeitos cognitivos e psicomotores em indivíduos após o consumo de bebidas alcoólicas

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências, obtido no Programa de Pós-Graduação em Química

Orientador: Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis

Ribeirão Preto - SP

2020

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.

Freitas, Bruno Toledo

Investigação dos níveis de etanol em ar exalado, fluido oral e sangue capilar e correlação com efeitos cognitivos e psicomotores em indivíduos após o consumo de bebidas alcoólicas, 2020.

123 p.: il. ; 30 cm

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

Orientador: Martinis, Bruno Spinosa De.

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

Nome: Freitas, Bruno Toledo

Título: Investigação dos níveis de etanol em ar exalado, fluido oral e sangue capilar e correlação com efeitos cognitivos e psicomotores em indivíduos após o consumo de bebidas alcoólicas

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

“É necessário sempre acreditar que o sonho é possível
Que o céu é o limite e você, truta, é imbatível
Que o tempo ruim vai passar, é só uma fase
E o sofrimento alimenta mais a sua coragem”
A vida é desafio, Racionais Mc’s

“A vida é cheia de altos e baixos!”
Lucas Pigari

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a minha família por todo o suporte durante a minha formação, pelo carinho e pela compreensão por todos os longos meses que fiquei ausente. Gostaria de agradecer principalmente a minha mãe pelo esforço até mesmo nas situações mais difíceis. Mãe te amo!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis por ter me aceitado em seu grupo de pesquisa, por todo o conhecimento que me passou e por todos os bons momentos durante o decorrer deste projeto de mestrado.

A Polícia Militar Rodoviária que abraçou a nossa ideia e tão gentilmente concordou em nos ajudar com sua experiência supervisionando os testes e com dicas valiosas que foram fundamentais durante os experimentos. Gostaria de agradecer especialmente aos 2º SGT. Ronimar Canavez, CB Rodolpho Aparecido Abbad de Cayres, SD Leonardo José da Silva Júnior e SD Daniel Rodrigues de Carvalho por toda ajuda que nos forneceram.

A Autoescola Moré pela parceria e pela confiança em nosso projeto, assim como ao instrutor Olavo pela paciência de acompanhar os voluntários em todos os trajetos e garantindo a segurança dentro do veículo.

A guarda universitária, em especial aos Senhores Adilson e Alvaro por garantirem a segurança e o isolamento do local escolhido para a execução dos testes, assim como

A Prof. Dr^a Gleici da Silva Castro Perdoná por todo o suporte e colaboração nos auxiliando em todos as análises estatísticas deste projeto.

Aos amigos do laboratório que me acompanharam por todos esses anos, em especial ao Bruno Ruiz Brandão da Costa pela paciência e pelas inúmeras dicas que foram essenciais tanto nos detalhes experimentais deste projeto quanto durante a escrita da dissertação.

A Isabela Fernanda Maximiano pela companhia nos diversos cafezinhos, todos os lanchinhos, por todas as conversas e por todas as risadas

Ao meu grande amigo Bassam Bachou Junior com sua expertise me ajudou muito na elaboração de alguns gráficos que foram muito importantes para o andamento deste projeto.

A Amanda Beatriz Candelária da Silva e a Maria Luiza Guimaraes de Oliveira por todo o suporte com as análises dos dados genéticos.

E por fim, gostaria de agradecer a Universidade de São Paulo por todo o conhecimento que adquiri, por ter me acolhido e por ter sido a minha casa, por ter sido um lugar onde chorei, sorri e me tornei uma pessoa melhor. E onde foi possível um garoto da periferia alcançar o seu sonho: cursar uma faculdade!

Resumo

FREITAS, B. T. **Investigação dos níveis de etanol em ar exalado, fluido oral e sangue capilar e correlação com efeitos cognitivos e psicomotores em indivíduos após o consumo de bebidas alcoólicas.** 2020. 123 páginas. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

Introdução - Após validação de métodos analíticos, estudos de concentração plasmática de etanol ao longo do tempo e ancestralidade genética, foi avaliada a capacidade de dirigir um veículo em um circuito fechado após consumo de bebida alcoólica concomitante com o uso de celular. **Objetivo** - Conhecer a influência do desvio de atenção causada após o consumo de etanol quando associado ao uso do telefone celular enquanto dirige e empregar análises genéticas para tentar classificar o tipo de metabolismo de diversos indivíduos. **Método** - Realizar quantificação de etanol por métodos cromatográficos em amostras fluido oral e sangue, e em ar exalado utilizando o “Teste do Bafômetro” em grupo de 15 voluntários com material genético já sequenciado e avaliar a capacidade psicomotora após ingestão de doses de vodca proporcional ao peso corporal. **Resultado** - O método analítico validado foi capaz de realizar as quantificações de etanol tanto no fluido oral quanto no sangue, os gráficos de concentração plasmáticas ao longo do tempo foram utilizados como base para definir os intervalos ideais de coletas de 30 e 60 minutos após ingestão de bebida alcoólica. A embriaguez afetou o desempenho dos voluntários ao volante evidenciada pelas análises estatísticas principalmente como velocidade, tempo de percurso e distância de frenagem. **Conclusão** - O uso do celular ao volante durante a embriaguez contribuir fortemente para que surjam situações com potencial de gerar acidentes de trânsito como oscilações de velocidade, acelerações ou frenagens bruscas, além de reduzir ainda mais a capacidade de atenção dos motoristas.

Palavras-chave: Bebida alcoólica. Condução veicular. Telefone celular. Sangue. Fluido Oral. Cromatografia. Ar exalado. Etilômetro.

Abstract

FREITAS, B. T. **Investigation of ethanol levels in exhaled air, oral fluid and capillary blood and correlation with cognitive and psychomotor effects in individuals after alcohol consumption.** 2020. 123 pages. Dissertation (Master's Degree) - Faculty of Philosophy, Sciences and Letters at Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

Objective - To know the influence of the diversion of attention caused after the consumption of ethanol when associated with the use of the cell phone while driving and to use genetic analyzes to try to classify the type of metabolism of several individuals. **Method** - Perform ethanol quantification by chromatographic methods in oral fluid and blood samples, and in exhaled air using the "Breathalyzer Test" in a group of 15 volunteers with genetic material already sequenced and assess psychomotor capacity after ingesting doses of vodka proportional to body weight. **Result** - The validated analytical method was able to perform the quantifications of ethanol in both oral fluid and blood, the plasma concentration graphs over time were used as a basis to define the ideal collection intervals of 30 and 60 minutes after drinking alcohol. Drunkenness affected the performance of volunteers behind the wheel, as evidenced by statistical analysis, mainly as speed, travel time and braking distance. **Conclusion** - The use of mobile at the wheel while drunk contribute strongly to situations that arise with the potential to generate traffic accidents as speed fluctuations, sudden acceleration or braking, and further reduce the attention span of the drivers.

Keywords Alcohol drink. Driving. Cell phone. Blood. Oral Fluid. Driving. Driving. Breathalyzer.

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura química do etanol

Figura 2. Curva de alcoolemia. Adaptado de Calabuig, 1992 e Weafer & Fillmore, 2012.

Figura 3. Reações de oxidação do etanol catalisadas por enzimas. Traduzido e adaptado de NIAA, 2007.

Figura 4. Representação do neuroreceptor GABA. Adaptado de Barbalho, 2007.

Figura 5. Representação esquemática da coleta de fluido oral utilizando Salivete®. Adaptado de Bueno (2014)

Figura 6. Estrutura do cabelo e a incorporação de drogas e metabólitos em sua matriz. Adaptado de Gordo (2013) e Borgo (2016).

Figura 7. Reação de formação do EtG e outros biomarcadores a partir do etanol. Adaptado de Wabuye (2018).

Figura 8. Percurso montado para a execução do experimento

Figura 09. Procedimento de coleta da amostra de cabelo e armazenamento dos fios em um invólucro de papel. Adaptado de Dinis (2010).

Figura 10. Sobreposição do cromatograma da solução fortificada (registro em preto) com o cromatograma de uma solução de fluido oral isentas de etanol (registro em verde), não existe nenhum pico presente no “pool” fluido oral não fortificado que interfira na determinação do etanol.

Figura 11. Gráfico da curva analítica obtido a partir das análises de amostras de fluido oral fortificadas com solução padrão de etanol.

Figura 12. Gráfico de resíduos obtido a partir das análises de amostras de fluido oral fortificadas.

Figura 13. Sobreposição dos cromatogramas obtidos a partir da solução de fluido oral fortificada com $0,20 \text{ g.L}^{-1}$ de etanol, a análise intra-ensaio do primeiro dia está representada pela linha preta, a análise inter-ensaio do segundo dia pela cor vermelha e a análise inter-ensaio o do terceiro dia pela cor azul.

Figura 14. Cromatograma obtido após a análise de fluido oral fortificado com $0,004 \text{ g.L}^{-1}$ de etanol

Figura 15. Cromatograma obtido após a análise de fluido oral fortificado com $1,25 \text{ g.L}^{-1}$ de etanol

Figura 16. Sobreposição dos cromatogramas de estabilidade de curta duração e de pós-processamento (12 e 24 h) para a solução fortificada com $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ de etanol. A linha preta corresponde a análise da estabilidade de curta duração, a linha vermelha e a linha verde, corresponde a análise da estabilidade pós-processamento de 12 h e 24 h, respectivamente.

Figura 17. Sobreposição dos cromatogramas de estabilidade de curta duração e de pós-processamento (12 e 24 h) para a solução fortificada com $1,25 \text{ g.L}^{-1}$ de etanol. A linha preta

corresponde a análise da estabilidade de curta duração, a linha vermelha e a linha verde, corresponde a análise da estabilidade pós-processamento de 12 h e 24h, respectivamente.

Figura 18. Sobreposição do cromatograma de sangue fortificada com solução de etanol $0,20 \text{ g.L}^{-1}$ (registro em preto) com o cromatograma de uma solução de sangue isento de etanol (registro em verde), não existe nenhum pico presente no sangue não fortificado que interfira na determinação do etanol.

Figura 19. Gráfico da curva analítica obtido a partir das análises de amostras de sangue fortificadas com solução padrão de etanol

Figura 23. Cromatograma obtido após a análise de sangue fortificado com $0,004 \text{ g.L}^{-1}$ de etanol a partir das análises de amostras de sangue fortificadas com solução padrão de etanol.

Figura 20. Gráfico de resíduos obtido a partir das análises de amostras de sangue fortificado

Figura 21. Sobreposição dos cromatogramas nas análises intra-ensaio e inter-ensaio obtidos a partir da solução de sangue fortificado com $0,20 \text{ g.L}^{-1}$ de etanol, análise intra-ensaio está representada pela linha preta, a análise inter-ensaio do segundo dia pela cor rosa e a análise inter-ensaio o do terceiro dia pela cor vermelha

Figura 22. Cromatograma obtido após a análise de sangue fortificado com $0,004 \text{ g.L}^{-1}$ de etanol

Figura 23. Cromatograma obtido após a análise de sangue fortificado com $0,004 \text{ g.L}^{-1}$ de etanol

Figura 24. Sobreposição dos cromatogramas de estabilidade de curta duração e de pós-processamento (12 e 24 h) para a solução fortificada com $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ de etanol. A linha preta corresponde a análise da estabilidade de curta duração, a linha vermelha e a linha verde, corresponde a análise da estabilidade pós-processamento de 12 h e 24 h, respectivamente

Figura 25. Sobreposição dos cromatogramas de estabilidade de curta duração e de pós-processamento (12 e 24 h) para a solução fortificada com $1,25 \text{ g.L}^{-1}$ de etanol. A linha preta corresponde a análise da estabilidade de curta duração, a linha vermelha e a linha verde, corresponde a análise da estabilidade pós-processamento de 12 h e 24 h, respectivamente.

Figura 25. Concentração de etanol em função do tempo nas amostras de sangue de todos os voluntários

Figura 26. Concentração de etanol em função do tempo nas amostras de fluido oral de todos os voluntários

Figura 27. Concentração de etanol no sangue e concentração de etanol em fluido oral em função do tempo de todos os voluntários

Figura 28. Concentração de etanol em função do tempo nas amostras de sangue de todos os voluntários masculinos

Figura 29. Concentração de etanol em função do tempo nas amostras de fluido oral de todos os voluntários masculinos.

Figura 30. Concentração de etanol no sangue e concentração de etanol em fluido oral em função do tempo de todos os voluntários masculinos

Figura 31. Concentração de etanol em função do tempo nas amostras de sangue de todos os voluntários femininos

Figura 32. Concentração de etanol em função do tempo nas amostras de fluido oral de todos os voluntários femininos

Figura 33. Concentração de etanol no sangue e concentração de etanol em fluido oral em função do tempo de todos os voluntários femininos

Figura 34. Gráfico apresentando as informações de ancestralidade para cada indivíduo

Figura 35. Gráfico da distribuição dos genótipos para cada SNP

Figura 36. Gráfico de correlação entre as quantificações de álcool em sangue e a quantificação em fluido oral para os voluntários do sexo feminino (esquerda) e masculino (direita)

Figura 37. Gráfico de correlação entre as quantificações do etilômetro do laboratório e a quantificação em fluido oral para os voluntários do sexo feminino (esquerda) e para os voluntários masculino (direita)

Lista de Tabelas

Tabela 1. Mortes em acidentes de trânsito relacionados ao álcool (WHO, 2014)

Tabela 2. Valores de alcoolemia permitidos de acordo com a legislação de diferentes países. Adaptado de “Global Health Observatory Data Repository (WHO, 2018).

Tabela 3. Diferenças e similares entre as legislações de trânsito dos Estados Unidos e do Brasil. Adaptado de Bruni e Mozayani (2020).

Tabela 4. Valores de alcoolemia e os respectivos sinais clínicos. Adaptado de (OGA, 2008; FRANÇA, 2012; REIS et al, 2014)

Tabela 5. Gradiente de fase móvel utilizada durante as análises

Tabela 6. Relação m/z monitorada para as amostras de cabelo

Tabela 7. Valores de área das regiões próximas ao tempo de retenção do etanol e do álcool isoamílico (padrão interno) obtidos a partir das análises de amostras de branco de fluido oral

Tabela 8. Valores de área obtidos a partir das análises de amostras de fluido oral fortificadas com solução padrão de etanol

Tabela 9. Cálculos da razão sinal ruído para determinar o Limite de Detecção (LD) do fluido oral.

Tabela 10. Cálculos da razão sinal ruído para determinar o Limite de Quantificação (LQ) do fluido oral.

Tabela 11. Cálculos da curva analítica do fluido oral

Tabela 12. Valores de área do fluido oral fortificado com 0,20 g.L⁻¹ de solução padrão de etanol.

Tabela 13. Cálculos do desvio padrão relativo (DPR) da precisão para o fluido oral.

Tabela 14. Valores de área do fluido oral fortificado com 0,20 g.L⁻¹ de solução padrão de etanol.

Tabela 15. Cálculos do erro padrão relativo (EPR%) da exatidão para o fluido oral.

Tabela 16. Valores de área obtidos com as análises do Efeito Residual nas amostras de fluido oral

Tabela 17. DPR calculado para o ensaio de estabilidade 06 horas de fluido oral

Tabela 18. Valores de Desvio Padrão Relativo para a estabilidade de curta duração (06 horas) e para estabilidade de pós-processamento (12 e 24 horas) das amostras de fluido oral.

Tabela 19. Valores de Desvio Padrão Relativo para a estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento após 24, 48, 72 horas e após 7 e 30 dias das amostras de fluido oral.

Tabela 20. Valores de área das regiões próximas ao tempo de retenção do etanol e do álcool isoamílico (PI) obtidos a partir das análises de amostras de branco de sangue.

Tabela 21. Valores de área obtidos a partir das análises de amostras de branco fortificados com solução padrão de etanol

Tabela 22. Cálculos da razão sinal ruído para determinar o Limite de Detecção (LD) do sangue.

Tabela 23. Cálculos da razão sinal ruído para determinar o Limite de Quantificação (LQ) do sangue.

Tabela 24. Cálculos da curva analítica do sangue.

Tabela 25. Valores de área do sangue fortificado com 0,20 g.L⁻¹ de solução padrão de etanol.

Tabela 26. Cálculos do desvio padrão relativo (DPR) da precisão para o sangue.

Tabela 27. Valores de área do sangue fortificado com $0,20 \text{ g.L}^{-1}$ de solução padrão de etanol.

Tabela 28. Cálculos do erro padrão relativo (EPR%) da exatidão para o fluido oral.

Tabela 29. Valores de área obtidos com as análises do Efeito Residual nas amostras de sangue

Tabela 30. DPR calculado para o ensaio de estabilidade 06 horas de sangue

Tabela 31. Valores de Desvio Padrão Relativo para a estabilidade de curta duração (06 horas) e para estabilidade de pós-processamento (12 e 24 horas) das amostras.

Tabela 32. Valores de Desvio Padrão Relativo para a estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento após 24, 48, 72 horas e após 7 e 30 dias das amostras de sangue.

Tabela 33. Concentração média de etanol em sangue após ingestão de vodca, onde o volume ingerido por voluntário é equivalente a 0,5g de etanol por quilograma de massa corpórea.

Tabela 34. Concentração média de etanol em fluido oral após ingestão de vodca, onde o volume ingerido por voluntário é equivalente a 0,5g de etanol por quilograma de massa corpórea.

Tabela 35. Concentração média de etanol encontradas em sangue após ingestão de vodca nos voluntários masculinos

Tabela 36. Concentração média de etanol encontradas em fluido oral após ingestão de vodca nos voluntários masculinos

Tabela 37. Concentração média de etanol encontradas em sangue após ingestão de vodca nos voluntários femininos

Tabela 38. Concentração média de etanol encontradas em fluido oral após ingestão de vodca nos voluntários femininos

Tabela 39. Informações coletadas dos voluntários e resultado da análise de EtG

Tabela 40. Análise de ancestralidade de todos os voluntários.

Tabela 41. Relação dos SNPs contemplados pelo sequenciamento e as respectivas técnicas de sequenciamento utilizada

Tabela 42. Frequências genotípicas calculadas para cada SNP

Tabela 43. Valores médios das quantificações dos níveis de etanol obtido durante o experimento

Tabela 44. Velocidade média por percurso (em km/h) para todos os voluntários nos trajetos 1 e 2

Tabela 45. Tempo médio de percurso (em segundos) para todos os voluntários nos trajetos 01 e 02

Tabela 46. Distância média de frenagem por percurso (em metros) para todos os voluntários nos trajetos 1 e 2

Tabela 47. Resultados dos coeficientes das retas ajustadas para o intervalo de coleta de 30 minutos

Tabela 48. Resultados dos coeficientes das retas ajustadas para o intervalo de coleta de 60 minutos

Lista de Abreviaturas

- ADH** – Álcool Desidrogenase
- ALDH** – Aldeído Desidrogenas
- ALT** – Alanina Aminotransferase
- ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- AST** – Aspartato Amino Transferase
- CEP-FFCLRP-USP** – Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo
- CID** – Classificação Internacional de Doenças
- CMD** – Concentração Média Determinada
- CME** – Concentração Média Experimental
- CR** – Concentração Real
- CTB** – Código de Trânsito Brasileiro
- DNA** – Ácido Desoxirribonucleico
- DP** – Desvio Padrão
- DPR** – Desvio Padrão Relativo
- EPR** – Erro Padrão Relativo
- EtG** – Etilglicuronídeo
- EtS** – Etilsulfato
- ESALQ** – Escola Superior de Agronomia Luís de Queiroz
- FAAE** – Fatty Acid Ethyl Esters
- FID** – Flame Ionization Detector
- GABA** – Ácido Gama-Aminobutírico
- GC** – Gas Chromatography
- GGT** - Gama-Glutamiltransferase
- GWAS** - Genome Wide Association Studies
- HCFMRP-USP** – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
- HS** – Headspace
- IMC** – Índice de Massa Corporal
- LC-MS** – Liquid Chromatography-mass espectrômetro
- LD** – Limite de Detecção
- LPFG** – Laboratório de Pesquisas Forenses e Genética
- LQ** – Limite de Quantificação
- NAD** - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
- NGS** – Next Generation Sequencing

NMDA - N-metil-D-aspartato

NPD – Nitrogen Phosphorus Detector

ONU – Organização das Nações Unidas

PCR – Polymerase Chain Reaction

Peth – Phosphatidyl Ethanol

pH – Potencial Hidrogeniônico

PI – Padrão Interno

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

SMOE – Sistema Microssomal de Oxidação do Etanol

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – Single Nucleotide Polymorphism

TDC – Transferrina Deficiente de Carboidrato

TR – Tempo de Reação

t_R - Tempo de Retenção

VCM – Volume Corpuscular Medio

WHO – World Health Organization

Sumário

1. Introdução	18
1.1. Acidentes de Trânsito	18
1.2. Álcool e acidentes de trânsito	19
1.3. Legislação de Trânsito	20
1.4. Propriedades físico-químicas do etanol e a composição das bebidas alcoólicas	233
1.5. Toxico cinética do Etanol	244
1.6. Efeitos do álcool no organismo	2727
1.7. Amostras Biológicas	300
1.7.1. Sangue	300
1.7.2. Fluido Oral	311
1.7.3. Ar exalado	33
1.7.4. Cabelo	34
1.7.5. Marcadores Biológicos do Consumo de Etanol	35
1.7.6. Etil Glicuronídeo	37
1.8. Validação de métodos	38
1.8.1. Seletividade	38
1.8.2. Limite de detecção (LD)	38
1.8.3. Limite de quantificação (LQ)	38
1.8.4. Linearidade	38
1.8.5. Precisão	39
1.8.6. Exatidão	39
1.8.7. Efeito Residual ou <i>carry over</i>	39
1.8.8. Estabilidade	400
2. Objetivo	411
2.1. Objetivo Geral	41
2.2. Objetivos Específicos	41
3. Materiais e Métodos	42
3.1. Aspectos Éticos da Pesquisa	42
3.2. Materiais	42
3.3. Soluções	43
3.3.1. Soluções Padrão	43
3.3.2. Solução de Padrão Interno	43

3.3.3.	Condições instrumentais da análise cromatográfica	43
3.4.	Curva de Metabolização do Etanol	43
3.5.	Procedimento Experimentais de Coleta e Aplicação do Teste Psicomotor.....	44
3.6.	Condições Instrumentais	47
3.7.	Validação de Método.....	48
3.7.1.	Seletividade.....	48
3.7.2.	Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)	48
3.7.3.	Linearidade.....	48
3.7.4.	Precisão	48
3.7.5.	Exatidão	49
3.7.6.	Efeito Residual.....	49
3.7.7.	Estabilidade (Curta duração, pós-processamento e longa duração).....	49
3.8.	Sequenciamento e Análises genéticas	50
3.9.	Análises Estatísticas	51
4.	Resultados e Discussão.....	533
4.1.	Validação.....	533
4.1.1.	Fluido oral.....	533
4.1.1.1.	Seletividade.....	533
4.1.1.2.	Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)	54
4.1.1.3.	Linearidade	56
4.1.1.4.	Precisão	588
4.1.1.5.	Exatidão	59
4.1.1.6.	Efeito Residual.....	611
4.1.1.7.	Estabilidade.....	622
4.1.2.	Sangue.....	655
4.1.2.1.	Seletividade.....	655
4.1.2.2.	Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)	666
4.1.2.3.	Linearidade	677
4.1.2.4.	Precisão.....	69
4.1.2.5.	Exatidão	711
4.1.2.6.	Efeito Residual.....	722
4.1.2.7.	Estabilidade.....	733
4.2.	Curva de Metabolização.....	76

4.3. Quantificação de EtG em amostras de cabelo	888
4.4. Avaliações Genéticas	900
4.4.1. Ancestralidade Genética	900
4.4.2. Avaliação Genética do Metabolismo do etanol e Associação Genotípica.....	92
4.5. Avaliação Psicomotora através de Análises Estatísticas	95
5. Conclusão	1033
Referências.....	1055
Anexos	116
Anexo 01 – Temo de Consentimento Livre e Esclarecido	1166
Anexo 02 – Tabela para coleta de dados	118
Anexo 03 – Tabelas com os dados obtidos após análise de amostras de sangue e de fluido oral para o experimento da curva de metabolização.....	120
Anexo 04	122

1. Introdução

1.1. Acidentes de Trânsito

Como consequência do avanço científico e a crescente necessidade de locomoção, o transporte ganha cada vez mais importância. O carro tornou-se um objeto de desejo, visto como um símbolo de *status* social devido a influências de propagandas nas mais diversas mídias (BASTOS, ANDRADE, SOARES, 2005). Tal influência causa um aumento na frota veicular que associado a imprudência, imperícia, negligência do motorista, sinalização precária, má conservação das vias e condução de veículos sob efeitos do álcool levam um a problema de causa social e econômica: os acidentes de trânsito (SOUZA, 2005).

Já é bem conhecido o quão prejudicial a combinação de álcool e direção pode ser. Isso ocorre devido à complexidade cognitiva necessária para a condução de um veículo, a velocidade na capacidade de tomada de decisões e o tempo de reação do motorista. É neste contexto que se insere o crescente interesse em informações cada vez mais específicas sobre como o álcool reduz a habilidade de dirigir agravado pelo aumento da autoconfiança, excesso de velocidade e desrespeito a sinalização viária (FILMORE et al, 2008; WEAFFER & FILLMORE, 2012).

Os acidentes de trânsito são considerados como um grande problema de saúde pública em diversos países, incluindo o Brasil. De acordo com o Plano Global para a Segurança Rodoviária da ONU, de 2011 a 2020, anualmente cerca de 1,3 milhão de pessoas morrem por ano, em consequência de acidentes de trânsito, sendo que mais da metade dessas vítimas não se encontravam dentro dos veículos no instante do acidente (ONU, 2011).

Com relação as estatísticas à nível global, temos que 77% de todas as mortes causadas por acidentes de trânsito atingem principalmente a população jovem masculina. Para uma faixa etária de 15 a 29 anos de idade, esses acidentes representam a principal causa de óbitos, enquanto que para a população masculina de 30 a 49 anos é a 3ª maior causa (WHO, 2013).

No período de 1980 a 2011, cerca de 500 mil pessoas morreram em decorrência de acidentes de trânsito, o que classificou o Brasil como um dos países com a maior mortalidade no trânsito com cerca de 43 mil pessoas por ano, sendo precedido somente pela Índia, China, Estados Unidos e Rússia (ABREU, 2018; DATASUS, 2012; WHO, 2013). O elevado número de mortes e de feridos em acidentes causam forte impacto sobre os orçamentos públicos, inclusive na renda das famílias afetadas (IPEA, 2015).

Devido ao alarmante número de acidentes, em 2018, a prefeitura da cidade de São Paulo lançou o site Vida Segura, no qual é possível encontrar informações sobre o número de acidentes de

trânsito nos últimos anos. No ano de 2015 foram registrados 20.254 acidentes, causando uma perda econômica de 1,075 bilhão à capital paulista (São Paulo, 2019). Em meio às elevadas taxas de acidentes, existem evidências que a existência de legislação mais rigorosa e também maiores punições, são fatores determinantes para que haja uma real diminuição de acidentes (MINAYO, 1997). Exemplos deste tipo de intervenções podem ser vistas em países como Japão, Irã e Inglaterra, onde os principais focos foram a redução do número de morte através do controle rigoroso de velocidade, redução do consumo de álcool, incentivo ao uso de cinto de segurança e de capacete (NAKAHARA, 2013; BAHADORIMONFARED, 2013; HAOJIE, 2013).

1.2. Álcool e acidentes de trânsito

O Relatório Global sobre Álcool e Saúde publicado pela Organização Mundial da Saúde consta em 2012 que 15% das mortes em acidentes de trânsito estão relacionadas com o consumo de álcool (WHO, 2014). Neste mesmo estudo, estima-se que no Brasil, de todos os acidentes envolvendo consumo de álcool, 18% dos acidentais fatais foram atribuídos aos homens e 5,2% às mulheres, ao comparar essas informações com dados obtidos de outros países fica evidente a necessidade de campanhas conscientização para que motoristas não consumam bebidas alcoólicas antes de dirigir. A Tabela 1 mostra essa relação em diversos países.

Tabela 1. Mortes em acidentes de trânsito relacionados ao álcool (WHO, 2014) *

País	Número Total de Mortes em acidentes de trânsito a cada 100 mil habitantes		Envolvendo uso de álcool (%)	
	Homens	Mulheres	Homens	Mulheres
Argentina	26,4	7,6	12,5	4,3
Brasil	52,5	11,3	18	5,2
EUA	18,6	7	12,4	4,2
Canadá	11	4	13,8	4,8
China	30,5	15,6	22,2	4,4
Itália	13	2,8	3,9	1,5

*adaptado de WHO, 2014

Segundo o levantamento de dados obtidos pelo Ministério da Saúde em 2016, 7,3% dos indivíduos adultos da população das principais capitais brasileiras afirmaram que dirigem após o consumo de álcool (VIGITEL, 2017). Observando a população de estudantes universitários, essa porcentagem é representativamente maior, segundo o Levantamento Nacional sobre o Uso de Álcool,

Tabaco e Outras Drogas entre Universitários de 27 Capitais Brasileiras, de um total de 10.106 entrevistados, 18% afirmaram que já dirigiram sob efeito de álcool e 27% já pegaram carona com motoristas alcoolizados (BRASIL, 2010).

Os motoristas que associam comportamentos inseguros, como beber e dirigir, estão mais propensos a causarem acidentes de trânsito, além de demonstrarem tendência de não reconhecer a própria responsabilidade em tais ocorrências (BRASIL, 2010). Dentre os comportamentos mais relacionados com a ocorrência de acidentes, são a falta de atenção (59,3%), o desrespeito a sinalização (33,5%) e abuso do limite de velocidade (22,5%) (ANDRADE *et al.*, 2003).

Com este panorama, visando uma redução dos acidentes em estradas e rodovias, uma das formas que o governo brasileiro encontrou para controlar o consumo de álcool pelos motoristas foi através de legislações mais rigorosas no Código de Trânsito Brasileiro (CTB), no qual estão estabelecidas as atribuições dos órgãos ligados ao trânsito, assim como suas penalidades.

1.3. Legislação de Trânsito

O Código de Trânsito Brasileiro (CTB) foi instituído através da Lei nº 9503/97, onde se encontram as atribuições dos diversos órgãos ligados ao trânsito, assim como todas as definições legais e as punições aplicáveis às diversas infrações. Além disso, nesta Lei, definia como infração gravíssima dirigir sob influência de seis decigramas de álcool por litro de sangue (BRASIL, 1997).

Devido à clara tendência do risco de acidentes de trânsito causados por condutores alcoolizados (JORGE, 2013), em 2008, o Brasil começou a adotar uma legislação de trânsito mais rígida, a qual passou a ser conhecida popularmente como “Lei Seca”. Nesta lei, constava-se que motoristas que fossem flagrados, através do teste do etilômetro (bafômetro), com mais de 0,1 miligramas de álcool por litro de ar exalado seriam multados. Nesta redação, também era definido como crime os casos nos quais os motoristas apresentassem níveis de álcool igual ou superior a 0,34 mg/L no etilômetro (BRASIL, 2008).

Em 2013, ocorreu uma reformulação da “Lei Seca”, passando a vigorar a tolerância zero para álcool no organismo, entretanto, não ocorreram alterações nos níveis de álcool considerados como crime, continuando a valer, para este quesito, a redação de 2008 (Brasil, 2012).

Visando uma redução no percentual de acidentes de trânsito, diversos países também reduziram drasticamente para zero a quantidade de álcool no sangue permitido para dirigir (OTERO, 2017). A Tabela 2 apresenta, brevemente, os limites da concentração de álcool em sangue permitida pela legislação de cada país no ano de 2016, em alguns deles o valor permitido varia conforme as categorias de motoristas.

Tabela 2. Valores de alcoolemia permitidos de acordo com a legislação de diferentes países. Adaptado de “Global Health Observatory Data Repository (WHO, 2018).

País	População Geral (%m/v)	Motoristas Jovens (%m/v)	Motoristas Comerciais/Profissionais (%m/v)
Argentina	0,05%	0,05%	0,02%
Austrália	0,05%	Tolerância Zero	0,02%
Brasil	Tolerância Zero	Tolerância Zero	Tolerância Zero
Canadá	0,08%	0,08%	0,08%
Chile	0,03%	0,03%	0,03%
EUA	0,08%	Sub-nacional	0,04%
Finlândia	0,05%	0,05%	0,05%
França	0,05%	0,02%	0,02%
Alemanha	0,05%	Tolerância Zero	Tolerância Zero
Irã	Tolerância Zero	Tolerância Zero	Tolerância Zero
Japão	0,03%	0,03%	0,03%

*Subnacional: cada estado norte-americano apresenta valores de alcoolemia diferentes

Em um recente estudo realizado por Bruni e Mozayani (2020), onde realizaram comparações das estruturas institucionais e legislações relacionadas a dirigir sob efeito do álcool. Devido a autonomia de cada estado norte-americano, existem algumas variações na legislação, mas de forma geral, considera-se que um indivíduo apresenta intoxicação aguda por álcool quando apresenta uma concentração de álcool em sangue igual ou superior a 0,08%, equivalente a 0,08 g.dL⁻¹, no Brasil o indivíduo que apresentasse essa mesma concentração seria enquadrado como crime.

A Tabela 3 apresenta de forma simplificadas algumas similares e diferenças entre as legislações dos EUA e do Brasil.

Tabela 3. Diferenças e similares entre as legislações de trânsito dos Estados Unidos e do Brasil.

Adaptado de Bruni e Mozayani (2020).

	EUA	Brasil
Similaridades	<ul style="list-style-type: none"> Nos dois países existem punições devido a recusa ao teste do etilômetro; A constatação de embriaguez durante averiguação policial é considerada como evidência legal. 	
Aspectos Institucionais	<ul style="list-style-type: none"> dirigir embriagado é principalmente uma ofensa estadual; Em nível federal: somente é considerado crime se ocorrer em propriedade federal. 	<ul style="list-style-type: none"> Legislação única: Lei 9.305/1997; Vigência em todo território nacional, sem diferenciação entre estados.
Definições Legais	<ul style="list-style-type: none"> Existem diferenciações de acordo com o estado entre os termos dirigir sob influência de álcool e dirigir embriagado. 	<ul style="list-style-type: none"> Não existe nenhuma diferenciação.
Concentração de Álcool em Sangue	<ul style="list-style-type: none"> Em todos os estados considera-se embriagado quem apresentar valores de concentração de álcool no sangue igual ou superior a $0,08 \text{ gDL}^{-1}$ 	<ul style="list-style-type: none"> Nenhuma concentração é permitida
Condutas Ilegais	<ul style="list-style-type: none"> Varia conforme o estado. 	<ul style="list-style-type: none"> Existe contravenção penal se qualquer quantidade for detectada pelo etilômetro; Considera-se crime se for quantificado $0,6 \text{ gL}^{-1}$ de álcool no sangue ou $0,3 \text{ mg. L}^{-1}$ no etilômetro.
Penalidades	<ul style="list-style-type: none"> Varia conforme o estado. 	<ul style="list-style-type: none"> Suspensão da habilitação por 12 meses; Prisão
Teste de Drogas	<ul style="list-style-type: none"> O teste é diferente em cada estado e existem diferenças entre algumas regiões dentro de um mesmo estado; Existem situações onde nenhuma droga é testado se o motorista apresentar resultado superior a $0,08 \text{ mg. L}^{-1}$ no etilômetro. 	<ul style="list-style-type: none"> Segundo o Conselho Nacional de Trânsito Testes psicomotores; Álcool: exames de sangue ou etilômetros; Exames laboratoriais para avaliar outras drogas.

Podemos observar que existem diferenças entre as duas legislações nos aspectos institucionais e na definição legal, assim como as punições aplicadas aos infratores, o que reflete principalmente os aspectos culturais entre países. Fica evidente que o Brasil tem uma grande preocupação com os altos índices de acidente no trânsito e está empenhado em combater através de uma legislação mais rígida, o caminho a ser percorrido ainda é longo, mas se forem observados dados mais recentes, como o apresentado pela Plataforma “Vida Segura”, espera-se que nos próximos anos a tendência nos números de acidentes se reduzam.

1.4. Propriedades físico-químicas do etanol e a composição das bebidas alcoólicas

O etanol é também conhecido como álcool etílico, trata-se de um composto orgânico da classe dos álcoois de fórmula C_2H_6O (ou CH_3CH_2OH) e massa molecular de $46,07 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Trata-se de um álcool primário com um grupo hidroxila (-OH) ligado covalentemente a um átomo de carbono em sua extremidade, conferindo a essa estrutura característica polar e muito solúvel em água, devido à capacidade de interagirem entre si por meio de ligações de hidrogênio. Apresenta-se na forma de líquido incolor, volátil e de odor característico de álcool, pH igual a 7,0 pKa de 16,8 e densidade de $0,790 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ à $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Possui temperatura de fusão de $-112 \text{ }^\circ\text{C}$ e temperatura de ebulição de $78,3 \text{ }^\circ\text{C}$. É altamente miscível com a água (ATKINS, 2012; CONSTATINO, 2005; FISPQ, 2019).

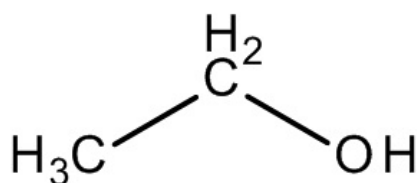


Figura 1. Estrutura química do etanol

Durante o processo de produção de bebidas alcoólicas, diversos compostos sofrem fermentação, dos quais se destacam os aldeídos, álcoois, ésteres e ácidos. A maioria dessas substâncias são consideradas como componentes secundários, apresentam-se em concentrações abaixo de 0,5%, estão diretamente ligados ao aroma e sabor, além de serem fundamentais para a qualidade da bebida (Brasil, 1994; ALCARDE *et al.*, 2012).

As bebidas alcoólicas podem ser classificadas em três categorias: bebidas fermentadas, bebidas destiladas e bebidas alcoolizadas (ARBENS, 1988; XAVIER, 1998). As bebidas fermentadas, como a cerveja e o vinho, são bebidas obtidas após o processo de fermentação natural de substâncias como o amido e os açúcares, geralmente apresentam baixo teor alcoólico (FRANÇA, 2012; CROCE, 2012).

Já as bebidas destiladas são obtidas através da destilação das bebidas fermentadas, e apresentam uma gradação alcoólica maior quando comparadas a estas, alcançando até 60% de álcool em sua composição. A cachaça, a vodca e o uísque são exemplos de destilados (CROCE, 2012).

E, em relação as bebidas alcoolizadas, essas são obtidas através da adição artificial de álcool a uma bebida que sofreu fermentação natural, ou seja, trata-se da mistura de dois líquidos alcoólicos. Apresentam diferentes teores dependendo da adição artificial de álcool, de forma geral possuem gradação elevada. Os licores, o vinho do Porto e o vinho Madeira, são exemplos de bebidas alcoolizadas (ARBENZ, 1988).

1.5. Toxicocinética do Etanol

O álcool é a substância de maior destaque em análises toxicológicas forenses devido ao fato de que indivíduos embriagados estão mais propensos a causarem acidentes fatais (Kassenbech et al, 2011). O consumo de álcool está diretamente relacionado a danos em diversos órgãos, com destaque principalmente para o fígado e para o cérebro, visto que a maior parte dos efeitos agudos está associado ao Sistema Nervoso Central (SNC), induzindo o indivíduo a diversas mudanças comportamentais que podem ser relacionadas com os níveis de alcoolemia (RIBEIRO, GAIVÃO, 2010)

Primeiramente é importante fazer algumas distinções entre alguns termos recorrentes como: embriaguez alcoólica e alcoolemia. A embriaguez alcoólica é definida como intoxicação aguda devido ao consumo de bebidas alcoólicas por um indivíduo. Enquanto que a alcoolemia é a dosagem da quantidade de álcool consumido, seus resultados são apresentados na forma de gramas de etanol por litro de sangue (FRANÇA, 2012).

Após a ingestão, o etanol fica pouco tempo em contato com a cavidade oral, passando em seguida pela orofaringe, esôfago, para então alcançar o estômago. Cerca de 20% do volume total sofre absorção pelo estômago e os 80% restantes são absorvidos ao chegar ao intestino delgado. Ao entrar em contato com a via digestiva, o álcool atinge a corrente sanguínea por meio do processo de difusão e logo em seguida, é distribuído aos demais tecidos (JUNIOR, 1998; FRANÇA, 2012; DORTA *et al*, 2018).

Vale ressaltar que existem outras formas de introdução do etanol no organismo, porém são menos comuns, tais como: através das vias aéreas superiores por inalação decorrente de infortúnios do trabalho; endovenosa em casos de medidas terapêuticas ou anestésicas; absorção cutânea e absorção retal (CALABUIG,1992).

Ao alcançar o intestino delgado, a absorção do etanol é rápida, a taxa com que isso ocorre é independente da concentração da bebida e da presença de alimentos. Essa relação não se aplica a absorção pelo estômago, pois a presença (ou ausência) de conteúdo gástrico interfere na velocidade, ficando dependente do tempo de esvaziamento do alimento ali presente (HOFFMANN et al, 1996). No estômago, diferente do que ocorre no intestino, fatores como o tipo de bebida, a concentração de etanol e o pH do meio também podem interferir na velocidade de absorção (VIEIRA, 2012).

O pico máximo de absorção pelo organismo ocorre no intervalo de 30 a 90 minutos após ingestão. No trabalho publicado por Weafer & Fillmore (2012), foi feita uma monitorização dos níveis de alcoolemia ao longo do tempo por meio de medições de ar exalado, correlacionando com a concentração sangue e obtiveram o perfil de curva muito semelhante ao mostrado na Figura 2,

condizente com o proposto por Calabuig (1992). Desta forma, podemos observar que a absorção ocorre rapidamente e decai logo em seguida, mesmo que a concentração no estômago ainda seja alta (OGA, 2008).

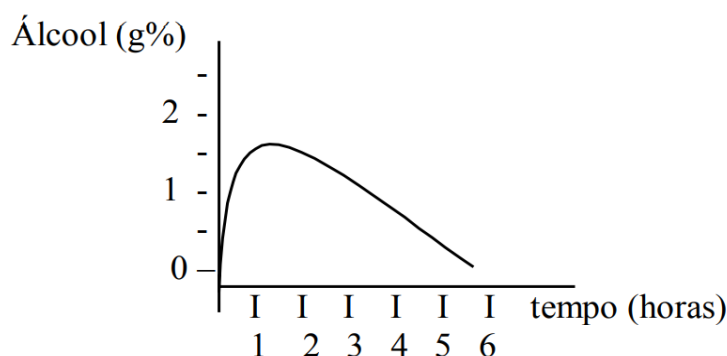


Figura 2. Curva de alcoolemia. Adaptado de Calabuig, 1992 e Weafer & Fillmore, 2012.

Vemos um comportamento semelhante ao apresentado na Figura 2 no trabalho de Weafer & Fillmore (2012), onde os níveis de alcoolemia foram monitorados ao longo do tempo por meio de medições de ar exalado, correlacionaram com a concentração sangue e obtiveram um perfil muito semelhante apresentado na figura acima.

Após atingir a corrente sanguínea, a distribuição do etanol pelo organismo ocorre por meio aquoso, se difundindo para diversos tecidos e espaços intra e extracelulares, dessa forma a disponibilização é proporcional ao volume de água corporal. Em consequência deste fato, as mulheres (por apresentarem um volume corporal de água menor do que o dos homens), acabam tendo elevadas concentrações de álcool no sangue quando se comparam indivíduos de ambos sexos que consumiram uma dose equivalente (VENTORIN, 2004; DORTA *et al.*, 2018). Logo, pode-se relacionar a quantidade de etanol com o peso do indivíduo em função do índice de massa corporal ou IMC. Com o aumento do IMC a tendência da concentração de etanol no sangue é diminuir (VENTORIN, 2004).

Após a etapa de absorção, o etanol é distribuído para todo organismo. Passando pela absorção gastrointestinal, atinge a circulação sanguínea através do sistema porta-hepático, ao alcançar o fígado, uma parte é metabolizada pela reação catalisada pela enzima Álcool desidrogenase (ADH) (VENTORIN, 2004; VIEIRA, 2012; FRANÇA, 2012).

O processo de metabolização do etanol ocorre principalmente no fígado pela ação do álcool desidrogenase (ADH). Existem também outras duas vias de metabolização como: o sistema microsomal de oxidação do etanol (SMOE) e a via da catalase (DORTA *et al.*, 2018).

Através do sistema microsossomal de oxidação do etanol (SMOE), esta via de oxidação é particularmente importante em indivíduos que apresentam etilismo crônico (etilistas crônicos) onde as enzimas do citocromo P450 atuam de forma mais eficiente, pois nestes indivíduos a atividade da ADH pode estar bloqueada. Na via da catalase, para a oxidação do etanol é necessária a presença de peróxido de hidrogênio, produzindo acetaldeído que logo é convertido em ácido acético (VENTORIN, 2004; DORTA *et al.*, 2018).

Entretanto, a ação da ADH não ocorre somente no fígado, encontra-se presente no estômago, auxiliando no metabolismo gástrico do etanol. No cérebro, o metabolismo do etanol é realizado quase em sua totalidade pelas enzimas do citocromo e pela catalase, a ADH possui uma menor atividade neste órgão (DORTA *et al.*, 2018).

A metabolização do etanol começa com a ação da ADH, como produto dessa reação é gerado o acetaldeído (CH_3CHO) que posteriormente é convertido em ácido acético através da enzima aldeído desidrogenase (ALDH). Essa sequência de reações é mediada pela nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) que possui a função de carreador de elétrons, após participar da reação, ele é reduzido a NADH (DORTA *et al.*, 2018).

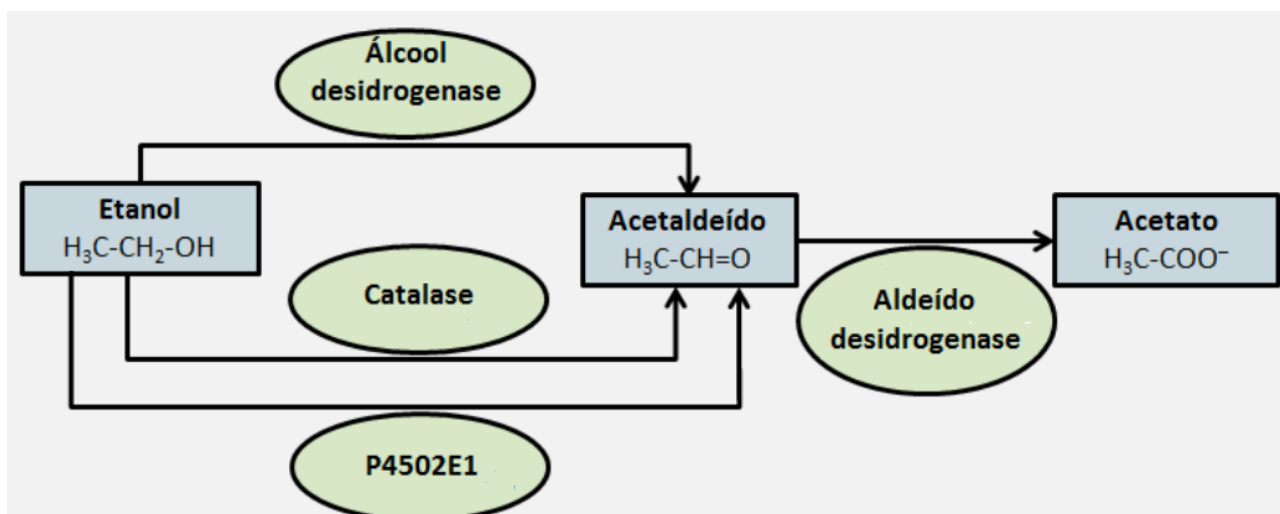


Figura 3. Reações de oxidação do etanol catalisadas por enzimas. Traduzido e adaptado de NIAA, 2007.

A demanda de NAD^+ para que a reação ocorra é na proporção de 2:1, isto é, são necessários dois mols de NAD^+ para que seja oxidado um mol de etanol. Essa quantidade de NAD^+ não é suportada pelo sistema hepático, sendo este o fator limitante para o andamento da reação. A capacidade de metabolização de etanol por um indivíduo adulto, fica limitado a 8 ou 10 g/mL por hora (DORTA *et al.*, 2018). O que é equivalente a metabolizar 30 mL de uísque que apresente 40% de etanol em sua composição em um intervalo de 3 horas (OGA, 2008).

Parte do ácido acético resultante alcança a corrente sanguínea é transformado em CO₂ por diversos tecidos (coração, músculos e cérebro) e uma outra parte é convertido em corpos cetônicos pelas mitocôndrias ou em acetil coenzima A no citoplasma (OGA, 2008; DORTA *et al.*, 2018).

Além das vias oxidativas de metabolização do etanol, existem outras duas formas de metabolismo não oxidativo, mas a sua participação é muito pequena. Em uma dessas vias o produto formado pelo metabolismo leva a formação de ésteres etílicos de ácidos graxos, enquanto que a outra via produz fosfatidil etanol. Ambos produtos formados podem ser utilizados como marcadores biológicos do consumo de etanol (DORTA *et al.*, 2018).

Em situações comuns de consumo de etanol cerca de 2% do volume total não passa pelo processo de oxidação. Entretanto, quando grandes quantidades são consumidas, esse valor pode ser aproximar de 10%. Desse total não oxidado, a maior parte é excretada na forma de urina pelos rins, como ar exalado pelos pulmões ou por meio de secreções como o suor ou a saliva. Quando somadas representam de 10 a 15% da eliminação de etanol (VENTORIN, 2004; OGA, 2008)

Quando um indivíduo apresenta uma deficiência na produção da ALDH, a conversão do aldeído para acetato fica comprometida, aumentando a sua concentração no organismo. Esse acúmulo gera uma série de efeitos desconfortáveis, dentre eles inclui-se a vasodilatação periférica, náusea, cefaleia e taquicardia. Esse tipo de deficiência não ocorre com significativamente em populações ocidentais, predominantemente em países orientais (BAU, 2002).

1.6. Efeitos do álcool no organismo

Enquanto que para a maioria das drogas são necessários somente alguns miligramas ou microgramas para que sejam observados os efeitos fisiológicos, o etanol necessita de quantidade expressivamente maiores sendo consumida na ordem de gramas (DORTA *et al.*, 2018).

Os principais efeitos do álcool estão localizados no Sistema Nervoso Central (SNC) e podem ser classificados com base em ações comportamentais, funções psicomotoras e capacidade de coordenação. Tais efeitos estão relacionados com a ação sobre o receptor de glutamato, associado com neurotransmissores excitatórios e sobre os receptores GABA (ácido gama-aminobutírico), principal neurotransmissor inibitório (HAES, 2010; ZORUMSKI *et al.*, 2013).

Em resumo, a ação do etanol promove uma melhora da transmissão sináptica do GABA ao mesmo tempo que inibe a transmissão sináptica do glutamato).

O GABA é um neurotransmissor que possui ação inibitória do SNC e age sobre dois tipos de receptores, o GABA_A e o GABA_B. Estes receptores GABA são formados por uma estrutura cinco unidades proteicas (pentamérica) que resultam em um canal permeável a íons cloreto. Sob situações

normais, o GABA permite que ocorra a passagem de cloreto por estes canais, garantindo a ação inibitória (ZORUMSKI *et al.*, 2013; DORTA *et al.*, 2018).

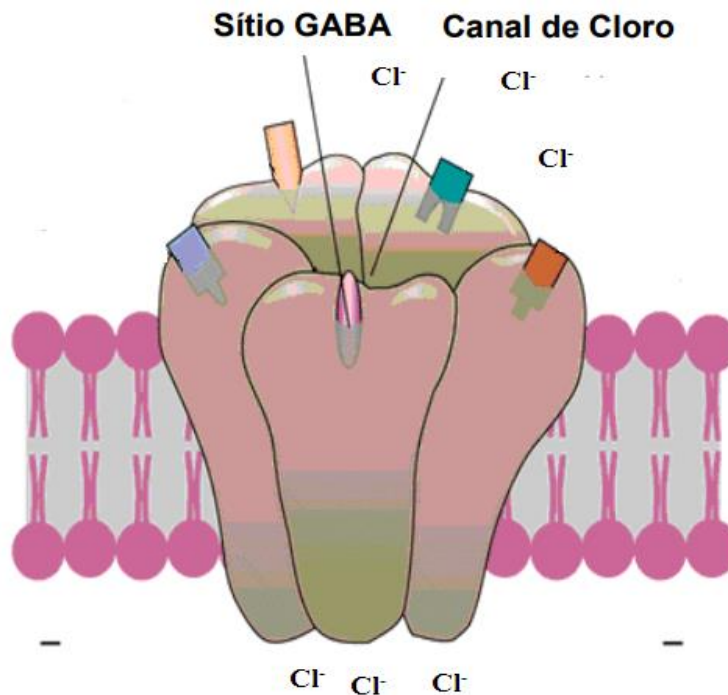


Figura 4. Representação do neuroreceptor GABA. Adaptado de Barbalho, 2007.

A ação do etanol no GABA consiste em uma modulação alostérica positiva deste receptor, fazendo com que haja um aumento do influxo de íons cloreto, potencializando assim a ação inibitória do GABA no SNC, levando a uma série de efeitos comportamentais, os quais serão discutidos posteriormente (OGA, 2008).

Já o glutamato é o aminoácido de maior abundância no SNC, e, dentre os neurotransmissores, possui grande destaque devido a sua ação excitatória, especialmente ativado pelo receptor glutamérgico com afinidade pelo aminoácido N-metil-D-aspartato (NMDA) (ZALESKI *et al.*, 2004).

O receptor NMDA é uma estrutura complexa e apresenta diversos sítios reguladores. Entretanto, para que o canal, que permite a passagem de íons, é necessário a presença da glicina ligado ao seu sítio específico (co-agonista). Quando ativados, estes receptores permitem que ocorra um aumento da concentração dos íons Ca^{2+} no meio intracelular. O etanol reduz a atividade do receptor de glutamato, e conseqüentemente, gera não só uma redução de cálcio, mas também influencia na liberação de dopamina, resultando em sensação de recompensa (ZALESKI *et al.*, 2004; COSTA, 2014).

Os níveis sanguíneos de etanol podem ser estimados de forma superficial e aproximada com base na quantidade de álcool apresentada na composição, entretanto existem diversos fatores que podem influenciar, tais como a porcentagem de água, tipo de bebida, peso corporal, gênero,

metabolismo até a taxa de esvaziamento gástrico. Sabendo disso, é possível estipular que um adulto de 70 kg ao consumir uma dose de bebida destilada contendo cerca de 14 g de etanol puro (cerca de 45 mL de uma bebida destilada com teor alcoólico de 40%), poderá apresentar um nível sanguíneo de etanol de 30 mg%, equivalente a 30 mg de etanol para cada 100mL de sangue (OGA, 2008; DORTA *et al.*, 2018).

Os efeitos decorrentes do consumo de álcool, variam consideravelmente, mas é possível correlacionar os níveis plasmáticos com os sintomas clínicos observados, classificando-os em três fases de embriaguez: fase da excitação, fase da confusão e fase da depressão (FRANÇA, 2012).

Na fase de excitação observam-se sinais de inquietação, euforia e suas ações ainda são conscientes, apresenta um comportamento social adequado. Pequenos sinais de alterações nos reflexos podem ser notados e, também, já são observados sinais de hálito etílico. A alcoolemia varia individualmente, entretanto, esses sinais podem ser notados entre faixa que vai de 20 mg/100ml até 60 mg/100mL (VENTORIN, 2004; MOREAU, 2008; OGA, 2008; FRANÇA, 2012; FHEMIG, 2013).

A fase de confusão, se inicia com alcoolemia em 80 mg/100mL até próximo de 150 mg/100 mL. Os primeiros sinais de comportamento agressivo surgem e a tomada de decisões racionais começam a ser afetadas, com isso, pode ocorrer náuseas e vômito. É nessa fase que há o maior interesse legal, pois, a capacidade de dirigir diminui devido à redução na capacidade motora. Indivíduos nessa faixa de alcoolemia tornam-se mais propensos a causarem acidentes influenciado pelo aumento da autoconfiança (VENTORIN, 2004; MOREAU, 2008; OGA, 2008; FRANÇA, 2012; FHEMIG, 2013).

A fase do sono está associada com a um estado de alcoolemia acima de 150 mg/100 mL. A capacidade motora e emocional fica comprometida, a fala torna-se mais lenta, ocorre a perda de equilíbrio (quedas) e pode ocorrer perda de consciência ao atingir 300 mg/100 mL. Níveis de alcoolemia acima de 400 mg/100 mL deixam o indivíduo inconsciente e valor acima disso podem levar a morte devido ao comprometimento do sistema respiratório (VENTORIN, 2004; MOREAU, 2008; OGA, 2008; FRANÇA, 2012; FHEMIG, 2013).

A Tabela 4 apresenta os níveis de alcoolemia com os sinais clínicos observáveis.

Tabela 4. Valores de alcoolemia e os respectivos sinais clínicos. Adaptado de (OGA, 2008; FRANÇA, 2012; REIS et al, 2014)

Fases da Embriaguez	Alcoolemia (mg/100mL)	Sinais Clínicos
Fase da Excitação	20 a 60	<ul style="list-style-type: none"> • Sensação de calor e relaxamento • Excitação • Desinibição • Hálito Etílico • Coordenação motora levemente alterada
Fase da Confusão	80 a 150	<ul style="list-style-type: none"> • Comportamento agressivo • Aumento na autoconfiança • Maior comprometimento da coordenação motora (reflexos mais lentos) • Náuseas e vômitos
Fase do Sono	Acima de 150 a 450	<ul style="list-style-type: none"> • Fala lenta • Perda de Equilíbrio • Perda de Consciência
	500 ou mais	<ul style="list-style-type: none"> • Morte por parada cardiorrespiratória

1.7. Amostras Biológicas

A escolha da amostra adequada para a análise de etanol é o passo inicial para uma correta interpretação dos resultados. Existe uma grande variedade de amostras que podem ser exploradas, desde as convencionais por apresentarem grande aplicação em diversos métodos como sangue e urina, quanto as amostras alternativas (ou não-convencionais), um exemplo deste tipo de amostra alternativa é o fluido oral (BRUNI *et al.*, 2012; DORTA *et al.*, 2018).

Além disso, também é possível realizar a dosagem da ingestão alcoólica pelo ar exalado, popularmente conhecido como teste do bafômetro ou etilômetro, sendo bastante utilizado para medição da embriaguez em motoristas (Haffner *et al.*, 2003).

1.7.1. Sangue

O sangue é um tecido líquido, de coloração vermelha, levemente viscoso e apresenta pH igual a 7,4. É composto por hemácias (eritrócitos, produzidas pela medula óssea), plaquetas e leucócitos (glóbulos brancos). Todos esses compostos encontram-se suspensos em um líquido denominado plasma, que corresponde a 55% do volume total do sangue (VELHO, 2012; JUNQUEIRA, 2013; DORTA *et al.*, 2018).

Este tecido atua principalmente como transportador de oxigênio e gás carbônico. A hemoglobina presente nas hemácias é responsável pela distribuição de oxigênio para as células do

corpo e do gás carbônico até os pulmões. No plasma estão presentes nutrientes e diversos metabólitos que serão levados até os órgãos de excreção (VELHO, 2012; JUNQUEIRA, 2013).

O sangue possui a vantagem de fornecer detalhes importante sobre efeitos tóxicos de eventos agudos e crônicos a partir de análises quantitativas partindo de informações sobre a concentração de uma droga inalterada ou metabolizada. Quando a concentração da droga na sua forma inalterada está com valores altos é um indicativo de um evento agudo, no caso de concentrações maiores do metabólito sugere uma intoxicação de forma crônica (DORTA *et al.*, 2018).

Além disso, muitos trabalhos utilizaram essa matriz para análises, o que permite ter um conhecimento mais amplo sobre valores terapêuticos, tóxicos e fatais para um amplo número de substâncias. A coleta desta amostra é invasiva e também bastante suscetível a contaminação por microrganismos. Em relação a sua janela de detecção, o sangue não pode ser utilizado para verificação de consumo a longo prazo de drogas, uma vez que o uso é indicado somente para análises de curta duração na ordem de algumas horas (DORTA *et al.*, 2018).

1.7.2. Fluido Oral

Inicialmente, é importante diferenciar a saliva do fluido oral. A saliva é um fluido biológico produzido pelas glândulas salivares e pelos sulcos gengivais. Estima-se que existam cerca de 450 glândulas na boca que auxiliem na produção salivar, de maneira geral, a saliva é formada a partir da secreção das glândulas parótidas, fornecendo 25% do volume total, pelas glândulas submandibulares (71%) e pelas glândulas sublinguais (4%). (VEERMAN *et al.*, 1996).

Apresenta característica aquosa, pH levemente ácido (pH 5,5) podendo variar conforme estímulo salivar, chegando a pH 7,9 e coloração clara. Nela são encontradas diversas substâncias, dentre as quais podemos destacar alguns eletrólitos, substâncias orgânicas de baixo peso molecular, algumas proteínas, além de peptídeos e polinucleotídios (SANTOS, 2007; BRUNI *et al.*, 2012; MARSH, 2015; GRÖSCH, 2017; KUBALA, 2018).

Os compostos presentes na saliva estão distribuídos da seguinte maneira: 99,5% de água, 0,3% de proteínas em geral e 0,2% de compostos orgânicos e inorgânicos, como sódio, potássio, cloreto, bicarbonato e fosfato, sendo eles de origem sanguínea. Também estão presentes na saliva, algumas enzimas, tais como a amilase e a lipase, cujas funções exercidas por elas estão relacionadas à digestão de alimentos, estes são sintetizados pelas células secretoras (JOHAN, 2005; SANTOS, 2007; BRUNI *et al.*, 2012; MARSH, 2015; GRÖSCH, 2017; KUBALA, 2018).

Já o fluido oral e, basicamente, formado pela mistura da saliva com os demais componentes que podem estar presentes na cavidade bucal, como células epiteliais da mucosa e restos alimentares. Ainda contem bactérias e seus respectivos metabólitos (DORTA *et al.*, 2018).

Em média, o fluxo salivar em indivíduos saudáveis, produz de 500 mL até 2,0 L durante o dia. Idosos podem apresentar certa limitação na hora de fornecer amostras, devido à dificuldade de salivação. A quantidade de saliva produzida por indivíduo é muito variável e controlada por estímulo hormonal e por neurotransmissores a uma taxa que pode variar de 0 a 10mL por minuto. A administração de fármacos pode afetar significativamente a produção de saliva, podendo, em alguns casos, dobrar o volume produzido (GUBALA, 2005; JOHAN, 2005; GRÖSCH, 2017; KUBALA, 2018).

As substâncias consumidas chegam até saliva através da difusão passiva ou por ultrafiltração. Dessa forma, é possível que alguns compostos, como o álcool, drogas e fármacos, sejam encontrados na saliva ainda na sua forma não-metabolizada. Entretanto, estes mecanismos de transferência possuem suas limitações. Moléculas que apresentam um alto peso molecular, drogas ou fármacos em sua forma ionizada ou ligados a alguma proteína plasmática tem maior dificuldade de serem transportadas até a saliva (BORDIN, 2015).

Através do mecanismo de difusão passiva, moléculas com características lipossolúveis conseguem atravessar a barreira formada por diversas membranas celulares até entrar em contato com a saliva. Moléculas que apresentam características mais polares possuem maior facilidade em chegar às cavidades bucais através da ultrafiltração (GRÖSCH, 2017).

São encontrados na saliva majoritariamente as substâncias em sua forma não metabolizada, pois tendem apresentar características mais lipofílica do que seus metabólitos e atravessam as barreiras biológicas formada pelos capilares e membranas das células de maneira mais eficiente. A partição da droga entre o plasma e a saliva é determinado pelo pH do sangue e o pH salivar, assim como o pKa da substância em questão (WOOD *et al.*; 1982).

Existem diversas técnicas de coleta que podem ser aplicadas para obter amostras de fluido oral, sendo elas separadas em coletas estimuladas e as coletas não-estimuladas. A forma de coleta não-estimulada é realizada deixando que a saliva escorra diretamente da cavidade oral para o recipiente destinado a coleta (CROUCH, 2005).

As coletas estimuladas podem ser realizadas com a língua, com as bochechas e com os lábios sem a necessidade de estímulos externos. A salivação pode ser induzida ao empregar o uso de cera de parafina, teflon®, parafilm® e gotas de limão sobre a língua, essa técnica é considerada uma forma estímulo externo. Após o estímulo para a produção, os líquidos salivares podem ser recolhidos por sucção, absorção ou empregando um *swab* (CROUCH, 2005).

É comum o uso de estímulo externo aliado com materiais absorventes para uma maior eficácia das coletas. Um dispositivo comercialmente disponível para a coleta de amostras de fluido oral é o Salivette®, que é composto por um tubo plástico e possui um pedaço de algodão na forma de um rolo

que absorve os fluidos ao entrar em contato com eles na cavidade bucal, e, após a centrifugação, o fluido oral é separado do algodão para ser utilizado nas análises de interesse (CROUCH, 2005).

Neste ponto vale salientar a diferença entre a coleta de fluido oral utilizando o Salivette® da coleta através do esfregaço, este último tem a função de coletar células da mucosa bucal para estudos citológicos, sendo também aplicável para análises DNA. O esfregaço utiliza fricção com espátulas, escovas ou *swabs* sobre os tecidos para que se uma pequena quantidade de células se descole fornecendo o material de interesse (CARVALHO, 2009; SANDRIN et al, 2010).

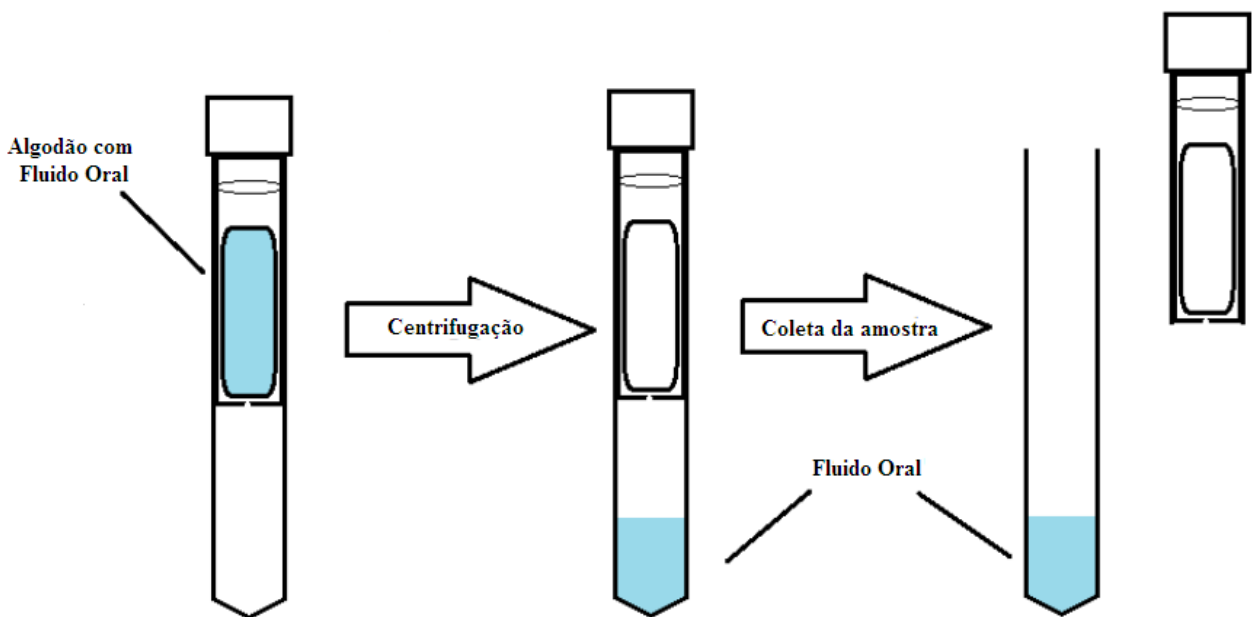


Figura 5. Representação esquemática da coleta de fluido oral utilizando Salivete®. Adaptado de Bueno (2014)

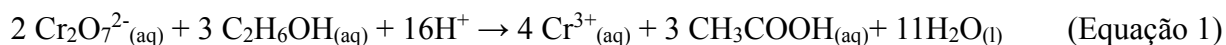
A saliva é muito citada como sendo um espelho da saúde do organismo devido à presença de diversos componentes que a tornam capaz de monitorar os níveis de substâncias presente no sangue, podendo abranger desde análises hormonais até fármacos e drogas (MOTEMAYEL *et al.*, 2010).

1.7.3. Ar exalado

Após o álcool alcançar a corrente sanguínea e ser distribuído, ele atravessa a membrana que separa o sangue dos alvéolos pulmonares formando um equilíbrio entre a concentração sanguínea com o volume de ar presente no pulmão. Durante a respiração, ao expelir o conteúdo gasoso do pulmão, este ar contendo o álcool pode ser empregado para verificação do consumo de etanol (LINDBERG *et al.*, 2007).

Os modelos mais simples do etilômetro são construídos em pequenos tubos que contém no seu interior uma solução aquosa de dicromato e sílica contendo ácido sulfúrico. Por meio de uma

reação de óxido redução, o álcool é convertido a aldeído através de sua oxidação e, ao mesmo tempo, o dicromato é reduzido, conforme reação a seguir (BRAATHEN, 1997):



É possível acompanhar visualmente o andamento da reação, a solução de dicromato antes de reagir apresenta coloração vermelho alaranjada proveniente dos íons $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$, após reagir com o etanol a cor da solução passa para o verde devido a formação do íon Cr^{3+} (BRAATHEN, 1997).

Na rotina policial é utilizado um equipamento mais prático e sofisticado. O princípio de funcionamento também é baseado na oxidação do etanol, entretanto para que isso ocorra é utilizado dois eletrodos de platina aquecidos. O etanol ao entrar em contato com esses eletrodos, sofre oxidação e altera a resistência/condutância do sensor, essa alteração na voltagem é proporcional à concentração do álcool no ar exalado, o qual possui concentração proporcional aos níveis de etanol encontrados no sangue (BRAATHEN, 1997).

A relação entre a quantidade de álcool detectado no ar exalado em relação ao sangue é de 2.100:1, isto é, para cada 2,1L de ar exalado pelo pulmão é equivalente a mesma quantidade de etanol presente em 1mL de sangue (LINDBERG *et al.*, 2007).

A principal vantagem do uso do etilômetro para dosagem de etanol está no fato deste método fornece resultados simples e robustos, com resultados obtidos no campo de forma imediata, tornando-se fundamental para a rotina policial (LINDBERG *et al.*, 2007).

1.7.4. Cabelo

O cabelo é uma matriz que possui estrutura composta por queratina, água, lipídeos e uma pequena parcela de minerais. Os fios de cabelo crescem por meio de células ligadas a um centro germinativo localizado na base do folículo capilar, cerca de 3 a 5 mm abaixo da superfície da epiderme. Estão localizados no couro cabeludo, uma região com bastante irrigação sanguínea por apresentar muitos vasos capilares arteriais (KINTZ *et al.*, 2013).

Existem algumas propostas de mecanismos que podem elucidar como ocorre a incorporação de drogas e metabólitos na matriz do cabelo. Dentre eles, temos a incorporação por difusão ativa e passiva do sangue para os folículos capilares, incorporação através de secreções das glândulas sudoríparas e incorporação de substâncias externas que se depositam e permanecem na fibra capilar (BORDIN *et al.*, 2015).

Conforme as células sofrem alongamento, envelhecem e morrem, estas dão origem à fibra capilar com a droga já fixada, sendo que essa incorporação ocorre de forma progressiva. Assim, em determinado segmento do cabelo, as drogas ou metabólitos poderão estar presentes, dependendo somente da taxa de crescimento dos fios, podendo crescer entre 0,6 a 1,42 cm/mês, variando conforme etnia (KINTZ *et al.*, 2013).

As características físico-químicas das substâncias estão diretamente relacionadas com a incorporação destas no cabelo, assim como a lipofilicidade e a basicidade. Drogas com caráter básico como a cocaína e as anfetaminas, possuem maior capacidade de incorporação quando comparadas com drogas neutras ou ácidas, como os canabinoides e benzodiazepínicos (JOSEPH *et al.*, 1996; BORGES *et al.*, 2001; COOPER *et al.*, 2012).

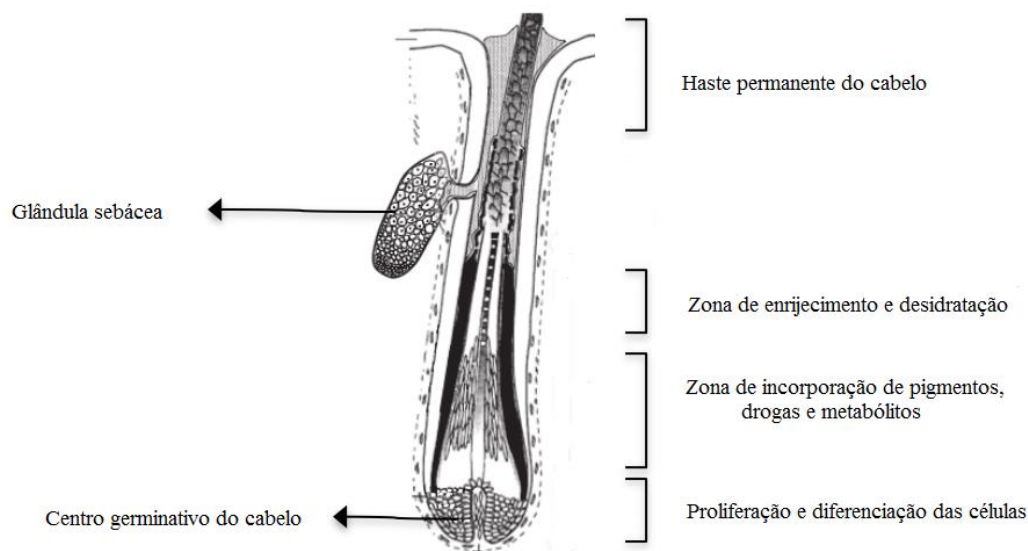


Figura 6. Estrutura do cabelo e a incorporação de drogas e metabólitos em sua matriz. Adaptado de Gordo (2013) e Borgo (2016).

1.7.5. Marcadores Biológicos do Consumo de Etanol

Marcadores biológicos são indicadores fisiológicos que fornecem informações relacionadas ao consumo ou exposição ao etanol, permitindo o monitoramento tanto do uso crônico, quanto o agudo. Esses marcadores são ferramentas importantes no que condiz ao diagnóstico e acompanhamento de problemas relacionados ao uso contínuo desta substância (PETERSON, 2004).

Existem duas classes de marcadores: os tradicionais e os diretos. Os tradicionais são, basicamente, marcadores de natureza indireta, isto é, permitem inferir o consumo por meio de alterações bioquímicas ou algum efeito tóxico em órgãos específicos. Podemos destacar os seguintes marcadores indiretos do etanol: as enzimas gama-glutamiltransferase (GGT), aspartato amino transferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), assim como o volume corpuscular médio (VCM) que avalia o tamanho médio das hemácias e a transferrina deficiente de carboidrato (TDC), uma proteína transportadora de ferro para a medula (VAN PELT, 1997).

Já os marcadores diretos são denominados desta forma por serem metabólitos do etanol. Mesmo após a metabolização do etanol através das reações oxidativas, uma pequena porcentagem sofre metabolização não oxidativa. Os produtos desta via podem ser encontrados com uma maior

janela de detecção no sangue e na urina. Alguns exemplos de marcadores diretos são: etil ésteres de ácidos graxos (do inglês *fatty acid ethyl esters*, FAEE), fosfatidil etanol (*phosphatidyl ethanol*, Peth), etilglicuronídeo (EtG) e etilsulfato (EtS) ((PETERSON, 2004).

O EtG trata-se de um metabólito direto não volátil, solúvel em água, além de ser estável ao armazenamento, permitindo sua quantificação após a completa eliminação do etanol do organismo. Cerca de 0,1% do volume de etanol total consumido é conjugado com o ácido glicurônico e com o sulfato de etila na presença das enzimas UDP-glicuronosiltransferase e sulfotransferase, dando origem ao EtG e o EtS. Esses metabólitos podem ser detectados em todo o fluido corporal por até dois dias após o consumo de etanol, essa maior janela de detecção é devido ao maior tempo de meia de vida (ALT *et al.*, 2000; DAHL *et al.*, 2002; MARÍN, 2006, HOISETH *et al.*, 2007).

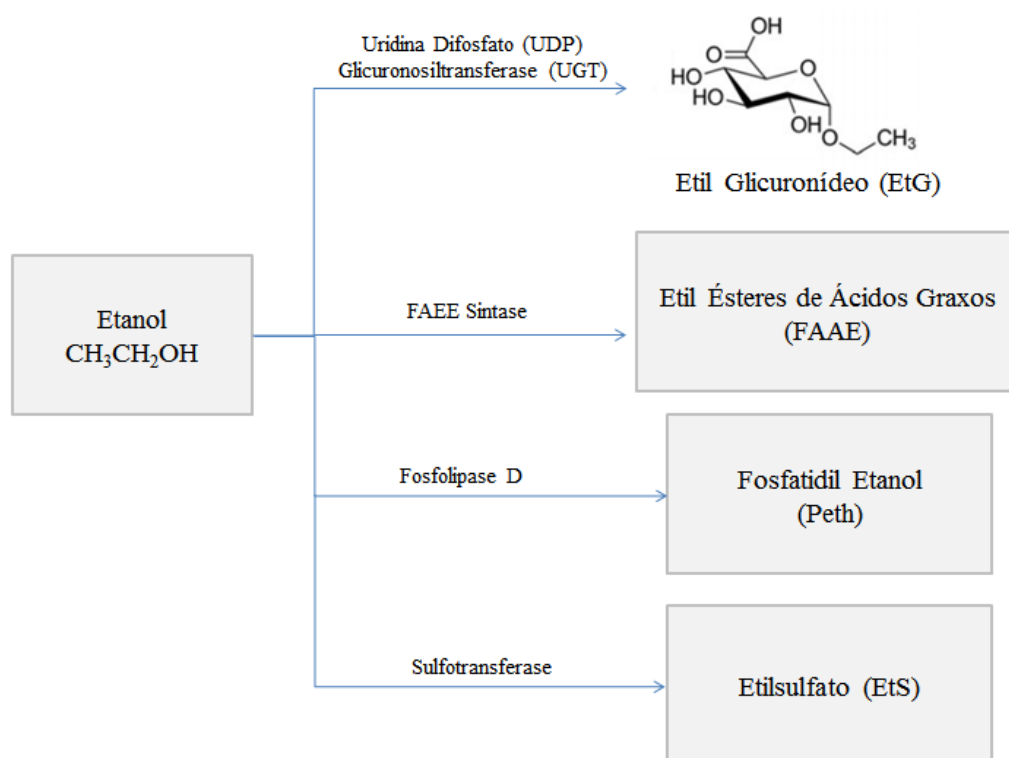


Figura 7. Reação de formação do EtG e outros biomarcadores a partir do etanol. Adaptado de Wabuyele (2018).

Diversos estudos como os de Pragst (2008), Lininger (2010) e Bastiani (2020) aplicam o EtG como principal biomarcador para monitoração do consumo de álcool, demonstrando algumas aplicações, como por exemplo, para avaliar o consumo crônico por motoristas ou por mulheres durante a gravidez, para as detecções foram utilizadas principalmente amostras de cabelo.

1.7.6. Etil Glicuronídeo

As primeiras publicações relacionadas à determinação de etil glicuronídeo em cabelo foram realizadas por Skopp *et al* (2000). Nesta época já era conhecido que esse metabólito tinha potencial para ser empregado no monitorar de consumo recente de álcool utilizando amostras de urina e como marcador de uso crônico por meio de análises com cabelo (SKOPP, 2000; MORINI *et al.*, 2009).

Recentemente, o EtG vem ganhando destaque devido a sua alta sensibilidade e especificidade na detecção e diagnóstico do uso crônico de etanol, possui ainda a vantagem de apresentar uma boa estabilidade, há estudos que conseguiram detectar esse marcador em análises post-mortem em amostras de urina, de sangue e de cabelo (MARÍN, 2006; MORINI, 2010).

Contudo, alguns trabalhos demonstram que nem sempre é possível encontrar EtG em todas as amostras analisadas. A partir de amostras obtidas de diagnósticos positivos para dependência de etanol, Skoop *et al* (2000) encontrou 2 amostras negativas de um total de 4 e Janda *et al* (2002), em um trabalho mais extenso de 97 amostras obteve resultados negativos em 38 delas. Isso demonstra que nem sempre a ausência de EtG em cabelo é condizente com abstenção alcoólica, o que pode ocasionar tal resultado é a quantidade do marcador presente na amostra estava abaixo do limite de detecção.

Com o aprimoramento das técnicas utilizadas para a quantificação de EtG, tornou-se possível estabelecer uma relação entre o metabólito e consumo diário de etanol, utilizando o peso corporal como fator de normalização. Devido a relação de EtG e a ingestão diária de etanol apresentar uma relação linear, é possível diferenciar indivíduos que bebem socialmente, daqueles que fazem consumo abusivo (MORINI, 2009).

Para que seja estabelecido EtG como um marcador do uso crônico de etanol, ainda faltam estudos que avaliem alguns fatores que interferem no metabolismo como por exemplo o sexo, idade e índice de massa corporal, assim como aqueles que afetem a incorporação do EtG ao cabelo, como por exemplo os tratamentos capilares e hábitos de higiene (MORINI, 2009).

1.8. Validação de métodos

A validação de métodos consiste na verificação e confirmação através de uma série de experimentos de que um determinado método de análise atende a todos os parâmetros necessários para o uso pretendido, assegurando assim a confiabilidade e garantindo o controle dos fatores que podem ocasionar imprecisão de um resultado (ANVISA, 2012; JOORIS, 2012).

Os parâmetros usualmente avaliados através da validação são: seletividade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), linearidade, precisão, exatidão, efeito residual, estabilidade de curta duração, estabilidade pós-processamento, estabilidade de longa duração (ANVISA, 2012).

1.8.1. Seletividade

A seletividade é o parâmetro que avalia a capacidade de um analito ser identificado sem equívocos dentre todos os componentes presentes em uma amostra (ANVISA, 2012). Dessa forma, a seletividade pode ser entendida como um teste verificativo que procura identificar presença de algum interferente na matriz utilizada que pode coeluir no mesmo tempo de retenção (t_R) que o analito de interesse, assegurando que o pico encontrado pertence única e exclusivamente ao analito (JOORIS, 2012).

1.8.2. Limite de detecção (LD)

O limite de detecção é definido como a menor concentração de um analito que pode ser identificado por um método analítico, sem, entretanto, poder quantificá-lo (RIBANI, 2004).

1.8.3. Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação é a menor quantidade de um analito presente em uma amostra que pode ser quantificado, A determinação do LD e/ou do LQ pode ser realizada de três maneiras distintas: por meio de método visual, da razão sinal-ruído, utilizando amostras de “branco” ou em parâmetros da curva de calibração (ANVISA, 2017).

1.8.4. Linearidade

Avalia a capacidade do equipamento em fornecer resultados proporcionais às concentrações conhecidas das soluções padrões. A relação entre a concentração e o sinal analítico é avaliado através de parâmetros matemáticos e expresso sob a forma de uma reta denominada *curva analítica* (BARROS, 2002). A aferição dos coeficientes da curva é realizada utilizando o método de regressão linear, obtendo-se os coeficientes de regressão (**a** e **b**) apresentados sob a forma da equação $y=ax+b$ assim como o coeficiente de correlação (**r**) e determinação (**r²**). O parâmetro **r** atua como

uma medida da qualidade da curva, quanto mais próximo este valor estiver de 1,0, menor são as dispersões do conjunto de dados (RIBANI, 2004). Segundo a RDC nº166 da ANVISA, é desejável que o coeficiente de correlação esteja acima de 0,990 (ANVISA, 2017).

O cálculo da equação de regressão varia conforme a classificação da variância, se o sistema for heterocedástico, o cálculo de regressão deve ser realizado utilizando o método dos mínimos quadrados ordinários ponderados. Se o sistema for homocedástico, o cálculo é realizado utilizando o método dos mínimos quadrados ordinários não ponderados (INMETRO, 2018).

1.8.5. Precisão

A precisão avalia a capacidade de um método em produzir resultados com alto grau de concordância para uma mesma concentração de amostra após análises sucessivas sob as mesmas condições (QUINTÁN, 2017; RIBANI, 2004). Esta medida representa numericamente o grau de dispersão dos resultados individuais em relação à média.

A precisão deve ser realizada em diferentes dias para que seja obtido a precisão intra-ensaio e precisão inter-ensaio. A precisão intra-ensaio avalia as medições em uma mesma amostra, em iguais condições, pelo mesmo analista e um pequeno intervalo de tempo. A precisão inter-ensaio observa variações relacionadas a análises em diferentes dias, diferentes analistas, diferentes equipamentos ou todos estes fatores combinados (BRITO, 2003; RIBANI, 2004). A precisão é avaliada por meio do cálculo do Desvio Padrão Relativo (Equação 2)

1.8.6. Exatidão

A exatidão é a capacidade de o método analítico apresentar concordância entre resultados muito próximos ao um valor tido como verdadeiro (ANVISA, 2017).

A exatidão deve ter sua resposta analisada através do Erro Percentual Relativo ou EPR, pode-se expresso em porcentagem (INMETRO, 2018).

1.8.7. Efeito Residual ou *carry over*

O efeito residual é o carreamento de um ou mais componentes presentes na amostra para a análise seguinte. A importância de avaliar este parâmetro está relacionada na capacidade de interferência direta de uma substância em uma análise. A relevância desse estudo está correlacionada com um possível acréscimo na concentração de um analito ou surgimento de um pico referente ao analito em corrida cromatográfica posterior (LBCD, 2011).

1.8.8. Estabilidade

A estabilidade engloba uma série de ensaios que determinam se um analito armazenado sob certas condições específicas em função do tempo comprometem a capacidade do método em obter bons resultados. (ANVISA,2012).

2. Objetivo

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a capacidade de indivíduos em conduzir um veículo após o consumo de bebidas alcoólicas e correlacionar os resultados da quantificação de etanol com análises de marcadores genéticos envolvidos com a produção de enzimas responsáveis pela metabolização do etanol.

2.2. Objetivos Específicos

- Desenvolver e validar um método analítico para a quantificação de etanol no fluido oral;
- Desenvolver e validar um método analítico para quantificação do etanol utilizando adsorção de sangue em papel;
- Correlacionar as concentrações de etanol encontradas na saliva com os valores encontrados no sangue;
- Correlacionar os hábitos de consumos de consumo com quantificações de EtG em cabelo;
- Avaliar a capacidade motora de indivíduos dirigindo sobre a influência do álcool;
- Encontrar marcadores genéticos relacionados com a metabolização do etanol e correlacionar com as análises cromatográficas;

3. Materiais e Métodos

3.1. Aspectos Éticos da Pesquisa

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo (CEP-FFCLRP-USP) no dia 11/09/2018, a fim de cumprir todos os requisitos exigidos pela resolução 466/2012 (CNS, 2012) Após a análise pelo CEP, o projeto foi enquadrado na categoria “APROVADO” (CAAE n. ° 01809018.4.0000.5407) em 04/02/2019.

3.2. Materiais

No preparo das soluções foram empregados os seguintes equipamentos: balança analítica modelo BP211D da Sartorius (São Paulo, Brasil), com precisão de 0,00001 g e massa mínima de 0,01 mg. Pipetas Rainin classic modelo PR-20 (2 – 20 µL), modelo PR- 200 (20 – 200µL) e modelo PR – 1000 (100 – 1000 µL) da Mettler Toledo (São Paulo, Brasil). Agitador de tubos (vórtex) modelo AP56 da Phoenix (São Paulo, Brasil). Centrífuga modelo Universal 32 da Hettich Zentrifugen (Tuttlingen, Alemanha).

O equipamento de análise instrumental utilizado foi o cromatógrafo em fase gasosa com detecção por ionização de chama (GC-FID) modelo 7890A da Agilent Technologies (Califórnia, EUA) com amostrador automático modelo GC Sampler 80 da Agilent Technologies (Califórnia, EUA).

Os gases empregados para análises no cromatógrafo foram nitrogênio (N₂) como gás de arraste. Para o detector de ionização por chama foi utilizado ar sintético e hidrogênio (H₂), todos foram adquiridos na Air Liquide (São Paulo, Brasil).

Os reagentes utilizados foram: Etanol (Merck, Alemanha), de grau HPLC para o preparo das soluções de calibração; 3-Metil-1-Butanol (Merck, Alemanha), grau analítico, foi empregado como padrão interno; Cloreto de sódio (NaCl) (Sigma-Aldrich, Alemanha), reagente analítico. Frascos para *Headspace* foram adquiridos através da Sun Sri (Espanha); Salivette® da Sarstedt AG & Co (Alemanha) para coleta de amostras de fluido oral.

As amostras de sangue foram coletadas utilizando lancetador e lancetas descartáveis (Accumed, Rio de Janeiro). As amostras de sangue foram armazenadas nos frascos de *Headspace* contendo água deionizada e o padrão interno álcool isoamílico e mantidos à -10 °C até o momento de análise.

3.3. Soluções

3.3.1. Soluções Padrão

Com o auxílio de balões volumétricos de 50,00 mL as soluções padrão com as concentrações de 5,0 g.L⁻¹, 10,0 g.L⁻¹ e 20,0 g.L⁻¹ foram preparadas, respectivamente, utilizando os seguintes volumes de etanol 314 µL, 628 µL e 1256 µL e seus volumes finais completados com água deionizada.

3.3.2. Solução de Padrão Interno

O padrão interno utilizando o 3-metil-1-butanol (álcool isoamílico) foi preparado em um balão volumétrico de 50,00 mL no qual foram adicionados 5,0µL do álcool isoamílico e completado o volume com água deionizada. Foi pesado uma massa de 0,1 g de NaCl para otimizar o efeito de “*Salting Out*” do etanol presente nas amostras e nos padrões.

3.3.3. Condições instrumentais da análise cromatográfica

Foram utilizadas as seguintes condições de análise: Coluna capilar de sílica fundida modelo CP-Wax 52CB de característica polar (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm de espessura de filme). A temperatura do injetor foi de 250 °C. A temperatura inicial do forno foi de 50 °C durante 2 minutos seguido de aquecimento até 200 °C a uma taxa de aquecimento de 20 °C min⁻¹. Tempo total de análise de 15,5 minutos.

As condições de incubação das amostras no *Headspace* foram: tempo de incubação de 6 minutos e temperatura de incubação de 90° C com agitação de 500 rpm. A seringa foi mantida aquecida com temperatura de 50° C e o volume de injeção da fase gasosa foi de 400 µL.

3.4. Curva de Metabolização do Etanol

Para construir as curvas de metabolização foram convidados 20 voluntários, dos quais 10 doaram amostras de fluido oral e sangue, enquanto que 10 voluntários doaram somente fluido oral.

Cada voluntário ingeriu um volume de álcool diretamente proporcional ao peso individual com a finalidade de atingir uma concentração equivalente a 0,5 g de álcool/kg de massa corporal, ou seja, cerca de 760 mL de cerveja (graduação alcoólica de 5%) ou 106 mL de vodka (graduação alcoólica de 36%) para um indivíduo de aproximadamente 60 kg. Todos os participantes foram instruídos a ingerir a bebida em um tempo máximo de 10 minutos. Essa proporção de etanol foi baseada no trabalho de Bueno (2014), que realizou a quantificação empregando urina e fluido oral. A maioria dos estudos são limitados a doses de 1,0kg/kg visto que o consumo de quantidades maiores

ocasiona náusea e vômito, assim como administração de doses baixas $<0,30$ g/kg geram efeitos de curta duração após o ápice da absorção (Jones, 2019).

Em seguida, as coletas de fluido oral e de sangue foram realizadas em intervalos de 15 minutos por um período 150 minutos (10 coletas) para monitorar a metabolização dos níveis de etanol ao longo do tempo.

A coleta de sangue foi realizada através do puncionamento da região das digitais com uma lanceta estéril, o sangue foi coletado utilizando um papel de filtro com as dimensões de 1,0 x 1,0 cm até a sua saturação. Para a coleta de fluido oral os voluntários utilizaram um Salivette® e mantiveram o rolo de algodão em contato com a cavidade bucal por 1 minuto ou até a saturação com a amostra.

3.5. Procedimento Experimentais de Coleta e Aplicação do Teste Psicomotor

Os voluntários convidados a participar deste projeto foram selecionados a partir do projeto de pesquisa “Sequenciamento de nova geração de genes envolvidos na biossíntese de melanina em amostra da população brasileira”, desenvolvido sob coordenação do Prof. Dr. Celso Teixeira Mendes Júnior e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo (processo CAAE n.º 25696413.7.0000.5407), uma vez que o presente trabalho fará uso dos mesmos marcadores genéticos (*Infinium Multi-Ethnic Global Array*).

Todos os voluntários foram previamente instruídos a não ingerir produtos alimentícios ou bebidas que continham álcool etílico em sua composição por pelo menos 24 horas antes da realização dos testes. No dia da coleta, antes de iniciar os procedimentos, foram submetidos ao Teste do Bafômetro (Etilômetro) para assegurar que todos estavam aptos a participar deste projeto.

Cada voluntário ingeriu um volume de álcool diretamente proporcional ao peso individual com a finalidade de atingir uma concentração equivalente a 0,5 g de álcool/kg de massa corporal e foram instruídos a ingerir a bebida em um tempo máximo de 10 minutos.

Em seguida, os voluntários participaram da avaliação psicomotora dirigindo um veículo de autoescola acompanhado por um instrutor devidamente habilitado. Com a colaboração da Guarda Universitária da Universidade de São Paulo do Campus de Ribeirão Preto, uma rua de baixa circulação de veículos foi isolada e sinalizada aos demais motoristas que aquela via estava reservada a execução do presente projeto.

Os obstáculos foram montados utilizando cones e fitas zebradas de forma que o condutor completasse o trajeto evitando derrubá-los. O trajeto era composto por desvios alocados inicialmente à esquerda e seguido por um desvio alocados à direita. Ao terminar esta etapa, o trajeto dispunha de uma curva estreita para a direita delimitada por cones, seguido por uma “zona de aceleração”, nela o

voluntário poderia acelerar e no momento que fosse sinalizado pelo instrutor presente no veículo, o mesmo deveria acionar o freio. O link a seguir direciona para um vídeo onde é possível acompanhar detalhadamente o trajeto (https://youtu.be/_7kqVoD7RoM).



Figura 8. Percurso montado para a execução do experimento

A supervisão deste teste foi realizada pela Polícia Militar Rodoviária, que avaliou a capacidade de atenção e o tempo de resposta de cada um dos voluntários.

A condução do veículo foi realizada em duas situações distintas, sóbrio e após consumo de bebida alcoólica: (I) sóbrio para conhecer o trajeto e seguido por uma tentativa de responder a uma mensagem no celular através do aplicativo WhatsApp enquanto dirige; (II) 30 e 60 minutos após a ingestão da bebida alcoólica, seguindo os mesmos critérios do item (I).

Durante cada etapa do experimento informações sobre número de setas utilizadas, número de cones derrubados, acelerações e frenagens bruscas, tempo total de percurso, velocidade máxima, tempo de frenagem e distância de frenagem até parada total do veículo foram registrados.

Após o final dos experimentos, os participantes foram dispensados somente após constatação pelo “bafômetro” de que não há mais álcool no ar exalado, o que ocorreu cerca de 3 a 4 horas após a ingestão da bebida.

De todos os participantes deste projeto, 4 voluntários concordaram em doar amostras de cabelo. Para a quantificação de EtG foi necessária coleta de amostra de cabelo da área da nuca, cortando na base do cabelo, o mais próximo possível da pele, uma porção de cabelo com diâmetro de aproximadamente 0,5 cm como é demonstrado na Figura 09. Também foram coletadas informações

relacionadas ao tipo de tratamento capilar, assim como drogas ou fármacos, que os voluntários fizeram uso nos últimos 3 meses.

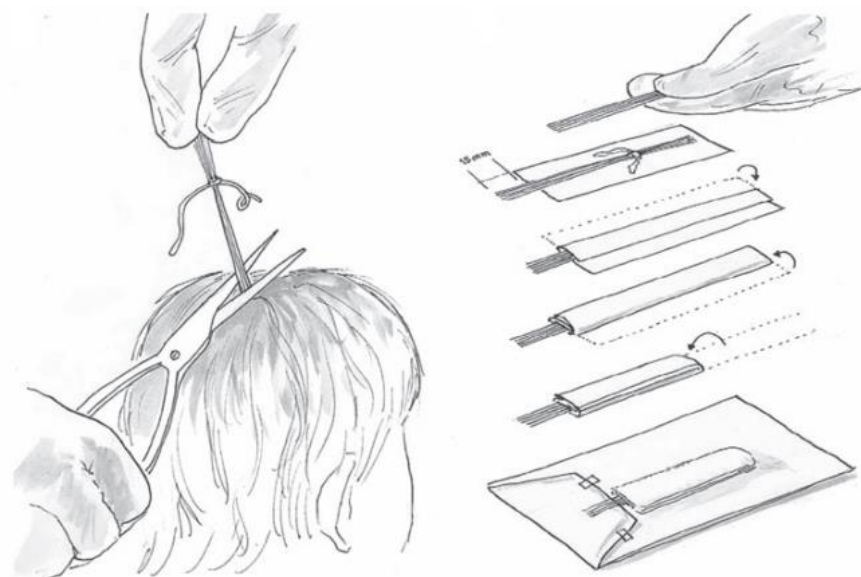


Figura 09. Procedimento de coleta da amostra de cabelo e armazenamento dos fios em um invólucro de papel. Adaptado de Dinis (2010).

As amostras e os formulários foram enviados para Departamento de Diagnóstico e Saúde Pública da Universidade de Verona, na Itália e analisados pelo SYNLAB. A análise foi realizada de acordo com a metodologia de Morini (2006) descrito a seguir: descontaminação dos cabelos por lavagem com diclorometano e metanol; pulverização da amostra com um moinho de bolas; incubação em água destilada; centrifugação e análise por LC-MS-MS.

Um segmento de cabelo foi colocado em um tubo de ensaio de 10 mL, adicionado 4 mL de diclorometano e submetido a banho ultrassônico por 10 minutos. Com o auxílio de uma Pipeta de Pasteur, o líquido de lavagem foi removido. Uma nova etapa de lavagem foi realizada utilizando 4 mL de diclorometano seguido por uma lavagem com 4 mL de metanol.

O cabelo foi submetido a um fluxo de nitrogênio para secagem e posterior pesagem de uma alíquota de 50 mg em um tubo contendo pequenas bolas de metal. O tubo foi agitado por 5 minutos até total pulverização do cabelo com a temperatura mantida a 13 °C com auxílio de gelo seco.

Para fazer a incubação extrativa, ao tubo contendo o cabelo pulverizado foi adicionado 1 mL de água deionizada e 7,5 µL da solução de padrão interno de etilglucuronídeo-D₅ em metanol a uma

concentração de 0,10 ng/ μ L. Todos os tubos foram agitados manualmente, centrifugados por 10 minutos e incubados à temperatura ambiente por uma noite.

No dia seguinte, os tubos foram submetidos à ultrassonicação por 10 minutos. Uma alíquota de 0,2 mL do sobrenadante foi centrifugado (10000 rpm por 10 minutos). Aproximadamente 0,1 mL de cada sobrenadante foram transferidos para um frasco e analisado por um LC-MS-MS.

3.6. Condições Instrumentais

A análise dos extratos foi realizada utilizando as seguintes instrumentais: o equipamento utilizado foi um cromatógrafo líquido de alta pressão com detecção através de um espectrômetro de massa com triplo quadrupolo (AB Sciex 5500 Qtrap), a coluna empregada foi a Restek Raptor Bifenilo (2,1 x 100 mm; 2,7 μ m), temperatura da coluna foi de 35 °C e volume de amostra injetado foi 2,0 μ L. As duas fases móveis utilizadas foram: (a) solução de ácido fórmico a 0,1% (v / v) em água e (b) solução de ácido fórmico a 1% (v / v) em metanol e fluxo da fase móvel de 0,250 mL/min. O gradiente de eluição está apresentado na Tabela 5.

Tabela 5. Gradiente de fase móvel utilizada durante as análises

Tempo (min)	Porcentagem da fase móvel (a)	Porcentagem da fase móvel (b)
0,01	99,0%	1,0%
0,10	99,0%	1,0%
3,00	85,0%	15%
3,20	10,0%	90,0%
4,00	10,0%	90,0%
4,10	99,0%	1,0%
6,90	99,0%	1,0%

A monitorização dos resultados foi realizada em modo negativo e os íons monitorados são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Relação m/z monitorada para as amostras de cabelo

Substância	Fragmentos iônicos (m/z)
Etil glicuronídeo	221,2 \rightarrow 75,0
	221,2 \rightarrow 85,0
Etil glicuronídeo-D5	226,2 \rightarrow 75,0

3.7. Validação de Método

3.7.1. Seletividade

Este experimento foi realizado preparando dez replicatas de amostras “brancos” de fluido oral ou sangue de voluntários diferentes, assegurando-se que não contenha etanol ou padrão interno, seguido por injeção de três replicatas (triplicatas) de uma amostra de fluido oral ou sangue contendo concentrações conhecida de etanol ($0,20 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,25 \text{ g.L}^{-1}$).

3.7.2. Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

A razão sinal-ruído será calculada da seguinte forma utilizando a Equação 2:

$$LDouLQ = \frac{\text{Área do etanol}}{\text{Área média do sinal ruído do branco}} \quad (\text{Equação 2})$$

Serão realizadas análises em dez replicatas de amostras de branco seguidas de análise em dez replicatas de amostras fortificadas com $0,0014 \text{ g/L}$ de etanol para obter o Limite de Detecção (LD) e dez replicatas de amostras fortificadas com $0,008 \text{ g/L}$ para encontrar o Limite de Quantificação (LQ).

3.7.3. Linearidade

Os experimentos foram realizados empregando sete concentrações ($0,05 \text{ g.L}^{-1}$, $0,10 \text{ g.L}^{-1}$, $0,20 \text{ g.L}^{-1}$, $0,50 \text{ g.L}^{-1}$, $0,75 \text{ g.L}^{-1}$, $1,00 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,25 \text{ g.L}^{-1}$) de solução padrão de etanol diferentes e analisados em oito replicatas.

Para todos os resultados obtidos neste ensaio foi aplicado o Teste de Cochran, no qual é possível avaliar se a estimativa de variância é grande ou não, comparando-o com um grupo de resultados. Se o valor calculado da variância for maior do que o valor tabelado, esta variância é então classificada como não homogênea ou heterocedástica ou como homogêneo ou homocedástico.

É possível, através dos dados obtidos, plotar um gráfico da distribuição de resíduos. O gráfico de resíduos não deve apresentar visualmente nenhum tipo de tendência.

3.7.4. Precisão

Os resultados dos ensaios de precisão devem ser avaliados através do cálculo do desvio padrão relativo (DPR), utilizando a Equação 3:

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

Onde DP é o Desvio Padrão e CMD é a Concentração Média Determinada.

A execução deste experimento foi através da análise de oito replicatas de quatro amostras fortificadas com diferentes concentrações (0,20 g.L⁻¹, 0,75 g.L⁻¹, 1,25 g.L⁻¹ e 2,00 g.L⁻¹) de solução padrão de etanol, as quais foram analisadas no mesmo dia e em três dias diferentes.

3.7.5. Exatidão

A análise da exatidão foi avaliada por meio de análises de oito replicatas de quatro amostras contendo sangue ou fluido oral com concentrações (0,20 g.L⁻¹, 0,75 g.L⁻¹, 1,25 g.L⁻¹ e 2,00 g.L⁻¹) de solução padrão de etanol, as quais foram analisadas no mesmo dia (intra-ensaio) e em mais dois dias diferentes (inter-ensaio).

O Erro Padrão Relativo, foi calculado utilizando a Equação 4:

$$EPR = \frac{(CME - CR)}{CR} \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

Onde, CME é a Concentração Média Experimental e CR é a Concentração Real.

3.7.6. Efeito Residual

Avaliou-se o efeito residual injetando uma amostra “branco”, seguido por duas injeções de soluções padrões concentrações conhecidas (0,004 g.L⁻¹ e 1,25 g.L⁻¹), sendo uma delas com a concentração de aproximadamente duas vezes o limite de detecção e uma amostra com maior concentração, respectivamente. Em seguida, analisa-se duas amostras de “branco” de sangue ou fluido oral, sem presença de etanol.

Como critério de aceitabilidade foram admitidas somente os resultados das amostras de branco que, após a injeção das soluções padrão contendo etanol, apresentarem área igual ou menor às obtidas com a primeira análise.

3.7.7. Estabilidade (Curta duração, pós-processamento e longa duração)

As amostras foram submetidas ao ensaio de estabilidade de curta duração e mantidas no suporte do equipamento sob condição ambiente (23,0 ° C) durante 06 horas (estabilidade de curta duração), 12 horas (estabilidade pós-processamento) e 24 horas (estabilidade de longa duração) até o momento de sua da análise. Para a estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento foi necessário expor as amostras fortificadas a ciclos de congelamento (-10 ° C) e descongelamento durante 24, 48 e 72 horas após seu preparo, também foram avaliadas as amostras após um maior tempo de armazenamento de (7 e 30 dias).

O critério de avaliação foi baseado nos valores de Desvio Padrão Relativo (DPR%) e somente as amostras que apresentarem valores de DPR menores ou iguais a 15% foram aceitos.

3.8. Sequenciamento e Análises genéticas

As amostras de sangue foram coletadas dos voluntários no Hemocentro de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP) e os dados genéticos foram obtidos através de uma parceria com o Laboratório de Pesquisas Forenses e Genética (LPFG) sob coordenação do Prof. Dr. Celso Teixeira Mendes Júnior.

O método de extração do material genético foi realizado a partir de amostras de sangue total submetidas a um processo de *salting out* adaptados de Miller *et al.* (1988). O DNA foi ressuspensão em 200 μ L de água e armazenados a -20°C .

A quantificação do DNA foi realizada através de três metodologias e, em seguida, diluição em água. A primeira quantificação foi realizada com a eletroforese em gel de agarose para determinar possíveis degradações nas amostras, a segunda quantificação foi realizada com o intuito de avaliar a presença de proteínas contaminantes por meio de espectrofotometria (*Nanodrop 200 UV-Vis Spectrophotometer, Thermo Fischer Scientific Inc.*) e a terceira metodologia empregada foi fluorimetria (*Qubit® 2.0 Fluorometer, Thermo Fischer Scientific Inc.*) para determinar a concentração DNA genômico com acurácia. As amostras foram separadas em alíquotas de 5 ng/ μ L.

Após a quantificação foi realizado o preparo de bibliotecas para NGS (*Next Generation Sequencing*), onde as regiões de interesse para o sequenciamento são amplificadas por PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Para o preparo dessas bibliotecas foi utilizado o kit *HaloPlex Target Enrichment System (Agilent Technologies, Inc.)* com sondas desenhadas a partir de um ensaio *in silico (SureDesign, Agilent Technologies, Inc.)*. As cinco etapas deste processo são descritas a seguir:

- i) Digestão das amostras com enzimas de restrição;
- ii) Hibridização dos fragmentos alvo com sondas complementares aos fragmentos alvos;
- iii) Captura dos fragmentos hibridizados por meio de *beads* magnéticas;
- iv) Amplificação dos fragmentos por PCR;
- v) Purificação.

As bibliotecas foram validadas e quantificadas por eletroforese capilar *2100 BioAnalyzer (Agilent Technologies, Inc.)* e fluorimetria (*Qubit® 2.0 Fluorometer, Thermo Fischer Scientific Inc.*).

Ao término da validação, foi preparando um *pool* de até 96 amostras para sequenciamento simultâneo, onde todas as amostras possuíam concentrações próximas, para terem representatividade parecidas. Este *pool* foi diluído até obter um volume final de 600 μ L e concentração de 16 pM.

Essa solução foi inserida em um cartucho *MiSeq Reagent Kit V3 (600 cycle)* e sequenciado no *MiSeq Personal Sequence (Illumina Inc.)* no modo *paired-end*, conforme instruções do fabricante.

Também foi realizado uma genotipagem do tipo Array, onde cerca 1,8 milhão de SNPs foram sequenciados a partir das amostras de DNA empregando o chip *Infinium Multi-Ethnic Global-8*

(MEGA) *Kit (Illumina)* e a plataforma *HiScanSQ System (Illumina Inc.)*. Esta genotipagem foi realizada pelo Centro de Genômica Funcional da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP) em parceria com o Prof. Dr. Esteban J. Parra da Universidade de Toronto e Prof. Dr. Heather L. Northon, da Universidade de Cincinnati.

O procedimento, segundo recomendações do fabricante, sem quaisquer alterações se encontra disponível em: https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/infinium_assays/infinium_lcg_assay/infinium-lcg-assay-reference-guide-15023139-04.pdf.

De forma simplificada, o processo pode ser resumido em seis etapas:

- i) Amplificação do DNA genômico;
- ii) Fragmentação com enzimas de restrição;
- iii) Precipitação e ressuspensão do DNA;
- iv) Distribuição e posterior hibridização do DNA com os *primers*;
- v) Extensão do *primer* de uma única base nucleotídica marcada e identificação do sinal por ela emitido;
- vi) Leitura do sinal e coleta dos dados de intensidade da coloração emitida.

3.9. Análises Estatísticas

Foram realizadas análises descritivas dos dados para avaliar o comportamento das amostras através de tabelas com medidas básicas e gráficos de médias conforme a necessidade. As principais medidas calculadas foram: média e o desvio padrão. A média é o valor que auxilia a compreender onde existe uma maior concentração dos dados em determinada distribuição e o desvio padrão é uma ferramenta que avalia a dispersão dos dados (Morettin, 2002).

Para avaliar se as diferenças entre os grupos foram significativas, foi utilizada uma abordagem do tipo não paramétrica através do teste de Mann Whitney. Este é um teste de hipóteses, utilizado quando o objetivo é avaliar duas amostras independentes e para avaliar se as médias de duas populações são as mesmas. Esta abordagem é uma alternativa não paramétrica para o teste de *t-Student* aplicados em amostras independentes e que não exige que as populações sejam uma distribuição Normal. Além disso, não requer a hipótese de igualdade de variâncias e nem que o tamanho das amostras seja idêntico. O nível de significância adotado para todos os testes deste trabalho foi de 5%. Dessa forma, rejeita-se a hipótese testada quando o p-valor do teste for menor do que 0,05 (Hollander, 1978; Conover, 1980). O software utilizado para a análise foi o *R Core Team* (2017).

As variáveis deste estudo foram:

1. **Trajeto:** dois tipos de trajetos, sendo que em um deles o motorista respondia uma mensagem através do aplicativo WhatsApp, e no outro sem interferência do celular;
2. **Coleta:** representa o tempo em que foram coletadas as amostras (0: primeira coleta, 30: 30min depois da primeira coleta; 60: 60 minutos depois da primeira coleta);
3. **Etilômetro L:** medida do álcool ingerido utilizando o etilômetro do laboratório;
4. **Etilômetro P:** medida do álcool ingerido utilizando o etilômetro da Polícia;
5. **Fluido oral:** medida do álcool ingerido (g.L^{-1});
6. **Sangue:** medida do álcool ingerido (g.L^{-1});
7. **Tempo de percurso:** tempo em segundos do percurso;
8. **Velocidade:** Velocidade máxima no percurso (Km/h);
9. **Tempo frenagem:** Tempo de reação na frenagem (seg.);
10. **Distancia de frenagem:** Distância percorrida na frenagem (m);
11. **Seta:** Se utilizou ou não seta;
12. **Nseta:** Número de setas ativadas;
13. **Acelerou:** aceleração brusca sim ou não;
14. **Derrubou:** Se derrubou ou não cones;
15. **Freou:** frenagem brusca ou não;
16. **Whats:** utilização do WhatsApp (1: sem o app , 2:com o app);
17. **Sexo:** Feminino e Masculino.

4. Resultados e Discussão

4.1. Validação

4.1.1. Fluido oral

4.1.1.1. Seletividade

Para a confirmação da ausência de picos com intensidade que pudessem mascarar a presença de etanol, foram realizadas análises em um “pool” de fluido oral isento de etanol. Em seguida uma solução de fluido oral fortificada com $0,20 \text{ g.L}^{-1}$ de etanol foi analisada e o cromatograma obtido foi sobreposto com um cromatograma do “pool” de fluido oral.

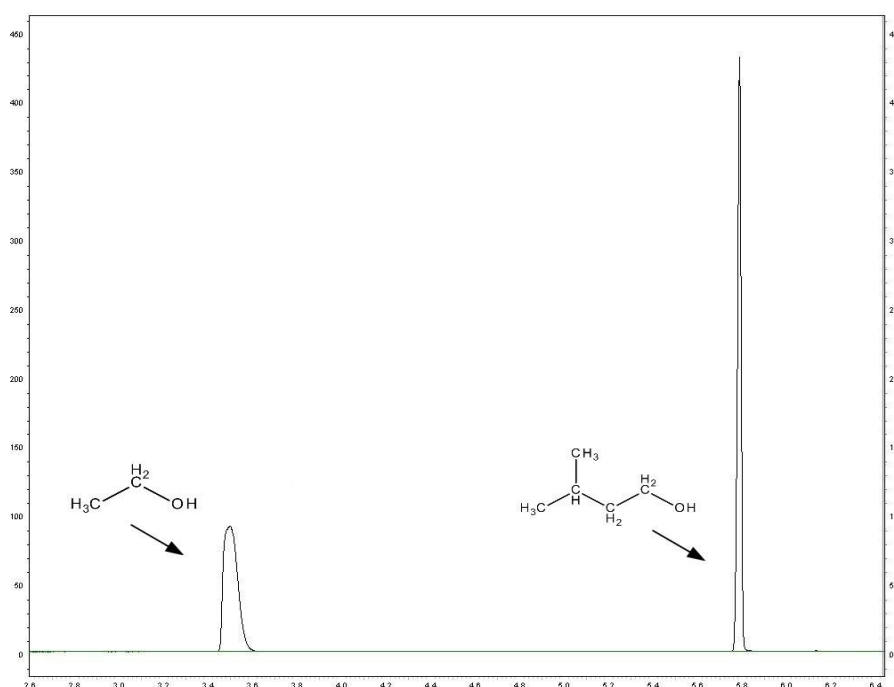


Figura 10. Sobreposição do cromatograma da solução fortificada (registro em preto) com o cromatograma de uma solução de fluido oral isentas de etanol (registro em verde), não existe nenhum pico presente no “pool” fluido oral não fortificado que interfira na determinação do etanol.

Nas Tabela 7 e Tabela 8, estão relacionados os resultados das análises de seletividade para o fluido oral. Na Tabela 7 estão apresentadas as áreas dos picos cromatográficos nos tempos de retenção no qual são detectados o analito e o padrão interno obtidos a partir das amostras de branco do fluido oral, na Tabela 8 encontram-se os valores de áreas de amostras fortificadas com $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,25 \text{ g.L}^{-1}$ de etanol.

Tabela 7. Valores de área das regiões próximas ao tempo de retenção do etanol e do álcool isoamílico (padrão interno) obtidos a partir das análises de amostras de branco de fluido oral

Amostra Branco	Área próxima ao t_R do etanol	Área próxima ao t_R do PI
1	25867	6748
2	27670	4386
3	30688	9882
4	49352	5387
5	55518	4942
6	49368	3581
7	57362	3422
8	53623	2801
9	43867	3018
10	60242	3367
Média	57658	4753,4

Tabela 8. Valores de área obtidos a partir das análises de amostras de fluido oral fortificadas com solução padrão de etanol

Concentração Etanol (g.L ⁻¹)	Área Etanol	Área PI
0,20	3146201	3796719
0,20	4426057	5297636
0,20	4121218	4862250
Média	3897825	4652201
Concentração Etanol (g.L ⁻¹)	Área Etanol	Área PI
1,25	31432828	5886422
1,25	28347168	5295563
1,25	27885416	5168282
Média	29221804	5450089

O método analítico empregado é seletivo para o etanol visto que, mesmo para amostras fortificadas com baixas concentrações de etanol, é possível distingui-las facilmente de amostras isentas de etanol.

4.1.1.2. Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

Limite de Detecção (LD)

O cálculo utilizado para encontrar a relação sinal ruído para o LD foi realizado utilizando a Equação 5 a seguir:

$$LD = \frac{\text{Área do etanol}}{\text{Área média do sinal ruído do branco}} \quad (\text{Equação 5})$$

Substituindo o valor de área obtido após a análise de uma solução de fluido oral fortificada com 0,0014 g.L⁻¹ de etanol e o valor médio da área obtido durante as análises de amostras de fluido oral isentas de etanol, teremos a seguinte relação sinal ruído:

$$LD = \frac{49352}{25437} = 1,94 \quad (\text{Equação 6})$$

Tabela 9. Cálculos da razão sinal ruído para determinar o Limite de Detecção (LD) do fluido oral.

Sol. Etanol 0,0014 g.L ⁻¹	Área Etanol	Razão Sinal – Ruído
1	49352	1,94
2	55518	2,18
3	49368	1,94
4	57362	2,25
5	53623	2,10
6	43867	1,72
7	60242	2,36
8	57658	2,26
9	50415	1,98
10	56488	2,22
Média		2,09

Os limites de detecção para as amostras fortificadas com solução padrão de etanol até alcançar uma concentração de 0,0014 g.L⁻¹, apresentaram a um valor médio para a razão sinal-ruído de 2,09, cumprindo assim os requisitos preditos pela ANVISA.

Limite de Quantificação (LQ)

O cálculo utilizado para encontrar a relação sinal ruído para o LQ foi realizado utilizando a Equação 7 a seguir:

$$LQ = \frac{\text{Área do etanol}}{\text{Área média do sinal ruído do branco}} \quad (\text{Equação 7})$$

Substituindo o valor de área obtido após a análise de uma solução de fluido oral fortificada com 0,008 g.L⁻¹ de etanol e o valor médio da área obtido durante as análises de amostras de fluido oral isentas de etanol, teremos a seguinte relação sinal ruído:

$$LQ = \frac{680801}{21962,2} = 30,99 \quad (\text{Equação 8})$$

Tabela 10. Cálculos da razão sinal ruído para determinar o Limite de Quantificação (LQ) do fluido oral.

Sol. Etanol 0,008 g.L ⁻¹	Área Etanol	Razão Sinal – Ruído
1	680801	30,99
2	718023	32,69
3	942118	42,69
4	844481	38,45
5	744516	33,89
6	821671	37,41
7	844998	38,47
8	766867	34,91
9	748416	34,07
10	730079	33,24
Média		35,70

Os limites de quantificação para as amostras fortificadas com solução padrão de etanol a 0,008 g.L⁻¹, apresentaram um valor média da razão sinal-ruído de 35,70, cumprindo assim os requisitos para validação de métodos analíticos proposto pela ANVISA.

Os resultados obtidos para o LD e para o LQ nas amostras de fluido oral, encontram-se dentro de valores que atendem aos requisitos sugeridos pela ANVISA, além de suprir as demandas necessárias para o método em questão.

4.1.1.3. Linearidade

Os resultados para a avaliação da linearidade do método são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Cálculos da curva analítica do fluido oral.

Cálculos da Curva Analítica	
Coefficiente Angular (a)	4,507653
Coefficiente Linear (b)	-0,028121
Coefficiente de Correlação (r)	0,995061
Coefficiente de Determinação (r ²)	0,990148
Linearidade (ANVISA)	Conforme
Variância Máxima (S ² _{máx})	0,002462
Somatória Variância	0,010170
C _{calc}	0,242128
C _{tab.}	0,3535
Resultado Cochran	Homocedástico
Modelo de Regressão	Linear

As Figuras 11 e a Figura 12 apresentam os gráficos de linearidade (curva analítica) e o gráfico de resíduos, respectivamente.

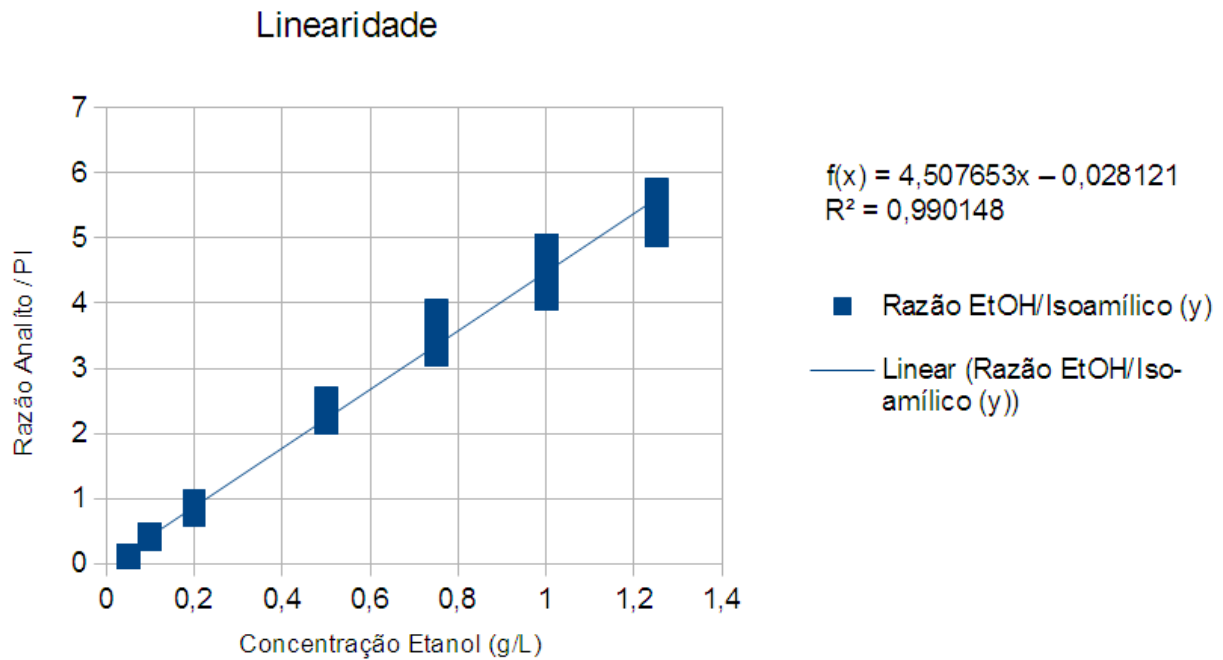


Figura 11. Gráfico da curva analítica obtido a partir das análises de amostras de fluido oral fortificadas com solução padrão de etanol.

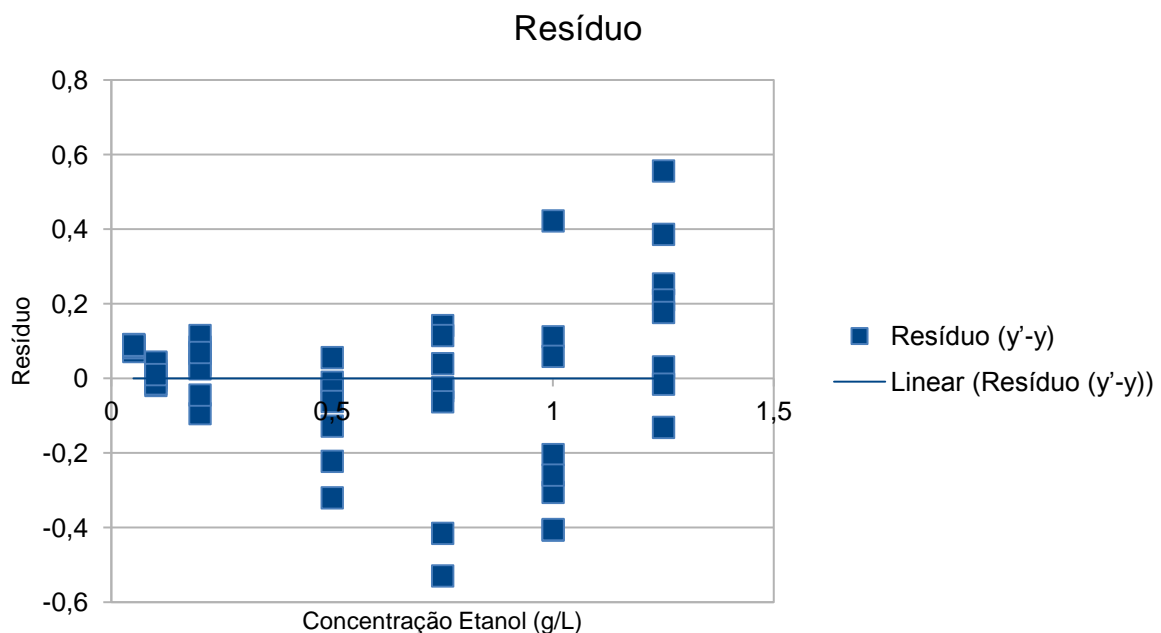


Figura 12. Gráfico de resíduos obtido a partir das análises de amostras de fluido oral fortificadas.

A partir dos resultados apresentados na Tabela 11 observa-se que a linearidade cumpre os requisitos presentes nas diretrizes de validação métodos analíticos propostos pela ANVISA, no qual exige-se que o valor de coeficiente de correlação (r) seja maior do que 0,990. Para esta curva analítica obteve-se um valor de r igual a 0,995061. Aplicando os testes de Cochran foram observados que o

conjunto de dados para a curva são homocedásticos e através do gráfico de resíduos que os dados não apresentam nenhuma tendência.

4.1.1.4. Precisão

Os cálculos de Desvio Padrão Relativo (DPR) foram realizados utilizando a Equação 3. Utilizando os resultados da Tabela 12 obtidos para a solução fortificada com 0,20 g.L⁻¹ de etanol, calcula-se o desvio padrão relativo como demonstrado a seguir:

Tabela 12. Valores de área do fluido oral fortificado com 0,20 g.L⁻¹ de solução padrão de etanol.

Réplica	Área Etanol	Área Padrão Interno	Razão Etanol/PI
1	3804597	4714318	0,807030
2	6037041	6237439	0,967871
3	4426057	5297636	0,835477
4	4286926	5430895	0,789359
5	4121218	4862250	0,847594
6	3930320	5181486	0,758531
7	4351765	4742552	0,917599
8	4194646	5221102	0,803402
	Média		0,840858
	Desvio Padrão		0,069768

Substituindo esses valores na equação acima, encontramos:

$$DPR = \frac{0,069768}{0,840858} \times 100 = 8,697 \quad (\text{Equação 9})$$

Os resultados para a avaliar a precisão intra-ensaio e precisão inter-ensaio do método são apresentados na Tabela 13 e a Figura 13 apresenta a sobreposição dos cromatogramas das análises intra e inter-ensaio.

Tabela 13. Cálculos do desvio padrão relativo (DPR) da precisão para o fluido oral.

Concentração Etanol (g.L ⁻¹)	DPR Intra-ensaio 1º dia	DPR Inter-ensaio 2º dia	DPR Inter-ensaio 3º dia
0,20	8,2972	2,4269	2,9446
0,75	7,1003	3,2656	1,2194
1,25	4,1079	0,9603	3,8894
2,00	4,9485	3,8114	3,3981

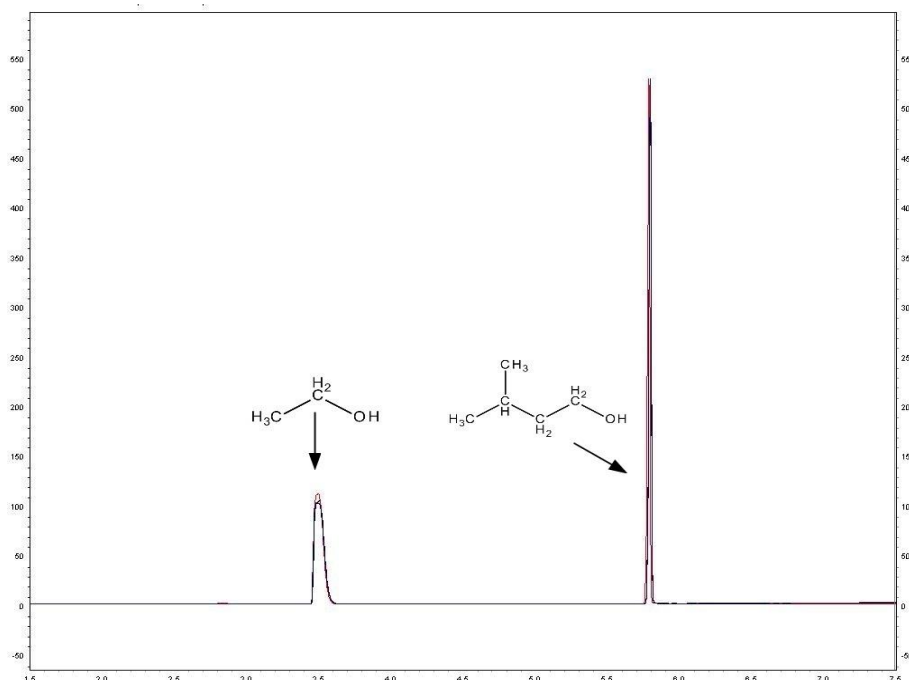


Figura 13. Sobreposição dos cromatogramas obtidos a partir da solução de fluido oral fortificada com 0,20 g.L⁻¹ de etanol, a análise intra-ensaio do primeiro dia está representada pela linha preta, a análise inter-ensaio do segundo dia pela cor vermelha e a análise inter-ensaio o do terceiro dia pela cor azul.

Os cálculos de desvio padrão relativo para análise da precisão não apresentaram valores com variações que excedessem 10%, adequando-se ao critério de aceitabilidade proposto.

4.1.1.5. Exatidão

Os cálculos de Erro Padrão Relativo (EPR) para avaliar a exatidão foram realizados utilizando a Equação 4. A concentração experimental calculada é obtida ao isolar o x na Equação 10 obtida no gráfico de linearidade e substituindo $f(x)$ pelo valor da razão Etanol/PI, logo:

$$f(x) = 4,507653x - 0,028121 \quad (\text{Equação 10})$$

Então,

$$\text{Concen. Exprim. Calculada} = x = \frac{0,8070302 + 0,028121}{4,507653} = 0,185274 \quad (\text{Equação 11})$$

Tabela 14. Valores de área do fluido oral fortificado com 0,20 g.L⁻¹ de solução padrão de etanol.

Réplica	Razão Etanol/PI	Concent. Experim. Calculada (g.L ⁻¹)
1	0,807030	0,185274
2	0,967871	0,220955
3	0,835477	0,191585
4	0,789359	0,181353
5	0,847594	0,194273
6	0,758531	0,174514
7	0,917599	0,209803
8	0,803402	0,184469
Concentração Média Experimental		0,192778

Utilizando os resultados da Tabela 14 obtidos para a solução fortificada com 0,20 g.L⁻¹ de etanol, partindo da Equação 4, calcula-se o erro padrão relativo como demonstrado a seguir. Ao substituir a concentração média experimental (0,192778 g.L⁻¹) e a concentração real (0,20 g.L⁻¹), encontramos o Erro Padrão Relativo:

$$EPR = \frac{(CME - CR)}{CR} \times 100 = \frac{(0,192778 - 0,20)}{0,20} \times 100 = -3,610658 \quad (\text{Equação 12})$$

Os resultados para a avaliar a exatidão intra-ensaio e exatidão inter-ensaio do método são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15. Cálculos do erro padrão relativo (EPR%) da exatidão para o fluido oral.

Concentração Etanol (g.L ⁻¹)	EPR Intra-ensaio 1º dia	EPR Inter-ensaio 2º dia	EPR Inter-ensaio 3º dia
0,20	-3,6106	-6,7086	-4,1551
0,75	2,8383	-4,2130	-5,5784
1,25	-3,2608	-9,2096	-4,8067
2,00	-3,4356	-7,2229	-3,6147

O erro padrão relativo calculado para análise da exatidão, tanto para os resultados intra quanto inter-ensaio, não excederam 10%. Dessa forma, como os resultados ficaram abaixo do valor predito de $\pm 15\%$ pelo critério de aceitabilidade, o método está adequado para a análise de etanol em fluido oral de acordo com a finalidade proposta.

4.1.1.6. Efeito Residual

A seguir, nas Figura 14 e a Figura 15, são apresentados os cromatogramas obtidos após a análise das soluções contendo fluido oral que foram fortificadas com $0,004 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,25 \text{ g.L}^{-1}$ de etanol, respectivamente.

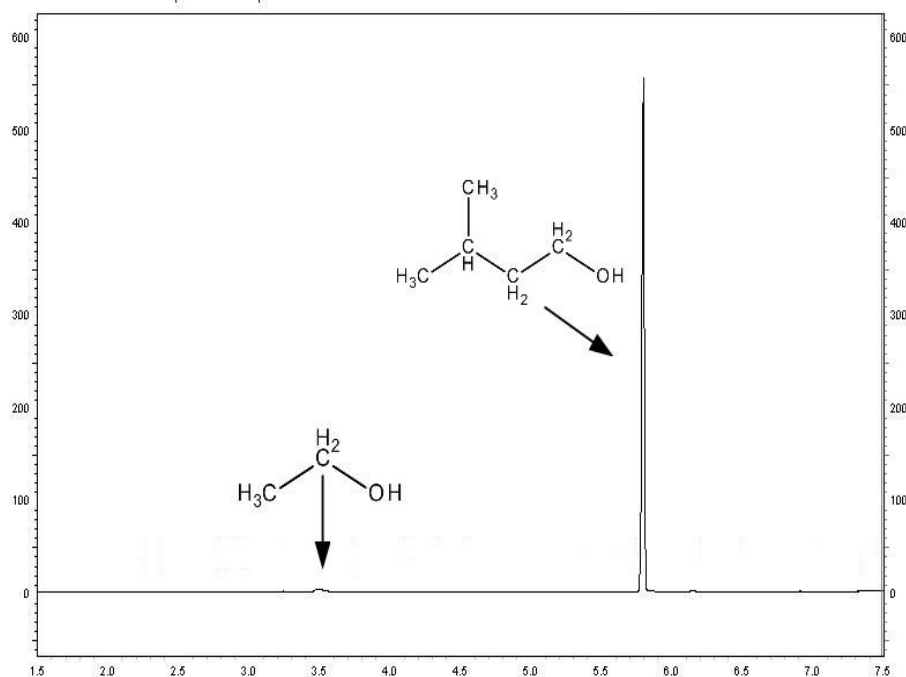


Figura 14. Cromatograma obtido após a análise de fluido oral fortificado com $0,004 \text{ g.L}^{-1}$ de etanol

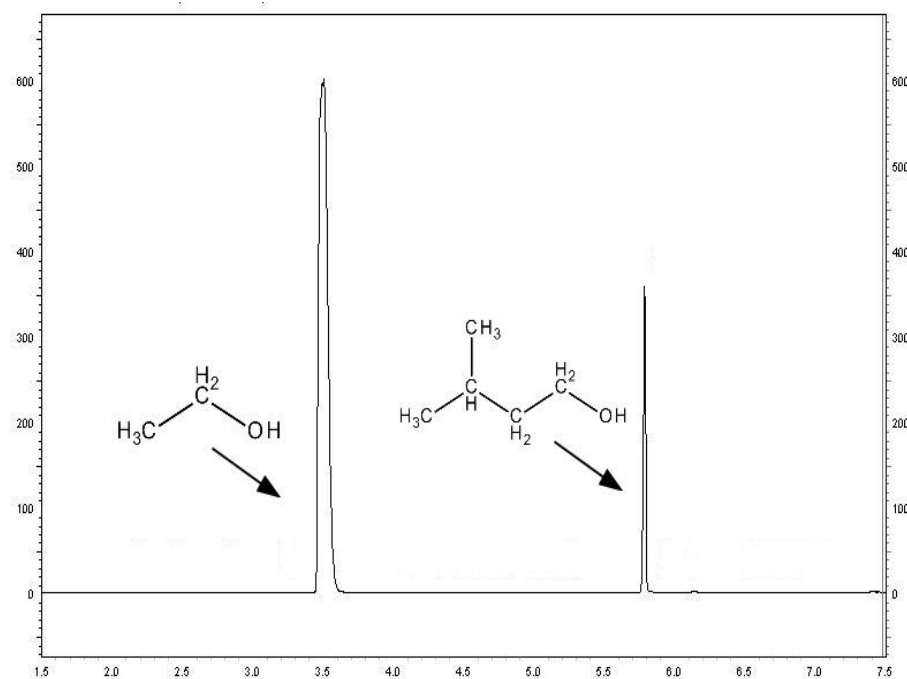


Figura 15. Cromatograma obtido após a análise de fluido oral fortificado com $1,25 \text{ g.L}^{-1}$ de etanol

Os valores encontrados de áreas para as análises do Efeito Residual em amostras de fluido oral, estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16. Valores de área obtidos com as análises do Efeito Residual nas amostras de fluido oral

Amostra	Área Etanol	Área Padrão Interno
Branco	10516	40399
Etanol (0,004 g.L ⁻¹)	90645	5150866
Etanol (1,25 g.L ⁻¹)	20815490	4171323
Branco	10422	33067
Branco	4141	11143

Com base nos cromatogramas e nos dados acima tabelados, não foram observados efeitos residuais em nenhuma das concentrações de etanol analisadas. Ou seja, com base no pico cromatográfico na região onde espera-se detectar o analito, para as amostras de branco analisadas após a injeção da solução fortificada com a concentração mais elevada da curva analítica, não foram observados sinais com intensidade grande o suficiente para mascarar uma análise de etanol em baixas concentrações.

4.1.1.7. Estabilidade

Os resultados de estabilidade foram calculados com base no Desvio Padrão Relativo, os cálculos para o fluido oral fortificado com 0,20 g.L⁻¹ de solução padrão de etanol submetido a avaliação de estabilidade por um período de 06 horas estão demonstrados na Tabela 17 a seguir:

Tabela 17. DPR calculado para o ensaio de estabilidade 06 horas de fluido oral

Réplica	Área Etanol	Área PI	Razão Etanol/PI
1	4032976	4729259	0,852771
2	4103164	4859600	0,844341
3	5040842	5698546	0,884583
	Média		0,860565
	Desvio. Padrão		0,021223
	Desvio Padrão. Relativo		2,46617

A Tabela 18 mostra os resultados de desvio padrão relativo obtidos para os parâmetros estabilidade de curta duração e estabilidade pós-processamento para o fluido oral.

Tabela 18. Valores de Desvio Padrão Relativo para a estabilidade de curta duração (06 horas) e para estabilidade de pós-processamento (12 e 24 horas) das amostras de fluido oral.

Amostra Fortificada	DPR da Estabilidade		
	Curta Duração (6 h)	Pós Processamento (12 h)	Pós Processamento (24 h)
0,2 g.L ⁻¹	2,34	2,46	8,34
1,25 g.L ⁻¹	3,87	4,02	1,25

As Figuras 16 e a Figura 17 a seguir mostram a sobreposição dos cromatogramas da estabilidade de curta duração e de pós-processamento com base nas concentrações das amostras fortificadas com base nas concentrações das amostras fortificadas.

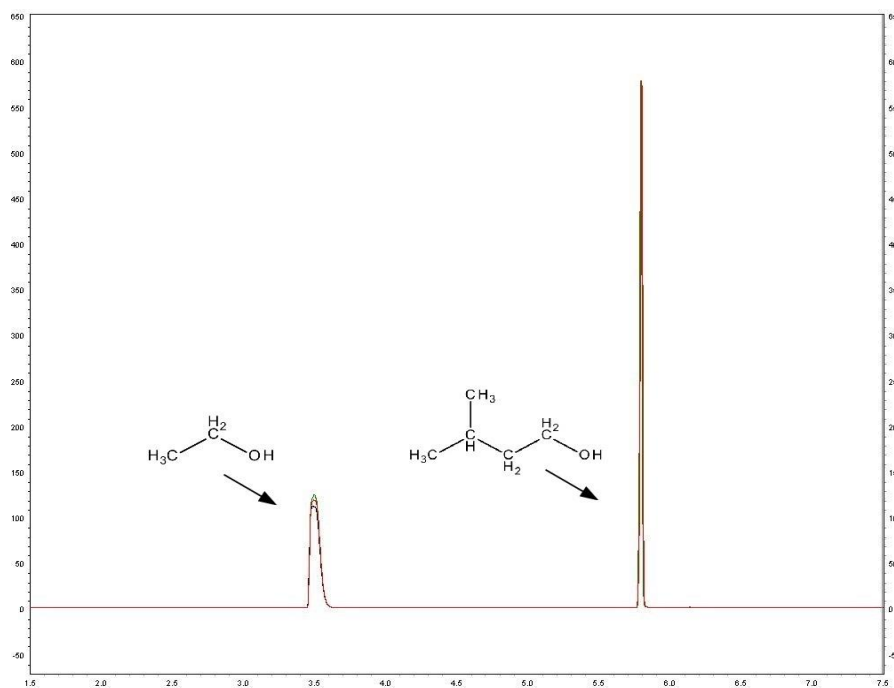


Figura 16. Sobreposição dos cromatogramas de estabilidade de curta duração e de pós-processamento (12 e 24 h) para a solução fortificada com $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ de etanol. A linha preta corresponde a análise da estabilidade de curta duração, a linha vermelha e a linha verde, corresponde a análise da estabilidade pós-processamento de 12 h e 24 h, respectivamente.

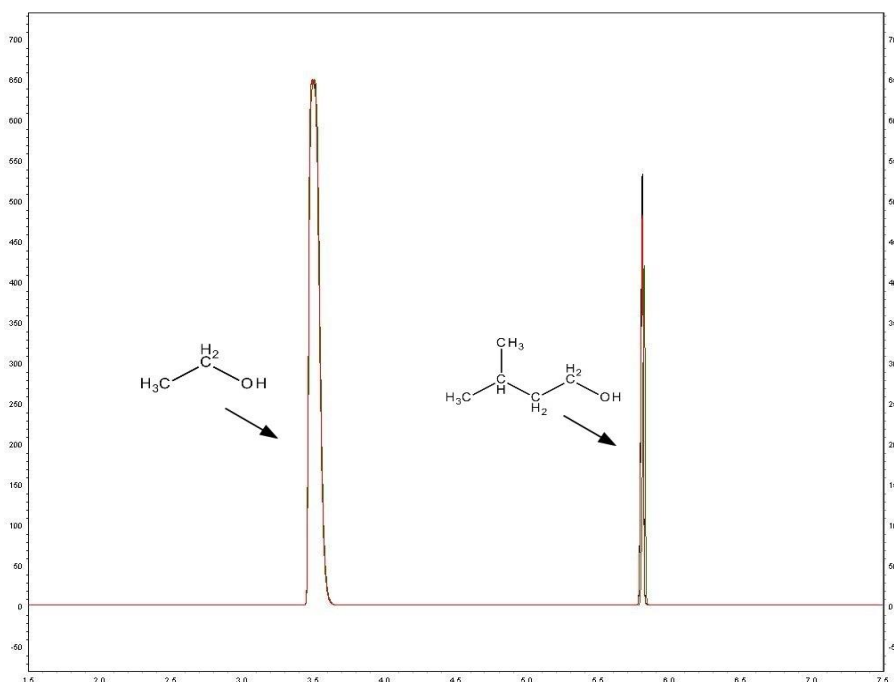


Figura 17. Sobreposição dos cromatogramas de estabilidade de curta duração e de pós-processamento (12 e 24 h) para a solução fortificada com $1,25 \text{ g.L}^{-1}$ de etanol. A linha preta corresponde a análise da estabilidade de curta duração, a linha vermelha e a linha verde, corresponde a análise da estabilidade pós-processamento de 12 h e 24h, respectivamente.

A Tabela 19 mostra os resultados de desvio padrão relativo obtidos para os parâmetros estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento.

Tabela 19. Valores de Desvio Padrão Relativo para a estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento após 24, 48, 72 horas e após 7 e 30 dias das amostras de fluido oral.

DPR dos Ciclos de Congelamento e Descongelamento					
Amostra Fortificada	24 horas	48 horas	72 horas	7 dias	30 dias
$0,2 \text{ g.L}^{-1}$	3,16	3,76	2,49	6,13	3,36
$1,25 \text{ g.L}^{-1}$	3,48	5,04	1,60	6,20	1,73

Não foram observados valores de desvio padrão relativo com variação que ultrapasse 10%, dessa forma o parâmetro de estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento cumpriu os critérios de aceitação anteriormente proposto. Portanto, mesmo se as amostras forem armazenadas em freezer por um período de até 30 dias ou se sofrerem ciclos de congelamento e descongelamento, é possível realizar análises e obter resultados satisfatórios.

4.1.2. Sangue

4.1.2.1. Seletividade

A confirmação da ausência de picos com intensidade que pudessem mascarar a presença de etanol foi realizada a partir de análises de sangue isento de etanol. Em seguida foram realizadas análises em sangue fortificado com $0,20 \text{ g.L}^{-1}$ de etanol e o cromatograma obtido a partir da sobreposição destas análises encontra-se na Figura 18.

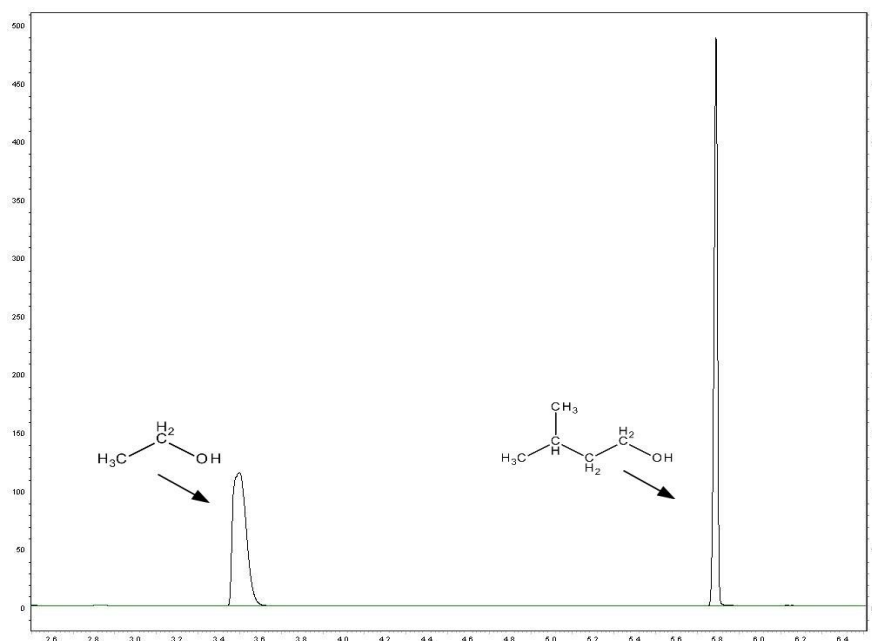


Figura 18. Sobreposição do cromatograma de sangue fortificada com solução de etanol $0,20 \text{ g.L}^{-1}$ (registro em preto) com o cromatograma de uma solução de sangue isento de etanol (registro em verde), não existe nenhum pico presente no sangue não fortificado que interfira na determinação do etanol.

As Tabela 20 e Tabela 21 apresentam os resultados de seletividade para amostras de sangue.

Tabela 20. Valores de área das regiões próximas ao tempo de retenção do etanol e do álcool isoamílico (PI) obtidos a partir das análises de amostras de branco de sangue.

Amostra Branco	Área próxima ao t_R do etanol	Área próxima ao t_R do PI
1	32859	29490
2	29237	9454
3	20145	5578
4	16028	4894
5	13125	4111
6	13509	3316
7	11594	3075
8	10014	3021
9	9496	2319
10	9870	2638
Média	16580	6789,6

Tabela 21. Valores de área obtidos a partir das análises de amostras de branco fortificados com solução padrão de etanol

Concentração Etanol (g.L ⁻¹)	Área Etanol	Área PI
0,20	4000580	4469121
0,20	4272500	5059456
0,20	4007709	4875896
Média	4093596	4801491
Concentração Etanol (g.L ⁻¹)	Área Etanol	Área PI
1,25	20908503	4287271
1,25	25897639	4688597
1,25	26074336	4719029
Média	24293493	4564966

O método analítico empregado é seletivo para análises de etanol em sangue, mesmo em amostras fortificadas com solução de etanol com baixas concentrações, é possível distingui-las facilmente de amostras isentas de etanol.

4.1.2.2. Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

Limite de Detecção (LD)

O cálculo utilizado para encontrar a relação sinal ruído para o LD foi realizado utilizando a Equação 5. Substituindo o valor de área obtido após a análise de uma solução de sangue fortificado com 0,0014 g.L⁻¹ de etanol, teremos a seguinte relação sinal ruído:

$$LD = \frac{37009}{13026,4} = 2,84 \text{ (Equação 13)}$$

Tabela 22. Cálculos da razão sinal ruído para determinar o Limite de Detecção (LD) do sangue.

Sol. Etanol 0,0014 g.L ⁻¹	Área Etanol	Razão Sinal - Ruído
1	37009	2,84
2	45029	3,45
3	35146	2,69
4	34379	2,63
5	34683	2,66
6	36413	2,79
7	35295	2,71
8	39030	2,99
9	37031	2,84
10	32153	2,46
Média		2,81

Os limites de detecção para as amostras fortificadas com solução padrão de etanol 0,0014 g.L⁻¹, apresentaram a um valor médio para a razão sinal-ruído de 2,81, estando dentro dos parâmetros preconizados pela ANVISA (ANVISA, 2017).

Limite de Quantificação (LQ)

O cálculo utilizado para encontrar a relação sinal ruído para o LQ foi realizado utilizando a Equação 7. Substituindo o valor de área obtido após a análise de uma solução de sangue fortificado com 0,008 g.L⁻¹ de etanol, teremos a seguinte relação sinal ruído:

$$LQ = \frac{680801}{21962,2} = 30,99 \text{ (Equação 14)}$$

Tabela 23. Cálculos da razão sinal ruído para determinar o Limite de Quantificação (LQ) do sangue.

Sol. Etanol 0,008 g.L ⁻¹	Área Etanol	Razão Sinal - Ruído
1	158563	25,17
2	133108	21,13
3	139866	22,20
4	140045	22,23
5	139849	22,20
6	115440	18,32
7	126095	20,01
8	127160	20,18
9	139296	22,11
10	137123	21,76
Média		21,53

Os limites de quantificação para as amostras fortificadas com solução padrão de etanol a 0,008 g.L⁻¹, apresentaram um valor médio da razão sinal-ruído de 21,53, cumprindo assim os requisitos para validação de métodos analíticos proposto pela ANVISA.

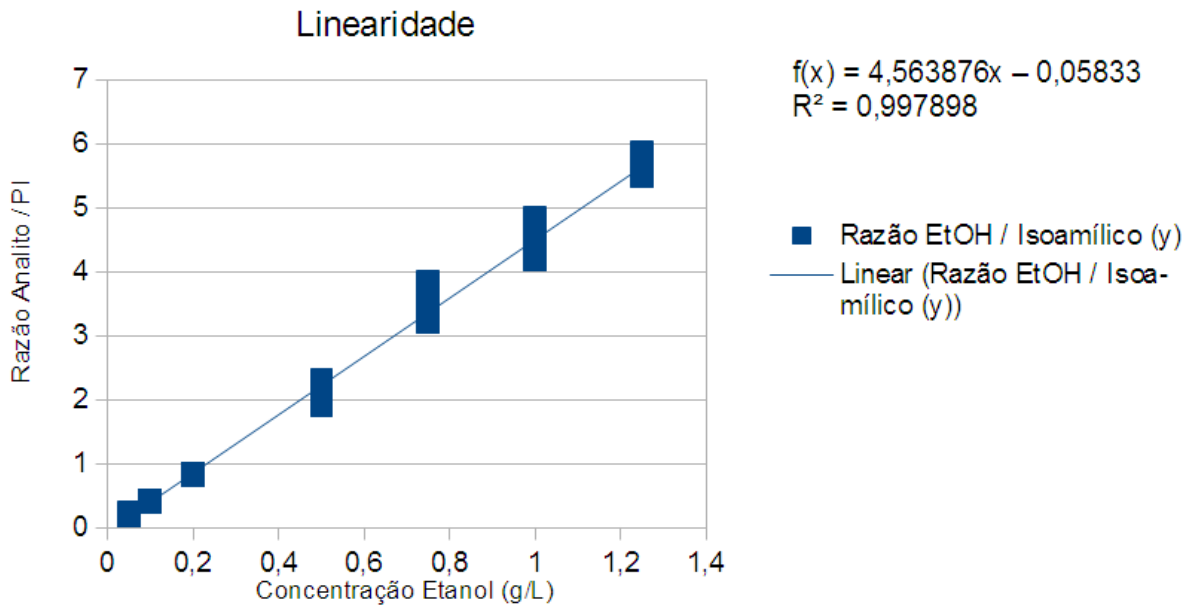
Os resultados obtidos para o LD e para o LQ nas amostras de sangue, estão adequadas aos requisitos sugeridos pela ANVISA, atendendo as demandas necessárias para as análises utilizando método em questão.

4.1.2.3. Linearidade

O resultado para a avaliação da linearidade do método para o sangue está apresentado na Tabela 24. As Figura 19 e a Figura 20 apresentam o gráfico de linearidade com sua respectiva equação de reta e o gráfico de resíduos, respectivamente.

Tabela 24. Cálculos da curva analítica do sangue.

Cálculos da Curva Analítica	
Coefficiente Angular (a)	4,563876
Coefficiente Linear (b)	-0,05833
Coefficiente de Correlação (r)	0,997898
Coefficiente de Determinação (r ²)	0,995801
Linearidade (ANVISA)	Conforme
Variância Máxima (S ₂ máx)	0,000403
Somatória Variância	0,002749
C calc	0,146865
C tab.	0,3535
Resultado Cochran	Homocedástico
Modelo de Regressão	Linear

**Figura 19.** Gráfico da curva analítica obtido a partir das análises de amostras de sangue fortificadas com solução padrão de etanol

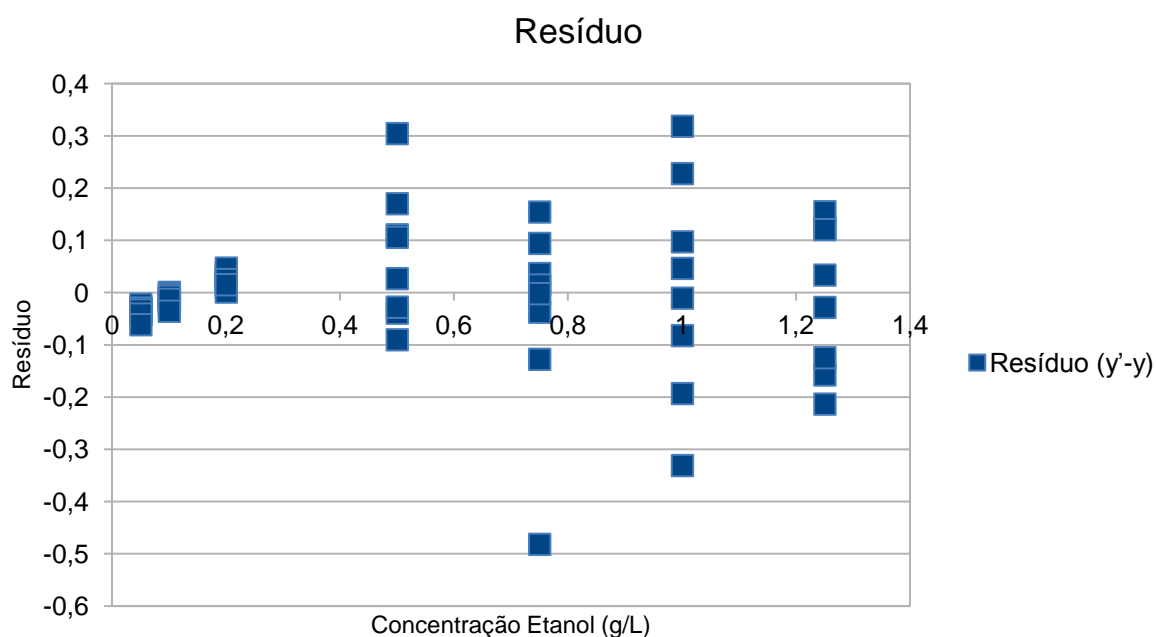


Figura 20. Gráfico de resíduos obtido a partir das análises de amostras de sangue fortificado

Observa-se que a linearidade para o sangue, cumpre os requisitos das diretrizes de validação métodos analíticos propostos pela ANVISA, no qual exige-se que o valor de coeficiente de correlação (r) seja maior do que 0,990. Para a curva analítica de linearidade em questão o valor de r foi igual a 0,997898. Com os testes de Cochran foram observados que o conjunto de dados desta curva são homocedásticos e através do gráfico de resíduos que os dados não apresentam nenhuma tendência.

4.1.2.4. Precisão

Os cálculos de Desvio Padrão Relativo (DPR) foram calculados empregando a Equação 3. A partir dos resultados da Tabela 25 obtidos para a solução fortificada com $0,20 \text{ g.L}^{-1}$ de etanol, calcula-se o desvio padrão relativo como demonstrado a seguir:

Tabela 25. Valores de área do sangue fortificado com $0,20 \text{ g.L}^{-1}$ de solução padrão de etanol.

Réplica	Área Etanol	Área Padrão Interno	Razão Etanol/PI
1	4272500	5059456	0,844458
2	4007709	4875896	0,821943
3	3886002	4766805	0,815221
4	3959261	4905856	0,807047
5	4153991	4975925	0,834817
6	4081823	4924473	0,828885
7	4480726	5253332	0,852930
8	3858358	4599492	0,838861
	Média		0,830521
	Desvio Padrão		0,015334

Substituindo na equação esses valores, encontramos:

$$DPR = \frac{0,015334}{0,830521} \times 100 = 1,8462 \quad (\text{Equação 15})$$

Os resultados para a avaliar a precisão intra-ensaio e precisão inter-ensaio do método são apresentados na Tabela 26 e a Figura 21 apresenta a sobreposição dos cromatogramas das análises intra e inter-ensaio.

Tabela 26. Cálculos do desvio padrão relativo (DPR) da precisão para o sangue.

Concentração Etanol (g.L ⁻¹)	DPR Intra-ensaio 1º dia	DPR Inter-ensaio 2º dia	DPR Inter-ensaio 3º dia
0,20	1,8462	2,7068	1,8939
0,75	5,7495	3,8318	5,2992
1,25	2,5041	3,1622	3,0686
2,00	6,9786	3,4017	1,8278

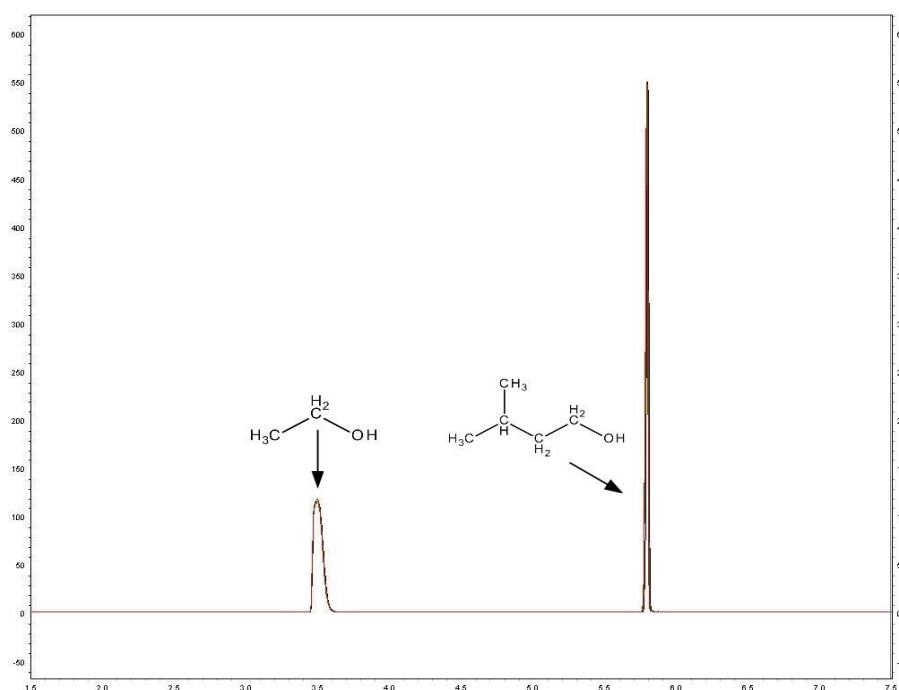


Figura 21. Sobreposição dos cromatogramas nas análises intra-ensaio e inter-ensaio obtidos a partir da solução de sangue fortificado com 0,20 g.L⁻¹ de etanol, análise intra-ensaio está representada pela linha preta, a análise inter-ensaio do segundo dia pela cor rosa e a análise inter-ensaio o do terceiro dia pela cor vermelha

Os cálculos de desvio padrão relativo para análise da precisão não apresentaram valores com variações que excedessem 10%, adequando-se ao critério de aceitabilidade proposto.

4.1.2.5. Exatidão

Os cálculos do Erro Padrão Relativo (EPR) para avaliar a exatidão foram realizados da seguinte maneira, utilizando a Equação 4. A concentração experimental calculada é obtida ao isolar o x na equação obtida no gráfico de linearidade e substituindo $f(x)$ pelo valor da razão Etanol/PI, logo:

$$f(x) = 4,563876x - 0,05833 \quad (\text{Equação 16})$$

Então,

$$\text{Concen. Experim. Calculada} = x = \frac{0,844458 + 0,05833}{4,563876} = 0,197921 \quad (\text{Equação 17})$$

Tabela 27. Valores de área do sangue fortificado com 0,20 g.L⁻¹ de solução padrão de etanol.

Réplica	Razão Etanol/PI	Concentração. Experim. Calculada (g.L ⁻¹)
1	0,844458	0,197921
2	0,821943	0,192987
3	0,815221	0,191515
4	0,807047	0,189724
5	0,834817	0,195808
6	0,828885	0,194509
7	0,852930	0,199777
8	0,838866	0,196695
Concentração Média Experimental		0,194867

Utilizando os resultados da Tabela 27 obtidos para a solução contendo sangue e fortificada com 0,20 g.L⁻¹ de etanol, calcula-se o erro padrão relativo como demonstrado a seguir. Ao substituir a concentração média experimental (0,194867 g.L⁻¹) e a concentração real (0,20 g.L⁻¹), encontramos o Erro Padrão Relativo:

$$EPR = \frac{(CME - CR)}{CR} \times 100 = \frac{(0,194867 - 0,20)}{0,20} \times 100 = -2,566228 \quad (\text{Equação 18})$$

Os resultados para a avaliar a exatidão intra-ensaio e exatidão inter-ensaio do método são apresentados na Tabela 28.

Tabela 28. Cálculos do erro padrão relativo (EPR%) da exatidão para o fluido oral.

Concentração. Etanol (g.L ⁻¹)	EPR Intra-ensaio 1º dia	EPR Inter-ensaio 2º dia	EPR Inter-ensaio 3º dia
0,20	-2,566228	-2,711575	-3,514698
0,75	1,280930	2,141463	4,879690
1,25	0,202929	-3,100897	-1,710191
2,00	-0,474434	-3,025696	-3,756532

O erro padrão relativo calculado para análise da exatidão, tanto para os resultados intra quanto inter-ensaio, não excederam 10%. Dessa forma, como os resultados ficaram abaixo do valor predito de $\pm 15\%$ pelo critério de aceitabilidade, o método está adequado para a análise de etanol em sangue de acordo com a finalidade proposta.

4.1.2.6. Efeito Residual

A seguir, nas Figura 22 e a Figura 23, são apresentados os cromatogramas obtidos após a análise das soluções contendo sangue que foram fortificadas com $0,004 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,25 \text{ g.L}^{-1}$ de etanol, respectivamente.

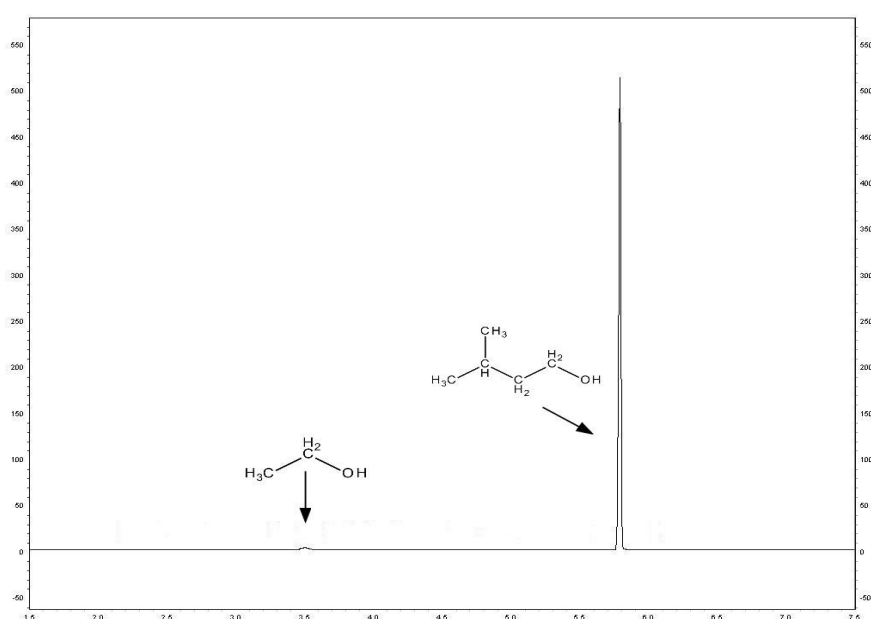


Figura 22. Cromatograma obtido após a análise de sangue fortificado com $0,004 \text{ g.L}^{-1}$ de etanol

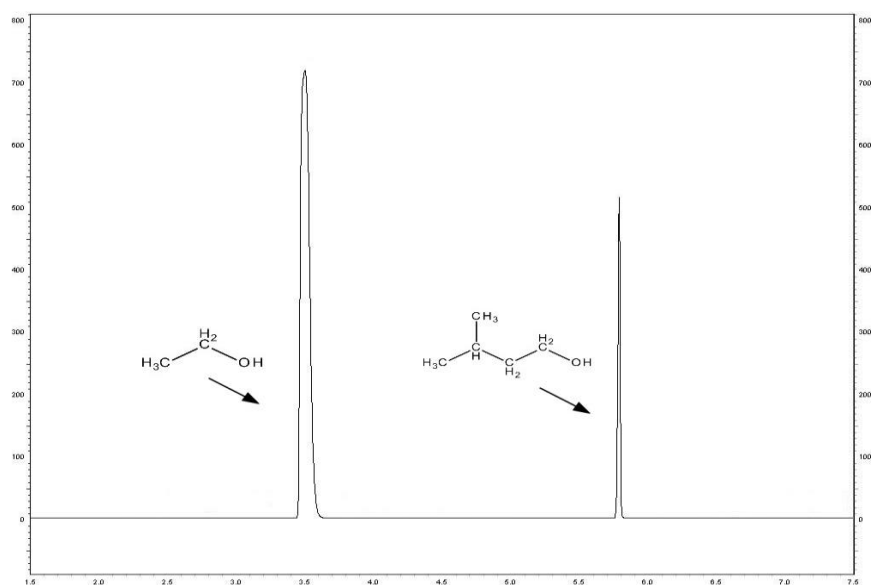


Figura 23. Cromatograma obtido após a análise de sangue fortificado com $0,004 \text{ g.L}^{-1}$ de etanol

Os valores encontrados de áreas para as análises do Efeito Residual em amostras de sangue, estão apresentados na Tabela 29:

Tabela 29. Valores de área obtidos com as análises do Efeito Residual nas amostras de sangue

Amostra	Área Etanol	Área Padrão Interno
Branco	10516	40399
Etanol (0,004 g.L ⁻¹)	90645	5150866
Etanol (1,25 g.L ⁻¹)	20815490	4171323
Branco	10422	33067
Branco	4141	11143

Com base nos cromatogramas e nos dados acima tabelados, não foram observados efeitos residuais em nenhuma das concentrações de etanol analisadas. Não existem picos cromatográficos na região onde espera-se detectar o analito, mesmo após a injeção da solução fortificada com a concentração mais elevada da curva analítica, não foram observados sinais com intensidade grande o suficiente para mascarar uma análise de etanol em baixas concentrações.

4.1.2.7. Estabilidade

Os resultados de estabilidade foram calculados com base no Desvio Padrão Relativo, os cálculos para o sangue fortificado com 0,20 g.L⁻¹ de solução padrão de etanol submetido a avaliação de estabilidade por um período de 06 horas estão demonstrados na Tabela 30 a seguir:

Tabela 30. DPR calculado para o ensaio de estabilidade 06 horas de sangue

Réplica	Área Etanol	Área PI	Razão Etanol/PI
1	4105132	4681767	0,876833
2	4250277	4873588	0,872104
3	3979468	4683685	0,849644
	Média		0,866128
	Desvio Padrão		0,014526
	Desvio Padrão Relativo		1,677010

A Tabela 31 mostra os resultados de desvio padrão relativo obtidos para os parâmetros estabilidade de curta duração e estabilidade pós-processamento.

Tabela 31. Valores de Desvio Padrão Relativo para a estabilidade de curta duração (06 horas) e para estabilidade de pós-processamento (12 e 24 horas) das amostras.

Amostra Fortificada	DPR da Estabilidade		
	Curta Duração (6 h)	Pós Processamento (12 h)	Pós Processamento (24 h)
0,2 g.L ⁻¹	1,67	2,60	5,60
1,25 g.L ⁻¹	5,10	6,68	3,24

As Figuras 24 e a Figura 25 a seguir mostram a sobreposição dos cromatogramas da estabilidade de curta duração e de pós-processamento com base nas concentrações das amostras fortificadas.

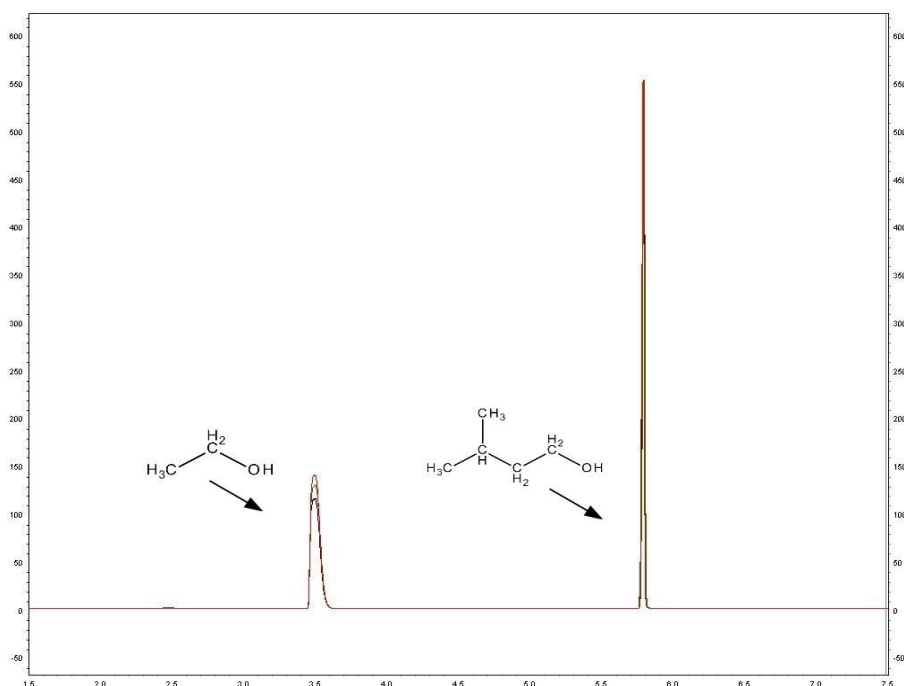


Figura 24. Sobreposição dos cromatogramas de estabilidade de curta duração e de pós-processamento (12 e 24 h) para a solução fortificada com $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ de etanol. A linha preta corresponde a análise da estabilidade de curta duração, a linha vermelha e a linha verde, corresponde a análise da estabilidade pós-processamento de 12 h e 24 h, respectivamente.

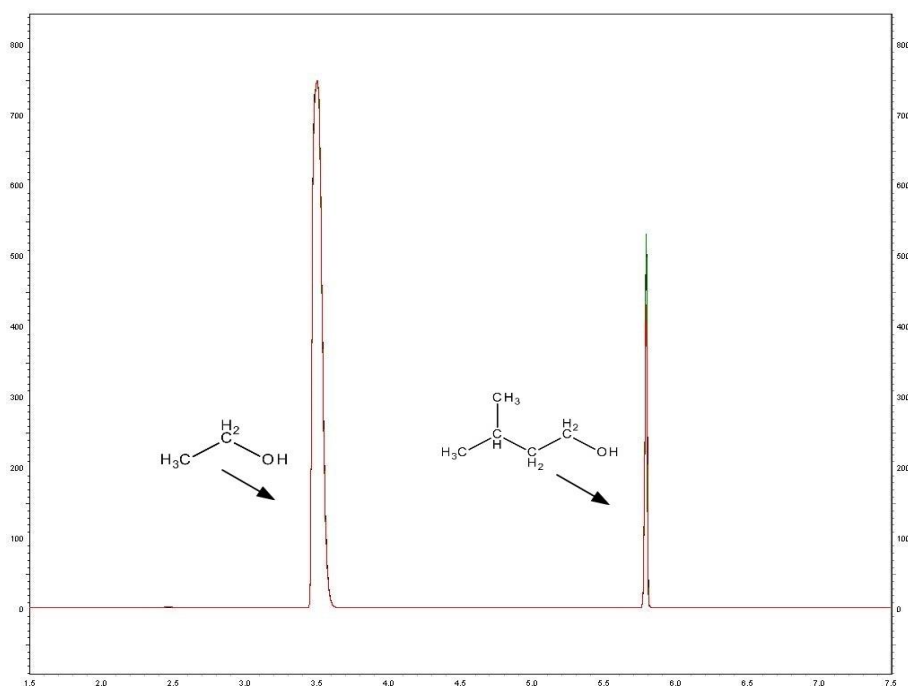


Figura 25. Sobreposição dos cromatogramas de estabilidade de curta duração e de pós-processamento (12 e 24 h) para a solução fortificada com $1,25 \text{ g.L}^{-1}$ de etanol. A linha preta corresponde a análise da estabilidade de curta duração, a linha vermelha e a linha verde, corresponde a análise da estabilidade pós-processamento de 12 h e 24 h, respectivamente.

A Tabela 32 mostra os resultados de desvio padrão relativo obtidos para os parâmetros estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento.

Tabela 32. Valores de Desvio Padrão Relativo para a estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento após 24, 48, 72 horas e após 7 e 30 dias das amostras de sangue.

DPR dos Ciclos de Congelamento e Descongelamento					
Amostra Fortificada	24 horas	48 horas	72 horas	7 dias	30 dias
$0,2 \text{ g.L}^{-1}$	1,91	5,53	4,08	1,13	1,10
$1,25 \text{ g.L}^{-1}$	1,06	5,11	2,20	6,28	7,53

Não foram observados valores de desvio padrão relativo com valores superiores a 10%, cumprindo os critérios de aceitação anteriormente proposto. Portanto, mesmo após submetidas ao armazenamento em freezer por até 30 dias ou após diversos ciclos de congelamento e descongelamento, é possível realizar análises e obter resultados satisfatórios.

4.2. Curva de Metabolização

Os resultados apresentados a seguir foram obtidos de um experimento piloto para avaliar a capacidade do método analítico em quantificar etanol em algumas gotas de sangue e monitorar ao longo do tempo os níveis de alcoolemia. Esses dados serviram de base para estabelecer alguns critérios experimentais que posteriormente foram utilizados em outras etapas deste estudo, como os intervalos de coleta das amostras e critérios de classificação do tipo de metabolismo na avaliação genética.

Os valores das concentrações de etanol encontradas nas amostras de sangue e fluido oral encontram-se tabelados no Anexo 03. Foram analisadas um total de 30 amostras, sendo 20 delas amostras de fluido oral e 10 amostras de sangue. Os dados serão apresentados na seguinte ordem: primeiro os resultados de todos os voluntários, e posteriormente serão separados conforme o sexo.

Os valores médios da concentração de etanol em função do tempo e o desvio padrão relativo para o sangue está apresentados na Tabela 33 e para o fluido oral estão apresentados na Tabela 34, respectivamente.

Tabela 33. Concentração média de etanol em sangue após ingestão de vodca, onde o volume ingerido por voluntário é equivalente a 0,5g de etanol por quilograma de massa corpórea.

Tempo (min)	Concentração média (g.L ⁻¹)	Desvio Padrão
15	0,0201	0,0036
30	0,0235	0,0064
45	0,0266	0,0069
60	0,0293	0,0054
75	0,0289	0,0087
90	0,0271	0,0066
105	0,0251	0,0051
120	0,0237	0,0055
135	0,0224	0,0045
150	0,0204	0,0030

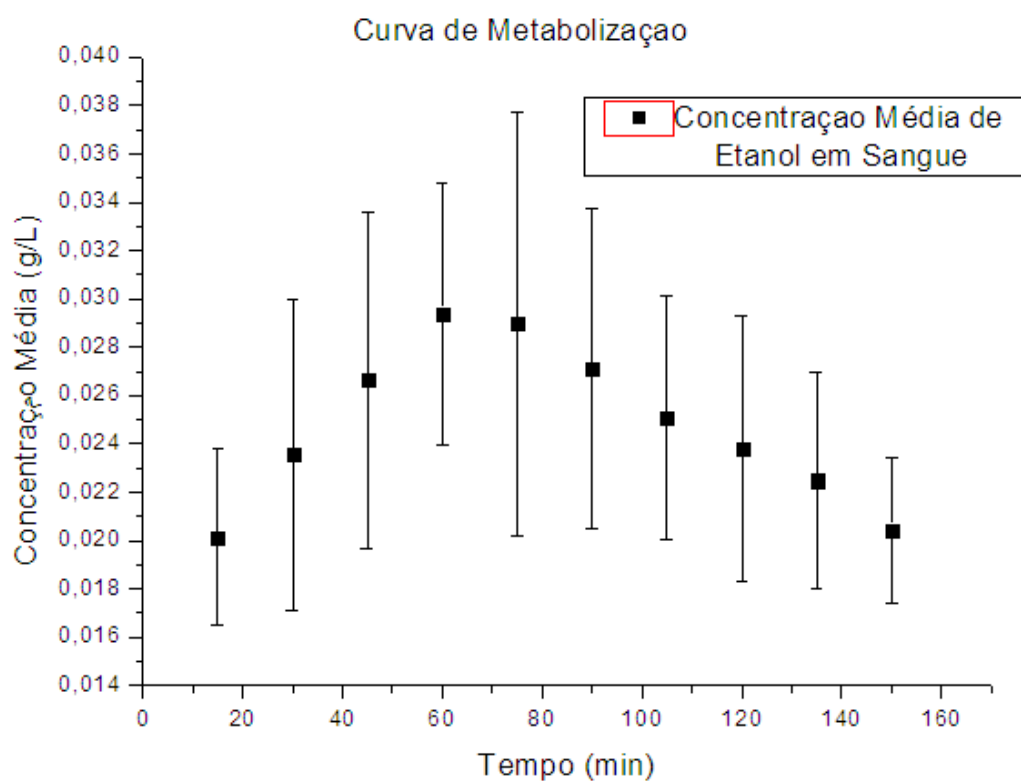


Figura 25. Concentração de etanol em função do tempo nas amostras de sangue de todos os voluntários

Na Figura 25, no qual estão apresentados os resultados médios da quantificação de etanol em sangue de todos os voluntários, vemos um aumento da concentração média de etanol até 60 minutos.

Tabela 34. Concentração média de etanol em fluido oral após ingestão de vodca, onde o volume ingerido por voluntário é equivalente a 0,5g de etanol por quilograma de massa corpórea.

Tempo (min)	Concentração média (g.L ⁻¹)	Desvio Padrão
15	0,1076	0,0445
30	0,1292	0,0452
45	0,1436	0,0557
60	0,1554	0,0557
75	0,1623	0,0592
90	0,1525	0,0524
105	0,1288	0,0463
120	0,1222	0,0409
135	0,1108	0,0406
150	0,1038	0,0432

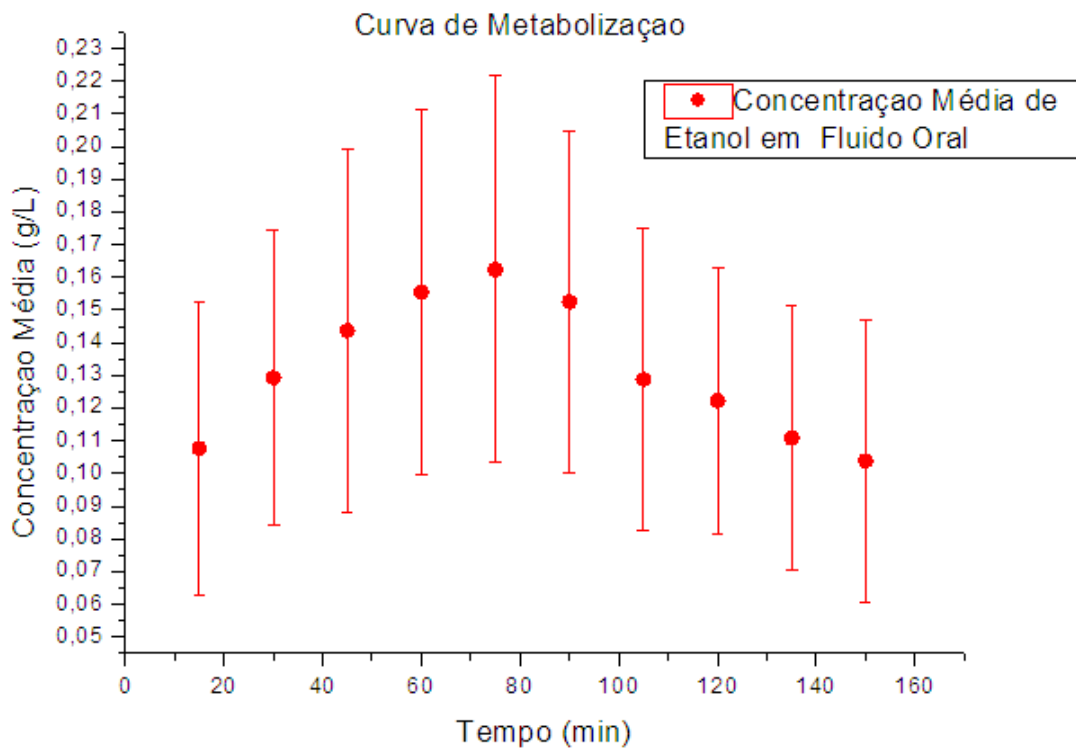


Figura 26. Concentração de etanol em função do tempo nas amostras de fluido oral de todos os voluntários

Quando observamos o Figura 26 vemos um padrão muito semelhante ao encontrado no sangue, porém nos resultados obtidos a partir das amostras de fluido oral, o pico máximo de absorção ocorre após 75 minutos da ingestão de etanol.

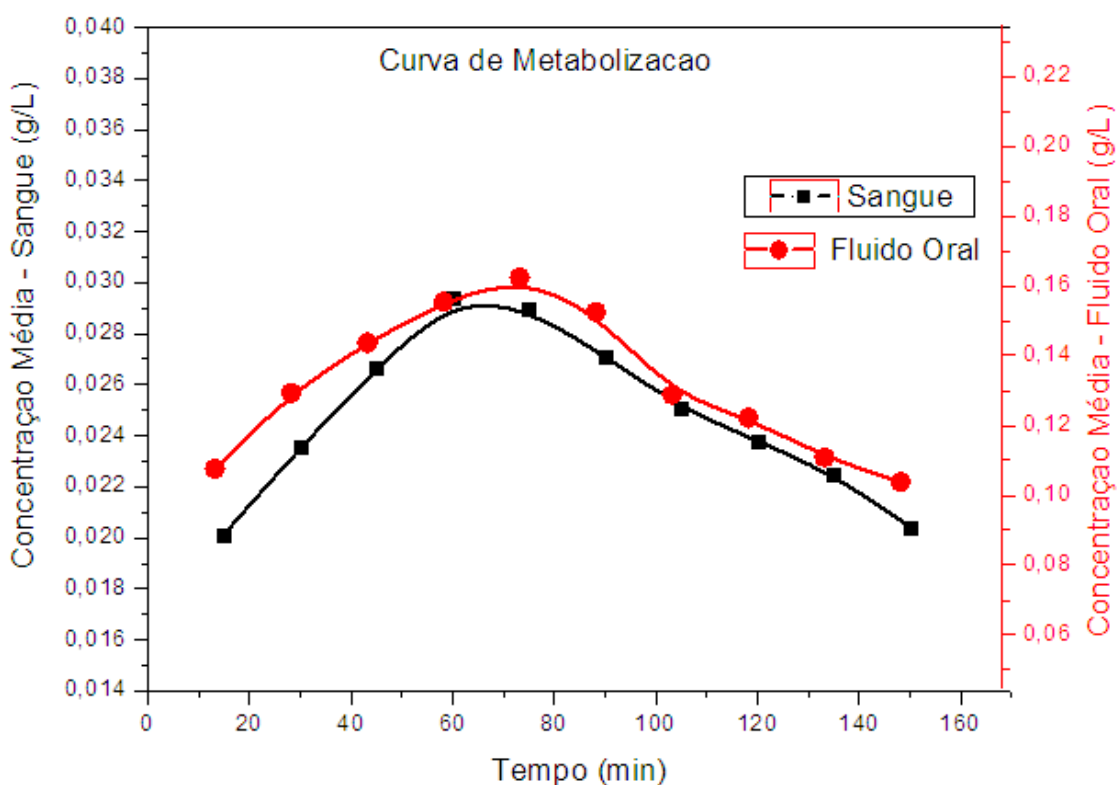


Figura 27. Concentração de etanol no sangue e concentração de etanol em fluido oral em função do tempo de todos os voluntários

No Figura 27 fizemos uma sobreposição das curvas de metabolização, onde temos representado pela linha vermelha com marcadores circulares, a curva de metabolização média obtida a partir das amostras de fluido oral. A linha preta com marcadores quadrados representa os resultados obtidos a partir das amostras de sangue.

É possível observar o mesmo padrão de metabolização nas curvas: vemos uma região crescente na curva que tem seu ápice em 60 minutos para o sangue com uma concentração média de $0,0293\text{g/L}^{-1}$ e para o fluido oral o mesmo ocorre em 75 minutos, aqui a concentração média é de $0,1623\text{g/L}^{-1}$. A divergência entre os valores aqui apresentados pode ter sido causada pela metodologia alternativa de coleta de sangue, pois este ao ser coletado sobre a superfície do papel de filtro adquire uma maior superfície de espalhamento desta amostra, podendo evapora parcialmente o analito.

O trabalho de Jones (1993) e em seu artigo de revisão publicado posteriormente (Jones, 2011) explorou o contexto de curvas de metabolização do etanol em 21 indivíduos que consumiram $0,68\text{g/kg}$ de peso corporal, além dos perfis médios das concentrações do álcool na fluido oral e no sangue, avaliou também amostras de urina e alguns fatores relacionados a embriaguez como tremores nas mãos e oscilação corporal. Os gráficos obtidos demonstraram bastante similaridades com os aqui

apresentados, os máximos de absorção ocorreram próximo aos 40 minutos após o consumo com concentrações variando entre 0,5 g.L⁻¹ e 1,09 g.L⁻¹ no sangue e 0,57 g.L⁻¹ e 1,35 g.L⁻¹ na fluido oral.

As diferenças nos valores encontrados por Jones (1993) e o presente trabalho podem ser decorrentes das diferentes técnicas utilizadas para a análise e quantificação, Jones empregou diluição das amostras em solução de fluoreto de sódio e um método enzimático com levedura de álcool desidrogenase. Outro fator que pode estar relacionado com as divergências dos resultados é o volume de etanol consumido pelos voluntários. Comparando as duas metodologias podemos observar que, apesar de variações individuais apresentadas pelos voluntários, o perfil da curva é bastante similar, com um máximo de absorção ocorrendo no intervalo esperado de 30 a 90 minutos após a administração de álcool (OGA, 2008).

Ao realizar uma subdivisão dos dados de acordo com o sexo dos voluntários, podemos analisar com maiores detalhes as tendências de metabolização. Dentre os voluntários masculinos foram obtidos 6 amostras de sangue e 12 amostras de fluido oral, enquanto que para os voluntários femininos, foram obtidos 4 amostras de sangue e 7 amostras de fluido oral.

Os resultados das concentrações médias de etanol em função do tempo para os voluntários masculinos encontram-se nas Tabelas 35 e Tabela 36.

Tabela 35. Concentração média de etanol encontradas em sangue após ingestão de vodca nos voluntários masculinos

Tempo (min)	Concentração média (g.L ⁻¹)	Desvio Padrão
15	0,0191	0,0027
30	0,0232	0,0075
45	0,0257	0,0078
60	0,0291	0,0052
75	0,0272	0,0073
90	0,0262	0,0064
105	0,0245	0,0051
120	0,0230	0,0051
135	0,0219	0,0044
150	0,0208	0,0036

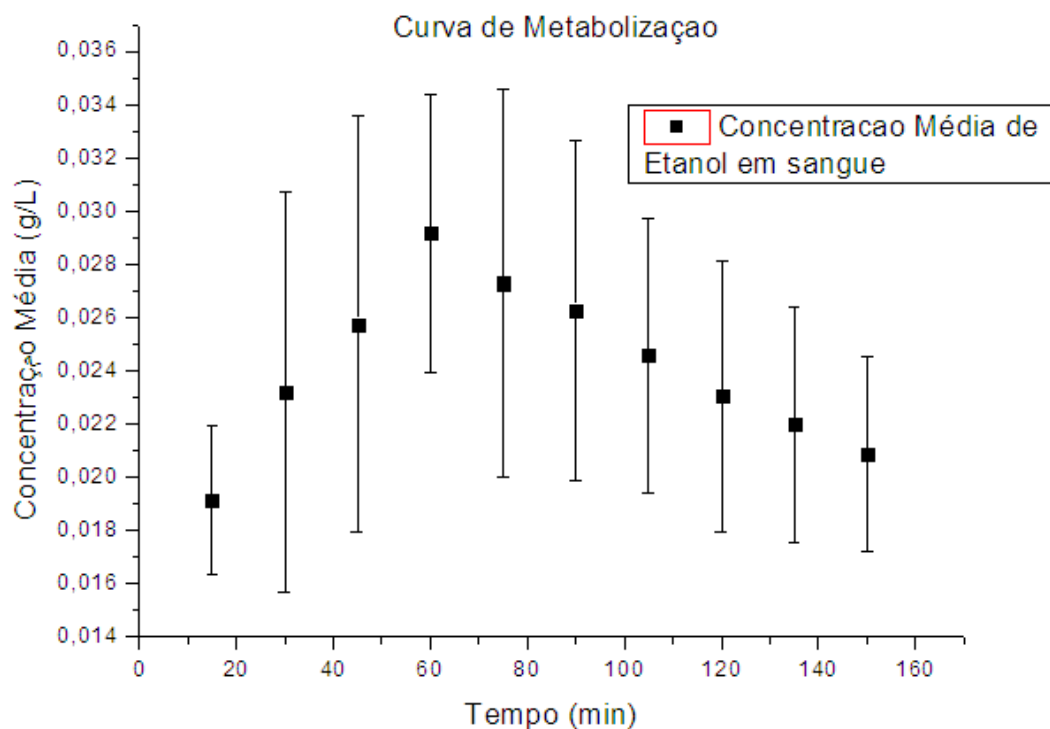


Figura 28. Concentração de etanol em função do tempo nas amostras de sangue de todos os voluntários masculinos

Avaliando separadamente os resultados da metabolização para as amostras de sangue para os voluntários masculinos, temos que o pico de absorção máxima do etanol neste grupo ocorre em 60 minutos após a ingestão e a concentração máxima de encontrada foi de $0,02918 \text{ gL}^{-1}$.

Tabela 36. Concentração média de etanol encontradas em fluido oral após ingestão de vodca nos voluntários masculinos

Tempo (min)	Concentração média (g.L^{-1})	Desvio Padrão
15	0,1008	0,0408
30	0,1226	0,0357
45	0,1419	0,0571
60	0,1411	0,0398
75	0,1506	0,0526
90	0,1413	0,0434
105	0,1119	0,0277
120	0,1107	0,0264
135	0,1031	0,0303
150	0,0925	0,0309

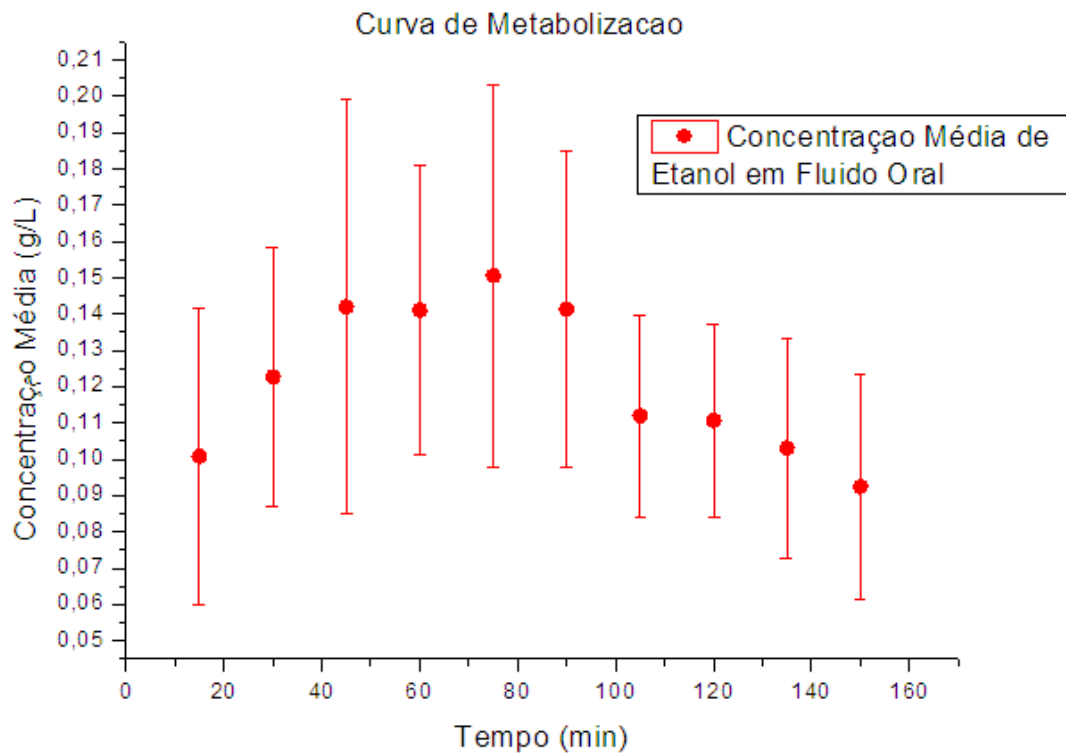


Figura 29. Concentração de etanol em função do tempo nas amostras de fluido oral de todos os voluntários masculinos.

Observando os resultados para o fluido oral dos voluntários masculinos, vemos que nesta matriz o máximo da absorção ocorreu no intervalo de 75 minutos apresentando uma concentração média de $0,15057 \text{ gL}^{-1}$.

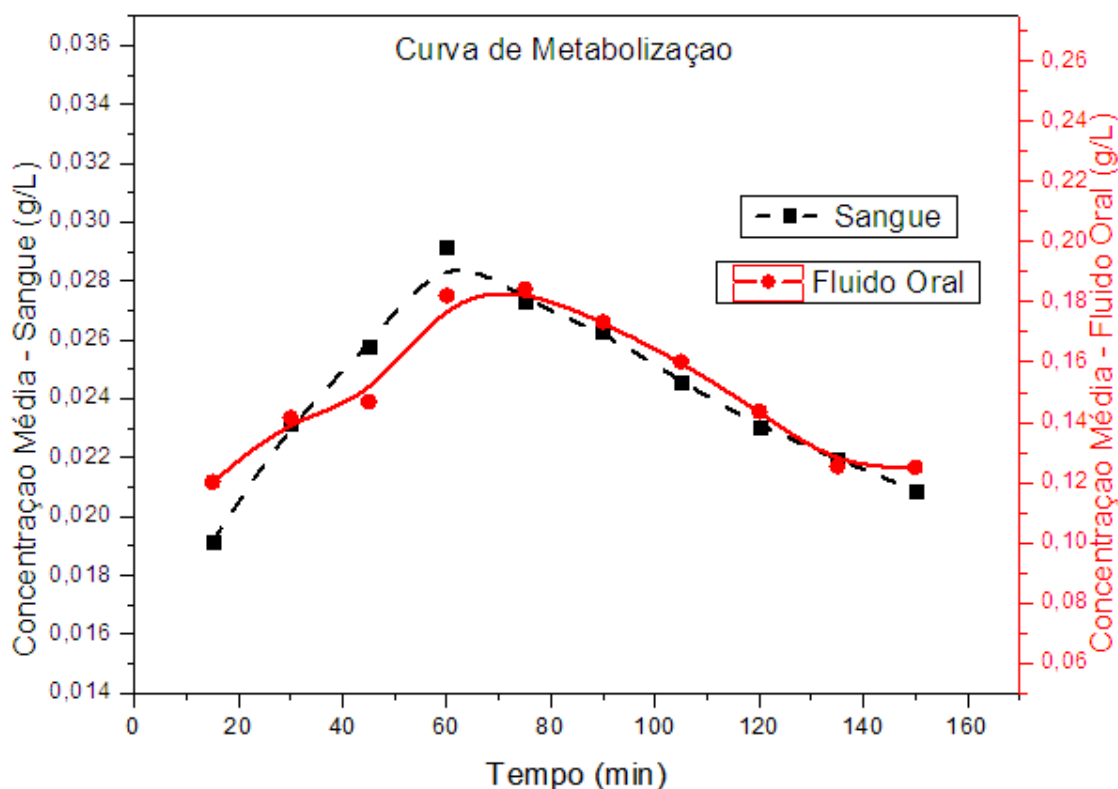


Figura 30. Concentração de etanol no sangue e concentração de etanol em fluido oral em função do tempo de todos os voluntários masculinos

Ao sobrepor as curvas de metabolização das duas matrizes, onde na linha tracejada temos a curva plotada a partir dos valores médios da quantificação de etanol em sangue e a linha contínua é a curva com os resultados obtidos com as análises do fluido oral. Novamente, o padrão das curvas é semelhante e o máximo da fase de absorção de etanol quase de coincidem, no sangue o máximo ocorre aproximadamente 15 minutos antes do que o máximo observado para o fluido oral.

Os resultados das concentrações médias de etanol em função do tempo para os voluntários femininos encontram-se nas Tabelas 37 e Tabela 38.

Tabela 37. Concentração média de etanol encontradas em sangue após ingestão de vodca nos voluntários femininos

Tempo (min)	Concentração média (g.L ⁻¹)	Desvio Padrão
15	0,0216	0,0046
30	0,0241	0,0055
45	0,0279	0,0063
60	0,0296	0,0065
75	0,0315	0,0112
90	0,0283	0,0076
105	0,0258	0,0056
120	0,0249	0,0067
135	0,0232	0,0051
150	0,0197	0,0021

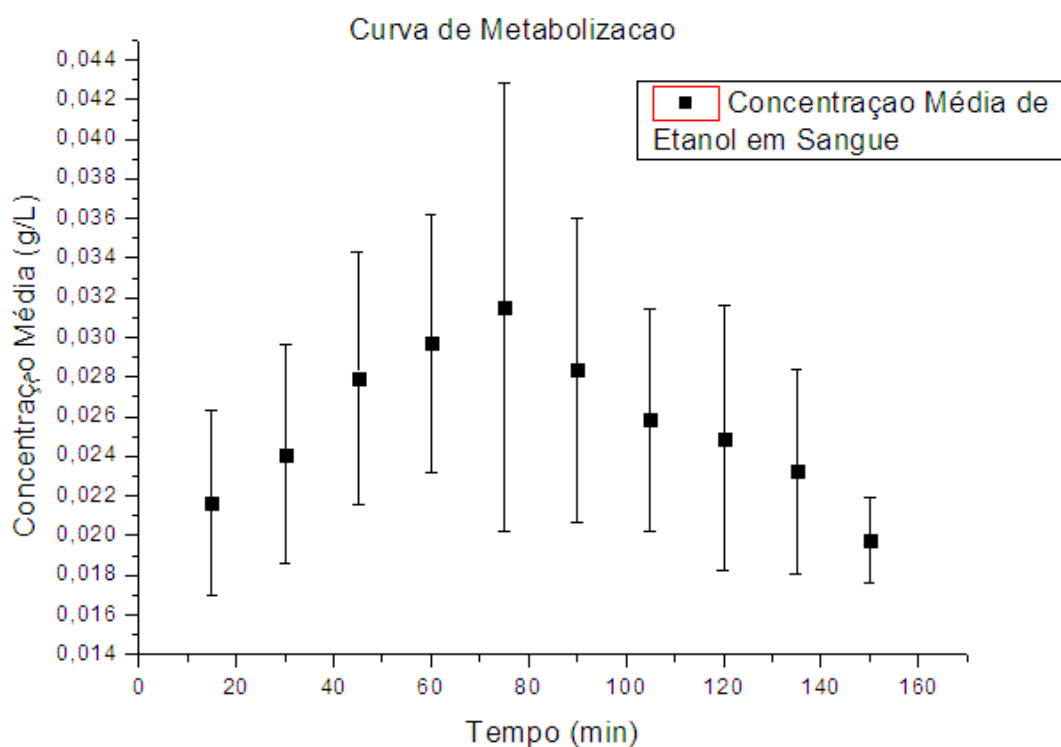


Figura 31. Concentração de etanol em função do tempo nas amostras de sangue de todos os voluntários femininos

Ao analisar as amostras de sangue dos voluntários femininos, apresentou um valor médio de etanol $0,0315 \text{ gL}^{-1}$, para este grupo o pico máximo da absorção ocorreu aproximadamente aos 75 minutos após o consumo de álcool.

Tabela 38. Concentração média de etanol encontradas em fluido oral após ingestão de vodca nos voluntários femininos

Tempo (min)	Concentração média (g.L^{-1})	Desvio Padrão
15	0,1203	0,0516
30	0,1415	0,0605
45	0,1468	0,0572
60	0,1821	0,0733
75	0,1842	0,0684
90	0,1733	0,0643
105	0,1601	0,0592
120	0,1436	0,0554
135	0,1253	0,0549
150	0,1250	0,0564

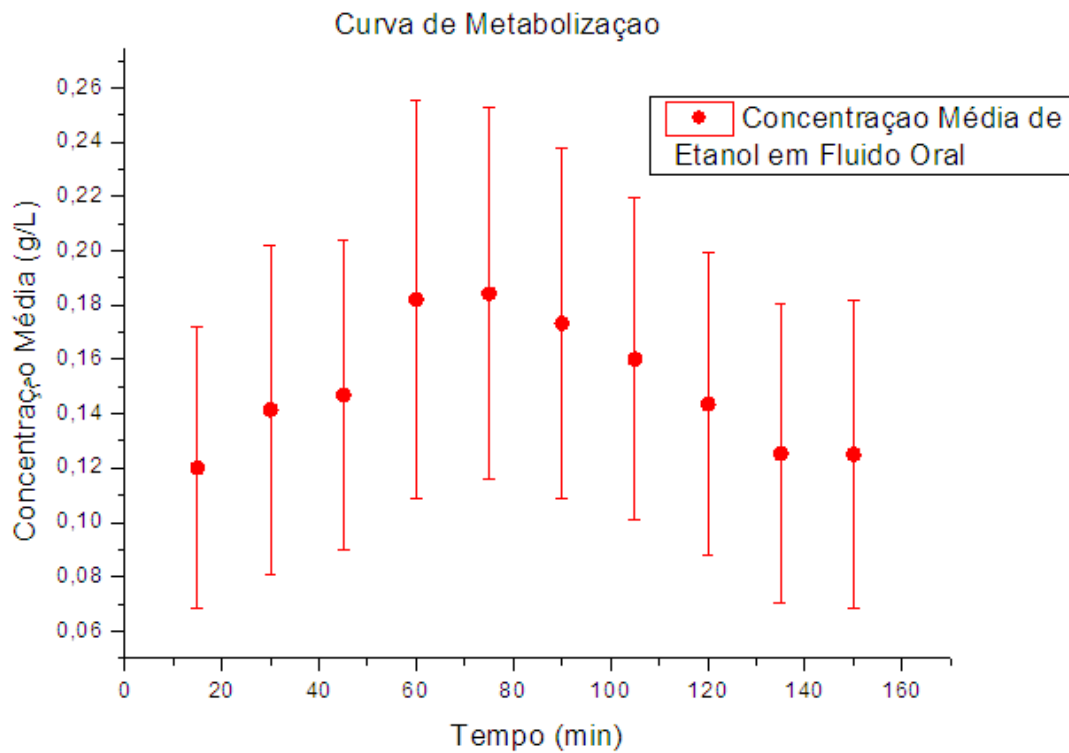


Figura 32. Concentração de etanol em função do tempo nas amostras de fluido oral de todos os voluntários femininos

No fluido oral, o máximo da absorção pode ter ocorrido entre 60 e 75 minutos, neste caso em questão os valores quantificados de etanol ficaram muito próximos $0,1821 \text{ gL}^{-1}$ e $0,1842 \text{ gL}^{-1}$, respectivamente. Não foi possível observar com maior precisão o momento onde ocorreu o máximo da absorção devido ao intervalo de 15 minutos entre as coletas.

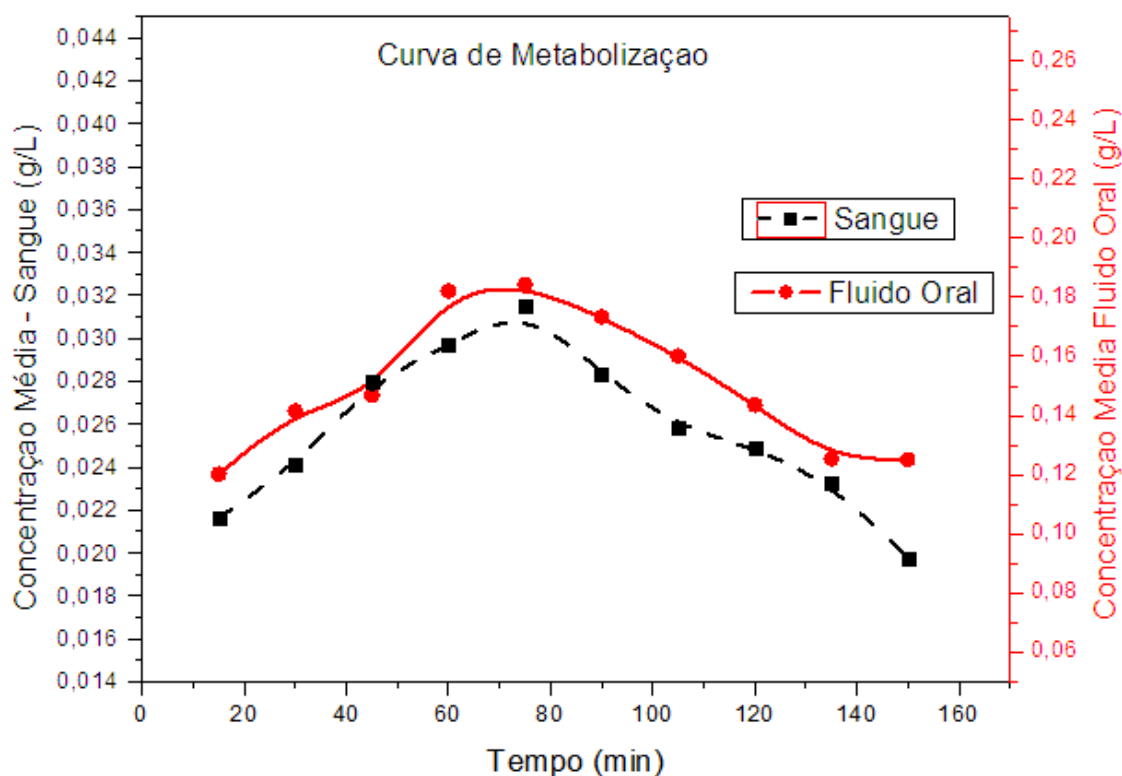


Figura 33. Concentração de etanol no sangue e concentração de etanol em fluido oral em função do tempo de todos os voluntários femininos

Ao sobrepor os resultados do grupo de voluntários femininos, vemos que o máximo da absorção ocorre de maneira quase que simultânea aos 75 minutos após a ingestão da vodca.

Para todas as curvas plotadas existe uma pequena incerteza em relação ao pico máximo da absorção, tanto para o sangue quanto para o fluido oral, tal incerteza é decorrente do intervalo de 15 minutos entre as coletas. Porém, mesmo com esse intervalo de incerteza, podemos avaliar de maneira confiável o perfil de metabolização nestas duas matrizes.

Fazendo uma comparação dos resultados médios dos grupos de voluntários femininos e masculinos não foram encontradas grandes diferenças nas quantificações. Observando os níveis de alcoolemia obtidas a partir das amostras de sangue, o grupo de voluntários masculinos apresentaram uma concentração de $0,02918 \text{ gL}^{-1}$ e o grupo de voluntários femininos apresentou um valor de $0,0315 \text{ gL}^{-1}$. A quantificação realizada no fluido oral apresentou uma pequena variação entre os grupos, sendo que a média dos homens foi de $0,15057 \text{ gL}^{-1}$ e o valor médio para as mulheres foi $0,1842 \text{ gL}^{-1}$. Era esperado que os valores quantificados no grupo de voluntários femininos fossem ligeiramente maior do que o outro grupo, baseado no fato que para um mesmo volume consumido de etanol as mulheres por apresentarem uma porcentagem maior de distribuição pelo organismo por possuírem

uma menor quantidade de água em sua composição corporal, visto que o meio aquoso é a principal forma de propagação do etanol através dos tecidos. (Dorta *et al.*, 2018)

Entretanto, nem sempre é possível observar diferenças reais entre indivíduos de sexos diferentes, Ammon *et al.* (1996) realizou um estudo com 12 participantes, sendo metade homens e metade mulheres. Após uma refeição padronizada, os voluntários consumiram doses moderadas de álcool (0,3 g/kg) e não foram observadas diferenças significantes entre os sexos. Sendo esta tendência observada pelo presente estudo, pois as variações entre os dois grupos confrontados demonstraram ser muito pequenas.

A região de perfil ascendente de cada gráfico está diretamente associada a etapa de absorção do etanol, segundo OGA (2008) e JUNG (2014) é esperado que este máximo de absorção ocorra entre 30 e 90 minutos após a ingestão de bebida alcoólica. Logo após este máximo começa a preponderar a metabolização pelo fígado, devido a ação das enzimas ADH e ALDH, a uma taxa de aproximadamente 15 mg/dL por hora (JUNG, 2014).

Quando comparamos os resultados de todos os voluntários temos um pico máximo de absorção do etanol ocorrendo em 60 minutos após consumirem a vodca e a concentração média de etanol neste ponto foi de $0,0293\text{gL}^{-1}$. Para o grupo de voluntários masculinos tivemos o ápice em 60 minutos e a concentração média foi de $0,02918\text{gL}^{-1}$ enquanto que o grupo de voluntários femininos teve o seu máximo em 75 minutos com uma concentração de $0,0315\text{gL}^{-1}$.

No trabalho de Weafer (2012), 20 voluntários adultos que consumiam bebidas alcoólicas socialmente foram convidados a ingerir um volume de licor visando alcançar uma concentração 0,65 g de etanol por quilo de massa corpórea, com ingestão em um intervalo de 6 minutos. Para estes voluntários, foi reportado um pico de etanol em amostras de sangue ocorrendo em 65 minutos com uma concentração média de $94,1\text{mg}/100\text{mL}$ (equivalente a $0,941\text{g.L}^{-1}$).

As diferenças entre os resultados podem ser decorrentes do tipo de bebida alcoólica oferecida aos voluntários, assim como o montante consumido por eles, visto que a quantidade de etanol por eles ingerida foi ligeiramente maior do que o utilizado neste experimento. Tais diferenças também podem estar relacionadas com a coleta das amostras empregadas no estudo. Neste trabalho, utilizamos sangue capilar proveniente na região das digitais e um volume de coleta de aproximadamente $50\mu\text{L}$ de amostra, enquanto que Weafer (2012) realizou uma coleta de ar exalado e com estes resultados montou sua curva de metabolização.

Em relação às amostras de fluido oral, os resultados observados para todos os voluntários mostram um pico máximo da absorção em 75 minutos e uma concentração média $0,1623\text{gL}^{-1}$. O grupo de voluntários masculinos também apresentou um máximo de absorção em 75 minutos com

uma concentração média de etanol de $0,15057 \text{ gL}^{-1}$ e o grupo de voluntários feminino apresentou um máximo entre 60 e 75 minutos e concentração de etanol de $0,1821 \text{ gL}^{-1}$ e $0,1842 \text{ gL}^{-1}$.

O estudo realizado por Giant (2007) realizou experimentos com um grupo de 84 voluntários de ambos sexos foram convidados a consumir $0,80 \text{ g / kg}$ de bebida alcoólica. Foram coletados diversos tipos de amostra, dentre elas, amostras de 3 mL de fluido oral em diversos intervalos de tempo (30 min., 45 min., 1 h, 2 h, 3 h e 4 h) e álcool e um nível de etanol equivalente a $0,045\%$ (m/v), ou seja, $0,45 \text{ g.L}^{-1}$, desta maneira, vemos resultados bastante similares com os obtidos neste experimento.

São necessários estudos mais aprofundados com um maior número de voluntários e um número igual de participantes de ambos os sexos para conseguir traçar curvas de metabolização com menores intervalos entre as coletas de modo a se obter resultados com maior precisão e confiabilidade, para que seja feita uma boa diferenciação da quantificação de etanol entre os sexos, a idade e até mesmo o peso corporal dos indivíduos.

Com base nessas curvas ficaram definidos os intervalos de coletas das amostras para o experimento psicomotor, sendo estabelecidas as coletas em 30 e 60 minutos visando realizar a quantificação na fase de absorção do etanol, onde os efeitos decorrentes do consumo tornam-se mais evidentes para avaliar as capacidades de cada voluntário ao volante.

Após um intervalo de aproximadamente uma hora após a ingestão da bebida alcoólica, alguns voluntários afirmaram não sentir mais os efeitos da embriaguez, entretanto, essa sensação não demonstrava a realidade, pois todos ainda estavam incapacitados de realizar as atividades cotidianas pois observando as curvas de metabolização o intervalo para que ocorre a total eliminação do álcool ainda estava apenas em sua fase inicial e perduraria por mais algumas horas.

4.3. Quantificação de EtG em amostras de cabelo

Na Tabela 39 estão apresentados os hábitos de consumo dos 4 voluntários que doaram amostras para a quantificação de EtG em cabelo.

Tabela 39. Informações coletadas dos voluntários e resultado da análise de EtG

Voluntário	Freq. de Consumo	Dose habitualmente consumida	Concent. EtG (pg/mg)
01	1 a 2 vezes/semana	3 a 4 doses	< 7
02	1 a 2 vezes/mês	3 a 4 doses	< 7
03	1 a 2 vezes/semana	3 a 4 doses	< 7
04	1 a 2 vezes/mês	1 a 2 doses	< 7

Em 2000, Alt *et al.* quantificou EtG em amostras *post mortem* de cabelo proveniente de 31 indivíduos, dentre estas, 20 amostras que estavam relacionadas a casos de alcoolismo ou de indivíduos alcoolistas apresentaram concentração entre 119 pg/mg até 4.025 pg/mg . Quando foram

analisadas as amostras de bebedores sociais e de crianças, não foram detectadas quantidades significativas de EtG.

Podemos observar no trabalho de Morini (2010), que quantificou EtG em um grupo de 30 voluntários composto por abstêmios, bebedores sociais e bebedores habituais. Eles encontraram valores de EtG de 7,7 pg/mg para os voluntários que eram bebedores sociais e valores de até 149 pg/mg para os bebedores habituais.

Indivíduos que possuem hábitos de consumo habitual geralmente apresentam concentração de EtG variando de 7 a 30 pg/mg e indivíduos que fazem consumo elevado de etanol apresentam valores acima de 30 pg/mg.

Todas as amostras analisadas apresentam concentração de EtG menor do que o limite de detecção de 7 pg/mg, isto é, os resultados indicam que os voluntários se enquadram como abstêmios ou como consumidores habituais moderados. Além disso, estes resultados confirmam as informações coletadas dos voluntários durante o experimento de avaliação psicomotora, visto que nenhum deles apresentou hábitos de consumo de etanol que fossem maiores que 1 a 2 vezes por semana. Este resultado é condizente com o trabalho de Kronstrand (2012) onde foi observado que indivíduos que consumiam pequenas quantidades de etanol (até 16 g de etanol puro/dia) também apresentaram valores abaixo de 7 pg/mg.

Ao comparar os dados coletados durante o experimento de álcool e direção, foi possível inferir sobre os hábitos de consumo dos voluntários e todos eles apresentaram resultados condizentes com o de bebedores moderados. Caso algum resultado indicasse consumo de etanol compatível com o de um alcoolista, isto é, valores de EtG acima de 30 pg/mg, todos os dados coletados durante a etapa de condução veicular seriam descartados pois as alterações ocasionadas após o consumo de álcool seriam menos expressivas em comparação aos demais participantes.

4.4. Avaliações Genéticas

4.4.1. Ancestralidade Genética

Uma avaliação genética da ancestralidade dos indivíduos foi realizada com base em 3 distintas etnias: europeia, africana e asiática, nesta última classificação também estão inclusos indivíduos de etnia ameríndia.

A Tabela 40 apresenta para cada voluntário as informações relacionadas a ancestralidade, onde são apresentados a composição genética por meio da porcentagem representativa de cada etnia, quanto mais os valores se aproximarem de 1 maior será a predominância de uma determinada etnia. A Figura 34 ilustra os dados apresentados a seguir.

Tabela 40. Análise de ancestralidade de todos os voluntários.

Voluntário	Ancestralidade		
	Africana	Asiática	Europeia
1	0,029	0,448	0,523
2	0,057	0,015	0,928
3	0,026	0,013	0,961
4	0,043	0,043	0,914
5	0,052	0,088	0,861
6	0,029	0,019	0,952
7	0,171	0,136	0,693
8	0,026	0,018	0,956
9	0,026	0,026	0,949
10	0,044	0,016	0,939
11	0,190	0,036	0,774
12	0,243	0,103	0,654
13	0,026	0,022	0,952
14	0,036	0,029	0,936
15	0,124	0,024	0,852

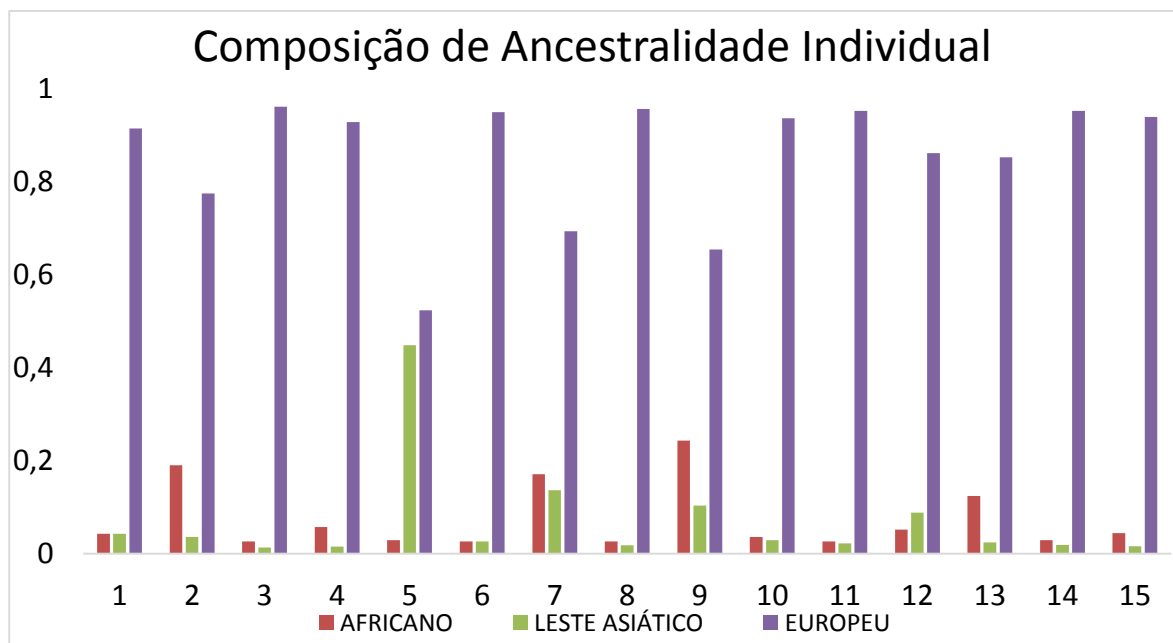


Figura 34. Gráfico apresentando as informações de ancestralidade para cada indivíduo.

No gráfico apresentado na Figura 34 observa-se uma predominância genética associada a características europeias, apresentando valores que variavam 52,3% até 96,1% dessa etnia. Dos quinze voluntários, cinco indivíduos se destacaram por apresentar uma maior porcentagem de ancestralidade africana com valores entre 17,1% a 24,3% e quatro indivíduos que possuíam uma maior herança genética proveniente de populações asiáticas apresentaram composição genética dessa etnia variando de 0,88% a 44,8%.

Segundo Moore (2007) ao realizar um estudo na ilha de Trinidad e Tobago, onde a população é composta por indivíduos de ancestralidade asiática e por ancestralidade africana, observou-se que indivíduos com uma maior composição asiática possuem dificuldade em metabolizar o etanol quando comparados a indivíduos com ancestralidade africana.

Dessa forma, espera-se de maneira geral que não existam grandes variações na capacidade de metabolização dos indivíduos após consumirem etanol durante o experimento de condução veicular, visto que este grupo de voluntários apresenta ancestralidade majoritariamente de origem europeia.

4.4.2. Avaliação Genética do Metabolismo do etanol e Associação Genotípica

Dos 12 SNPs presentes na literatura que estão conhecidamente relacionados com a expressão de enzimas que metabolizam o etanol, 8 SNPs foram contemplados pelas técnicas de sequenciamento.

A Tabela 41 apresenta quais os SNPs foram encontrados tanto pela técnica de NGS quanto Array, também são apresentados os alelos utilizados como referência e o alelo alternativo.

Tabela 41. Relação dos SNPs contemplados pelo sequenciamento e as respectivas técnicas de sequenciamento utilizada

Identificação do SNP	Cromossomo	Alelo		Gene	Técnica de Sequenciamento	
		Referência	Alternativo		NGS	Array
rs1229984	4	G	A	ADH1B	Sim	Sim
rs6413413	4	A	T	ADH1B	Sim	Sim
rs2066702	4	G	A	ADH1B	Não	Sim
rs35385902	4	G	A	ADH1C	Não	Sim
rs698	4	A	G	ADH1C	Não	Sim
rs35719513	4	C	A	ADH1C	Não	Sim
rs671	12	G	A	ALDH2	Sim	Sim
rs 72559710	10	G	A	CYP2E1	Não	Sim

Dos 15 voluntários que forneceram amostras para o sequenciamento genético, 5 deles também participaram do experimento da curva de metabolização, onde foram quantificados os níveis de etanol em função do tempo. Esses dados também foram empregados na classificação dos 15 voluntários como rápidos ou lentos metabolizadores.

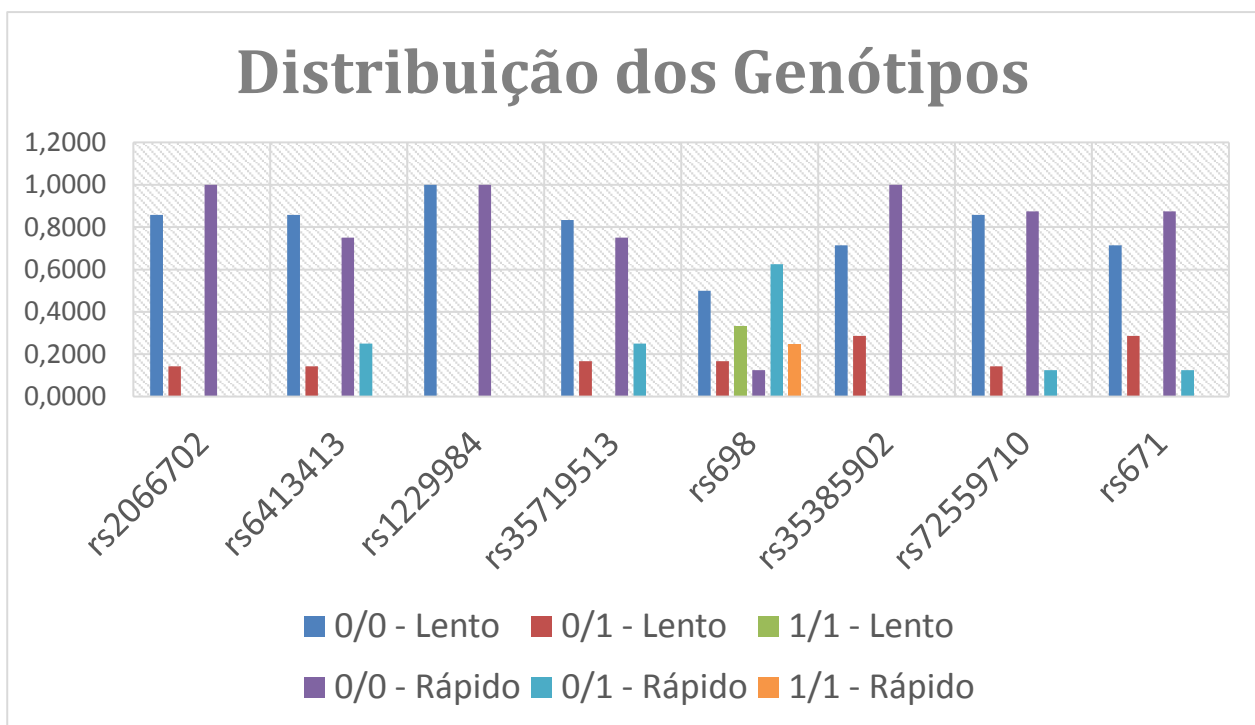
Na curva de metabolização, elaborada com os resultados de todos os voluntários, apresentada na Figura 27, a concentração máxima de etanol quantificada foi de $0,162\text{gL}^{-1}$. Utilizando este valor como parâmetro de classificação, todos os voluntários que apresentaram níveis de alcoolemia maiores do que $0,162\text{gL}^{-1}$ na coleta realizada 30 minutos após ingestão de álcool e que apresentaram uma redução na quantificação em 60 minutos foram classificados como metabolizadores rápidos e os voluntários que não apresentaram este mesmo comportamento, foram classificados como metabolizadores lentos.

Os valores de frequência genotípica para os SNPs estão apresentados na Tabela 42.

Tabela 42. Frequências genóticas calculadas para cada SNP

SNP	Metabolizadores Lentos			Metabolizadores Rápidos		
	0/0	0/1	1/1	0/0	0/1	1/1
rs1229984	1,0000	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000
rs6413413	0,8571	0,1429	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000
rs2066702	0,8571	0,1429	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000
rs35385902	0,7143	0,2857	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000
rs698	0,5000	0,1667	0,3333	1,0000	0,0000	0,0000
rs35719513	0,8333	0,1667	0,0000	0,7500	0,2500	0,0000
rs671	0,7143	0,2857	0,0000	0,8750	0,1250	0,0000
rs72559710	0,8571	0,1429	0,0000	0,8750	0,1250	0,0000

Os dados da Tabela 42 foram plotados no gráfico da Figura 35 separando as frequências genóticas para cada um dos SNPs.

**Figura 35.** Gráfico da distribuição dos genótipos para cada SNP.

Devido ao baixo número de voluntários não foi possível identificar nenhuma associação genotípica para os seguintes SNPs: rs6413413, rs2066702 e rs1229984, inclusos no gene ADH1B, rs35385902 e rs35719513, inclusos no gene ADH1C, rs671, incluso no gene ALDH2 e o rs72559710,

incluso no gene CYP2E1. Dessa forma, não foi possível realizar nenhuma interpretação quantitativa dos dados.

O SNP rs698 associado ao gene ADH1C mostrou-se mais promissor, os indivíduos que apresentaram o genótipo 0/0 possuem capacidade de metabolização lenta mais frequentemente quando comparamos o mesmo genótipo com característica de metabolizadores rápidos. Além disso, indivíduos com o genótipo 0/1 possuem capacidade de metabolização rápida mais frequentemente quando comparamos o mesmo genótipo com característica de metabolização lenta. É importante ressaltar que existem trabalhos, como o de Pavanello (2012), no qual esse mesmo gene é associado com o alcoolismo em motoristas que dirigem embriagados, mas não foram encontrados estudos ligando este SNP a velocidade de metabolização.

Em um estudo conduzido por Martinez (2010) onde foi avaliada a farmacocinética do etanol, após seus voluntários consumirem 0,5 g/kg de etanol observou-se que os SNPs rs6413413 e rs698 estão relacionados com a redução estatisticamente significativa com a biodisponibilidade do etanol ao comparar indivíduos que possuem essa variante genética com outros que não a possuíam.

Entretanto, todos esses SNPs são reconhecidos na literatura por serem diretamente relacionados à expressão dos genes que permitem a produção das enzimas ADH e ALDH que são responsáveis para a metabolização do etanol, facilitando a sua posterior excreção de organismo.

4.5. Avaliação Psicomotora através de Análises Estatísticas

A tabela com as informações coletadas durante a execução do experimento e sem tratamento estatístico, encontram-se no Anexo 04.

Um grupo de 15 indivíduos com média de idade de $31,1 \pm 6,9$ anos foi selecionado para participar deste projeto, o grupo foi composto por 6 pessoas do sexo feminino e por 9 pessoas do sexo masculino. Para cada indivíduo foram obtidas 9 repetições da seguinte forma: 3 repetições em momentos distintos e para cada repetição foram feitas duas medições, onde em uma delas o voluntário conduzia o veículo sem utilizar um celular e uma outra vez fazendo uso do mesmo. Dessa forma, totalizaram 90 medições, sendo 36 medições para o sexo feminino e 54 para o sexo masculino. Na sequência considerou-se a análise dos dados através do trajeto e do sexo.

A Tabela 43 relata as médias de cada variável das quantificações dos níveis de etanol em relação ao sexo nas diferentes coletas de 30 e 60 minutos.

Tabela 43. Valores médios das quantificações dos níveis de etanol obtido durante o experimento

Coleta	Quantificação	Feminino	Masculino
30 minutos	Etilômetro Lab. (mg.L ⁻¹)	0,300	0,287
	Etilômetro Pol. (mg.L ⁻¹)	0,290	0,282
	Fluido Oral (g.L ⁻¹)	0,193	0,174
	Sangue (g.L ⁻¹)	0,027	0,034
60 minutos	Etilômetro Lab. (mg.L ⁻¹)	0,274	0,261
	Etilômetro Pol. (mg.L ⁻¹)	0,278	0,254
	Fluido Oral (g.L ⁻¹)	0,148	0,159
	Sangue (g.L ⁻¹)	0,029	0,025

*diferença significativa (alfa=0,05) teste Wilcoxon

O etilômetro da polícia foi utilizado somente para efeitos comparativos, os policiais puderam avaliar a resposta do equipamento após o consumo de quantidade conhecida de bebida alcoólica. Porém nas análises estatísticas foram considerados apenas os resultados do etilômetro do laboratório pois os resultados das medições realizadas com os dois equipamentos foram muito semelhantes.

Um teste de médias do tipo não paramétrico foi realizado e mostrou que não existem diferenças significativas nas médias das medidas em nenhum dos grupos. Esse comportamento era esperado devido à padronização do volume de bebida consumida pelos voluntários. Dessa forma

podemos avaliar corretamente o desempenho durante a condução do veículo pois todos estavam submetidos a níveis semelhantes de alcoolemia.

A Tabela 44 apresenta os valores médios de velocidade em todos os trajetos e comparação por sexo.

Tabela 44. Velocidade média por percurso (em km/h) para todos os voluntários nos trajetos 1 e 2

	Velocidade (km/h)		P-valor*
	Masculino	Feminino	
Trajeto 01 (sem celular)	37,2	33,5	0,308
Trajeto 02 (com celular)	38,4	32,9	0,052
P-valor*	0,147	0,721	

*Teste Wilcoxon, mais descritivos em anexo

Em relação à velocidade média, observamos que as mulheres conduziram o veículo a 33,17 km/h e 37,8 km/h para os homens durante o Trajeto 01 (sem celular). Em todas as trajetórias, os homens apresentaram os maiores valores de velocidade, entretanto esta diferença não foi estatisticamente relevante, observe que o comportamento das mulheres foi o oposto, em todos os trajetos elas apresentaram uma tendência de dirigir mais devagar. Porém, é importante observar o P-valor do Trajeto 02 (com celular), este valor calculado está muito próximo de um resultado significativo, evidenciando que o desvio da atenção causado pelo celular pode influenciar no ajuste fino da coordenação motora necessária para a manutenção de uma velocidade constante do veículo.

O desvio de atenção acarretou oscilações de velocidade, no instante que os voluntários mudavam o foco da condução do veículo para responder ao celular causava uma redução da velocidade e, após o envio da resposta, era compensada com uma aceleração repentina para que o tempo do trajeto não fosse comprometido.

Avaliando somente os valores médios das velocidades, não é possível observar essa tendência, porém ao relacionar com os dados da Tabela 45, podemos ver como esse comportamento influencia no tempo do trajeto.

A Tabela 45 apresenta os valores médios do tempo de todos os trajetos para comparação, separando os dados de acordo com o sexo.

Tabela 45. Tempo médio de percurso (em segundos) para todos os voluntários nos trajetos 01 e 02

	Tempo de percurso (seg.)		P-valor*
	Masculino	Feminino	
Trajeto 01 (sem celular)	38,74	45,80	0,005955*
Trajeto 02 (com celular)	42,40	49,21	0,005672*
P-valor*	0,550	0,175	

*Teste Wilcoxon, mais descritivos em anexo

O tempo médio do percurso geral dos dois trajetos para o sexo masculino foi de 40,6 segundos enquanto que para o sexo feminino foi de 47,74 segundos. O tempo de trajeto foi maior para o grupo feminino e sempre maior durante o Trajeto 02 (com celular), porém, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os valores.

Entretanto, no Trajeto 02 (com celular), podemos ver mais evidências de como a junção das tarefas de dirigir e usar o celular se relacionam. Como citado anteriormente, durante essa ação conjunta, a velocidade ao longo do trajeto oscilou e comprometeu o tempo total desta etapa, sempre aumentando o tempo necessário para completá-la. Em situações cotidianas de trânsito em horários de pico, esse comportamento pode ser um dos responsáveis por contribuir com a formação engarrafamentos e acidentes.

A Tabela 46 apresenta os valores médios da distância de frenagem em todos os trajetos e comparação por sexo em cada trajetória.

Tabela 46. Distância média de frenagem por percurso (em metros) para todos os voluntários nos trajetos 1 e 2

	Distância de frenagem (m)		P-valor*
	Masculino	Feminino	
Trajeto 01 (sem celular)	7,32	8,65	0,149
Trajeto 02 (com celular)	7,95	9,85	0,099
P-valor*	0,02	0,23	

*Teste Wilcoxon, mais descritivos em anexo

A distância de frenagem média até a parada total do veículo foi de 9,25 metros para as mulheres e 7,63 metros para os homens, sendo sempre menor para os homens. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o sexo, mas no grupo de voluntários masculino ocorreu uma diferença entre a trajetória 01 e 02, sendo sempre menor na trajetória 01.

O estudo de Fillmore & Weafer (2012) avaliou o comportamento e a capacidade cognitiva de direção em um grupo de 20 voluntários que foram submetidos a uma série de testes utilizando um simulador veicular. Estes voluntários foram separados em dois grupos, um grupo placebo e um grupo submetido ao consumo de álcool (0,65g/kg). Os participantes que consumiram álcool apresentaram uma menor disposição e menor aptidão para dirigir, a coordenação motora e o controle inibitório ficaram comprometidos causando comportamentos ao volante que não permitiam os voluntários manter o carro dentro da faixa e manipulações mais bruscas do veículo.

Durante a etapa de preparo dos experimentos, os voluntários demonstravam empolgação por poderem realizar a condução de um veículo sob ação do álcool em um ambiente isolado e seguro. Porém, após o consumirem a bebida em intervalos de 5 a 15 minutos, observou-se, assim como no trabalho de Fillmore & Weafer (2012), que alguns voluntários relataram menor confiança em suas capacidades de dirigir quando surgiram os primeiros sinais de embriaguez.

Na publicação de Van Dyke (2014), em um estudo semelhante ao de Fillmore & Weafer (2012), avaliou-se a impulsividade de motoristas que dirigiam sob influência de álcool e observou que conforme os sinais de embriaguez foram se desenvolvendo, os participantes sentiram-se mais confortáveis para conduzir o veículo pela pista com obstáculos. Esses sinais foram observados cerca de 70 minutos após o início dos testes, onde para muitos dos voluntários, os níveis de alcoolemia estavam em seus estágios mais elevados.

Essa mesma tendência de comportamental tornou-se evidente no grupo de voluntários deste estudo, o aumento da autoconfiança foi observado cerca de 60 minutos após o início do experimento e como observado nas curvas de metabolização apresentadas anteriormente, essa é a faixa onde o nível de alcoolemia está em seu ápice. Muito provavelmente esse aumento da confiança ao volante é decorrente do fato dos indivíduos estarem mais acostumados com os efeitos da embriaguez e não está relacionada com a eliminação do álcool pelo processo de metabolização do organismo. Estas observações empíricas demonstram que um cenário onde os indivíduos sentem-se mais confortáveis para dirigir, mesmo sob ação do álcool, são propulsoras de infrações e acidentes em situações de trânsito real.

Os participantes ao serem submetidos ao teste de direção demonstraram alguns sinais de redução da capacidade motora, porém o que mais se destacou foi a distância necessária para a frenagem do veículo, o grupo masculino se mostrou mais comprometido, sendo evidenciado pelo maior espaço necessário para frear: em uma situação de trânsito real, sob estas condições, existiriam grandes chances de ocasionar algum tipo de colisão.

Se as diferenças nesta variável forem causadas pela autoconfiança dos voluntários masculinos, podemos relacionar diretamente esse comportamento com as estatísticas de acidentes em trânsito,

visto que grande porcentagem dos acidentes de trânsito são ocasionados por homens, sendo evidenciado por um recente levantamento realizado por Rios (2020) onde as chances de um homem se envolver em um acidente de trânsito é de 52,0% maior do que as mulheres.

Algumas análises focadas no desempenho das técnicas de quantificação foram realizadas para encontrar alguma correção linear entre as medições realizadas em todas as coletas (sangue, fluido oral e ar exalado).

As comparações foram realizadas utilizando como base os resultados obtidos para as análises de fluido oral, isto é, os resultados das quantificações realizadas em fluido oral foram comparados com os resultados obtidos com as análises de sangue e ar exalado. Abaixo serão apresentados os gráficos de correlação entre as medidas, separando-os em grupos de acordo com o sexo e posteriormente os ajustes das retas para cada período de coleta.

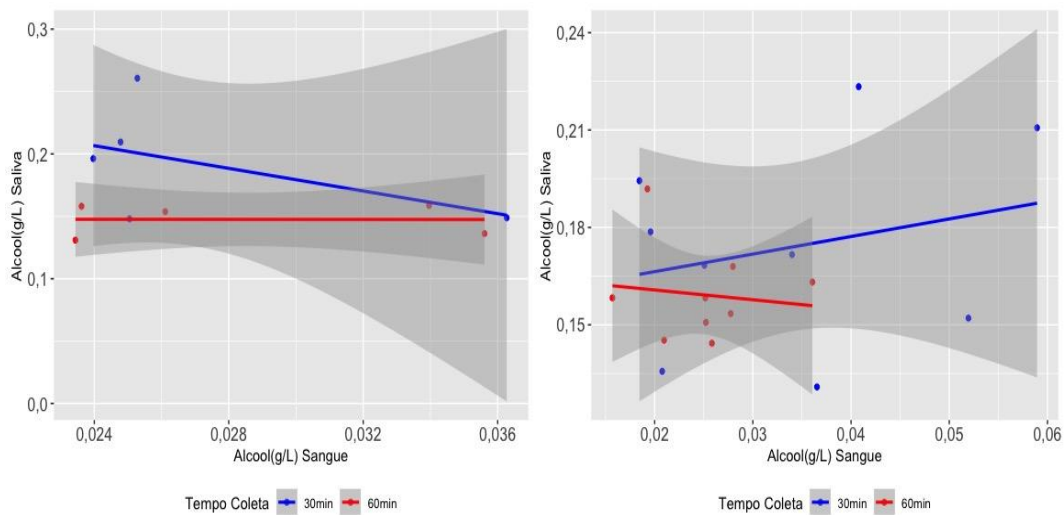


Figura 36. Gráfico de correlação entre as quantificações de álcool em sangue e a quantificação em fluido oral para os voluntários do sexo feminino (esquerda) e masculino (direita)

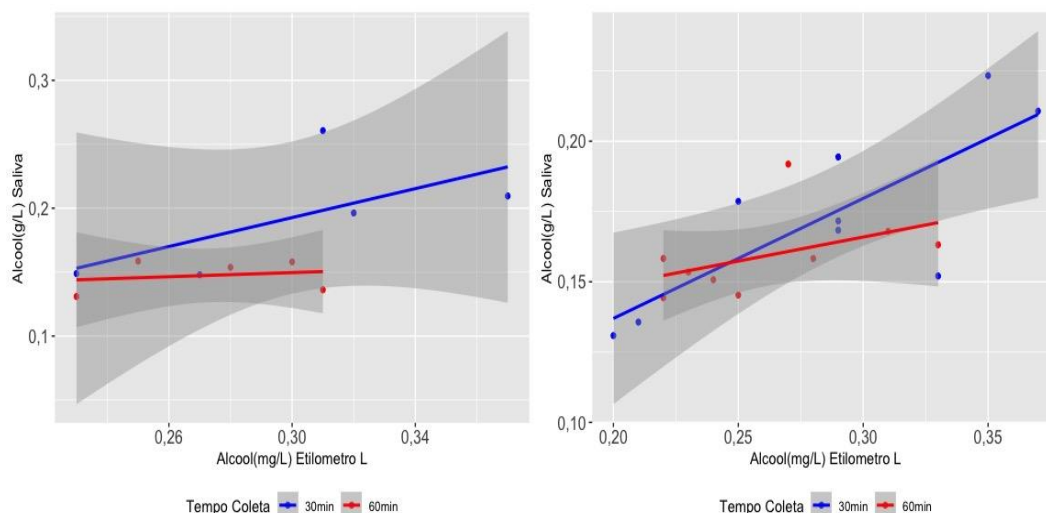


Figura 37. Gráfico de correlação entre as quantificações do etilômetro do laboratório e a quantificação em fluido oral para os voluntários do sexo feminino (esquerda) e para os voluntários masculino (direita)

A partir dos gráficos mostrados acima, não podemos definir diretamente um ajuste linear entre as diferentes medidas e o fluido oral. Entretanto, é mais evidente a existência de um ajuste linear apenas para o gráfico do etilômetro *versus* fluido oral (Figura 37) para o grupo masculino, neste caso existe um melhor alinhamento das retas ficando evidenciado pela maior sobreposição das regiões de distribuição dos pontos no gráfico. Um correto alinhamento das retas permitiria, por exemplo, estabelecer uma relação matemática entre a concentração de álcool presente no ar exalado utilizando somente os resultados obtidos a partir do fluido oral e além de permitir estabelecer um fator de correção para compensar as diferenças das unidades de medidas.

Os dados de cada uma das curvas apresentadas nos gráficos das Figuras 36 a Figura 37 estão apresentados nas Tabela 47 e Tabela 48.

Tabela 47. Resultados dos coeficientes das retas ajustadas para o intervalo de coleta de 30 minutos

Retas	Feminino				Masculino			
	Angular	Intercepto	R ²	r	Angular	Intercepto	R ²	r
Etilômetro	0,5663	0,0228	0,406	0,637	0,4269	0,052	0,406	0,789
Sangue	-4,5370	0,31548	0,25	-0,499	0,5412	0,1555	0,062	0,249

Onde: R²: Coeficiente de angular. r: Coeficiente de correlação

Tabela 48. Resultados dos coeficientes das retas ajustadas para o intervalo de coleta de 60 minutos

Retas	Feminino				Masculino			
	Angular	Intercepto	R ²	r	Angular	Intercepto	R ²	r
Etilômetro	0,0806	0,12545	0,04	0,208	0,1710	0,1146	0,217	0,466
Sangue	-0,0139	0,14793	0,00	-0,006	-0,3012	0,1668	0,015	-0,12

Ao realizar uma análise numérica dos dados das Tabela 47 e Tabela 48, pode-se observar que o etilômetro, dentre as outras medidas, apresentou melhor relação linear com as medidas do fluido oral apenas para 30 minutos de coleta, para ambos os sexos.

O coeficiente angular (R²) significa o quanto o ajuste explica a variabilidade dos dados pelo modelo linear. A avaliação do desempenho é realizada por meio do coeficiente de correlação (r) que apresenta a correlação linear entre as duas variáveis. Sendo que quanto mais próxima de +1 a correlação máxima observada tende a ser positiva e quando o valor se aproxima de -1 correlação máxima observada é negativa. O coeficiente de variação (r) para o grupo de voluntários femininos foi de 0,637 e de 0,789 para os voluntários masculinos, dessa forma a melhor correlação deste estudo foi obtida para o grupo de voluntários masculinos.

Como todos os voluntários apresentaram o mesmo nível de médio de alcoolemia, foi possível avaliar objetivamente os efeitos da embriaguez ao volante e assim como a influência do uso do celular.

O consumo da bebida interferiu no estado de euforia dos voluntários, sendo que essa alteração acarretou em comprometimento nas capacidades motoras, assim como no controle de movimentos finos imprescindíveis para ações como manter a velocidade de um veículo constante ou mesmo para frear o veículo em situações de emergência.

A avaliação de todos os parâmetros coletados durante o decorrer dos experimentos permitiu observar diferenças significativas nos desempenhos entre os grupos de voluntários masculinos e femininos, porém o mesmo tipo de avaliação não foi possível intragrupo, isto é, quando comparamos os dados do Trajeto 01 com o Trajeto 02, tanto para os homens quanto para mulheres, os resultados não foram estatisticamente significativos.

Utilizando os testes de Wilcoxon e empregando um valor de P = 0,05 para observar a significância dos resultados, as principais diferenças foram constatadas na velocidade média (p-valor = 0,052 no Trajeto 02 com celular) e tempo de percurso (p-valor = 0,0059 e p-valor = 0,0056, para o Trajeto 01 e Trajeto 02, respectivamente).

Podemos destacar as duas variáveis que mais afetaram a capacidade de dirigir ao serem relacionadas com o uso do celular: a velocidade média e o tempo de percurso. Em relação a velocidade

média tivemos um p valor muito próximo a um resultado significativo, tornando interessante sua avaliação devido as oscilações da velocidade que foram observadas durante o desvio da atenção para responder ao celular, sendo que em alguns casos ocorreram uma parada total do veículo para uma posterior aceleração visando terminar o circuito proposto no menor tempo possível.

Nos dois grupos estudados, o tempo de percurso apresentou um aumento no intervalo necessário para a conclusão do circuito proposto, o aumento foi de aproximadamente 4 segundos, podendo ser reflexo tanto da evolução dos efeitos da embriaguez quanto do uso do celular, entretanto as abordagens estatísticas não possibilitam um aprofundamento pois não foram observados resultados significativos.

Diferenças mais notáveis foram observadas entre os gêneros dos participantes, sendo que os voluntários masculinos nos dois trajetos apresentaram os menores tempos. É possível que essa diferença de desempenho seja consequência de uma maior impulsividade ou de sensação de autoconfiança apresentada pelos voluntários masculinos, porém esse comportamento pode ser decorrente de maior experiência ao volante, visto que não foram estabelecidos tempo de percurso ou velocidades mínimas, além disso existe uma relação entre a autoconfiança principalmente dos homens e a incidência de acidentes envolvendo este grupo.

Ao abordar esses tipos de comportamento para uma situação real de trânsito, principalmente as oscilações na velocidade ou, em uma situação extrema, onde ocorra a parada do veículo, contribui fortemente para gerar acidentes e lentidão ao trânsito, tornando-se ainda mais grave em horários onde a circulação de veículo encontra-se mais intensa, pois um maior tempo parado durante engarrafamentos deixa o motorista mais predisposto a dividir a sua atenção com o uso do celular.

As variáveis tempo de frenagem, distância de frenagem, número de setas, acelerações bruscas, frenagens bruscas e número de cones derrubados tiveram seus dados coletados e submetidos a avaliações estatísticas, entretanto não foi possível estabelecer nenhuma interpretação com as informações fornecidas pelos softwares.

Porém, estas variáveis possuem um potencial de estarem relacionadas com o desempenho ao volante e podem apresentar interferências quando associadas ao consumo de álcool em conjunto com uso do celular. Entretanto, para um melhor entendimento de como a interação delas, ou de cada uma em isolado, podem vir a influenciar na atenção do motorista podem ser focos de pesquisas futuras.

5. Conclusão

Foi possível o desenvolvimento de um método analítico para a quantificação de etanol em fluido oral, seguindo criteriosamente as diretrizes propostas pela ANVISA. De maneira semelhante, também foi possível realizar pequenos ajustes nesta metodologia para a elaboração de um método analítico para o etanol em amostras de sangue que foram coletadas através de adsorção em uma superfície de papel de filtro.

Os dois métodos propostos serviram como base para construir as curvas de metabolização tanto em fluido oral quanto em sangue, possibilitando o estudo da evolução dos níveis de etanol ao longo do tempo nestas matrizes e, conseqüentemente, a escolha dos intervalos de coletas ideais, ficando estabelecidos que as coletas destas amostras seriam realizadas em 30 e 60 minutos após o consumo de álcool, sendo utilizados durante o experimento prático de álcool e direção. A escolha destes intervalos permitiu observar o comportamento dos voluntários durante a fase ascendente da metabolização, onde os efeitos da embriaguez foram mais evidentes e apresentaram maior potencial de interferir na aptidão necessária para dirigir um veículo.

Após estabelecido o grupo de voluntários que se encaixavam no perfil proposto para este estudo foram realizados uma variedade de experimentos onde todos se relacionavam, direta ou indiretamente, com as ações de beber e dirigir. Um teste de quantificação de etilglicuronídeo realizado com alguns voluntários que permitiram a coleta de amostras de cabelo, possibilitou a confirmação dos hábitos de consumo dos voluntários.

Após realizar a etapa da condução do veículo sob os efeitos da embriaguez e com o auxílio de análises estatísticas foi possível observar mais atentamente algumas tendências da capacidade motora dos voluntários. Foi perceptível em diversos momentos alterações do estado de euforia, afetando inclusive a autoconfiança na capacidade de conduzir o veículo.

O uso do celular para responder mensagens no aplicativo Whatsapp durante os trajetos associado ao consumo de bebida alcoólica contribuiu para comprometer a capacidade de dirigir, ficando evidente ao observar as variações da velocidade média e aumento no tempo total do percurso.

Tendo em mãos todas as informações de alcoolemia obtidas através das amostras de sangue, fluido oral e ar exalado, tentamos estabelecer uma correlação linear entre elas. Não foi possível estabelecer uma correlação entre o sangue e o fluido oral com os dados obtidos, entretanto foi possível observar uma correlação entre o ar exalado e fluido oral. O alinhamento das curvas alcançou um coeficiente de variação 0,789 para os voluntários masculinos e 0,637 para os voluntários femininos, sendo que quanto mais próximo de 1 este valor, maior é a correlação entre as curvas estudadas.

Existem muitas variáveis exploradas neste trabalho com potencial de prejudicar o desempenho dos motoristas ao dirigir, entretanto muitas dessas variáveis não demonstraram significância estatística. Para isso são necessários estudos, onde sejam pré-determinado o valor de alguns parâmetros, como, por exemplo, estabelecendo uma velocidade fixa para se estudar as suas interações com as demais variáveis.

Referências

ABREU, D. R. O. M.; DE SOUZA, E. M.; MATHIAS, T. A. F.; Impacto do Código de Trânsito Brasileiro e da Lei Seca na Mortalidade por Acidentes de Trânsito. *Cad. Saúde Pública* 2018; 34 (8):e0022117.

AGRAWAL, A., EDENBERG, HJ, FOROUD T, BIERUT LJ, DUNNE G, HINRICHS AL, NURNBERGER JI, CROWE R, KUPERMAN S, SCHUCKIT MA, BEGLEITER H, PORJESZ B, DICK, DM: Association of GABRA2 with drug dependence in the collaborative study of the genetics of alcoholism sample. *Behav Genet*, 36:640-650, 2006.

ALCARDE, A. R.; MONTEIRO, B. M. S.; BELLUCO, A. E. S. Composição química de aguardentes de cana-de-açúcar fermentadas por diferentes cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae*. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 35, n. 8, p. 1612-1618, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-0422012000800022&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 09/01/2020.

ALT, A.; JANDA, I.; SEIDL, S.; WURST, F. W.; Determination of ethyl glucuronide in hair samples. *Alcohol and Alcoholism*, 2000; v. 35(3): 313-314.

AMMON, E.; SCHAFER, C.; HOFMANN, U.; AND KLOTZ, U. Disposition and first-pass metabolism of ethanol in humans: Is it gastric or hepatic and does it depend on gender? *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 59(5):503–513, 1996.

ANDRADE, S.M.; SOARES, D.A.; BRAGA, G.P.; MOREIRA, J.H.; BOTELHO, F.M. Risky behavior for traffic accidents: a survey among medical students in Southern Brazil. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, 2003, 49 (4): 439-444.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de Validação para Métodos Bioanalíticos – Resolução RDC nº 27/12, de 17 de Maio de 2012. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/rdc0027_17_05_2012.pdf/c6edeb56-200d-4482-8a19-99fa11c33fd3>. Acesso em 16/04/2019.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de Validação para Métodos Analíticos – Resolução RDC nº 166/17, de 24 de julho de 2017. Disponível em: <<https://www20.anvisa.gov.br/coifa/pdf/rdc166.pdf>>. Acesso em 16/04/2019.

ARBENZ, G. O. - *Medicina Legal e Antropologia Forense*. São Paulo: Livraria Atheneu, 1988.

ATKINS, P; JONES, L. PRINCÍPIOS DE QUÍMICA: Questionando a vida moderna e o meio ambiente. 5ª ed. - Porto Alegre: Bookmanm 2012. Cap. 19, p 762-763.

BARBALHO, C. A. Papel dos receptores GABA-Benzodiazepínicos da amígdala na modulação da ansiedade em camundongos ingênuos e reexpostos ao labirinto em cruz elevado (Dissertação de Mestrado) Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR. São Carlos, 2007.

BASTIANI, M.F.; LIZOT, L. L. F.; SILVA, A. C. C.; HAHN, R. Z.; DRIES, S. S.; PERASSOLO, M. S.; ANTUNES, M. V.; LINDEN, R.; Improved measurement of ethyl glucoronide concentrations in hair using UPLCMS/MS for the evaluation of chronic ethanol consumption. *Forensic Sci. Int.*, 2020; 306:110071.

BASTOS, Y. G. I.; ANDRADE, S. M.; SOARES, D.A. Características dos acidentes de trânsito e das vítimas atendidas em serviços pré-hospitalar em cidades do sul do Brasil, 1997/2000. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v.21, n.3, p.815-822, 2005.

BAU, C. H. D. Estado atual e perspectivas da genética e epidemiologia do alcoolismo. *Ciênc. Saúde coletiva*, São Paulo, v. 7, n. 1, p. 183-190.

BAHADORIMONFARED, A.; SOORI, H.; MEHRABI, Y.; DELPISHEH, A.; SALEHI, M. *et al.* Trends of fatal road traffic injuries in Iran (2004-2011). *PLoS One* 2013; 8:e65198.

BORDIN, D. C. M.; MONEDEIRO, F. F. da S.; CAMPOS, E. G.; ALVES, M. N. R.; BUENO, L. H. P.; DE MARTINIS, B. S.; Técnicas de Preparo de Amostras Biológicas com Interesse Forense. *Scientia Chromatographica*. 7(2): 125-143, 2015.

BORGES, C. R.; ROBERTS, J. C.; WILKINS, D. G.; ROLLINS, D. E.; Relationship of melanin degradation products to atual melanin content: application to human hair. *Anal. Biochem.* 290(1):116-25 (2001).

BORGO, A. P., Análise Post-Mortem de Cocaína em Cabelo Utilizando a Técnica de LC-MS/MS (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2016.

Brasil. Lei nº 9503, de 23 de setembro de 1997. Código de Trânsito Brasileiro. Disponível em: <<https://presrepublica.jusbrasil.com.br/legislacao/91797/codigo-de-transito-brasileiro-lei-9503-97>>. Acesso em: 06/04/2019.

Brasil. Decreto nº 2.314 de 04 de setembro de 1997 que regulamenta a Lei nº 8.918 de 14 de julho de 1997, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/L8918.htm>. Acesso em: 09/01/2020.

Brasil. Lei nº 11.705, de 19 de junho de 2008: altera a Lei nº 9.503, de 23 de setembro de 1997, que “Institui o Código de Trânsito Brasileiro”, e a Lei nº 9.294, de 15 de julho de 1996, que dispõe sobre as restrições ao uso e à propaganda de produtos fumíferos, bebidas alcoólicas, medicamentos, terapias e defensivos agrícolas, nos termos do § 4º. do art. 220 da Constituição Federal,

para inibir o consumo de bebida alcoólica por condutor de veículo automotor, e dá outras providências.

Diário Oficial da União 2008. Disponível em: <http://www.stf.jus.br/arquivo/cms/processoAudienciaPublicaAdin4103/anexo/Lei_11.705_de_2008.pdf>. Acesso em 06/04/2019.

Brasil. Lei nº 12.760, de 20 de dezembro de 2012. Altera a Lei no 9.503, de 23 de setembro de 1997, que institui o Código de Trânsito Brasileiro. Diário Oficial da União 2012; 21 dez. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2011-2014/2012/lei/112760.htm. Acesso em: 20/12/2019.

Brasil. Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Mortalidade (SIM) – DATASUS [Online], 2009. Disponível em: <http://www.datasus.gov.br/cid10/V2008/WebHelp/v01_v99.htm>. Acesso em: 23/12/2019

Brasil. Presidência da República. Secretaria Nacional de Políticas Sobre Drogas. Relatório Brasileiro Sobre Drogas. IME/USP. Brasília, SENAD, 2009. Disponível em: <https://www.justica.gov.br/central-de-conteudo/politicas-sobre-drogas/relatorios-politicas-sobre-drogas/relatoriobrasileirosobredrogas-2010.pdf>. Acesso em 24/12/2019.

Brasil. Presidência da República. Secretaria Nacional de Políticas Sobre Drogas. I Levantamento Nacional Sobre o Uso de Drogas, Tabaco e Outras Drogas entre Universitários das 27 Capitais Brasileiras. GREA/IPQ-HC/FMUSP. Brasília: SENAD, 2010. p. 153. Disponível em: <<http://www.grea.org.br/userfiles/GREA-ILevantamentoNacionalUniversitarios.pdf>>. Acesso em: 19/12/2019.

BRITO, N. M.; JUNIOR, O. D. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégias e discussão. Pesticidas: R. Ecotoxicol. E Meio Ambiente, v.13, pg. 129-146, 2003.

BRUNI, A.T.; MOZAYANI, A. Driving Under Influence (DUI) in the United States and Brazil. 72nd Annual Scientific Meeting, Proceeding American Academy of Forensic Sciences, p. 983, 2020. Disponível: <https://aafs.org/common/Uploaded%20files/Resources/Proceedings/2020_Proceedings.pdf>

BRUNI, A. T; VELHO, J. A.; OLIVEIRA, M. F. - Fundamentos de Química Forense: uma análise prática da química que soluciona crimes. Campinas, SP: Millennium Editora, 2012.

BUENO, L. H. P. Oral fluid as an alternative matrix to determine ethanol for forensic purpose. For. Scie. Intern. 242 (2014) 117-122.

CALABUIG, J. A. G. Medicina legal y toxicología. 4^a ed. Barcelona: Ediciones Cientificas y Técnicas S. A.; 1992.

CARVALHO, S. P. M. Avaliação da qualidade do DNA obtido da saliva humana armazenada e sua aplicabilidade na identificação forense em Odontologia Legal. [Dissertação de Mestrado]. Faculdade de Odontologia de Bauru - Universidade de São Paulo. Bauru, 2009.

CONSTANTINO, M. G.; QUÍMICA ORGÂNICA: Um curso básico universitário – Volume 1 EDUSP, São Paulo, 2005. Cap. 2.6, p.286.

CONOVER, W. U. Practical Nonparametric Statistics. 2a. ed., John Wiley & Sons, P493, 1980.

COOPER, G. A., KRONSTRAND, R.; KINTZ, P.; Testing SoH. Society of hair testing guidelines for drugs testing in hair. Forensic Scie. Int. 218(1-3):20-24, 2012.

COSTA, B. R. B. Análise de agentes anabolizantes em suplementos proteicos derivado do soro do leite por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ – Rio de Janeiro, 2018.

COSTA, P. A. Avaliação dos efeitos de abstinência alcoólica em ratos submetidos a um modelo de preferência por etanol. Dissertação de mestrado – Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, 2014.

CROCE, D.; JUNIOR, D. C. Manual de Medicina Legal. 8ª ed. São Paulo, Saraiva, 2012.

CROUCH, D. Oral fluid collection: the neglected variable in oral fluid testing. Forensic Sci. Int., 150, 165-173, 2005.

DAHL, H., STEPHANSON, N., BECK, O., HELANDER, A.; Comparisson of urinary excretion characteristics of ethanoland ethyl glucuronide. J. Anal. Toxic., 2002; 26(4):201-4.

DATASUS - Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde. Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/idb2012/matriz.htm#demog>>. Acesso em: 11/03/2019.

DINIS, O. R. J., *et al.*, Collection of biological sample in forensic toxicology. Toxicology Mechanism and Methods, v.20, p.363-414, 2010.

DORTA, D. J.; YONAMINE, M.; DE MARTINIS, B. S.; Toxicologia Forense. São Paulo. Ed. Blucher, 2018. Cap. 3, p. 55-77, 79-99.

FHEMIG – Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais – Protocolos Clínicos: Intoxicação Alcoólica Aguda. 2013.

Disponível:<http://www.fhemig.mg.gov.br/index.php/docman/Protocolos_Clinicos-1/148-034-intoxicacao-alcoolica-aguda-07082014/file>. Acesso em: 28/04/2019.

FILLMORE, M. T.; BLACKBURN, J. S.; HARRISON, E. L. Acute disinhibiting effects of alcohol as a factor in risky driving behavior. Drug Alcohol Depend (2008) 95:97-106.

FINDLAW. The FindLaw Guide to DUI Charges. Thomson Reuters Available at: <http://dui.findlaw.com/>.

FISPQ – Ficha de Informação de Segurança de Produtos Químicos Disponível em: <<http://sites.ffclrp.usp.br/cipa/fispq/Etanol.pdf>>e<<http://downloads.labsynth.com.br/FISPQ/rv2012/FISPQ-%20Alcool%20Etilico%20Absoluto.pdf>>. Acesso em: 09/03/2019.

FRANÇA, G. V.; Medicina Legal. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. Cap. 16 p.367-379.

GIANG, Y. S., WANG, S.M., TSAI, C. C., et al., Analyzing alcohol in breath, blood, oral fluid, and urine for forensic purposes: Taiwanese population, Forensic Sci. J. 6 (1) (2007) 1–19.

GIUDICE, G. H. Parâmetros de uma validação: uma revisão bibliográfica. Acta de Ciência e Saúde, n05; v01, pg. 130-4, 2016.

GONCALVES, E.B.; CASTRO, I. M. Desenho esquemático para programas de qualidade em laboratórios de análises. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, v. 18, n. 1, p. 121-126, 1998.

GORDO, J. M. O., O cabelo como amostra biológica em toxicologia forense: colheita, análise e áreas de aplicação. Universidade Fernando Pessoa. Porto, 2013.

GREEN, M. “How Long Does It Take to Stop?” Methodological Analysis of Driver Perception-Brake Times. Transportation Human Factors, 2(3), 195–216, 2000.

GRÖSCH, M. Saliva: a reliable sample matrix in bioanalytics. Bioanalysis, 9(8), p. 655-668. Switzerland, 2017.

GUBALA, W.; ZUBA, D. Gender differences in the pharmacokinetics of ethanol in saliva and blood after oral ingestion. Pol. J. Phamacol., 2005. V. 55, p. 639-644.

HAES TM. Álcool e sistema nervoso central. Rev Fac Med Rib Preto. 2010; 43(2):153-63.

HAFFNER, H.T., GRAW, M., DETTLING, A. et al. Concentration dependency of the BAC/BrAC (blood alcohol concentration/breath alcohol concentration) conversion factor during the linear elimination phase. Int J Legal Med 117, 276–281, 2003.

HOFFMAN, M. H. *et al.* Álcool e segurança – epidemiologia e efeitos – Psicologia: Ciência e profissão. Nº 1. V.6, 1996.

HOISETH, G., BERNARD, J. P., KARINEN, R., JOHNSEN, L., HELANDER, A., CHRISTOPHERSEN, A. S., *et al.* A pharmacokinetics study of ethyl glucuronide in blood and urine: applications to forensic toxicology. For. Scie. Intern., 2007; 172 (2-3): 119-24.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) - DOQ-CGRE-008. Orientação sobre validação de métodos e ensaios químicos. Rio de Janeiro: INMETRO, 2018.

Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc_organismos.asp?tOrganismo=LabClinicos&iacao=imprimir>

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) – Introdução à validação de métodos – Coordenação Geral de Credenciamento – CGRE / Divisão de Credenciamento de Laboratórios – Dicla, 2006.

Disponível em: < <http://www.inmetro.gov.br/metcientifica/palestras/renata%20borges.pdf> >. Acesso em: 16/08/2019.

JOHAN, K.; MARTENS, L. Review: the physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. *Forensic Sci. Int.* 150, 119-131, 2005.

JANDA, I., WEINMANN, W., KUHNLE, T., LAHODE, M., ALT, A.; Determination of ethyl glucuronide in human hair by SPE and LC-MS/MS. *Forensic Science International*, v. 128, 59-65, 2002.

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

JONES, A. W. Pharmacokinetics of ethanol – Issues of forensic importance. *Forensic Science Review*, 2011.

JONES, A. W. Alcohol, its absorption, distribution, metabolism, and excretion in the body and pharmacokinetic calculations. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Forensic Sci.* e1340, 2019.

JOORIS, L. F. A. Desenvolvimento e validação de método analítico para estudo do perfil esteroide endógeno em urina humana. Dissertação: mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química – Rio de Janeiro: UFRJ 2012.

JORGE, M. H. P. M.; ADURA, F. E. - Álcool e direção veicular. *Revista USP* 2013; 96:23-36.

JOSEPH, R. E., SU, T. P., CONE, E. J.; In vitro binding studies of drugs to hair: influence of melanin and lipids on cocaine binding to Caucoid and Africoid hair. *J Anal. Biochem.* 290(1):116-25, 2001.

JUNG, Y. C.; NAMKOONG, K.; Alcohol: intoxication and poisoning – diagnosis and treatment. *Alcohol and the Nervous System.* v.125(7):115-121, 2014.

JÚNIOR, A. A. - Lições de Medicina Legal. 22ª ed. Rio de Janeiro: Editora Nacional de Direito, 1998.

KASSASBEH, E. T.; ABDALLAT, E.M.; HADIDI, M. S.; Prevalence of alcohol in autopsied medico-legal cases of the National Institute of Forensic Medicine, Jordan. *Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences.* 2011. 3(9):264-270.

KINTZ, P., SPIEHLER, V., NEGRUSZ, A., COOPER, G. Alternative specimens. In: NEGRUSZ, A., COOPER, G., editors. *Clarke's Analytical Forensic Toxicology*, 2^a ed. London: Pharmaceutical Press. 153-187 (2013).

KLOEPPPEL, E., PETERS, R., JAMES, C., FOX, J., & ALICANDRI, E. Comparison of older and younger driver responses to emergency driving events. *Proceedings of the Human Factors and Ergonomics Society*, 38, 986, 1994.

KORTELING, J. E. Perception–response speed and driving capabilities of brain-damaged and older drivers. *Human Factors*, 32, 95–108, 1990.

KRONSTRAND, R.; BRINKHAGEN, L.; NYSTRÖM, F. H.; Ethyl glucuronide in human hair after daily consumption of 16 or 32 g of ethanol for 3 months. *For. Sci. International*. V. 215(1-3), 51-55, 2012.

KUBALA, E.; STRZELECKA, P.; GRZEGOCCA, M.; LIETZ-KIJAK, D.; GRONWALD, H.; SKOMRO, P.; KIJAK, E. A review of selected studies that determine the physical and chemical properties in the field of dental treatment. *Biomed Res. Int.* 2018:2018: 6572381, 2018

LBCD, Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem. *Protocolo de Validação de Métodos de Análise Qualitativa*, 2011.

LERNER, N. Brake perception–reaction times of older and younger drivers. *Proceedings of the Human Factors and Ergonomics Society*, 38, 206–209, 1994

LI, D. Y.; BING, Y. H.; CHU, C. P.; CUI, X.; CUI, S. B.; QIU, D. L.; SU, L. D. Chronic ethanol consumption impairs the tadel-evoked long term depression at cerebellar molecular layer Interneuron-Purkinje cell synapse in vivo in Mice. *Front. Cell. Neurosci.*, 2019.

LINDBERG, L., BRAUER, S., WOLLMER, P., JONES, A. W., OLSSON, S. G. Breath alcohol concentration determined with a new analyzer using free exhalation predicts almost precisely the arterial blood alcohol concentration. *Forensic Sci. Int.* V. 168(2-3), 200-207, 2007.

LINIGER, B.; NGUYEN, A.; FRIEDRICH-KOCH, A.; YEGLES, M.; Abstinence monitoring of suspected drinking drivers: ethyl glucuronide in hair versus CDT. *Traffic Inj. Prev.*, v. 11, p. 123-126, 2010.

IPEA - Instituto de Pesquisas Econômicas Avançadas. Brasília, 2015. Disponível em: <http://www.ipea.gov.br/portal/images/stories/PDFs/relatoriopesquisa/50922_relatorio_acidentes_transito.pdf>. Acesso em: 11/03/2019.

MARÍN, A.V. F. Verificação da janela de detecção de etilglucuronídeo urinário entre usuários crônicos e bebedores sociais de etanol por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2006.

MARSH, P. D.; DO, T.; BEIGHTON, D.; DEVINE, D. A.; Influence of saliva on the Oral Microbiota. *Periodontology*, v. 70 (1), p. 80-92, 2015.

MEHTA, C.R. & PATEL, N. R., *StatXact-5 for Windows*. Manual, Cytel Software Cooperation, Cambridge, USA, 2001.

MILLER S.A., DYKES D.D., POLESKY H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16: 1215, 1988.

MINAYO, M. C.; SOUZA, E.R. Violence and health care as an interdisciplinary field and an arena for collective action. *Hist Ciênc Saúde-Manguinhos* 1997; 4:513-31.

MOORE, S., MONTANE-JAIME, L. K., CARR, L. G., EHLERS, C. L.; Variations of alcohol-metabolizing enzymes in people of East Indian and African descent from Trinidad and Tobago. *Alcohol Res. Health*, v. 30(1):28-30, 2007.

MOREAU, R. L. M.; SIQUEIRA, M. E. P. B.; *Toxicologia Analítica*. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Kooganm 2008. Cap. 1, p. 3-4 – Cap. 29, p. 248-253.

MORETTIN, P. A. & BUSSAB, W. O. *Estatística Básica*. Editora Saraiva, 5ª Ed., 2002.

MORINI L., POLITI, L., GROPPI, A., STRAMESI, C., POLETTINI, A., Determination of ethyl glucuronide in hair samples by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom*, 2006; 41:34-42.

MORINI, L., POLITI, L., POLETTINI, A.; Ethyl glicuronide in hair. A sensitive and scpecific marker of chronic heavy drinking. *SSA – Society for the study of addiction*. v.104(6): 915-920, 2009.

MORINI, L., ZUCHELLA, A., POLETTINI, A., POLITI, L., GROPPI, A.; Effect of bleaching on ethyl glucuronide in hair: an in vitro experiment. *Forensic Sci. Inter.*, v.198(1-3), 23-27, 2010.

MOTAMAYEL, F. A.; DAVOODI, P.; DALBAND, M.; HENDI, S. S. Saliva as a mirror of the bodyhealth. *DJH*, 2010; vol.1, n.2.

MYLES, H. & WOLFE, D. A. *Nonparametric statistical inference*. New York: John Wiley & Sons. Pages 27–33 (one-sample), 68–75 (two-sample), 1973

NAKAHARA, S.; KATANODA, K.; ICHIKAWA, M. Onset of a declining trend in fatal motor vehicle crashes involving drunk-driving in Japan. *J Epidemiol* 2013; 23:195-204.

NIAA – National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism. *Alcohol Metabolism: an update*. Disponível em: <https://pubs.niaaa.nih.gov/publications/aa72/aa72.htm>. Acesso em 04/02/2020.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. - *Fundamentos de Toxicologia*, 3ªed. - São Paulo: Atheneu Editora, 2008. pg 11-37.

OTERO, SEBASTIÁN; RAU, TOMAS; The effects of drinking and driving laws on car crashes, injuries and deaths: Evidence from Chile. *Accident Analysis & Prevention*. V106, September 2017. Pages 262-274.

PAVANELLO, S., SNENGLI, R., NALESSO, A., SARTORE, D., FERRARA, S. D., MONSTISCI, M.; Alcohol drinking, mean corpuscular volume of erythrocytes, and alcohol metabolic genotypes in drunk drivers. *Alcohol*, v. 46(1):61-68, 2012.

PENTEADO, J. C. P.; MAGALHÃES, D.; MASINI, J. C. Experimento didático sobre cromatografia gasosa: uma abordagem analítica e ambiental. *Quím. Nova*, vol. 31, nº 8. São Paulo, 2008.

PEREIRA, R. E. - Relação entre o consumo de bebidas alcoólicas e as infrações e acidentes de trânsito (Dissertação de mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP-USP. Ribeirão Preto, 2008.

PETERSON, K. Biomarkers for alcohol use and abuse--a summary. *Alcohol Res Health*. V. 28(1):30-3, 2004.

PRAGST, F.; YEGLES, M.; Determination of fatty acid ethyl esters (FAEE) and ethyl glucuronide (EtG) in hair: a promising way for retrospective detection of alcohol abuse during pregnancy? *Ther. Drug. Monit.*, v. 30. p 255-263, 2008.

R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

RIOS, P.A.A.; MOTA, E. L. A.; FERREIA, L. N.; CARDOSO, J. P.; RIBEIRO, V. M.; SOUZA, B. S. Fatores associados a acidentes de trânsito entre condutores de veículos: achados de um estudo de base populacional. *Ciênc. Saúde coletiva*, v.25(3), 2020.

QUINTÁN, G. K. S. Estudo do perfil esteroideal endógeno androgênico em soro humano por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas em série para aplicações no controle de dopagem no esporte. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ – Rio de Janeiro, 2017.

REIS, G. A; GÓIS, H.R.; ALVES, M. S.; PARTATA, A. K. Alcoolismo e seu tratamento. *Revista Científica do ITPAC, Araguaína*, v. 7, n.2, 2014.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. - Validação em métodos analíticos cromatográficos e eletroforéticos. *Quím. Nova*, Vol. 27, No. 5, pg. 771-780, 2004

RIBEIRO, I. P.; GAIVAO, I. Efeito genotóxico do etanol em neuroblastos de *Drosophila melanogaster*. *Rev. Port. Sau. Pub.*, Lisboa, v. 28, n. 2, p. 199-204, 2010.

SANDRIN, R.; CAMPAGNOLI, E. B.; FRANÇA, B. H. S.; LIMA, A. A. S.; Comparação entre a citologia em base líquida e citologia esfoliativa convencional no diagnóstico da condidose bucal. *Rev. Odontol UNESP, Araraquara*; 39(1): 33-39, 2010.

São Paulo. Prefeitura de São Paulo. Vida Segura, 2019. Disponível em: <<https://vidasegura.prefeitura.sp.gov.br>> . Acesso em: 02/03/2019.

SANTOS, P. P. A.; IGLESIAS, D. P. P.; SOUZA, E. L.; FREITAS, R. A.; GALVÃO, H. C.; Saliva: Current Methods For Collection and Attainment of the Sample. *R. Fac. Odontol. Porto Alegre, Porto Alegre*, v.48, n. 1/3. p. 95-98, 2007.

SCHERER, J. N. *et al.* Predictive factors associated with driving under the influence among Brazilian drug-using drivers. *Accid. Anal. Prev.* **123**, 256–262 (2019).

SKOPP, G., SCHMITT, G., POTSCHE, L., DRONNER, P., ADERJAN, R. MATTERN, R. Ethyl glucuronide in human hair. *Alcohol and Alcoholism*, v.35, 283-285, 2000.

SOUZA, E. R.; MINAYO, M. C.; MALAQUIAS, J. V. - Violência no trânsito: expressão da violência social in *Impacto da Violência na saúde dos brasileiros, série B. Textos Básicos de Saúde, Brasília*, 2005.

United Nations Road Safety Collaboration. Global plan for the decade of action for road safety 2011-2020 [Internet]. Geneva: United Nations Road Safety Collaboration; 2011 [cited 2016 Dec 07]. Disponível em: <http://www.who.int/roadsafety/decade_of_action/plan/plan_english.pdf?ua=1>. Acesso em: 09/03/2019.

VAN DYKE, N., & FILLMORE, M. T. Alcohol effects on simulated driving performance and self-perceptions of impairment in DUI offenders. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*, 22(6), 484–493, 2014.

VAN PELT, J. Carbohydrate-deficient transferrin: a new biochemical marker for chronic excessive alcohol consumption. *Nederland Tijdschrift voor Geneeskunde*. 1997;141 (16):773-7.

VEERMAN, E. C. I.; VAN DEN KEIJBUS, P. A. M.; VISSINL, A.; VAN NIEUW AMERONGEN, A. Human glandular salivas: their separate collection and analysis. *Eur. J. Sci.*, 104, 346-352, 1996.

VENTORIN, M. V. P. - Relação entre a dosagem do etanol no sangue e na saliva (Dissertação de mestrado). Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba. Piracicaba, 2004.

VIEIRA, J. M. F. Metabolismo do Etanol (Dissertação de Mestrado). Universidade Fernando Pessoa – Faculdade de Ciências da Saúde. Porto, 2012.

VIGITEL - Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico - Ministério da Saúde, Dez, 2017. Disponível em:

<http://portalms.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/42245-obitos-por-acidentes-de-transito-caem-pelo-segundo-ano-consecutivo>> Acesso em: 04/04/2019.

WABUYELE, S.L., MCMILLIN, G. A., Quantitation of Ethyl- β -D-Glucuronide in human umbilical cord tissue by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) LC-MS in Durg Analysis, 223-236, 2018.

WEAFER, J.; FILLMORE, M. T.; Acute tolerance to alcohol impairment of behavioral and cognitive mechanisms related to driving drinking and driving on the descending limb. *Psychopharmac.* (2012) 220:697.

WOOD, J. H.; FLORA, K. P.; NARASIMHACHARI, A.; BAKER, C. A.; Dependence of salivary drug concentration on salivary flow rate. *Methods and Finding in Experimental and Clinical Pharmacology*, 4, 255-260, 1982.

World Health Organization. Global status report on road safety 2013: supporting a decade of action. Geneva: World Health Organization; 2013. Disponível em: https://www.who.int/violence_injury_prevention/road_safety_status/2013/en/ >. Acesso em: 19/12/2019.

World Health Organization. Global status report on alcohol and health. Geneva: World Health Organization; 2014.

Disponível :<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112736/9789240692763_eng.pdf;jsessionid=0C0663AEC518657AD5AE5588E15EC123?sequence=1 >. Acesso em: 19/12/2019.

XABIER, E. F. - *Rotina Médico Legal*. 2ª ed. Porto Alegre: Sagra Luzzatto; 1998.

ZALESKI, M., MORATO, G. S., SILVA, V. A., LEMOS, T.; Aspectos neurofarmacológicos do uso crônico e síndrome de abstinência do álcool. *Rev. Bras. Psiquiatri*. Vol. 26, suppl.1, São Paulo, 2004.

ZORUMSKI, C. F.; MENNERICK, S.; IZUMI, Y. Acute and chronic effects of ethanol on learning-related synaptic plasticity. *Alcohol*. Author manuscript, 2016. Doi: 10.1016/j.alcohol.2013.09.045.

Anexos

Anexo 01 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidado a participar da pesquisa denominada: **“Investigação dos níveis de etanol em ar exalado, fluido oral e sangue capilar e correlação com efeitos cognitivos e psicomotores em indivíduos após o consumo de bebidas alcoólicas”**, sob responsabilidade do aluno de mestrado Bruno Toledo Freitas e orientação do Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis.

O presente projeto pretende avaliar sua capacidade de conduzir um automóvel em um percurso fechado e controlado, após a ingestão de bebida alcoólica. Estes resultados serão avaliados conjuntamente com os dados genéticos obtidos a partir de uma amostra de sangue sua previamente fornecida ao projeto “Sequenciamento de nova geração de genes envolvidos na biossíntese de melanina em amostra da população brasileira”, desenvolvido sob coordenação do Prof. Dr. Celso Teixeira Mendes Junior, o que permitirá avaliar suas origens ancestrais e identificar se você possui alguma variante genética que esteja influenciando a velocidade com que você eliminará o álcool do seu organismo.

Para sua participação, você deverá dirigir um carro de autoescola em uma velocidade de 40 a 60 km/h acompanhado por um instrutor capacitado a assumir o controle do veículo caso necessário. Teremos também o apoio e autorização da Polícia Militar Rodoviária e da Guarda Universitária para isolar o local e proporcionar maior segurança ao experimento. O percurso de aproximadamente 200 metros será montado em uma via pouco movimentada do campus da USP recomendada pela Guarda Universitária e alguns obstáculos formados por cones estarão posicionados ao longo do trajeto para avaliar sua resposta ao volante.

A condução do veículo será feita em duas situações distintas, sóbrio e após consumo de bebida alcoólica: (I) sóbrio para conhecer o trajeto e sóbrio tentando responder a uma mensagem no celular através do aplicativo Whatsapp; (II) 30 e 60 minutos após a ingestão de um volume controlado de bebida alcoólica, seguindo os mesmos critérios do item (I).

O volume de álcool que você deverá ingerir será diretamente relacionado ao peso corporal, serão oferecidos o equivalente 0,5 g de álcool/kg massa corporal, ou seja, cerca de 760 mL de cerveja ou 106 mL de vodka para um indivíduo de aproximadamente 60 kg.

Para determinar a concentração de álcool, serão coletadas amostras de ar exalado (teste do bafômetro), sangue e saliva em intervalos de 30 minutos após ingestão da bebida alcoólica. A coleta de sangue será pelo puncionamento da polpa de um de seus dedos da mão com lanceta estéril, onde aproximadamente duas gotas serão extraídas. Para a coleta de saliva você deverá colocar um chumaço de algodão na boca e deixá-lo por 1 minuto em contato com o fluido oral. Após o final dos experimentos, você poderá deixar o local apenas após a constatação pelo “bafômetro” de que não há mais álcool no ar exalado, o que deverá levar cerca de 3 a 4 horas.

Como benefícios da pesquisa pode ser destacado o conhecimento de como seu organismo elimina uma quantidade conhecida de álcool, e como o álcool afeta sua capacidade motora em dirigir um automóvel e interagir com celular. Além disso, poderemos identificar se você possui alguma variante genética que esteja influenciando a velocidade com que você elimina o álcool do seu organismo.

A participação no experimento poderá trazer riscos relacionados à condução de veículo sob efeito de álcool, porém, estes serão minimizados pela presença de um instrutor qualificado ao seu lado e que terá todo o controle do veículo em situação de emergência. Poderá também ter algum desconforto relacionado à ingestão de bebidas alcoólicas. Com relação às coletas de amostras, você poderá ter pequeno desconforto no punção do dedo para as coletas de sangue. Porém, não há riscos previsíveis para as coletas de saliva e ar exalado.

Você não terá gastos para participar da pesquisa, porém, caso você tenha alguma despesa relacionada à sua participação, a mesma será ressarcida. Você poderá se recusar a participar ou mesmo se retirar do projeto a qualquer momento sem nenhum prejuízo.

Seu nome e os dados coletados serão mantidos em sigilo. Porém, como o experimento será realizado em via pública, não temos como garantir o total anonimato de sua participação e, como a imprensa já se mostrou interessada em acompanhar o experimento por ser de interesse da comunidade e uma questão de saúde pública importante, sua imagem poderá ser divulgada pela mídia (com devida autorização).

Durante todas as etapas do experimento desta pesquisa, você estará sob a supervisão e acompanhamento dos responsáveis pelo projeto.

Em caso de eventuais dúvidas, você poderá entrar em contato com Laboratório de Análises Toxicológicas Forense – Avenida Bandeirantes, 3900 FFCLRP/USP – Bloco de Exatas Departamento de Química, Bloco 8, sala 47-D andar superior, Fone (16) 3315-0471 – E-mail: martinis@usp.br e bruno.toledo.freitas@usp.br.

Em caso de eventuais dúvidas sobre questões éticas relacionadas ao projeto, você poderá entrar em contato com o CEP – Comitê de Ética em Pesquisa da FFCLRP/USP - Av. Bandeirantes, 3900 – Bloco 01 – sala 07 – Prédio da Administração FFCLRP/USP – 14040-901 – Ribeirão Preto – São Paulo, Brasil. Fone (16) 3315-4811. Atendimento de 2ª a 6ª das 13h30 às 17h30. E-mail: coetp@ffclrp.usp.br / homepage: <http://www.ffclrp.usp.br>

Declaro que concordo em participar desta pesquisa. Recebi uma via deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

_____/_____/2019

Assinatura do participante

_____/_____/2019

Bruno Toledo Freitas

Anexo 02 – Tabela para coleta de dados

Nome Completo:	Data da coleta: ___/___/___
Idade:	Peso Corporal: ___kg
Volume de Vodca Calculado: ___mL	
Frequência de consumo de bebidas alcoólicas	
() 1 a 2 vezes/mês	() 1 a 2 vezes/semana
() 3 ou + vezes/semana	() _____
Tipo de bebida: () cerveja () vinho () vodca () uísque () aguardente () outro? Qual? _____	
Volume normalmente consumido :	
() 1 a 2 latinhas / taças / doses	() 3 a 4 latinhas / taças / doses
() 5 a 6 latinhas / taças / doses	() 6 ou mais latinhas / taças / doses
Vocês faz (ou fez) uso de algum medicamento no último mês?	
() Sim	() Não
Qual (is) ?	
Gostaria de receber um e-mail com o resultado obtido neste experimento?	
() Sim	() Não
E-mail:	
Dados obtidos ANTES do consumo de bebida alcoólica	
Etilômetro: ___mg/L	Etilômetro (polícia): ___mg/L
Tempo gasto para completar o trajeto dirigindo ANTES de consumir a bebida alcoólica	
Conhecendo o percurso: _____min _____seg.	
Utilizou seta? () não / () sim – N°:	Derrubou cones? () não / () sim – N°:
Acelerações bruscas? () não / () sim – N°:	Frenagens bruscas? () não / () sim – N°:
Tempo até frenagem: __:__:__ seg	Velocidade: ___km/h
Distância até o carro parar: _____metros	
Respondendo Whatsapp: _____min _____seg.	Acertou a pergunta?
Utilizou seta? () não / () sim – N°:	Derrubou cones? () não / () sim – N°:
Acelerações bruscas? () não / () sim – N°:	Frenagens bruscas? () não / () sim – N°:
Tempo até frenagem: __:__:__ seg	Velocidade: ___km/h
Distância até o carro parar: _____metros	
Dados obtidos APÓS o consumo de bebida alcoólica (30 minutos)	
Etilômetro: ___mg/L	Etilômetro (polícia): ___mg/L

Apenas dirigindo: _____ min _____ seg.	Cód. Amostra Saliva / Cód. Amostra Sangue
Utilizou seta? () não / () sim – N°:	Derrubou cones? () não / () sim – N°:
Acelerações bruscas? () não / () sim – N°:	Frenagens bruscas? () não / () sim – N°:
Tempo até frenagem: ____:____:____ seg	Velocidade: _____ km/h
Distância até o carro parar: _____ metros	
Respondendo Whatsapp: _____ min _____ seg.	
Utilizou seta? () não / () sim – N°:	Derrubou cones? () não / () sim – N°:
Acelerações bruscas? () não / () sim – N°:	Frenagens bruscas? () não / () sim – N°:
Tempo até frenagem: ____:____:____ seg	Velocidade: _____ km/h
Distância até o carro parar: _____ metros	

Dados obtidos APÓS o consumo de bebida alcoólica (60 minutos)	
Etilômetro: _____ mg/L	Etilômetro (polícia): _____ mg/L
Apenas dirigindo: _____ min _____ seg.	Cód. Amostra Saliva / Cód. Amostra Sangue
Utilizou seta? () não / () sim – N°:	Derrubou cones? () não / () sim – N°:
Acelerações bruscas? () não / () sim – N°:	Frenagens bruscas? () não / () sim – N°:
Tempo até frenagem: ____:____:____ seg	Velocidade: _____ km/h
Distância até o carro parar: _____ metros	
Respondendo Whatsapp: _____ min _____ seg.	
Utilizou seta? () não / () sim – N°:	Derrubou cones? () não / () sim – N°:
Acelerações bruscas? () não / () sim – N°:	Frenagens bruscas? () não / () sim – N°:
Tempo até frenagem: ____:____:____ seg	Velocidade: _____ km/h
Distância até o carro parar: _____ metros	

Dados de Frenagem			
Condição	Tempo até parada total do veículo	Velocidade máxima (km/h)	Distância de frenagem (m)
Sóbrio			
Sóbrio + celular			
Após ingerir bebida alcoólica			
30 minutos			
30 minutos + celular			
60 minutos			
60 minutos + celular			

Anexo 03 – Tabelas com os dados obtidos após análise de amostras de sangue e de fluido oral para o experimento da curva de metabolização

Tempo após ingestão (min)	Concentração de etanol em sangue (g.L ⁻¹)									
	Volunt. 01	Volunt. 02	Volunt. 03	Volunt. 04	Volunt. 05	Volunt. 06	Volunt. 07	Volunt. 08	Volunt. 09	Volunt. 10
15	0,019604832	0,019200067	0,019112631	0,019568577	0,016388488	0,024072558	0,01991181	0,017351017	0,02865229	0,0175834
30	0,019919058	0,023361857	0,020134526	0,020777344	0,018521184	0,038238866	0,022409245	0,018951333	0,032086708	0,021125789
45	0,020421023	0,026844295	0,021417908	0,026907837	0,01810485	0,037427229	0,033571342	0,022702801	0,036671393	0,022347474
60	0,026978026	0,031049097	0,022343972	0,027508408	0,029513981	0,03655184	0,034031352	0,02368912	0,037856975	0,024355771
75	0,021484934	0,033999512	0,020567351	0,025289027	0,017928857	0,03460810	0,036399682	0,024566614	0,046233641	0,028805129
90	0,021965181	0,032206184	0,020747568	0,023225274	0,017283311	0,032601699	0,033571342	0,023689120	0,037187218	0,028648493
105	0,020042218	0,024036749	0,020228297	0,025511702	0,01750855	0,031408741	0,027873759	0,023976337	0,033573803	0,026698906
120	0,019111613	0,023460588	0,019826065	0,021671342	0,016416771	0,030369888	0,02520036	0,021140627	0,034665401	0,026092601
135	0,018592466	0,019837803	0,018957223	0,023835271	0,016662154	0,027438244	0,024920676	0,019045113	0,030328028	0,02521235
150	0,018260424	0,017971628	0,018373805	0,022702501	0,016150620	0,024938006	0,022292576	0,018951333	0,019954856	0,024680704

Tempo após ingestão (min)	Concentração de etanol em fluido oral (g.L ⁻¹)									
	Volunt. 01	Volunt. 02	Volunt. 03	Volunt. 04	Volunt. 05	Volunt. 06	Volunt. 07	Volunt. 08	Volunt. 09	Volunt. 10
15	0,068836127	0,077187861	0,093933	0,080704	0,074476	0,089342	0,074926	0,125304	0,085686	0,018378
30	0,071109756	0,117148499	0,115495	0,096209	0,089658	0,096727	0,123663	0,126445	0,095344	0,094578
45	0,073606041	0,11450864	0,129426	0,101466	0,111395	0,102072	0,148115	0,125079	0,113012	0,105194
60	0,089256372	0,129567552	0,107045	0,123292	0,143831	0,126423	0,102045	0,130199	0,182825	0,110524
75	0,087599364	0,121817263	0,086658	0,106306	0,186269	0,148067	0,06884	0,143718	0,166828	0,175245
90	0,083464072	0,135849144	0,0838	0,087587	0,114538	0,20728	0,138319	0,153176	0,13268	0,196039
105	0,082073773	0,119447561	0,076194	0,082708	0,109515	0,189254	0,061904	0,10457	0,122814	0,136476
120	0,077387221	0,10545994	0,065015	0,081009	0,098663	0,165105	0,078762	0,123755	0,126512	0,135494
135	0,076950656	0,085154305	0,061328	0,083619	0,075109	0,131261	0,047966	0,121963	0,120009	0,134434
150	0,056538492	0,107187711	0,065611	0,071074	0,070296	0,175123	0,034047	0,122915	0,079804	0,128693

Anexo 03 – Tabela com os dados obtidos após análise de amostras de fluido oral para o experimento da curva de metabolização (continuação)

Tempo após ingestão (min)	Concentração de etanol em fluido oral (g.L ⁻¹)									
	Volunt. 11	Volunt. 12	Volunt. 13	Volunt. 14	Volunt. 15	Volunt. 16	Volunt. 17	Volunt. 18	Volunt. 19	Volunt. 20
15	0,198406	0,148285	0,163446	0,150367	0,109539	0,122479	0,170736	0,049662	0,116655	0,134091
30	0,2565	0,167291	0,18171	0,159787	0,137997	0,148582	0,174712	0,059894	0,123556	0,149366
45	0,256337	0,287773	0,189357	0,1635	0,166527	0,148934	0,178652	0,056894	0,138307	0,16314
60	0,27861	0,194242	0,191051	0,180652	0,168424	0,159703	0,29242	0,080409	0,150855	0,167539
75	0,290896	0,154863	0,244603	0,178519	0,203628	0,145572	0,258047	0,121675	0,137749	0,22045
90	0,244631	0,150869	0,243253	0,170388	0,144451	0,131858	0,253048	0,094878	0,136643	0,147423
105	0,234883	0,144799	0,127551	0,158195	0,137003	0,124735	0,22649	0,079496	0,125157	0,132891
120	0,212229	0,131176	0,118891	0,124877	0,122331	0,119924	0,218061	0,077623	0,115221	0,147086
135	0,200712	0,130913	0,112524	0,099913	0,123685	0,103694	0,201813	0,061458	0,114105	0,131112
150	0,200324	0,109533	0,116592	0,077267	0,098218	0,10321	0,174179	0,053772	0,113283	0,119796

Anexo 04

As tabelas com os dados estatísticos encontram-se disponíveis para acesso pelo link:

<https://drive.google.com/drive/folders/1xu76d4G2kqhzGSr2oP8OitKne2oNIR7W?usp=sharing>.