



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

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 vodka 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.

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.	<p>Segundo o Conselho Nacional de Trânsito</p> <ul style="list-style-type: none">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).

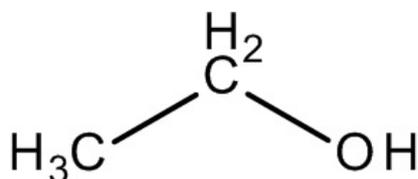


Figura 1. Estrutura química do etanol

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 vodka 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

graduação 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).

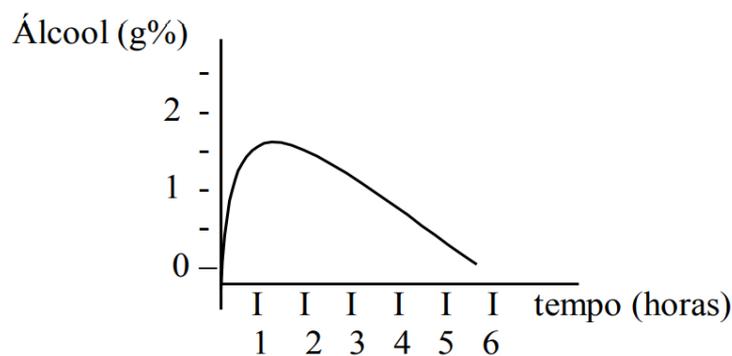


Figura 2. Curva de alcoolemia. Adaptado de Calabuig, 1992 e Weafer & Fillmore, 2012.

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 microsomal 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).

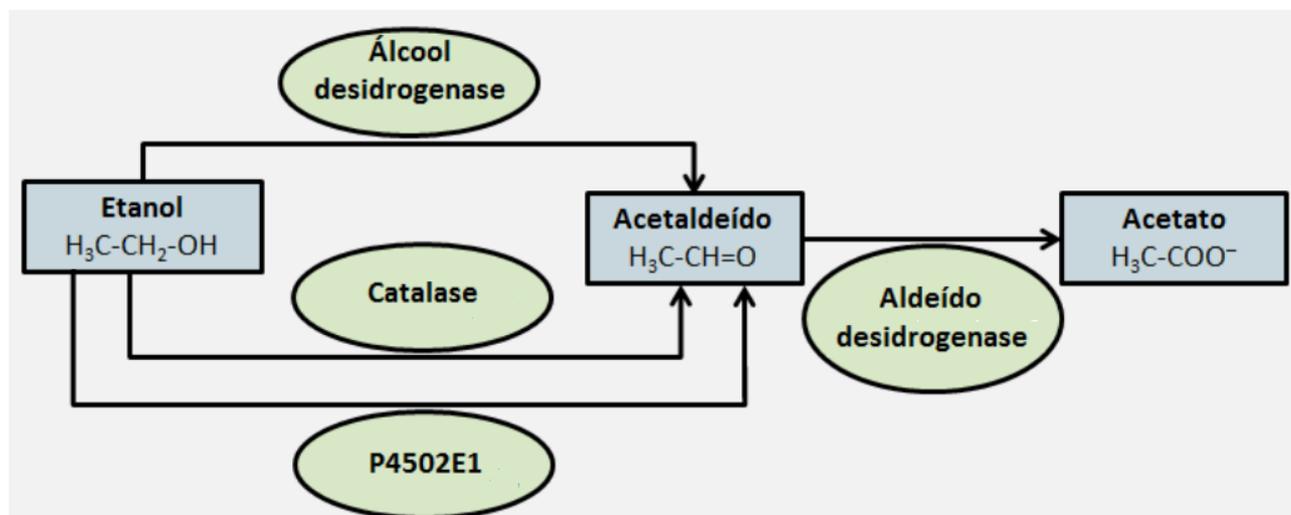


Figura 3. Reações de oxidação do etanol catalisadas por enzimas. Traduzido e adaptado de NIAA, 2007.

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 ocorre a passagem de cloreto por estes canais, garantindo a ação inibitória (ZORUMSKI *et al.*, 2013; DORTA *et al.*, 2018).

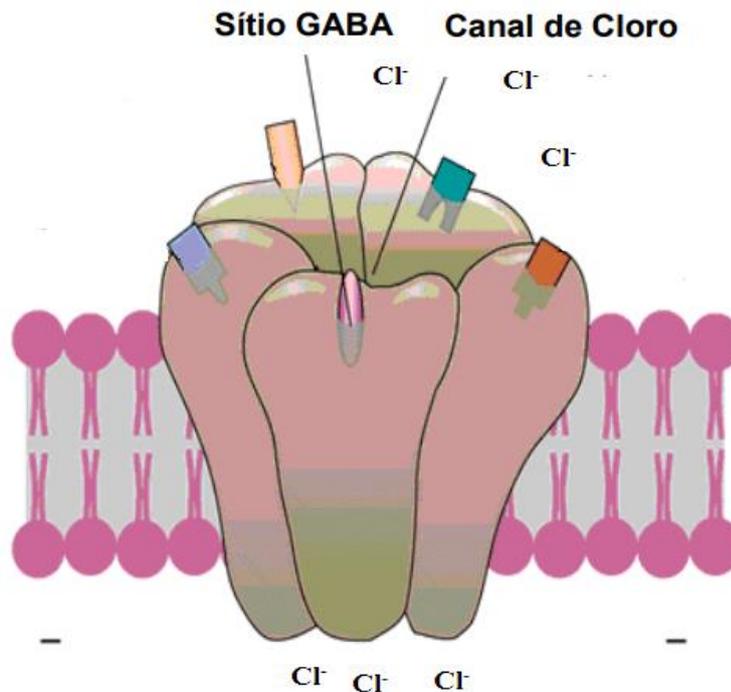


Figura 4. Representação do neuroreceptor GABA. Adaptado de Barbalho, 2007.

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 polinucleotídeos (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).

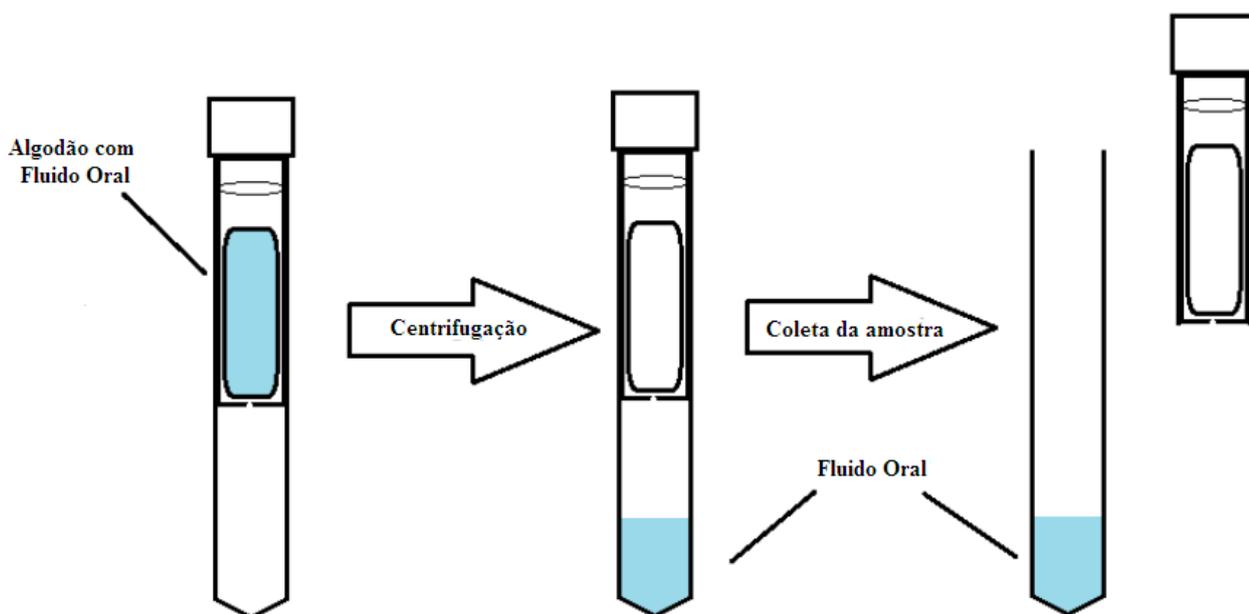


Figura 5. Representação esquemática da coleta de fluido oral utilizando Salivete®. Adaptado de Bueno (2014)

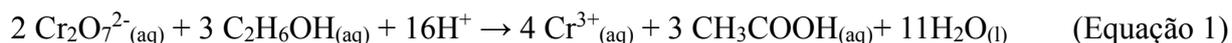
A saliva é muito citada como sendo um espelho da saúde do organismo devido à presença de diversos componentes que a tornam capaz de monitorar os níveis de substâncias presente no sangue, podendo abranger desde análises hormonais até fármacos e drogas (MOTEMAYEL *et al.*, 2010).

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 el.*, 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).

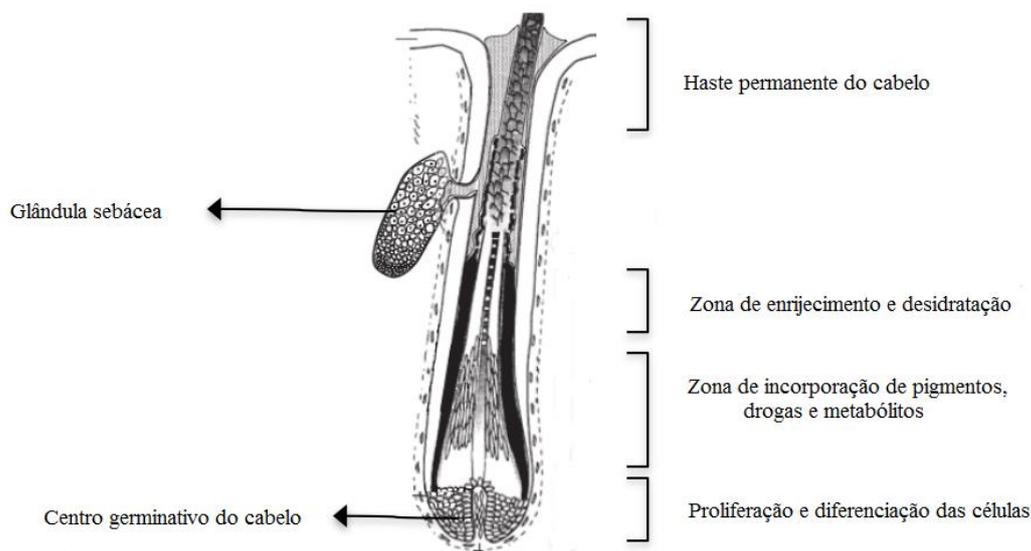


Figura 6. Estrutura do cabelo e a incorporação de drogas e metabólitos em sua matriz. Adaptado de Gordo (2013) e Borgo (2016).

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-glutamyltransferase (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).

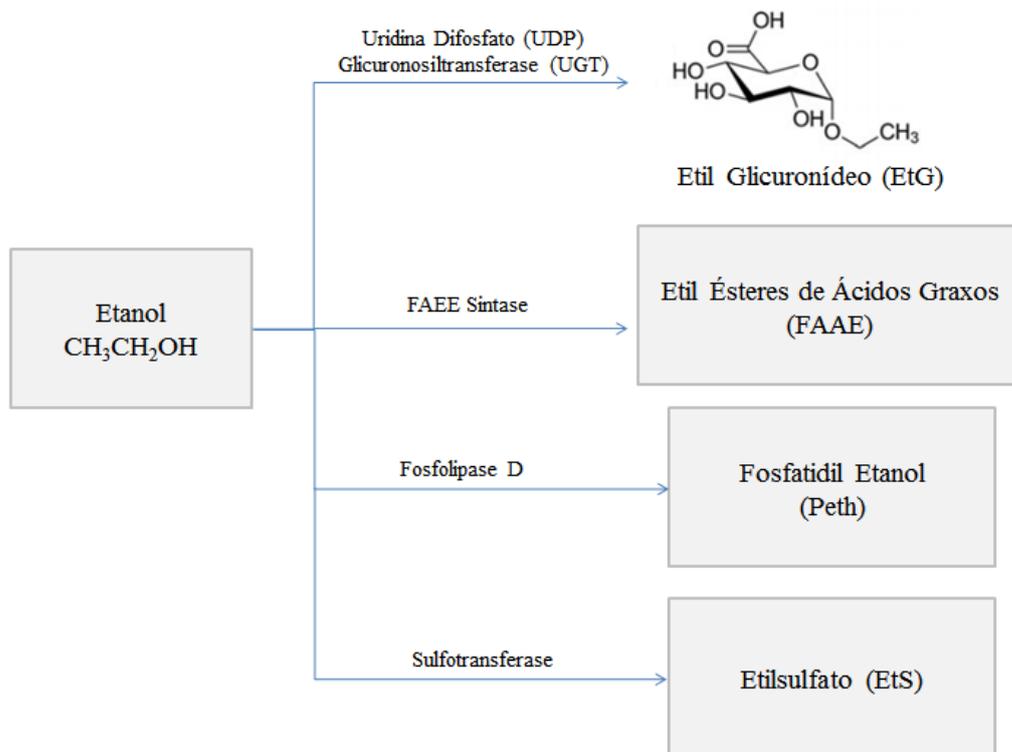


Figura 7. Reação de formação do EtG e outros biomarcadores a partir do etanol. Adaptado de Wabuyele (2018).

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 (r^2). 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).

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 glucuronide 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. 4ª 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. Pharmacol.*, 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 Caucasoid and African 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*, 2ª 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 etilglicuronídeo 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., GROPPA, 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 glucuronide in hair. A sensitive and specific 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., GROPPA, 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., SNENGI, 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 esteroide 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 candidose 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 em: <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.