

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
SERGIO AROUCA
ENSP

“Alcoolemia e etanol no ar exalado: validação de uma metodologia rápida e sua aplicação em um grupo populacional exposto a doses controladas.”

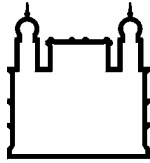
por

Arthur de Mello Prates

Dissertação apresentada com vistas à obtenção do título de Mestre em Ciências na área de Saúde Pública e Meio Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Rabello Alves

Rio de Janeiro, julho de 2012.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Esta dissertação, intitulada

“Alcoolemia e etanol no ar exalado: validação de uma metodologia rápida e sua aplicação em um grupo populacional exposto a doses controladas.”

apresentada por

Arthur de Mello Prates

foi avaliada pela Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Claudio Cerqueira Lopes

Prof. Dr. Josino da Costa Moreira

Prof. Dr. Sergio Rabello Alves - *Orientador*

Catálogo na fonte
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica
Biblioteca de Saúde Pública

P912 Prates, Arthur de Mello
Alcoolemia e etanol no ar exalado: validação de uma metodologia rápida e sua aplicação em um grupo populacional exposto a doses controladas. / Arthur de Mello Prates. -- 2012. x, 56 f. : tab. : graf. ; mapas
Orientador: Alves, Sergio Rabello
Dissertação (Mestrado) – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2012
1. Consumo de Bebidas Alcoólicas - sangue. 2. Etanol - sangue. 3. Etanol - metabolismo. 4. Etanol - efeitos adversos. 5. Etanol - toxicidade. 6. Bebidas Alcoólicas - análise. 7. Análise do Ar. 8. Cromatografia. I. Título.

CDD - 22.ed. – 362.292

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Toxicologia do Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana (CESTEH) localizado na Fundação Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro sob orientação do Prof. Dr. Sergio Rabello Alves e tendo colaboração do Prof. Dr. Jefferson Jose Oliveira Silva.

Os auxílios financeiros foram concedidos pela Fundação Carlos Chagas de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

O aluno recebeu bolsa da FIOCRUZ durante todo o desenvolvimento deste projeto.

Dedico essa dissertação aos meus amores: Lilia, Cristina, Thalita, Tatyane e Thamyres

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Sergio Rabello Alves, pela oportunidade de realizar esse mestrado, pela amizade e pela confiança. E por ter me ajudado muito em dar o próximo passo na minha vida profissional, me dando tempo para estudar para o concurso em que eu fui aprovado.

À Ana Cristina Simões Rosa, pela ajuda nos momentos de dúvida, por ter me ajudado em praticamente todas as etapas do processo de validação dessa metodologia e por se mostrar sempre solícita em me auxiliar.

Ao professor Jefferson José Oliveira Silva pela oportunidade de participar desse projeto, que sem dúvida tem tudo para ser um divisor de águas, em relação ao metabolismo do álcool e seus efeitos sobre a nossa população.

Ao professor Josino Costa Moreira pelos ensinamentos, passados a mim com tanta sabedoria, agradeço muito sua ajuda, que veio quando eu mais precisei.

Ao amigo Mário Sergio da Silva Amorim por estar sempre pronto para me ajudar e pelos momentos de descontração, que sem dúvida tornam o ambiente de trabalho algo mais agradável.

À minha noiva Tatyane Pereira dos Santos, pelo apoio, sem o qual eu não teria obtido sucesso no concurso em que fui aprovado, pelo carinho, pelo cuidado e por ser essa mulher maravilhosa e minha estrela guia. Obrigado por colocar em minha vida essa menina linda e muito esperta, chamada Thamyres, um anjinho pra eu chamar de filha e que eu amo demais. Amo você!!

A minha mãe e minha irmã pelo apoio em todas as etapas da minha vida, por estarem sempre lá para mim, pelo amor e pelo carinho. E por me aturar nos momentos de estresse e nos momentos de mal humor. Obrigado por tudo. Amo vocês!!

RESUMO

O consumo de bebidas alcoólicas é praticado pela sociedade desde, pelo menos, o início dos registros históricos em rituais religiosos, comemorações e confraternizações. Na saúde, o etanol é utilizado como anti-séptico e desinfetante. Também é empregado como veículo para alguns tipos de apresentações farmacêuticas. Contudo, seu principal impacto é devido ao uso não-médico, tanto pela alta frequência de uso como pelos inúmeros problemas de Saúde e Segurança Pública a ele associados. Com a entrada em vigor da chamada “Lei Seca” faz-se necessário um maior conhecimento dos efeitos do etanol sobre o organismo humano especificamente sobre a população brasileira. Assim, este trabalho tem por objetivo realizar os procedimentos de validação de uma metodologia cromatográfica para identificação e quantificação de etanol e do acetaldeído e de sua aplicação em um grupo populacional exposto. Nesta validação foram estudados os critérios e estabelecidas as condições cromatográficas que atendam ao objetivo supracitado. Foram analisados pela metodologia padronizado e pelo etilômetro, 6 indivíduos nesse primeiro momento, estando o valor do etilômetro subestimado em 40% em 4 desses casos, diferença que no entanto desaparece quando esses dados são estudados de forma conjunta, sendo então estatisticamente semelhantes. Assim deve-se utilizar individualmente esses resultados, para que as características metabólicas singulares de cada um, sejam evidenciadas. Existe também a necessidade de análises de um grupo maior, para que haja maior robustez nos resultados.

ABSTRACT

The consumption of alcoholic beverages is practiced by the society since, at least, the beginning of recorded history in religious rituals, celebrations and gatherings. In health, ethanol is used as an antiseptic and disinfectant. It is also used as a vehicle for some types of pharmaceutical preparations. However, its main impact is due to non-medical use, both for the high frequency of use as by the numerous problems of public health and safety associated with it. With the entry into effect of the so-called "Lei Seca" is necessary a better understanding of the effects of ethanol on the human body specifically the Brazilian population. Thus, this work aims to carry out the procedures for validation of a chromatographic method for identification and quantification of ethanol and acetaldehyde and their application in a exposed populational group. In this validation were studied the criteria and established the chromatographic conditions that meet the above objective. Were assessed by this standardized methodology and by breathalyzer, six individuals at this time, the value of breathalyzer being underestimated by 40% in 4 of these cases, however difference disappears when the data are studied jointly, looking like statistically similar. Thus, these results must be used individually, so that the particular metabolic characteristics of each one are evident. There is also a need for analysis of a larger group, for greater robustness in the results.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Aspectos históricos do uso do álcool	2
1.2 Características físico-químicas do etanol	2
1.3 Aspectos toxicocinéticos e toxicodinâmicos do etanol no organismo humano	3
1.4 Exposições aguda e crônica ao etanol.....	6
1.5 Álcool e trânsito	7
1.6 Limites legais da concentração de álcool no sangue pelo mundo	8
1.7 Métodos analíticos para a determinação dos níveis de etanol	11
1.8 Validação metodológica	12
2. OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos Específicos.....	18
3. JUSTIFICATIVA	19
3.1 Justificativa	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
4.1 Materiais	22
4.2 Equipamento Instrumental analítico utilizado.....	23
4.3 Soluções utilizadas para o desenvolvimento do método.....	24
4.4 Avaliação das matrizes sangue e urina.....	24
4.5 Preparo das amostras para a validação	25
4.6 Condição inicial de trabalho	25
4.7 Otimização da técnica de extração em espaço confinado (“headspace”).....	25
4.8 Teste de interferência de outro anticoagulante/conservante.....	26
4.9 Coletas.....	26
4.10 Comparação das metodologias analíticas entre o etanol no ar exalado X sangue. 27	
4.11 Teste de estabilidade do analito intra-dia.....	27
4.12 Gerenciamento das informações produzidas e softwares empregados.....	27
4.13 Aspectos éticos.....	28
5. Resultados & Discussão.....	29
5.1 Condições cromatográficas iniciais, otimização da extração, validação e aplicação....	30
5.2 Aplicação do método	38
6. CONCLUSÃO	43

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
8. ANEXOS	50
ANEXO 1: Folha de rosto	51
ANEXO 2: Questionário	52
Anexo 3: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Coleta de Material Biológico	55

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Metabolismo do etanol.....05
- Figura 2** – Limites legais da concentração de etanol no sangue ao redor do mundo.....09
- Figura 3** – Fluxograma referente ao desenho amostral do painel de doses controladas de álcool etílico (fonte: Oliveira-Silva, 2009).....26
- Figura 4** – Cromatograma típico gerado na coluna CARBOWAX 20M em amostras de sangue fortificadas com 100 dg.L⁻¹ cada analito, sendo eles: acetaldeído, acetona, metanol, 2-propanol, etanol. E 30 dg.L⁻¹ de isobutanol como padrão interno (PI).....32
- Figura 5** – Cromatograma típico gerado na coluna DB-ALC1 em amostras de sangue fortificadas com 0,01 dg.L⁻¹ de cada analito, sendo eles: acetaldeído, acetona, metanol, 2-propanol, etanol. E 1,6 dg.L⁻¹ de isobutanol como padrão interno (PI).....33
- Figura 6** – Curva de calibração representativa do etanol em sangue. As concentrações variaram de 0,01 a 5 dg.L⁻¹. $R = 0,999992$, $Y = A * X + B$, onde $A = 10248493,8$ e $B = 42836,9907$. Mínimo de três experimentos.....35
- Figura 7** – Curva de calibração representativa do acetaldeído em sangue. As concentrações variaram de 0,01 a 5 dg.L⁻¹. $R = 0,999833$, $Y = A * X + B$, onde $A = 10453159,4$ e $B = 67211,26$. Mínimo de três experimentos.....36
- Figura 8** – Sobreposição das diversas curvas de calibração de amostras fortificadas com etanol nas concentrações que variaram de 0,05 dg.L⁻¹ a 250 dg.L⁻¹ em diversas matrizes: ● = Água; ○ = Sangue e ▼ = Urina. Comparação entre as matrizes. Mínimo de três experimentos.....37
- Figura 9** – Médias das concentrações dos indivíduos nas três coleta.....38
- Figura 10** – Comparação entre os anticoagulantes heparina e fluoreto de sódio.....41
- Figura 11** – Comparação entre os experimentos realizados para validação...47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Coeficientes de variação em função do nível de concentração do analito.....	15
Tabela 2 – Diferentes tratamentos realizados no sistema de extração em espaço confinado (“headspace”) e respectiva áreas obtidas em amostras fortalecidas a uma concentração de 1 dg.L ⁻¹ (Concentração final do tubo – vial) de etanol e acetaldeído.....	31
Tabela 3 - Tempos médios de retenção expressos em minutos dos analitos alvo pesquisados, bem como seus respectivos desvios-padrão e ordem de surgimento dos cromatogramas oriundos de duas fases estacionárias distintas.....	34
Tabela 4 - Comparação entre a metodologia cromatográfica e o etilômetro ...	39
Tabela 5 - Parâmetros estatísticos referentes a validação da coluna cromatográfica DB-ALC1.....	40

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Alguns exemplos dos limites legais de alcoolemia e sua relação com as mortes por acidente de trânsito.....	10
Quadro 2 – Comparação entre as metodologias para a análise de etanol e suas limitações.....	11
Quadro 3 – Estabilidade intra-dia etanol.....	42

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos históricos do uso do álcool

A palavra “álcool” possui uma origem inusitada. Vem da palavra *al kuhl* e se referia originalmente a um fino pó de antimônio, o qual era usado por mulheres para pintar as pálpebras¹. Posteriormente esse termo foi utilizado por alquimistas para indicar produtos de destilação, o que levou ao significado atual da palavra².

Denomina-se álcool a um grupo de substâncias orgânicas que contem um grupo hidroxila ligado ao átomo de carbono em substituição ao átomo de hidrogênio¹. Alcoois comuns incluem o álcool etílico ou etanol (encontrado nas bebidas alcoólicas), álcool metílico ou metanol e o álcool propílico ou propanol.

O consumo de bebidas alcoólicas é praticado pela sociedade desde, pelo menos, o início dos registros históricos³. Como descrito na literatura, desde os primórdios da civilização o álcool já estava presente na sociedade como um elemento importante em rituais religiosos, comemorações e confraternizações⁴.

Posteriormente novos tipos de bebidas alcoólicas foram desenvolvidos, e produtos antes produzidos no meio doméstico, passaram gradualmente à escala industrial. Estando disponível para ser comprado em qualquer lugar hoje em dia⁵.

1.2 Características físico-químicas do etanol

O etanol, cuja fórmula molecular é $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, é um líquido incolor com peso molecular 46,07 u, tem sido descrito como um dos mais peculiares compostos orgânicos contendo oxigênio, dado sua combinação de propriedades como solvente, germicida, anti-congelante, combustível, depressivo, componente de bebidas, além de grande versatilidade como intermediário químico para outros produtos⁶.

1.3 Aspectos toxicocinéticos e toxicodinâmicos do etanol no organismo humano

Segundo Santos *et al*, na área médica o etanol é utilizado como anti-séptico e desinfetante⁷. Também é empregado como veículo para alguns tipos de apresentações farmacêuticas⁸. Contudo, seu principal impacto é devido ao uso não-médico, tanto pela alta frequência de uso como pelos inúmeros problemas de Saúde e Segurança Pública a ele associados⁹.

Devido principalmente às suas propriedades físico-químicas, a toxicocinética do etanol é complexa e sua distribuição através dos diversos compartimentos corpóreos depende de muitos fatores, incluindo: quantidade e tipo de ingestão (dose única ou fracionada), presença de alimento no estômago, fluxo sanguíneo hepático, idade, sexo, quantidade de água no corpo e atividade/síntese de isoenzimas álcool desidrogenases¹⁰.

O etanol é rapidamente absorvido principalmente no estômago¹¹. Uma fração importante é eliminada através da biotransformação ocorrida no fígado, fenômeno este classicamente denominado como efeito de primeira passagem¹². De acordo com Swift (2003) o metabolismo hepático do etanol mostra cinética de saturação, em concentrações bem baixas, de maneira que a fração removida diminui quando aumenta a concentração neste órgão¹³. Portanto, se a absorção do etanol é rápida e a concentração na veia porta é elevada, a maior parte dele escapa para a circulação sistêmica, corroborando para os efeitos comportamentais típicos da ingestão excessiva. Contudo, se a absorção for lenta, uma maior fração é removida pelo metabolismo hepático.

Após alcançar a corrente sanguínea, o etanol é uniformemente distribuído pela água corpórea¹⁴. Assim, em um estômago vazio o etanol é mais facilmente absorvido e conduz a maiores alterações orgânicas.

Cerca de 90% do álcool etílico absorvido é biotransformado sendo que entre 5 e 10% é excretado de forma inalterada, através do ar expirado e na urina. Este último percentual, embora insignificante do ponto de vista toxicológico, é responsável pelo fornecimento da base ou do princípio da estimativa dos níveis sanguíneos de etanol a partir das mensurações realizadas no ar expirado ou na urina¹⁵.

Para se calcular o valor da concentração sanguínea a partir do ar expirado, utiliza-se a Lei de Henry que diz: “A solubilidade de um gás dissolvido em um líquido (etanol no sangue arterial) é proporcional à pressão parcial do gás acima do líquido (etanol no ar exalado)”. Portanto, a proporção das concentrações de etanol no sangue e no ar alveolar, determinada ao final da expiração profunda é relativamente constante sendo que uma concentração de $0,8 \text{ g.L}^{-1}$ (8 dg.L^{-1}) de sangue arterial, produz aproximadamente, $0,35 \text{ mg.L}^{-1}$ no ar expirado. Esta proporção é a base da utilização do etilômetro¹⁶.

A biotransformação do álcool etílico ocorre quase que integralmente no fígado. Aproximadamente, 85% do etanol ingerido é metabolizado por oxidação enzimática que consiste de duas reações enzimáticas sucessivas que requerem nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) como co-fator. A primeira reação envolve a enzima álcool desidrogenase (ADH) responsável pela conversão de etanol a acetaldeído com consequente redução do NAD^+ . O metabólito acetaldeído é uma substância reativa e hepatotóxica. Posteriormente o acetaldeído é metabolizado a ácido acético (acetato) pela enzima aldeído desidrogenase (ALDH), que também reduz a NAD^+ . O acetato produzido é rapidamente convertido a gás carbônico e água através do Ciclo de Krebs¹⁷⁻¹⁹.

Ambas ADH E ALDH apresentam múltiplas isoformas, que podem ser codificadas através de diversos genes e são responsáveis por gerar importantes diferenças acerca do metabolismo do álcool etílico, caracterizando um polimorfismo observado em diferentes grupos populacionais²⁰.

Uma via secundária de biotransformação do álcool envolve a enzima catalase. Esta enzima se faz presente em todos os tipos celulares e sua função está relacionada à eliminação de peróxidos e à concomitante diminuição das espécies radicalares. Na presença de peróxidos, este tipo enzimático pode oxidar etanol a acetaldeído e acetato²¹. Apesar da catalase contribuir minoritariamente em relação à oxidação total do etanol, a produção de acetaldeído pode ocasionar alterações fisiológicas em tecidos cerebrais e outros órgãos através da formação de adutos de acetaldeído com proteínas e com o DNA. Este pequeno grau de esterificação pode contribuir para a toxicidade a longo prazo²².

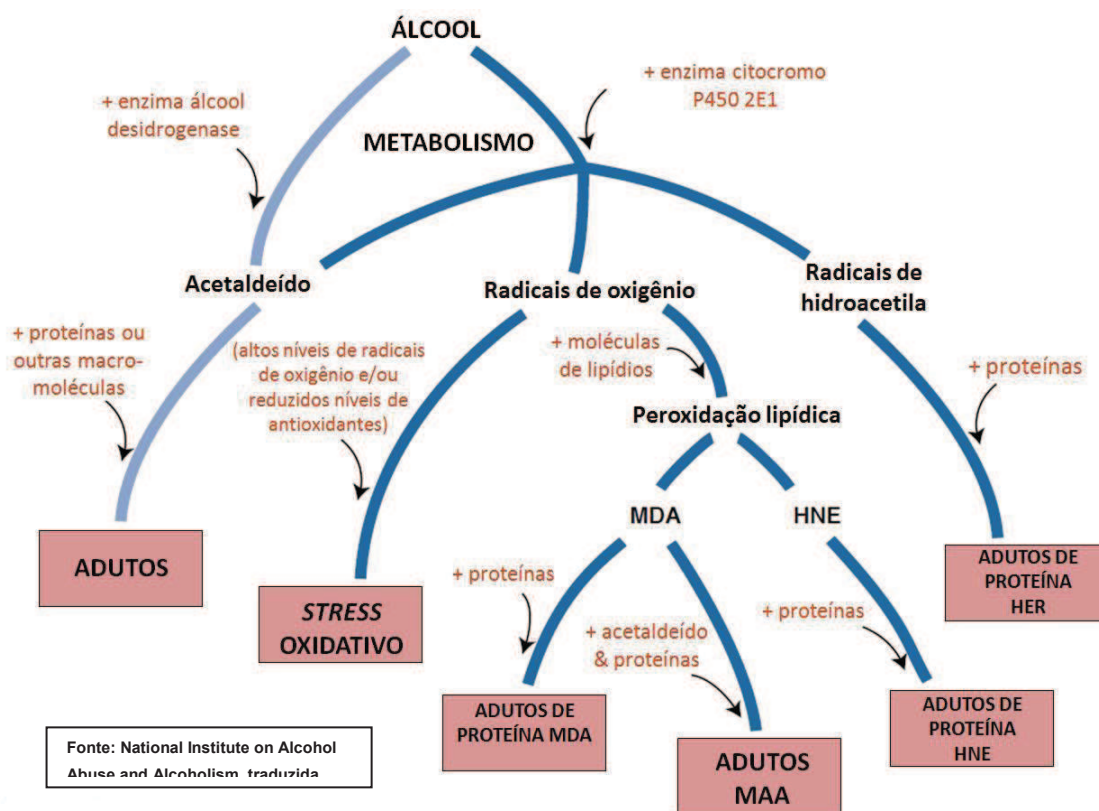


FIGURA 1: Metabolismo do etanol²³

Enzimas esterásicas denominadas ácidos-etil-éster sintetases (FAEES) presentes em diversos tecidos como cérebro, coração, pâncreas e tecido adiposo podem reagir com ácidos graxos para formar ácidos graxos etil-éster. No entanto estes últimos podem persistir por horas a dias após a eliminação do etanol e, portanto, podem se apresentar como biomarcadores do consumo de etanol¹⁵.

Com relação à biomarcadores urinários do consumo crônico de álcool etílico destacam-se o etil sulfato e o etilglucuronídeo, formados pela conjugação do etanol com sulfato e com ácido glicurônico, respectivamente. Entretanto apenas 0,02 a 0,06% do etanol é eliminado por essa via de transformação^{19, 24}.

Além de ser eliminado do organismo mais lentamente que o etanol, o etil glucuronídeo é um metabólito direto dessa substância, o que lhe confere maior especificidade²⁵.

Do ponto de vista toxicodinâmico, o etanol tem seu efeito principal sobre o Sistema Nervoso Central (SNC), através de uma característica ação

depressora. Dessa forma segundo Tabakoff & Hoffman (1996) o efeito do álcool etílico é puramente depressor, à nível celular, embora aumente a atividade de impulsos – presumivelmente por desinibição – em algumas partes do SNC, notadamente nos neurônios dopaminérgicos mesolímbicos que estão envolvidos no fenômeno da recompensa²⁶.

O álcool pode induzir tolerância farmacodinâmica, associada ao desenvolvimento de dependência física. Na ocorrência deste fenômeno, pode haver concentrações plasmáticas muito altas com mínima ou até nenhuma expressão clínica de intoxicação. Não há, entretanto, tolerância aos efeitos letais do álcool^{15, 27}.

Uma interação pouco comum é a que ocorre entre o álcool e o dissulfiram, caracterizada por rubefação, cefaléia, náuseas e vômitos, e taquicardia. Baseado nisso, o dissulfiram tem sido usado no controle de pacientes com dependência alcoólica. Esta droga interfere no metabolismo do álcool por meio da inibição irreversível da enzima acetaldeído desidrogenase, levando ao aumento de acetaldeído, responsável pelos sintomas desagradáveis resultantes da ingestão do álcool etílico²⁸. Essa droga deve ser utilizada com acompanhamento médico, pois possui algumas reações adversas sérias, de acordo com a sua bula, que variam desde uma sonolência ou dor de cabeça, até neurotoxicidade, hepatite e reações psicóticas.

1.4 Exposições aguda e crônica ao etanol

A exposição aguda ao etanol divide-se em duas fases distintas, uma estimulante e outra depressora do Sistema Nervoso Central. Nesta primeira fase, os efeitos mais comuns são: euforia, desinibição e loquacidade (maior facilidade para falar). Na segunda fase outros efeitos surgem, como: falta de coordenação motora, descontrole e sono, podendo chegar ao coma, dependendo dos níveis de consumo²⁹.

Já a exposição crônica está relacionada ao consumo continuado dessa substância, que ao longo do tempo pode desenvolver dependência, conhecida como alcoolismo. Essa condição é considerada frequente entre os brasileiros, atingindo cerca de 10% da população. Alguns sinais de dependência são: o desenvolvimento de tolerância; grande desejo de beber e falta de controle em

quando deve parar; síndrome de abstinência (surgimento de sintomas desagradáveis após ficar algumas horas sem ingerir bebida alcoólica)²⁹.

No entanto, o estudo realizado, trata do uso agudo de etanol, ou seja, seus efeitos em apenas um curto espaço de tempo.

1.5 Álcool e trânsito

Segundo a Organização Mundial de Saúde, morrem por ano cerca de 1.300.000 pessoas por lesões causadas em acidentes de trânsito no mundo sendo que apenas no Brasil este numero beira os 38.000. Sendo nos anos 90, a nona entre as dez maiores causas de morbidade. Estima-se que em 2020 alcance o terceiro lugar, estando atrás somente de cardiopatia isquêmica e depressão unipolar grave³⁰.

Em 2006, os impactos sociais e econômicos dos acidentes de trânsito nas rodovias brasileiras chegam a R\$ 24,6 bilhões, valores principalmente relacionados à perda de produção devido à morte das pessoas ou à interrupção das atividades das vítimas³¹.

Embora as causas de acidentes de trânsito podem ser várias, como por exemplo a qualidade das estradas, a educação dos motoristas é fundamental para que se reduza significativamente os números acima mencionados.

Assim, as Leis de Trânsito precisam ser criteriosamente avaliadas antes de serem aprovadas e entrarem em vigor, para garantir que sejam racionalmente lógicas, cientificamente apoiadas e venham a ser cumpridas igualmente por todos, sem que haja a diferenciação entre as classes ou formas que permitem escapes legais.

Sendo também importante a interação entre o etanol e outras drogas, em motoristas de veículos automotores, como por exemplo a cocaína, que interage com o etanol, formando o cocaetileno^{32, 33}. Esse metabólito, potencializa os efeitos de ambas as drogas, aumentando o estado de euforia, através do bloqueio da recaptação de dopamina no cérebro³⁴. Assim, uma interação tão perigosa deveria despertar maior interesse das autoridades, em relação à detecção de tal metabólito.

1.6 Limites legais da concentração de álcool no sangue pelo mundo

O padrão populacional do consumo de álcool varia tanto de país para país, quanto no interior de cada um. Dessa forma este costume influencia também sua tolerância perante a lei. Entretanto, quando ingerido em doses acima de limites cientificamente estabelecidos, o etanol certamente prejudicará as condições de dirigibilidade dos motoristas. Assim foram estabelecidos limites legais aceitáveis em cada país do mundo que podem variar desde zero a 8 decigramas por litro de sangue, como mostrado na figura 2.

Enquanto no Reino Unido, por exemplo, em 1965 a Associação Médica Britânica sugeriu um limite legal de alcoolemia de 80 mg.dL^{-1} , levando em conta a aceitação pública, o risco de acidentes e a sobrecarga no trabalho policial (número de prisões)³⁵, sendo esse valor revisto em 2002. no Brasil o valor zero foi estabelecido como limite legal sem que estudos preliminares fossem realizados. Este limite é também adotado em países como Uzbequistão, Cazaquistão, Tajiquistão e Afeganistão, países esses de maioria muçulmana, adeptos do islamismo e, portanto, tem por tradição o não consumo de álcool, de nenhuma forma³⁶, sendo países com realidades bem diferentes da nossa.

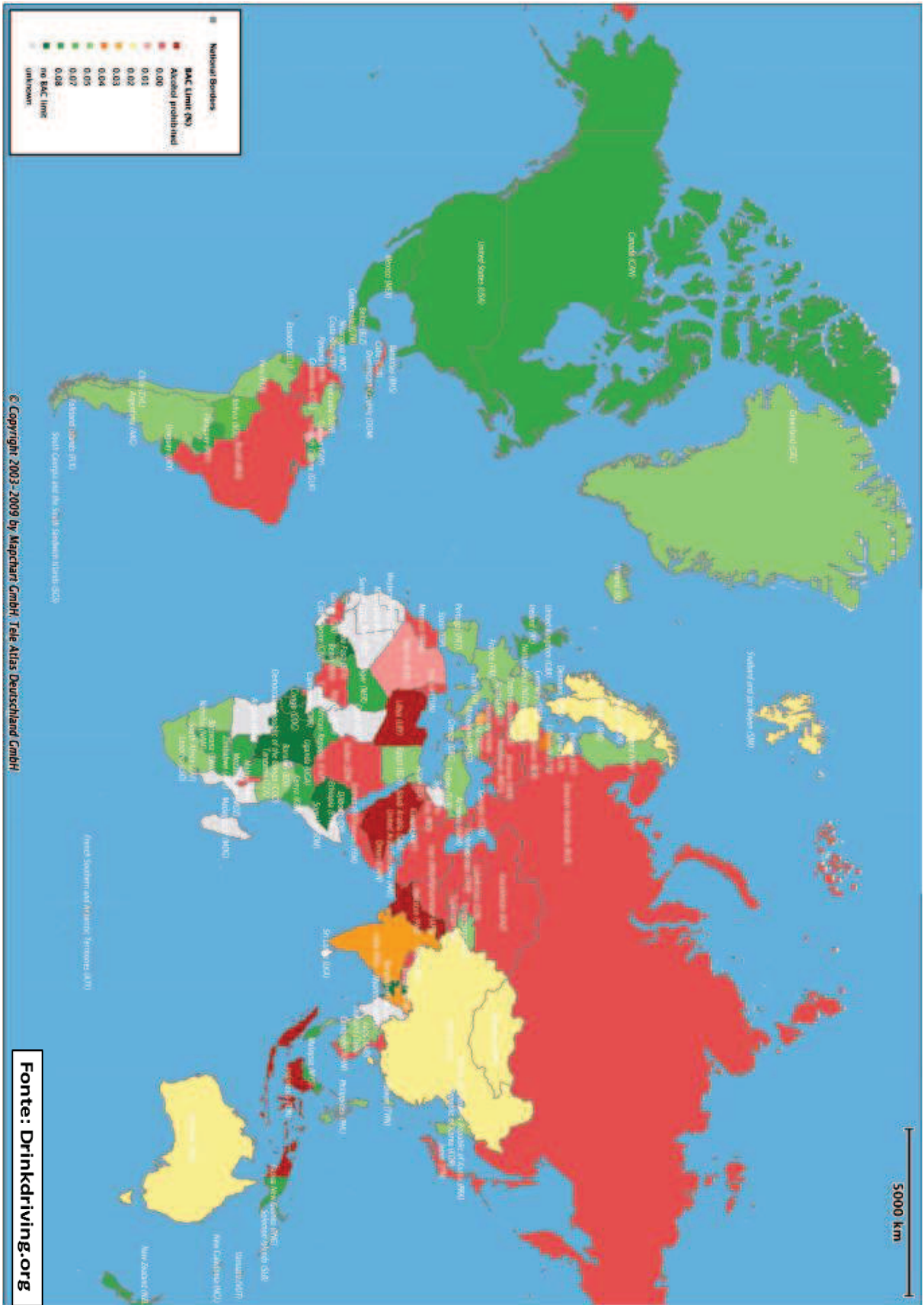


FIGURA 2: Limites legais da concentração de etanol no sangue ao redor do mundo

O Quadro 1, abaixo apresentado, explicita os valores adotados em alguns países. A análise deste Quadro deixa claro que existe um valor mínimo cientificamente estabelecido em países mais desenvolvidos e que possuem estilos de vida próximos ao brasileiro e que no Brasil a relação veículo/acidente é muito superior aos demais mesmo onde os limites legais são mais elevados.

QUADRO 1: Alguns exemplos dos limites legais de alcoolemia e sua relação com as mortes por acidente de trânsito³⁷

País	Limite legal de etanol no sangue (%)	Número de mortes por acidentes (2007)	Número de veículos registrados	Razão veículo/acidente
Brasil	0,00	38.000	49.644.025	1.306
Estados Unidos da América	0,08	42.642	251.422.509	5.896
Canadá	0,08	2.889	20.065.000	6.945
Argentina	0,05	4.630	12.399.887	2.678
Portugal	0,05	854	5.948.269	6.965
França	0,05	4.620	39.926.000	8.641
Austrália	0,02	1.616	14.774.921	9.142
Inglaterra	0,08	3.298	34.327.520	10.408

1.7 Métodos analíticos para a determinação dos níveis de etanol

Existem três principais métodos para a determinação dos níveis de etanol em um indivíduo. Um método enzimático, no qual geralmente se utiliza a saliva como matriz, que consiste na detecção de produtos formados pela reação do álcool, principalmente, com as enzimas álcool desidrogenase e álcool oxidase³⁸. Um método que utiliza o ar exalado como matriz, tendo como princípio a geração de uma corrente elétrica, proporcional à concentração de etanol, pela oxidação de suas moléculas em uma célula eletroquímica³⁹, sendo este método utilizado em muitos trabalhos, principalmente em relação ao abuso de álcool no trânsito, devido à sua praticidade, uma vez que pode ser realizado em campo⁴⁰⁻⁴³. E finalmente um método que utiliza a cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (CG-DIC), acoplado com a técnica de extração em espaço confinado (“headspace”), geralmente tendo o sangue como matriz⁴³.

QUADRO 2: Comparação entre as metodologias para a análise de etanol e suas limitações.

Metodologia	Matriz	Limitações
Enzimática	Saliva	Análise colorimétrica indireta (metabólitos)
Eletroquímica	Ar exalado	Baixa reprodutibilidade
Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização em Chama	Sangue	Matriz de difícil acesso

1.8 Validação metodológica

1.8.1 Parâmetros da validação

A validação de uma metodologia demanda a determinação de diversos parâmetros, analítica e estatisticamente, como discutido a seguir:

1.8.2 Especificidade

Este termo define a capacidade do método em identificar o analito de interesse na presença de outros componentes da matriz⁴⁴. Assim, com a utilização dos padrões analíticos é possível, através da comparação entre os cromatogramas obtidos com os extratos e com as soluções-padrão, o tempo de retenção dos analitos de interesse. Estes dados são utilizados como indicativos da possível presença destas substâncias nas amostras.

1.8.3 Função da Resposta

Esta relação é obtida através da elaboração de uma curva analítica (curva de calibração). A partir da curva obtida pode-se identificar a função matemática que expressa esta relação, desejavelmente linear, e neste caso determinar a equação da reta que melhor a representa (coeficientes angular e linear). A dispersão dos resultados ao redor desta função pode ser obtidos através do valor do coeficiente de correlação linear. Esta curva deve ser construída a partir do uso de, no mínimo, cinco valores de concentração dentro dos limites que se pretende avaliar⁴⁴⁻⁴⁶.

Para a construção do gráfico de calibração (CG-DIC), assume-se que a resposta do instrumento, em relação ao y, está linearmente relacionada com a concentração do padrão y, através da fórmula:

$$y = F(x) + e_y$$

Na qual: e_y = erro randômico ou indeterminado (distribuição normal); y = sinal analítico (ou resposta instrumental).

O método é considerado sensível, quando com pequenas alterações na concentração existem grande alterações na sua resposta⁴⁶.

1.8.4 Intervalo de trabalho

O intervalo do método analítico corresponde à faixa compreendida entre o maior e o menor valor de concentração que possam ser determinados com precisão e exatidão aceitáveis. Em geral estes valores são estabelecidos em função da faixa de concentração de interesse. Não são aceitos resultados obtidos por extrapolação de valores⁴⁷.

O experimento de determinação da faixa de trabalho, deve ser iniciado com a definição de uma faixa preliminar. A faixa de trabalho deve simplesmente cobrir o intervalo com o qual se deseja trabalhar⁴⁶.

1.8.5 Sensibilidade

A sensibilidade é a capacidade de um método em estabelecer a diferença, com determinado nível de confiança, duas concentrações que estejam próximas⁴⁸. É expresso pelo coeficiente angular do gráfico analítico, ou seja, pela expressão:

$$S = Dy/Dx$$

Dessa forma em métodos sensíveis, uma pequena variação na concentração do analito gera uma grande variação no valor do sinal analítico medido⁴⁹.

1.8.6 Exatidão

É definida como a concordância entre o valor real do analito na amostra e o estimado pelo processo analítico, a qual constitui o principal ponto para o propósito da validação^{47, 48, 50}.

O método mais utilizado para validação de processos analíticos é o ensaio de recuperação. Que está relacionado com a exatidão, pois reflete a quantidade de determinado analito, recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra^{47, 51}. Através da fórmula escrita abaixo:

$$\text{Re c\%} = [\text{valor obtido} - \text{valor real}] / \text{valor real} \times 100$$

Normalmente aceita-se valores quando o coeficiente de recuperação é superior a 90%, devendo estar a concentração adicionada dentro da faixa de utilização do método.

1.8.7 Precisão

A precisão do processo analítico é um parâmetro utilizado para determinar a proximidade entre as medidas efetuadas na mesma amostra. Geralmente, é expressa como o desvio-padrão ou coeficiente de variação (CV) de diversas medidas^{52, 53}. O CV é dado pela seguinte equação:

$$\text{CV \%} = s / M \times 100$$

Na qual: s = desvio-padrão das recuperações; M = média das recuperações.

O coeficiente de variação está relacionado com o nível de concentração do analito na amostra, definido pela equação: $\text{CV}(\%) = 2^{(1-0,5\log C)}$, na qual C é a concentração do analito⁵⁴. Desse modo, substituindo-se os níveis de concentração nessa equação obtém-se os valores CV apresentados na Tabela 1.

TABELA 1: Coeficientes de variação em função do nível de concentração do analito⁵⁴.

CONCENTRAÇÃO DO ANALITO	COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (%)
1(100%)	2
10^{-1}	2,8
10^{-2} (1%)	4
10^{-3}	5,6
10^{-4}	8
10^{-5}	11
10^{-6} (ppm)	16
10^{-7}	23
10^{-8}	32
10^{-9} (ppb)	45

1.8.8 Limite de Detecção

Constitui a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas^{47, 55-57}.

A razão sinal/ruído pode ser aplicada somente para processos analíticos que exibem linha de base. Dessa forma é realizada por meio da comparação dos sinais medidos da amostra com baixas concentrações conhecidas do analito com as do branco, estabelecendo-se a concentração mínima na qual o a substância alvo pode ser detectada. A razão sinal/ruído com valor 3 é geralmente considerada aceitável para estimar o limite de detecção^{47, 57}.

Ou ainda, pode ser calculada através da seguinte equação⁴⁶:

$$[(t \times s) - b] / a$$

Sendo: t= distribuição de Student; s= desvio-padrão amostral; b= coeficiente linear; a= coeficiente angular.

1.8.9 Limite de quantificação

É definido como a menor concentração do analito, que pode ser quantificada na amostra, com exatidão e precisão aceitáveis, sob as condições experimentais adotadas. Pode ser estimado, assim como o LD por meio da razão sinal/ruído, do desvio-padrão, sendo a razão sinal/ruído de 10:1 aceitável nesse parâmetro^{47, 57}. Ou também pode ser definida através de cálculos estatísticos, através da equação⁴⁶:

$$10 \times s/a$$

Sendo: s= desvio-padrão amostral; a= coeficiente angular.

Recomenda-se que este valor seja o primeiro ponto da curva de calibração.

1.8.10 Robustez

De acordo com a International Conference on Harmonisation (ICH), a robustez de um método é a medida da sua capacidade de permanecer inalterado sob pequenas variações em alguns parâmetros^{58, 59}.

A avaliação da robustez deve ser considerada durante a fase de desenvolvimento da metodologia. No caso de métodos cromatográficos, como o CG-FID, as variações referem-se a diferentes tipos de colunas, temperatura e fluxo, entre outras⁵⁹.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Validar e aplicar uma metodologia analítica para a identificação e quantificação dos níveis de etanol no sangue em grupo populacional exposto a doses controladas, residentes no município do Rio de Janeiro em 2011.

2.2 Objetivos Específicos

- Validação da metodologia analítica;
- Determinar a variação temporal das concentrações de etanol e de acetaldéido em um grupo populacional exposto em condições controladas;
- Comparar as concentrações obtidas por leitura direta no etilômetro aquelas obtidas por análise cromatográfica.

3. JUSTIFICATIVA

3.1 Justificativa

- Este estudo de justifica devido a necessidade de se comparar os resultados obtidos pelo etilômetro na avaliação de amostras de ar exalado humano em estudos controlados de ingestão de etanol com aqueles obtidos por uma técnica analítica reconhecidamente segura, sensível, precisa e confiável, a cromatografia em fase gasosa.
- A utilização do etilômetro para a avaliação da concentração de álcool no sangue, como único instrumento analítico para esta constatação, requer um alto grau de confiança em seus resultados o que pode ser questionado particularmente quando se sabe que este equipamento deveria ser usado apenas como um teste de triagem. Assim, faz-se imprescindível o conhecimento de suas limitações e eventuais vantagens as quais podem ser obtidas através da “validação” de seus resultados por comparação com outra técnica padronizada.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Padrões

Os padrões utilizados possuíam no mínimo 99% de pureza e foram adquiridos das seguintes fontes:

- Etanol absoluto (Sigma-Aldrich, $\geq 99,5\%$, lote 09596HM, validade outubro de 2015);
- Acetaldeído (Sigma-Aldrich, $\geq 99,5\%$, lote 43396JMV, validade janeiro de 2013);
- 2-propanol (Sigma-Aldrich, $\geq 99,5\%$, lote STBB6621, validade novembro de 2015);
- Acetona (Tedia Brasil, $\geq 99,5\%$, lote K23E04, validade setembro de 2012);
- Metanol (Tedia Brasil, $\geq 99,9\%$, lote 1102075, validade março de 2014);
- 2-metil-1-propanol (Sigma-Ald, $\geq 99\%$, lote KI0352HI, validade novembro de 2012);
- Água deionizada preparada através de sistema Milli-Q (Millipore).

4.1.2 Pipetas automáticas

Foram utilizadas as seguintes pipetas:

- Micropipeta da marca Eppendorf, com capacidade de 0,5-10 μL (data da certificação Agosto de 2012 – validade de um ano);
- Micropipeta da marca Eppendorf, com capacidade de 10-100 μL (data da certificação Agosto de 2012 – validade de um ano);
- Micropipeta da marca Eppendorf, com capacidade de 100-1000 μL (data da certificação Agosto de 2012 – validade de um ano);
- Micropipeta da marca Research, com capacidade de 5000 μL (data da certificação Agosto de 2011 – validade de um ano);

4.1.3 Vidrarias

Foram utilizadas as seguintes vidrarias:

- Becker de volume 5 mL;
- Becker de volume 10 mL;
- Becker de volume 25 mL;
- Becker de volume 50 mL;
- Balão volumétrico de volume 5 mL;
- Balão volumétrico de volume 10mL;
- Balão volumétrico de volume 25 mL;
- Balão volumétrico de volume 100 mL;
- Balão volumétrico de volume 250 mL;
- Balão volumétrico de volume 500 mL;
- Vial para headspace com capacidade de 20 mL de volume da marca Sunsri, lote P911.

4.1.4 Outros materiais

Outros materiais utilizados, foram:

- Septos da marca Sunsri, lote 00113931 e lote 00087123;
- Lacres da marca Sunsri, lote 00117456;

4.2 Equipamento Instrumental analítico utilizado

Foi utilizado para a realização das análises cromatográficas um cromatógrafo de fase gasosa com detector de ionização em chama (CG-DIC) acoplado à técnica de extração em espaço confinado (“Headspace”), *GC Focus* da marca Thermo Scientific, Modelos Focus-GC e Triplus (Headspace), respectivamente. Neste trabalho foram utilizadas colunas Carbowax 20M de 60 m com diâmetro interno de 0,25 mm e espessura do filme de 1µm e a coluna

DB-ALC1 de 30 m, com diâmetro interno de 0,53 mm e espessura do filme de 3 μm .

Este equipamento estava devidamente qualificado como estabelecido no certificado número 0044/2011 em 15/02/2011.

O etilometro utilizado foi da marca Instrutherm, modelo BFD-40.

4.3 Soluções utilizadas para o desenvolvimento do método

As soluções foram preparadas diariamente de forma conjunta (mistura), ou em separado (nas primeiras etapas da validação) pela dissolução de todos os analitos-padrão, sendo eles, acetaldeído e etanol, nas concentrações de 5,0; 1,0 ; 0,5; 0,1; 0,05; 0,01 dg.L^{-1} , diluídos em água deionizada (Milli-Q).

A solução do padrão interno (isobutanol) contendo 16 mg.L^{-1} misturado em água deionizada.

4.4 Avaliação das matrizes sangue e urina

Foi testada a resposta do equipamento em 5 diferentes concentrações – 0,05; 0,5; 1,0; 10,0 e 250,0 dg.L^{-1} -, através da construção de uma curva de calibração, comparando água deionizada, sangue e urina.

4.5 Preparo das amostras para a validação

A técnica analítica utilizada dispensa o preparo da amostra, assim no preparo do recipiente (*vial*), que foi levado diretamente ao equipamento, foi colocado sangue, colhido de voluntários não expostos, e acrescentado os padrões de solventes e o isobutanol (padrão interno), totalizando 500 µL de volume total.

4.6 Condição inicial de trabalho

Como ponto de partida, para a validação, foram extraídas as condições utilizadas por Corrêa (1997) em seu trabalho⁶⁰, sendo elas, temperaturas do “vial” 95 °C, da seringa e do injetor a 110 °C e do detector a 200 °C; temperatura da coluna, programada, sendo a inicial de 35 °C/1min, rampa de aquecimento de 6,5 °C/min até 165 °C como será discutido no item 5.1.1. com mais detalhes.

4.7 Otimização da técnica de extração em espaço confinado (“headspace”)

Uma das variáveis que podem interferir de forma significativa na resposta do equipamento (intensidade do sinal) é a incubação da amostra. Assim para que o melhor resultado de extração possível fosse alcançado, foram testados três tempos e três temperaturas de incubação, para o etanol e o acetaldeído. Posteriormente, uma análise multivariada foi realizada no sentido de se apontar qual a melhor condição responsável pela melhor recuperação dos analitos alvo (etanol e acetaldeído).

4.8 Teste de interferência de outro anticoagulante/conservante

Foram realizados testes com os anticoagulantes/conservantes fluoreto de sódio, comumente utilizado em análise de etanol, e a heparina.

4.9 Coletas

Foram realizadas três coletas de sangue de cada indivíduo. Sendo estas realizadas em tempos específicos de acordo com o volume de etanol ingerido, em intervalos foram de 800 em 800 mL, totalizando 2400 mL no total.

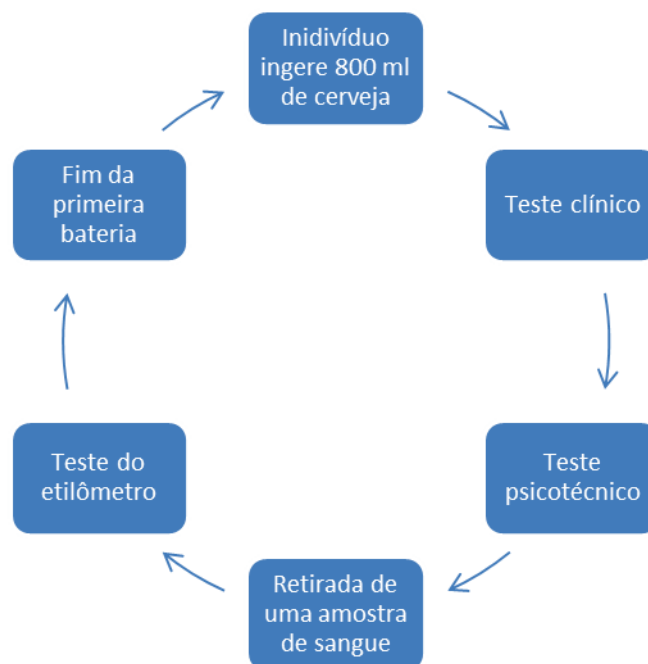


FIGURA 3: Fluxograma referente ao desenho amostral do painel de doses controladas de álcool etílico (fonte: Oliveira-Silva, 2009) ⁶¹.

4.10 Comparação das metodologias analíticas entre o etanol no ar exalado X sangue

Foram realizados comparações entre as concentrações obtidas nas amostras de ar exalado e de sangue para avaliar a precisão e a confiabilidade do etilômetro, tendo como padrão-ouro o resultados obtidos através da análise cromatográfica.

4.11 Teste de estabilidade do analito intra-dia

Foram realizadas análises com o objetivo de verificar a diminuição da concentração do analito no decorrer de uma bateria de análises, ou seja, o tempo suficiente para a realização de 54 corridas cromatográficas, uma vez que este é o total de posições na bandeja do equipamento.

4.12 Gerenciamento das informações produzidas e softwares empregados

Foram utilizados os seguintes softwares:

- Microsoft Office Excel 2007TM – Para o desenvolvimento das planilhas e cálculos;
- Sigma Plot versão 10.0.0.54 – Para a plotagem de gráficos;
- EndNote X1.0.1 – Para a organização das referências bibliográficas.

4.13 Aspectos éticos

Todos os procedimentos deste estudo foram desenvolvidos de forma a proteger a privacidade dos indivíduos, garantindo a participação anônima e voluntária. Um consentimento informado, assinado pelo próprio, foi uma exigência para a participação do voluntário. Com vistas a garantir o princípio da não maleficência, este projeto ao qual esta dissertação está vinculada, foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca em 18/04/2011, conforme protocolo discriminado na folha de rosto em anexo. A aprovação foi deliberada por esta instância colegiada em 09/11/2011, sob o parecer nº 0279.0.031.000-11. Portanto, todos os critérios definidos pela Comissão de Ética da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca e pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) foram seguidos.

5. Resultados & Discussão

5.1 Condições cromatográficas iniciais, otimização da extração, validação e aplicação.

5.1.1 Condições cromatográficas iniciais

Para o início dos procedimentos de validação da metodologia de quantificação dos níveis de etanol no sangue, foi realizada minuciosa busca na literatura^{60, 62, 63}. Que consorciada com as condições instrumentais disponíveis no Laboratório de Toxicologia/CESTEH/ENSP/FIOCRUZ, foi apontada a seguinte condição cromatográfica inicial, oriunda de uma modificação do procedimento descrito por Corrêa e Pedroso (1997): Temperaturas do “vial” 95 °C, da seringa e do injetor a 110 °C e do detector a 200 °C; temperatura da coluna, programada, sendo a inicial de 35 °C/1min, rampa de aquecimento de 6,5 °C/min até 165 °C. Colunas Carbowax 20 M (Comprimento – 60 m; Diâmetro interno 0,25 mm e Espessura do Filme 1 μ) ou DB-ALC1 (Comprimento – 30 m; Diâmetro interno 0,53 mm e espessura do filme 3 μ). Tempos de equilíbrio do forno e de pré-tratamento da amostra: 10 min; injeção: modo "split" 1/20. Gás de arraste: Nitrogênio, vazão de 1,47 mL/min. Tempo de corrida: 20 minutos. Resultados preliminares apontaram que para o Sistema cromatográfico portador da fase estacionária CARBOWAX 20M, os tempos de retenção iniciais do etanol e do isobutanol (padrão interno) corresponderam a 10,756 e 18,338 minutos, respectivamente.

5.1.2 Otimização da Extração (“Headspace”)

O próximo passo percorrido, consistiu no estabelecimento das melhores condições de extração em espaço confinado (“headspace”) para a determinação de etanol e acetaldeído no sangue. Amostras fortificadas foram tratadas em diferentes condições (tempos) de incubação e agitação. Uma análise multivariada foi executada no sentido de se avaliar o tratamento, responsável pelas melhores recuperações (área). Os resultados apontaram que a incubação a 110 °C por 2 minutos, na placa de agitação e aquecimento,

seguida de amostragem de 1 mL, com seringa a 110 °C, apontou melhores resultados de recuperação. Esta condição demonstrou está associada a uma maior resolutividade dos picos cromatográficos obtidos, apresentando portanto, estreita relação com a especificidade. Tais resultados são apresentados nas tabelas e podem ser evidenciadas na Tabela 3.

Tabela 2: Diferentes tratamentos realizados no sistema de extração em espaço confinado (“headspace”) e respectiva áreas obtidas em amostras fortalecidas a uma concentração de 1 dg.L⁻¹ (Concentração final do tubo – vial) de etanol e acetaldeído.

Temp (°C)	Tempo (min.)	Etanol	Acetaldeído
		Média das áreas ± Desvio-padrão (mVolts)	Média das áreas ± Desvio-padrão (mVolts)
80	2	2131888 ± 161946,6	2993382 ± 47713,87
80	5	2504160 ± 110053,3	3990310 ± 1333468
80	10	2200565 ± 33487,16	3173523 ± 6220,65
95	2	2586773 ± 365788,2	3610238 ± 861421,4
95	5	3351499 ± 228894,7	4364646 ± 851754,5
95	10	3229680 ± 123071,7	3965154 ± 294087,5
110	2	3973944 ± 462133,9	5525362 ± 215776,5
110	5	3918667 ± 43268,89	4352972 ± 23158,08
110	10	3533114 ± 249208,1	3848364 ± 1143935

5.1.3 Condições cromatográficas

Os parâmetros cromatográficos foram ajustadas para a coluna Carbowax 20 M, com a seguinte rampa de aquecimento: 60 °C por 11 minutos (min), elevando 10 °C p/min até atingir 150 °C e em seguida 50 °C por minuto até 200 °C, permanecendo nesta temperatura por um minuto. Para a coluna DB-ALC, os parâmetros cromatográficos foram ajustados para uma isoterma de 40 °C por 4 minutos. Foi utilizado o Nitrogênio (gás de arraste) em um fluxo de 50 kpa. As figuras 3 e 4, mostram respectivamente, os cromatogramas representativos de cada sistema cromatográfico descrito anteriormente. O

tempo de desenvolvimento cromatográfico foi de 20 (vinte) para a CARBOWAX 20M e 4 (quatro) minutos para DB-ALC1.

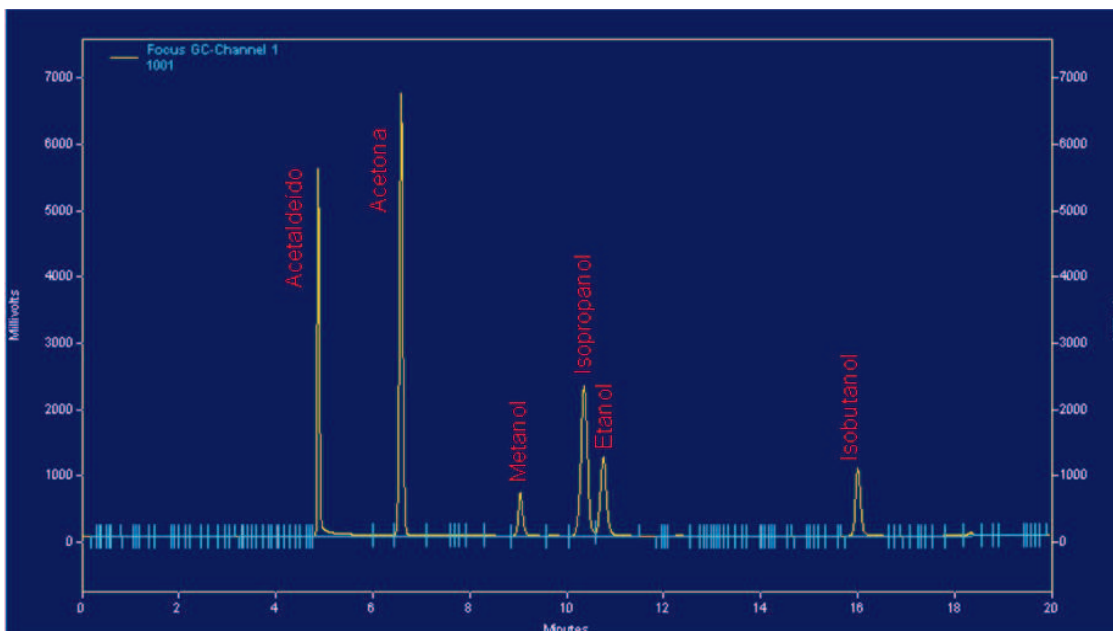


FIGURA 4: Cromatograma típico gerado na coluna CARBOWAX 20M em amostras de sangue fortificadas com 100 dg.L^{-1} cada analito, sendo eles: acetaldeído, acetona, metanol, 2-propanol, etanol. E 30 dg.L^{-1} de isobutanol como padrão interno (PI).

Como notado na figura acima ocorreu uma superposição parcial dos picos de Isopropanol e etanol. E mesmo ao final de todas as tentativas de variação do fluxo do gás de arraste e da rampa de aquecimento, parâmetros que podem alterar o tempo de retenção e, portanto, o nível de separação dos analitos, não foi possível realizar a separação completa desses dois compostos.

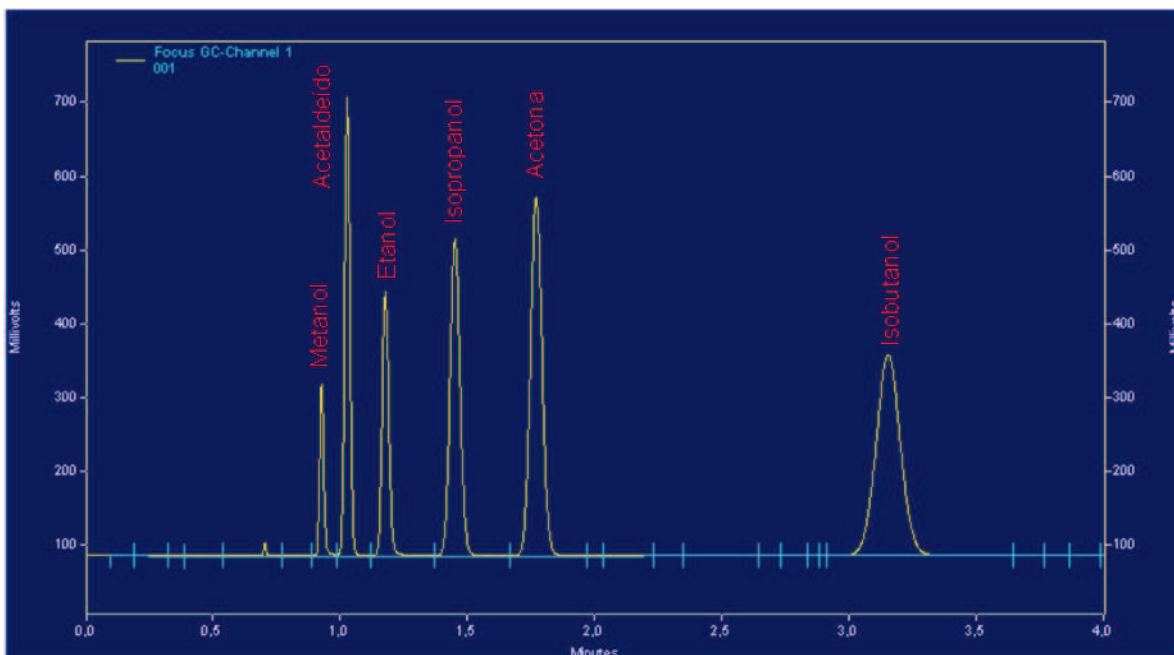


FIGURA 5: Cromatograma típico gerado na coluna DB-ALC1 em amostras de sangue fortificadas com $0,01 \text{ dg.L}^{-1}$ de cada analito, sendo eles: acetaldeído, acetona, metanol, 2-propanol, etanol. E $1,6 \text{ dg.L}^{-1}$ de isobutanol como padrão interno (PI).

Diferentemente do cromatograma apresentado na página anterior, o cromatograma acima apresenta total separação de todos os compostos, ainda possuindo a vantagem de uma corrida cromatográfica de apenas 4 minutos, ao invés dos 20 minutos necessários para a análise com a outra coluna.

5.1.4 Tempos de retenção

A tabela 3 abaixo demonstra a média dos tempos de retenção e respectivos desvios-padrão para os dois sistemas cromatográficos estudados e a ordem do surgimento destes.

Tabela 3: Tempos médios de retenção expressos em minutos dos analitos alvo pesquisados, bem como seus respectivos desvios-padrão e ordem de surgimento dos cromatogramas oriundos de duas fases estacionárias distintas.

	Tempo médio de retenção (tR) em minutos \pm desvio-padrão		Ordem de surgimento do analito (CARBOWAX 20M)/(DBALC1)
	CARBOWAX 20M	DB-ALC1	
Etanol	10,7560 \pm 0,0221 (*)	1,1775 \pm 0,0005 (*)	(5)/(3)
Acetaldeído	4,8760 \pm 0,0044 (*)	1,0275 \pm 0,0005 (*)	(1)/(2)
Isobutanol	18,3380 \pm 0,0075 (*)	3,1537 \pm 0,0046 (*)	(6)/(6)

(*) Grau de significância estatística $P < 0,01$, pelo teste t de Student, entre os analitos. Tempo total de desenvolvimento cromatográfico: CARBOWAX 20M – 20 minutos; DB-ALC1 – 4 minutos.

5.1.5 Escolha do Sistema Cromatográfico

A partir dos dados gerados pelas duas colunas, foi escolhida a coluna DB-ALC1 para as análises desse projeto, em detrimento da coluna CARBOWAX 20M, devido ao satisfatório grau de separação dos analitos em um tempo 5 vezes menor nessa coluna cromatográfica. Essa diferença no tempo, permite uma análise muito maior de amostras em um único dia, um ponto muito importante, para que não haja a necessidade de armazenamento por longos períodos das mesmas.

5.1.6 Quantificação do etanol, do acetaldeído e verificação do “efeito matriz”

Foram construídas três curvas de calibração em sangue que variaram entre 0,01 e 5 dg.L⁻¹. para o etanol e acetaldeído.

As curvas foram construídas com cinco calibradores em 10 replicatas para as duas menores concentrações e 5 replicatas para as demais concentrações. Os resultados obtidos apontaram um coeficiente de relação de 0,999951 para o etanol e de 0,999933 para o acetaldeído, respectivamente. Para uma melhor visualização, um resumo dos achados referentes aos dois analitos de interesse estão resumidos no quadro 5. As curvas de calibração para o etanol e o acetaldeído podem ser evidenciadas nas Figuras 5 e 6.

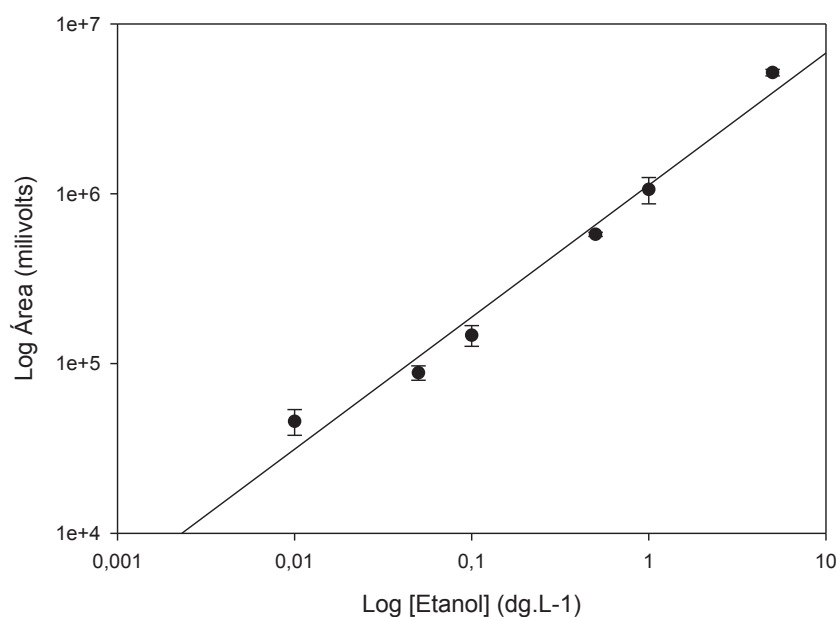


FIGURA 6: Curva de calibração representativa do etanol em sangue. As concentrações variaram de 0,01 a 5 dg.L-1. $R = 0,999992$, $Y = A \cdot X + B$, onde $A = 10248493,8$ e $B = 42836,9907$. Mínimo de três experimentos.

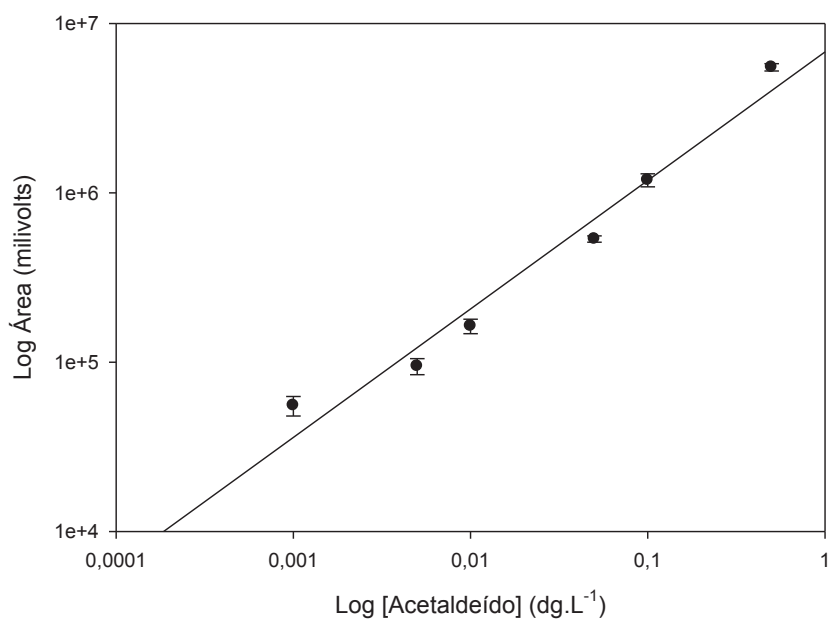


FIGURA 7: Curva de calibração representativa do acetaldeído em sangue. As concentrações variaram de 0,01 a 5 dg.L⁻¹. $R = 0,999833$, $Y = A \cdot X + B$, onde $A = 10453159,4$ e $B = 67211,26$. Mínimo de três experimentos.

O próximo passo foi avaliar o efeito da matriz biológica (sangue e urina) sobre o comportamento do analito pesquisado em relação às soluções dissolvidas na água. O resultados obtidos apontam que a complexidade da matriz de escolha não interfere de forma significativa na eficiência de extração/recuperação do analito, dada a sobreposição das curvas conforme demonstrado na Figura 7.

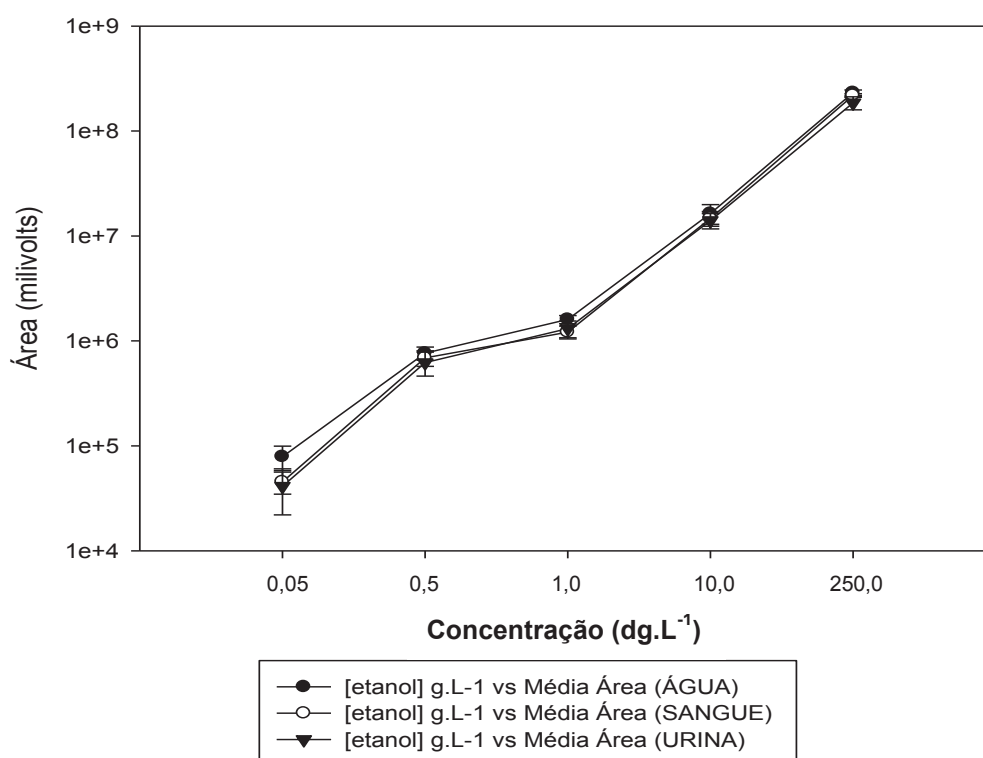


FIGURA 8: Sobreposição das diversas curvas de calibração de amostras fortificadas com etanol nas concentrações que variaram de 0,05 dg.L⁻¹ a 250 dg.L⁻¹ em diversas matrizes: ● = Água; ○ = Sangue e ▼ = Urina. Comparação entre as matrizes. Mínimo de três experimentos.

5.1.7 Outros parâmetros da validação

A faixa de trabalho ficou compreendida entre 0,2 e 39,0 dg. L⁻¹. Os limites de detecção e quantificação foram 0,15 e 0,25 dg.L⁻¹, respectivamente. Os coeficientes de variação entre 8,29 e 16,65% (intraensaio). A curva construída com cinco calibradores em 10 replicatas para as duas menores concentrações e 5 replicatas para as demais demonstrou boa linearidade, através de um coeficiente de relação de 0,999985 para o etanol e de 0,999922 para o acetaldeído.

5.2 Aplicação do método

Foram analisados 10 indivíduos. As médias e desvios das concentrações de etanol em dg.L⁻¹ no sangue das três amostragens estão representadas na tabela abaixo:

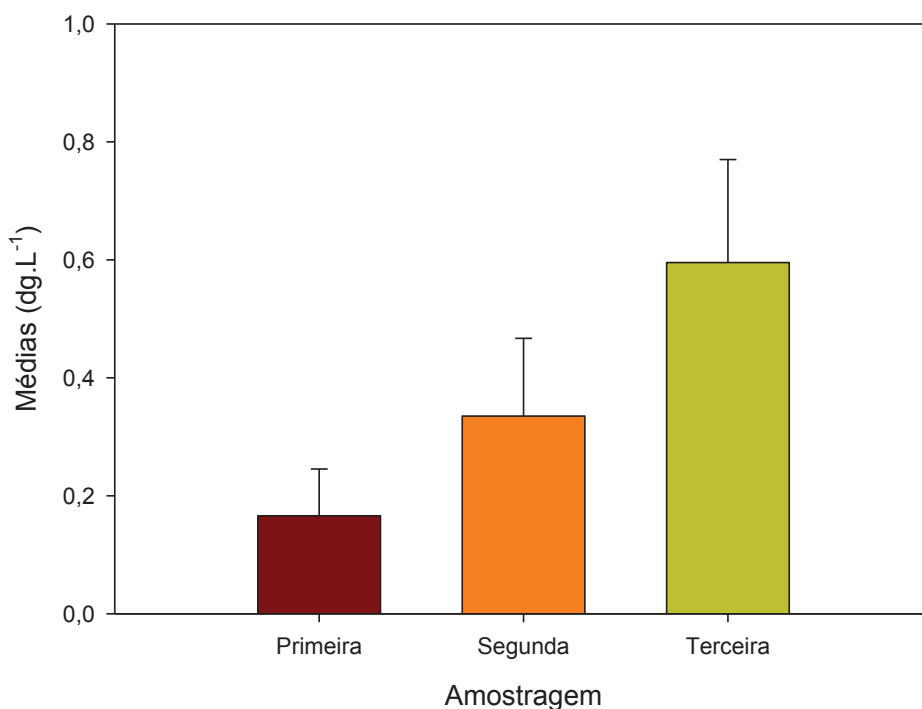


FIGURA 9: Médias das concentrações de etanol dos indivíduos nas três coletas.

A partir dos dados do gráfico acima, fica comprovada a necessidade de se utilizar individualmente os dados de concentração de etanol, uma vez que o desvio de cada valor alcança quase a totalidade do valor seguinte. Isso ocorre devido a variabilidade farmacocinética que ocorre de pessoa para pessoa, que segundo Grant *et al*, pode ser diminuída com a infusão intravenosa constante de etanol⁶⁴.

TABELA 4: Comparação entre a metodologia cromatográfica e o etilômetro.

Indivíduo	Concentração de Etanol no sangue (dg.L ⁻¹)		Concentração de Etanol no ar exalado (dg.L ⁻¹)		Diferença entre as metodologias (%)
	Média	Desvio-Padrão	Média	Desvio-Padrão	
1	0,39	0,259467	0,21	0,102632029	-45,89%
2	0,58	0,305283	0,32	0,111355287	-44,41%
3	0,34	0,114888	0,18	0,088881944	-46,47%
4	0,37	0,208337	0,21	0,030550505	-42,56%
5	0,24	0,187019	0,22	0,066583281	-7,32%
6	0,33	0,192264	0,23	0,070945989	-31,44%

Diferentemente da comparação da página anterior, somente 6 indivíduos possuíam os dados do etilômetro e da cromatografia gasosa, desse modo, a comparação desses valores mostrou uma diferença percentual média de 43,485% entre elas. Subestimando assim a concentração real no sangue. E essa diferença é confirmada pelo T de *student* pareado, que tem como resultado um valor de 2,022, em contra partida com um T tabelado de 4,03 e um α de 1%, configurando assim uma diferença estatística entre os resultados.

TABELA 5: Parâmetros estatísticos referentes a validação da coluna cromatográfica DB-ALC1.

Parâmetro	Analito	
	Etanol	Acetaldeído
Faixa de trabalho	0,077 e 5,0 dg.L ⁻¹	0,067 e 5,0 dg.L ⁻¹
Limite de detecção	0,025 dg.L ⁻¹	0,022 dg.L ⁻¹
Limite de quantificação	0,077 dg.L ⁻¹	0,067 dg.L ⁻¹

5.2.1 Influência dos conservantes mais utilizados sobre a resposta cromatográfica

O próximo passo consistiu em avaliar os efeitos das diferentes formas de conservação entre amostras de sangue coletadas. Para tal procedimento, amostras foram coletadas com tubos com fluoreto de sódio, com volume de 4 mL, ou heparina sódica com volume de 10 mL e posteriormente fortificadas com concentrações de acetaldeído e etanol que variaram entre 0,01 e 1,0 dg.L⁻¹.

Um estudo realizado por pesquisadores chineses em 2007, utilizando fluoreto de sódio e peróxido de sódio como conservantes para a análise de etanol, não mostrou diferença significativa do ponto de vista estatístico entre as concentrações dessa substância nesses casos. Porém, a não utilização de conservantes indicou uma diferença significativa. Sendo a temperatura de armazenamento o principal parâmetro para a determinação de uma resposta mais próxima da análise inicial⁶⁵.

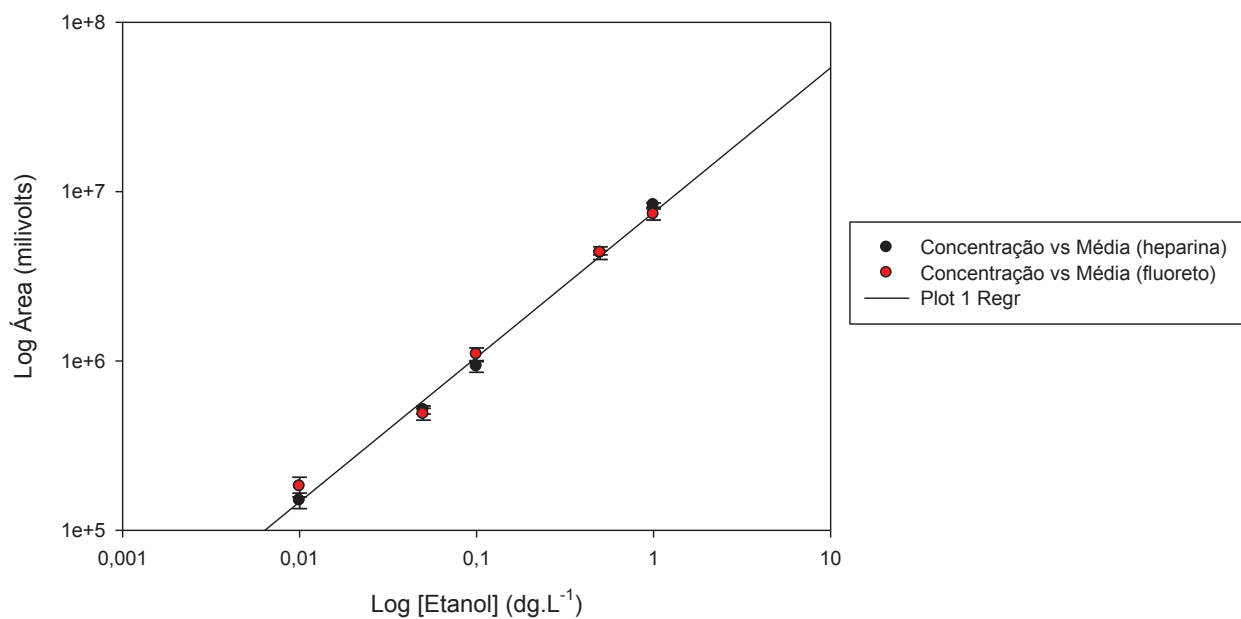


FIGURA 10: Comparação entre os anticoagulantes heparina e fluoreto de sódio.

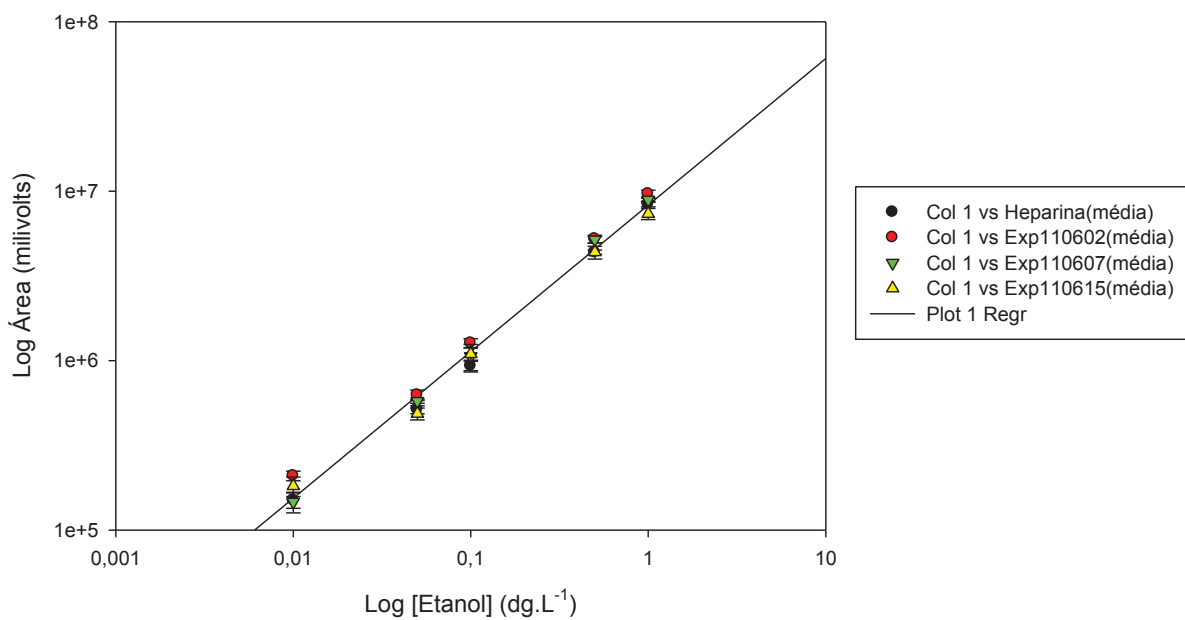


FIGURA 11: Comparação entre os experimentos realizados para a validação e o teste do anticoagulante heparina.

Desse modo, não houve diferença significativa entre os anticoagulantes/conservantes heparina e fluoreto na preservação da concentração de etanol no sangue, corroborando com o estudo citado anteriormente.

5.2.2 Teste de estabilidade do analito

QUADRO 3: Estabilidade Intra-dia Etanol

Varição Intradia	Médias das áreas (mvolts)
Vial 1	439468
Vial 2	423595

Outro fator importante é a certeza de que a amostra que foi colocada na bandeja do equipamento, a qual será analisada em algumas horas, não sofreu perdas de concentração significativas. Desse modo, nos testes realizados, não foram verificadas diferenças entre as análises do etanol em sangue em uma mesma bateria, com concentração de $0,5 \text{ dg.L}^{-1}$. Sendo de apenas 3,61% a variação entre elas. Assim fica garantido que entre a primeira análise e a quinquagésima quarta (54), ou seja, aproximadamente 3 horas e meia após o início da bateria de testes, não há perda na concentração de etanol no sangue.

6. CONCLUSÃO

Após a aplicação da metodologia validada no cromatógrafo gasoso com detector de ionização em chama acoplado com “headspace”, verificou-se uma diferença percentual de mais de 40% em 4 dos 6 indivíduos analisados, em relação ao etilômetro, o que aponta uma maior necessidade de estudos relacionando esses dois meios de obtenção da concentração de etanol no sangue.

Outro importante ponto é a utilização e interpretação dos dados de forma individual e não coletiva, devido às diferenças entre o metabolismo de cada indivíduo.

Não foi verificada diferença nas concentrações de etanol no sangue, utilizando-se heparina ou fluoreto de sódio como conservante/anticoagulante, bem como também não houve essa diferença nas amostras colocadas em uma mesma bateria de análises, o que garante que nessas 3 horas e meia (tempo de duração de uma bateria), não há diminuição na concentração do etanol no sangue.

ESTUDOS FUTUROS

Este estudo continuará até que o valor de 400 indivíduos seja analisado, um valor que geraria um dado significativo do ponto de vista estatístico em relação a população residente no Estado do Rio de Janeiro, originando uma grande quantidade de dados, após dividi-los por faixa etária, gênero e índice de massa corpórea, sendo possível a verificação da influência dessas características no metabolismo do etanol. E ainda a nível individual, a divisão entre indivíduos com rápido metabolismo, lento metabolismo e metabolismo considerado normal (médio) do etanol, pela comparação entre as concentrações de etanol e acetaldeído (seu metabólito) no sangue.

Existem muitos outros testes que podem ser feitos a partir da validação dessa metodologia, que inclusive ajudarão a mantê-la atualizada e transmitirão maior credibilidade às análises, através, por exemplo, de testes de estabilidade interdia do etanol e do acetaldeído em diferentes temperaturas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. in *Webster's New World Medical Dictionary*.
2. Fishman, R., *Tudo Sobre Drogas – Alcoolismo*. 1998, São Paulo-SP: Nova Cultura.
3. Room, R., et al., *Alcohol in developing societies : a public health approach*. 2002: Helsinki: Finnish Foundation for Alcohol Studies and Geneva: World Health Organization. 25 p.
4. Gigliotti, A. e Bessa, M.A., *Síndrome de dependência do álcool: critérios diagnósticos*. Rev Bras Psiquiatr., 2004. **26(Supl 1)**: p. 11-3.
5. Room, R., Babor, T. e Rehm, J., *Alcohol and public health*. Lancet, 2005. **365(9458)**: p. 519-30.
6. Sons, J.W., *Kirk - Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, third edition*. 1980. **Volume 9**: p. 338.
7. Santos, A.A.M. e al., e., *Importância do álcool no controle de infecções em serviços de saúde*. Revista de Administração em Saúde, 2002. **4(16)**: p. 7-14.
8. Kalberg, B. e Pacey, G.E., *Flow Injection Analysis: A Practical Guide*. Elsevier, Amsterdam., 1989.
9. Alves, S.R., *Toxicologia forense e saúde pública: desenvolvimento e avaliação de um sistema de informações como ferramenta para a vigilância de agravos decorrentes da utilização de substâncias químicas [Tese de Doutorado]*. Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca. , 2005.
10. Lands, W.E., *A review of alcohol clearance in humans*. Alcohol, 1998. **15(2)**: p. 147-60.
11. Julkunen, R.J., Di Padova, C. e Lieber, C.S., *First pass metabolism of ethanol--a gastrointestinal barrier against the systemic toxicity of ethanol*. Life Sci, 1985. **37(6)**: p. 567-73.
12. Oneta, C.M., et al., *First pass metabolism of ethanol is strikingly influenced by the speed of gastric emptying*. Gut, 1998. **43**: p. 612-619.
13. Swift, R., *Direct measurement of alcohol and its metabolites*. Addiction, 2003. **98 Suppl 2**: p. 73-80.
14. Norberg, A., et al., *Role of variability in explaining ethanol pharmacokinetics: research and forensic applications*. Clin Pharmacokinet, 2003. **42**: p. 1-31.
15. Rang, H.P., et al., *Farmacologia*. Editora Elsevier. Rio de Janeiro-RJ, Brasil 2004. **5ª Ed**.
16. Wilson, P.F., et al., *Alcohol in breath and blood: a selected ion flow tube mass spectrometric study*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2001. **15(6)**: p. 413-7.
17. Lieber, C.S., *Microsomal ethanol-oxidizing system (MEOS): the first 30 years (1968–1998) a review*. Alcohol Clin Exp Res, 1999. **23**: p. 991-1007.
18. Agarwal, D.P., *Genetic polymorphisms of alcohol metabolizing enzymes*. Pathol Biol, 2001. **49**: p. 703-9.
19. Dahl, H., et al., *Comparison of urinary excretion characteristics of ethanol and ethyl glucuronide*. J Anal Toxicol, 2002. **26(4)**: p. 201-4.
20. Mizoi, Y., et al., *Involvement of genetic polymorphism of alcohol and aldehyde dehydrogenases in individual variation of alcohol metabolism*. Alcohol Alcohol, 1994. **29(6)**: p. 707-10.
21. Jelski, W., Grochowska-Skiba, B. e Szmikowski, M., *Alcohol dehydrogenase and the metabolism of ethanol in the brain*. Postepy Hig Med Dosw, 2007. **61**: p. 226-230.
22. Lin, R.C., Smith, R.S. e Lumeng, L., *Detection of a protein-acetaldehyde adduct in the liver of rats fed alcohol chronically*. J Clin Invest, 1988. **81**: p. 615-619.

23. Tuma, D.J. e Casey, C.A., *Dangerous Byproducts of Alcohol Breakdown—Focus on Adducts*. 2004, National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism: <http://pubs.niaaa.nih.gov/publications/arh27-4/285-290.htm>.
24. Helander, A. e Beck, O., *Mass spectrometric identification of ethyl sulfate as an ethanol metabolite in humans*. Clin Chem, 2004. **50**(5): p. 936-7.
25. Aderjan, R.E., Besserer, K. e Sachs, H., *Ethyl-glucuronide a non-volatile ethanol metabolite in human hair*. Spiehler V (ed) CA, 39–45, 1995.
26. Tabakoff, B. e Hoffman, P.L., *Alcohol addiction: an enigma among us*. Neuron, 1996. **16**: p. 909-912.
27. Zaleski, M., et al., *Aspectos neurofarmacológicos do uso crônico e da Síndrome de Abstinência do Alcool*. Revista Brasileira de Psiquiatria, 2004. **26**(1, São Paulo).
28. Zernig, G., Fabisch, K. e Fabisch, H., *Pharmacotherapy of alcohol dependence*. Trends Pharmacol Sci, 1997. **18**(7): p. 229-31.
29. CEBRID, C.B.d.I.s.D.P.-. *Livreto Informativo Sobre Drogas Psicotrópicas*. 2003, Universidade Federal de São Paulo.
30. (OMS), O.M.d.I.S., *Informe mundial sobre prevención de los traumatismos causados por el tránsito: resumen*. 2004: Ginebra.
31. (IPEA), I.d.P.E.A., *Impactos sociais e econômicos dos acidentes de trânsito nas rodovias brasileiras*. 2006. p. 244.
32. Perez-Reyes, M. e Jeffcoat, A., *Ethanol/cocaine interaction: cocaine and cocaethylene plasma concentrations and their relationship to subjective and cardiovascular effects*. Life Sci, 1992. **51**: p. 553–563.
33. McCance-Katz, E., et al., *Concurrent cocaine-ethanol ingestion in humans: pharmacology, physiology, behavior, and the role of cocaethylene*. Psychopharmacology (Berl), 1993. **111**: p. 39–46.
34. Hear, W.L. e al, e., *Cocaethylene: A Unique Cocaine Metabolite Displays High Affinity for the Dopamine Transporter*. Journal of Neurochemistry, 1991. **56** (2): p. 698-701.
35. James, A.D., Antti, P. e Jarmo, P., *Drinking and driving: choosing the legal limits*. British Medical Journal, 1987. **295**: p. 1458 – 1460.
36. **Abu-Sahlieh, S.**, *Conflitos entre direito religioso e direito estadual em relação aos muçulmanos residentes em países muçulmanos e em países europeus*. Análise Social, 1998 (2.º-3.º). **XXXIII**((146-147)): p. 539-561.
37. WHO, *Global Status Report on Road Safety*. 2009: Geneve.
38. Shin, J.M.S., G.; Kraut, J.A. , *Simple Diagnostic Tests to Detect Toxic Alcohol Intoxications*. 2008, NIH Public Access: California. p. 194–201.
39. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, N.E.Q.I., in *Portaria INMETRO/DIMEL/Nº 189*. 2003.
40. Remco W. M. Zoethout, J.M.A.v.G., Glenn J. H. Dumont, Sunita Paltansing, Nathalie D. van Burgel, Monique van der Linden, Albert Dahan,1 Adam F. Cohen & Rik C. Schoemaker, *A comparative study of two methods for attaining constant alcohol levels*. British Journal of Clinical Pharmacology, 2008. **66**(5): p. 674–681.
41. Dougherty, D.M.M.-R., D.M. ; Hatzis, E.S.; Nouvion, S.O.; Mathias, C.W. , *A Test of Alcohol Dose Effects on Multiple Behavioral Measures of Impulsivity*. 2009, NIH Public Access: San Antonio. p. 111–120.
42. Pierce, M.E.H.M.L.J.G.A.K.P.S.M.B.R.J., *The Interactive Effects of Extended Wakefulness and Low-dose Alcohol on Simulated Driving and Vigilance*. SLEEP AND ALCOHOL, 2007. **30**(10): p. 1334-1340.

43. Yun-Seng Giang, S.-M.W.C.-C.T.M.-C.L.C.-J.N., *Analyzing alcohol in breath, blood, saliva, and urine for forensic purposes: Taiwanese population*. Forensic Science Journal, 2007. **6**(1): p. 1-19.
44. Bressolle, F., Bromet-Petit, M. e Audran, M., *Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics*. J Chromatogr B Biomed Appl, 1996. **686**(1): p. 3-10.
45. McDonald, R.D., *The role of laboratory information management systems (LIMS) in analytical method validation*. Anal. Chim. Acta, 1999. **391**: p. 149-158.
46. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, N.E.Q.I.I., *Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos*. 2003 (Revisão:2010). **DOQ-CGCRE-008**.
47. *Validation of analytical procedures methodology : ICH harmonised tripartite guideline*. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE, 1996: p. 8.
48. Amarante Jr., O.P. e al., e., *Validação de métodos analíticos: uma breve revisão*. Cad. Pesq., 2001. **12**: p. 116-131.
49. Brito, M.N., et al., *VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS: ESTRATÉGIA E DISCUSSÃO*. Pesticidas: REcototoxicologia e Meio Ambiente, 2003. **13**: p. 129-146.
50. *ISO 5725: accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results*. ISO. International Standards Organization, 1994. **1-4, 6**.
51. Gonzalez, A.G., Herrador, M.A. e Asuero, A.G., *Intra-laboratory testing of method accuracy from recovery assays*. Talanta, 1999. **48**(3): p. 729-36.
52. Hubert, P. e al., e., *The SFSTP guide on the validation of chromatographic methods for drug bioanalysis: from the Washington Conference to the laboratory*. Anal. Chim. Acta, 1999. **391**: p. 135-139.
53. Stubberud, K.P. e Astrom, O., *Separation of ibuprofen, codeine phosphate, their degradation products and impurities by capillary electrophoresis. II. Validation*. J Chromatogr A, 1998. **826**(1): p. 95-102.
54. Wood, R., *How to validate analytical methods*. Trends Anal. Chem., 1999. **18**: p. 624-632.
55. Currie, L.A. e Svehla, G., *Nomenclature for the presentation of results of chemical analysis*. Pure & Appl. Chem., 1994. **66**(3): p. 595-908.
56. Long, G.L. e Winefordner, J.D., *Limit of detection: a closer look at the IUPAC definition*. Anal. Chem., 1983. **55**(7): p. 712A-724A.
57. Huber, L., *Validation of analytical methods: review and strategy*. LC/GC International, 1998: p. 96-105.
58. Maroto, A., et al., *Estimating uncertainties of analytical results using informations from the validation process*. Anal. Chim. Acta., 1999. **391**: p. 173-185.
59. Van Der Heyden, Y., et al., *Determination of system suitability limits with a robustness test*. J. Chromatogr. A., 1999. **845**: p. 145-154.
60. Corrêa, C.L., *Validação da urina para análise toxicológica do etanol em programas de controle e prevenção do uso de álcool e drogas no local de trabalho*. 1997, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo - USP: São Paulo.

61. Oliveira-Silva, J.J., *Avaliação da Resposta de Indivíduos Expostos ao Álcool e uma Proposta para mudar os Limites Impostos pela Legislação Brasileira*. 2009.
62. Jones, A.W. e Schuberth, J., *Computer-aided headspace gas chromatography applied to blood-alcohol analysis: importance of online process control*. J Forensic Sci, 1989. **34**(5): p. 1116-27.
63. Brown, D.J. e Long, W.C., *Quality control in blood alcohol analysis: simultaneous quantitation and confirmation*. J Anal Toxicol, 1988. **12**(5): p. 279-83.
64. Grant, S.A.M., K.; Kenny, G.N.C., *Blood alcohol concentration and psychomotor effects*. British Journal of Anaesthesia, 2000. **85**(3): p. 401-406.
65. Ma, D., et al., *[Research of on the stability of ethanol in preservation of ethanol in blood]*. Fa Yi Xue Za Zhi, 2007. **23**(2): p. 117-9.

8. ANEXOS

ANEXO 1: Folha de rosto



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz
Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca
Comitê de Ética em Pesquisa



Rio de Janeiro, 31 de janeiro de 2012.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca – CEP/ENSP, constituído nos Termos da Resolução CNS nº 196/96 e, devidamente registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, recebeu, analisou e emitiu parecer sobre a documentação referente ao Protocolo de Pesquisa, conforme abaixo, discriminado:

PROTOCOLO DE PESQUISA CEP/ENSP - Nº 262/11 CAAE: 0279.0.031.000-11

Título do Projeto: “Alcoolemia e etanol no ar exalado: Validação de uma metodologia rápida e sua aplicação em um grupo populacional exposto a doses controladas”

Classificação no Fluxograma: Grupo III

Será encaminhado à Conep (áreas temáticas especiais) e, portanto, deve aguardar a apreciação final desta para início da execução? Não

Pesquisador Responsável: Arthur de Mello Prates

Orientador: Sérgio Rabello Alves

Instituição Proponente: Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca – ENSP/FIOCRUZ

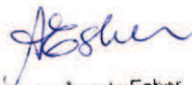
Data de recebimento no CEP-ENSP: 18 / 04 / 2011

Data de apreciação: 09 / 11 / 2011

Parecer do CEP/ENSP: Aprovado.

Ressaltamos que o pesquisador responsável por este Protocolo de Pesquisa deverá apresentar a este Comitê de Ética um relatório das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (*item VII.13.d., da resolução CNS/MS Nº 196/96*) de acordo com o modelo disponível na página do CEP/ENSP na internet.

Esclarecemos, que o CEP/ENSP deverá ser informado de quaisquer fatos relevantes (incluindo mudanças de método) que alterem o curso normal do estudo, devendo o pesquisador justificar caso o mesmo venha a ser interrompido.


Prof. Angela Esher
Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa
CEP/ENSP

ANEXO 2: Questionário

1- Data: ____/____/____

2- Nome: _____

3- Sexo: • Feminino • Masculino

4- Idade: _____

Peso: _____ Altura: _____

5- Identificação: _____

6-Endereço: _____

7- Telefone: _____

8- Nível de escolaridade:

Analfabeto

1º ciclo do Ensino Fundamental incompleto
Fundamental completo

1º ciclo do Ensino

2º ciclo do Ensino Fundamental incompleto
Fundamental completo

2º ciclo do Ensino

Ensino Médio incompleto

Ensino Médio completo

Ensino Superior incompleto

Ensino Superior Completo

Pós-graduação

Não sabe

9-Raça/Etnia:

Branco

Negro

Pardo

Asiático

Outros: _____

10- Profissão: _____

11- Fuma?

Sim

Não

11.2- Se sim:

Em média, quantos cigarros fuma por dia: _____

12- Faz uso de algum medicamento?

Sim Não

- Se sim, qual? _____

13-Você toma bebidas alcoólicas?

Sim Não

14-Com que frequência você toma bebidas alcoólicas?

4 ou mais vezes por semana até 3 vezes por semana

4 ou mais vezes por semana até 3 vezes por semana

pelo menos 1 vez por mês menos de 1 vez por mês

não sabe

15-Que tipo de bebidas alcoólicas você costuma beber?

cerveja vinho cachaça outros _____

16- Com quantos anos começou a beber:_____

Você consome bebidas alcoólicas e dirige depois?

Sim Não

17-Tem alguma doença hereditária na família?

Sim Qual:_____ Não

18-Tem ou já teve alguma doença crônica?

Sim Qual:_____ Não

19- Possui alguma doença cardíaca?

Sim Qual:_____ Não

20-Está atualmente sob tratamento médico?

Sim Pra quê?_____ Não

21-Tem ou já teve hepatite e ou Cirrose?

Sim Não

- Se sim, qual? _____

22-Tem ou já teve alguma doença neurológica e ou psiquiátrica?

Sim Não

- Se sim, qual? _____

23-Tem ou já teve alguma doença renal?

Sim Não

- Se sim, qual? _____

Anexo 3: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Coleta de Material Biológico

Você está sendo convidado para participar da pesquisa **“Alcoolemia e etanol no ar exalado: Validação de uma metodologia rápida e sua aplicação em um grupo populacional exposto a doses controladas”**.

Sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar desta pesquisa, sem qualquer prejuízo. Este estudo tem como principal objetivo estabelecer o perfil cinético das concentrações de etanol e acetaldeído absorvidas em grupo populacional exposto a doses controladas, residentes no Rio de Janeiro em 2011/2012. A principal justificativa deste estudo é que na utilização do etilômetro para a avaliação da concentração de álcool no sangue, como único instrumento analítico para a sua constatação, deposita um alto grau de confiança em um equipamento que deveria ser usado apenas como teste de triagem.

Sua participação nesta etapa da pesquisa consistirá em fornecer amostras de sangue para avaliação da exposição a doses controladas de etanol. O sangue será coletado em tubos vacuntainer contendo fluoreto de sódio com agulhas descartáveis, num total de 10 mL. É importante frisar que no máximo três coletas de sangue estarão previstas para cada voluntário ao longo de todo projeto. Um ligeiro desconforto acontecerá na coleta de sangue (semelhante à picada de um inseto), com pequena ardência no lugar onde este foi coletado. As amostras biológicas (sangue) serão utilizadas exclusivamente para as análises do projeto, sendo descartadas após o término das análises.

O benefício relacionado com a sua participação nessa etapa refere-se à possibilidade de obter um perfil cinético da concentração de etanol e acetaldeído além de permitir a comparação desses valores com a concentração obtida através do etilômetro e agregar conhecimento científico acerca do uso controlado de etanol no sangue e no ar exalado, para fins regulatórios. A realização deste projeto deverá ser acompanhado de

orientações e encaminhamento ao Serviço de Ambulatório do CESTE/ENSP/FIOCRUZ, se necessário). Não haverá nenhuma compensação financeira / pagamento pelo fornecimento destas amostras e informações.

Após a validação da metodologia de análise, laudos analíticos serão produzidos e remetidos em envelopes lacrados para cada voluntário.

Os riscos relacionados à sua participação na pesquisa – além do desconforto provocado pela coleta de sangue – referem-se à sua identificação como informante. Para evitar esta situação, as informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Você será identificado, apenas, pela sua idade, sexo e profissão. Todo o material gravado ficará sob a guarda do pesquisador principal em equipamentos eletrônicos e físicos (arquivo) com senha de acesso ou trancados. Os dados brutos eletrônicos serão destruídos após cinco anos do término do projeto.

Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação:

Arthur de Mello Prates	Comitê de Ética em Pesquisa da Ensp
Mestrando	Rua Leopoldo Bulhões 1480 – sala
314	
CESTE/ENSP/Fiocruz	Manguinhos, Rio de Janeiro / RJ
Rua Leopoldo Bulhões 1480 – sala 25	Tel: (21) 2598-2863
Manguinhos, Rio de Janeiro / RJ	
Tel: (21) 2598-2820	

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

Sujeito da pesquisa