



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**AVALIAÇÃO DE UM MÉTODO DE CROMATOGRAFIA EM
FASE GASOSA – *HEAD SPACE* E ESTUDO DA
ESTABILIDADE DO ETANOL EM AMOSTRAS DE SANGUE**

Teresa Cristina Epifânio Diógenes Rego

NATAL

2008

Teresa Cristina Epifânio Diógenes Rego

**AVALIAÇÃO DE UM MÉTODO DE CROMATOGRAFIA EM FASE
GASOSA – *HEAD SPACE* E ESTUDO DA ESTABILIDADE DO ETANOL
EM AMOSTRAS DE SANGUE**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.
Área de concentração: Bioanálises.

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Vitória de Moura

NATAL
2008

CATALOGAÇÃO NA FONTE

R343e

Rego, Teresa Cristina Epifânio Diógenes.

Avaliação de um método de cromatografia em fase gasosa – *head space* e estudo da estabilidade do etanol em amostras de sangue /

Teresa Cristina Epifânio Diógenes Rego. – Natal – RN, 2008.

80 p.

Orientadora: Profª Drª Maria de Fátima Vitória de Moura.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

1. Cromatografia em fase gasosa – Dissertação. 2. Estudo da estabilidade – Dissertação. 3. Etanol – Dissertação. I. Moura, Maria de Fátima Vitória de. II. Título.

RN-UF/BS-CCS

CDU:331.61615(043.3)

Teresa Cristina Epifânio Diógenes Rego

**AVALIAÇÃO DE UM MÉTODO DE CROMATOGRAFIA EM FASE
GASOSA – *HEAD SPACE* E ESTUDO DA ESTABILIDADE DO ETANOL
EM AMOSTRAS DE SANGUE**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.
Área de concentração: Bioanálises.

Aprovado em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^ª. Dr.^ª. Maria de Fátima Vitória de Moura
Orientadora

Prof.^ª. Dr.^ª. Maria Beatriz Abreu Glória
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof.^ª. Dr.^ª. Tereza Neuma de Castro Dantas
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Prof.^ª. Dr.^ª. Aline Schwarz
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

NATAL
2008

AGRADECIMENTOS

A **Papai do céu**, meu guia, fonte de luz, força, fé e coragem.

A **minha querida Mãe** pelo incentivo, carinho e amor incondicional.

A **Edna**, única pessoa no mundo que realmente sabe o que esta dissertação de mestrado significa.

A **Profª Drª. Maria de Fátima Vitória de Moura** pela orientação, confiança e apoio.

Ao **Prof. Ms. George Queiroz de Brito** pela valiosa colaboração, através da transmissão dos seus conhecimentos, incentivo e apoio ao longo deste trabalho.

A **Thyrone Barbosa Domingos** pela contribuição técnica, compartilhamento dos seus conhecimentos, bem como pela disponibilidade e atenção.

Ao **Prof. Dr. José Melo de Carvalho** pelas importantes sugestões e colaboração.

Aos responsáveis pelo Laboratório Integrado de Análises Clínicas (LIAC) – DACT/UFRN, pela disponibilização da sala de coleta.

Ao **Prof. Dr. Cícero Flávio Soares de Aragão**, pelo apoio e incentivo.

A **Profª Drª. Tereza Neuma de Castro Dantas**, pela gentileza na disponibilização do Cromatógrafo, e a todos que fazem parte do Laboratório de Tensoativos - DQ/UFRN, especialmente **Kaline, Alcides, Kátia, Cláudia, Elaine, Keila, Rafaela e Verônica**, muito obrigada pelo apoio e amizade.

A **Ângela Maria e a todos do Laboratório de Química Analítica** – DQ/UFRN, pela ajuda.

Ao **Prof. Dr. Marcos Eugênio Cury de Medeiros**, pela colaboração na parte estatística e ao bibliotecário **João Bosco de Medeiros**, pela normalização das referências bibliográficas.

“O merecimento de cada um está na proporção do sacrifício que se impõe a si mesmo”.
(Mahatma Gandhi)

RESUMO

O etanol é a droga psicoativa mais utilizada de forma abusiva em todo o mundo, isso faz dele uma das principais substâncias requisitadas em exames toxicológicos na atualidade. O desenvolvimento de um método analítico, a adaptação ou implementação de um método conhecido, envolve um processo de validação que estima sua eficiência na rotina do laboratório e a credibilidade do método. A estabilidade é definida como a capacidade da amostra do material manter o valor inicial de uma medida quantitativa por um período definido dentro de limites específicos quando armazenados sob condições definidas. Este trabalho teve como objetivo avaliar o método de Cromatografia em fase gasosa e estudar a estabilidade do etanol em amostras de sangue, considerando as variáveis tempo e temperatura de armazenamento, bem como a presença de conservante e, com isso verificar se as condições de conservação e armazenamento utilizadas neste estudo mantêm a qualidade da amostra e preservam a quantidade inicialmente presente do analito. Foram coletadas amostras de sangue de 10 voluntários para avaliação do método e para o estudo da estabilidade do etanol. Para a avaliação do método, parte das amostras foi adicionada de concentrações conhecidas de etanol. No estudo da estabilidade, a outra parte do *pool* de sangue foi colocada em dois recipientes: um contendo o conservante fluoreto de sódio 1% e o anticoagulante heparina e no outro somente heparina, foi adicionado etanol na concentração de 0,6 g/L, fracionado em dois frascos, sendo um armazenado a 4°C (geladeira) e outro a -20°C (*freezer*). As análises foram realizadas no mesmo dia (tempo zero) e após 1, 3, 7, 14, 30 e 60 dias de armazenamento. A avaliação considerou a diferença dos resultados durante o armazenamento em relação ao tempo zero. Foi utilizada a técnica de *head space* associada à cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama e coluna capilar com fase estacionária de polietilenoglicol. As melhores condições cromatográficas de análise obtidas foram: temperatura de 50°C (coluna), 150°C (injetor) e 250°C (detector), com tempo de retenção para o etanol de $9,107 \pm 0,026$ e para o t-butanol (padrão interno) de $8,170 \pm 0,081$ minutos, sendo o etanol separado adequadamente do acetaldeído, acetona, metanol e isopropanol, que são potenciais interferentes na determinação do etanol. A técnica mostrou linearidade no intervalo de concentração de 0,01 e 3,2 g/L ($y = 0,8051x + 0,6196$; $r^2 = 0,999$). A curva de calibração apresentou a seguinte equação da reta: $y = 0,7542x + 0,6545$, com um coeficiente de correlação linear igual a 0,996. A recuperação média foi de 100,2%, os coeficientes de variação da precisão intraensaio e interensaio apresentaram valores de no máximo 7,3%, o limite de detecção e quantificação foi de 0,01 g/L e apresentou coeficiente de variação dentro do permitido. O método analítico avaliado no presente trabalho demonstrou ser rápido, prático e eficiente, atendendo satisfatoriamente aos objetivos do trabalho. O estudo da estabilidade demonstrou diferença menor que 20% na resposta obtida nas condições de armazenamento e período estipulados, comparada com a resposta obtida no tempo zero e, ao nível de significância de 5%, nenhuma diferença estatística na concentração de etanol foi observada entre as análises. Os resultados obtidos reforçam a confiabilidade do método de cromatografia em fase gasosa e das amostras de sangue na pesquisa de etanol, seja na área toxicológica, Forense, social ou clínica.

Palavras chaves: cromatografia em fase gasosa, estudo da estabilidade, etanol.

ABSTRACT

The ethanol is the most overused psychoactive drug over the world; this fact makes it one of the main substances required in toxicological exams nowadays. The development of an analytical method, adaptation or implementation of a method known, involves a process of validation that estimates its efficiency in the laboratory routine and credibility of the method. The stability is defined as the ability of the sample of material to keep the initial value of a quantitative measure for a defined period within specific limits when stored under defined conditions. This study aimed to evaluate the method of Gas chromatography and study the stability of ethanol in blood samples, considering the variables time and temperature of storage, and the presence of preservative and, with that check if the conditions of conservation and storage used in this study maintain the quality of the sample and preserve the originally amount of analyte present. Blood samples were collected from 10 volunteers to evaluate the method and to study the stability of ethanol. For the evaluation of the method, part of the samples was added to known concentrations of ethanol. In the study of stability, the other side of the pool of blood was placed in two containers: one containing the preservative sodium fluoride 1% and the anticoagulant heparin and the other only heparin, was added ethanol at a concentration of 0.6 g/L, fractionated in two bottles, one being stored at 4°C (refrigerator) and another at -20°C (freezer), the tests were performed on the same day (time zero) and after 1, 3, 7, 14, 30 and 60 days of storage. The assessment found the difference in results during storage in relation to time zero. It used the technique of headspace associated with gas chromatography with the FID and capillary column with stationary phase of polyethylene. The best analysis of chromatographic conditions were: temperature of 50°C (column), 150°C (jet) and 250°C (detector), with retention time for ethanol from 9.107 ± 0.026 and the tert-butanol (internal standard) of 8.170 ± 0.081 minutes, the ethanol being separated properly from acetaldehyde, acetone, methanol and 2-propanol, which are potential interfering in the determination of ethanol. The technique showed linearity in the concentration range of 0.01 and 3.2 g/L ($0.8051 x + y = 0.6196$; $r^2 = 0.999$). The calibration curve showed the following equation of the line: $y = x 0.7542 + 0.6545$, with a linear correlation coefficient equal to 0.996. The average recovery was 100.2%, the coefficients of variation of accuracy and inter intra test showed values of up to 7.3%, the limit of detection and quantification was 0.01 g/L and showed coefficient of variation within the allowed. The analytical method evaluated in this study proved to be fast, efficient and practical, given the objective of this work satisfactorily. The study of stability has less than 20% difference in the response obtained under the conditions of storage and stipulated period, compared with the response obtained at time zero and at the significance level of 5%, no statistical difference in the concentration of ethanol was observed between analysis. The results reinforce the reliability of the method of gas chromatography and blood samples in search of ethanol, either in the toxicological, forensic, social or clinic.

Key words: gas chromatography, study of stability, ethanol.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Metabolismo do etanol.....	22
FIGURA 2 - Curvas de linearidade: a) curva analítica clássica; b) gráfico de razão sinal/concentração vs. concentração em escala logarítmica.....	32
FIGURA 3 - Fases do frasco do <i>head space</i> . Desenho esquemático da técnica de <i>head space</i>	43
FIGURA 4 - Fluxograma do tratamento dado às amostras de sangue.....	53
FIGURA 5 - Perfil cromatográfico de vapores de uma amostra de sangue adicionada de (1) acetaldeído, (2)acetona, (3)metanol, (4)t-butanol, (5)isopropanol e (6)etanol...56	
FIGURA 6 - Representação gráfica da linearidade entre concentração de etanol e relação de área de picos cromatográficos.....	57
FIGURA 7 - Cromatograma obtido com a análise por <i>head space</i> e CG/FID de sangue adicionado com etanol na concentração de 0,6 g/L e t-butanol 0,3 g/L.....	58
FIGURA 8 - Representação gráfica da curva de calibração para determinação da concentração de etanol em amostras de sangue.....	59
FIGURA 9 - Representação gráfica das concentrações de etanol em amostras de sangue, em análises realizadas com intervalos de 1, 3, 7, 14, 30 e 60 dias, para estudo sobre estabilidade durante armazenamento.....	62
FIGURA 10 - Representação gráfica do estudo da estabilidade do etanol em amostra de sangue adicionadas de 0,6 g/L com e sem conservante (Fluoreto de sódio – NaF) em condições de temperatura a 4°C e a -20°C em períodos de 1, 3, 7, 14, 30 e 60 dias.....	65

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Conteúdo alcoólico de bebidas.....	20
TABELA 2 - Efeitos psicológicos e comportamentais do álcool associados com concentrações crescentes de etanol no sangue.....	24
TABELA 3 - Recuperação do analito em função da concentração.....	33
TABELA 4 - Tempo de retenção com os respectivos desvios padrão e tempo de retenção relativo ao t-butanol (PI) de algumas substâncias voláteis, nas condições cromatográficas padronizadas.....	56
TABELA 5 - Relação entre as concentrações sanguíneas de etanol e as razões entre as áreas dos picos cromatográficos (etanol/ t-butanol).....	58
TABELA 6 - Valores de recuperação obtidos com a aplicação do método proposto em amostras de sangue adicionadas de etanol.....	59
TABELA 7 - Coeficiente de variação intraensaios das concentrações sanguíneas de etanol em amostras adicionadas.....	60
TABELA 8 - Coeficiente de variação interensaios das concentrações sanguíneas de etanol em amostras adicionadas.....	60
TABELA 9 - Concentrações de etanol em amostras de sangue, em análises realizadas com intervalos de 1, 3, 7, 14, 30 e 60 dias, para estudo sobre estabilidade durante armazenamento.....	61
TABELA 10 - Estudo da estabilidade do etanol em amostra de sangue adicionadas de 0,6 g/L com e sem conservante (Fluoreto de sódio – NaF) em condições de temperatura a 4°C e a -20°C em períodos de 1, 3, 7, 14, 30 e 60 dias.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- **AD:** álcool desidrogenase
- **AID:** aldeído desidrogenase
- **ANVISA:** Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- **AOAC:** *Association of Official Analytical Chemists*
- **CG-FID-HS:** Cromatografia em fase Gasosa acoplada ao Detector de Ionização de Chama utilizando a técnica de separação por *Head Space*
- **CTB:** Código de Trânsito Brasileiro
- **CV:** Coeficiente de Variação
- **DP:** Desvio Padrão
- **DIC:** Detector de Ionização de Chama
- **DENATRAN:** Departamento Nacional de Trânsito
- **DPRF:** Departamento de Polícia Rodoviária Federal
- **EDTA:** Ácido etilenodiamino tetra-acético
- **ELISA:** *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*
- **FAS:** fetal alcohol syndrome
- **GABA:** Ácido Gama-Aminobutírico
- **GARP:** Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas
- **HDL:** Lipoproteína de alta densidade
- **ICH:** *International Conference on Harmonization*
- **IUPAC:** *International Union of Pure and Applied Chemistry*
- **ISO:** *International Standard Organization*
- **INMETRO:** Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
- **LD:** Limite de Detecção
- **LQ:** Limite de Quantificação
- **NMDA:** N-metil-D-aspartato
- **NaF:** Fluoreto de sódio
- **OMS:** Organização Mundial de Saúde
- **SNC:** Sistema Nervoso Central
- **SFSTP:** *Société Française Sciences et Techniques Pharmaceutiques*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1. GENERALIDADES	16
2.2. ETANOL E BEBIDAS ALCOÓLICAS	18
2.3. TOXICOCINÉTICA DO ETANOL	21
2.4. TOXICODINÂMICA DO ETANOL	23
2.4.1. Mecanismo de ação	23
2.4.2. Sistema Nervoso Central	23
2.4.3. Sistema cardiovascular	25
2.4.4. Sistema hepático.....	25
2.4.5. Efeitos teratogênicos	26
2.4.6. Fatores genéticos	26
2.4.7. Tolerância, dependência e síndrome de abstinência.....	27
2.5. CRITÉRIOS DE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	28
2.5.1. Especificidade/seletividade	29
2.5.2. Gráfico Analítico (Curva de Calibração).....	30
2.5.3. Linearidade	31
2.5.4. Exatidão (recuperação).....	32
2.5.5. Precisão	34
2.5.6. Limite de detecção	35
2.5.7. Limite de quantificação	36
2.6. ESTABILIDADE DO ETANOL	36
2.7. CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA NA ANÁLISE DE ETANOL	42
3. OBJETIVOS	46
3.1. GERAIS	46
3.2. ESPECÍFICOS	46
4. MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1. MATERIAL	47
4.1.1. Solução-estoque.....	47

4.1.2. Soluções de trabalho	47
4.1.3. Equipamentos e acessórios	48
4.1.4. Reagentes e outros materiais	48
4.1.5. Amostras	49
4.2. MÉTODOS.....	50
4.2.1. Avaliação do procedimento analítico	50
4.2.1.1. Otimização dos parâmetros cromatográficos.....	50
4.2.1.2. Avaliação da especificidade da técnica.....	50
4.2.1.3. Estudo da linearidade da técnica.....	50
4.2.1.4. Separação por <i>head space</i> e cromatografia em fase gasosa	50
4.2.1.5. Curva de calibração	51
4.2.1.6. Recuperação do método	51
4.2.1.7. Avaliação da precisão do método	51
4.2.1.8. Limite de detecção e limite de quantificação.....	52
4.2.2. Estudo da estabilidade	52
4.2.2.1. Tratamento das Amostras.....	52
4.2.2.2. Estabilidade após ciclos de congelamento e congelamento.....	53
4.2.2.3. Estabilidade após armazenamento sob refrigeração	53
4.2.2.4. Análise Estatística	54
5. RESULTADOS.....	55
5.1. AVALIAÇÃO DO PROCEDIMENTO ANALÍTICO	55
5.1.1. Otimização dos parâmetros cromatográficos	55
5.1.2. Avaliação da especificidade da técnica.....	55
5.1.3. Estudo de linearidade	57
5.1.4. Separação por <i>head space</i> e cromatografia em fase gasosa	57
5.1.5. Curva de calibração.....	58
5.1.6. Recuperação do método.....	59
5.1.7. Avaliação da precisão do método	60
5.1.8. Limite de detecção e limite de quantificação	60
5.2. ESTUDO DA ESTABILIDADE	61
5.2.1. Concentrações de etanol no sangue	61
5.2.2. Estabilidade após refrigeração e ciclos de congelamento	63

6. DISCUSSÃO.....	67
7. CONCLUSÕES	70
REFERÊNCIAS.....	71
APÊNDICE	78
ANEXO.....	79

1. INTRODUÇÃO

O etanol é a droga psicoativa mais utilizada de forma abusiva em todo o mundo (RALL, 1991, COLASANTI; MARTIN, 1994, RANG; DALE; RITTER, 2001, SCIVOLETTO; MALBERGIER, 2003). O conhecimento sobre a estabilidade desta substância psicoativa em fluidos biológicos é crucial para uma correta interpretação dos resultados analíticos. Por este motivo, considera-se um parâmetro fundamental para a validação dos métodos bioanalíticos. Uma vez que as análises de amostras biológicas para testar essa e outras substâncias não são usualmente realizadas imediatamente após a coleta, sendo muito importante o uso de condições adequadas de armazenamento na qual a substância mantenha suas características originais (JIMENÉZ et al., 2004).

A precisão na medida da concentração de etanol é de fundamental importância, pois um resultado errôneo pode evitar a administração da justiça em delitos envolvendo o consumo de bebidas alcoólicas (FUNG et al., 2000). Desta forma, é importante para qualquer laboratório responsável por medir concentrações de álcool no sangue, principalmente os laboratórios de interesse forense, dispor de métodos precisos, rápidos e eficientes que sejam validados de acordo as normas prescritas, garantindo a qualidade das análises.

Os métodos para mensuração quantitativa de etanol, devem ser simples e pouco exigentes, em termos de ocupação de recursos humanos e de consumo de material. As técnicas de análise toxicológica variam desde os clássicos métodos não instrumentais, tais como reações volumétricas ou colorimétricas, até outros mais sofisticados para os quais se recorre à tecnologia apropriada, simples ou acoplada, como as técnicas espectrofotométricas (espectrofotometria de absorção molecular, de infra-vermelho ou de absorção atômica), cromatográficas (cromatografia gasosa e cromatografia líquida), imunoquímicas (*Elisa*, imunoensaios com fluorescência polarizada ou radioimunoensaio) e de espectrometria de massas (PELLEGRINNO; BRUNO; PETRARULO, 1999, RANGEL, 2003/2004, WASFI et al., 2004).

A cromatografia em fase gasosa ou a cromatografia em fase líquida acoplada a detectores mais específicos tais como, o espectrômetro de massas ou os detectores de varrimento na zona do ultravioleta ou infravermelho, quando utilizados em condições adequadas, permitem identificações com elevado grau de confiança (WASFI et al., 2004, RANGEL, 2003/2004).

Hoje em dia, *head space* associado à técnica de cromatografia em fase gasosa, é o procedimento mais comum para a análise de álcool em amostras de sangue e urina. A técnica de *head space* tem a vantagem de prolongar a vida útil da coluna e prevenir a contaminação do injetor, e é também um procedimento muito bem estabelecido na Toxicologia Forense há décadas (CORRÊA; PEDROSO, 1997, SPINOSA DE MARTINIS et al., 2004, RANGEL, 2003/2004).

O consumo de álcool envolve aspectos jurídicos que se relacionam diretamente ou indiretamente com o Código Penal, a Lei de Contravenção Penal, o Regime Jurídico dos Servidores Públicos da União, o Código de Trânsito Brasileiro, o Código Penal Militar, o Direito do Trabalho e o Código Civil (FRANÇA, 1998).

A condução de veículos sob a influência de álcool e drogas de abuso é uma questão de preocupação crescente em países industrializados como um risco e um motivo de acidentes rodoviários. Em toxicologia forense, o aumento do número de amostras para determinação de substâncias psicoativas no sangue deve-se principalmente a leis de tolerância zero em vários países coibindo a condução de veículos por pessoas sob a influência de álcool e drogas de abuso (MOELLER; KRAEMER, 2002).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o procedimento analítico de cromatografia em fase gasosa e estudar a estabilidade do etanol em amostras de sangue nas condições de conservação e armazenamento citadas na literatura, tendo em vista o caráter ético e legal envolvido na quantificação de etanol em casos de suspeita de ingestão de bebidas alcoólicas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. GENERALIDADES

Os problemas provocados pelo consumo excessivo de álcool compreendem não somente as patologias e as mortes, mas também estão relacionados à metade de todos os acidentes de trânsito, dois terços dos homicídios e três quartos dos suicídios, sendo um fator significativo em outros crimes, problemas familiares, acidentes pessoais e industriais (COLASANTI; MARTIN, 1994, O'NEAL; POKLIS, 1996, BRUCKNER; WARREN, 2001).

No relatório de 2004, elaborado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) sobre a saúde no mundo, verificou-se que dois bilhões de pessoas consumiam bebidas alcoólicas e que 76,3% desses indivíduos apresentavam algum transtorno mental relacionado ao uso do álcool. Dados da OMS demonstraram também que 8,9% da carga global das doenças e 12,4% da mortalidade por todas as causas resultaram do consumo de substâncias psicoativas, sendo o álcool responsável por 3,2% desse índice (ANDRADE; CRUZ, 2005). Por isso, a OMS considera que as drogas lícitas como álcool e tabaco, pelo seu impacto, em termos de mortalidade e incapacidade junto às populações, seja em países desenvolvidos ou em desenvolvimento, continuarão como importantes fatores de risco nas projeções para as próximas décadas (2010 e 2020) (LUIS; LUNETTA, 2005).

O consumo exagerado de bebidas alcoólicas leva sempre à embriaguez e até mesmo ao alcoolismo, criando assim problemas de ordem médica, psiquiátrica, psicológica, policial, médico-legal, bem como ações que podem se desdobrar no âmbito dos tribunais (FRANÇA, 1998). A embriaguez pode ter elevado interesse médico-legal, por sua influência na condução rodoviária, por seu importante efeito criminogêneo e por várias outras questões de ordem legal que se podem colocar como, por exemplo, questões de responsabilidade penal (RANGEL, 2003/2004).

Nos dias atuais tem havido uma crescente preocupação com o consumo de álcool, bem como de outras drogas de abuso no local de trabalho. Com isso, começaram a ser implantados programas que visam o controle e a prevenção do uso de álcool e drogas neste ambiente (CORRÊA; PEDROSO, 1997).

Um estudo realizado na Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) com cinquenta amostras de sangue de vítimas fatais de acidente de trânsito, analisadas pelo método

de titulometria, no período de junho a novembro de 2003, mostrou que 56% destas amostras apresentaram teor alcoólico acima de 0,6 g/L. A faixa etária predominante dos envolvidos foi de 29 a 35 anos, sendo a maioria do sexo masculino (90%) (SANTIAGO; REGO, 2003).

Um relatório do Departamento de Polícia Rodoviária Federal (DPRF) realizado entre janeiro e setembro de 2007, mostrou que os motoristas envolvidos nos acidentes em rodovias são principalmente homens (84,8%), dirigindo automóveis (47,8%), com um a nove anos de habilitação (33,59%). Os caminhões representam 13,6% do total de veículos envolvidos nas ocorrências (158.411). O tipo de acidente mais verificado é a colisão com 64,2% dos casos, seguida de saída da pista, capotamento e atropelamento (BRASIL, 2007).

Por vários anos tem sido sugerido que as drogas psicoativas seriam um dos fatores causadores de acidentes de trânsito por prejudicar o desempenho dos motoristas. O laboratório de toxicologia analítica do Instituto Universitário de Medicina Legal de Lausanne (Suíça) analisou, epidemiológica e laboratorialmente, 641 motoristas suspeitos de dirigirem sob a influência de drogas durante 13 anos (1982-1994), concluindo que em 92,8% das amostras foram encontradas uma ou mais drogas psicoativas; destas, o etanol foi encontrado em 36% dos casos (AUGSBURG; RIVIER, 1996).

No estado de Washington, EUA, um estudo sobre acidentes fatais com motoristas mostrou que o uso de álcool foi responsável por 61% dos acidentes envolvendo um veículo e 30% dos casos envolvendo vários veículos (LONGAN; SCHWILKE, 1996).

Outra pesquisa com 5.745 condutores espanhóis envolvidos em acidentes fatais entre 1991 e 2000, avaliou a presença de álcool, drogas ilícitas e de medicamentos. Os resultados apresentaram principalmente álcool (43,8%) e, menos frequentemente, drogas ilícitas (8,8%) e medicamentos (4,7%), demonstrando a relação freqüente de substâncias psicoativas, principalmente álcool, com acidentes automobilísticos fatais na Espanha (CARMEN DEL RIO et al., 2002).

Luxemburgo, na França, em 1997, ocupou o 2º lugar em relatos de acidentes de trânsito com mortes na Europa. Entre 2001 e 2002, foram investigados 210 motoristas quanto ao consumo de álcool, 29,5% dos investigados assumiram serem usuários crônicos de álcool (APPENZELLER et al., 2005).

O Código de Trânsito Brasileiro (CTB) de 1997 estabelece as circunstâncias consideradas infrações, às medidas a serem tomadas e as penalidades a serem aplicadas, relativas ao uso de álcool e de outras substâncias que causam dependência física ou psíquica (VENTORIN, 2004). Alterações ocorridas em 20 de junho de 2008 foram publicadas no

Diário Oficial da União, onde os artigos 165, 276, 277, 291, 296, 302 e 306 do CTB passaram a ter nova redação, através da Lei nº. 11.705 e do Decreto nº. 6.488. Segundo a nova Lei o condutor que for flagrado dirigindo sob a influência de álcool ou de qualquer substância psicoativa, com índice de tolerância de duas decigramas de álcool por litro de sangue e de um décimo de miligrama de álcool por litro de ar expelido dos pulmões, terá a Carteira Nacional de Habilitação suspensa, multa, além da retenção do veículo e recolhimento do documento de habilitação. De acordo com a legislação, para efeito de caracterização de crime de trânsito, a concentração de álcool por litro de sangue igual ou superior a seis decigramas e igual ou superior a três décimos de miligrama por litro de ar expelido dos pulmões e, também considera crime doloso, o homicídio praticado por um motorista alcoolizado (BRASIL, 2008).

Em uma lista de 92 países pesquisados pelo *International Center for Alcohol Policies*, instituição sediada em Washington (EUA), o Brasil agora se enquadra entre os 20 países que possuem a legislação mais rígida sobre o tema: álcool e direção. A lei aqui é mais restritiva do que as de outras 63 nações pesquisadas, mas ainda é superada pelas regras de outros 13 países. Cinco nações têm o mesmo nível de rigor do Brasil: Estônia, Polônia, Noruega, Mongólia e Suécia. Na América do Sul, o Brasil ficou em segundo lugar, atrás apenas da Colômbia, onde o limite é zero. Vizinhos como Argentina, Uruguai, Paraguai, Bolívia e Venezuela estipulam limites de 0,5; 0,8; 0,8; 0,7 e 0,5 g/L, respectivamente. Estados Unidos (0,8 g/L), Canadá (0,8 g/L) e alguns países europeus como Reino Unido (0,8 g/L), Alemanha (0,5 g/L), França (0,5 g/L), Itália (0,5 g/L) e Espanha (0,5 g/L) também são mais tolerantes no assunto (A LEI, 2008).

2.2. ETANOL E BEBIDAS ALCOÓLICAS

O etanol (álcool etílico) é uma molécula orgânica simples composta de um único grupo hidroxila e uma cadeia alifática curta, de dois carbonos, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$. Os radicais hidroxil e etil conferem propriedades tanto hidrofílicas quanto lipofílicas à molécula. Possui ponto de fusão em torno de $-114,3^\circ\text{C}$ e ponto de ebulição a $78,4^\circ\text{C}$ (HUNT, 1994, COLASANTI; MARTIN, 1994, VILAS BOAS, 2004).

O etanol deprime o funcionamento do sistema nervoso central (SNC) e difere da maioria dos outros depressores do SNC pelo fato de ser amplamente disponível para adultos e de ter seu uso legal e aceito em muitas sociedades. Estão associados a grande disponibilidade

do etanol os enormes custos sociais e pessoais de seu uso abusivo, com milhões de indivíduos se tornando usuários contumazes ou alcoólatras (FLEMING; MIHIC; HARRIS, 2003).

A fabricação de cerveja usando cevada cultivada e de vinhos a partir das uvas de vinhedos estabeleceram-se firmemente entre 3500-4000 a.C.. As bebidas de teor alcoólico passaram a ser amplamente produzidas por volta de 6000-8000 a.C. (LONGENECKER, 2002). Segundo alguns registros arqueológicos, os primeiros indícios do consumo de álcool pelo ser humano datam de mais de oito mil anos. No primeiro momento, as bebidas eram produzidas apenas pela fermentação e, por isso, tinham um baixo teor alcoólico. Com o desenvolvimento do processo de destilação, pelos árabes, por volta de 800 a.C., começaram a surgir as primeiras bebidas mais fortes e mais perigosas. Com a Revolução Industrial, a bebida passou a ser produzida em série, o que aumentou consideravelmente o número de consumidores e, por consequência, os problemas sociais causados pelo abuso no consumo de álcool (FLEMING; MIHIC; HARRIS, 2003, VIALA-ARTIGUES; MECHETTI, 2003).

Na época dos primeiros colonos americanos, as bebidas alcoólicas consumidas eram fermentadas, na forma de cerveja (90%) e vinho (5%), sendo que a embriaguez não era tolerada. A partir de 1725 houve o aumento do consumo de bebidas destiladas, até o ponto em que esta passou a ser a bebida alcoólica mais consumida. Paralelamente, o consumo em excesso também aumentou e, apesar de ainda ser condenado em várias situações, passou a ser tolerado e até admirado como sinal de masculinidade. Em 1789 iniciou-se um movimento de oposição ao uso indiscriminado e excessivo de destilados, que culminou com a Oitava Emenda Constitucional dos Estados Unidos, proibindo a produção, venda ou transporte de bebidas causadoras da intoxicação, com exceção para o uso médico ou religioso. Iniciou-se, então, um confronto massivo entre o povo e as autoridades, uma vez que a simples proibição não funcionava. As pressões resultaram na redefinição, em 1933, das “bebidas que causam intoxicação”, permitindo a venda e o consumo de cerveja com teor alcoólico de 3,2%. Finalmente, em 1934 a Vigésima Primeira Emenda anulou a Oitava e a proibição em relação a bebidas alcoólicas teve seu fim (SCIVOLETTO; MALBERGIER, 2003).

No Brasil, antes da chegada dos portugueses, os índios produziam o cauim (do tupi “ka’wi”), uma bebida fermentada preparada a partir da mandioca cozida ou do suco de cajú ou de milho. Com a chegada dos portugueses foram trazidos os vinhos, cervejas, aguardentes e outros destilados, de alto teor alcoólico. A instalação dos primeiros engenhos para produção de açúcar de cana e aguardente tornou os destilados nacionais, obtidos da fermentação e destilação da borra do melaço, mais acessíveis para a população de menor poder aquisitivo.

Com a popularidade alcançada em todo o país e pelo preço acessível, a cachaça, bebida de alto teor alcoólico, contribuiu muito para o agravamento do consumo de álcool pela população brasileira (SCIVOLETTO; MALBERGIER, 2003).

A concentração de álcool em cada espécie de bebida depende do grau de fermentação, do tipo de fruta ou vegetal utilizado, da percentagem de aditivos e da quantidade de destilação. As concentrações típicas de bebidas alcoólicas são apresentadas na TABELA 1 (INABA; COHEN, 1991, YONAMINE, 2004).

TABELA 1 – Conteúdo alcoólico de bebidas.

<i>Bebidas</i>	<i>Concentração alcoólica (% v/v)</i>
Cerveja	6-8
Vinho tinto, branco, champanhe	12
Vinho do porto, vertume	14-20
Licores	15-40
Destilados (uísque, rum, aguardente)	35-45

Fonte: Inaba; Cohen (1991) e Yonamine (2004).

O etanol existe na natureza como um produto da oxidação do açúcar por leveduras (fermentação). Apesar da história da introdução do etanol ter sido perdida, muito provavelmente ele foi descoberto cedo na nossa história a partir da fermentação acidental das frutas. A maioria das bebidas alcoólicas disponíveis hoje em dia, incluindo vinhos e cervejas, é fermentada naturalmente e tem baixo conteúdo de etanol. A fermentação é autolimitada, uma vez que concentrações maiores que 12% são tóxicas para as leveduras. Bebidas com conteúdo maior de etanol são produzidas por destilação dos produtos fermentados. Praticamente todos os efeitos causados pela ingestão de bebidas alcoólicas são devido ao seu conteúdo de etanol (COLASANTI; MARTIN, 1994, FRANÇA, 1998). As bebidas alcoólicas podem ser classificadas em três grupos:

- a) bebidas fermentadas (vinho, sidra, cerveja e cauim), as quais se caracterizam por apresentarem o menor teor de álcool, por se originarem da fermentação natural de substâncias terciárias;

- b) bebidas destiladas, de grande concentração alcoólica, obtidas por destilação em alambiques (aguardentes, uísque, conhaque);
- c) bebidas alcoolizadas, obtidas artificialmente pela adição de álcool aos produtos fermentados (vinho do Porto, vinho Madeira).

2.3. TOXICOCINÉTICA DO ETANOL

O etanol é rapidamente absorvido para a corrente sanguínea a partir do estômago e do intestino delgado. A velocidade da absorção é largamente determinada pela quantidade de etanol consumido, concentração de etanol na bebida, velocidade de consumo e composição do conteúdo gástrico. O tempo entre a última dose e as concentrações sanguíneas geralmente varia de 30 a 90 minutos. Como o etanol é volátil, ele pode ser absorvido por inalação. No entanto, isto seria relevante, principalmente nas situações em que a concentração de etanol é muito alta, como no meio industrial ou ambiente de laboratório (RALL, 1991, COLASANTI; MARTIN, 1994, RANG; DALE; RITTER, 2001, SCIVOLETTO; MALBERGIER, 2003, FLEMING; MIHIC; HARRIS, 2003).

Após a absorção, o etanol é satisfatoriamente distribuído de modo uniforme por todos os tecidos e líquidos do corpo. Nos órgãos com elevado fluxo sanguíneo, como o cérebro, fígado, pulmão e rim, o equilíbrio ocorre mais rapidamente. Ao contrário, nos órgãos com baixo fluxo sanguíneo, como os músculos, o equilíbrio ocorre mais lentamente. A placenta é permeável ao etanol, assim tem livre acesso à circulação fetal (RALL, 1991, COLASANTI; MARTIN, 1994, RANG; DALE; RITTER, 2001, SCIVOLETTO; MALBERGIER, 2003).

Normalmente, 90 a 98% do etanol ingerido é metabolizado pelo fígado, por pelo menos dois sistemas enzimáticos. A enzima mais importante e mais bem estudada é a álcool-desidrogenase, que converte o álcool em acetaldeído, que é posteriormente metabolizado em acetato pela enzima acetaldeído-desidrogenase (Figura 1). Em associação com a coenzima A (CoA), o acetato é metabolizado em dióxido de carbono e água através de várias reações envolvidas no metabolismo intermediário (COLASANTI; MARTIN, 1994, SCIVOLETTO; MALBERGIER, 2003).

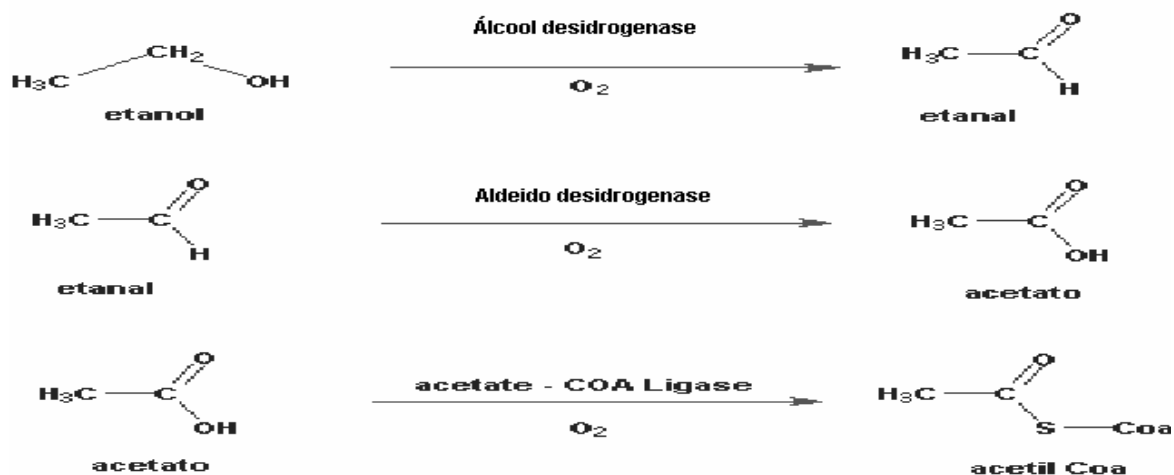


FIGURA 1 - Metabolismo do etanol.

Fonte: Livros interativos (2004).

Além da álcool-desidrogenase, o etanol também pode ser oxidado em acetaldeído pelo sistema da oxidase microssomal de função mista (citocromo P450 IIEI). Apesar deste sistema microssomal de oxidação do etanol ser provavelmente menos importante no metabolismo do etanol nos humanos, ele pode estar envolvido em algumas das interações relatadas entre o etanol e outras drogas que também são metabolizadas por este sistema. (COLASANTI; MARTIN, 1994, SCIVOLETTO; MALBERGIER, 2003, FLEMING; MIHIC; HARRIS, 2003).

A maior parte dos 2 a 10% restantes é excretada de forma inalterada na urina e no ar expirado. O conteúdo de etanol na urina é normalmente cerca de 13% da concentração sanguínea e é muito constante; o ar expirado contém aproximadamente 0,05% do nível de etanol no sangue, uma concentração que também é marcadamente uniforme. Dosagens de etanol no ar exalado são comumente utilizadas em procedimentos legais. No entanto, essas medidas podem estar erroneamente elevadas como um indicador das concentrações de etanol no sangue se forem realizadas logo após o consumo da bebida alcoólica (LARINI, 1993, COLASANTI; MARTIN, 1994).

2.4. TOXICODINÂMICA DO ETANOL

2.4.1. Mecanismo de ação

Provavelmente o etanol exerce sua ação no cérebro porque se dissolve nas membranas plasmáticas neuronais, e não por ligação a um receptor específico. O etanol pode distribuir-se rapidamente pelas porções lipídicas e hidrofóbicas das proteínas, apesar de sua alta solubilidade em água. Uma vez presente na membrana neuronal, o etanol provoca desorganização do ambiente lipídico, prejudicando, desta forma, funções celulares importantes. Essas atividades medeiam o processo de condução elétrica e transmissão química. O etanol altera o movimento normal de íons cálcio e cloreto envolvidos na regulação dos impulsos elétricos e na liberação de neurotransmissores. O movimento dos íons cloreto estimulado pelo ácido γ -aminobutírico (GABA) é exacerbado pelo etanol e envolve a sua interação com o complexo ionóforo GABA-benzodiazepínico-cloreto. Ao contrário, o movimento do Ca^{2+} através das membranas após a estimulação dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) é prejudicado pelo etanol (COLASANTI; MARTIN, 1994, SCIVOLETTO; MALBERGIER, 2003).

2.4.2. Sistema Nervoso Central

O álcool é primariamente um depressor do Sistema Nervoso Central (SNC), e o grau de depressão produzida é diretamente proporcional à quantidade consumida. No entanto, pode haver estimulação do comportamento após a ingestão de pequenas quantidades de etanol. Tal estimulação se expressa pela redução da inibição psicológica e social e é, muito provavelmente, resultado da depressão das vias inibitórias no cérebro, com liberação subsequente da atividade cortical. Os efeitos psicológicos e comportamentais associados com diferentes concentrações sanguíneas de etanol estão listados na Tabela 2 (COLASANTI; MARTIN, 1994).

TABELA 2 - Efeitos psicológicos e comportamentais do álcool associados com concentrações crescentes de etanol no sangue.

<i>Concentração (mg/dL)</i>	<i>Natureza do efeito</i>
< 50 mg/dL	Euforia, maior sociabilidade
50-100 mg/dL	Distúrbios da marcha Falta de concentração Tempo de reação aumentado
100-150 mg/dL	Ataxia Capacidades motoras e mentais prejudicadas Prejuízo da memória recente Fala arrastada
200 mg/dL	Ausência de resposta ao estímulo sensorial
250 mg/dL	Coma
500 mg/dL	Morte

Fonte: Colasanti; Martin (1994).

A ingestão crônica excessiva do etanol está associada com graves distúrbios mentais e neurológicos (por exemplo, lesão cerebral, perda de memória, distúrbios do sono e psicoses). Pacientes que ingerem regularmente etanol também têm risco elevado de convulsões espontâneas. Como a primeira crise pode ocorrer durante períodos em que o consumo é crescente, este fenômeno parece ser distinto de crises induzidas pela suspensão do álcool. Ademais, deficiências nutricionais e vitamínicas, relativas à ingestão de alimentos de baixo valor nutritivo ou distúrbios gastrointestinais e hepáticos dos alcoolistas ou etilistas, parecem causar muitas síndromes neuropsiquiátricas que são comuns em alcoolistas, como encefalopatia de Wernicke, psicose de Korsakoff, polineurite e encefalopatia por deficiência do ácido nicotínico (RALL, 1991, SCIVOLETTO; MALBERGIER, 2003).

A suscetibilidade pessoal à Síndrome de Wernicke-Korsakoff pode estar relacionada às diferenças individuais nos sistemas enzimáticos da tiamina. A síndrome consiste, na verdade, de dois distúrbios que podem ocorrer de forma independente ou em conjunto. A tríade clássica descrita por Wernicke é composta de oftalmoplegia, ataxia e distúrbio mental e de consciência. A síndrome ou psicose de Korsakoff envolve danos à memória e às habilidades cognitivas e intelectuais, como solução de problemas ou aprendizado, juntamente

com sintomas múltiplos de danos nervosos. A neuropatia periférica está comumente associada com a doença de Wernicke-Korsakoff (ZUBARAN et al., 1996).

Dentre as vitaminas utilizadas comumente no tratamento de alcoolistas, a tiamina ou vitamina B₁ é essencial ao metabolismo dos carboidratos e apresenta diminuição após intoxicação aguda com etanol (PORTARI, 2006). A absorção de tiamina é prejudicada pela deficiência nutricional e pelo álcool, a situação é frequentemente agravada pela doença hepática subjacente, que leva à redução dos estoques corporais e à diminuição do metabolismo de tiamina. O tratamento da Síndrome de Wernicke-Korsakoff deve ser imediatamente iniciado com a administração de tiamina, uma vez que esta previne a progressão da doença e reverte as anormalidades cerebrais que não tenham provocado danos estruturais estabelecidos (ZUBARAN et al., 1996).

2.4.3. Sistema cardiovascular

O álcool, em altas doses, provoca inflamação no músculo cardíaco (miocardiopatia), hipertensão e elevação do colesterol sérico. O uso abusivo de álcool está associado a maior frequência de infarto agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral. É importante destacar que alguns estudos relacionam o uso de álcool, em baixas doses, à elevação do HDL (lipoproteína de alta densidade), protetor contra a formação de placas de atheroma e, conseqüentemente, reduzindo a probabilidade de doença cardiovascular (RANG; DALE; RITTER, 2001, SCIVOLETTO; MALBERGIER, 2003).

2.4.4. Sistema hepático

A lesão hepática constitui a conseqüência em longo prazo mais grave do consumo excessivo de etanol. Na seqüência dos efeitos, o aumento no acúmulo de gordura (fígado gorduroso) progride para a hepatite (isto é, inflamação do fígado) e, finalmente, para a necrose e fibrose hepáticas irreversíveis (RALL, 1991; RANG; DALE; RITTER, 2001). O desvio do fluxo sanguíneo do sistema porta ao redor do fígado fibrótico é frequentemente responsável pelo desenvolvimento de varizes esofágicas, que podem sangrar de forma súbita e catastrófica (RANG; DALE; RITTER, 2001).

A ingestão regular de quantidades mais do que moderadas de álcool leva ao acúmulo crescente de acetaldeído, em parte pela atividade reduzida da acetaldeído-desidrogenase. O

acetaldeído parece causar vários efeitos deletérios, incluindo peroxidação lipídica aumentada e dano às membranas mitocondriais e outras membranas celulares, depleção de glutathione, depleção de vitaminas e oligoelementos. Ademais, a associação de ingestão excessiva de etanol com uma maior incidência de câncer pode ser explicada pela indução de oxidases microssômicas acopladas com depleção de glutathione, levando a um acúmulo de carcinogênicos ativados ou metabólitos tóxicos (RALL, 1991).

2.4.5. Efeitos teratogênicos

O efeito adverso do consumo de etanol durante a gravidez sobre o desenvolvimento fetal foi demonstrado no início da década de 1970, quando foi criado o nome síndrome alcoólica fetal (FAS, fetal alcohol syndrome) (RANG; DALE; RITTER, 2001, SCIVOLETTO; MALBERGIER, 2003). A anormalidade consiste em disfunção do sistema nervoso central (como QI baixo e microencefalia), lentidão de crescimento, um conjunto característico de anormalidades faciais (como fissuras palpebrais pequenas, lábio superior hipoplásico e nariz pequeno) e um conjunto variável de mal-formações pequenas e grandes. Estes achados podem ser resultantes, ao menos em parte, de uma ação direta do etanol (ou do acetaldeído) em inibir a proliferação celular embrionária precocemente na gestação. Pode também ser decorrente de má nutrição fetal seletiva por lesão placentária (RALL, 1991, SCIVOLETTO; MALBERGIER, 2003).

2.4.6. Fatores genéticos

Em 50% dos asiáticos, verifica-se a expressão de uma variante genética inativa de uma das isoformas da aldeído desidrogenase (ALDH-1); esses indivíduos apresentam uma reação do tipo dissulfiram após o consumo de álcool, e a incidência de alcoolismo é extremamente baixa nesse grupo. Por outro lado, uma isoforma da álcool desidrogenase com atividade reduzida é também comum em asiáticos, e a sua presença está associada a um comportamento de consumo excessivo de etanol (RANG; DALE; RITTER, 2001).

2.4.7. Tolerância, dependência e síndrome de abstinência

O uso excessivo ou imoderado de bebidas alcoólicas causa uma intoxicação aguda conduzindo a um estado de perturbação física e mental conhecido como embriaguez alcoólica. O álcool é uma droga que leva à dependência física e psicológica. Os bebedores crônicos adquirem tolerância que os leva a beber cada vez maiores quantidades para obter os mesmos efeitos (GALVÃO, 1996).

Do ponto de vista farmacodinâmico, a tolerância resulta da adaptação das células nervosas ao efeito do álcool. Como consequência, doses cada vez maiores são necessárias para provocar os mesmos efeitos comportamentais. Pode haver tolerância cruzada com outros depressores do SNC, como barbitúricos e hipnóticos, entretanto, o uso concomitante de dois ou mais depressores centrais pode potencializar os efeitos um do outro (PEREIRA; OLIVEIRA, 1998).

A adaptação do SNC ao uso repetido e prolongado do etanol produz um estado de dependência física que se caracteriza pelo desejo forte e compulsivo até o consumo persistente de bebidas alcoólicas, apesar do aparecimento de consequências claramente nocivas, tanto do ponto de vista mental quanto físico.

Já a síndrome de abstinência pode instalar-se quando o consumo do álcool é interrompido após dias ou semanas de uso. Observam-se, então, em algumas horas, tremores, enjôo ou vômitos, mal-estar ou fraqueza, taquicardia, sudorese, ansiedade e humor deprimido ou irritável. Cefaléia e insônia são freqüentes. Podem ocorrer alucinações e evoluir para uma forma temível e de graves complicações, o *delirium tremens*, síndrome cerebral orgânica aguda que pode ser fatal (PEREIRA; OLIVEIRA, 1998).

2.5. CRITÉRIOS DE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A validação de um método analítico inclui todos os procedimentos realizados para garantir a qualidade dos dados produzidos. O desenvolvimento de um método analítico, a adaptação ou implementação de um método conhecido, envolve um processo de validação que estima sua eficiência na rotina do laboratório e a credibilidade do método (CHASIN; CHASIN; SALVADORI, 1994, BRITO et al., 2003, PORTARI 2006).

Órgãos como ICH (*International Conference on Harmonization*), IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), ISO (*International Organization of Standardization*), ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), INMETRO (Instituto Nacional de metrologia, Normalização e Qualidade industrial) e outros exigem o item validação de métodos analíticos como um requisito fundamental no credenciamento para qualidade assegurada e demonstração de competência técnica (RIBANI et al., 2004).

Vários grupos em todo o mundo têm elaborado documentos com o objetivo de padronizar o processo de validação de métodos analíticos. Como é o caso do grupo tripartite, representado pela união europeia, Japão e Estados Unidos, que em 1994 e 1996 se reuniram durante a ICH para elaborar diretrizes para a validação de procedimentos analíticos (INTERNATIONAL, 2005). Da mesma forma, a *Société Française Sciences et Techniques Pharmaceutiques* (SFSTP), em 1995, publicou um guia para validação de métodos cromatográficos em análises biológicas, baseando-se nas diretrizes publicadas anteriormente pelo grupo da ICH. No Brasil, a ANVISA por meio da resolução nº 899 de 29 de maio de 2003, publicou o guia para validação de métodos analíticos (AGÊNCIA, 2002, PORTARI, 2006).

Os parâmetros analíticos recomendados pela ANVISA e pelos guias internacionais para validação de métodos cromatográficos são gráfico analítico (curva de calibração), seletividade ou especificidade, linearidade e faixa de aplicação, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação (AGÊNCIA, 2002, RIBANI et al., 2004, INTERNATIONAL, 2005).

2.5.1. Especificidade/seletividade

Os termos especificidade e seletividade têm sido empregados com o mesmo significado, definindo a capacidade do método em detectar o analito de interesse na presença de outros componentes da matriz e de outros analitos, como excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos similares que possam estar presentes, garantindo que o pico de resposta seja exclusivamente de um componente simples, isto é, que não existam interferentes naquele tempo de retenção. Se a especificidade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas (BRITO et al., 2003, RIBANI et al., 2004).

Segundo Ribani et al. (2004), a especificidade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método instrumental de separação e deve ser reavaliada continuamente durante a validação e subsequente uso do método.

A especificidade de um método pode ser determinada de várias maneiras, uma das formas é a avaliação da amostra com detectores modernos (arranjo de diodos, espectrômetros de massa), que comparem o espectro do pico obtido na separação com o de um padrão, utilizando-se isto como uma indicação da presença da substância pura. Outro procedimento seria a realização de uma nova análise por outra técnica cromatográfica, ou com métodos e técnicas que são específicos para a substância de interesse, podendo-se utilizar a espectrometria de massa, a ressonância magnética nuclear, a espectrometria no infravermelho ou bioensaios específicos. A especificidade também pode ser determinada pela comparação da matriz isenta da substância de interesse e a matriz adicionada com esta substância; podendo-se adicionar a matriz outras substâncias que podem funcionar como possíveis interferentes (RIBANI et al., 2004).

Na análise de etanol no sangue pode ser detectada a presença de alguns possíveis interferentes, sendo, portanto importante à realização do teste de especificidade do método. Os possíveis interferentes que podem ser encontrados em amostras de sangue são o acetaldeído proveniente da biotransformação do etanol, o metanol que é um adulterante comumente encontrado em bebidas alcoólicas, a acetona que pode está presente em sangue de indivíduos intolerantes a glicose e o isopropanol que é utilizado na indústria farmacêutica para produção de soluções antissépticas e sabões líquidos (CORRÊA, 1997, MUSSHOF, 2002).

2.5.2. Gráfico Analítico (Curva de Calibração)

A correlação entre o sinal medido (área ou altura do pico) e a massa ou concentração da espécie a ser quantificada raramente é conhecida. Na maior parte dos casos, a relação matemática entre o sinal e a concentração ou massa de interesse deve ser determinada empiricamente, a partir de sinais medidos para massas ou concentrações conhecidas dessa espécie. Esta relação matemática, muitas vezes, pode ser expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica (RIBANI et al., 2004).

O gráfico analítico deve apresentar os dados estatísticos de intersecção, da equação da regressão linear $y = ax + b$ (contém os coeficientes de regressão linear “b” e angular “a”), o coeficiente de correlação (r) e a concentração estimada dos calibradores (soluções padrão) (BRITO et al., 2003).

As diretrizes da ICH e da ANVISA especificam um mínimo de cinco níveis de concentrações (AGÊNCIA, 2002, INTERNATIONAL, 2005). O GARP (Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas) também sugere cinco concentrações que devem ser injetadas em ordem crescente de concentração, no mínimo três vezes cada, com estimativa de desvio padrão relativo entre as injeções inferior a 5%. A IUPAC recomenda seis ou mais níveis de concentração (RIBANI et al., 2004).

Segundo Chasin, Chasin e Salvadori (1994), para definir uma curva é necessário um mínimo de quatro concentrações, as quais pelo menos duas devem conter concentrações respectivamente menor e maior que a mais baixa e alta concentração rotineiramente encontradas.

Julga-se satisfatória a linearidade do gráfico quando o coeficiente de correlação da reta obtida é estatisticamente igual a 1. Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados.

Segundo Brito et al. (2003), devem-se considerar as seguintes relações:

- R = 1 Correlação perfeita
- 0,91 < R < 0,99 Correlação fortíssima
- 0,61 < R < 0,91 Correlação forte
- 0,31 < R < 0,60 Correlação média
- 0,01 < R < 0,30 Correlação fraca
- R = zero Correlação nula

A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,91 (RIBANI et al., 2004).

2.5.3. Linearidade

A linearidade refere-se à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame dentro da faixa analítica especificada (BRITO et al., 2003, RIBANI et al., 2004). A linearidade está normalmente relacionada com a variação da inclinação da linha de regressão e é determinada através do princípio da curva analítica.

A linearidade pode ser demonstrada através das seguintes formas:

- Através do coeficiente de correlação do gráfico analítico, que não deve ser diferente de um (avaliado pelo teste t de Student), observando-se que a inclinação da reta seja diferente de zero. Assim é necessário obter coeficiente de correlação estatisticamente igual a 1 e coeficiente angular diferente de zero (BRITO et al., 2003).

- Pode-se testar a linearidade através da análise de variância ponderada (ANOVA ponderada). Considera-se linearidade satisfatória quando quatro curvas de calibração mostrarem linearidade ou, ainda, quando três delas forem lineares, sendo que aquela não linear ao nível de significância de 0,05 ou seja a 0,01 ($F_{a0,05} < F_{obtido} < F_{a0,01}$) (CHASIN; CHASIN; SALVADORI, 1994, BRITO et al., 2003).

Em qualquer técnica instrumental, a relação linear simples, descrita pela equação $y = ax+b$, só é válida em um determinado intervalo de concentração da espécie medida (faixa linear dinâmica), estando limitada a uma faixa de trabalho que corresponde à curva de calibração utilizada para a quantificação das amostras (RIBANI et al., 2004; PORTARI, 2006).

O cálculo dos coeficientes de regressão de uma curva analítica deve ser acompanhado de uma cuidadosa inspeção, para verificar se todos os pontos a serem usados estão dentro da faixa linear dinâmica correspondente. Para esta inspeção, deve-se dividir os dados do sinal pelas suas respectivas concentrações, fornecendo as respostas relativas. Um gráfico deve ser construído com as respostas relativas no eixo y e as concentrações correspondentes em escala logarítmica no eixo x. A linha obtida deve ser horizontal sobre toda a faixa linear. São desenhadas outras linhas horizontais paralelas no gráfico, para 95% e 105% da linha da faixa linear. Conclui-se que o método é linear até o ponto onde a resposta relativa intercepta a linha

95% ou 105%. A Figura 2 mostra a determinação do intervalo linear dinâmico através da sua representação logarítmica e da curva analítica clássica (RIBANI et al., 2004).

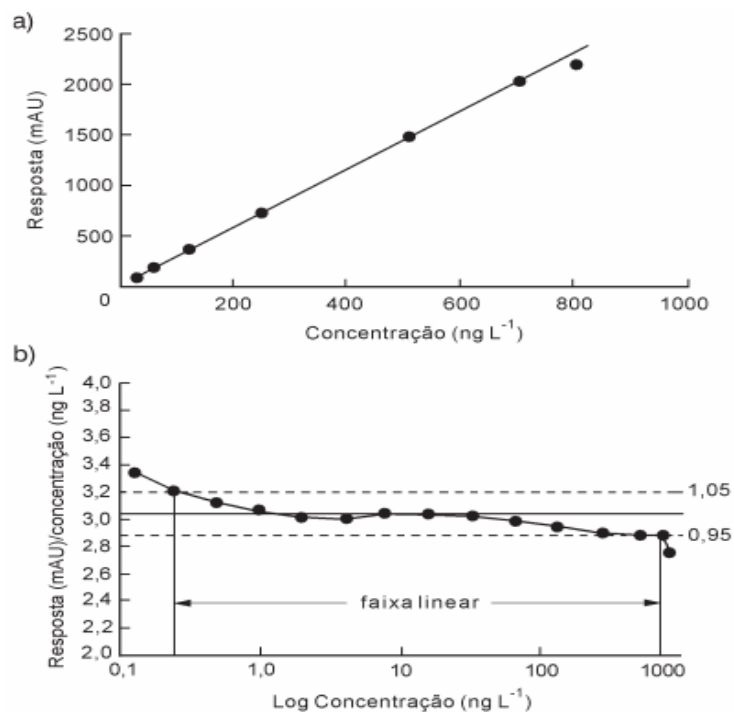


FIGURA 2 – Curvas de linearidade: a) curva analítica clássica; b) gráfico de razão sinal/concentração vs. concentração em escala logarítmica.

Fonte: Ribani et al. (2004).

2.5.4. Exatidão (recuperação)

Representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. A exatidão é expressa como o percentual de resposta obtida através da análise de amostras fortificadas – amostras isentas do analito que são adicionadas de uma solução padrão do analito com concentração conhecida (BRITO et al., 2003, RIBANI et al., 2004, VIEIRA; LICHTIG, 2004).

A ICH estabelece que um mínimo de nove determinações envolvendo um mínimo de três diferentes níveis de concentração deve ser obedecido. Por exemplo, ensaios em triplicata para três níveis de concentração. Esta recomendação é também adotada pela ANVISA (AGÊNCIA, 2002, RIBANI et al., 2004, INTERNATIONAL, 2005).

Os processos utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência, comparação de métodos, adição padrão e ensaios de recuperação (RIBANI et al., 2004).

O ensaio de recuperação constitui o método mais utilizado para validação de processos analíticos; ele reflete a quantidade de determinado analito, recuperado no processo, em relação a quantidade real presente na amostra. No estudo da recuperação são realizados testes de significância, utilizando o teste "t" de Student de acordo com a seguinte fórmula (BRITO et al., 2003):

$$t = \frac{(\text{Rec} - 100)}{\frac{S_{\text{Rec}}}{\sqrt{n-1}}}$$

Na qual: Rec = a média das recuperações obtidas para n repetições; 100 = a recuperação percentual desejada; n = o número de determinações (trabalha-se com no mínimo 5 repetições); S_{Rec} = o desvio padrão das recuperações.

Se o valor de t obtido estiver enquadrado no intervalo estabelecido pelo valor tabelado, para n - 1 graus de liberdade em dado nível de significância (0,1 ou 0,05), então o método será considerado exato. Além de efetuar o teste "t" de Student, existem valores críticos aceitáveis de acordo com a concentração do analito em estudo. Esses valores são estimados considerando-se que análises de elementos majoritários costumam apresentar erros sistemáticos relativos muito inferiores àqueles obtidos para analitos em concentrações muito pequenas. Tais valores, sugeridos pelo manual da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) são apresentados na Tabela 3 (BRITO et al., 2003).

TABELA 3 - Recuperação do analito em função da concentração

<i>Concentração do analito (%)</i>	<i>Intervalo de recuperação aceito (%)</i>
≥ 10	98 – 102
≥ 1	97 – 103
≥ 0,1	95 – 105
≥ 0,01	90 – 107
≥0,001 - ≥ 0,00001	80 – 110
≥0,000001	60 – 115

Fonte: Brito et al. (2003).

2.5.5. Precisão

Precisão é o parâmetro que avalia a proximidade entre várias medidas efetuadas na mesma amostra, expressando o grau de repetibilidade entre os resultados de análises individuais quando o procedimento é aplicado mais de uma vez em uma mesma amostra homogênea, em idênticas condições de análise (BRITO et al., 2003, VIEIRA; LICHTIG, 2004).

A precisão pode ser expressa através do intervalo de confiança da média, que é uma faixa de valores no qual existe uma determinada probabilidade de se encontrar um certo valor de uma variável, calculada pela equação (RIBANI et al., 2004):

$$\text{Intervalo de confiança da média} = \bar{x} \pm t_{n-1} \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Em que: t_{n-1} = valor crítico da distribuição de Student com n-1 graus de liberdade. O valor t é tabelado e apresenta valores para diferentes níveis de confiança.

Outra expressão da precisão é através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), também conhecido como coeficiente de variação (CV) (BRITO et al., 2003, RIBANI et al., 2004).

$$CV\% = \frac{s}{M} \times 100$$

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

Para a verificação da precisão o coeficiente de variação deve ser menor que 15%. No caso de amostras com concentrações baixa (resíduos) aceita-se um coeficiente de variação de 20% (CHASIN; CHASIN; SALVADORI, 1994).

A precisão em validação de métodos é considerada em três níveis diferentes: repetitividade (precisão intra-ensaio); precisão intermediária (precisão inter-ensaio); reprodutibilidade (precisão inter-laboratórios) (RIBANI et al., 2004).

Para a precisão inter e intra-ensaio o INMETRO recomenda sete ou mais repetições para o cálculo da estimativa do desvio padrão. A ICH e ANVISA sugerem que seja verificada a partir de um mínimo de nove determinações cobrindo o limite especificado do procedimento (ex.: três níveis, três repetições cada um), ou a partir de um mínimo de seis determinações a uma concentração similar ao valor esperado (AGÊNCIA, 2002, RIBANI et al., 2004, INTERNATIONAL, 2005).

Segundo Chasin, Chasin e Salvadori (1994), para a verificação da precisão inter e intra-ensaio devem ser considerados resultados de cinco amostras ($n = 5$) para cada concentração e a média da concentração obtida pode ter variação de até 20% em relação à concentração adicionada.

2.5.6. Limite de detecção

O limite de detecção é representado pela menor concentração da substância em exame que o processo analítico pode detectar, mas não necessariamente quantificar, utilizando um determinado procedimento experimental (BRITO et al., 2003, RIBANI et al., 2004).

O limite de detecção pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído, método baseado em parâmetros da curva analítica (RIBANI et al., 2004).

- Método visual: É utilizado para determinar o limite de detecção utilizando a matriz com adição de concentrações conhecidas da substância de interesse, de tal modo que se possa distinguir entre ruído e sinal analítico pela visualização da menor concentração possível (detectável).

- Método da relação sinal-ruído: Este método pode ser aplicado somente em procedimentos analíticos que mostram o ruído da linha de base. Para determinar a relação sinal-ruído, é feita a comparação entre a medição dos sinais de amostras em baixas concentrações conhecidas do componente de interesse na matriz e um branco. A relação sinal-ruído pode ser de 3:1 ou 2:1.

- Método baseado em parâmetros da curva analítica: O limite de detecção pode ser expresso como: $LD = 3,3 \times \frac{s}{S}$

Onde s é a estimativa do desvio padrão da resposta, que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação e S é a inclinação ou coeficiente angular da curva analítica. Para calcular estes dados deve ser feita uma curva analítica.

2.5.7. Limite de quantificação

O limite de quantificação representa a menor concentração da substância em análise que pode ser quantificada na amostra com exatidão e precisão aceitáveis, utilizando um determinado procedimento experimental (BRITO et al., 2003, RIBANI et al., 2004).

O limite de quantificação pode ser determinado pelos mesmos métodos empregados no limite de detecção. (RIBANI et al., 2004).

Após determinado o limite de quantificação deve-se certificar se o valor encontrado apresenta precisão e exatidão através da determinação do coeficiente de variação, a média e desvio padrão para dez replicatas (CORRÊA, 1997).

2.6. ESTABILIDADE DO ETANOL

A estabilidade, em química clínica, é definida como a capacidade da amostra do material manter o valor inicial de uma medida quantitativa por um período definido dentro de limites específicos quando armazenados sob condições definidas. A instabilidade individual máxima é admissível quando associada à luz dos critérios da imprecisão analítica, e é expressa como a diferença crítica. Este procedimento permitiu que a clínica Toxicológica definisse o tempo máximo admissível de armazenamento para um analito num determinado modelo biológico em uma determinada condição, e de emitir recomendações para a preservação e armazenamento que mantenham a qualidade da amostra e em grande parte preservar a quantidade inicialmente presente (SKOPP, 2004).

As possibilidades técnicas de realização de uma prova pericial estão sujeitas à qualidade das amostras, o que, em muitos casos, é inerente à própria amostra. Porém, muitas vezes, a qualidade depende dos processos de coleta e de armazenamento destas amostras até a chegada ao laboratório para análises. Acrescente-se que a admissibilidade das provas nos tribunais, depende de como foram realizados os ditos processos e do cumprimento da cadeia de custódia (BONACCORSO; PERIOLI, 2001).

A qualidade das amostras pode ser definida com relação a sua aceitação e quantidade, tão bem quanto aos anticoagulantes e conservantes usados. O tempo de análise, transporte e armazenamento interferem nos critérios de estabilidade da amostra, bem como, todo o tratamento pré-analítico (GURDER, 1999). O laboratório deve estabelecer medidas de

segurança para garantir que o material biológico seja devidamente documentado, processado e armazenado. Este procedimento para manter a integridade do espécime biológico a ser testado é conhecido como cadeia de custódia e tem como objetivo garantir a segurança da amostra desde a coleta e transporte até o armazenamento e a análise laboratorial (CORRÊA, 1997).

Estudos descrevem que o tempo e a temperatura de armazenamento, bem como a concentração de conservante estão entre os fatores mais importantes envolvidos na estabilidade do etanol em amostras biológicas (SMALLDON; BROWN, 1973, BROWN; NEYLAN, 1976, TAGLIARO et al., 1992, WINEK et al., 1995, KRISTOFFERSEN et al., 2006).

Um outro item importante referente à conservação da amostra para análise de etanol é a volatilidade deste álcool, cujo teor poderia diminuir com o tempo devido a perdas através da tampa do recipiente. Em espécimes de sangue, após adição de conservante e armazenamento em temperaturas abaixo de 0°C, a concentração alcoólica não se altera significativamente por pelo menos 12 meses (SMALLDON; BROWN, 1973, BROWN; NEYLAN, 1976, CHANG; KOLLMAN, 1989, CORREA, 1997).

As amostras destinadas a exame toxicológico de dosagem de álcool devem ser adicionadas de um conservante, com isso pretende-se impedir a proliferação microbiana, e assim prevenir a probabilidade de se induzirem alterações nas taxas sanguíneas do referido tóxico (RANGEL, 2003/2004). A substância mais comumente utilizada para a conservação de amostras contendo etanol é o fluoreto de sódio, principalmente em amostras *post mortem*. O íon fluoreto, na concentração aproximada de 1% (peso por volume), previne a formação de polissacarídeos pelos micróbios e, por sua vez, previne o crescimento microbiológico. A temperatura de armazenamento e a duração têm também um papel importante na formação de etanol por microrganismos (CORREA, 1997).

Brown e Neylan (1976) pesquisaram os efeitos de diversos fatores como tempo de armazenamento, concentração de conservante, concentração de etanol, temperatura de armazenamento e tipo de recipiente, na estabilidade de etanol no sangue armazenado, utilizando o planejamento fatorial 2⁵. Os fatores mais importantes relacionados à estabilidade do etanol foram o tempo e a temperatura de armazenamento e, a concentração de fluoreto de sódio.

Winek et al. (1995) avaliaram o efeito do tempo e temperatura de armazenamento, presença de conservante, na concentração de etanol no soro e sangue total. As amostras coletadas com oxalato de potássio como anticoagulante, com e sem fluoreto de sódio como

conservante, foram armazenadas as temperaturas de 26,7, 32,2 e 37,8° C por 35 dias. As amostras de sangue total foram analisadas no 1º e 35º dias, não sendo observada variação significativa na concentração de etanol, com variações de 10-19% nas três temperaturas. Segundo esses mesmos autores estudos prévios sobre o efeito das diferentes condições de armazenamento na concentração de álcool em amostras de sangue, não revelaram alteração significativa no teor de álcool quando armazenadas à temperatura ambiente por até dois meses e a - 20°C durante seis meses, utilizando fluoreto de sódio como conservante.

Corrêa (1997) estudou o uso da urina para análise toxicológica de etanol em “Programas de controle e prevenção do uso de álcool e drogas no local de trabalho”. Dentro da padronização do procedimento para determinação de etanol em sangue e urina com separação por *head space* e cromatografia em fase gasosa foi realizado o estudo da estabilidade das amostras para o período de 30 dias, sob condições de armazenamento em freezer com o uso do conservante fluoreto de sódio. A avaliação considerou a diferença entre os resultados obtidos na 1ª análise, efetuada nas 2 semanas consecutivas à colheita, e a 2ª análise, realizada exatamente 30 dias após a primeira. Os resultados mostraram que não houve variação superior a 10% entre os valores e que, a estabilidade no período de 30 dias mostrou-se adequada, demonstrando que ao nível de 0,5% de significância nenhuma diferença estatística foi observada entre as duas análises.

Vasiliades e Ford (2001) avaliaram a estabilidade do etanol em sangue e urina. Amostras de sangue contendo conservante (fluoreto de sódio) e anticoagulante (oxalato de potássio) e urinas não preservadas foram adicionadas com etanol. As amostras foram analisadas por cromatografia em fase gasosa imediatamente após preparação e por um período de 1 a 7 anos para as de sangue e 11 meses para as de urinas. As amostras foram armazenadas sob refrigeração a 4°C. A estabilidade do álcool nas amostras armazenadas foi menor com dois anos para o sangue e onze meses para a urina.

Zilly et al. (2003) fizeram a determinação de etanol em amostras de urina humana através do método de cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama. Este método mostrou-se fácil e econômico para laboratórios que não têm viabilidade de usar a técnica de *head space*. A principal vantagem deste método refere-se ao fato de avaliar níveis baixos ou muito baixos de etanol na urina, com um procedimento não-invasivo, permitindo uma fácil diferenciação entre abstinência e consumo de álcool em pacientes submetidos a terapia especial ou a transplante de órgão, tendo em vista que o etanol é a principal substância responsável pela progressão da hepatite viral crônica para cirrose hepática.

Jiménez et al. (2004) estudaram procedimentos práticos para testar a homogeneidade e estabilidade de drogas analisadas nos testes *anti-doping* em fluidos biológicos. A estabilidade de amostras de urina foi avaliada por longo e curto espaço de tempo de armazenamento, 24 meses nas condições de armazenamento a -20°C e 4°C e, após 3 e 7 dias de armazenamento a 37°C. Amostras foram armazenadas também a temperaturas muito baixas (-80°C) para posteriores comparações.

A instabilidade dos analitos na matriz biológica e os fenômenos de redistribuição *post mortem* são interferentes importantes em toxicologia forense. Conhecimentos sobre a estabilidade dos analitos no material biológico são de fundamental importância em várias situações nas análises toxicológicas, uma vez que várias situações acabam por inserir intervalos de tempo variáveis entre a coleta do material, seu transporte até o laboratório e o momento da análise (COSTA, 2004).

Numerosos estudos têm examinado o tempo requerido para a produção de etanol e a temperatura ótima de armazenamento para a preservação da formação de etanol *post mortem* em amostras de sangue e urina (LEWIS et al., 2004). Esses aspectos são de fundamental importância, principalmente em países em desenvolvimento, onde a coleta e conservação de amostras de sangue são frequentemente deficientes e agentes conservantes, como o fluoreto de sódio, são raramente usados (FERRARI et al., 2006).

Lewis et al. (2004) estudaram a formação de etanol em tecidos *post mortem* não-adulterados. As amostras foram obtidas de vítimas de acidentes de aviação do Instituto Médico-Aeroespacial Civil da Administração de Aviação Federal Americana, geralmente submetidas a trauma severo e que podem ter sido expostas a numerosas espécies de microrganismos capazes de produzir etanol. Sendo o fluoreto de sódio (NaF) o conservante mais comumente utilizado em amostras *post mortem*, foi designado um experimento com cromatografia em fase gasosa utilizando amostras de tecidos para determinar a eficácia do NaF em várias temperaturas de armazenamento na preservação da formação de etanol. Foi encontrado que sem conservante, houve aumento na concentração de etanol, sendo maior na temperatura de 25°C e menor a 4°C, quando armazenados por 96 horas. Com a adição de NaF 1% não houve variação significativa na concentração de etanol nas temperaturas estudadas.

Ventorin (2004) estudou a relação entre a dosagem de etanol no sangue e na saliva. Utilizando amostras de 30 voluntários após ingestão de etanol, as amostras de sangue com fluoreto de sódio, armazenado em geladeira a temperatura de 0-4°C e submetidas ao procedimento de *head space* e cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de

chama. Como resultado foi observado uma forte correlação positiva apontando comportamento similar das concentrações de etanol nas amostras de saliva e sangue.

Kristoffersen et al. (2006) utilizaram o planejamento fatorial para estudar o efeito do armazenamento do sangue e as condições de *head space* na estabilidade do etanol e formação de acetaldeído em sangue total e plasma. O método utilizado foi o de Cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama e separação por *head space* (CG/DIC/HS), utilizando as variáveis *head space* com a temperatura de 50 e 70°C e no tempo de 15 e 25 minutos, concentração de etanol de 0,20 a 1,20 g/Kg e tipo de amostra (plasma, sangue hemolisado e sangue não-hemolisado). Observou-se que a concentração de etanol no sangue diminuiu enquanto a de acetaldeído aumentou, devido muito provavelmente a oxidação química do etanol a acetaldeído na presença das células vermelhas, efeito este não observado no plasma.

Os fatores mais freqüentemente implicados no mecanismo de produção de etanol *post mortem* em corpos têm sido considerados: o número e a natureza dos microorganismos presentes, a variedade de tipos de substratos, a temperatura e o tempo (ZIAVROU et al., 2005). A síntese de etanol *post mortem* por contaminação microbiológica pode ser prevenida por adequada preservação das amostras, refrigeração de sangue até 4 horas de morte e preservação das amostras com fluoreto de sódio (O'NEAL; POKLIS, 1996, LIMA; MÍDIO, 1999, LEIKIN; WATSON, 2003, SPINOSA DE MARTINS et al., 2006).

Uma questão comumente discutida na análise de etanol em material biológico é a produção *in vitro* de etanol. De acordo com alguns autores, a produção de concentrações significativas de etanol *in vitro*, ocorre somente a partir de amostras não preservadas, na presença de grandes quantidades de microorganismos produtores de etanol (ex. *Candida albicans*) e glicose, requerendo mais de 12 horas para o processo se estabelecer (LOUGH; FEHN, 1993, CORRÊA; PEDROSO, 1997).

Jones (1994) discute a aceitação e os benefícios do fluoreto de sódio (NaF) como conservante em amostras de sangue para a análise de etanol por cromatografia a gás. Apesar dos estudos mostrando a eficácia do NaF para a preservação da formação microbiana do etanol (CHANG; KOLLMAN, 1989, LOUGH; FEHN, 1993), existem outros estudos concluindo que a presença do NaF pode ser ineficaz em amostras de sangue contendo elevada concentração de leveduras como *Candida albicans* (LEWIS et al., 2004, FERRARI et al., 2006).

Lough e Fehn (1993) e Jones et al. (1999) estudaram a eficácia do fluoreto de sódio a 1% como conservante na prevenção da formação de etanol em amostras de urina contendo glicose e inoculadas com *Candida albicans*. Como resultado, encontraram que enquanto a produção endógena de etanol é possível na presença de glicose e contaminação com *Candida albicans*, a presença de fluoreto de sódio a 1% eliminou completamente a fermentação microbiológica. O fluoreto é muito utilizado como um inibidor de crescimento microbiano, embora sua concentração e as condições de armazenamento possam alterar sua eficácia.

Num determinado estudo, três espécies de fungos e seis espécies de bactérias foram adicionadas a amostras de urina. As amostras foram incubadas a 0, 25 e 35°C por 24, 48 e 144 horas na presença de um ou quatro açúcares diferentes. Os resultados mostraram que quando a glicose foi usada como substrato, todas as amostras de fungos e três espécies de bactérias foram capazes de produzir etanol. A razão da produção de etanol demonstrou ser temperatura dependente e pode ser inibida pelo armazenamento a 0°C ou com o uso de fluoreto de sódio a 1% como um agente antimicrobiológico (SULKOWSKI; MCCARTER, 1995).

Yajima et al. (2006) utilizaram o t-butanol como padrão interno na análise da produção de etanol por *Candida albicans* em amostras de sangue *post mortem*, bem como avaliaram o efeito do fluoreto de sódio como conservante na prevenção da produção de etanol pela *Candida albicans*, verificando o efeito inibidor do NaF a 1-2% em amostras experimentais, não foi produzido etanol nem n-propanol (LEWIS et al., 2004).

2.7. CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA NA ANÁLISE DE ETANOL

O método de cromatografia em fase gasosa (CG) é uma técnica para separação e análise de misturas de substâncias voláteis. A amostra é vaporizada e introduzida em um fluxo de um gás adequado denominado de fase móvel ou gás de arraste. Este fluxo de gás com a amostra vaporizada passa por um tubo contendo a fase estacionária (FE) (coluna cromatográfica), onde ocorre a separação da mistura. A FE pode ser um sólido adsorvente (Cromatografia gás-sólido) ou, mais comumente, um filme de um líquido pouco volátil, suportado sobre um sólido inerte (Cromatografia gás-líquido com coluna empacotada ou recheada) ou sobre a própria parede do tubo (Cromatografia a gás de alta resolução).

As substâncias separadas saem da coluna dissolvidas no gás de arraste e passam por um detector; dispositivo que gera um sinal elétrico proporcional à quantidade de material eluído. O registro deste sinal em função do tempo é o cromatograma, sendo que as substâncias aparecem nele como picos com área proporcional à sua massa, o que possibilita a análise quantitativa (LANÇAS, 1993, MENDHAM et al., 2002, SKOOG; HOOLER; NIEMAN, 2002).

O detector de ionização de chama (DIC ou do inglês, FID – flame ionization detector) é o mais usado e o mais aplicável em cromatografia em fase gasosa. Com um queimador, o efluente da coluna é misturado com hidrogênio e ar e, então, entra em ignição eletricamente. A maioria dos compostos orgânicos, quando pirolisados na temperatura da chama de hidrogênio/ar, produz íons e elétrons que podem conduzir eletricidade através da chama. Um potencial de algumas centenas de volts é aplicado através da ponta do queimador operacional de alta impedância para a medida (MENDHAM et al., 2002, SKOOG; HOOLER; NIEMAN, 2002).

Considerando que o álcool é uma substância amplamente utilizada mundialmente e da qual resultam altas taxas de acidentes fatais, laboratórios forenses são solicitados a desenvolver métodos mais rápidos e mais precisos para a determinação rotineira do etanol em fluídos biológicos. (SPINOSA DE MARTINIS; MARTIN, 2002, WASFI et al., 2004).

Por mais de 30 anos, a cromatografia a gás tem sido utilizada na determinação do etanol, sendo considerada nos dias atuais como o método de referência. A injeção direta e o uso de *head space* são as técnicas mais difundidas, embora esta última seja a mais utilizada,

devido à sua vantagem em prolongar a vida útil da coluna e prevenir a contaminação do injetor, importante principalmente nos laboratórios de rotina (CORRÊA; PEDROSO, 1997).

Ziavrou et al. (2005) descrevem a cromatografia em fase gasosa – *headspace* como o método de escolha para a detecção de etanol em sangue ou outras amostras devido à acurácia e à sensibilidade fornecidos.

Na análise de etanol em fluidos biológicos complexos, tais como, sangue, plasma, urina, saliva e leite, a técnica do *head space* é preferida, por evitar contaminação da coluna e injetor do cromatógrafo. Esta técnica consiste na evaporação dos analitos de interesse e amostragem dos vapores acima do fluido (sangue, urina ou outros) após alcançado o equilíbrio térmico e gasoso em um tubo fechado, conforme apresentado na Figura 3. Os componentes volatizados presentes no *head space* são aspirados por meio de seringa especial (*Gas tight*® - a qual não deixa que o vapor vaze para o ambiente) e injetados no cromatógrafo para separação (LANÇAS, 1993, KOLB, 1999, SNOW; SLACK, 2002, PORTARI, 2006).

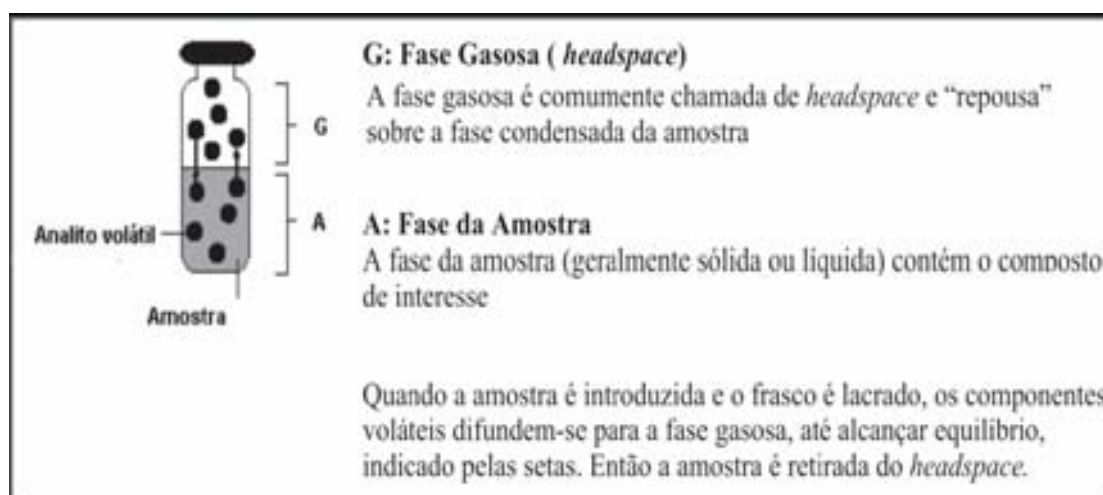


FIGURA 3 - Fases do frasco do *head space*. Desenho esquemático da técnica de *head space*. Fonte: Melquiades et al. (2006).

A análise por *head space* é geralmente definida como uma extração fase-vapor, envolvendo a partição do analito entre um líquido não-volátil ou fase sólida e a fase vapor acima do líquido ou sólido. Espera-se que a mistura da fase vapor contenha menos componentes que usualmente o líquido complexo ou amostra sólida e que a mistura é transferida para o CG ou outro instrumento para análise (KOLB, 1999, SNOW; SLACK, 2002).

A principal característica do *head space* é a possibilidade da determinação de componentes voláteis da amostra a ser estudada de forma direta. Além disso, o *head space*

torna-se insubstituível e muito eficiente, pois possibilita a introdução da amostra sem pré-tratamento no cromatógrafo gasoso. Isto se torna mais crítico principalmente devido à baixa detectabilidade dos detectores cromatográficos e a indesejável contaminação da coluna por resíduos não-voláteis (LANÇAS, 1993, KOLB, 1999, GOBATO; LANÇAS, 2001).

Técnicas tais como *head space* dinâmico (*purge and trap*), micro extração em fase sólida (SPME) e micro extração com solvente (SME) têm sido desenvolvidas para melhorar a eficiência da extração para compostos orgânicos voláteis e semi-voláteis de amostras líquidas e sólidas. Quando se compara e avalia as várias técnicas de *head space*, os critérios decididos não são apenas a sensibilidade do método, mas igualmente importante é o grau de automação. Ele melhora a precisão e fornece um uso mais efetivo do pessoal do laboratório (KOLB, 1999, SNOW; SLACK, 2002, MELQUIADES et al., 2006).

Um grande problema existente na análise quantitativa por *head space* é o efeito matriz. A composição da amostra influencia a concentração do analito na fase gasosa e, conseqüentemente, a exatidão dos resultados. Para compensar este efeito e obter resultados mais exatos, faz-se uso de padrões internos para a calibração (CORRÊA; PEDROSO, 1997). Como em geral a amostras analisadas são matrizes aquosas, utiliza-se um artifício para diminuir a interação existente entre o álcool e a água, ou seja, as pontes de hidrogênio, e permitir melhor vaporização do etanol. Este artifício consiste na adição de um sal, tornando o sistema saturado, chamado *salting-out* (PORTARI, 2006). Com uma dissolução simples de NaCl (outros sais inorgânicos causam o mesmo efeito) em água pode-se diminuir a solubilidade de uma substância orgânica na água e conseqüentemente aumentar a distribuição de um composto orgânico em um solvente orgânico.

Devido ao grande número de métodos empregando a cromatografia para determinação do etanol, Tagliaro et al. (1992) fizeram uma revisão das condições cromatográficas presentes nos métodos mais interessantes, destacando o uso de diferentes colunas, espécimes biológicos, gases de arraste, detectores e padrões internos. Embora existam muitos métodos descritos na literatura para a dosagem de etanol por cromatografia em fase gasosa, cada qual possui suas particularidades com respeito ao equipamento disponível, tipo de coluna, preparação da amostra, gás de arraste, tipo de detector e padrão interno, tornando difícil a implementação desta técnica (TAGLIARO et al., 1992, PORTARI, 2006). Entretanto, alguns parâmetros são considerados universais ou preferenciais na análise de etanol em fluidos biológicos. Assim, o detector de ionização de chama é a escolha na detecção de etanol e compostos correlatos como acetaldeído, acetona e metanol. As colunas polares são preferíveis

às apolares ou de polaridade intermediária (TAGLIARO et al., 1992, PORTARI, 2006). O uso de padrão interno para a calibração da análise também é universal na análise por *head space* para correções de imprecisões na amostragem ou na injeção. Esta técnica consiste em adicionar uma quantidade conhecida de uma substância (padrão interno), diferente daqueles que estão sendo analisados. Para a quantificação, é construída uma curva de calibração utilizando a razão de área do analito e a do padrão interno versus a concentração do analito (PORTARI, 2006).

Lima e Mídio (1997) validaram um método cromatográfico em fase gasosa por *head space*, simples, rápido, preciso, específico e de fácil execução com vistas à determinação de etanol em fluidos biológicos (sangue, humor vítreo, bile e urina) de interesse forense.

Strassing e Lankmary (1999) estudaram a eliminação do efeito matriz em análises de etanol por *head space* utilizando cromatografia em fase gasosa, injeção *split/splitless*, coluna capilar DB-WAX de 30 m de comprimento e 0,32 mm de diâmetro interno (J&W Scientific, CA, USA), detector de ionização de chama e t-butanol como padrão interno.

Yonamine et al. (2003) fizeram a determinação de tetrahydrocannabinol, anfetamina, metanfetamina, cocaína e etanol em amostras de saliva de motoristas de caminhão no estado de São Paulo, através da microextração em fase sólida e da cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas e cromatografia em fase gasosa com separação por *head space*.

Spinosa de Martinis et al. (2004) realizaram a determinação de etanol em sangue e urina por *head space* automático com microextração em fase-sólida e cromatografia capilar. Para o experimento utilizaram sangue e urina de voluntários após ingerirem certa quantidade de etanol. A metodologia demonstrou boa sensibilidade, precisão e linearidade, similar ao *head space* convencional.

Wasfi et al. (2004) estudaram a rapidez e sensibilidade da cromatografia em fase gasosa por *head space* acoplada a Espectrometria de Massas como método para a análise de etanol e inalantes de abuso no sangue.

Spinosa de Martinis e Martin (2002), Ziavrou et al. (2005) e Spinosa de Martinis et al. (2006) realizaram análises de etanol em amostras *post mortem* utilizando CG/FID/HS e a técnica de *head space* automático com microextração em fase-sólida e cromatografia capilar. O procedimento apresentado mostrou-se simples, sensível, de boa reprodutibilidade e excelente representação quantitativa.

3. OBJETIVOS

3.1. GERAIS

- Avaliar um procedimento analítico conhecido de Cromatografia em fase gasosa para analisar amostras de sangue adicionadas com etanol;
- Avaliar a estabilidade do etanol em amostras de sangue, levando em consideração as variáveis: presença de conservante (fluoreto de sódio), tempo e temperatura de armazenamento.

3.2. ESPECÍFICOS

- Otimizar os parâmetros cromatográficos;
- Determinar a linearidade e a especificidade do método;
- Estudar a recuperação do método
- Avaliar a precisão intraensaio e interensaio;
- Determinar o limite de detecção e quantificação do método;
- Estudar a estabilidade do etanol em amostras de sangue com e sem conservante, adicionadas de etanol a 0,6 g/L, armazenadas a temperatura de -20 e 4°C, por 1, 3, 7, 14, 30 e 60 dias;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1. Solução-estoque

Todas as soluções foram preparadas utilizando como solventes n-propanol ou sangue de voluntários, evitando a danificação da coluna cromatográfica pela utilização de água como solvente.

Foram preparadas as soluções estoque de etanol a 0,6 g/L e 3,2 g/L em sangue, dissolvendo-se 39 μ L de etanol P.A. em 50 mL de sangue e 104 μ L de etanol P.A. em 25 mL de sangue, respectivamente.

Foram preparadas soluções a 10 g/L de acetaldeído, acetona, metanol, isopropanol e etanol em sangue, dissolvendo-se 129 μ L de acetaldeído, 127 μ L de acetona, 126 μ L de metanol, 128 μ L de isopropanol e 128 μ L de etanol, todos reagentes P.A. em 10 mL de sangue.

4.1.2. Soluções de trabalho

A partir da solução estoque de etanol, foram preparadas as soluções de trabalho a 0,01; 0,05 e 0,1 g/L; e a partir do etanol P.A. foi preparada a solução de trabalho a 0,8 e 1,6 g/L. Estas concentrações foram obtidas diluindo-se 31, 156 e 312 μ L da solução estoque a 3,2 g/L em 10 mL de sangue e, 10 e 21 μ L de etanol P.A. em 10 mL de sangue, respectivamente.

Foi preparada uma solução única do padrão interno t-butanol a 0,3 g/L em n-propanol. Dissolveu-se 40 μ L de t-butanol P.A. em 100 mL de n-propanol.

Foi preparada uma mistura das seguintes substâncias: acetaldeído e acetona a 0,04 g/L, metanol a 0,1 g/L, isopropanol e etanol a 0,08 g/L, a partir das soluções estoque a 10 g/L destas substâncias. Dissolveu-se 40 μ L de acetaldeído e de acetona, 100 μ L de metanol, 80 μ L de isopropanol e de etanol em 10 mL de sangue.

Todas as soluções (padrão e de trabalho) foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar e mantidas sob refrigeração a 4°C.

4.1.3. Equipamentos e acessórios

- Aquisição de dados: Star Chromatography Workstation versão 5.52 (Varian, Califórnia, EUA);
- Balança analítica AG-200 (Gehaka, São Paulo, Brasil).
- Cromatógrafo Gasoso modelo CP 3800 equipado com detector de ionização de chama (Varian, Califórnia, EUA);
- Coluna capilar de sílica fundida com fase estacionária de polietilenoglicol (CP-WAX), com 50 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno (Varian, Califórnia, EUA);
- Estufa (Fanem, São Paulo, Brasil);
- Freezer R360 (Eletrolux[®]) com temperatura de -20°C;
- Gases especiais para cromatografia em fase gasosa: Nitrogênio, Hidrogênio, Hélio e ar sintético (White Martins);
- Microseringa *Gas Tight* 500 µL com agulha *Gas Tight* estilo 2 (SGE, Austrália);

- Refrigerador R360 (Eletrolux[®]) com temperatura entre 0°C e 4°C.

4.1.4. Reagentes e outros materiais

- Acetaldeído P.A. (MERK);
- Acetona P.A. (VETEC);
- Etanol P.A. (VETEC);
- Isopropanol P.A. (VETEC);
- Metanol P.A. (VETEC);
- N-propanol P.A. (VETEC);
- Sulfato de sódio anidro (Nuclear, SP, Brasil);
- Terc-butanol P.A. (MERCK);
- Balões volumétricos de 10, 25 e 100 mL;
- Frascos de vidro, capacidade para 10, 20 e 100 mL;
- Pipetas semi-automáticas graduadas de 10-100 µL e 40-200 µL;
- Pipetas semi-automáticas volume fixo: 250, 500 e 1000 µL;
- Seringas descartáveis de 10 e 20 mL (PLASCALP[®]);
- Scalp n° 19 e 23 (PLASCALP[®]);

- Tampas de borracha, lacre de alumínio e lacrador.

4.1.5. Amostras

Foram coletadas amostras de sangue de voluntários saudáveis (n=10), de ambos os sexos, que não tinham feito uso de bebida alcoólica 72 horas antes da coleta, após a leitura e assinatura de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A).

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFRN, em reunião realizada no dia 17 de novembro de 2006 e comunicado através do Protocolo nº 179/06 CEP – UFRN (ANEXO A).

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Avaliação do procedimento analítico

4.2.1.1. Otimização dos parâmetros cromatográficos

Soluções de trabalho de etanol foram utilizadas para a padronização das análises através da cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama. Foram testadas corridas isotérmicas e rampas de aquecimento para a escolha da temperatura, da velocidade de fluxo de gás pela coluna e do tempo de análise, utilizando-se o hélio como gás de arraste.

4.2.1.2. Avaliação da especificidade da técnica

A solução de trabalho contendo acetaldeído, acetona, metanol, isopropanol e etanol foi utilizada para verificar a separação destas substâncias na coluna utilizada e avaliar a potencial interferência destas, quando submetidas ao procedimento descrito no item 4.2.1.4.

4.2.1.3. Estudo da linearidade da técnica

O estudo da linearidade, para definir o intervalo de concentração no qual a intensidade de resposta do detector é diretamente proporcional à concentração de etanol, foi feito através da análise cromatográfica de soluções contendo etanol nas seguintes concentrações de 0,01; 0,05; 0,1; 0,8; 1,6 e 3,2 g/L em sangue, submetidas ao procedimento descrito no item 4.2.1.4.

4.2.1.4. Separação por *head space* e cromatografia em fase gasosa

A determinação de álcool foi realizada usando a técnica de *head space* por cromatografia em fase gasosa (Cromatógrafo CP 3800, Varian) com detector de ionização de chama (DIC) utilizando uma coluna capilar com fase estacionária de polietilenoglicol (CP-WAX, Varian) com 50 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno.

Num frasco de vidro de capacidade para 10 mL, colocou-se 1 mL da amostra de sangue, 1 mL da solução de t-butanol 0,3 g/L (padrão interno) e 1g de sulfato de sódio anidro (salting out). Este frasco foi fechado com tampa de borracha, lacrado com um selo de

alumínio e a seguir incubado por 10 minutos em estufa previamente aquecida a 70°C. Após esse período, a camada superior foi homogeneizada através de três operações de tomada e devolução do vapor, utilizando uma seringa própria para *head space* (*Gas tight*®, SGE) de 500 µL. Retirou-se 250 µL da camada de vapor e injetou-se no cromatógrafo.

Após a separação dos analitos na coluna capilar, os mesmos foram eluídos e detectados pelo detector de ionização de chama. Os dados foram analisados por meio de software que por integração fornece a área relativa a cada pico eluído. A razão entre a área do pico do padrão interno versus às concentrações teóricas de cada diluição foram colocadas em gráfico de regressão linear. A quantificação de etanol nas amostras foi realizada por meio da equação da reta $y = a + bx$ obtida na curva de calibração, onde y = área do etanol/área do padrão interno e, x é a concentração de etanol na amostra.

4.2.1.5. Curva de calibração

A curva de calibração foi obtida pela análise de amostras de sangue adicionadas de etanol nas concentrações de 0,05; 0,1; 0,8; 1,6 e 3,2 g/L. As amostras adicionadas foram submetidas ao procedimento descrito em 4.2.1.4. e analisadas em triplicata. A curva foi construída com a média dos valores encontrados para cada concentração, utilizando-se a relação de área etanol/padrão interno.

4.2.1.6. Recuperação do método

No estudo da recuperação foram utilizadas três diferentes concentrações (0,05; 0,8 e 3,2 g/L), onde cada concentração foi analisada em 5 replicatas, sendo a exatidão do método determinada pelos testes de significância, utilizando o teste t de Student.

4.2.1.7. Avaliação da precisão do método

A precisão foi avaliada indiretamente, pela medida da imprecisão da técnica, dada pelo coeficiente de variação (CV) dos resultados. A avaliação da precisão intra e inter-ensaio foi realizada através da determinação de alíquotas de sangue, contendo etanol nas concentrações

de 0,05; 0,8 e 3,2 g/L. O estudo foi realizado em triplicatas, durante 3 dias. Com os dados obtidos, foram calculados os CVs relativos à precisão do método.

4.2.1.8. Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção foi determinado pelo método da diluição progressiva, a partir de várias diluições de uma concentração inicial de 0,1 g/L. O limite de quantificação, que é a menor concentração precisamente medida, foi determinado através da escolha de uma concentração que se diferencie da linha de base e que apresente reprodutibilidade na resposta.

4.2.2. Estudo da estabilidade

4.2.2.1. Tratamento das Amostras

As amostras de sangue (*pool*) foram colocadas em dois recipientes, um contendo o anticoagulante heparina e o conservante fluoreto de sódio a 1% e no outro somente heparina. Foram realizadas análises para confirmação da ausência de etanol nas amostras doadas, em seguida foi feito o enriquecimento dessas amostras, obtendo-se concentração igual a 0,6 g/L de etanol. O *pool* de sangue foi fracionado em quatro amostras que foram armazenadas duas a 4°C (geladeira) e duas a -20°C (*freezer*). A estabilidade foi avaliada por um período de 2 meses, sendo realizadas análises no mesmo dia (tempo zero) e após 1, 3, 7, 14, 30 e 60 dias de armazenamento. As condições de conservação e armazenamento acima descritas estão apresentadas na Figura 4.

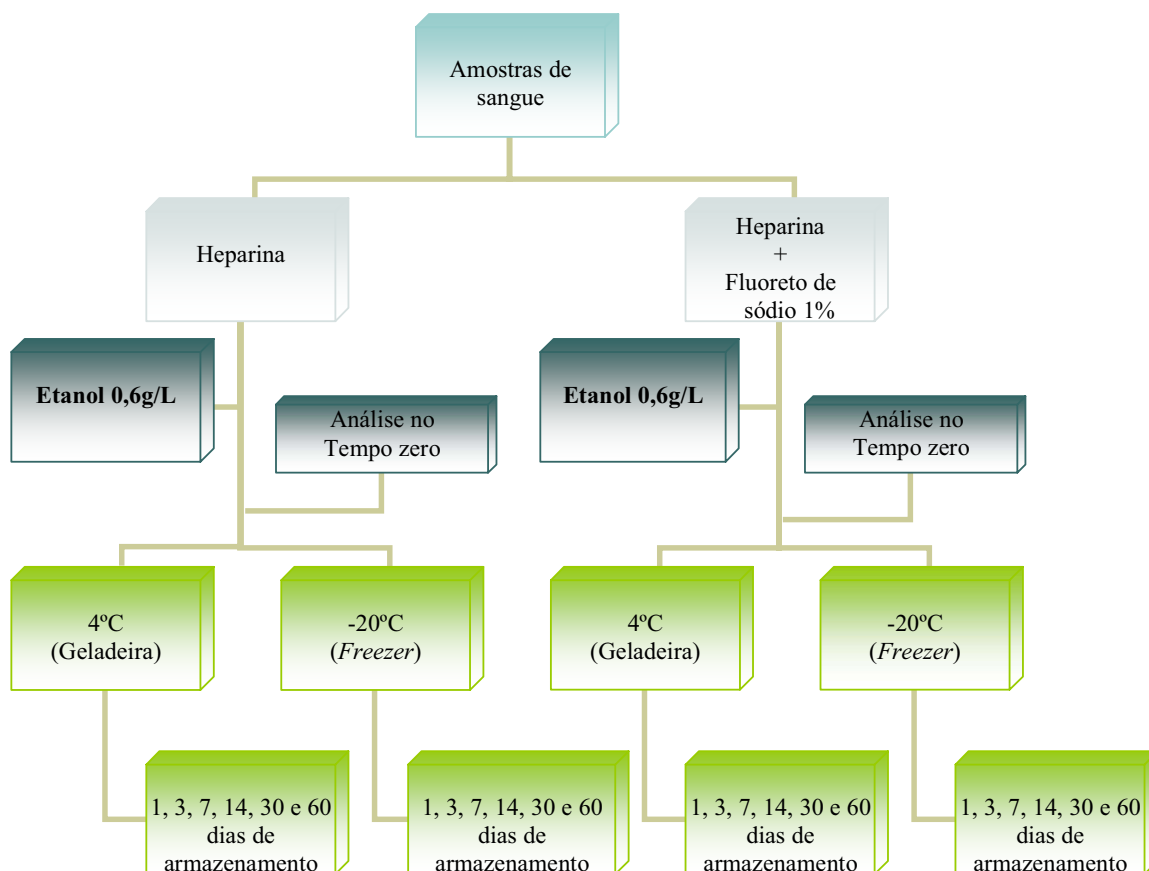


FIGURA 4 - Fluxograma do tratamento dado às amostras de sangue

4.2.2.2. Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento

Amostras de sangue sem etanol foram enriquecidas com 0,6 g/L de etanol e analisadas através do procedimento descrito no item 4.2.1.4. (estes resultados foram considerados como sendo os relativos ao tempo zero do experimento), sendo então congeladas e armazenadas em freezer a -20°C . Estas amostras foram descongeladas e alíquotas foram analisadas 1, 3, 7, 14, 30 e 60 dias após seu preparo, sendo o restante novamente congelado, e os resultados comparados com os obtidos nas análises relativas ao tempo zero.

4.2.2.3. Estabilidade após armazenamento sob refrigeração

Amostras de sangue sem etanol foram enriquecidas com 0,6 g/L de etanol e analisadas através do procedimento descrito no item 4.2.1.4. (estes resultados foram considerados como

sendo os relativos ao tempo zero do experimento de estabilidade), sendo então armazenadas sob refrigeração a 4°C. Destas amostras foram retiradas alíquotas e analisadas 1, 3, 7, 14, 30 e 60 dias após seu preparo, sendo o restante novamente refrigerado, e os resultados comparados com os obtidos nas análises relativas ao tempo zero.

4.2.2.4. Análise Estatística

A análise de variância (ANOVA) com estrutura de blocos completos casualizados foi aplicada aos resultados do estudo da estabilidade para saber se existe diferença significativa entre os grupos e com isso avaliar possíveis correlações existentes entre os parâmetros avaliados, sendo utilizado o programa STATISTICA versão 6.0.

O Teste de Hipóteses foi conduzido a fim de comparar as alterações na concentração de etanol adicionado às amostras de sangue nas condições de armazenamento e tempos estipulados. Foram testadas as hipóteses de que as concentrações não sofreram variação significativa (H_0) com o tempo e também a hipótese de que as concentrações sofreram variação significativa (H_1). Sendo regra de decisão utilizada para aceitar ou rejeitar uma hipótese estatística com base nos níveis descritivos (valores de p) dos elementos amostrais ao nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação do procedimento analítico

5.1.1. Otimização dos parâmetros cromatográficos

As condições cromatográficas estabelecidas para a análise do etanol foram as seguintes:

- Temperatura:
 - coluna: 50°C (modo de operação isotérmico)
 - injetor: 150°C
 - detector: 250°C
- Fluxo da coluna: 2 mL/min
- Gases: hidrogênio, hélio (gás de arraste), nitrogênio e ar sintético
- Modo de Injeção: Split
- Razão de split: 1:25
- Tempo de corrida: 12 minutos
- Coluna: CP-WAX 57 (50 m x 0,25 mm I.D.)

5.1.2. Avaliação da especificidade da técnica

Nas condições padronizadas, o etanol foi separado do acetaldeído, acetona, metanol, t-butanol e isopropanol. A Figura 5 mostra o perfil cromatográfico de uma amostra de sangue adicionada de tais substâncias voláteis. A Tabela 4 apresenta os tempos de retenção relativos dos picos cromatográficos destas substâncias na coluna CP-WAX.

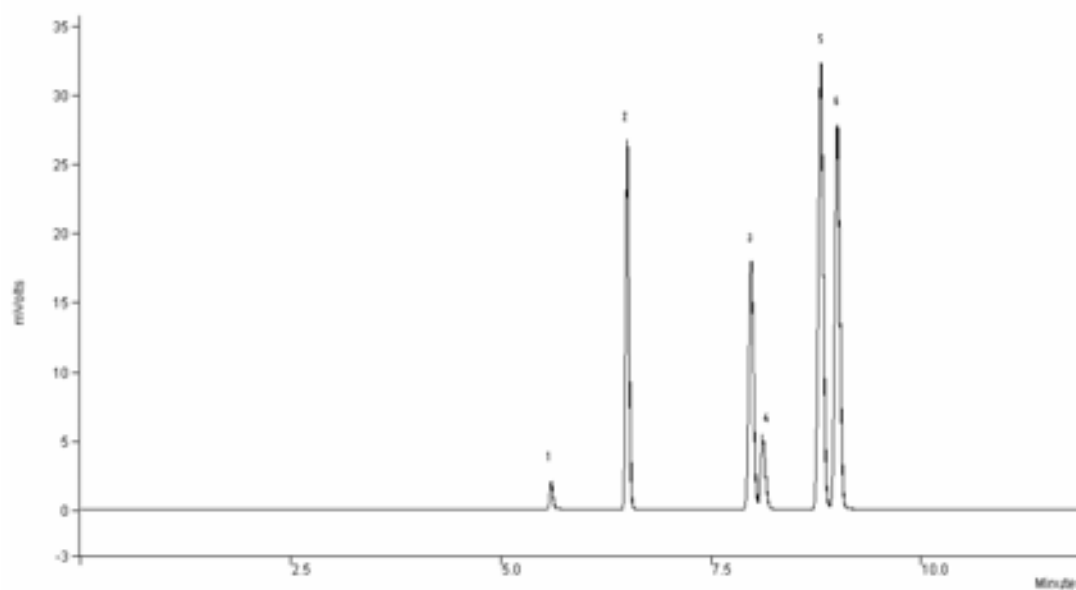


FIGURA 5 – Perfil cromatográfico de vapores de uma amostra de sangue adicionada de (1) acetaldeído, (2) acetona, (3) metanol, (4) t-butanol, (5) isopropanol e (6) etanol.

TABELA 4 – Tempo de retenção com os respectivos desvios padrão e tempo de retenção relativo ao t-butanol (PI) de algumas substâncias voláteis, nas condições cromatográficas padronizadas.

<i>Ordem de eluição</i>	<i>Substância</i>	<i>Tempo de retenção</i> $\pm DP (min)^*$	<i>Tempo de retenção</i> <i>relativo</i>
1	Acetaldeído	$5,60 \pm 0,0115$	0,68
2	Acetona	$6,50 \pm 0,0159$	0,79
3	Metanol	$8,00 \pm 0,0216$	0,98
4	t-butanol	$8,20 \pm 0,0809$	1
5	Isopropanol	$8,91 \pm 0,0948$	1,09
6	Etanol	$9,11 \pm 0,0259$	1,11

* Média de 10 determinações

5.1.3. Estudo de linearidade

Ficou demonstrado que houve uma relação linearmente proporcional entre o sinal gerado pelo equipamento e os teores de etanol nos vapores das soluções, na faixa de concentração de 0,01 a 3,2 g/L. A equação de regressão linear e o quadrado do coeficiente de correlação obtidos foram: $y = 0,8051x + 0,6196$; $r^2 = 0,9989$ e pode se visualizado graficamente na Figura 6.

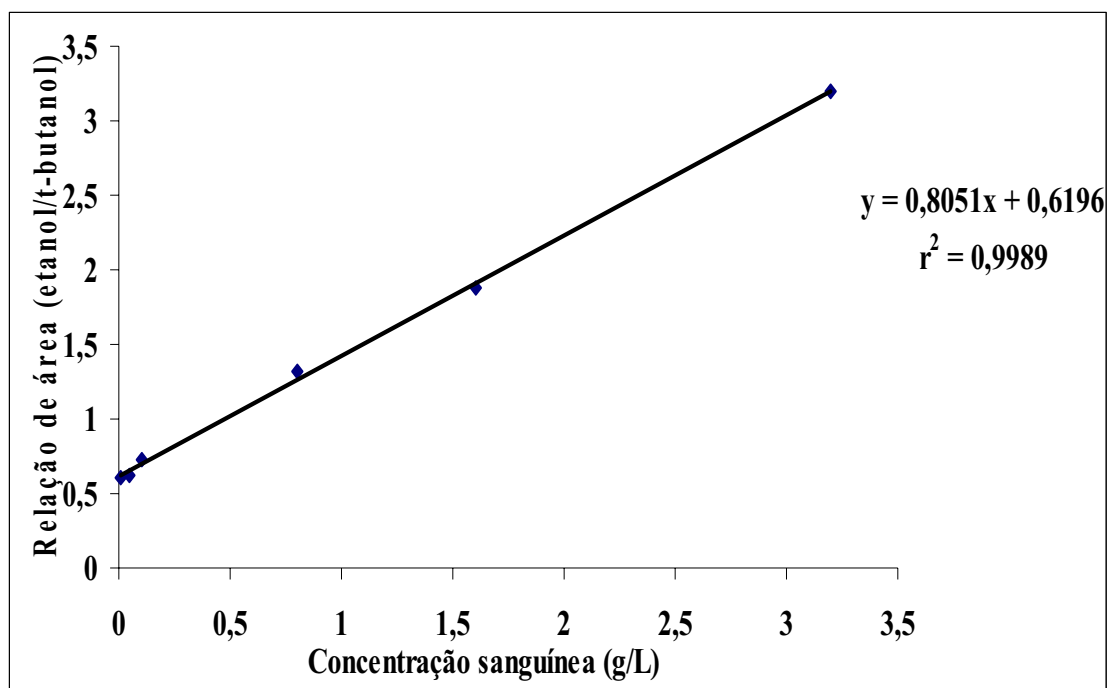


FIGURA 6 – Representação gráfica da linearidade entre concentração de etanol e relação de área de picos cromatográficos.

5.1.4. Separação por *head space* e cromatografia em fase gasosa

Na Figura 7 está apresentado um cromatograma obtido através da análise de uma amostra de sangue adicionada com etanol na concentração de 0,6 g/L e t-butanol 0,3 g/L submetida ao método proposto.

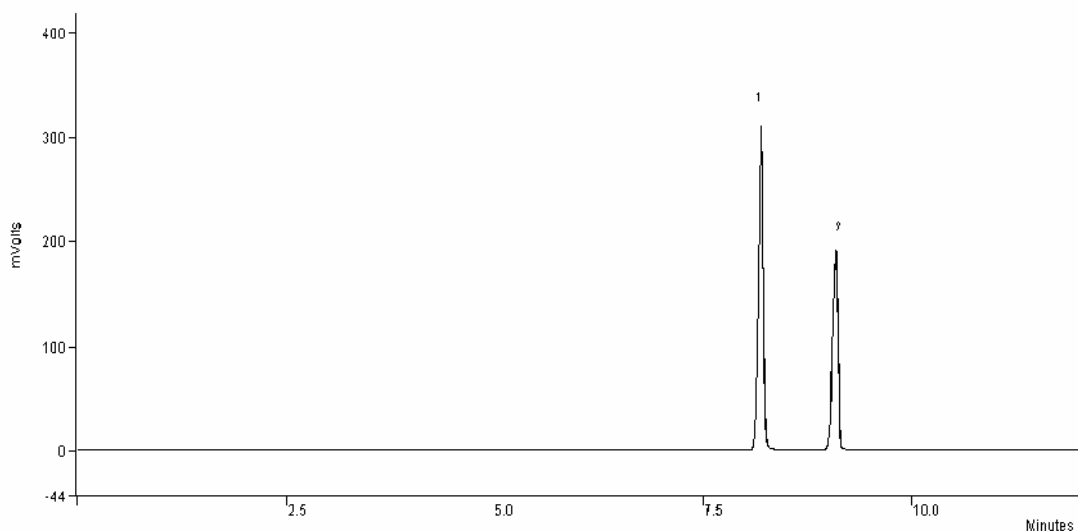


FIGURA 7 – Cromatograma obtido com a análise por *head space* e CG/FID de sangue adicionado com etanol na concentração de 0,6 g/L e t-butanol 0,3 g/L. (1) t-butanol e (2) etanol.

5.1.5. Curva de calibração

As relações entre concentração do etanol nas amostras de sangue e a razão entre as áreas dos picos cromatográficos (etanol/t-butanol) estão representadas na Tabela 5. A partir destes valores foi obtida a seguinte equação de reta: $y = 0,7542x + 0,6545$, $r^2 = 0,9961$. A representação gráfica da curva de calibração é mostrada na Figura 8.

TABELA 5 – Relação entre as concentrações sanguíneas de etanol e as razões entre as áreas dos picos cromatográficos (etanol/ t-butanol).

<i>Concentração Sanguínea (g/L)</i>	<i>Razão entre áreas* (etanol/ t-butanol)</i>
0,05	0,62
0,1	0,73
0,8	1,31
1,6	1,93
3,2	3,02

* Média de triplicata

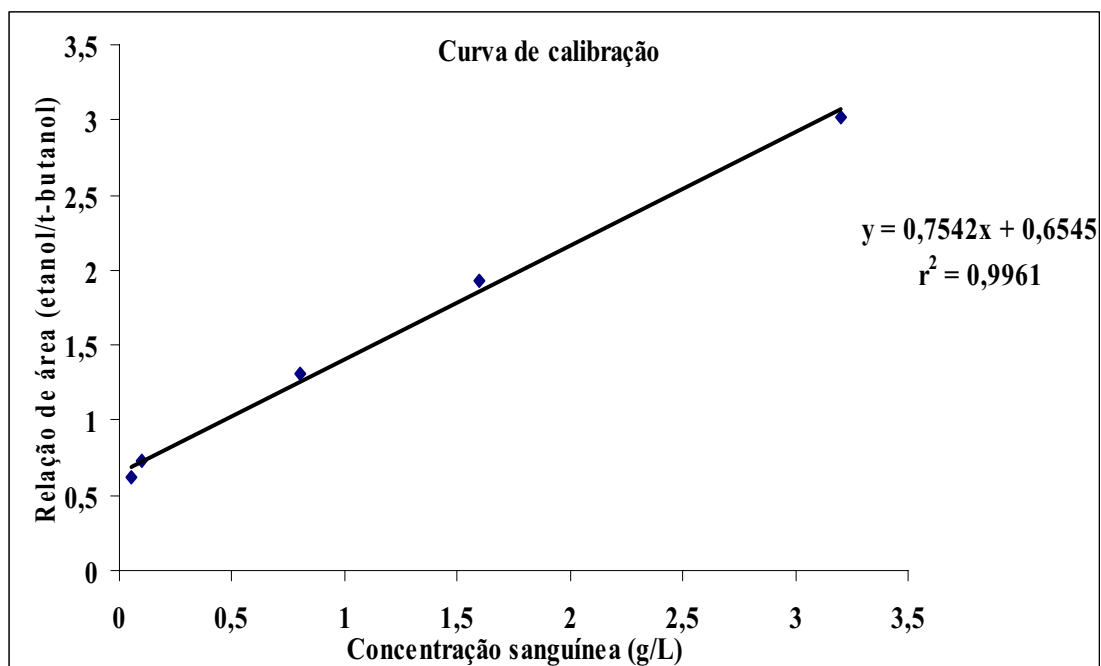


FIGURA 8 – Representação gráfica da curva de calibração para determinação da concentração de etanol em amostras de sangue.

5.1.6. Recuperação do método

Na tabela 6 são apresentados os valores (%) de recuperação do etanol no sangue em relação à quantidade de etanol adicionada, empregando-se as condições cromatográficas e o procedimento descrito no item 4.2.1.6.

TABELA 6 - Valores de recuperação obtidos com a aplicação do método proposto em amostras de sangue adicionadas de etanol.

<i>Concentração adicionada (g/L)</i>	<i>Recuperação % (média* ± DP)</i>
0,05	97,84 ± 4,95
0,80	106,9 ± 5,59
3,20	95,89 ± 4,95

* Média de cinco replicatas

5.1.7. Avaliação da precisão do método

Os coeficientes de variação obtidos nas análises de alíquotas de sangue adicionadas de etanol, como descrito em 4.2.2.3., estão expressos nas Tabelas 7 e 8.

TABELA 7 – Coeficiente de variação intraensaios das concentrações sanguíneas de etanol em amostras adicionadas

<i>Concentração (g/L)</i>	<i>n</i>	<i>x</i>	<i>DP</i>	<i>CV%</i>
0,05	3	0,05	0,0028	5,82
0,80	3	0,87	0,0631	7,28
3,20	3	2,96	0,1805	6,09

n = número de amostras analisadas

x = média das relações de área EtOH/t-BUT

DP = desvio padrão

CV = coeficiente de variação

TABELA 8 – Coeficiente de variação interensaios das concentrações sanguíneas de etanol em amostras adicionadas

<i>Concentração (g/L)</i>	<i>n</i>	<i>x</i>	<i>DP</i>	<i>CV%</i>
0,05	3	0,05	0,0038	7,28
0,80	3	0,78	0,0438	5,62
3,20	3	3,04	0,2057	6,76

n = número de amostras analisadas

x = média das relações de área EtOH/t-BUT

DP = desvio padrão

CV = coeficiente de variação

5.1.8. Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção e o limite de quantificação do método proposto para a análise de etanol no sangue foi de 0,01 g/L, apresentando coeficiente de variação de 2,48%, média de 0,0121 e desvio padrão de 0,0003, para dez replicatas.

5.2. Estudo da Estabilidade

5.2.1. Concentrações de etanol no sangue

Os resultados das concentrações de etanol no estudo da estabilidade estão apresentados na Tabela 9 e na Figura 9.

TABELA 9 – Concentrações de etanol em amostras de sangue, em análises realizadas com intervalos de 1, 3, 7, 14, 30 e 60 dias, para estudo sobre estabilidade durante armazenamento.

Tempo de armazenamento (dias)	Concentração de etanol (g/L)			
	<i>Média* ± DP</i>			
	com NaF		sem NaF	
	Geladeira (4°C)	Freezer (-20°C)	Geladeira (4°C)	Freezer (-20°C)
0	0,60 ± 0,1513		0,60 ± 0,0071	
1	0,61 ± 0,0048	0,61 ± 0,0069	0,65 ± 0,0679	0,62 ± 0,0649
3	0,56 ± 0,0908	0,56 ± 0,0079	0,50 ± 0,0235	0,57 ± 0,1452
7	0,63 ± 0,0310	0,66 ± 0,0516	0,56 ± 0,0396	0,63 ± 0,0517
14	0,68 ± 0,0257	0,69 ± 0,0082	0,68 ± 0,0059	0,69 ± 0,0133
30	0,69 ± 0,0439	0,67 ± 0,0433	0,69 ± 0,0571	0,69 ± 0,0719
60	0,69 ± 0,0327	0,68 ± 0,0356	0,72 ± 0,0863	0,71 ± 0,0056

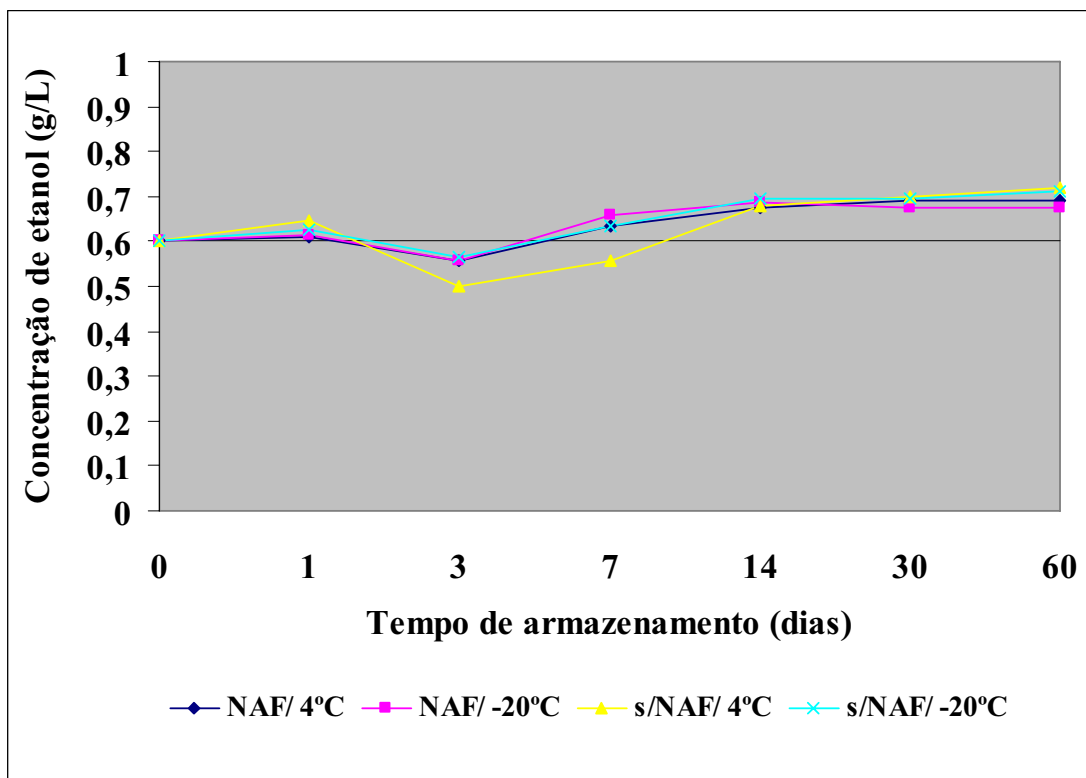


FIGURA 9 – Representação gráfica das concentrações de etanol em amostras de sangue, em análises realizadas com intervalos de 1, 3, 7, 14, 30 e 60 dias, para estudo da estabilidade durante armazenamento.

5.2.2. Estabilidade após refrigeração e ciclos de congelamento

A estabilidade do analito na matriz foi avaliada pela diferença (%) encontrada na resposta obtida nas condições de armazenamento (4°C e -20°C) e período estipulados (1, 3, 7, 14, 30 e 60 dias), comparada com a resposta obtida no tempo zero. Os resultados são apresentados na Tabela 10 e Figura 10.

As concentrações de etanol obtidas no estudo da estabilidade das amostras de sangue adicionadas de 0,6 g/L de etanol, com e sem conservante, após armazenamento a temperatura de -20°C por 1, 3, 7, 14, 30 e 60 dias de armazenamento, aplicando a análise de Variância (ANOVA) com estrutura de blocos completos casualizados para os dados emparelhados, apresentou um valor de $p = 0,279$, como esse valor foi superior a 0,05 aceita-se a hipótese H_0 , logo ao nível de significância de 5%, nenhuma diferença estatística na concentração de etanol foi observada entre as análises.

As concentrações de etanol obtidas no estudo da estabilidade das amostras de sangue adicionadas de 0,6 g/L de etanol, com e sem conservante, após armazenamento a temperatura de 4°C por 1, 3, 7, 14, 30 e 60 dias de armazenamento, aplicando a Análise de variância (ANOVA) com estrutura de blocos completos casualizados para os dados emparelhados, apresentou um valor de $p = 0,595$, como esse valor foi superior a 0,05 aceita-se a hipótese H_0 , logo ao nível de significância de 5%, nenhuma diferença estatística na concentração de etanol foi observada entre as análises.

TABELA 10 – Estudo da estabilidade do etanol em amostra de sangue adicionadas de 0,6 g/L com e sem conservante (Fluoreto de sódio – NaF) em condições de temperatura a 4°C e a -20°C em períodos de 1, 3, 7, 14, 30 e 60 dias.

<i>Diferença (%)</i>				
Tempo de armazenamento (dias)	com NaF		sem NaF	
	Geladeira	<i>Freezer</i>	Geladeira	<i>Freezer</i>
	(4°C)	(-20°C)	(4°C)	(-20°C)
0	+ 0,46		+ 0,20	
1	+ 1,2	+ 1,53	+ 7,52	+ 3,8
3	- 7,4	- 7,5	- 17,15	- 5,7
7	+ 5,3	+ 9,01	- 7,5	+ 5,3
14	+ 12,2	+ 14,0	+ 13,0	+ 15,5
30	+ 14,7	+ 12,0	+ 16,3	+ 15,6
60	+ 15,0	+ 12,3	+ 19,5	+ 18,2

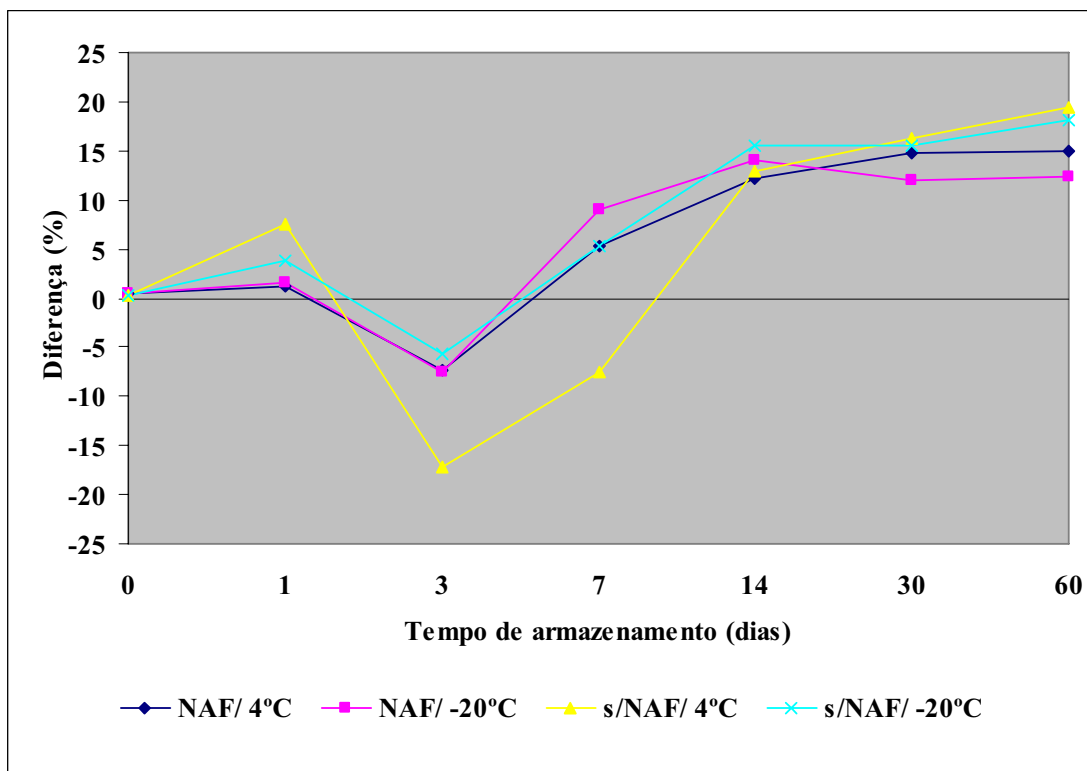


FIGURA 10 – Representação gráfica do estudo da estabilidade do etanol em amostra de sangue adicionadas de 0,6 g/L com e sem conservante (Fluoreto de sódio – NaF) em condições de temperatura a 4°C e a -20°C em períodos de 1, 3, 7, 14, 30 e 60 dias.

6. DISCUSSÃO

A relevância deste trabalho reside no fato de que, conforme mostrado na literatura, existe o interesse forense na verificação do uso do etanol, bem como nos casos de exame toxicológico em motoristas suspeitos de dirigirem sob o efeito do álcool, especialmente com o aumento do rigor na Lei de Trânsito Brasileira.

Visando cumprir os objetivos do trabalho, foi utilizado o método de cromatografia em fase gasosa com separação por *head space* para verificar a concentração de etanol nas amostras de sangue, uma vez que é uma técnica muito utilizada com esta finalidade nas diversas áreas da Toxicologia, além de ser um procedimento analítico bastante simples, rápido, apresentando sensibilidade e precisão adequadas (CORRÊA, 1997, LIMA; MÍDIO, 1997, YONAMINE et al., 2003, VENTORIN, 2004, ZIAVROU et al., 2005).

Um grande problema existente na análise quantitativa por *head space* é o efeito de matriz. A composição da amostra influencia a concentração do analito na fase gasosa, e conseqüentemente a exatidão dos resultados. Para compensar este efeito e obter resultados mais exatos, faz-se necessário o uso de padrões internos para a calibração (CORRÊA, 1997). A utilização de padrão interno, substância que apresenta similaridade estrutural e físico-química aos analitos de interesse, pode minimizar os erros provenientes de perdas que eventualmente ocorram durante o procedimento de extração, e que podem acarretar grande variação na quantificação dos analitos (COSTA, 2004). A adição de um sal à matriz biológica no procedimento de separação tem sido frequentemente utilizada para aumentar o coeficiente de volatilização dos compostos em solução e, portanto a concentração na fase de vapor (COSTA, 2004). Nesta técnica chamada de *salting out*, a solubilidade dos voláteis na fase líquida é reduzida. O sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) é utilizado como agente *salting out* por aumentar a recuperação de todos os compostos em água e sangue (CORRÊA, 1997, YONAMINE et al., 2003).

Tagliaro et al. (1992) sugerem o n-propanol e o t-butanol como padrão interno em cromatografia. Outros trabalhos e laboratórios forenses preferem o t-butanol ao n-propanol como padrão interno para análise de etanol por cromatografia em fase gasosa, devido à produção do n-propanol durante a decomposição *post mortem* (O'NEAL; POKLIS, 1995, PAVLIC et al., 2007). O t-butanol foi utilizado como padrão interno por ser uma substância similar ao etanol, com tempo de retenção próximo e que geralmente não faz parte da amostra

analisada. A concentração de 0,3 g/L apresenta altura do pico cromatográfico equivalente àquela obtida para a concentração intermediária de etanol na curva de calibração.

A determinação das condições cromatográficas para separação e identificação do etanol e dos possíveis interferentes demandou tempo e perseverança, uma vez que esta análise possui algumas peculiaridades comuns à técnica de cromatografia em fase gasosa. Condições semelhantes foram utilizadas por Wasfi et al. (2004) e Lewis et al. (2004). O etanol e o t-butanol (padrão interno), nas condições padronizadas eluíram no tempo máximo de 12 minutos, apresentando tempo de retenção para o etanol de $9,107 \pm 0,0259$ (Figura 7) e para o t-butanol (padrão interno) de $8,170 \pm 0,0809$ minutos (Figura 7). O t-butanol foi utilizado como padrão interno porque foi separado adequadamente do etanol, apresentou tempo de retenção próximo e geralmente não faz parte da amostra analisada, este mesmo padrão interno foi utilizado por O'Neal; Poklis (1996) e Pavlic et al. (2007).

A especificidade é definida como a capacidade do método analítico em detectar os analitos de interesse presentes em uma amostra na presença dos demais componentes inerentes à matriz biológica (CHASIN; CHASIN; SALVADORI, 1994, BRITO et al., 2003, COSTA, 2004). O acetaldeído, acetona, metanol e isopropanol, são potenciais interferentes na determinação de etanol. O primeiro é proveniente da biotransformação do etanol, a acetona pode estar presente em sangue de indivíduos intolerantes à glicose (CORRÊA, 1997), o metanol pode ser usado em bebidas alcoólicas como adulterante e o isopropanol é um solvente farmacêutico bastante utilizado (TARGIARO et al., 1992, CORRÊA, 1997). O método empregado foi capaz de separar esses potenciais interferentes, ou seja, nenhum co-eluiu com o etanol, conforme observado na Tabela 4 e na Figura 5.

A linearidade expressa a resposta do aparelho em função da concentração do analito. Em termos práticos, a linearidade é limitada a uma faixa determinada, ou seja, faixa de trabalho, que corresponde à curva de calibração utilizada para a quantificação das amostras (PORTARI, 2006). A linearidade, definida como a capacidade do método gerar resultados proporcionais da espécie em estudo, foi avaliada através do quadrado do coeficiente de correlação (r^2) da curva (CHASIN; CHASIN; SALVADORI, 1994). A técnica mostrou-se linear no intervalo de concentração de 0,01 a 3,2 g/L ($y = 0,8051x + 0,6196$; $r^2 = 0,9989$) (Figura 6), que constitui uma faixa que abrange desde exposição leve a casos de intoxicação. Os dados apresentaram-se satisfatórios e semelhantes aos de Spinosa de Martinis e Martin (2002) com $r = 0,9983$ na faixa de 0,01 a 10 g/L, Zilly et al. (2003) com $r = 0,999$ na faixa de

0,025 a 0,5 g/L e Wasfi et al. (2004) com $r = 0,9994$ na faixa de concentração de 0,05 a 2,0 g/L.

A curva de calibração apresentou a seguinte equação da reta: $y = 0,7542x + 0,6545$, com o quadrado do coeficiente de correlação linear igual a 0,9961 (Tabela 5 e Figura 8), isto representa que a resposta instrumental y está linearmente relacionada com a concentração do padrão x . Para tanto julga-se satisfatória a linearidade do gráfico, pois a correlação da reta obtida foi classificada como fortíssima ($0,91 < R < 0,99$) (BRITO et al., 2003).

A exatidão do método foi avaliada pela recuperação do etanol em amostras de sangue adicionadas de etanol em três níveis de concentração, sendo cada concentração analisada em triplicata conforme recomendações da ICH e da ANVISA (AGÊNCIA, 2002, INTERNATIONAL, 2005). Os resultados obtidos foram avaliados pelo teste t de Student, o valor t obtido para cada concentração se enquadrou no intervalo estabelecido pelo valor tabelado para $n - 1$ graus de liberdade no nível de significância de 0,05, sendo o método, portanto, considerado exato.

A precisão do método foi verificada através dos coeficientes de variação (CVs), obtidos intra e inter-ensaios, nas análises de alíquotas de sangue contendo etanol. Os coeficientes de variação da precisão intraensaio e interensaio apresentaram valores de no máximo 7,3% (Tabela 6 e 7). Estes valores encontram-se dentro da faixa preconizada, que aceita uma imprecisão menor que 15%, tanto intra como inter testes (CHASIN; CHASIN; SALVADORI, 1994), bem como atende os critérios da ANVISA onde estabelece que o coeficiente de variação na determinação da precisão não deve exceder os 15% (AGÊNCIA, 2002). Dados semelhantes para precisão intra e inter ensaio em torno de 8% foram obtidos por Zilly et al. (2003) ao analisarem amostras de urina.

Os limites de detecção e quantificação são parâmetros que permitem distinguir ruídos do sistema de sinais gerados pela presença do analito nos níveis inferiores da linearidade (PORTARI, 2006). O limite de quantificação de 0,01 g/L obtido representa um valor suficientemente adequado para o propósito do trabalho, que é a quantificação de etanol em amostras de sangue negativas enriquecidas com etanol 0,6 g/L após certo período de armazenamento; um valor bastante baixo do ponto de vista toxicológico, visto que no Brasil a máxima concentração permitida por Lei, para condutores de veículos, é de 0,2 g/L, em casos especiais. Dados da literatura relatam valores que vão de 0,025 mg/L a 10 mg/L para o limite de detecção e, 0,08 mg/L a 0,25 mg/L para o limite de quantificação (PORTARI, 2006). Tais diferenças estão provavelmente relacionadas ao equipamento utilizado. No entanto, como

salientam Zilly et al. (2003) e Wasfi et al. (2004) esses valores são suficientemente aceitáveis para dosagens de etanol em amostras clínicas ou forenses.

O estudo de estabilidade é necessário para que se possa afirmar que a concentração do analito determinada na amostra corresponde ao valor presente na matriz biológica na hora da coleta e/ou óbito, sendo de fundamental importância em toxicologia forense, sem o qual as inferências não são possíveis. Pode-se considerar que os analitos são estáveis no material biológico se sua concentração não diferir em mais de 20% do valor determinado no tempo zero do estudo de estabilidade segundo Costa (2004) e Yonamine (2004). Este critério pode perfeitamente ser aplicado ao nosso estudo. O estudo da estabilidade do etanol em amostras de sangue demonstrou uma diferença na concentração de etanol adicionado menor que 20% na resposta obtida, comparada com a resposta no tempo zero, na condição de temperatura a -20°C e a 4°C, com e sem o conservante fluoreto de sódio 1%, no período de até 60 dias de armazenamento, sendo as análises realizadas com 1, 3, 7, 14, 30 e 60 dias (Tabela 10 e Figura 10). Dados da literatura também relatam variações menores que 20% entre os valores da concentração de etanol (WINEK et al., 1996, CORRÊA, 1997). Aplicando-se a Análise de variância aos valores do estudo da estabilidade apresentados na Tabela 10 e visualizados graficamente na Figura 10, não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa na concentração de etanol entre as análises, ao nível de 5%, estando de acordo com os resultados obtidos por Corrêa (1997).

Os resultados obtidos com a avaliação do método de cromatografia em fase gasosa para análise de etanol em amostras de sangue e o estudo da estabilidade do etanol nessas amostras reforçam a confiabilidade desse método nas condições estipuladas.

7. CONCLUSÕES

- O método analítico apresentou-se específico, não havendo interferência de outras substâncias, sensível, preciso e com recuperação adequada. Após a validação do procedimento analítico, o método demonstrou ser rápido, prático e eficiente, atendendo satisfatoriamente aos objetivos desse trabalho.
- O estudo da estabilidade do etanol em amostras de sangue nas condições e períodos estipulados não demonstrou diferença estatística na concentração de etanol entre as análises.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução n. 475, de 19 de março de 2002. **Diário Oficial**, 20 mar. 2002. Disponível em: <www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 10 out., 2008.

A LEI da tolerância (quase) zero. **Veja**, São Paulo, ano 41, n. 26, p. 53, 02 jul. 2008.

ANDRADE, A. G.; CRUZ, M. S. Alcoolismo: recursos terapêuticos e agentes farmacológicos promissores. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 54, p. 270-276, 2005.

AUGSBURGER, M.; RIVIER, L. Drugs and alcohol among suspected impaired drivers in Canton de Vaud (Switzerland). **Forensic Science International**, v. 85, p. 95-104, 1996.

APPENZELLER, B. M. R.; SCHNEIDER, S.; YEGLES, M.; MAUL, A.; WENNING, R. Drug and chronic alcohol abuse in drivers. **Forensic Science International**, v. 155, p. 83-90, 2005.

BONACCORSO, N.; PERIOLI, C. Centro de Custódia. **Instituto de Criminalística do Estado de São Paulo**. São Paulo, 2001. Disponível em: <www.peritocriminal.net/artigos/custodia.htm>. Acesso em: 24 fev. 2007.

BRASIL. Secretaria de Comunicação Social da Presidência. **Relatório mostra imprudência como principal causa de acidentes de trânsito**. 2007. Disponível em: <www.brasil.gov.br/noticias/em_questao/eq560a>. Acesso em: 27 jul. 2007.

BRASIL. Ministério das cidades. Departamento Nacional de Trânsito (DENATRAN). **Alterações na legislação de trânsito sobre álcool e direção**. 2008. Disponível em: <www.denatran.gov.br/ultimas/20080626_alcool_direcao.htm>. Acesso em: 28 jun. 2008.

BROWN, G. A.; NEYLAN, D. The stability of ethanol in stored blood. Part I: Important variables and interpretation of results. **Analytica Chimica Acta**, v. 66, p. 271-283, 1976.

BRITO, N. M.; AMARANTE JUNIOR, O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: Estratégia e discussão. Pesticidas: **Revista Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 13, p. 129-130, 2003.

BRUCKNER, J. V.; WARREN, D. A. Toxic effects of solvents and vapors. In: KLAASSEN, C. D. **Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons**. 6 ed. United States: McGraw-Hill, 2001. p. 869-916.

CARMEN DEL RIO, M.; GÓMEZ, J.; SANCHO, M.; ALVAREZ, F. J. Alcohol, illicit drugs and medicinal drugs in fatally injured drivers in Spain between 1991 and 2000. **Forensic Science International**, v. 127, p. 63-70, 2002.

CHANG, J.; KOLLMAN, S. E. The effect of temperature on the formation of ethanol by *Candida albicans* in blood. **Journal of Forensic Sciences**, v. 34, p. 105-109, 1989.

CHASIN, A. A. M.; CHASIN, M.; SALVADORI, M. Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas. **Rev. Farm. Bioquímica Univ. São Paulo**, São Paulo, v. 30, p. 49-53, 1994.

COLASANTI, B. K.; MARTIN, B. Abuso de Drogas. In: CRIG, C. R.; STITZEL, R.E. **Farmacologia Moderna**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994, p. 413-425.

CORRÊA, C. L. **Validação da urina para análise toxicológica de etanol em “Programas de controle e prevenção do uso de álcool no local de trabalho”**. 1997. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

CORRÊA, C. L.; PEDROSO, R. C. Headspace gas chromatography with capillary column for urine alcohol determination. **Journal of Chromatography B**, v. 704, p. 365-368, 1997.

COSTA, J. L. **Determinação de 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA - Ecstasy), 3,4-metilenodioxietilanfetamina (MDEA - Eve) e 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA) em fluidos biológicos por cromatografia líquida de alta eficiência: aspecto forense**. 2004. 121 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

DEPARTAMENTO NACIONAL DE TRÂNSITO (DENATRAN). Ministério das cidades. **Alterações na legislação de trânsito sobre álcool e direção**. Disponível em: <www.denatran.gov.br/ultimas/20080626_alcool_direcao.htm>. Acesso em: 28 jun. 2008.

FLEMING, M.; MIHIC, S. J.; HARRIS, R. A. Etanol. In: GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003. p. 325-337.

FRANÇA, G. V. Embriaguez Alcoólica. In: _____. **Medicina Legal**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 273-280.

GALVÃO, L. C. C. **Estudos médico-legais**. Porto Alegre: Sagra Luzzatto, 1996. 356 p.

GOBATO, E. A. A. F.; LANÇAS, F. M. Comparação entre injeção na coluna (“on-column”) e headspace dinâmico na determinação de Benzeno, Tolueno e Xilenos (BTX) em amostras de água. **Química Nova**, v. 24, p. 176-179, 2001.

GURDER, W. G. Preanalytical factors and their influence on analytical quality specifications. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 59, p. 545 – 549, 1999.

HUNT, W. A. Etanol e outros Álcoois Alifáticos. In: CRIG, C. R.; STITZEL, R.E. **Farmacologia Moderna**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. p. 407-412.

INABA, B.S.; COHEN, W. Drogas: estimulantes, depressores, alucinógenos - efeitos físicos e mentais das drogas psicoativas. Rio de Janeiro: Jorge Zahar, 1991.

INTERNATIONAL CONFERENCE FOR HARMONISATION. Expert Technical Working Group. **ICH Harmonised Tripartite Guideline**: validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). [s.l.], 2005. Disponível em: <www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>. Acesso em: 10 out., 2008.

JONES, A. W.; HYLEN, L.; SVENSSON, E.; HELANDER, A. Storage of specimens at 4 degrees or addition of sodium fluoride (1%) prevents formation of ethanol in urine inoculated with *Candida albicans*. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 23, p. 333-336, 1999.

JONES, A. W. Salting-out effect of sodium fluoride and its influence on the analysis of ethanol by headspace gas chromatography. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 18, p. 292-293, 1994.

JIMÈNEZ, C.; VENTURA, R.; SEGURA, J.; DE LA TORRE, R. Protocols for stability and homogeneity studies of drugs for its application to doping control. **Analytica Chimica Acta** v. 515, p. 323–331, 2004.

KOLB, B. Headspace sampling with capillary columns. **Journal of Chromatography A**, v. 842, p. 163-205, 1999.

KRISTOFFERSEN, L.; STORMYHR, L. E.; KIELLAND, A. S. Headspace gas chromatographic determination of ethanol: The use of factorial design to study effect of blood storage and headspace conditions on ethanol stability and acetaldehyde formation in whole blood and plasma. **Forensic Science International**, v. 161, p. 151-157, 2006.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia em Fase Gasosa**, São Carlos-SP: Acta, 1993. 254 p.

LARINI, L.; SALGADO, P. E. T. Compostos voláteis. In: _____. **Toxicologia**. 2.ed. São Paulo: Manole, 1993. p. 69-78.

LEIKIN, J. B.; WATSON, W. A. Post-mortem Toxicology: What the dead can and cannot tell us. **Journal of Toxicology – Clinical Toxicology**, v. 41, p. 47-56, 2003.

LEWIS, R. J.; JOHNSON, R. D.; ANGIER, M. K.; VU, N. T. Ethanol formation in unadulterated postmortem tissues. **Forensic Science International**, v. 146, p. 17-24, 2004.

LIMA, I. V.; MÍDIO, A. F. Validação de um método cromatográfico em fase gasosa – head space para determinação de álcool etílico em fluidos biológicos de interesse forense. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 10, p. 21-27, 1997.

LIMA, I. V.; MÍDIO, A. F. Origin of blood ethanol in decomposed bodies. **Forensic Science International**, v. 106, p. 157-162, 1999.

LIVROS INTERATIVOS. Universidade de Caxias do Sul. **Metabolismo do etanol**. 2004. Disponível em: <www.ucs.br/ccet/defq/naeq/material_didatico/textos_interativos_06.htm>. Acesso em: 10 jun. 2007.

LONGENECKER, G. L. Drogas: ações e reações. São Paulo: Market Books, 2002. 121 p.

LOGAN, B. K.; SCHWILKE, E. W. Drug and alcohol use in fatally injured drivers in Washington State. **Journal of Forensic Science**, v. 41, p. 505-510, 1996.

LOUGH, P. S.; FEHN R. Efficacy of 1-percent sodium-fluoride as a preservative in urine samples containing glucose and *Candida albicans*. **Journal of Forensic Science**, v. 38, p. 266-271, 1993.

LUIS, M. A. V.; LUNETTA, A. C. F. Álcool e outras drogas: levantamento preliminar sobre a pesquisa produzida no Brasil pela enfermagem. **Revista Latino-americana de Enfermagem**, v. 13, p. 1219-1230, 2005.

MELQUIADES, R. A.; LOBO, I.; GUEDES, C. L. B.; PINTO, J. P. Análise de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos em solos por *headspace* e cromatografia gasosa/detector de ionização de chama. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 27, p. 113-120, 2006.

MENDHAM, J.; DENNEY, R. C.; BARNES, J. D.; THOMAS, M. J. Cromatografia com fase gasosa. In: _____. **Análise Química Quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002. p. 160-173.

MOELLER, M. R.; KRAEMER, T. Drugs of Abuse Monitoring in Blood for Control of Driving Under the Influence of Drugs. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 24, p. 210-221, 2002.

MUSSHOFF, F. C. Chromatographic methods for the determination of markers of chronic and acute alcohol consumption. **Journal of Chromatography B**, v. 781, p. 457-480, 2002.

O'NEAL, C. L. M. F. S.; POKLIS, A. Postmortem production of ethanol and factors that influence interpretation: A Critical Review. **American Journal of Forensic Medicine & Pathology**, v. 17, p. 8-20, 1996.

PAVLIC, M.; GRUBWIESER, P.; LIBISELLER, K.; RABL, W. Elimination rates of breath alcohol. **Forensic Science International**, v. 171, p. 16-21, 2007.

PEREIRA, E. L. A.; OLIVEIRA, I. R. Farmacologia do álcool etílico. Tratamento Farmacológico do Alcoolismo. In: SILVA, PENILDON. **Farmacologia**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 313-319.

PELLEGRINNO, S.; BRUNO, F. S.; PETRARULO, M. Liquid chromatographic determination of ethyl alcohol in body fluids. **Journal of Chromatography B**, v. 729, p. 103-110, 1999.

PORTARI, G. V. **Infusão de glicose e tiamina em ratos tratados com dose aguda de etanol**. 2006, 101 f. Dissertação (Mestrado na Área de investigação biomédica aplicada à clínica médica) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

RANGEL, R. Toxicologia Forense. In:_____. **Noções Gerais sobre outras Ciências Forenses**, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto - Medicina Legal – 2003/2004. p. 1-19.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. Dependência e abuso de drogas. In:_____. **Farmacologia**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 506-531.

RALL, T. W. Hipnóticos e Sedativos; Etanol. In: GOODMAN e GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 228-252.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

SANTIAGO, F. E.; RÊGO, T. C. E. D. **Alcoolemia em vítimas fatais de acidente de trânsito no Rio Grande do Norte no período de junho a novembro de 2003**. 2003. 74 f. (Monografia para conclusão do curso de Farmácia) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2003.

SCIVOLETTO, S.; MALBERGIER, A. Etanol. In: OGA, SEIZI. **Fundamentos de Toxicologia**. 2.ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2003. p. 272-285.

SKOOG, D.A.; HOOLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de análise instrumental**. 5.ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836 p.

SKOPP, G. Preanalytic aspects in postmortem toxicology. **Forensic Science International**, v. 142, p. 70-100, 2004.

SMALLDON, K. W.; BROWN, G. A. The stability of ethanol in stored blood. Part II. The mechanism of ethanol oxidation. **Analytica Chimica Acta**, v. 66, p. 285-290, 1973.

SNOW, N. H.; SLACK, G. C. Head-space analysis in modern gas chromatography. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 21, p. 608-617, 2002.

SPINOSA DE MARTINIS, B.; MARTIN, C. C. S. Automated headspace solid-phase microextraction and capillary gas chromatography analysis of ethanol in postmortem specimens. **Forensic Science International**, v. 128, p.115-119, 2002.

SPINOSA DE MARTINIS, B. et al. Determination of ethanol in human blood and urine by automated headspace solid-phase microextraction and capillary gas chromatography. **Forensic Science International**, v. 152, p. 163-168, 2004.

SPINOSA DE MARTINIS, B.; DE PAULA, C. M. C.; BRAGA, A.; MOREIRA, H. T.; MARTIN, C. C. S. Alcohol distribution in different postmortem body fluids. **Human & Experimental Toxicology**, v. 25, p. 93-97, 2006.

STRASSNIG, S.; LANKMAYR, E. P. Elimination of matrix effects for static headspace analysis of ethanol. **Journal of Chromatography A**, v. 849, p. 629-636, May 1999.

SULKOWSKI, H. A.; AHB, W. U.; MCCARTER, Y. S. In-vitro production of ethanol in urine by fermentation. **Journal of Forensic Sciences**, v. 40, p. 990-993, 1995.

TAGLIARO, F.; LUBLI, G.; GHIELMI, S.; FRANCHI, D.; MARIGO, M. Chromatographic methods for blood alcohol determination. **Journal of Chromatography: Biomedical Applications**, v. 580, p. 161-190, 1992.

VASILAIDES, J.; FORD, K. Stability of ethanol in blood and urine. **Toxicology and Clin/Chem Labs**. Inc., Omaha, NE 68132, USA. 2001. Disponível em: <www.tiaft.org/tiaft2001/poster/p15.doc>, acesso em 10 jul. 2007.

VENTORIN, M. V. P. **Relação entre a dosagem de etanol no sangue e na saliva**. 2004. 85 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia Legal e Deontologia) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2004.

VIALA-ARTIGUES, J.; MECHETTI, C. Histoire de l'alcool archéologie partie 1. 2003. Disponível em: <www.alcoologie.org/documentation/article.php?id_article=118>, acesso em 19 jul. 2008.

VILAS BOAS, M. A. G. C. **Farmacologia**. Alfenas-MG: Centro Universitário Federal (CEUFE). 2004

WASFI, I. A. et al. Rapid and sensitive static headspace gas chromatography-mass spectrometry method for the analysis of ethanol and abused inhalants in blood. **Journal of Chromatography B**, v. 799, p. 331-336, 2004.

WINEK, T.; WINEK, C. L.; WAHBA, W. W. The effect of storage at various temperatures on blood alcohol concentration. **Forensic Science International**, Pittsburgh, v. 78, p. 179-185, 1995.

YAJIMA, D.; MOTANI, H.; KAMEI, K.; SATO, Y.; HAYAKAWA, M.; IWASE, H. Ethanol production by *Candida albicans*. in postmortem human blood samples: effects of blood glucose level and dilution. **Forensic Science International**, v. 164, p. 116-121, 2006.

YONAMINE, M. **Saliva como espécime biológico para monitorar o uso de álcool, anfetamina, metanfetamina, cocaína e maconha por motoristas profissionais**. 2004. 126 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

YONAMINE, M.; TAWIL, N.; MOREAU, R. L. M.; SILVA, O. A. Solid-phase micro-extraction-gas chromatography-mass spectrometry and headspace-gas chromatography of tetrahydrocannabinol, amphetamine, methamphetamine, cocaine and ethanol in saliva samples. **Journal of Chromatography B**, v. 789, p. 73-78, 2003.

VIEIRA, E.; LICHTIG, J. Validação de métodos cromatográficos em análise de resíduos de pesticidas. **Arq.Inst.Biol.**, São Paulo, v.71, (supl.), p.1-749, 2004

ZIAVROU, K.; BOUMBA, V. A.; VOUGIOUKLAKIS, T. G. Insights into the origin of postmortem ethanol. **International Journal of Toxicology**. v. 24, p. 69-77, 2005.

ZILLY, M.; LANGMANN, P.; LENKER, U.; SATZINGER, V.; SCHIRMER, D.; KLINKER, H. Highly sensitive gas chromatographic determination of ethanol in human urine samples. **Journal of Chromatography B**, v. 798, p. 179-186, 2003.

ZUBARAN, C.; FERNANDES, J.; MARTINS, F.; SOUZA, J.; MACHADO, R.; CADORE, M. Aspectos clínicos e neuropatológicos da síndrome de Wernicke-Korsakoff. **Revista de Saúde Pública**, v. 30, n. 6, p. 602-608, 1996.

APÊNDICE

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSETIMENTO DO PROJETO DE PESQUISA N° 179/ 06-CEP/UFRN
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

1. Dados do Pesquisador Responsável

Nome: Maria de Fátima Vitória de Moura

Endereço na instituição: Av. Gal. Gustavo Cordeiro de Farias, s/n, Petrópolis - Faculdade de Farmácia/UFRN.

Contato: (84) 3205-2583 / mfvmoura@yahoo.com.br

2. Informações sobre a Pesquisa

Trata-se do Estudo da Estabilidade do Etanol em amostras de sangue, através do método de Cromatografia Gasosa, utilizando amostras (sangue) de voluntários sadios, adicionadas “in vitro” com etanol, com o objetivo de avaliar a estabilidade do etanol (álcool etílico) em amostras de sangue, levando em consideração as variáveis tipo de anticoagulante, tempo e temperatura de armazenamento e, com isso, contribuir com a sociedade dando subsídios à Justiça, para que ela julgue os diversos tipos de delitos envolvendo o consumo de álcool, com garantias de que o tratamento dado as amostras é adequado.

3. Procedimento

- 3.1. Assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;
- 3.2. Coleta de sangue de voluntários sadios;
- 3.3. Adição de etanol (0,6 g/L) aos tubos contendo o sangue doado;
- 3.4. Fracionamento das amostras em frascos de 20mL com três tipos de anticoagulantes diferentes (fluoreto de sódio, citrato de sódio e heparina).
- 3.5. Armazenamento das amostras de sangue em três diferentes condições de temperatura (temperatura ambiente, a 4°C (em geladeira) e a -20°C (em freezer)).
- 3.6. Realização da determinação da concentração de etanol nas amostras, através do método de cromatografia gasosa, realizado no Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia – UFRN.

4. Benefício da Pesquisa

Subsidiar órgãos competentes com medidas práticas e simples para o melhor resultado de suas análises.

5. Riscos ao doador

Os riscos ao doador serão mínimos, pois serão tomados os cuidados básicos de assepsia e biossegurança para coleta de sangue. Informamos ainda que a identidade dos doadores não será divulgada em hipótese alguma e os resultados das análises quando publicados não farão referência ao sujeito e sua identidade.

6. Em caso de despesas ou danos decorrentes da pesquisa, devidamente comprovados, o sujeito será ressarcido e/ou indenizado.

7. As análises serão realizadas pelas mestrandas do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas: Teresa Cristina Epifânio Diógenes Rego e Edna de Farias Santiago, no Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia - UFRN.

8. Consentimento da participação

Declaro que os responsáveis pela pesquisa informaram os riscos e benefícios do projeto de pesquisa a ser realizado, e que após ter lido e compreendido as informações contidas neste documento, autorizo a utilização da amostra de sangue na referida pesquisa, e da publicação científica dos resultados obtidos.

Assinatura do Doador



Assinatura do Pesquisador Responsável

Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-UFRN), praça do Campus Universitário, CP1666, Natal, 59.078-970, Brasil, e-mail cepufm@reitoria.ufrn.br, telefone: 84-3215-3135, página na Internet: www.etica.ufrn.br.

ANEXO

ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UFRN



MINISTÉRIO DE EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE – UFRN
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP

Parecer Consubstanciado

Protocolo nº.	179/06 CEP – UFRN
CAAE	0158.0.051.000-06
Projeto de Pesquisa	Estudo em vitro da estabilidade do etanol no sangue
Área de Conhecimento	Ciências da Saúde – Farmácia – Grupo III
Pesquisador Responsável	Maria de Fátima Vitória de Moura
Instituição Onde Será Realizado	Universidade Federal do Rio Grande do Norte - Centro de Ciências da Saúde – CCS-UFRN
Revisão Ética em	10 de novembro de 2006

RELATO

1. RESUMO

Trata-se de um Projeto de Mestrado, de grupo III, que avaliará a estabilidade do etanol em amostras de sangue, levando em consideração as variáveis: tipo de anticoagulante, tempo e temperatura de armazenamento. Utilizará sangue coletado de 10 sujeitos (5 homens e 5 mulheres) adultos, recrutados entre os alunos do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Os sujeitos não poderão ter ingerido bebida alcoólica nas 72 horas antecedentes à coleta, que será realizada por pessoal treinado. Os resultados obtidos colaborarão com a compreensão da estabilidade do etanol no sangue, o que poderá fornecer subsídios à Justiça em questões que envolvam o uso de bebidas alcoólicas. O sangue será analisado e armazenado (até o final das análises do projeto) no Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da UFRN. O orçamento prevê custo de R\$ 1.421,00 de responsabilidade dos pesquisadores. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido contempla todas as informações necessárias sobre a pesquisa e sobre os aspectos éticos.

2. ENTENDIMENTOS E RECOMENDAÇÕES

O presente Protocolo apresenta-se perfeitamente instruído do ponto de vista ético.

3. PARECER

Levando-se em consideração os entendimentos e as recomendações apresentadas neste parecer, o protocolo em questão foi considerado por este Comitê como PROTOCOLO APROVADO.

4. ORIENTAÇÕES AO PESQUISADOR

Em conformidade com a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) através do Manual Operacional para Comitês de Ética em Pesquisa (Brasília, 2002-p.65) e Resolução 196/96 – CNS o pesquisador responsável deve:

- 1 – entregar ao sujeito da pesquisa uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), na íntegra, por ele assinada (Resolução 196/96 – CNS – item IV.2d);
- 2 – desenvolver a pesquisa conforme foi delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após a análise das razões da descontinuidade pelo CEP/UFRN (Resolução 196/96 – CNS – item III.3z);

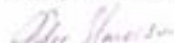
CEP-UFRN-170/06

3 – apresentar ao CEP/UFRN eventuais emendas ou extensões ao protocolo original, com justificativa (Manual Operacional para Comitês de Ética em Pesquisa – CONEP – Brasília – 2002 – p.41);

4 – apresentar ao CEP/UFRN relatório final (Manual Operacional para Comitês de Ética em Pesquisa - CONEP – Brasília – 2002 – p.42);

Os formulários para os Relatórios Parciais e Final estão disponíveis na página do CEP/UFRN (www.etica.ufrn.br).

Natal, 17 de novembro de 2006.



Dulce Almeida
Vice-Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa
Universidade Federal do Rio Grande do Norte