

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA A
DETERMINAÇÃO DE ETANOL EM FLUIDO ORAL UTILIZANDO HS-CG/EM**

Maíra Kerpel dos Santos

Porto Alegre, 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA A
DETERMINAÇÃO DE ETANOL EM FLUIDO ORAL UTILIZANDO HS-CG/EM

Dissertação apresentada por **Maíra Kerpel dos Santos** para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Pereira Limberger

Porto Alegre, 2013

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 26.04.2013, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Fabiane Moreira Farias
Universidade Federal do Pampa

Prof. Dra. Leticia Scherer Koester
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Pedro Eduardo Froehlich
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Kerpel dos Santos, Maíra
OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA A
DETERMINAÇÃO DE ETANOL EM FLUIDO ORAL UTILIZANDO HS-
CG/EM. / Maíra Kerpel dos Santos. -- 2013.
98 f.

Orientadora: Renata Pereira Limberger.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto
Alegre, BR-RS, 2013.

1. Etanol. 2. Álcool. 3. Fluido oral. 4.
Cromatografia em fase gasosa. 5. headspace. I.
Pereira Limberger, Renata, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido sob a orientação da Profa. Dra. Renata Pereira Limberger, no laboratório de Toxicologia e no Laboratório de Produção de Padrões Secundários da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, os quais disponibilizaram os equipamentos e os materiais necessários para a realização dos experimentos práticos.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ pela bolsa de estudos.

A minha orientadora Profa. Dra. Renata Pereira Limberger pela confiança e oportunidade.

Aos meus pais pelo apoio em todos os caminhos que desejei percorrer, especialmente à minha mãe, Solange, que sempre me inspirou e me estimulou, e que mesmo longe sempre se fez presente.

Ao meu namorado Daniel que me acompanhou em todos os momentos e dificuldades enfrentadas, pelo apoio, carinho e amor incondicionais, imprescindíveis para a finalização deste trabalho e sem os quais nada faria sentido.

Aos colegas do laboratório de toxicologia que me acompanharam nesta trajetória.

Ao Giuliano e a Bruna, essenciais para a finalização deste trabalho.

À Eloisa pelo apoio e pelas discussões sempre esclarecedoras e construtivas.

À Kris pelo esclarecimento das dúvidas e auxílio na estatística.

Ao Samuel Kaiser pela colaboração no desenvolvimento do desenho experimental.

Ao LAPPS pela estrutura disponibilizada para a realização deste trabalho.

RESUMO

A elevada incidência de acidentes de trânsito está fortemente relacionada ao consumo de bebidas alcoólicas. No Brasil a verificação do uso de álcool entre os condutores é realizada através dos etilômetros e da confirmação do etanol presente no sangue pela técnica de *headspace* (HS) associada à cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama (CG/DIC). Não foram encontrados na literatura métodos para determinação de etanol em fluido oral (FO), utilizando a cromatografia em fase gasosa com detector de massas (CG/EM). **Objetivos:** Realizar a otimização da extração do etanol do fluido oral pela técnica de HS através de desenho experimental e posterior validação de metodologia analítica para a determinação de etanol em FO através de CG/EM e CG/DIC, utilizando o Quantisal[®] como dispositivo de coleta. **Métodos:** O desenho experimental foi desenvolvido através do Box–Behnken Design (BBD), onde foram avaliados a temperatura, o tempo de agitação e o volume injetado. O método foi validado de acordo com as recomendações do FDA e ANVISA considerando os parâmetros de seletividade, efeito residual, efeito matriz, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação, estabilidade e recuperação. **Resultados:** As melhores condições do HS obtidas pelo desenho foram: temperatura de 90°C, volume de injeção de 1000 µL e tempo de extração de 7 min. O método mostrou-se linear na faixa de 0,05-2 g/L (0,5-20 dg/L). Os valores de exatidão situaram-se na faixa de 101,56 e 111,29% e os valores obtidos para a precisão intra e interdia foram inferiores a 12%. Os limites de quantificação e de detecção encontrados foram iguais a 0,0125 g/L e 0,005 g/L para a CG/EM e 0,05 g/L e 0,0129 g/L para a CG/DIC, respectivamente. **Conclusões:** O método desenvolvido mostrou-se eficaz na determinação inequívoca de etanol em fluido oral através da técnica de HS-CG/EM e utilizando o dispositivo de coleta Quantisal[®], atingindo limites de detecção inferiores ao encontrados pelas análises em CG/DIC, sem a necessidade de confirmação por outros sistemas cromatográficos e podendo ser facilmente aplicado na rotina laboratorial.

Palavras-chave: álcool, etanol, cromatografia em fase gasosa, *headspace*, fluido oral.

ABSTRACT

The high incidence of traffic accidents is strongly related to alcohol consumption. In Brazil the verification of alcohol use among drivers is performed through the breath alcohol analyzers and confirmation of ethanol in blood by the headspace technique (HS) associated to gas chromatography with flame ionization detector (GC/FID). To the best of our knowledge there are no methods for the determination of ethanol in oral fluid (OF), using gas chromatography with mass detection (GC/MS) in the literature. **Propose:** Perform the optimization of the extraction of ethanol from OF by headspace technique (HS) through experimental design and subsequent validation of analytical method for the determination of ethanol in OF by GC/MS and GC/DIC, using Quantisal[®] as a collection device. **Methods:** The experimental design was performed using the Box-Behnken Design (BBD) and the evaluated parameters were temperature, stirring time and sample volume injected. The methods were validated according to FDA and ANVISA recommendations considering the parameters of selectivity, residual effect, matrix effect, linearity, precision, accuracy, limit of detection and quantification, stability and recovery. **Results:** The best conditions of HS obtained by design were: temperature 90°C, injection volume 1000 µL and extraction time of 7 min. The method was linear in the range of 0.05-2 g/L (or 0.5-20 dg/L). The values of accuracy stay in the range of 101.56 and 111.29% and values for intra and inter-day precision were less than 12%. The limits of detection and quantification were found equal to 0.0125 g/L and 0.005 g/L for GC/MS and 0.05 g/L and 0.0129 g/L for GC/FID, respectively. **Conclusions:** The method was effective in unequivocal determination of ethanol in oral fluid by HS-GC/MS and using the collection device Quantisal[®], reaching detection limits lower than that found by analysis on HS-GC/FID, without the need confirmation by other chromatographic systems and can be easily applied for routine monitoring.

Keywords: alcohol, ethanol, gas chromatography, headspace, oral fluid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema das vias de oxidação do etanol em doses moderadas.....	29
Figura 2 - Concentração de etanol versus tempo em diferentes matrizes biológicas.....	52
Figura 3 – Dispositivo de coleta Quantisal.....	53
Figura 4 - Análise por HS estático.....	60
Figura 5 - Gráficos de contorno obtidos através do BBD para os três fatores avaliados no HS.....	71
Figura 6 - Cromatograma da análise de Etanol e PI em fluido oral utilizando CG/EM.....	72
Figura 7 - Espectro de massas do Etanol e PI.....	73
Figura 8 - Cromatograma da análise de Etanol e PI em fluido oral utilizando HS-CG/DIC.....	73
Figura 9 - Curva de calibração e análises de resíduos.....	75
Figura 10 - Cromatograma da análise de etanol em fluido oral e seus possíveis interferentes.....	80
Figura 11 - Espectro de massas do Metanol, Etanol e Isopropanol.....	81
Figura 12 - Espectro de massas do Diclorometano, Éter etílico e PI.....	82
Figura 13 - Espectro de massas do Acetato de Etila e Tolueno.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação entre os valores de alcoolemia e sinais clínicos/sintomas da intoxicação por etanol.....	34
Tabela 2 - Métodos descritos na literatura para análise de etanol em sangue e urina.....	42
Tabela 3 - Percentual da produção de saliva pelas diferentes glândulas salivares.....	50
Tabela 4 - Relação de distribuição de etanol entre sangue, ar alveolar, urina e saliva.....	51
Tabela 5 - Métodos relatados na literatura para a análise de etanol em fluido oral.....	55
Tabela 6 - BBD	65
Tabela 7 - Resultados obtidos pela avaliação da capacidade preditiva.....	72
Tabela 8 – Resultados da recuperação em CG/EM e CG/DIC.....	74
Tabela 9 - Resultados obtidos a partir dos mínimos quadrados ordinários e ANOVA.....	76
Tabela 10 – Resultados da exatidão e precisão em CG/EM e CG/DIC.....	77
Tabela 11 – Resultados obtidos nos ensaios de estabilidade.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS

CG/DIC	Cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama
CG/EM	Cromatografia em fase gasosa acoplada a detector de massas
CONTRAN	Conselho Nacional de Trânsito
CTB	Código de Trânsito Brasileiro
DRUID	Driving under the Influence of Drugs, Alcohol and Medicines
FO	Fluido Oral
HS	<i>Headspace</i>
IPEA	Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada do Brasil
NEPTA	Núcleo de Estudos e Pesquisa em Trânsito e Álcool
ROSITA	Roadside Testing Assessment
SAMSHA	Substance Abuse and Mental Health Services Administration
SPME	Solid Phase Microextraction (microextração em fase sólida)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	OBJETIVOS.....	25
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	27
3.1	ETANOL	28
3.2	O CONSUMO DE ETANOL E SEUS EFEITOS NO TRÂNSITO.....	35
3.3	MÉTODOS DE ANÁLISE DE ETANOL	38
4	MATERIAIS E MÉTODOS	61
4.1	MATERIAIS E REAGENTES	62
4.2	AMOSTRAS BRANCO	62
4.3	SOLUÇÕES PADRÃO E DE TRABALHO	62
4.4	PREPARO DAS AMOSTRAS	62
4.5	ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS	63
4.6	DESENHO EXPERIMENTAL.....	64
4.7	VALIDAÇÃO DO MÉTODO POR HS-CG/EM E CG/DIC	65
4.8	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	67
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
5.1	OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DO HS	70
5.2	VALIDAÇÃO	72
6	CONCLUSÕES	84
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

1 INTRODUÇÃO

Inúmeras evidências apontam para a relação entre o consumo de álcool e os acidentes de trânsito (ABREU, LIMA, ALVES, 2006; LIMBERGER et al., 2010; DRUID, 2011). O álcool altera as funções cerebrais e reflexos mentais que irão influenciar diretamente o desempenho do condutor, prejudicando as suas capacidades físicas e psíquicas, mesmo quando ingerido em pequenas quantidades (PONCE e LEYTON, 2008). No Brasil, o Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada do Brasil (IPEA), contabilizou um custo total de 6,5 bilhões de reais devido aos acidentes nas rodovias federais entre os anos de 2004 e 2005 (IPEA, 2006). Em Porto Alegre, segundo dados do Núcleo de Estudos e Pesquisa em Trânsito e Álcool (NEPTA), entre os anos de 2007 e 2008, os custos com os acidentes de trânsito chegaram a 65 milhões de reais, sendo aproximadamente 31 milhões devido ao consumo de álcool (SOUSA et al., 2010).

Estudos apontam a existência de uma correlação linear entre o aumento da alcoolemia (nível de etanol no sangue) e o risco de acidentes de trânsito (HINGSON e WINTER, 2003; KELLY et al., 2004, GJERDE et al., 2011a). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), para cada 0,02% de aumento no nível sérico de etanol há o dobro do risco de envolvimento em um acidente fatal (WHO, 2009).

Uma das medidas adotadas pelo Brasil para conter o alto número de acidentes foi a alteração do Código de Trânsito Brasileiro (CTB) pela Lei nº 11.705 de junho de 2008 e mais recentemente pela Resolução nº 432 de janeiro de 2013 do Conselho Nacional de Trânsito (CONTRAN), que determinou a diminuição do limite permitido de álcool no etilômetro para 0,05 miligrama de álcool por litro de ar expirado (0,05 mg/L) e tolerância zero para alcoolemia (concentração de álcool no sangue), com punições mais severas, incluindo prisão, quando constatada alcoolemia superior a 0,6 g/L (6 dg/L), bem como a responsabilização civil e criminal ao motorista embriagado (BRASIL, 2013). No entanto, países que possuem baixas taxas de mortalidade por acidentes de trânsito (menor que 8 mortes/100 mil habitantes) utilizam limites mais brandos que os presentes no CTB, como a Suécia (0,2 g/L), o Japão (0,3 g/L), a França, a Alemanha, a Holanda e a maioria dos países europeus (0,5 g/L), Inglaterra, União Soviética e Canadá (0,8 g/L), porém, em todos esses países há o rigor no cumprimento da lei (WHO, 2009). O Brasil, além de apresentar um amplo território, conta com inúmeros empecilhos na fiscalização como a inviabilidade técnica dos laboratórios em processar as análises, que

dificultam o trabalho pericial, constituindo uma área emergencial a ser desenvolvida no país.

A forma usual para aferição do consumo de álcool no Brasil entre os condutores é através do etilômetro, no local da abordagem policial. A conversão dos valores obtidos no etilômetro para o equivalente à concentração de etanol no sangue total é baseada nos princípios da Lei de Henry, que estabelece a relação da concentração de etanol no sangue e a concentração no ar alveolar como 1/2000. Os pontos críticos em relação ao uso do etilômetro são a baixa especificidade ao etanol e o fato de se basearem na medida do teor alcoólico apenas ao longo do aparelho respiratório através do ar expirado (ar alveolar) e não na corrente sanguínea (RABELO, 2004). Diversas substâncias voláteis que são expelidas como ar exalado, produzidas durante a atividade metabólica normal ou presente em alimentos e bebidas, como a acetona, podem interferir na leitura do equipamento, produzindo resultados falso-positivos. Assim, trabalhadores expostos a solventes orgânicos, por exemplo, podem obter resultados positivos oriundos da exposição ocupacional, sem que tenham ingerido bebidas alcoólicas (SPINELLI, 2004).

Face ao exposto, é de extrema importância a confirmação de resultados positivos através da análise de sangue e, sempre que possível, por técnicas com princípios analíticos diferentes em matrizes biológicas distintas (SOFT/AAFS, 2006). Nos últimos anos o emprego do fluido oral para monitorar o consumo de álcool e drogas no trânsito teve aumento significativo em vários países do mundo, (CONE e HUESTIS, 2007; DRUMMER et al., 2007; BOSKER e HUESTIS, 2009; GJERDE et al., 2011a). O fluido oral apresenta inúmeras vantagens frente ao sangue, matriz empregada para avaliação da alcoolemia, como o fato da coleta não ser invasiva, de fácil aplicação, com possibilidade de realização pelo próprio agente de trânsito através de dispositivos comerciais, além de possuir correlação plasmática com os níveis de etanol, fornecendo a informação sobre o consumo recente (algumas horas) comprovando, desta forma, que o indivíduo suspeito dirige sob a influência da substância no momento da abordagem (DRUMMER et al., 2007; BOSKER e HUESTIS, 2009; LIMBERGER et al., 2010). A possibilidade de coleta logo após a aferição através do etilômetro evita a perda da confirmação do resultado devido a devido à metabolização do etanol, que leva a extrapolação do tempo da janela analítica, decorrente da demora entre a abordagem policial e a realização da coleta em ambiente laboratorial, como no caso do sangue. As desvantagens encontradas

como a baixa concentração do analito e o pequeno volume disponível para coleta podem ser contornados pelo uso de técnicas analíticas de alta sensibilidade como a técnica de *headspace* (HS), microextração em fase sólida (SPME) e CG/EM. O fluido oral constitui, portanto, uma excelente opção em abordagens de trânsito, e ainda possui uma taxa de recusa significativamente menor que o sangue (GUBALA e ZUBA, 2003; NHTSA, 2009; GJERDE et al., 2011a).

A técnica mais utilizada para confirmação da alcoolemia em laboratórios forenses é através de HS associada a CG/DIC, porém, esta possibilita a ocorrência de resultados falso-positivos com outros alcoóis e compostos voláteis, como metanol e outros solventes. Desta forma, para melhorar a assertiva das análises é empregado um sistema cromatográfico com colunas diferentes. Apesar de a CG/EM ser a técnica considerada “padrão-ouro” para a confirmação inquestionável dos resultados, estando presente na maior parte dos laboratórios forenses, ainda é pouco empregada nas análises de etanol em sangue e fluido oral. Em trabalho realizado por WASFI et al., 2004, a análise de etanol em sangue pela técnica de HS-CG/EM demonstrou ser sensível e específica, atingindo limites de detecção inferiores aos encontrados para as análises de etanol utilizando a técnica de CG/DIC, e garantindo resultados inequívocos sem a necessidade de confirmação por outros sistemas cromatográficos. Entretanto, não foram encontrados na literatura trabalhos empregando a CG/EM para a análise de etanol em fluido oral. Esta abordagem viabiliza a coleta da matriz biológica *in loco* e a análise de teores inferiores de etanol, além de possibilitar a confirmação qualitativa do analito, preenchendo assim os requisitos para suportar um processo legal.

Assim, o presente projeto propõe a otimização da metodologia através de desenho experimental do tipo Box–Behnken Design (BBD) com o intuito de obter condições ótimas de extração pela técnica de HS para a determinação de etanol em amostras de fluido oral através de CG/EM e utilizando o Quantisal® como dispositivo de coleta, além da comparação com os resultados obtidos pelas análises em CG/DIC. O estudo conta com o apoio do NEPTA e com a consultoria internacional realizada por pesquisadores americanos do National Institute of Health (NIH) dos Estados Unidos (National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism e National Institute on Drug Abuse), e da Divisão de Toxicologia Forense e Drogas de Abuso, Oslo, Noruega.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Determinar o etanol em fluido oral através da técnica HS-CG/EM, através do dispositivo de coleta Quantisal®.

2.2 Objetivos Específicos

- Otimizar os parâmetros da técnica de HS utilizada para extração do etanol das amostras de fluido oral, através de desenho experimental do tipo BBD;
- A partir das condições ótimas obtidas no desenho experimental para a técnica de HS, desenvolver e validar um método para a determinação do teor de etanol em fluido oral por CG/EM, utilizando como dispositivo de coleta o Quantisal®;
- Comparar os resultados analíticos obtidos pelo método de HS-CG/EM com os resultados das análises realizadas por HS-CG/DIC.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Etanol

3.1.1 Absorção e distribuição

O etanol é o principal constituinte das bebidas alcoólicas, sendo consumido pela sociedade desde o início da sua história. Sua molécula é polar, hidrossolúvel e possui baixo peso molecular, distribuindo-se facilmente a todas as células e tecidos, com rápida absorção pelo organismo (ZAKHARI, 2006; SCIVOLETTO, MALBERGIER, PILEGGI, 2008).

É amplamente absorvido ao longo do tubo digestivo, principalmente por difusão passiva, sendo 20% absorvido pelas mucosas do estômago e 80% pelo intestino delgado (PASSAGLI e MARINHO, 2011). O etanol atinge picos na concentração sanguínea entre 30 e 90 minutos após a sua ingestão, mais rapidamente em jejum e mais lentamente durante as refeições (PASSAGLI e MARINHO, 2011). Quando há a presença de alimentos, o etanol permanece mais tempo no estômago, levando a uma aceleração da sua biotransformação pela ação da enzima álcool desidrogenase, presente na mucosa estomacal (PASSAGLI e MARINHO, 2011). Experimento descrito por JONES, 2000, relata que indivíduos que fizeram o uso do etanol 15 minutos após uma refeição, tiveram uma redução na eliminação do etanol de até 2 horas, quando comparados àqueles indivíduos que fizeram o uso do etanol em jejum (JONES, 2000). Fatores como a natureza da bebida alcoólica e o teor de etanol presente na mesma, o volume de bebida ingerido, a presença ou ausência de alimentos no estômago, além de fatores de variabilidade biológica, como idade, raça e gênero, também influenciam na sua absorção (SAMIR ZAKHARI, 2006; SCIVOLETTO, MALBERGIER, PILEGGI, 2008).

Após ser absorvido pelo trato gastrointestinal, o etanol segue diretamente pela veia porta até o fígado, atingindo a circulação sistêmica. Estima-se um volume de distribuição de aproximadamente 50L para uma pessoa de 70Kg. A capacidade de distribuição para os tecidos varia de acordo com diversos fatores como a solubilidade e o grau de ligação às proteínas plasmáticas. Por serem mais vascularizados, o cérebro e os rins são os órgãos que apresentam maiores concentrações de etanol, seguidos dos pulmões, coração e tecido adiposo (SCIVOLETTO, MALBERGIER, PILEGGI, 2008; PASSAGLI e MARINHO, 2011). O etanol atravessa facilmente a barreira hematoencefálica, resultando em altas concentrações no sistema nervoso central (SNC) e levando a alterações comportamentais proporcionais ao aumento da sua concentração no sangue

(alcoolemia). Também atravessa facilmente a barreira placentária, podendo provocar um conjunto de danos ao feto denominados de Síndrome Alcoólica Fetal (SCIVOLETTO, MALBERGIER, PILEGGI, 2008).

3.1.2 Biotransformação e excreção

Cerca de 90 a 98% do etanol é biotransformado pelo fígado com velocidade média para um indivíduo adulto de 120 mg/Kg/h, equivalente a cerca de 7 a 10g/h (SCIVOLETTO, MALBERGIER, PILEGGI, 2008, PASSAGLI e MARINHO, 2011). Cerca de 5% do etanol é eliminado na forma inalterada, sendo a maior parte excretada pela urina. (SCIVOLETTO, MALBERGIER, PILEGGI, 2008, PASSAGLI e MARINHO, 2011).

As principais vias de biotransformação são as oxidativas realizadas pela enzima ADH (Álcool Desidrogenase), pelo MEOS ou SOM (Sistema de oxidação microsomal) e pela catalase (SPINELLI, 2004; EDENBERG, 2007; SCIVOLETTO, MALBERGIER, PILEGGI, 2008). A figura 1 representa o esquema geral da oxidação do etanol, com formação de acetaldeído (CH_3CHO), metabólito tóxico como produto comum às três vias, o qual é detoxificado através da oxidação pela enzima ALDH (Aldeído Desidrogenase), formando acetato (ácido acético, CH_3COO^-) que é rapidamente convertido em dióxido de carbono e água, liberando energia (SCIVOLETTO, MALBERGIER, PILEGGI, 2008).

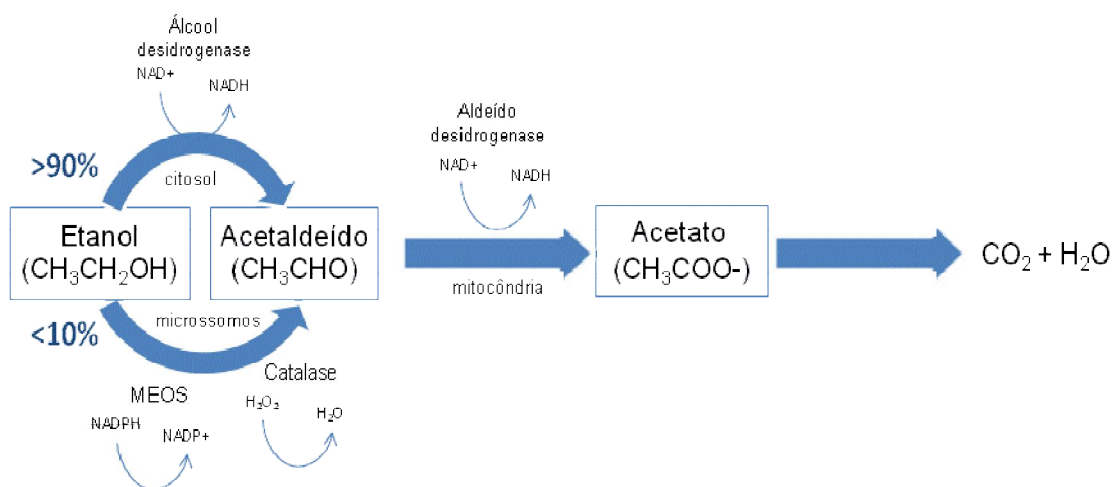


Figura 1. Esquema geral das vias de oxidação do etanol em doses moderadas. Adaptado de SPINELLI, 2004.

A principal via de biotransformação do etanol é a que utiliza a enzima citoplasmática ADH, presente nas células da parede estomacal e no citosol de hepatócitos (SCIVOLETTO, MALBERGIER, PILEGGI, 2008). A ADH constitui uma complexa família de isoenzimas, que foi classificada de acordo com suas propriedades cinéticas e estruturais em cinco classes (ZAKHARI, 2006). A classe I é composta pelas isoenzimas ADH1, ADH2*1, ADH2*2, ADH2*3, ADH3*1 e ADH3*2; a classe 2 pela isoenzima ADH4, a classe III pela isoenzima ADH5, a classe IV pela isoenzima ADH7 e a classe V pela isoenzima ADH6 (ZAKHARI, 2006). Quando o consumo de etanol é elevado, sua eliminação ocorre em um fluxo alto, decorrente principalmente das isoenzimas ADH das classes I e II, que apresentam atividade pronunciada (ZAKHARI, 2006). Estas isoenzimas são encontradas em uma frequência diferente nos diversos grupos raciais existentes, o que pode contribuir para a variação interindividual da biotransformação do etanol (SCIVOLETTO, MALBERGIER, PILEGGI, 2008). Sua atividade é limitada pela disponibilidade da coenzima NAD (Nicotina-Adenina-Dinucleotídeo) no meio, que é convertido a NADH, podendo ficar disponível novamente para a reação devido ao processo de oxidação de NADH a NAD⁺. Esse processo de reciclagem do NAD⁺ é importante já que atua como coenzima em outras reações de biotransformação. No entanto, a capacidade do fígado em produzir o NAD⁺ e realizar a sua regeneração é limitada. Em situações abusivas, sua oxidação é acelerada, exigindo uma contínua redução do NAD⁺, com formação de NADH (VALE, 2007).

Nos casos em que o consumo de etanol se faz de forma abusiva ou crônica e supera a capacidade das vias de eliminação da ADH, a via suplementar SOM é acionada e participa ativamente, aumentando a oxidação do etanol (ZAKHARI, 2006; SCIVOLETTO, MALBERGIER, PILEGGI, 2008; PASSAGLI e MARINHO, 2011). Localizado no retículo endoplasmático dos hepatócitos, as isoenzimas do citocromo P450 CYP2E1, 1A2, e 3A4, são as responsáveis pela oxidação do etanol no SOM, que utiliza como cofator o NADPH ao invés do NAD (fig. 1) (ZAKHARI, 2006). Embora o SOM seja mais eficiente se comparado a ADH e a catalase, ele gera superóxidos e radicais livres que podem causar danos como: mutações, comprometimento de funções, morte celular, câncer, além do aumento da síntese de ácidos graxos e o acúmulo de colesterol, responsáveis pela hiperlipidemia e esteatose hepática (SEITZ e STICKEL, 2006).

A catalase, localizada no interior dos peroxissomos dos hepatócitos, é responsável pela terceira via de oxidação do etanol. Nesta via, o etanol é transformado em acetaldeído, na presença de H_2O_2 (peróxido de hidrogênio), que é posteriormente transformado em água (SCIVOLETTO, MALBERGIER, PILEGGI, 2008, PASSAGLI e MARINHO, 2011). É considerada a via de menor participação no processo de oxidação do etanol (ZAKHARI, 2006).

Após a oxidação do etanol, ocorre a oxidação do acetaldeído a acetato, catalisada pela enzima aldeído desidrogenase (AID), presente na membrana externa, nos microssomas e no citosol dos hepatócitos. O acetato é então convertido em Acetilcoenzima A e posteriormente transformado em dióxido de carbono e água pelo ciclo de Krebs (SCIVOLETTO, MALBERGIER, PILEGGI, 2008; PASSAGLI e MARINHO, 2011) (fig 1). Aproximadamente 2% do etanol consumido não sofre oxidação, taxa que pode chegar a 10% se o seu consumo for abusivo. Este percentual não oxidado é predominantemente excretado pelos rins e pulmões (SCIVOLETTO, MALBERGIER, PILEGGI, 2008).

Pelas vias não oxidativas o etanol é diretamente conjugado com substâncias endógenas, como o ácido glicurônico e sulfatos, formando os metabólitos etilglicuronídeo (EtG), etilsulfato (EtS), etiléster de ácido graxo (FAEE) e fosfatidiletanol (PEth) (PASSAGLI e MARINHO, 2011). Apesar de serem eliminados em concentrações muito baixas, alguns desses metabólitos podem ser utilizados como marcadores do uso do etanol, com a vantagem de possuírem uma maior janela de detecção, devido seu maior tempo de meia-vida de eliminação. O EtG, por exemplo, possui grande utilidade nas análises forenses, podendo ser encontrado na urina, sangue, cabelo e em tecidos *post mortem* (PASSAGLI e MARINHO, 2011).

Ainda, marcadores bioquímicos tradicionais como ALT (alanina amino transferase) e AST (aspartato amina transferase), CDT (transferrina deficiente em carboidrato) e GGT (Gama-glutamil transpeptidase) tem aplicação na clínica médica, na identificação e acompanhamento de pacientes usuários crônicos de etanol (CONIGRAVE et al., 2003).

3.1.3 Mecanismo de ação no Sistema Nervoso Central e Toxicidade

O etanol é considerado um depressor do sistema nervoso central (SNC) e age principalmente na membrana celular, provocando alterações na função de proteínas ligadas às membranas neurais (SCIVOLETTO, MALBERGIER, PILEGGI, 2008). Seu

principal mecanismo de ação é pelo aumento da inibição sináptica, mediada pelo Ácido Gama Aminobutírico (GABA), agindo especificamente nos receptores GABA_A, majoritários no SNC (CRISWELL e BREESE, 2005), e pelo aumento do fluxo dos íons cloreto devido a sua maior permeabilidade, ocasionando a hiperpolarização da célula nervosa e prejudicando a condução neuroquímica (SCIVOLETTO, MALBERGIER, PILEGGI, 2008; PASSAGLI e MARINHO, 2011). Também age inibindo a atividade do neurotransmissor excitatório glutamato sobre os receptores N-Metil-D-Aspartato (NMDA) (HICKLIN et al., 2011), que desempenham papéis críticos na transmissão sináptica, plasticidade e excitotoxicidade, e podem ser responsáveis pela perda de memória aguda causada pelo consumo de etanol (HICKLIN et al., 2011; MARTINA et al., 2012). A tolerância cruzada entre o etanol e outros depressores centrais deve-se a entrada de cloro no SNC, favorecida pela ação de agonistas gabaérgicos como os benzodiazepínicos e barbitúricos (PASSAGLI e MARINHO, 2011).

A ação do etanol também se estende aos sistemas: adrenérgico, opióide, serotoninérgico, dopaminérgico, colinérgico e glutamatérgico (SCIVOLETTO, MALBERGIER, PILEGGI, 2008; PASSAGLI e MARINHO, 2011). No sistema colinérgico, que desempenha um papel importante na aprendizagem e na cognição, o etanol causa diminuição das atividades, com danos aos neurônios, que em usuários crônicos, pode levar ao desenvolvimento de tolerância (EHRlich, PIRCHL, HUMPEL, 2012). Outro sistema afetado é o dopaminérgico, através do estímulo à liberação de dopamina principalmente no núcleo *accumbens* e cortex pré-frontal, responsáveis pelas sensações de prazer e bem estar, provocados por estímulos dos sistemas opióide e serotoninérgico, que levam a um aumento da dopamina extracelular, responsável pela necessidade de repetir consumo de etanol. (QUESADA, 1998; DRUMMER e ODELL, 2001; SCIVOLETTO, MALBERGIER, PILEGGI, 2008). Contudo, seu uso frequente pode levar a uma diminuição dos níveis de serotonina no SNC, que juntamente com a ação agonista do GABA contribui para os efeitos de reforço positivo e dependência alcoólica observada em alguns indivíduos (QUESADA, 1998; DRUMMER e ODELL, 2001).

As variações comportamentais causadas pelo consumo de álcool são determinadas por inúmeros fatores como a dose e o tipo de bebida ingerida, a idade, o gênero, o peso corporal, a velocidade de absorção (influenciada pela presença de alimentos no estômago) e o desenvolvimento de tolerância pelo usuário. Uma dose

de 44 g de etanol ingerida com estômago vazio pode levar a concentrações sanguíneas entre 0,6 e 0,9 g/L. No entanto, se a mesma dose for ingerida após uma refeição a concentração máxima de etanol no sangue não ultrapassa os valores de 0,3 e 0,5 g/L (SCIVOLETTO, MALBERGIER, PILEGGI, 2008).

Entre homens e mulheres também há evidências que apontam para a diferença do metabolismo do etanol. As mulheres apresentam um menor conteúdo de água no organismo e uma maior quantidade de gorduras, levando a maiores níveis de etanol no sangue, mesmo quando consideradas as diferenças entre o peso corporal. A enzima ADH também contribui para a sua maior sensibilidade, pois apresenta atividade reduzida nas mulheres (SPINELLI 2004; PASSAGLI e MARINHO, 2011).

O uso de etanol em baixas doses não fornece reações comportamentais previsíveis e, desta forma, as reações entre os usuários podem variar de uma reação expansiva até a perda de autocontrole e comportamento antissocial (HOFFMAN et al., 2007). A desinibição pode ser visualizada com a utilização de baixas doses, mas com o aumento do consumo e dos níveis séricos, o indivíduo passa a apresentar uma diminuição da resposta aos estímulos, como fala prejudicada e dificuldade de locomoção. Ressalta-se que independente do comportamento causado pelo consumo do etanol, o desempenho das atividades psicomotoras e de funções relacionadas à cognição são efetivamente prejudicadas (YONAMINE, 2004).

A correlação entre a alcoolemia e alterações comportamentais mais comuns apresentadas pelos usuários de etanol estão demonstradas na tabela 1 (DUBOWSKI, 1980). Salienta-se que estes dados são influenciados pelas diferenças individuais, padrão de uso e outros fatores de variabilidade previamente abordados.

Quando ocorre a intoxicação crônica do usuário de etanol, todos os sistemas do organismo são afetados. As alterações mais relevantes ocorrem no sistema digestivo, que pode apresentar úlceras, gastrite, pancreatite, hiperemia congestiva e inflamação da mucosa gástrica, além de alterações hepáticas como esteatose, cirrose e hepatite alcoólica, que posteriormente podem ocasionar a formação de câncer hepatocelular. Outro sistema afetado é o cardiovascular, que pode apresentar inflamação do músculo cardíaco, hipertensão e até infarto agudo do miocárdio. No SNC podem ocorrer o desenvolvimento de neuropatias periféricas e alterações cognitivas, que podem ser permanentes e até deficiências de vitamina

B1, que pode acarretar o surgimento da síndrome de *Wernicke-Korsakoff*, caracterizada por confusão mental, ataxia e alterações oculares, podendo evoluir para alteração crônica da memória de forma irreversível (SCIVOLETTO, MALBERGIER, PILEGGI, 2008). Em indivíduos com síndrome de abstinência pode ocorrer o *delirium tremens*, caracterizado por delírio, tremores, suor, debilidade dos membros inferiores e confusão mental. O sistema reprodutivo também é afetado pela diminuição da libido, impotência e esterilidade. No sistema hematológico pode ocorrer o aparecimento de anemia megaloblástica, plaquetopenia e leucopenia (SCIVOLETTO, MALBERGIER, PILEGGI, 2008; PASSAGLI e MARINHO, 2011).

Tabela 1. Relação entre os valores de alcoolemia (g/L) e sinais clínicos/sintomas da intoxicação por etanol sobre um indivíduo com 70 kg de massa corpórea.

ALCOLEMIA (g/L)	ESTAGIO	SINAIS CLINICOS E SINTOMAS
0,1 a 0,5	Sobriedade	Nenhuma influência aparente; testes especiais revelam pequenos transtornos clínicos.
0,3 a 1,2	Euforia	Suave euforia; sociabilidade; decréscimo das inibições; diminuição da atenção; julgamento e controle; perda da eficiência em testes especiais.
0,9 a 2,5	Excitação	Instabilidade emocional; decréscimo da inibição; perda do julgamento crítico; perda de memória e compreensão; decréscimo da resposta sensitiva; alguma descoordenação muscular.
1,8 a 3,0	Confusão	Desorientação; confusão mental e vertigens; estado emocional exagerado, medo, aborrecimentos; distúrbio da sensação e da percepção das cores, formas, movimentos e dimensões; debilidade no equilíbrio, descoordenação muscular, vacilação no modo de andar e dificuldade na fala.
2,7 a 4,0	Estupor	Apatia, inércia geral, diminuição marcada das respostas aos estímulos, marcada descoordenação muscular com instabilidade para suportar o andar; vômitos; incontinência de urina e fezes, debilidade da consciência.
Maior que 4,0	Coma	Completa inconsciência, coma, anestesia, debilidade e abolição dos reflexos, incontinência de urina e fezes, dificuldades circulatórias e respiratórias, morte possível, por parada respiratória.

Fonte: Adaptado de DUBOWSKI, 1980.

O consumo crônico de etanol durante a gestação pode levar ao desenvolvimento da Síndrome Alcoólica Fetal, caracterizada por diversas manifestações, como a ocorrência de abortos espontâneos, recém-nascidos de

baixo peso, malformações faciais e de pés e mãos, lábio leporino e retardo mental. Ressalta-se que permanecem indefinidos a dose, a frequência e o período necessário de utilização de etanol para provocar o desenvolvimento da síndrome (SCIVOLETTO, MALBERGIER, PILEGGI, 2008).

3.2 O consumo de etanol e seus efeitos no trânsito

Estatísticas revelam que o consumo de etanol é uma das principais causas dos acidentes de trânsito no Brasil e no mundo. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a segurança no trânsito é atualmente um dos problemas mais graves de saúde pública (WHO, 2004). Dados da OMS revelam que o consumo de etanol resulta em aproximadamente 2,5 milhões de mortes por ano (WHO, 2011). O *World Report on Road Traffic Injury Prevention*, também realizado pela organização, revelou que 1,2 milhões de vidas são perdidas por ano, decorrentes dos acidentes de trânsito. O projeto DRUID, que monitora o uso de etanol e drogas em 13 países da Europa, avaliou 50.000 motoristas através de coleta de sangue e fluido oral, e revelou que o etanol lidera as estatísticas de consumo, aparecendo em 3,48% dos motoristas monitorados, seguido do uso de substâncias ilícitas (1,90%). O estudo revela ainda, que entre as vítimas dos acidentes de trânsito feridas ou mortas, a substância mais consumida também era o etanol, seguido do seu uso associado a drogas ou medicamentos. O etanol, portanto, ainda é considerada uma das substâncias psicoativas mais utilizadas pelos motoristas e o principal responsável pelas mortes e incapacidades no trânsito, já que a alcoolemia elevada ou a sua associação com outras substâncias eleva efetivamente o risco de um motorista ser seriamente ferido ou morrer em um acidente de trânsito (DRUID, 2011).

No Brasil, os dados não são diferentes. O último relatório do CEBRID mostra que o uso de etanol na vida entre os 7939 entrevistados de 108 cidades brasileiras com mais de 200 mil habitantes foi igual a 74,6%, sendo predominantemente maior entre os homens. Cerca de 12,3% da população em estudo declarou ser dependente do etanol, com maior prevalência em indivíduos do sexo masculino, considerando os critérios estabelecidos para classificação de dependência química do NHSDA (National Household Surveys on Drug Abuse). Os maiores índices de dependência foram encontrados na faixa etária de 18 a 24 anos (CEBRID, 2005).

É indiscutível a perigosa relação existente entre beber e dirigir, mesmo quando o etanol é consumido em pequenas doses, que são suficientes para

provocar alterações cognitivas que prejudicam o desempenho dos motoristas. Além de contribuir para um grande número de mortos e feridos, os acidentes de trânsito geram custos elevados ao sistema de saúde. O IPEA estima que 6,5 bilhões de reais foram gastos devido aos acidentes nas rodovias federais entre os anos de 2004 e 2005 (IPEA, 2006). DE BONI et al., 2011, investigaram a prevalência e os fatores associados uso de álcool e/ou drogas e os acidentes de trânsito, em uma amostra de vítimas que foram admitidas em duas emergências da cidade de Porto Alegre. Do total de 609 entrevistados a alcoolemia foi positiva em 7,8% dos condutores e 9,2% dos pedestres, sendo que entre 25,4 e 35,4% confessaram terem consumido etanol até 24h antes dos acidentes de trânsito (DE BONI et al., 2011).

No intuito de demonstrar o impacto econômico dos acidentes de trânsito causados pelo abuso de álcool, o NEPTA estimou todos os custos associados aos acidentes de trânsito na cidade de Porto Alegre entre os anos de 2007 e 2008. Os resultados mostraram que a alcoolemia foi positiva em 36,7% das vítimas, com alcoolemia média de 0,661 g/L (6,61 dg/L). Os indivíduos do sexo masculino na faixa etária de 35 a 44 anos apresentaram os maiores índices de alcoolemia. Os estudos apontaram ainda que foram gastos aproximadamente 66 milhões de reais na cidade com os acidentes de trânsito e que cerca de 31 milhões estavam relacionados ao consumo de álcool, o que representa quase 50% do valor total (SOUSA, 2010). A maior parte das vítimas foi do sexo masculino na faixa etária de 18 a 24 anos (SOUSA, 2010).

Recentemente o Brasil publicou mais uma alteração na lei 11.705, a resolução nº 432 do CONTRAN, na qual estabelece tolerância zero para o consumo de etanol e a possibilidade da verificação dos sinais que indiquem a alteração da capacidade psicomotora do condutor pelas autoridades de trânsito como prova de que o condutor do veículo consumiu etanol, na tentativa de minimizar o impactante número das estatísticas (BRASIL, 2013). No entanto, desde a publicação da lei seca em 2008, onde o limite de alcoolemia foi reduzida para zero com tolerância até 0,2 g/L (2 dg/L), poucos estudos foram realizados para comprovar a efetividade da lei (BRASIL, 2008).

Pesquisa realizada por BACHIERI e BARROS, 2011, apontou que desde a implantação do CTB em 1998, e mais precisamente entre o período de 1998 e 2010, as taxas de acidentes de trânsito se mantiveram estáveis no Brasil. No entanto, o número de mortes e incapacidades ainda permaneceu elevado e superior aos

índices obtidos em países como o Canadá, por exemplo. Ainda, comparando-se as taxas de mortalidade dos anos de 1998 e 2010 e considerando-se o aumento de 17% da população brasileira, notou-se um aumento de 19% em relação ao último ano (BACHIERI e BARROS, 2011). De acordo com o I Levantamento Nacional Domiciliar sobre Padrões de Consumo de Álcool, realizado no ano de 2009 e que englobou 143 cidades brasileiras, o número de pessoas que consumiram álcool e dirigiram foi igual a 35%, sendo significativamente superior em indivíduos do sexo masculino (SENAD, 2007; MOURA et al., 2009). Outro estudo realizado nas 27 capitais brasileiras avaliou a frequência do consumo abusivo de bebidas alcoólicas e a condução de veículos automotores, segundo a idade e a escolaridade, no ano de 2008. O estudo foi realizado através dos dados obtidos pelo sistema de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas (VIGITEL) (MOURA et al., 2008). Os resultados mostraram que 1,5% da população entrevistada consumiu bebida alcoólica e conduziu veículo automotor nos 30 dias anteriores à entrevista. O estudo ainda avaliou a frequência do consumo de álcool entre os motoristas 2 meses antes e nos meses subsequentes à implantação da Lei Seca, no ano de 2008. Nos meses anteriores à implantação da legislação o abuso de etanol entre os motoristas se manteve entre 1,8 e 2,2%, sendo reduzido para 1,3% no mês seguinte à Lei Seca. No entanto, a pesquisa revela que os índices voltaram a aumentar a partir do mês de setembro, atingindo 2,6% no mês de dezembro (MOURA et al., 2008).

Apesar dos dados, pouco se sabe sobre o perfil do uso de etanol e outras substâncias lícitas e ilícitas, nas diferentes regiões brasileiras, que certamente contribuem para os elevados índices dos acidentes e mortes no trânsito brasileiro. Poucos estudos demonstraram a efetividade da lei seca após sua implementação, mas segundo os dados relatados, nota-se que o número de pessoas que ainda consomem o álcool e conduzem veículos automotores é preocupante. Certamente a nova resolução do CONTRAN de janeiro de 2013 foi publicada com o intuito de reduzir estes índices. Porém, deve-se considerar uma fiscalização mais efetiva dos condutores e uma maior conscientização da população para tentar auxiliar na diminuição dos acidentes. Estudo realizado por CONCEIÇÃO et al., 2012 avaliou o conhecimento da legislação de trânsito pelos motoristas brasileiros no período de agosto de 2008 a setembro de 2009, em 27 capitais brasileiras nos finais de semana. Os resultados mostraram que do total de 3397 condutores avaliados sobre

as leis de trânsito, mais especificamente a respeito do limite permitido de etanol no sangue e suas penalidades, apenas 23,5% responderam corretamente ao questionado. Assim, evidencia-se a falta de conhecimento das próprias leis pelos condutores brasileiros e a necessidade de mais estudos do perfil dos motoristas e campanhas de conscientização da população (CONCEIÇÃO et al., 2012)

O rigor da fiscalização e cumprimento das leis com efetividade é o que diferencia o Brasil de países como EUA e Noruega, que apesar de apresentarem valores permitidos para o consumo de etanol menos rigorosos, possuem um pleno cumprimento das leis de trânsito e maior rigor na fiscalização. Como resultado os índices de acidentes de trânsito nestes países são significativamente inferiores aos encontrados no Brasil (DE BONI et al., 2011). Destaca-se também a importância das análises laboratoriais de etanol, para confirmar o seu uso entre os condutores. Por se tratar de análises forenses a interpretação cuidadosa dos resultados é fundamental, sendo recomendada a confirmação de resultados positivos através da alcoolemia e, sempre que possível, por técnicas com princípios analíticos diferentes em matrizes biológicas distintas (SOFT/AAFS, 2006). Até o momento, no Brasil, são utilizados o etilômetro e a alcoolemia para verificação do uso de etanol entre os motoristas. Alguns trabalhos já sugeriram a utilização do fluido oral ao invés do sangue como matriz biológica de escolha para o monitoramento de substâncias psicoativas no trânsito no BRASIL (YONAMINE, 2003; LIMBERGER et al., 2010; SOUZA et al., 2011; ZANCANARO et al., 2012). Na Europa, diversos países que participam do programa DRUID já adotaram o fluido oral como matriz biológica para monitorar o uso de etanol e outras substâncias no trânsito (DRUID, 2011), devido a sua maior facilidade de coleta quando comparada ao sangue, além de apresentar boa correlação com os níveis plasmáticos.

3.3 Métodos de análise de etanol

A fiscalização de etanol e outras substâncias psicoativas capazes de causar dependência deveriam ser procedimentos operacionais rotineiros dos órgãos de trânsito, conforme previsto no CTB (BRASIL, 2013). No entanto, apesar da previsão legal, no Brasil, atualmente, só é possível fazer a avaliação do teor estimado de etanol no ar expirado através de etilômetros, no local da abordagem, e posteriormente, a confirmação pelos resultados da alcoolemia, que é realizada em ambiente laboratorial.

Os etilômetros, popularmente conhecidos como “bafômetros”, são dispositivos utilizados para medir a quantidade de etanol presente no ar expirado (RABELO, 2004). Os etilômetros podem apresentar diferentes tipos de detectores, sendo os principais os detectores de infravermelho, presentes nos dispositivos portáteis e de bancada, os detectores baseados em oxidações químicas ou eletroquímicas, os semicondutores e os que possuem duplos sensores, que utilizam a associação do detector de infravermelho e das células eletroquímicas (PASSAGLI e MARINHO, 2011).

De acordo com a legislação, a unidade de medida utilizada para expressar a concentração de etanol com a utilização destes instrumentos deve ser miligrama de álcool por litro de ar expirado. A conversão dos valores obtidos, para a o equivalente à concentração de etanol no sangue total, é baseada nos princípios da Lei de Henry, que estabelece a relação da concentração de etanol no sangue e a concentração no ar alveolar como 1/2000, ou seja, 2 litros de ar alveolar expirado contém aproximadamente a mesma quantidade de álcool que um mililitro de sangue (PASSAGLI e MARINHO, 2011). Desta forma, de acordo com os novos limites estabelecidos pela Resolução nº 433 de 2013 do CONTRAN, 0,05 mg/L de etanol no ar expirado equivalem a 0,1 g/L no sangue (BRASIL, 2013).

A presença de etanol no ar expirado de condutores, medida através do etilômetro, constitui a técnica mais utilizada em abordagens policiais devido à facilidade de aplicação, baixo custo relativo, pelo fato de ser um método não invasivo de coleta e por fornecer resultado imediato no local da abordagem. No entanto, possuem baixa especificidade ao etanol, podendo apresentar interferência devido à presença de corpos cetônicos, por exemplo, que podem ser produzidos em jejum prolongado, dietas específicas e em indivíduos diabéticos, além da presença residual de etanol na boca, que pode alterar a relação sangue/ar expirado, levando a resultados falsamente elevados na leitura do equipamento quando do consumo recente. Outra limitação é que compostos voláteis como a acetona, o éter etílico e outros solventes, podem interferir na leitura do equipamento, produzindo resultados falso-positivos (RABELO, 2004; SPINELLI, 2004).

No Brasil a confirmação do consumo do etanol após a verificação pelo etilômetro é realizada através da análise laboratorial do etanol em sangue. O etanol possui mais afinidade pelo sangue do que pelo ar expirado, apresentando correlação direta com o desempenho do indivíduo (SPINELLI, 2004). A relação entre a dose

oral de etanol e a sua concentração máxima no sangue pode ser estimada através da relação matemática simples [$C_{\text{máx}} \text{ (dg/L)} = 0,02 \times \text{dose (g por 70 Kg de peso corporal)}$] (DRUMMER e ODELL, 2001). Normalmente para estimar a concentração de etanol no sangue em um período anterior à coleta, no momento da abordagem policial, utiliza-se a taxa de decréscimo de etanol no sangue, que considera a taxa de 8-28 mg/dL/h para se obter uma exatidão de 100%. Desta forma, um indivíduo que provocou um acidente de trânsito com níveis de etanol no sangue em torno de 0,6 g/L, precisa ser encaminhado a perícia e ter seu sangue colhido no prazo máximo de 2h (SPINELLI, 2004), para evitar a ocorrência de um resultado toxicológico negativo, comprometendo o laudo forense. Desta forma, evidencia-se a importância da aplicação do fluido oral como matriz alternativa, já que a sua coleta pode ser realizada no momento da abordagem.

A maior parte das análises de sangue para aferição de etanol em âmbito forense é realizada por HS-CG/DIC. Atualmente também tem sido empregada a técnica de SPME-HS-CG/DIC, que leva a um limite de detecção inferior nas análises de etanol. No entanto a CG/EM técnica considerada “padrão ouro”, é pouco empregada para confirmação do etanol em sangue, sendo relatada somente por WASFI et al., 2004, conforme a tabela 2. O método desenvolvido por WASFI et al., 2004, demonstrou boa sensibilidade, atingindo limites de detecção inferiores aos encontrados pelas análises realizadas em CG/DIC, além demonstrar uma boa resolução na separação dos compostos, sem a necessidade de confirmação por outra técnica ou por diferentes colunas cromatográficas, demonstrando a viabilidade da realização das análises de etanol utilizando a CG/EM. A diminuição do tempo e custo das análises realizadas pela CG/EM constituem importantes vantagens para as análises forenses já que a confirmação das amostras pela análise em diferentes colunas é desnecessário, além de alcançar limites de detecção relativamente menores sem a necessidade da utilização da técnica de SPME e permitir a análise qualitativa por espectrometria de massas de forma simultânea à análise cromatográfica, o que garante a confiabilidade requerida para suportar um processo legal.

Apesar de ser a técnica prevista na legislação para a confirmação do etanol, a alcoolemia possui como desvantagens a necessidade de local apropriado e profissional tecnicamente qualificado para sua execução, além de ser uma técnica invasiva, apresentando um grande número de recusas pelos usuários (GUBALA e

ZUBA, 2003). Desta forma, inúmeros países já utilizam o fluido oral como alternativa ao sangue para verificar o uso de substâncias psicoativas no trânsito, em ambientes ocupacionais e até mesmo na justiça criminal (BOSKER e HUESTIS, 2009). Nos EUA o fluido oral vem sendo utilizado para o monitoramento da utilização de substâncias psicoativas entre os condutores, através do programa DRUID e nos ambientes de trabalho (BOSKER e HUESTIS, 2009; DRUID, 2011). Atualmente o fluido oral é considerado pelos programas internacionais como o Substance Abuse and Mental Health Services Administration (SAMSHA) e o Driving under the Influence of Drugs, Alcohol and Medicines (DRUID), presente nos EUA e Europa, como uma das principais matrizes para análise de substâncias psicoativas, contando inclusive com guias próprias que regulam o seu emprego e estabelecem valores de *cut-off* para diversas substâncias, procedimentos para a coleta de amostras, cadeia de custódia, controle para garantir a identidade e integridade da amostras, assim como quais os métodos analíticos que devem ser empregados na análise das amostras, além da certificação dos laboratórios. (CONE e HUESTIS, 2007; BOSKER e HUESTIS, 2009). O reconhecimento do fluido oral como uma ferramenta para melhorar a segurança no trânsito é atribuída principalmente pela possibilidade de coleta rápida e não invasiva, no local da abordagem, facilitando o monitoramento dos condutores para o uso de substâncias psicoativas (BOSKER e HUESTIS, 2009), e evitando assim um resultado toxicológico negativo decorrente da demora em realizar a coleta das amostras, como ocorre no caso do sangue.

Tabela 2. Métodos descritos na literatura para análise de etanol em sangue e urina.

Método de análise	Método de coleta	Matriz Analisada	Coluna (CG)	Fibra de SPME	LOD	LOQ	Analitos	Referência
LC-MS e HPLC	Não descrito	Sangue: Urina	5- μ m C4 (Thermo Scientific)	Não se aplica	Não descrito	PEth 0,1 μ mol/LEtG: 0,0005g/L EtS: 0,0001g/L	PEth, CDT, EtG, EtS	Helander, Péter, Zheng, 2012
Ethanol Gen. 2, COBAS Integra 400/700/800, Roche Diagnostics	Não descrito	Sangue e ar expirado	Não se aplica	Não se aplica	0,1g/L	Não descrito	Etanol	Morey et al., 2011
HS/CG-DIC	Não descrito	Sangue e Urina	HP-Innowax 30m x 0,25mm x 320 μ m (Agilent)	Não se aplica	Sangue: 0,0148g/L Urina: 0,0111g/L	Sangue: 0,0448g /L Urina: 0,0336g/L	Etanol e Metanol	Aliyev et al., 2011
Enzimático (ADH), Hitachi 917 e HS/GC- DIC	Não descrito	Sangue e saliva	Rtx-BAC2 (30m x 0,32mm x 1,2mm) Rtx-BAC1 (30m x 0,32mm x 1,8mm)	Não se aplica	Não descrito	Não descrito	Etanol	Gjerde et al., 2011 (a) Gjerde et al., 2011 (b)
HS-SPME-GC/DIC	Não descrito	Sangue e Saliva	RTX-BAC 2 (30m x 0,53mm x 2,0 μ m) (Restek)	Poliacrilato 85 μ m (Supelco)	Não descrito	0,05g/L	Etanol, Acetaldeído, Acetona, Isopropanol, Metanol	Feltraco, Antunes, Linden, 2009
HS-GC/DIC e HS- GC/MS	Não descrito	Sangue e urina	3% Carbowax 20 M 80/100	Não se aplica	Não descrito	Não descrito	Etanol e Cloroeto de Etila	Tarnovski et al., 2009

Tabela 2. Continuação.

Método de análise	Método de coleta	Matriz Analisada	Coluna (CG)	Fibra de SPME	LOD	LOQ	Analitos	Referência
GC/DIC	Não descrito	Sangue, urina	CPWAX 57 CB (25m x 0,25mm x 0,2µm)	Não se aplica	Sangue: 0,00075g/L Urina: 0,00025g/L	Sangue: 0,0025g/L Urina: 0,00083g/L	Etanol, Metanol, Acetaldeído Acetona	Pontes et al., 2009
GC/DIC	Não descrito	Sangue	CPWAX 57	Não se aplica	0,01g/L	Não descrito	Etanol, t-butanol	Santiago, 2008
GC/DIC	Não descrito	Sangue, urina	Não descrito	Não se aplica	0,1g/L	Não descrito	Etanol, n-propanol	Jones, Kugelberg, Holmgren, Ahlner, 2008
HS-GC/DIC	BD Vacutainer	Sangue e urina	DB-WAX (30m x 0.25mm x 0,25µm)	Não se aplica	Sangue: 0,0001995g/L	Sangue: 0,0004986g/L	Etanol, metanol, acetaldeído e acetona	Portari, Marchini, Jordão, 2008
HS-GC/DIC	5ml Vacutainer (20ml Fluoreto de Sódio e Heparina de Sódio 75 Uni. USP)	Sangue	RTX BAC-1 30m x 0,32mm x 1,8µm e RTX BAC2 30m x 0,32mm x 1,2µm (Restek)	Não se aplica	0,010 g/kg	0,04 g/kg	Etanol e Acetaldeído	Kristoffersen, Stormyhr, Smith-Kielland, 2006
HS-SPME-GC/FID	Não descrito	Sangue e urina	Altech Econo-Cap, EC-1000 (30m x 0,25mm x 0,25µm)	10% cloreto de polivinila 90% de sulfeto prata	Etanol: 0,0056g/L	Não descrito	Etanol e Metanol	Maleki, Farhadi, Matin, 2006

Tabela 2. Continuação.

Método de análise	Método de coleta	Matriz Analisada	Coluna (CG)	Fibra de SPME	LOD	LOQ	Analitos	Referência
HS-GC/DIC	Não descrito	Sangue	DB 624 (30m x 0,53mm x 3,0µm)	Não se aplica	0,01 g/L	0,05 g/L	Etanol	Pelissier-Alicot et al., 2006
GC/EM	Não descrito	Urina	Sílica Fundida HP-5MS (30m x 0,25mm x 0,10µm)	Não se aplica	0,0001 g/L	0,0002 g/L	EtG	Marín, 2006
Enzimático (ADH), Hitachi 917 e HS-GC/DIC	5ml Vacutainer (20ml Fluoreto de Sódio e Heparina de Sódio 75 Uni. USP)	Sangue e urina	RTX BAC-1 30m x 0,32-mm x 1,8µm e RTX BAC2 30m x 0,32mm x 1,2µm (Restek)	Não se aplica	ADH: Urina 0,012 g/L	ADH: Urina 0,042 g/L Sangue 0,02 g/L	Etanol	Kristoffersen e Smith-kielland, 2005
Enzimático (ADH), Hitachi 917 HS-GC/DIC	5ml Vacutainer (20ml Fluoreto de Sódio e Heparina de Sódio 75 Uni. USP)	Sangue	RTX BAC-1 30 m x 0,32mm x 1,8µm e RTX BAC2 30m x 0,32mm x 1,2µm (Restek)	Não se aplica	ADH 0,007 g/L	GC 0,00042 g/L ADH – 0,0024 g/L	Etanol	Kristoffersen et al., 2005
SPME-HS-CG/DIC e HS-CG/DIC	Sangue: Recipiente com Fluoreto de Sódio e EDTA	Sangue e urina	Carbowax 30m x 0,25µm x 0,25mm (Chrompack)	Poliacrilato 85 µm	SPME-HS: 0,1 mg/dL; HS: 0,5 mg/dL	Não descrito	Etanol	Martinis, Ruzzene, Martin, 2004

Tabela 2. Continuação.

Método de análise	Método de coleta	Matriz Analisada	Coluna (CG)	Fibra de SPME	LOD	LOQ	Analitos	Referência
HS-GC/DIC	Vacutainer 5ml (Heparina e Fluoreto de Sódio)	Sangue	RTX BAC-1	Não se aplica	Não descrito	0,01 g/L	Etanol	Jones, Lindberg, Olsson, 2004
HS-CG/DIC	Becton-Dickinson - 10mL (100mg Fluoreto de Sódio e 20mg Oxalato de Potássio)	Sangue	GP60180 Carbopak C, 0,2% Carbowax 1500 (6' x 1/8" ID)	Não se aplica	Não descrito	Não descrito	Etanol	Miller, Vasquez, Evans, 2004
HS-CG/EM	Não descrito	Sangue	DB-ALC1 (30m x 0,32mm x 1,8µm)	Não se aplica	0,0002 g/L	0,02 g/L	Etanol	Wafsi et al., 2004
Sangue e Urina: HS-GC/EM Ar expirado: Alcolmeter S-D2 EtG: LC/EM	Não descrito	Sangue, urina e ar expirado	Não descrito	Não se aplica	Não descrito	EtG: 0,001 g/L	Etanol, creatinina, EtG	Bergstrom, Helander, Jones, 2003
HS-GC/DIC	Vacutainer (Fluoreto de Sódio 100mg e EDTA 25mg)	Sangue e ar expirado	Não descrito	Não se aplica	Não descrito	0,01 g/kg	Etanol	Jones e Anderson, 2003
HS-GC/DIC	Vacutainer	Sangue e urina	Não descrito	Não se aplica	Não descrito	0,1 g/L	Etanol	Jones e Holmgren 2003

Tabela 2. Continuação.

Método de análise	Método de coleta	Matriz Analisada	Coluna (CG)	Fibra de SPME	LOD	LOQ	Analitos	Referência
HS-CG/DIC	Não descrito	Sangue e saliva	0,2% Carbowax 1500/Graphpack	Não se aplica	Não descrito	Não descrito	Etanol	Gubala, Zuba, 2003
HS-SPME-GC/DIC	Seringa hipodérmica, sem conservantes	Sangue e urina	Carbowax (sílica) (30m x 0,25mm x 0,25µm) (Chrompack)	Poliacrilato 85µm	Não descrito	0,001 g/L	Etanol, metanol, acetaldeído e acetona.	Martinis, Martin, 2002
HS/GC-DIC	Não descrito	Sangue, ar expirado e saliva.	0,2% Carbowax 1500/Graphpack-GC	Não se aplica	Não descrito	Não descrito	Etanol	Gubala, Zuba, 2002
CG/DIC	Não descrito	Sangue	60/80 Carbopack B/5% Carbowax 20 M, 6ft2 mm	Não se aplica	Não descrito	Não descrito	Etanol	Matthews, 2001
HS-CG/DIC	Sangue: Vacutainer (Heparina e Fluoreto de Sódio)	Sangue, urina, saliva e ar expirado.	Não descrito	Não se aplica	Não descrito	Não descrito	Etanol	Bendtsen et al., 1999

Tabela 2. Continuação.

Método de análise	Método de coleta	Matriz Analisada	Coluna (CG)	Fibra de SPME	LOD	LOQ	Analitos	Referência
HS-CG/DIC “cryogenic oven trapping”	Não descrito	Sangue	Rtx-BAC2 (30m x 0,53mm x 2,0µm) (Restek)	Não se aplica	0,01 g/L	Não descrito	Etanol	Watanabe-Suzuki, et al., 1999
HS-GC/DIC	Não descrito	Urina	Poraplot Q fused-silica (10mx 30x32 mm I.D.) (Chrompack)	Não se aplica	0,008 mg/L	0,01 mg/L	Etanol	Corrêa, Pedroso, 1997
HS-CG/DIC	Sem anticoagulantes	Sangue	Carbowax (30m x 0,54mm x 1,2µm)	Não se aplica	Et: 5,4 umol/L; Acet: 1,13 µmol/L	Não descrito	Etanol e Acetaldeído	McCarver-May, Durisin, 1997
HS-GC/DIC	Não descrito	Sangue	Não descrito	Não se aplica	Não descrito	Não descrito	Etanol	Dubowski, Gadsden, Poklis, 1997
HS/CG-DIC	Não descrito	Sangue	Rtx-BAC2 30m x 0,53 mm x 2,0µm (Restek) MEC: 6 ft 1/8 inch 1,2% Carbowax 1500 on 60/80 Carbopak C column (Supelco)	Não se aplica	0,01 g/L	0,2 g/L	Etanol, t-butanol, metil etil cetona	O’neal et al., 1996

Tabela 2. Continuação.

Método de análise	Método de coleta	Matriz Analisada	Coluna (CG)	Fibra de SPME	LOD	LOQ	Analitos	Referência
HS-GC/DIC	Vacutainer (20mg Oxalato de Potássio e 25mg Fluoreto de Sódio)	Sangue	80/100 Carbopak C 0,8% THEED e 60/80 Carbopak B 5% Carbowax 20M.	Não se aplica	Não descrito	Não descrito	Etanol	Logan, Case, Kiesel, 1994
HS-CG/DIC	Tubo de vidro (Heparina ou citrato de sódio)	Sangue	5% Carbowax 20 M Haloport F (30-60 mesh) (Hewlett-Packard)	Não se aplica	Não descrito	Etanol: 0,000006g/L Acetaldeído: 0,001 g/L	Etanol e Acetaldeído	Steenaar, Clark, Brien, 1985
CG/DIC	Não descrito	Sangue e urina.	0,2% Carbowax 1500 80-100 mesh Carbopack.	Não se aplica	Não descrito	Não descrito	Etanol	Winek, Murphy e Winek , 1984
HS-GC/DIC	Butterfly No. 19, Abbott	Sangue	Chromosorb 102 em 60-80 mesh	Não se aplica	Não descrito	Não descrito	Etanol e Acetaldeído	Erikson, Peachey, 1980
GC/DIC	Não descrito	Sangue e Saliva (Parótida)	Porapak Q (Supelco)	Não se aplica	Não descrito	Não descrito	Etanol (Humanos e Ratos)	Digregorio, Piraino, Ruch, 1978

3.3.1 Análise de etanol em fluido oral

O “fluido oral” representa a mistura de saliva e outros constituintes presentes na boca, sendo composto por água, enzimas (principalmente amilase), glicoproteínas e eletrólitos, principalmente o sódio, o potássio, o cloro e o bicarbonato. Também apresenta bactérias e seus metabólitos, células epiteliais, leucócitos, eritrócitos (APS e MARTENS, 2005). A saliva é um fluido incolor, viscoso, formado principalmente pela secreção de três glândulas: a submandibular, a parótida e a sublingual (APS e MARTENS, 2005; SAMYN, LALOUP, DE BOECK, 2007; CONE e HUESTIS, 2007). Outras fontes, responsáveis pela composição do fluido oral, são os sulcos gengivais e entre 450 a 750 glândulas salivares acessórias, situadas na língua, no palato, na mucosa bucal e naso-oro-faringe (APS e MARTENS, 2005). Cerca de 70% do volume total da saliva é proveniente da glândula submandibular, 25% da glândula parótida e o restante da glândula sublingual e de outras glândulas menores (MOFFAT, OSSELTON, WIDDOP, 2004).

O pH da saliva situa-se na faixa de 5,8 a 7,4, podendo chegar até 8,0 quando sua produção é estimulada. É produzida inicialmente nos ácinos, constituintes das glândulas salivares, que são conectados por dutos intercalados. Depois de produzida é drenada para a cavidade oral através de dutos estriados e excretores (FAGIOLINO, 1999; CROUCH, 2005). Durante a passagem da saliva pelos dutos, a concentração dos eletrólitos muda devido a transporte iônico, levando o fluido oral a possuir um caráter hipotônico quando comparado ao plasma. O número de ácinos e a atividade de biossíntese de proteínas possuem a tendência de diminuir com o envelhecimento, embora dependa muito das características individuais (APS e MARTENS, 2005).

A produção de saliva varia de acordo com o ritmo circadiano e o tipo de estimulação proporcionada. Normalmente durante o sono a produção de saliva pode chegar a aproximadamente 0 mL/min, podendo chegar até 6 mL/min quando há o estímulo de uma substância ácida na boca (APS e MARTENS, 2005). O volume total de fluido oral produzido em um dia por um adulto por chegar a 1000 mL. O ritmo circadiano e a estimulação externa também irão determinar a diferença da produção de saliva pelas diferentes glândulas salivares (APS e MARTENS, 2005). A glândula parótida, por exemplo, é uma das principais produtoras de saliva durante o dia, e, no entanto, durante o sono possui uma contribuição quase nula (APS e MARTENS, 2005) (tabela 3).

Tabela 3. Percentual (%) da produção de saliva pelas diferentes glândulas salivares de acordo com o tipo de estimulação.

	Sono	Sem estimulação	Estimulação mecânica	Estimulação com ácido cítrico
Glândula parótida	0	21	58	45
Glândula submandibular	72	70	33	45
Glândula sublingual	14	2	2	2
Glândulas salivares menores	14	7	7	8

Adaptado de APS e MARTENS, 2005.

Os mecanismos de transporte de substâncias do sangue para a saliva são a filtração (difusão através dos poros da membrana), o transporte ativo e a difusão passiva, considerada a principal forma (CONE e HUESTIS, 2007) já que a barreira existente entre os dutos salivares e a circulação sistêmica é constituída apenas por uma camada epitelial formada pela membrana basal e membrana das células epiteliais glandulares, o que possibilita a passagem de substâncias com massa molecular entre 100 e 500 Da. (maioria dos fármacos) (SAMYN, LALOUP, DE BOECK, 2007). No entanto, inúmeros fatores influenciam a ocorrência deste mecanismo, como as propriedades químicas da molécula, o pH, o grau de ionização (solubilidade), a ligação às proteínas plasmáticas e as características da membrana (CONE e HUESTIS, 2007). Desta forma, a concentração de uma molécula é proporcional a sua fração livre e não ionizada no plasma sanguíneo. Assim, substâncias com características de base fraca possuem a tendência de sofrer acúmulo, com predomínio da substância original e não dos seus produtos de biotransformação, pois o seu pH é mais ácido que o pH sanguíneo, o que promove sua ionização e impede o retorno para o plasma (KIDWELL, HOLLAND, ATHANASELIS, 1998). Assim como no plasma, o período de detecção pode ser alterado por diversos fatores como dose, frequência de uso e sensibilidade dos métodos analíticos (CONE e HUESTIS, 2007).

A concentração de etanol encontrada na saliva é normalmente superior à encontrada no sangue (JONES, 1995; GUBALA e ZUBA, 2003), devido ao seu maior conteúdo de água e menor concentração de lipídeos (JONES, 1995). A tabela 4

apresenta a correlação entre o teor alcoólico encontrado nas principais matrizes biológicas empregadas nas análises forenses e o sangue (PASSAGLI e MARINHO, 2011). JONES, 1993, estabeleceu uma razão média saliva/plasma de 1,094 (n=166) no intervalo de 40 a 400 minutos após o início do consumo de álcool (JONES, 1995). GUBALA e ZUBA 2002 realizaram um estudo com 49 voluntários e obtiveram uma relação média entre saliva/plasma de 1,08. Outro experimento realizado com apenas seis voluntários, observou uma razão maior entre saliva/plasma nos intervalos entre 0,5 e 1h, apresentando valores iguais a 2,86 e 1,87 respectivamente, e igual a 1,15 no tempo de 3h (FELTRACO, ANTUNES, LINDEN, 2009). Ressalta-se que se as coletas forem realizadas com a presença de etanol no trato gastrointestinal, fase de pré-absorção, a correlação não será boa, e as interpretações deverão ser feitas com reservas (SPINELLI, 2004). Essa razão se mantém constante durante as fases de absorção, distribuição e eliminação do etanol no organismo (JONES, 1993; FAGIOLINO, 1999).

Na maioria dos casos, o etanol pode ser detectado no fluido oral pelo mesmo período de tempo que no sangue (4h), ou período um pouco maior (GUBALA e ZUBA, 2002). Outro aspecto a ser considerado é que existe uma grande taxa de recusa de fornecimento de amostra de sangue (GUBALA e ZUBA, 2003), que é obtida através de coleta invasiva, além de requerer ambiente laboratorial e profissional capacitado para coleta, tornando o fluido oral uma excelente alternativa para monitorar o uso de álcool no trânsito.

Tabela 4. Relação de distribuição de etanol entre sangue, ar alveolar, urina e saliva.

Matriz	Relação sangue: matriz
Sangue	1,00
Ar alveolar	0,0004
Urina	1,33
Saliva	1,18

Adaptado de PASSAGLI e MARINHO, 2011.

Conforme o observado na tabela 4, as amostras de fluido oral possuem elevada correlação com a concentração sanguínea, viabilizando a sua utilização para prever se o indivíduo que consumiu o etanol está sob o seu efeito (GUBALA e ZUBA, 2003). A figura 2 mostra a concentração de etanol versus tempo em

diferentes matrizes biológicas demonstrando a correlação entre os resultados de teores alcoólicos encontrados no sangue, ar exalado, urina e saliva.

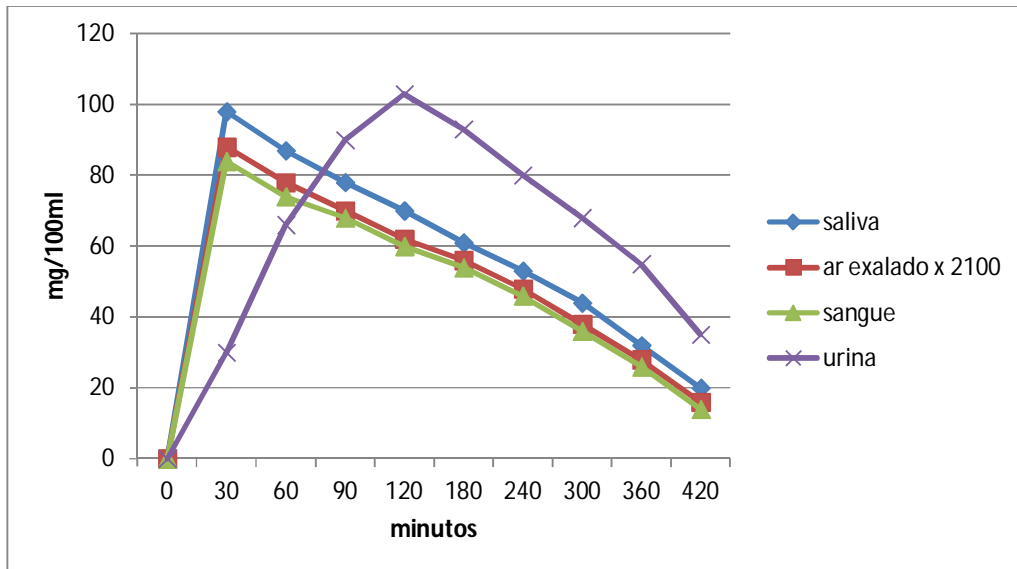


Figura 2. Concentração de etanol (mg/100 mL) versus tempo (minutos) em diferentes matrizes biológicas, baseado na média de indivíduos que ingeriram uma dose de etanol de 0,68 g/Kg. Adaptado de PASSAGLI e MARINHO, 2011.

A coleta do fluido oral pode ser realizada diretamente ou através de dispositivos coletores comerciais (SAMYN, LALOUP, DE BOECK, 2007), os quais fazem uso de *swabs* absorventes constituídos principalmente por celulose e polietileno (GRÖSCHL et al. 2008; CROUCH, 2005; ORASURE TECHNOLOGIES, 2013; COOPER et al., 2006; MOORE, 2009). Alguns dispositivos também podem apresentar tampões de preservação. A estimulação da saliva pode ser realizada de forma mecânica, através da mastigação de *parafilm*, cera de parafina, teflon, borracha e gomas de mascar, ou através de dispositivos de coleta impregnados com estimulantes da salivação (ex. ácido cítrico). No entanto, alguns problemas associados à estimulação da saliva podem ser encontrados. No caso do *parafilm* pode ocorrer a absorção de algumas substâncias e metabólitos da saliva, levando a diminuição da sua concentração, além da possibilidade de interferência dos seus constituintes nas análises cromatográficas. Além disso, os dispositivos que possuem estimulantes ácidos podem alterar o pH da saliva e provocar mudanças na concentração das substâncias a serem monitoradas (CROUCH, 2005; CHIAPPIN et al., 2007).

A vantagem dos dispositivos comerciais está em propiciar uma coleta fácil e rápida de um volume adequado de fluido oral (SAMYN, LALOUP, DE BOECK, 2007), de forma não invasiva, pelo próprio agente de trânsito e sob supervisão direta, dificultando a adulteração da amostra pelo doador.

Os principais dispositivos presentes no mercado são Quantisal[®], Cozart[®], Intercept[®], Omni-sal[®], Salivette[®], Finger Collector[®], Oral Diffusion Sink[®], Proflow Sialometer[®], ORALscreen[®], Orasure[®], Hooded Collector[®]. Alguns dispositivos vem acompanhados de tampões de conservação como Quantisal[®] e Cozart[®], outros dispositivos como o Intercept[®], possuem o estimulante de salivação ácido cítrico. O Saliva Collection System-SCS[®], diferentemente dos dispositivos citados, utiliza uma solução extratora contendo um corante como padrão interno, que é analisada em fotômetro para a determinação do volume exato de fluido oral coletado (SHIPLEY et al., 1992; GOMEZ et al., 1994; JONES, 1995; RAGGAM et al., 2008)

O dispositivo escolhido pelo nosso grupo de pesquisa para a coleta das amostras de fluido oral foi o Quantisal[®], (Figura 3), por possuir melhor indicativo do volume de coleta (1mL), facilitando assim a obtenção de volumes homogêneos de amostras e pelo fato de já ter sido previamente validado pelo nosso grupo de pesquisa, a exemplo dos trabalhos realizados por SOUSA et al., 2011 e ZANCANARO et al., 2012.



Figura 3. Dispositivo de coleta Quantisal[®] contendo o tampão de conservação (IMMUNALYSIS CORPORATION, 2013).

As desvantagens encontradas nas coletas de fluido oral como a baixa concentração do analito e o pequeno volume de fluido oral disponível para coleta, podem ser contornados pelo uso de técnicas analíticas de alta sensibilidade, como a técnica de HS e de SPME.

Apesar de não haver relatos na literatura para as análises de etanol em fluido oral utilizando a CG/EM, conforme especificado na tabela 5, esta representa uma ferramenta a ser considerada em análises confirmatórias do teor de etanol por condutores em fluido oral, já que é considerada uma técnica altamente específica, excluindo a possibilidade da ocorrência de resultados falso-positivos com outros interferentes, pois possibilita a identificação do analito pelo espectro de massas e isenta, portanto, a necessidade de utilização de outros sistemas para confirmação dos resultados, reduzindo o tempo de processamento das amostras, além de possuir elevada sensibilidade, viabilizando a detecção de etanol dentro da janela analítica da nova lei que propõe a alcoolemia zero.

Tabela 5. Métodos relatados na literatura para a análise de etanol em fluido oral.

Método de análise	Método de coleta do fluido oral	Coluna (CG)	Fibra de SPME	LOD	LOQ	Analitos	Referência
HS/CG-DIC	Statsure saliva sampler (Statsure Diagnostic Systems, USA)	Não descrito	Não se aplica	Não descrito	0,053 g/L	Etanol	Simonsen et al., 2012
HS/CG-DIC	Sem dispositivo de coleta	HP-Innowax	Não se aplica	0,0091 g/L	0,0276 g/L	Etanol e metanol	Aliyev et al., 2011
(SPME)/HS/CG-DIC	Saliva Collection System (Greiner Bio-One-Áustria)	RTX-BAC2 (30m x 0,53mm x 2µm-Restek)	Poliacrilato 85 µm	Não descrito	0,05 g/L	Etanol, acetaldeído, acetona, metanol e isopropanol	Feltraco, Antunes, Linden, 2009
HS/CG-DIC	Sem dispositivo de coleta	Poraplot Q (10m x 0,53x 2mm)	Não se aplica	Não descrito	Não descrito	Etanol, acetaldeído e 2-propanol	Ernstgard, 2009
Ensaio enzimático (ADH) Hitachi 917	Intercept® saliva kit (OraSure Technologies, Inc- USA)	Não se aplica	Não se aplica	Não descrito	0,1 g/L	Etanol	Gjerde et al., 2008, 2010, 2011a, 2012

Tabela 5. Continuação.

Método de análise	Método de coleta do fluido oral	Coluna (CG)	Fibra de SPME	LOD	LOQ	Analitos	Referência
SPME-HS/CG-DIC	Não descrito	EC-1000 (30m x 0,25mm x 0,25 µm)	10% de cloreto de polivinila (PVC): 90% de sulfeto de prata (Ag ₂ S)	0,0056 g/L	Não descrito	Etanol e metanol	Maleki et al., 2006
HS/CG-DIC	Salivette (Sarstedt- Germany)	Poraplot Q	Não se aplica	0,006 g/L	0,010 g/L	Etanol	Yonamine et al., 2003
HS/CG-DIC	Não descrito	0,2% Carbowax 1500/Graphpack	Não se aplica	0,05 g/L	Não descrito	Etanol	Gubala. W, Zuba D., 2002
Ensaio enzimático (ADH) Q.E.D. Saliva Alcohol Test	Q.E.D. Saliva Alcohol Test	Não se aplica	Não se aplica	0,1 g/L	0,2 g/L	Etanol	Christopher, Zeccardi,1992; Bendtsen et al.,1999; Smolle et al., 1999

Tabela 5. Continuação.

Método de análise	Método de coleta do fluido oral	Coluna (CG)	Fibra de SPME	LOD	LOQ	Analitos	Referência
Ensaio enzimático (Testomar-Alkohol Mono from Behringwerke GmbH)	Sem dispositivo de coleta	Não se aplica	Não se aplica	Não descrito	Não descrito	Etanol	Haeckel, Bucklitsch, 1987; Jones, 1993
HS/Detector Eletroquímico	Sem dispositivo de coleta	Não se aplica	Não se aplica	Não descrito	Não descrito	Etanol	Jones, 1978
HS/CG-DIC	Sem dispositivo de coleta	Porapak Q	Não se aplica	Não descrito	Não descrito	Etanol	Digregorio, Piraino, Ruch, 1978

3.3.2 Headspace

A análise por HS se baseia no equilíbrio entre os componentes voláteis de uma amostra líquida ou sólida em um recipiente selado (KOLB, 1999). Assim, os compostos voláteis são difundidos para a fase gasosa até atingirem um estado de equilíbrio e posteriormente uma parte da amostra é retirada do HS (figura 4) (KOLB, 1999). É considerada uma técnica simples, normalmente empregada para analisar compostos orgânicos voláteis de forma direta, evitando o preparo de amostras e proporcionando, desta forma, um menor custo e rapidez nas análises. Além disso, a técnica de HS leva à concentração dos analitos presentes na amostra, o que garante uma maior sensibilidade nas análises (KOLB, 1999; RESTEK, 2012).

O principal objetivo da técnica é maximizar a concentração dos componentes voláteis no espaço gasoso (*headspace*) e minimizar a contaminação indesejada da amostra a partir de outros compostos presentes na matriz (RESTEK, 2012). Para determinar a concentração do analito na amostra pode-se utilizar o coeficiente de partição (**K**) que é definido como a distribuição do analito entre a amostra e a fase gasosa (KOLB, 1999; RESTEK, 2012). Assim, compostos com coeficientes de partição menores, se difundem para a fase gasosa mais facilmente. O **K** é influenciado pela temperatura e composição da matriz (RESTEK, 2012). Seu valor pode ser diminuído, facilitando desta forma a sua distribuição à fase gasosa, pelo aumento da temperatura e adição de um sal à matriz, diminuindo a solubilidade dos compostos orgânicos e aumentando a sua volatilidade, conhecido como efeito *salting-out* (KOLB, 1999; RESTEK, 2012). Os sais mais utilizados nas análises por HS são o cloreto de sódio, sulfato de sódio, carbonato de potássio, cloreto de amônio e sulfato de amônio (RESTEK, 2012).

Outro fator importante a ser considerado nas análises por HS é a relação entre o volume presente de amostra e o volume da fase gasosa, denominado β . Desta forma, menores valores de β (maiores volume de amostra), irão aumentar a resposta para os compostos voláteis. No entanto, a diminuição nos valores de β nem sempre irão aumentar a sensibilidade da resposta do analito, como por exemplo, para as substâncias que possuem valor de **K** elevado, pois nesse caso, haverá uma maior dificuldade da sua distribuição para a fase gasosa, e desta forma a substância ficará mais difundida na amostra e não no gás (RESTEK, 2012).

$$\text{Coeficiente de partição (K)} = \frac{C_S}{C_G}$$

Onde C_S é a concentração do analito na amostra e C_G a concentração do analito na fase gasosa.

As principais formas de análise por HS são o *headspace* estático e o *headspace* dinâmico. A técnica mais utilizada é o *headspace* estático, no qual a amostra é colocada em um recipiente lacrado, submetida à aquecimento para a formação de vapor, posteriormente é retirada uma alíquota de gás através de uma seringa específica chamada *gas-tight* e transferida para o CG. A outra forma é o *headspace* dinâmico ou *purge-on trap*, no qual um gás inerte é introduzido na amostra levando os compostos voláteis para um compartimento fechado (*trap*). Este compartimento fechado é então aquecido e os compostos voláteis são transferidos pelo gás de arraste até a coluna do CG (KOLB, 1999).

O *headspace* é a técnica de escolha para realizar a determinação de etanol em sangue e fluido oral no âmbito forense, como já verificado nas tabelas 2 e 5, pois apresenta diversas vantagens como sensibilidade, proporcionando a análise de baixas concentrações do analito, além de rapidez e simplicidade, pois não necessita de pré-tratamento da amostra antes da introdução no CG, nem o emprego de fibras de SPME que elevam consideravelmente os custos das análises. Desta forma, o HS estático foi a técnica escolhida para a realização das análises de etanol em fluido oral, utilizando CG/EM, pela metodologia proposta.

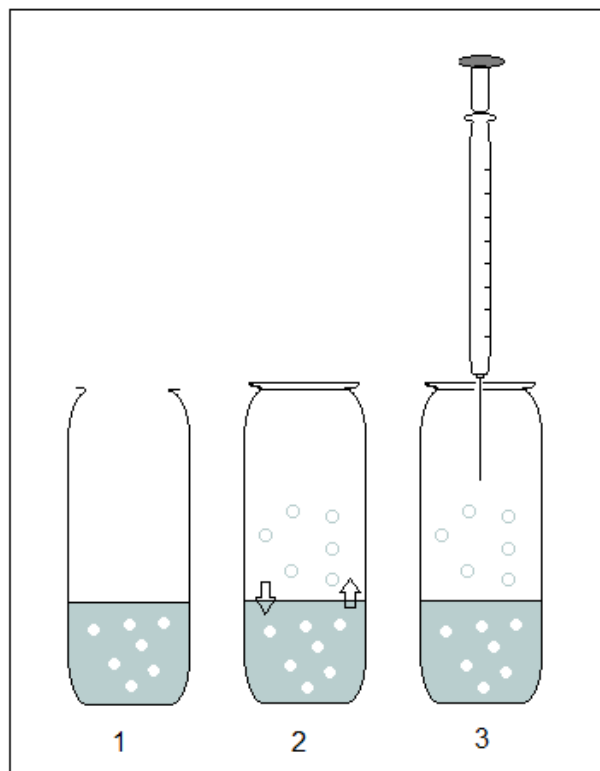


Figura 4. Análise por HS estático. (1) A amostra é adicionada em um frasco de HS, (2) Ocorre a volatilização do analito e sua partição na fase gasosa, (3) É retirada uma alíquota da fase gasosa através da seringa *gas tight*. Crédito de Maira Kerpel dos Santos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais e reagentes

Etanol, metanol, acetato de etila, diclorometano, tolueno, éter etílico, isopropanol e o padrão interno (PI) *n*-propanol foram adquiridos da Tedia Company (Fairfield, OH, USA).

O dispositivo de coleta Quantisal®, os filtros e a solução de tampão conservante foram adquiridos da Immunalysis Corporation (Pomona, CA, USA). Cada dispositivo de coleta contém um coletor com um indicador de volume que se torna azul quando 1 mL de fluido oral são coletados e um tubo plástico de transporte com 3 mL do tampão conservante (volume final de 4 mL).

Os frascos (*vials*) de headspace e as tampas rosqueáveis de alumínio com septo de PTFE e silicone, foram adquiridos da Agilent Technologies (Agilent J&W Scientific, Folsom, CA).

4.2 Amostras branco

As amostras de fluido oral branco utilizadas no estudo foram obtidas de seis voluntários não usuários de etanol. Após a coleta, as amostras de fluido oral foram congeladas até a realização das análises.

4.3 Soluções padrão e de trabalho

As soluções trabalho de etanol e do PI foram preparadas em água destilada a partir de uma solução estoque. A concentração das soluções de trabalho foram preparadas em uma faixa de 40-0,5 g/L. O PI foi preparado em uma concentração de 2 g/L. Após o preparo todas as soluções foram mantidas em geladeira.

4.4 Preparo das amostras

A curva de calibração e os controles de qualidade foram obtidos através da adição de 100 µL das soluções estoque de etanol em 1 mL de fluido oral branco. A curva de calibração foi obtida em uma faixa de concentração de 0,05-2 g/L e as amostras do limite inferior de quantificação (LIQ), controle de qualidade baixo (CQB), controle de qualidade médio (CQM), controle de qualidade alto (CQA) e controle de qualidade de diluição (CQD) foram obtidos nas concentrações de 0,05; 0,1; 0,5; 1,5 e 4,0 g/L, respectivamente. De acordo com o recomendado pelas guias de validação, por se encontrar fora da curva de calibração, o CQD foi submetido a uma diluição pré-definida, chegando a concentração de 1 g/L em 1 mL de fluido oral.

Após adição de etanol, as amostras foram diluídas com o tampão de conservação (3 mL para cada 1 mL de amostra), na tentativa de mimetizar ao máximo o procedimento de coleta pelo dispositivo Quantisal®. Após a adição do tampão as amostras submetidas à agitação em vórtex durante 20 s, e posteriormente foi retirada uma alíquota de 1 mL, que foi transferida para *vial* de HS de 10 mL. Subsequentemente foi adicionado ao *vial* de HS 50 µL do PI. O *vial* foi então colocado na bandeja do injetor e submetido análise automática de HS. Considerando a adição do tampão de conservação, as amostras foram diluídas quatro vezes a partir da concentração adicionada em 1 mL de fluido oral.

4.5 Análises cromatográficas

As análises foram realizadas em um CG 5975C acoplado a um detector de ionização de chamas e um detector de massas 7890A (Agilent Technologies, CA, USA), equipados com um injetor automático de HS (CTC Analytics Combipal, Basel, Switzerland) e uma coluna ZB-BAC1, Zebron (Phenomenex), 30 m x 0,32 mm x 1,80 µm. A temperatura do forno foi programada iniciando em 40°C (3 min), com uma rampa de 5°C/min até 70°C (1 min). O tempo da análise foi de 10 min. O *post run* foi mantido a 200 °C por 3 min. O gás de arraste utilizado foi o Hélio ultrapuro, com um fluxo de 1,4 mL/min. O injetor foi mantido a uma temperatura de 200°C e operado no modo *split* 25/1.

O detector de massas foi operado no sistema de impacto de elétrons de 70eV e no modo SIM (*Single Ion Monitoring*). Foram monitorados os íons m/z 31, 45, 46 para o etanol e m/z 60, 59, 31 para o PI. Os íons sublinhados foram utilizados para realizar a quantificação. O cálculo foi realizado através da razão entre a área do pico do etanol e do PI. As temperaturas da interface, da fonte íons e do quadrupolo foram mantidas a 220°C, 230°C e 150°C, respectivamente..

Para as análises realizadas em CG/DIC o injetor e o detector foram mantidos a uma temperatura de 200°C O Nitrogênio foi utilizado como gás *make up* e o Hidrogênio e o Ar sintético para acender a chama do detector.

4.6 Desenho experimental

As condições experimentais da técnica de HS foram otimizadas através do Box–Behnken design (BBD). Os dados foram processados pelo software estatístico Minitab 14 (State College, PA, USA). O desenho foi construído considerando três fatores em três níveis: temperatura 70 (-1), 80 (0) and 90 °C (+1), tempo de agitação 5 (-1), 12.5 (0) and 20 min (+1) e volume de amostra injetada 500 (-1), 750 (0) and 1000 µL (+1).

Os experimentos foram realizados de forma randomizada e em replicata (dois blocos), realizados em dias distintos, totalizando 30 análises (tabela 6). O objetivo do experimento foi avaliar a sensibilidade do método para a análise de etanol frente às diferentes condições testadas durante a extração pela técnica de HS.

Os dados do experimento foram ajustados seguindo um modelo polinomial de segunda ordem (equação 1), onde Y_i representa genericamente cada resposta, n é o número de fatores ou variáveis, b_0 é o coeficiente de regressão do intercepto, e b_i , b_{ii} e b_{ij} são coeficientes de regressão, linear, quadrático e de interação de cada fator A_i , respectivamente.

Equação (1)

$$Y_i = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i A_i + \sum_{i=1}^n b_{ii} A_i^2 + \sum_{i < j}^n b_{ij} A_{ij}$$

A validade e capacidade preditiva do modelo matemático foram avaliadas sob condições ótimas, comparando as respostas ótimas obtidas pelo modelo com os resultados experimentais realizados.

Tabela 6. BBD mostrando os três fatores avaliados e seus três níveis.

Run	Heating temperature (°C)	Stirring time (min.)	Volume of sample injection (µL)
1	70 (-1)	5,0 (-1)	750 (0)
2	90 (+1)	5,0 (-1)	750 (0)
3	70 (-1)	20,0 (+1)	750 (0)
4	90 (+1)	20,0 (+1)	750 (0)
5	70 (-1)	12,5 (0)	500 (-1)
6	90 (+1)	12,5 (0)	500 (-1)
7	70 (-1)	12,5 (0)	1000 (+1)
8	90 (+1)	12,5 (0)	1000 (+1)
9	80 (0)	5,0 (-1)	500 (-1)
10	80 (0)	20,0 (+1)	500 (-1)
11	80 (0)	5,0 (-1)	1000 (+1)
12	80 (0)	20,0 (+1)	1000 (+1)
13	80 (0)	12,5 (0)	750 (0)
14	80 (0)	12,5 (0)	750 (0)
15	80 (0)	12,5 (0)	750 (0)

4.7 Validação do método por HS-CG/EM e HS-CG/DIC

A validação foi realizada de acordo com as recomendações do FDA (USA Food and Drug Administration Center) e ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) para métodos bioanalíticos seguindo os seguintes parâmetros: seletividade, efeito residual, efeito matriz, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação, estabilidade e recuperação (FDA, 2001; BRASIL, 2012).

4.7.1 Seletividade

A seletividade foi realizada através da análise de amostras de fluido oral coletadas pelo dispositivo de coleta Quantisal® de seis voluntários não usuários de etanol. A presença de substâncias interferentes no método proposto foi avaliada e os resultados comparados com aqueles obtidos nas amostras processadas no LIQ.

Adicionalmente, amostras de fluido oral foram fortificadas com 0,1 g/L de etanol e substâncias potencialmente interferentes, como solventes e inalantes, na intenção de encontrar picos no mesmo tempo de retenção do etanol. As substâncias testadas foram: metanol, isopropanol, acetato de etila, éter etílico, diclorometano e tolueno.

4.7.2 Efeito residual e efeito matriz

Para avaliar o efeito residual, foram analisadas seis amostras branco após o limite superior de quantificação (LSQ) e o CQA. Os resultados foram comparados com os obtidos das amostras processadas no LIQ.

Para avaliar o efeito matriz, triplicatas das amostras do CQB e CQA preparadas em fluido oral e água destilada adicionadas de PI foram analisadas. O fator de matriz normalizado (FMN) foi calculado para cada amostra, sendo avaliado através do coeficiente de variação (CV), que conforme preconizado deve ser inferior a 15%.

$$\text{FMN} = \frac{\text{Resposta do analito em matriz/Resposta do PI em matriz}}{\text{Resposta do analito em solução/Resposta do PI em solução}}$$

4.7.3 Linearidade

A linearidade do método foi obtida através de três curvas calibração, analisadas em três dias distintos e preparadas pela adição de etanol em amostras de fluido oral nas concentrações de 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 g/L, e do PI na concentração final de 0,1 g/L.

4.7.4 Limites de detecção e quantificação

O LIQ foi estimado considerando valores de precisão menores que 20% e exatidão entre 80 e 120%, através da análise de cinco amostras independentes fortificadas com etanol. O limite de detecção foi estimado pela relação sinal ruído de aproximadamente três (S/R= 3).

4.7.5 Precisão e exatidão intra e interdia

A exatidão e a precisão intradia foram avaliadas durante uma única corrida analítica através da análise de cinco replicatas do LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD (n = 25). Os ensaios interdia foram realizados durante três dias, através da análise de cinco replicatas de cada CQ por dia. A precisão foi expressa como desvio padrão relativo (DPR) e a exatidão como o percentual da concentração teórica.

4.7.6 Estabilidade

Os ensaios de estabilidade foram realizados através da análise de triplicatas de amostras de CQB e CQA, fortificadas com o PI e incluíram ciclos de congelamento e descongelamento, estabilidade pós-processamento (14 h), estabilidade de curta duração (24 e 48 h a 4°C), estabilidade de curta duração com e sem controle de temperatura, durante 4 h antes da extração, e estabilidade de longa duração para amostras de fluido oral e soluções trabalho após o armazenamento por 1 mês a uma temperatura média de -10°C para as amostras de fluido oral e de 4°C para as soluções.

Os resultados analíticos foram obtidos através de uma curva de calibração preparada no dia de cada análise, obtendo como resultado o desvio padrão da média das concentrações obtidas com relação ao valor nominal, que não deve ultrapassar 15% para as amostras de fluido oral e 10% para as soluções.

4.7.7 Recuperação

Para o ensaio de recuperação foram preparadas triplicatas das amostras de CQB, CQM e CQA em fluido oral e água destilada. As concentrações foram calculadas com base em uma curva de calibração preparada no dia da análise, através da relação entre as concentrações obtidas em fluido oral e em água destilada x 100.

4.8 Análises Estatísticas

A adequação do modelo dos mínimos quadrados ordinários foi avaliada em três curvas padrões (n= 21). Os dados foram analisados sem transformações matemáticas através da regressão linear, análise de resíduos (considerando um intervalo de confiança de 95%) e análise de variância (ANOVA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Otimização dos parâmetros do HS

Os resultados experimentais obtidos a partir da matriz proposta foram avaliados através da superfície de resposta, gerando um modelo polinomial empírico de segunda ordem que descreve a relação entre as respostas e os fatores considerados (equação 2).

Equação (2)

$$y = - 413099 + 6377x_1 + 21882x_2 - 189x_3 - 185x_1x_2 + 4x_1x_3 - x_2x_3 - 18x_1^2 - 287x_2^2$$

Onde x_1 representa a temperatura de aquecimento, x_2 , o tempo de agitação e x_3 e o volume de injeção da amostra.

De acordo com a superfície de resposta, a resposta aumenta proporcionalmente ao aumento no volume de injeção (fig 5). Assim, o volume de 1000 mL foi selecionado devido à maior resposta gerada. O mesmo aconteceu com a temperatura de aquecimento, a qual obteve uma resposta ótima na temperatura de 90 °C. O tempo de agitação foi a característica mais importante avaliada e é considerada um fator de risco independente, porque é capaz de gerar um efeito negativo quadrático na superfície da resposta, ($p < 0,05$). Após 7 minutos de agitação ocorreu uma diminuição significativa na resposta (fig 5), que foi mais evidente após 10 min. Esta conclusão reflete o oposto dos resultados apresentados até o momento na literatura para a análise de etanol, que geralmente possui um tempo de aquecimento superior a 10 min.

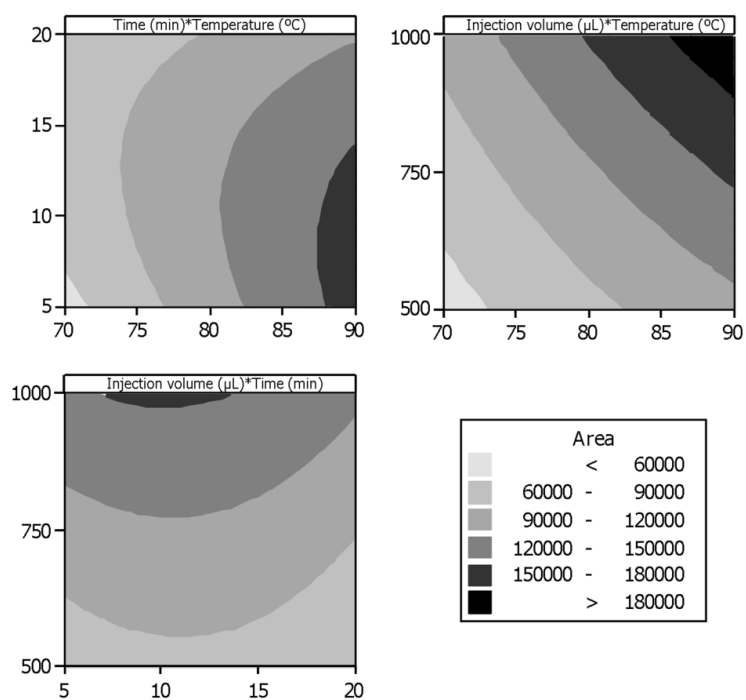


Figura 5. Gráficos de contorno obtidos através do BBD para os três fatores avaliados no HS: tempo de agitação, temperatura de aquecimento e volume de injeção.

A capacidade preditiva do modelo matemático gerado foi avaliada através da análise de cinco repetições da mesma amostra, avaliada sob as condições ótimas de 90 °C para a temperatura de aquecimento, 7 min para o tempo de agitação e 1000 µL para o volume de injeção.

A capacidade preditiva do modelo foi atestada pela alta similaridade entre a área prevista e áreas experimentais obtidas (tabela 7). Através da avaliação da capacidade preditiva, foi possível confirmar a validade do modelo matemático gerado para determinar as condições ótimas de extração, considerando a combinação dos três fatores avaliados. Assim, os parâmetros obtidos para o HS no desenho experimental foram utilizados para a validação analítica, assegurando uma maior sensibilidade da técnica.

Tabela 7. Resultados obtidos pela avaliação da capacidade preditiva do modelo matemático gerado.

	Área predita ^a	Área obtida (n=5) ^b	Capacidade preditiva (%)
	208800	224520	107,5
DP		28389	13,6
DPR		12,64	12,6

^a valor predito a partir do modelo matemático gerado

^b área experimental obtida a partir das condições ótimas

5.2 Validação

Apesar de ser pouco utilizada nos laboratórios forenses para a determinação do etanol, a análise realizada por CG/EM pela metodologia proposta mostrou ser eficaz para a determinação de etanol em fluido oral, através da análise simultânea do cromatograma e do espectro de massas (fig 6 e 7). Os tempos de retenção (TR) obtidos para o etanol e para o PI foram iguais a 1,78 e 2,80 min, respectivamente. Para o monitoramento do etanol e do PI foram escolhidos os íons mais abundantes e representativos das moléculas (pico base e íon molecular) (fig 6).

O método proposto também se mostrou eficaz nas análises de etanol através de CG/DIC, com um TR de 2,02 para o etanol e 3,17min para o PI (fig 8). O tempo de análise total de 10 min foi mantido devido à análise simultânea de solventes interferentes realizada no ensaio de seletividade.



Figura 6. Cromatograma da análise de Etanol (1) e PI (2) em fluido oral utilizando CG/EM.

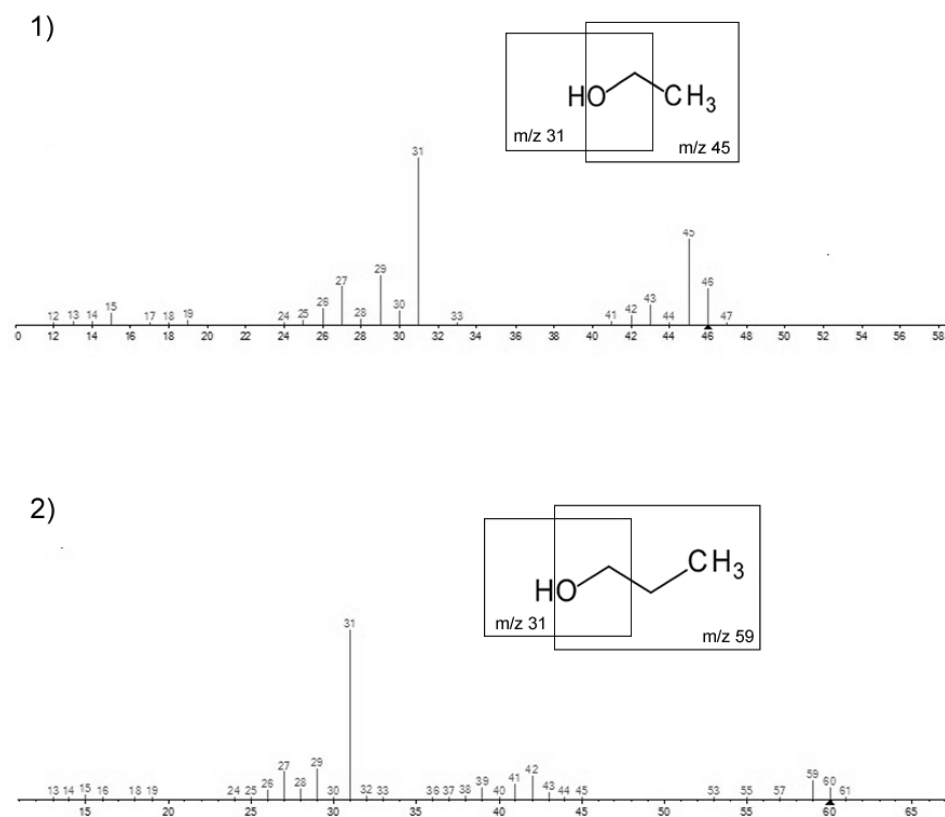


Figura 7. Espectro de massas do Etanol (1) e PI (2) e os respectivos modelos de fragmentação propostos para as moléculas, com os íons utilizados no seu monitoramento.

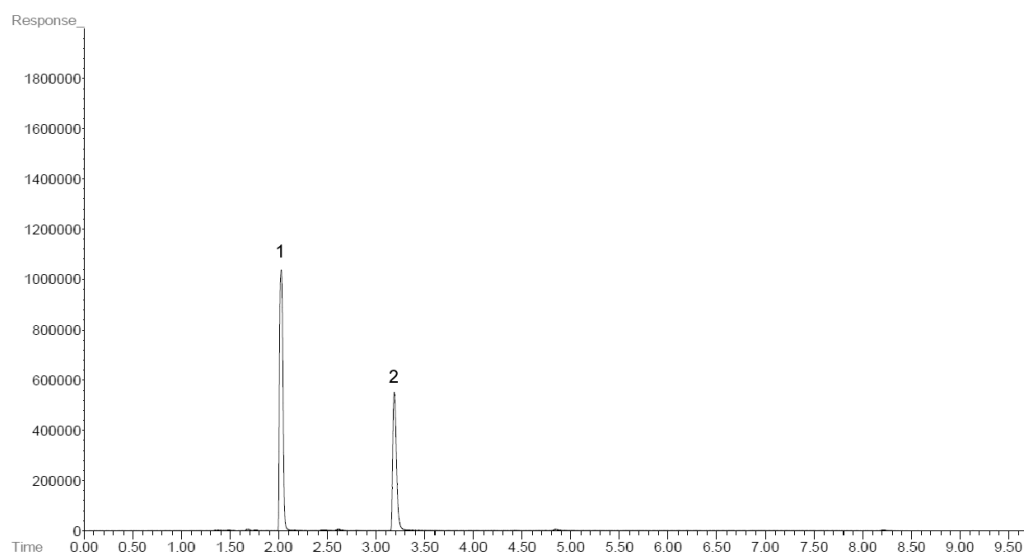


Figura 8. Cromatograma da análise de Etanol (1) e PI (2) em fluido oral utilizando HS-CG/DIC.

A recuperação foi testada pela comparação dos resultados obtidos em água e fluido oral através de uma curva de calibração preparada no dia das análises, para os CQ baixo, médio e alto, obtendo-se os valores adequados para o método proposto. Corroborando com os resultados obtidos, os dados de recuperação obtidos nas análises por CG/DIC não apresentaram variação superior a 5%, mostrando a efetividade da extração através da técnica de HS pelo método desenvolvido (tabela 8).

Tabela 8 Recuperação obtida através da relação do fluido oral e água em CG/EM e CG/DIC.

Amostra CQ	CG/EM		CG/DIC	
	Recuperação (%)	CV (%)	Recuperação (%)	CV (%)
CQB (n=3)	103,63	4,3	95,1	4,6
CQM (n=3)	99,92	1,3	100,5	2,3
CQA (n=3)	96,22	3,0	103,4	3,5

CQ: Controle de qualidade

CQB: CQ baixo (0,1 g/L); CQM: CQ médio (0,5 g/L); CQA: CQ alto (1,5 g/L).

A curva de calibração do método foi construída a partir de 7 pontos na faixa de 0,05-2,0 g/L, em três dias distintos. Para avaliar a linearidade da faixa testada foi utilizada a regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ordinários. Obteve-se um R^2 na ordem de 0,99 em todas as equações, observando-se um aumento proporcional da razão das áreas em relação à concentração dos analitos (tabela 9). A linearidade também avaliada pelo efeito residual, mostrando uma dispersão uniforme dos pontos em torno da reta. De acordo com os gráficos de resíduos obtidos, observou-se a homocedasticidade da faixa testada no intervalo de confiança de 95% e a ausência de *outliers*, pontos considerados como observações atípicas fora do intervalo de confiança estabelecido. O teste de ANOVA também foi realizado e apresentou valores de $p > 0,05$ (tabela 9), demonstrando que não houve desvios da linearidade, e evidenciando, portanto, a adequabilidade da descrição dos dados para

avaliar a linearidade do método (fig 9). Apesar de normalmente ser empregado somente o teste dos mínimos quadrados ordinários para a avaliação da linearidade, questiona-se a sua viabilidade quando analisado isoladamente, já que a confirmação por outros testes pode indicar a inexistência da correlação proporcional entre as áreas obtidas dos analitos e as concentrações testadas (heterocedasticidade) (SOUZA et al., 2011). Desta forma, destaca-se a importância da realização de análises complementares à dos mínimos quadrados ordinários, de forma a apresentar os resultados da regressão linear com confiança, garantindo assim a linearidade do método desenvolvido.

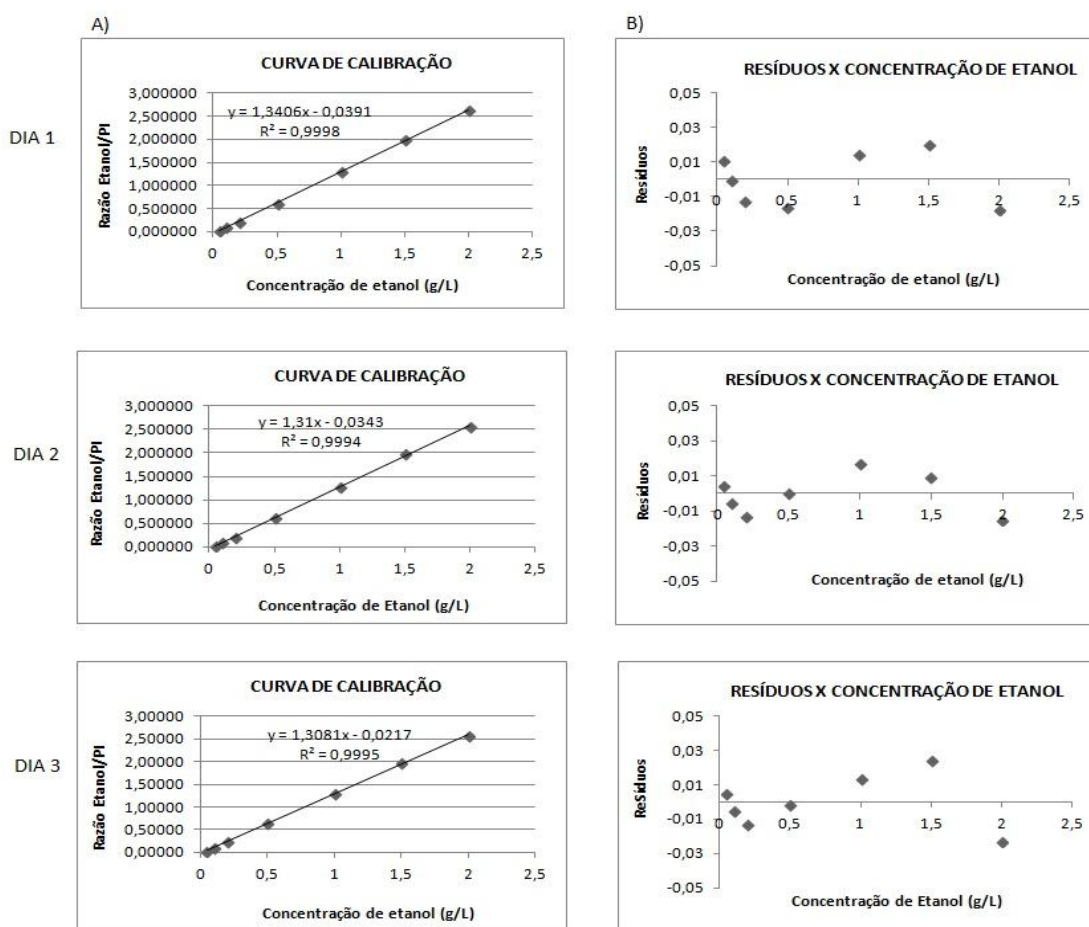


Figura 9. Curvas de calibração referente a três dias distintos de análise (A) e as respectivas análises de resíduos (B), utilizando CG/EM.

Os resultados obtidos pelas análises realizadas em CG/DIC também confirmaram a linearidade do método, através da análise do R^2 , análise de resíduos e ANOVA ($p > 0,05$) (tabela 9).

Tabela 9. Resultados obtidos a partir dos mínimos quadrados ordinários e ANOVA.

	CG/DIC			CG/EM		
	Equação ^a	R ² ^b	p ^c	Equação ^a	R ² ^b	p ^c
1	$y = 1,3302x - 0,0246$	0,9993	0,1884	$y = 1,3081x - 0,0217$	0,9995	0,6594
2	$y = 1,4203x - 0,0387$	0,9975	0,2332	$y = 1,31x - 0,0343$	0,9994	0,6817
3	$y = 1,3797x - 0,0311$	0,9978	0,3461	$y = 1,3406x - 0,0391$	0,9998	0,6534

^a: Equação da reta

^b: R² obtido a partir da curva de calibração

^c: Valor de p obtido a partir de análise de variância (ANOVA)

As respostas dos picos interferentes nas amostras branco, injetadas após o LSQ e CQA foram inferiores a 5% para o etanol e PI, permanecendo dentro dos limites estabelecidos e descartando a ocorrência de efeito residual durante as análises de etanol em fluido oral. Apesar de também estar de acordo com os limites estabelecidos nas análises realizadas através de HS-CG/DIC, o efeito residual foi de aproximadamente 20% para o etanol após a injeção da segunda e terceira amostra do LSQ. Desta forma, a fim de se evitar a interferência nos resultados obtidos para o etanol, após a análise das amostras do LSQ foi realizada a injeção de duas amostras branco.

O efeito matriz foi obtido pelo CV das amostras preparadas em água e fluido oral realizado através de CG/EM apresentou valores iguais a 3,51% para o CQB e 1,3% para o CQA. As análises utilizando CG/DIC também apresentaram resultados inferiores a 15%, conforme o preconizado para as duas concentrações testadas, confirmando que não há interferência da matriz na resposta do etanol nas análises realizadas pelas duas metodologias.

O LIQ do etanol em fluido oral foi igual a 0,0125 g/L, com uma precisão e exatidão intradia inferiores a 15%. O LD estimado através da relação sinal ruído igual a três, foi de 0,005 g/L, inferior ao encontrado nas análises por CG/DIC que apresentaram um LD igual a 0,0129 g/L, demonstrando a maior sensibilidade da técnica proposta, viabilizando a sua implementação na rotina dos laboratórios forenses.

Os resultados obtidos para a precisão e exatidão interdia e intradia não excederam 12%, mostrando-se adequados para o método proposto e de acordo com as guias de validação para métodos bioanalíticos, assim como os valores obtidos através de CG/DIC, que foram inferiores a 15% (tabela 10).

Tabela 10. Exatidão e precisão intradia e interdia do etanol em fluido oral utilizando CG/EM e CG/DIC.

	CG/EM				CG/DIC			
	Intradia		Interdia		Intradia		Interdia	
CQ (n=5)	Exatidão (%)	DPR (%)	Exatidão (%)	DPR (%)	Exatidão (%)	DPR (%)	Exatidão (%)	DPR (%)
LIQ	111,3	1,9	103,5	2,8	114,0	5,3	106,0	11,9
CQB	97,9	1,4	93,4	3,5	106,0	4,7	107,0	2,1
CQM	97,5	2,2	97,9	1,5	92,2	6,0	95,0	3,4
CQA	105,2	4,7	101,9	4,2	95,7	4,4	96,7	0,9
CQD	101,6	2,4	103,1	10,3	93,0	6,4	98,7	5,4

CQ: Controle de qualidade

LIQ: Limite inferior de quantificação (0,05 g/L); CQB: CQ baixo (0,1 g/L); CQM: CQ médio (0,5 g/L); CQA: CQ alto (1,5 g/L) e CQD: CQ de diluição (4,0 g/L).

O ensaio de estabilidade foi realizado com a intenção de reproduzir a rotina de coletas de fluido oral e seu transporte até o laboratório. Para o ensaio foram empregadas amostras de CQB e CQA em triplicata, as quais foram armazenadas no refrigerador durante 24 e 48h. As amostras também permaneceram a temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) e em ambiente com temperatura controlada ($\pm 20^{\circ}\text{C}$) durante 4h, além de serem reanalisadas após 14h (tempo superior ao intervalo mais longo compreendido entre o final do preparo das amostras e corrida analítica mais longa). Todas as amostras demonstraram variação inferior a 15%, assim como as amostras submetidas aos ciclos de congelamento e descongelamento (tabela 11). Também foi realizada a estabilidade de longa duração das amostras de fluido oral, que permaneceram a uma temperatura média de -10°C durante 1 mês. As soluções estoque de etanol preparadas em água destilada também foram submetidas ao teste

de longa duração pelo mesmo período, mas foram armazenadas a uma temperatura de 4°C, assim como permaneceram as soluções durante o ensaio de validação. As amostras de fluido oral e as soluções empregadas no ensaio de longa duração apresentaram variação superior a 15 e 10%, respectivamente, e, portanto, conforme as guias de validação, não são consideradas estáveis nas condições a que foram submetidas durante o ensaio.

As soluções de etanol e as amostras de fluido oral preparadas durante a validação provaram ser estáveis sob a maior parte das condições testadas, exceto para o ensaio de longa duração. No entanto, não foram testadas outras condições para o ensaio de longa duração que podem possibilitar o seu armazenamento nas condições preconizadas como o congelamento a temperaturas iguais a -20°C ou -40°C. Ainda assim, nos demais ensaios realizados, que reproduzem a rotina de armazenamento e de análises, as amostras não apresentaram variação significativa, possibilitando sua coleta, preparo e transporte sob as condições habituais requeridas para o seu emprego no monitoramento do etanol em condutores.

Tabela 11. Valores obtidos nos ensaios de estabilidade para as amostras de CQA e CQB.

ENSAIO DE ESTABILIDADE	CQB (n=3) (%)	CQA (n=3) (%)
Pós-processamento (14h)	97,5	99,4
Curta duração - 24h (4°C)	99,6	95,0
Curta duração - 48h (4°C)	92,5	97,5
Congelamento e descongelamento (3 ciclos de 24 h)	101,9	102,4
4h temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$)	86,7	96,0
4h (20°C)	93,0	102,3

CQ: Controle de qualidade

CQB: CQ baixo (0,1 g/L); CQA: CQ alto (1,5 g/L).

A seletividade do método foi realizada através da injeção de amostras branco de fluido oral de seis indivíduos distintos e não apresentou interferências significativas próximas ao tempo de retenção do etanol, com respostas inferiores a 5% aos

resultados obtidos no LIQ. A seletividade também foi obtida pela análise de metanol, isopropanol, acetato de etila, éter etílico, tolueno e diclorometano, solventes e inalantes que podem apresentar interferência na análise de etanol. O metanol é um dos solventes mais liberados no ambiente e está presente em combustíveis, resinas, corantes, esmaltes, além de ser utilizado na adulteração de bebidas alcoólicas. O isopropanol também pode estar presente em bebidas alcoólicas, tintas gráficas e cola doméstica (LEITE, 2008). Os outros solventes foram escolhidos por serem utilizados como inalantes, podendo causar interferência nas análises de triagem por etilômetro (SPINELLI, 2004). Alguns solventes são fabricados clandestinamente ou contrabandeados para fins de abuso, como é o caso do lança-perfume (cloreto de etila), muito utilizado pelos jovens e do “cheirinho da loló” (mistura de éter etílico, etanol e clorofórmio). Outros compostos importantes utilizados como inalantes estão presentes na cola de sapateiro (mistura de tolueno, n-hexano, metiletilcetona e acetato de etila). Estas substâncias voláteis, quando aspiradas pelo nariz ou pela boca também levam à depressão do sistema nervoso central, podendo provocar confusão, desorientação, perda do autocontrole, sonolência, ataxia, e em casos mais severos, inconsciência, depressão respiratória e parada respiratória (PEDROZO e JESUS, 2008).

A análise simultânea de etanol e solventes foi realizada através de HS-CG/EM no modo *scan*. Nenhuma das substâncias testadas interferiu na análise do etanol, que obteve um TR de 1,78 min, apresentando uma boa separação dos demais compostos testados (fig 10), além de espectro de massas bem definido (fig 11, 12 e 13), excluindo a possibilidade de resultados falso-positivos para os solventes testados. Considerando a avaliação simultânea do espectro de massas, a confirmação do etanol por outro sistema cromatográfico não é necessária, demonstrando que o método proposto é capaz de realizar a identificação inequívoca do analito, tendo desempenho compatível com as análises forenses e permitindo a aplicação de métodos paralelos para a determinação simultânea de outras substâncias psicoativas, utilizando CG/EM e o fluido oral como matriz biológica, como os métodos previamente desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa (SOUZA et al., 2011; ZANCANARO et al., 2012; MARIOTTI et al., 2013).

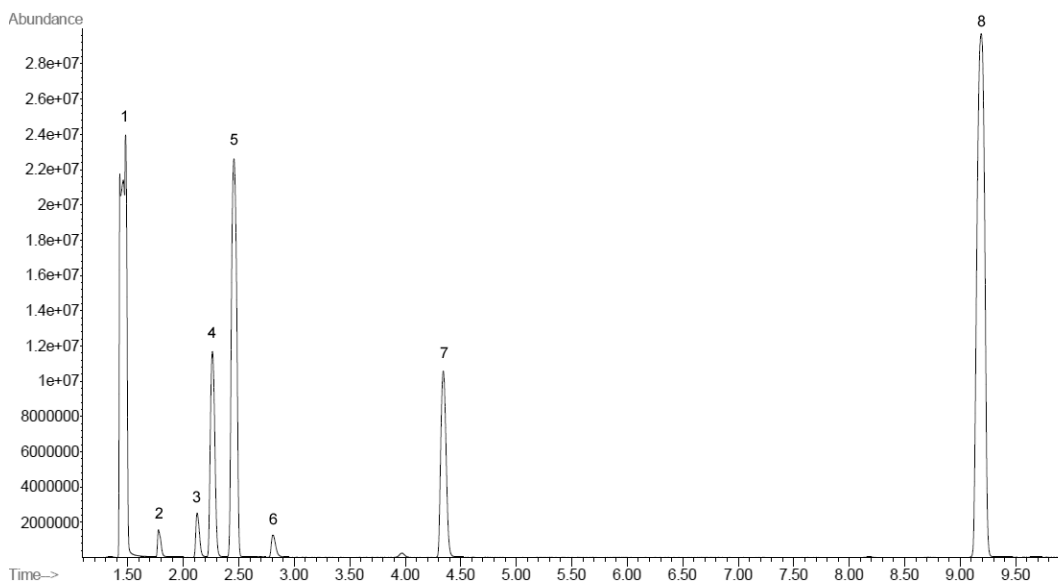


Figura 10. Cromatograma da análise de etanol em fluido oral e seus possíveis interferentes. (1) Metanol, (2) Etanol, (3) Isopropanol, (4) Diclorometano, (5) Éter etílico, (6) PI, (7) Acetato de Etila e (8) Tolueno.

Normalmente os métodos de análise de substâncias lícitas e ilícitas utilizadas no trânsito realizam a determinação do etanol através de HS-CG/DIC e das demais substâncias por CG/EM ou Cromatografia Líquida acoplada a detector de Massas (LC/EM), conforme realizado por YONAMINE, 2003, que monitorou o uso de substâncias ilícitas e de etanol nas rodovias do estado de São Paulo. Não foi encontrado na literatura o relato da análise de etanol em fluido oral utilizando CG/EM. O método proposto mostrou ser rápido, sensível e facilmente aplicável na rotina laboratorial já que não requer o pré-tratamento das amostras de fluido oral, e desta forma, propicia o desenvolvimento futuro de métodos para o monitoramento simultâneo de etanol, solventes e outras substâncias psicoativas, tanto para avaliação do consumo no trânsito, como em análises de solventes no âmbito ocupacional, através do aumento do painel de analitos a serem monitorados.

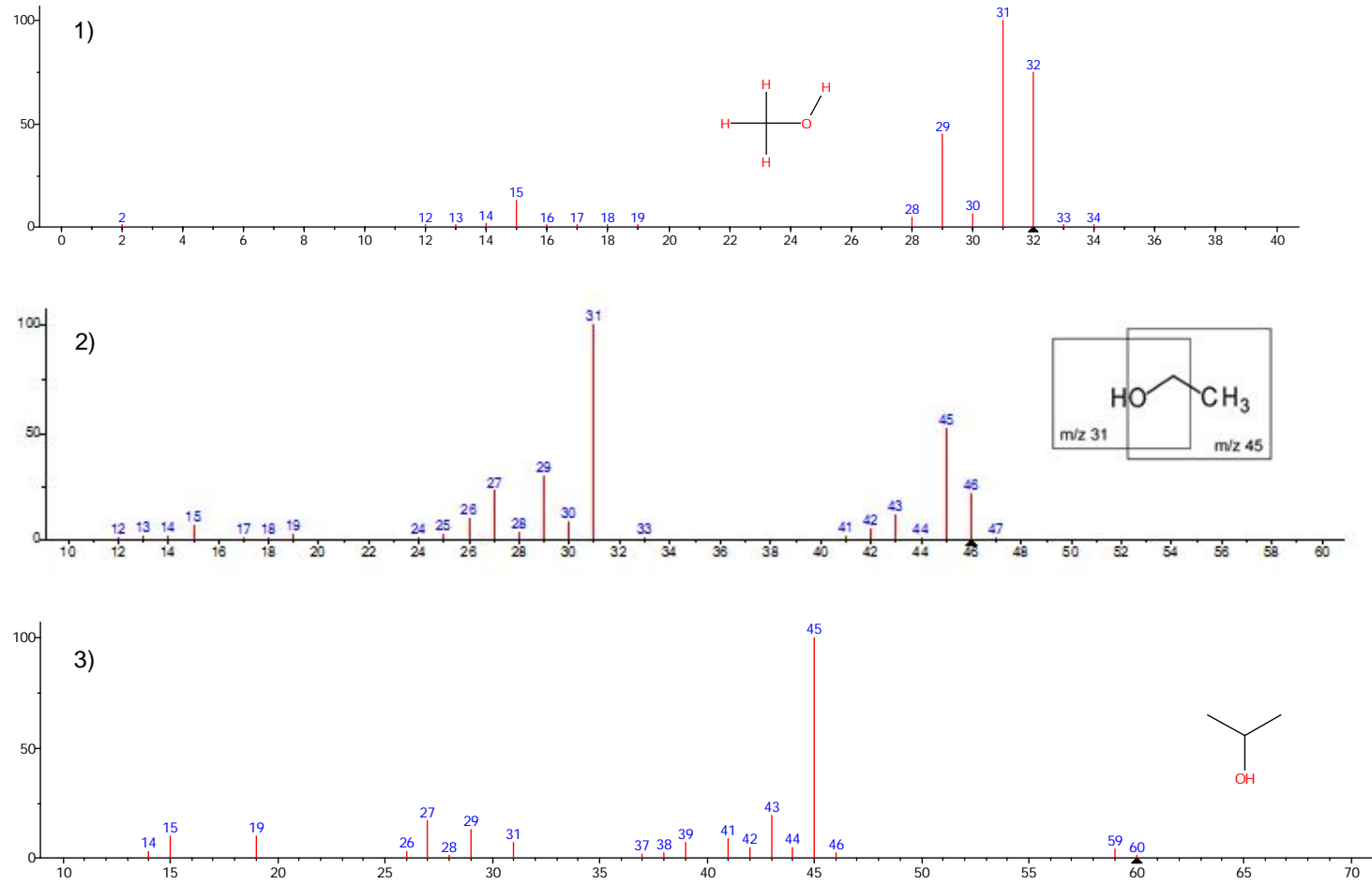


Figura 11. Espectro de massas do Metanol (1), Etanol (2) e Isopropanol (3).

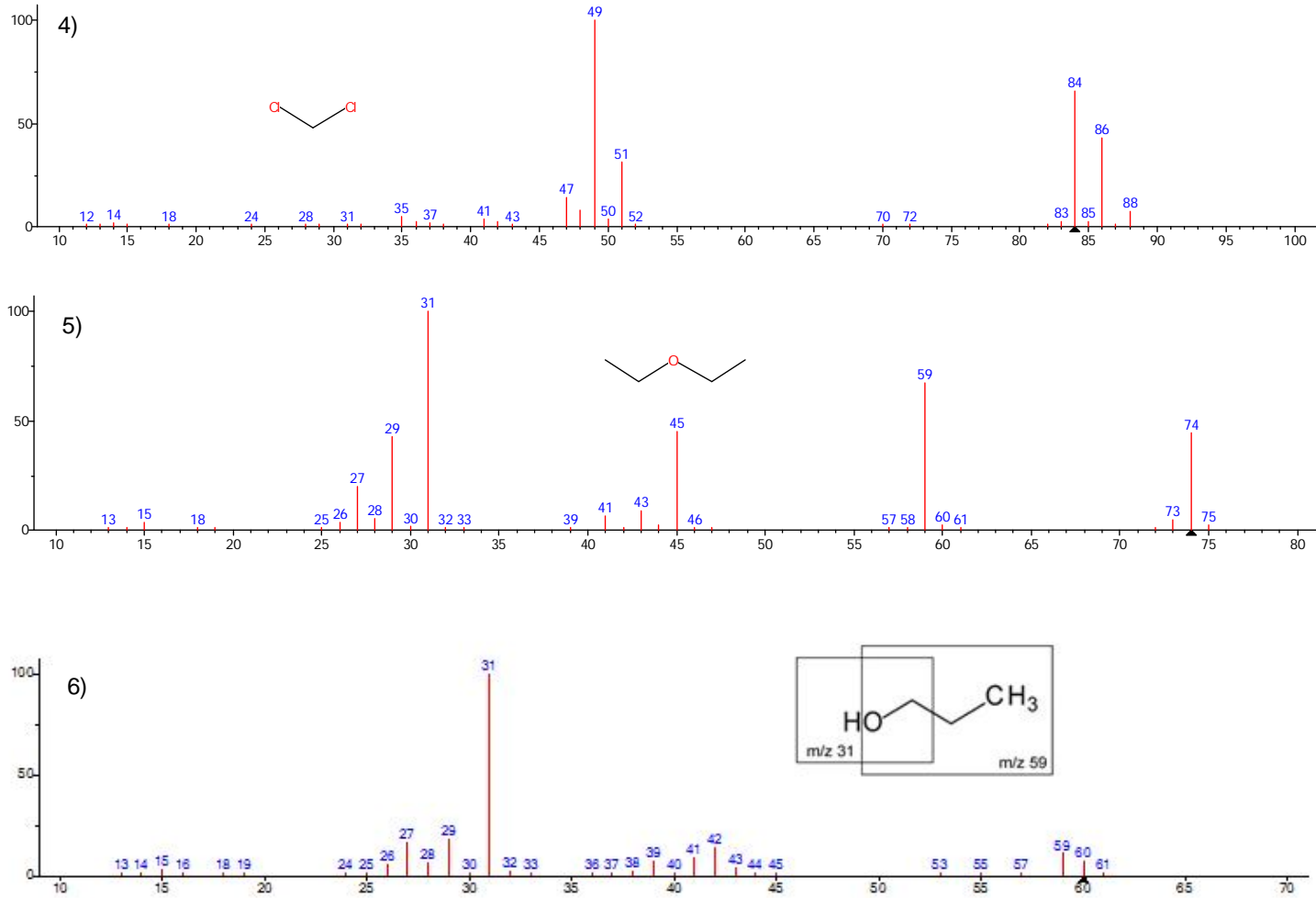


Figura 12. Espectro de massas do Diclorometano (4), Éter etílico (5) e PI (6).

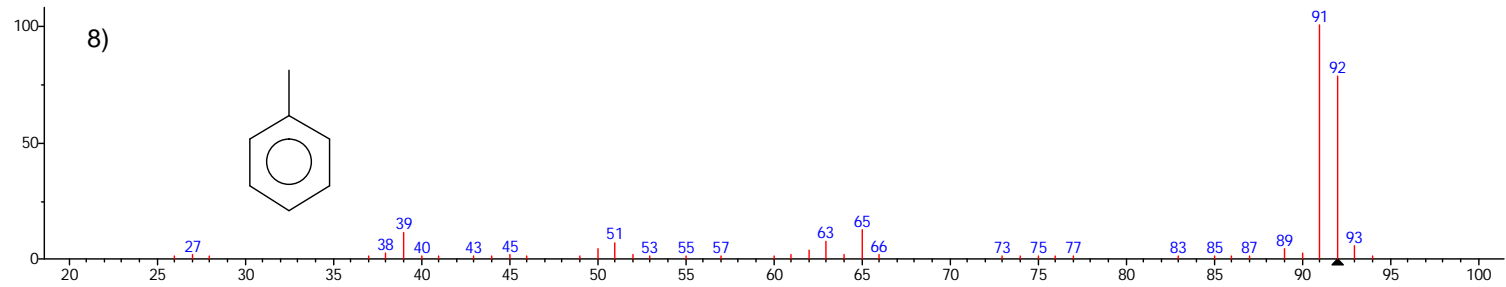
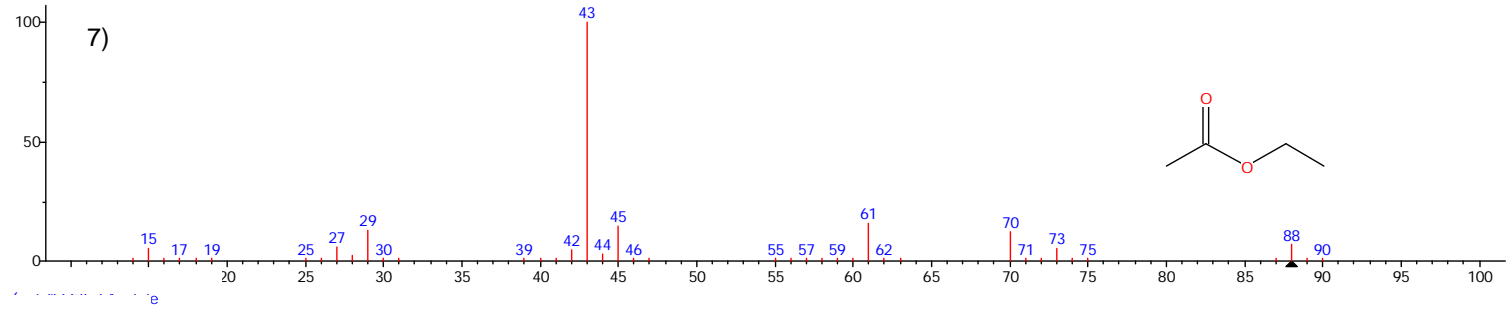


Figura 13. Espectro de massas do Acetato de Etila (7) e Tolueno (8).

6 CONCLUSÕES

A partir do desenho experimental realizado foi possível otimizar a extração por HS garantindo uma maior sensibilidade da técnica ao etanol, além de reduzir o tempo de incubação para 7 minutos, diminuindo o tempo das análises. A validação analítica mostrou que o método desenvolvido é linear, específico, com recuperação, precisão, exatidão e estabilidade dentro dos limites aceitos para métodos bioanalíticos pelo FDA e ANVISA. O método também provou ser simples, sem etapas de preparação da amostra, e sensível, apresentando limites de detecção inferiores aos obtidos pelas análises realizadas em HS-CG/DIC, viabilizando sua aplicação na rotina laboratorial.

A partir dos resultados obtidos, destaca-se a viabilidade de desenvolvimento de um método utilizando a técnica de HS-CG/EM para o monitoramento simultâneo de etanol e outros solventes e inalantes, no âmbito da toxicologia social (abuso) e ocupacional, que também possuem altos índices de abuso pela população brasileira e também provocam alterações no SNC, oferecendo risco ao ato de dirigir.

A possibilidade de coleta do fluido oral no local da abordagem policial, evitando a extrapolação da janela analítica do etanol, como ocorre na coleta do sangue que necessita de ambiente laboratorial para ser realizada, além da simplicidade e confiabilidade do método analítico proposto, evidenciam a sua aplicabilidade, com a robustez necessária para suportar um processo legal, preenchendo desta forma, uma lacuna na confirmação dos resultados do consumo de etanol pelos condutores no Brasil.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, A. M. M; LIMA, J. M. B; ALVES, T. A. O impacto do álcool na mortalidade em acidentes de trânsito: uma questão de saúde pública. **Escola Anna Nery Revista de Enfermagem**, v. 10, n. 1, p. 87-94, 2006.

ALIYEV, V; DURAL, E; KARAKUS, A; KAYA, S; KAYAALTI, Z; MERGEN, G Simultaneous headspace-GC-FID analysis for methanol and ethanol in blood, saliva and urine: validation of method and comparison of specimens. **Liquid Chromatography Gas Chromatography Europe**, v. 28, n. 7, p. 292, 2011.

APS, J. K. M; MARTENS, L. C. Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. **Forensic Science International**, v. 150, n. 2-3, p. 119-131, 2005.

BACCHIERI, G, BARROS, A. J. D. Acidentes de trânsito no Brasil de 1998-2010: muitas mudanças e poucos resultados. **Revista de Saúde Pública**, v.6, n.45, p. 949, 2011.

BENDTSEN, P; HULTBERG, J; CARBON, M; JONES, A. W. Monitoring ethanol exposure in a clinical setting by analysis of blood, breath, saliva, and urine. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 23, n.9, p. 1446-1451, 1999.

BERGSTRÖM, J; HELANDER, A; JONES, A. W. Ethyl glucuronide concentrations in two successive urinary voids from drinking drivers: relationship to creatinine content and blood and urine ethanol concentrations. **Forensic Science International**, v.133, n. 1-2, p. 86-94, 2003.

BOSKER, W. M; HUESTIS, M. A. Oral Fluid Testing for Drugs of Abuse. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 11, p. 1910-1931, 2009.

BRASIL. Lei nº. 11.705 de 19 de junho de 2008. Altera a Lei nº 9.503, de 23 de setembro de 1997, que institui o Código de Trânsito Brasileiro, e a Lei nº 9.294, de 15 de julho de 1996, que dispõe sobre as restrições ao uso e à propaganda de produtos fumíferos, bebidas alcoólicas, medicamentos, terapias e defensivos agrícolas. In: **Diário Oficial da União**, Brasília, 20 jun. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos. In: **Diário Oficial da União**, Brasília, 22 maio 2012.

BRASIL. Conselho Nacional de Trânsito. Resolução nº432, de 23 de janeiro de 2013. Dispõe sobre os procedimentos a serem adotados pelas autoridades de trânsito e seus agentes na fiscalização do consumo de álcool ou de outra substância psicoativa que determine dependência, para aplicação do disposto nos arts. 165, 276, 277 e 306 da Lei nº 9.503, de 23 de setembro de 1997 – Código de Trânsito Brasileiro (CTB). In: **Diário Oficial da União**, Brasília, 28 jan. 2013.

BROWNINGA, M. D. Alcohol inhibition of the NMDA receptor function, long-term potentiation, and fear learning requires striatal-enriched protein tyrosine phosphatase. **Proceedings of National Academy of Science**, v. 108, n. 16, 2011.

CEBRID-CENTRO BRASILEIRO DE INFORMAÇÕES SOBRE DROGAS PSICOTRÓPICAS. **II Levantamento Domiciliar sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil**. Secretaria Nacional Antidrogas, 2005. Disponível em: <http://www.unodc.org/pdf/brazil/II%20Levantamento%20Domiciliar%20Dr%20Elisald%20Carlini_alterado2.pdf>. Acesso em: 12 nov. 2012.

CHIAPPIN, S; ANTONELLI, G; GATTI, R; DE PALO, E. F. Saliva specimen: A new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. **Clinica Chimica Acta**, v. 383, n. 1-2, p. 30-40, 2007.

CHRISTOPHER, T. A; ZECCARDI, J. A. Evaluation of the Q.E.D. in saliva alcohol test: a new, rapid, accurate device for measuring ethanol in saliva. **Annals Of Emergency Medicine**, v. 21, n. 9, p. 1135-1137, 1992.

CONCEIÇÃO, T. V; DE BONI, R. B; DUARTE, P. C. A. V; PECHANSKY, F. Awareness of legal blood alcohol concentration limits amongst respondents of a national roadside survey for alcohol and traffic behaviours in Brazil. **International Journal of Drug Policy**, v. 23, n. 2, p.166–168, 2012.

CONE, E. J; HUESTIS, M. A. Interpretation of oral fluid tests for drugs of abuse. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1098, n. 1, p. 51-103, 2007.

CONIGRAVE, K. M; DAVIES, P; HABER, P; WHITFIELD, J. B. Traditional markers of excessive alcohol use. **Addiction**, v. 98, n. 2, p. 31–43, 2003.

COOPER, G; WILSON, L; REID, C; HAND, C; SPIEHLER, V. Validation of the Cozart. Amphetamine Microplate EIA for the analysis of amphetamines in oral fluid. **Forensic Science International**, v. 159, n.2-3, p. 104-112, 2006.

CORRÊA, C. L; PEDROSO, R. C. Headspace gas chromatography with capillary column for urine alcohol determination. **Journal of Chromatography B**, v. 704, n. 1-2, p. 365-368, 1997.

CRISWELL, H. E, BREESE, G. R. A Conceptualization of Integrated Actions of Ethanol Contributing to its GABA-mimetic Profile: A Commentary. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, n.8, p. 1407–1425, 2005.

CROUCH, D. J. Oral fluid collection: the neglected variable in oral fluid testing. **Forensic Science International**, v. 150, n. 2-3, p. 165-73, 2005.

DE BONI, R. B; BOZZETTI, M. C; HILGERT, J; SOUSA, T; VON DIEMEN, L; BENZANO, D; MENEGON, G; HOLMER, B; DUARTE, P. C. A. V; PECHANSKY, F. Factors associated with alcohol and drug use among traffic crash victims in southern Brazil. **Accident Analysis & Prevention**, v. 43, n. 4, p. 1408–1413, 2011.

DETLING, A; FISCHER, F; BÖHLER, S; ULRICH, F; SKOPPA, G; GRAWB, M; HAFFNER, H. T. Ethanol elimination rates in men and women in consideration of the calculated liver weight. **Alcohol**, v.41, n. 6, p. 415-420, 2007.

DIGREGORIO, G. J; PIRAINO, A. J; RUCH, E Correlations of parotid saliva and blood ethanol concentrations. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 3, n. 1, p. 43-50, 1978.

DRUID. Driving under the Influence of Drugs, Alcohol and Medicines. 6th Framework Programme Deliverable D2.2.3. **Prevalence of alcohol and other psychoactive substances in drivers in general traffic**. Part I: General results, SWOV: Netherlands, 2011. Disponível em: >. Acesso em: 12 nov. 2012.

DRUMMER, O. H; ODELL, M. Pharmacokinetics, metabolism and duration of action. **The forensic pharmacology of drugs of abuse**. p. 279-289. London: Arnold, 2001.

DRUMMER, O. H; GEROSTAMOULOS, D; CHU, M; SWANN, P; BOORMAN, M; CAIRNS, I. Drugs in oral fluid in randomly selected drivers. **Forensic Science International**, v. 170, n. 2-3, p. 105-110, 2007.

DUBOWSKI, K. M. Alcohol determination in the clinical laboratory. **American Journal of Clinical Pathology**. v. 74, n. 5, p. 747-750, 1980.

DUBOWSKI, KM; GADSDEN, R. H; POKLIS, A. The Stability of Ethanol in Human Whole Blood Controls: An Interlaboratory Evaluation. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 21, 1997.

EDENBERG, H. J. The genetics of alcohol metabolism: Role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase variants. **Alcohol Research & Health**, v. 30, n. 1, p. 5–13, 2007.

EHRlich, D; PIRCHL, M; HUMPE, C. Ethanol transiently suppresses choline-acetyltransferase in basal nucleus of Meynert slices. **Brain Research**, v. 1459, p. 35–42, 2012.

ERIKSSON, C. J. P; PEACHEY, J. E. Lack of difference in blood acetaldehyde of alcoholics and controls after ethanol ingestion. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, v. 13, n. 1, p. 101-105, 1980.

ERNSTGARD, L. Influence of gender on the metabolism of alcohols in human saliva in vitro. **Archives of Oral Biology**, v. 54, n. 8, p. 737-742, 2009.

FAGIOLINO, P. Monitorización de fármacos en saliva: aplicaciones biofarmacéuticas, farmacocinéticas y terapéuticas. **Montevideo: Comisión Sectorial de Investigación Científica de la Universidad de la República**, 1999.

FDA. Food and Drug Administration. **Guidance for industry – bioanalytical method validation**, 2001. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>>. Acesso em: 12 dez. 2012.

FELTRACO, L. L; ANTUNES, M. V; LINDEN, R. Determination of ethanol and related volatile compounds in blood and oral fluid by headspace solid-phase micro extraction associated to gas chromatography with flame-ionization detector. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2401-2406, 2009.

FERREIRA, S. L. C; BRUNS, R.E; FERREIRA, H. S; MATOS, G. D; DAVID, J. M; BRANDÃO, G. C; DA SILVA, E. G. P; PORTUGAL, L. A; DOS REIS, P. S; SOUZA, A. S; DOS SANTOS, W. N. L. Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta**, n. 597, n. 2, p. 179–186, 2007.

GJERDE, H; NORMANN, P. T; PETTERSEN, B. S; ASSUM, T; ALDRIN, M; JOHANSEN, U; et al. Prevalence of alcohol and drugs among Norwegian motor vehicle drivers: A roadside survey. **Accident Analysis and Prevention**, v. 40, n. 5, p. 1765-1772, 2008.

GJERDE, H; CHRISTOPHERSEN, A. S; MOAN, I. S; YTTREDAL, B; WALSH, J. M; NORMANN, P. T a. Use of alcohol and drugs by Norwegian employees: a pilot study using questionnaires and analysis of oral fluid. **Journal of Occupational Medicine and Toxicology**, v. 5, n. 13, 2010.

GJERDE, H; NORMANN, P. T; CHRISTOPHERSEN, A. S; SAMUELSEN, S.O; MORLAND, J. (a) Alcohol, psychoactive drugs and fatal road traffic accidents in Norway: a case–control study. **Accident Analysis and Prevention**, v. 43, n. 3, p. 1197–1203, 2011.

GJERDE, H; CHRISTOPHERSEN, A. S; NORMANN, P. T; MORLAND, J. (b) Toxicological investigations of drivers killed in road traffic accidents in Norway during 2006–2008. **Forensic Science International**, v. 212, n. 1-3, p. 102-109, 2011.

GJERDE, H; CHRISTOPHERSEN, A. S; NORMANN, P. T; PETTERSEN, B. S; SABAREDZOVIC, A; SAMUELSEN, S. O, et al. Analysis of alcohol and drugs in oral fluid from truck drivers in Norway. **Traffic Injury Prevention**, v. 13, n. 1, p. 43-48, 2012.

GOMEZ, D; GUTIERREZ, M; MARTINEZ-ACACIO, P; SORIANO, V., Evaluation of a new saliva collection Device for HIV antibody screening purposes. **Vox Sanguinis**, v. 66, n. 3, p. 244, 1994.

GRÖSCHL, M. Current status of salivary hormone analysis. **Clinical Chemistry**, v. 54, n. 11, p. 1759-1769, 2008.

GUBALA, W; ZUBA, D. Gender differences in the pharmacokinetics of ethanol in saliva and blood after oral ingestion. **Polish Journal of Pharmacology**, v. 55, n. 4, p. 639-644, 2003.

GUBALA, W; ZUBA, D. Saliva as an alternative specimen for alcohol determination in the human body. **Polish Journal of Pharmacology**., n. 54, p. 161-165. February, 2002.

HAECKEL, R; BUCKLITSCH, I. The comparability of ethanol concentrations in peripheral blood and saliva. The phenomenon of variation in saliva to blood concentration ratios. **Journal of Clinical Chemistry & Clinical Biochemistry**, v. 25, n. 4, p. 199-204, 1987.

HELANDER, A; PÉTER, O; ZHENG, Y. Monitoring of the alcohol biomarkers PEth, CDT and EtG/EtS in an outpatient treatment setting. **Alcohol and Alcoholism**, v. 47, n. 5, p. 1-6, 2012.

HICKLINA, T. R; WUB, P. H; RADCLIFFED, R. A; FREUNDE, R. K; GOEBEL-GOODYA, S. M; CORREAF, P. R; PROCTORB, W. R; LOMBROSO, P. J;.

HINGSON, R; WINTER, M. Epidemiology and consequences of drinking and driving. **Alcohol Research & Health**, v. 27, n. 1, p. 63-78, 2003.

HOFFMAN, R. S; NELSON, L. S; HOWLAND, M. A; LEWIN, N. A; FLOMENBAUM, N. E; GOLDFRANK, L. R. **Goldfrank's Manual of Toxicologic Emergencies**, 2007.

IMMUNALYSIS CORPORATION. Substance abuse testing. Disponível em: <<http://immunalysis.com/whyquantisal>>. Acesso em 10/01/2013.

IPEA. INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA. **Impactos sociais e econômicos dos acidentes de trânsito nas rodovias brasileiras**. BRASÍLIA: IPEA, 2006. Disponível em: <<http://www.ipea.gov.br>>. Acesso em 05 mar. 2013.

JONES, A. W. A rapid head-space method for ethyl alcohol determination in saliva samples. **Analytical Biochemistry**, v. 86, p. 589-596, 1978.

JONES, A. W. Pharmacokinetics of ethanol in saliva: comparison with blood and breath alcohol profiles, subjective feelings of intoxication and diminished performance. **Clinical Chemistry**, v. 39, n. 9, p. 1837-1844, 1993.

JONES, A. W. Measuring ethanol in saliva with the QED enzymatic test device: comparison of results with blood- and breath-alcohol concentrations. **Journal of analytical Toxicology**, v. 19, n. 3, p. 169-174, 1995.

JONES, A. W. Aspects of In-Vivo Pharmacokinetics of Ethanol. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 24, n. 4, p. 400, 2000.

JONES, A. W; ANDERSSON, L. Comparison of ethanol concentrations in venous blood and end-expired breath during a controlled drinking study. **Forensic Science International**, v. 132, n. 1, p. 18-25, 2003.

JONES, A. W; HOLMGREN, P. Urine/blood ratios of ethanol in deaths attributed to acute alcohol poisoning and chronic alcoholism. **Forensic Science International**, v. 135, n. 3, p. 206-212, 2003.

JONES, A. W; LINDBERG, L; OLSSON, S. G. Magnitude and Time-Course of Arterio-Venous Differences in Blood-Alcohol Concentration in Healthy Men. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 43, n. 15, p. 1157-1166, 2004.

JONES, A. W; KUGELBERG, F. C; HOLMGREN, A; AHLNER, J. Occurrence of ethanol and other drugs in blood and urine specimens from female victims of alleged sexual assault. **Forensic Science International**, v. 181, n. 1-3, p. 40-46, 2008.

KELLY, M. A; KUBIK, P. W; BLANCKENBURG, F. V; SCHLÜCHTER, C. Surface exposure dating of the Great Aletsch Glacier Egesen moraine system, western swiss alps, using the cosmogenic nuclide ^{10}Be . **Journal of Quaternary Science**, v. 19, n. 5, p. 431-441, 2004.

KIDWELL, D. A; HOLLAND, J. C; ATHANASELIS, S. Review: testing for drugs of abuse in saliva and sweat. **Journal of Chromatography B**, v. 713, p. 111-135, 1998.

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

KRISTOFFERSEN, L; SKUTERUD, B; LARSEN, B. R; SKURTVEIT, S; SMITH-KIELLAND, A. Fast quantification of ethanol in whole blood specimens by the enzymatic alcohol dehydrogenase method. Optimization by experimental design. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 29, n. 1, p. 66-70, 2005.

KRISTOFFERSEN, L; SMITH-KIELLAND, A. An automated alcohol dehydrogenase method for ethanol quantification in urine and whole blood. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 29, n. 5, p. 387-389, 2005.

KRISTOFFERSEN, L; STORMYHR, L. E; SMITH-KIELLAND, A. Headspace gas chromatographic determination of ethanol: The use of factorial design to study effects of blood storage and headspace conditions on ethanol stability and acetaldehyde formation in whole blood and plasma. **Forensic Science International**, v. 161, n. 2-3, p. 151-157, 2006.

LEITE, E. M. A. Solventes Orgânicos. In: OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2008. p. 275-324.

LIMBERGER, R. P; FRÖHLICH, P. E; BOEHL, P. O; SOUZA, D. Z; ZANCANARO, I; MARIOTTI, K. C; COMIRAN, E; PRUSCH, D. S; OLIVEIRA, F. Testes toxicológicos para aferição de substâncias psicoativas em condutores. In. PECHANESKY F; ARRUDA PCV, DE BONI RB. **Uso de bebidas alcoólicas e outras drogas nas rodovias brasileiras e outros estudos**. Porto Alegre: Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas; 2010. 121 p.

LINARES, P; RUZ, J; DE CASTRO, M. D. L; VALCARCEL, M. Enzymatic determination of ethanol in saliva by flow injection analysis. **Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis**, v. 5, n. 7, p. 701-706, 1987.

LOGAN, B. K; CASE, G. A; KIESEL, E. L. Differentiation of diethyl ether/acetone and ethanol/acetonitrile solvent pairs, and other common volatiles by dual column headspace gas chromatography. **Journal of Forensic Sciences**, v. 39, n. 6, p. 1544-1551, 1994.

MALEKI, R; FARHADI, K; MATIN, A. A. Analysis of Ethanol and Methanol in Human Body Fluids by Headspace Solid phase Microextraction Coupled with Capillary Gas Chromatography. **Analytical Sciences**, v. 22, n. 9, p. 1253-1255, 2006.

MARIN, A. V. F. **Verificação da janela de detecção de etilglicuronídeo urinário entre usuários crônicos e bebedores sociais de etanol por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.** Dissertação (Mestrado). 2006. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

MARIOTTI, K. C. **Estimulantes-Tipo Anfetamínicos: uma abordagem farmacocinética, epidemiológica e forense.** Tese (Doutorado). 2013. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

MARTINA, K; BARBORA, K; VOJTECH, V; MILOSLAV, K; KATARINA, L; LADISLAV, V; MARTIN, H. The Key amino acid residues within the third membrane domains of NR1 and NR2 subunits contribute to the regulation of the surface delivery of N-methyl-D-aspartate receptors. **Journal of biological chemistry**, v. 287, n.31, p. 26423-34, 2012.

MARTINIS, B. S; MARTIN, C. C. S. Automated headspace solid-phase microextraction and capillary gas chromatography analysis of ethanol in postmortem specimens. **Forensic Science International**, v. 128, n. 3, p. 115-119, 2002.

MARTINIS, B. S; RUZZENE, M. A. M; MARTIN, C. C. S. Determination of ethanol in human blood and urine by automated headspace solid-phase microextraction and capillary gas chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 522, n. 2, p. 163-168, 2004.

MATTHEWS, D. B; OVERSTREET D. H; REZVANIB, A. H; DEVAUDA, L. L; MORROWA A. L. Effects of sweetened ethanol solutions on ethanol self-administration and blood ethanol levels. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 68, n. 1, p. 13-21, 2001.

MCCARVER-MAY, D. G; DURISIN, L. An Accurate, Automated, Simultaneous Gas Chromatographic Headspace Measurement of Whole Blood Ethanol and Acetaldehyde for Human In Vivo Studies. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 21, n. 2, p. 134-141,1997.

MILLER, B. A; DAY, S. M; VASQUEZ, T. E; EVANS, F. M. Absence of salting out effects in forensic blood alcohol determination at various concentrations of sodium fluoride using semi-automated headspace gas chromatography. **Science & Justice**, v. 44, n. 2, p. 73-76, 2004.

MOFFAT, A. C; OSSELTON, D. M; WIDDOP, B; CLARKE, E. G. C. **Clarke's analysis of drugs and poisons: in pharmaceuticals, body fluids, and postmortem material.** 3 ed. v. 1 London : Pharmaceutical Press, 2004.

MOORE, C. M. Drug of abuse in oral fluid. In: ROPERO-MILLER, J.D.; GOLDBERGER, B.A.; LIU, R.H. **Handbook of workplace drug testing.** AACC Press, 2ª Ed. Washington: American Association of Clinical Chemistry, 2009.

MOREY, T. E; BOOTH, T. M. M; PRATHER, R. A; NIXON, S. J; BOISSONEAULT, J; MELKER, R. J; et al. Measurement of ethanol in gaseous breath using a miniature gas chromatograph. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 3, n. 35, p. 134-142, 2011.

MOURA, E. C; MALTA, D. C; MORAIS NETO, O. L; PENNA, G. O; TEMPORAO, J. G. Direção de veículos motorizados após consumo de bebidas alcoólicas, Brasil, 2006 a 2009. **Revista de Saúde Pública**, v.43, n.5, p. 891-4, 2009.

MOURA, E. C; MORAIS NETO, O. L; MALTA, D. C; MOURA, L; SILVA, N. N; BERNAL, R, et al. Vigilância de fatores de risco para doenças crônicas por inquérito telefônico nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal, 2006. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 11, n. 1, p. 20-37, 2008.

NHTSA. National Highway Traffic Safety Administration. **2007 National Roadside Survey of Alcohol and Drug Use by Drivers**. Washington DC , 2009. Disponível em: <<http://www.nhtsa.gov/DOT/NHTSA/Traffic%20Injury%20Control/Articles/Associated%20Files/811175.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2013.

O'NEAL, C.L; WOLF II, C. E; LEVINE, B; KUNSMAN, G; POKLIS, A. Gas chromatographic procedures for determination of ethanol in postmortem blood using t-butanol and methyl ethyl ketone as internal Standards. **Forensic Science International**, n. 83, p. 31-38, 1996.

ORASURE TECHNOLOGIES. Disponível em: <<http://www.orasure.com/products-substance/products-substance-abuse.asp>>. Acesso em: 10 jan. 2013.

PASSAGLI, M; MARINHO, P. A. Drogas Depressoras do Sistema Nervoso Central. In: PASSAGLI, M. **Toxicologia Forense: Teoria e Prática**. Editora: Millennium, 3ª edição. Campinas, São Paulo, 2011.

PEDROSO, M. F. M; JESUS, M. G. S. S. Inalantes. In: OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2008. p. 405-417.

PELISSIER-ALICOT, A. L; COSTE, N; BARTOLI, C; PIERCECCHI-MARTI, M. D; SANVOISIN, A; GOVERNET, J; et al. Comparison of ethanol concentrations in right cardiac blood, left cardiac blood and peripheral blood in a series of 30 cases. **Forensic Science International**, v. 156, n. 1, p. 35-39, 2006.

PONCE, J. C; LEYTON, V. Drogas ilícitas e trânsito: problema pouco discutido no Brasil. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 35, n. 1, p. 65-69, 2008.

PONTES, H; DE PINHO, P. G; CASAL, S; CARMO, H; SANTOS, A; MAGALHÃES, A; REMIÃO, F; CARVALHO, F; BASTOS, M. L. GC Determination of Acetone, Acetaldehyde, Ethanol, and Methanol in Biological Matrices and Cell Culture. **Journal of Chromatographic Science**, v. 47, n. 4, p. 272-278, 2009.

PORTARI, G. V; MARCHINI, J. S; JORDÃO, A. A. Validation of a manual headspace gas chromatography method for determining volatile compounds in biological fluids. **Labmedicine**, v. 39, n. 1, p. 42-45, 2008.

QUESADA, J. M. L. Alcohol (I) Farmacologia del alcohol. Intoxicación aguda. In: Lorenzo P; Ladero JM; Leza JC; Lizasoain I. **Drogodependencias**. Editorial Medica panamericana. Madrid. p. 233-248, 1998

RABELO, S. H. M. **Etilômetros: metodologia do controle metrológico e desenvolvimento e implantação da cultura de segurança no Brasil**. Dissertação (Mestrado). 2004. Pós-Graduação em Sistemas de Gestão da Universidade Federal Fluminense.

RAGGAM, R. B.; SANTNER, B. I.; KOLLROSER, M.; GÖSSLER, W.; SCHMIED, B.; SCHMITT, U.; STELZL, E.; LACKNER, A.; WAGNER, J.; MARTH, E.; KESSLER, H.H. Evaluation of a novel standardized system for collection and quantification of oral fluid. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. v. 46, n. 2, p. 287-291, 2008.

RESTEK. **A Technical Guide for Static Headspace Analysis Using GC**. Disponível em: <<http://www.restek.com/pdfs/59895B.pdf>>. Acesso em: 12/11/ 2012.

SAMYN, N; LALOUP, N; DE BOECK, G. Bioanalytical procedures for determination of drugs of abuse in oral fluid. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 388, n. 7, p. 1437-1453, 2007.

SANTIAGO, E. F. **Alcoolemia em vítimas fatais de acidentes de trânsito no Rio Grande do Norte empregando cromatografia em fase gasosa – headspace**. Dissertação (Mestrado). 2008. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

SCIVOLETTO; MALBERGIER; PILEGGI. Etanol. In: OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2008. p. 389-403.

SEITZ, H. K, STICKEL, F. Risk factors and mechanisms of hepatocarcinogenesis with special emphasis on alcohol and oxidative stress. **Biological Chemistry** v. 387, p. 349–360, 2006.

SENAD. **I Levantamento Nacional Sobre os Padrões De Consumo de Álcool na População Brasileira**. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/relatorio_padroes_consumo_alcool.pdf. Brasília, DF, 2007. Acesso em: 05 mar. 2013.

SHIPLEY, J.E; ALESSI, N.E; WADE, S.E; HAEGELE, A.D; HELMBOLD, B. Utility of an oral diffusion sink (ODS) device for quantification of saliva corticosteroids in human subjects, **J. Clin. Endocrinol. Metab**, v. 74, p. 698–700, 1992.

SIMONSEN, K. W; STEENTOFT, A; HELS, T; BERNHOFT, I. M; RASMUSSEN, B. S; LINNET, K. Presence of psychoactive substances in oral fluid from randomly selected drivers in Denmark. **Forensic Science International**, v. 221, n. 1-3, p. 33-38, 2012.

SMOLLE, K. H; HOFMANN, G; KAUFMANN, P; LUEGER, A; BRUNNER, G. QED. Alcohol test: a simple and quick method to detect ethanol in saliva of patients in emergency departments. Comparison with the conventional determination in blood. **Intensive Care Medicine**, v. 25, n. 5, p. 492-495, 1999.

SOFT/AAFS. Society of Forensic Toxicologists e American Academy of Forensic Sciences. **Forensic Toxicology Laboratory Guidelines**. 2006. Disponível em: <<http://www.softtox.org/docs/Guidelines%20Draft%202006%20Changes.pdf>>. Acesso em: 16 nov. 2012.

SOUSA, T; CORREA, E; STAMPE, M. Z; JUNIOR, S. S. P; DE BONI, R. B. Custos dos acidentes de trânsito com vítimas associados ao uso de álcool em Porto Alegre Seção B – Capítulo XIV. In: PECHANESKY F, DUARTE PCAV, DE BONI RB. **Uso de bebidas alcoólicas e outras drogas nas rodovias brasileiras e outros estudos**. Porto Alegre: Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas; 2010.

SOUZA, D. Z; BOEHL, P.O; COMIRAN, E; MARIOTTI, K. C; PECHANESKY, F; DUARTE, P. C. A. V; DE BONI, R. B; FROEHLICH, P. E; LIMBERGER, R. P. Determination of amphetamine-type stimulants in oral fluid by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v.696, n. 1-2, p. 67-76, 2011.

SPINELLI, E. **Vigilância Toxicológica: comprovação do uso de álcool e drogas através de testes toxicológicos**. Editora: Interciência. Rio de Janeiro, 2004.

STEENAAR, N. A. E; CLARK, D. W; BRIEN, J. F. Gas-liquid chromatographic analysis of ethanol and acetaldehyde in blood with minimal artifactual acetaldehyde formation. **Journal of Pharmacological Methods**, v. 14, n. 3, p. 199-212, 1985.

TARNOVSKI, G; HAYASHI, T; IGARASHI, K; OCHI, H; MATOBA, R. Misidentification of ethyl chloride in the routine GC-FID analysis for alcohol. **Forensic Science International**, v. 188, n. 1-3, p.e7-9, 2009.

VALE, A. Poisonous substances. Ethanol. **Medicine**, v. 11, n. 35, p. 615, 2007.

WASFI, I. A; AL-AWADHI, A. H; AL-HATALI, Z. N; AL-RAYAMI, F. J; 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, n.2, p. 331-336, 2004.

WATANABE-SUZUKI, K; SENO, H; ISHII, A; KUMAZAWA, T; SUZUKI, O. Ultra-sensitive method for determination of ethanol in whole blood by headspace capillary gas chromatography with cryogenic oven trapping. **Journal of Chromatography B**, v. 727, n. 1-2, p. 89-94, 1999.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Status Report on Road Safety: Time for action**. Geneva: 2009. Disponível em: <http://www.who.int/violence_injury_prevention/road_safety_status/2009>. Acesso em: 10 dez. 2013.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. T Global status report on alcohol and health **World report on traffic injury prevention**. Geneva: World Health Organization; 2011. Disponível em: <http://www.who.int/substance/global_alcohol_report/>. Acesso em: 10 dez. 2013.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. The Global Burden of Disease: 2004 update. Geneva: 2004. **World report on traffic injury prevention**. Geneva: World Health Organization; 2004. Disponível em: <<http://whqlibdoc.who.int/publications/2004/9241562609.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2013.

WINEK, C. L; MURPHY, K. L; WINEK, T. A. The unreliability of using a urine ethanol concentration to predict a blood ethanol concentration. **Forensic Science International**, v. 25, n. 4, p. 277-281, 1984.

YONAMINE, M. **A saliva como espécime biológico para monitorar o uso de álcool, anfetamina, metanfetamina, cocaína e maconha por motoristas profissionais**. Tese (Doutorado). 2004. Programa de Pós Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas da Universidade de São Paulo.

YONAMINE, M; TAWIL, N; MOREAU, R. L. M; SILVA, A. O. 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, n. 1, p. 73-78, 2003.

ZAKHARI, S. Overview: how is alcohol metabolized by the body. **Alcohol Research & Health**, v. 29, n. 2, p. 245-254, 2006.

ZANCANARO, I; LIMBERGER, R. P; BOHEL, P. O; SANTOS, M. K; DE BONI, R. B; PECHANSKY, F; CALDAS, E. D. Prescription and illicit psychoactive drugs in oral fluid-LC-MS/MS method development and analysis of samples from Brazilian drivers. **Forensic Science International**, v. 223, n. 1-3, p. 208-216, 2012.