

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNA TASSI BORILLE

**DETERMINAÇÃO DE ETANOL EM FLUIDO ORAL POR *HEADSPACE*
ASSOCIADA À CROMATOGRÁFIA GASOSA COM DETECTOR DE
IONIZAÇÃO EM CHAMA**

CURITIBA

2013

BRUNA TASSI BORILLE

**DETERMINAÇÃO DE ETANOL EM FLUIDO ORAL POR *HEADSPACE*
ASSOCIADA À CROMATOGRAFIA GASOSA COM DETECTOR DE
IONIZAÇÃO EM CHAMA**

Monografia apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito para a obtenção do título de Especialista em Análises Clínicas.

Orientadora: Prof.^a Dr. Renata Pereira Limberger

CURITIBA

2013

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	1
RESUMO	2
ABSTRACT	3
1 INTRODUÇÃO	4
2 MATERIAIS E MÉTODOS	5
2.1 Equipamentos	5
2.2 Condições Cromatográficas	6
2.3 Materiais	6
2.4 Preparo das Amostras Clínicas	6
2.5 Validação do Método Analítico	7
2.5.1 Limites de Detecção e Quantificação	7
2.5.2 Curva de Calibração e Controles de Qualidade	7
2.5.3 Precisão e Exatidão	8
2.5.4 Estabilidade	8
2.5.5 Efeito Matriz	8
2.5.6. Efeito Residual (Carry Over)	9
2.5.7. Seletividade	9
2.5.8 Recuperação	9
2.5.9 Especificidade	9
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	10
4 CONCLUSÃO	17
5 REFERÊNCIAS	18

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CQA: Controle de Qualidade Alto

CQB: Controle de Qualidade Baixo

CQD: Controle de Qualidade de Diluição

CQM: Controle de Qualidade Médio

CV: Coeficiente de Variação

EPR: Erro Padrão Relativo

FMN: Fator de Matriz Normalizado por Padrão Interno

HS/CG-DIC: *Headspace* associado à cromatografia gasosa com detector de ionização em chama

HS/CG-EM: *Headspace* associado à cromatografia gasosa com detector de massas

LIQ: Limite Inferior de Quantificação

LSQ: Limite Superior de Quantificação

PI: Padrão Interno

RESUMO

O etanol é o principal constituinte de bebidas alcoólicas. Quando consumido de forma abusiva é a principal causa para a ocorrência de acidentes de trânsito. Um método por cromatografia gasosa com detector de headspace de ionização em chama para determinação de etanol em fluido oral foi validado. A coleta de fluido oral foi realizada utilizando um dispositivo QuantisalTM e a separação foi realizada em uma coluna de ZB-BAC1 (30mx0,32mmx1,80µm). O método apresentou especificidade adequada, linearidade >0,997, precisão (0,86-11,91%) e exatidão (92-107%) aceitáveis. Limite de detecção 0,0019 g/L e limite de quantificação 0,005 g/L de etanol em amostras de fluido oral.

Palavras chave: Etanol, Fluido oral, Cromatografia gasosa.

ABSTRACT

Ethanol is the main constituent of alcoholic beverages. When consumed abusively is the main cause for occurrence of traffic accidents. A method by headspace gas chromatography with flame ionization detector for determination of ethanol in oral fluid was validated. The oral fluid collection was performed using Quantisal® device and separation was carried out on a ZB-BAC1 30mx0,32mmx1,80µm) column. The method presented adequate specificity, linearity>0,997, precision (0,86-11,91%) and accuracy (92-107%). The Limit of quantification was 0,005 g/L of ethanol in oral fluid samples.

KEYWORDS: Ethanol, Fluid oral, Gas chromatography.

1 INTRODUÇÃO

Conforme dados obtidos no relatório anual do Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime (UNODC), 2012, enquanto a produção, o tráfico e o uso de drogas ilícitas continuam sendo questões preocupantes, o sistema de controle internacional de drogas parece ter mantido o consumo de drogas ilícitas bem abaixo dos níveis reportados para substâncias psicoativas lícitas, sendo a prevalência anual do uso de álcool 42%, oito vezes maior do que a prevalência anual do uso de drogas ilícitas (5,0%).

No Brasil, o VI Levantamento Nacional Sobre o Consumo de Drogas Psicotrópicas entre Estudantes do Ensino Fundamental e Médio das Redes Pública e Privada de Ensino nas 27 Capitais Brasileiras (SENAD), 2010, revela que 42,4% dos jovens questionados fizeram uso de álcool pelo menos uma vez no ano que antecedeu a pesquisa. No sudeste e centro-oeste, a prevalência encontrada foi 40 a 48%. No norte foi 29 a 40%, no nordeste 36 a 47% e no sul, com a maior prevalência do país, 52 a 56% (SENAD), 2010.

Quando consumido de maneira abusiva, o álcool está associado à consequências negativas para a saúde da população, pois trata-se de um dos principais fatores de risco para o desencadeamento de doenças cardiovasculares, ocorrência de acidentes de trânsito e homicídios, os quais representam a maior causa de morte entre jovens (OMS, 2000).

A cada ano, o uso abusivo de álcool resulta em aproximadamente 2,5 milhões de mortes mundialmente (OMS, 2011). No Brasil, conforme apresentado pelo Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA), 2012, no ano de 2010, o número de mortes no trânsito chegou a 42.844 mil, gerando um custo anual de aproximadamente R\$ 40 bilhões, sendo uma das principais causas a associação do consumo de álcool e direção (IPEA, 2012). Portanto, a análise de etanol em amostras biológicas, como sangue, urina e fluido oral, é frequentemente solicitada para fins legais (ALIYEV *et al*, 2011).

De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), 2009, para cada 0,02% de aumento no nível sérico de etanol há, um aumento de duas vezes no risco de envolvimento em um acidente fatal (OMS, 2009). Assim, uma das análises mais freqüentes e importantes realizadas pelos laboratórios de toxicologia clínica e forense é a determinação de etanol em sangue (FELTRACO, ANTUNES, LINDEN,

2009). Embora o sangue seja a matriz preferencial para monitorar o consumo de álcool no trânsito, diversos trabalhos têm apresentado resultados com a aplicação de amostras de fluido oral para a determinação de etanol (GUBALA, ZUBA, 2003; YONAMINE *et al*, 2003; CONE, HUESTIS, 2007; FELTRACO, ANTUNES, LINDEN, 2009).

O fluido oral, além de apresentar correlação sanguínea para os níveis de etanol (YONAMINE *et al*, 2003; GUBALA, ZUBA, 2002; FELTRACO, ANTUNES, LINDEN, 2009), apresenta vantagens em relação ao sangue, como a possibilidade de uma coleta não invasiva, de fácil realização, assistida e no próprio local onde o indivíduo foi abordado (YONAMINE *et al*, 2003; CONE, HUESTIS, 2007; FELTRACO, ANTUNES, LINDEN, 2009; LIMBERGER *et al*, 2010). Portanto, o fluido oral constitui uma excelente opção em abordagens de trânsito, além de possuir uma taxa de recusa significativamente menor que o sangue (GUBALA, ZUBA, 2003).

O etanol é o principal constituinte em bebidas alcoólicas (SCIVOLETTO *et al*, 2008). Como composto químico, tem baixo peso molecular ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), é polar, altamente solúvel em água, e não se liga às proteínas do plasma, tornando-o um composto adequado para análise em amostras biológicas como sangue, urina, saliva e suor (GUBALA, ZUBA, 2003), já que devido a estas características físico-químicas, distribui-se facilmente em todos os tecidos no organismo (SCIVOLETTO *et al*, 2008). Além disso, devido ao fato da distribuição do etanol no organismo ser proporcional ao teor de água nos tecidos, a concentração de etanol atingida na saliva reflete a concentração encontrada na fração aquosa do sangue total (GUBALA, ZUBA, 2003; SANTIAGO, 2008).

Assim, este trabalho teve como objetivo validar um método para a determinação de etanol, em fluido oral, através da técnica de *headspace* associado à cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (HS/CG-DIC).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Equipamentos

Para a realização do método proposto por *headspace*, foi utilizado o equipamento CG/DIC 5975 C (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, Estados Unidos), equipado com injetor automático de *headspace*, COMBIPAL-CTC Analytics

(Agilent Technologies) localizado no Laboratório de Preparação de Padrões Secundários (LAPPS) da Faculdade de Farmácia da UFRGS.

2.2 Condições Cromatográficas

Os parâmetros do *headspace*, com injetor automático, utilizados para análise foram temperatura de 90 °C com agitação de 500 rpm durante 7 minutos. Para a determinação do etanol foi utilizada coluna ZB-BAC1, Zebron (Phenomenex), 30mx0,32mmx1,80µm, fornecida pela empresa Allcrom, São Paulo. Durante as análises, a temperatura do forno foi programada para iniciar em 40 °C, durante 3 min, com uma rampa de 5 °C/min até alcançar 70 °C, permanecendo nesta temperatura durante 1 min. O tempo da corrida cromatográfica foi 10 min. O gás de arraste utilizado foi Hélio ultrapuro, com fluxo constante de 12,5 mL/min. O injetor foi mantido a uma temperatura de 200 °C e operado no modo split 25:1. Foi empregado detector de ionização em chama, mantido a 200 °C.

2.3 Materiais

O etanol, padrão interno *n*-propanol, metanol, butanol, acetato de etila, tolueno, diclorometado, clorofórmio, isopropanol, foram adquiridos da empresa J.T Baker (Cidade do México, México). Os frascos para *headspace* foram adquiridos da Agilent Technologies. Os dispositivos para coleta de fluido oral, Quantisal™, foram adquiridos da empresa Immunalysis Corporation (Pomona, CA, Estados Unidos) e a coluna Zebron ZB-Bac 1, utilizada no HS/CG-DIC, foi adquirida da Allcrom (São Paulo, SP, Brasil).

2.4 Preparo das Amostras Clínicas

As amostras para a validação do método foram coletadas aleatoriamente, foi realizado um *pool*, este foi congelado para posterior utilização nas análises. A fim de preparar as amostras para análise, foi adicionado à um tudo de vidro 0,9 mL de fluido oral e a cada tudo foi adicionado separadamente 100 µL das soluções de etanol recém preparadas, nas concentrações de estudo: 0,05 g/L; 0,1 g/L; 0,2 g/L; 0,5 g/L; 1,0 g/L; 1,5 g/L; 2,0 g/L. Posteriormente à adição do etanol ao fluido oral, foi

adicionado 3 mL do tampão do dispositivo Quantisal™, a fim de mimetizar o dispositivo de coleta Quantisal™, onde a proporção tampão:fluido oral final encontrada é 3 mL de tampão do dispositivo de coleta e 1 mL de fluido oral. Em seguida foi retirado uma alíquota de 1 mL desta solução, colocada em um frasco de vidro e adicionado 50 µL de *n*-propanol 1 g/L como padrão interno (PI). O frasco foi vedado com septo e tampa rosca, próprios para a utilização da técnica *headspace*.

2.5 Validação do Método Analítico

A validação do método por *headspace* em cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (HS/CG-DIC) foi realizada conforme a Resolução RDC nº 27 da ANVISA, 17 de maio de 2012, que dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos, juntamente com a Resolução RE nº 899, da ANVISA, 29 de maio de 2003, “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Todos os cálculos da validação foram realizados com auxílio do programa Microsoft Excel®.

2.5.1 Limites de Detecção e Quantificação

O Limite Inferior de Quantificação foi estimado considerando os valores de precisão menores que 20% e exatidão entre 80% até 120%, através da análise de amostras independentes adicionadas de etanol. O limite de detecção foi estimado pela relação sinal/ruído de aproximadamente 3:1.

2.5.2 Curva de Calibração e Controles de Qualidade

Foram preparadas soluções 0,5 g/L; 1 g/L; 2 g/L; 5 g/L; 10 g/L; 15 g/L; 20 g/L com a finalidade de, ao adicionar 100 µL de solução em 1 mL de fluido oral, obter as concentrações desejadas para a curva de calibração. Portanto, foi utilizada uma curva de calibração com 7 pontos: 0,05 g/L; 0,1 g/L; 0,2 g/L; 0,5 g/L; 1,0 g/L; 1,5 g/L; 2,0 g/L. As concentrações dos controles de qualidade foram: 0,05 g/L para o limite inferior de quantificação (LIQ); 0,1 g/L para o controle de qualidade baixo (CQB); 0,5 g/L para o controle de qualidade médio (CQM); 1,5 g/L para o controle de qualidade alto (CQA); e 1,0 g/L para o controle de qualidade de diluição (CQD). Todas as soluções foram preparadas em água destilada. A curva de calibração foi construída através da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, onde foi

estabelecida correlação entre a razão da área do pico referente ao etanol e a área do pico de *n*-propanol (*y*) e as concentrações adicionadas (*x*). A curva foi avaliada com base no coeficiente de correlação (r^2).

2.5.3. Precisão e Exatidão

A precisão e a exatidão do método foram avaliadas através da análise dos 5 controles de calibração: (LIQ), (CQB), (CQM), (CQA) e (CQD), realizadas em 5 replicatas, em 3 dias distintos, conforme preconizado por Brasil, 2012. A precisão foi expressa como Coeficiente de Variação (CV) e a exatidão foi expressa como Erro Padrão Relativo (EPR).

$$\text{EPR: } \frac{\text{Concentração Média Experimental}}{\text{Concentração Teórica}} \times 100$$

$$\text{CV: } \frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{Concentração Média Experimental}} \times 100$$

2.5.4 Estabilidade

Para os ensaios de estabilidade foram processadas amostras em triplicata de CQB e CQA e foram imediatamente armazenadas a 4 °C, em tubos de ensaio de vidro. Alíquotas destas amostras foram avaliadas após 24 horas, 48 horas, e 1 mês após do preparo. A estabilidade de curta duração foi avaliada 4 horas após o preparo, a temperatura ambiente. A estabilidade de congelamento e descongelamento foi analisada após 3 ciclos de congelamento e descongelamento em intervalo de 12 horas. A estabilidade pós-processamento foi avaliada 16 horas após o preparo das amostras, armazenada nas condições laboratoriais de preparo da amostra. Em todas as condições de ensaio, a estabilidade foi avaliada com base no desvio padrão em relação ao valor nominal do analito.

2.5.5 Efeito matriz

Foram processadas amostras de fluido oral de 6 indivíduos, e também 6 amostras de solução (água destilada), nas concentrações de CQB e CQA. Então foi calculado o Fator de Matriz Normalizado por PI (FMN). Após, o efeito matriz foi avaliado através do CV (%) dos FMN's.

$$\text{FMN: } \frac{\text{Resposta do Analito em Matriz}}{\text{Resposta do PI em Matriz}} \times \frac{\text{Resposta do Analito em Solução}}{\text{Resposta do PI em Solução}}$$

2.5.6. Efeito Residual (Carry Over)

Foram realizadas 3 injeções da mesma amostra branco, ou seja, amostra processada sem adição de analito e PI, sendo uma injeção antes e duas injeções logo após a injeção de uma ou mais amostras processadas do limite superior de quantificação (LSQ). Foram avaliadas as respostas de picos interferentes no tempo de retenção do analito em relação ao LIQ, e do PI.

2.5.7. Seletividade

Amostras de 8 indivíduos não usuários de etanol foram analisadas, sem adição de analito e PI para avaliar a presença de picos interferentes nos tempos de retenção do etanol e do padrão interno *n*-propanol em relação ao LIQ.

2.5.8 Recuperação

Para o ensaio de recuperação foram analisadas amostras de CQB, CQM e CQA, em triplicata, em fluido oral e em água destilada. A recuperação foi calculada em função da relação de área do padrão extraído em fluido oral e em solução aquosa.

$$\text{Recuperação: } \frac{\text{Concentração Média Experimental em Fluido Oral}}{\text{Concentração Média Experimental em Solução}} \times 100$$

2.5.9 Especificidade

Para o ensaio de especificidade foram preparadas separadamente soluções 0,1 g/L de metanol, etanol, isopropanol, *n*-propanol, acetato de etila, butanol, diclorometano, clorofórmio e tolueno, além de um *pool* contendo todos os solventes. A especificidade do método foi avaliada comparando-se os tempos de retenção de todos os analitos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1 é possível observar a separação cromatográfica do etanol e do PI, bem como o tempo de retenção de ambos, nas concentrações 1,5 g/L para o etanol e 1,0 g/L para o *n*-propanol.

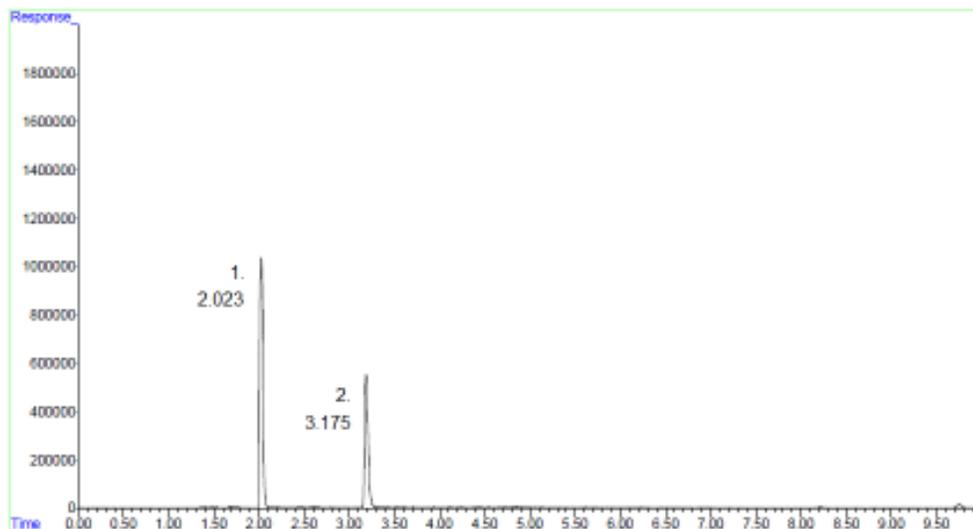


Figura 1. Separação cromatográfica do analito em estudo, etanol (1,5 g/L), e do padrão interno, *n*-propanol (1,0 g/L), juntamente com o tempo de retenção de ambos.

O limite inferior de quantificação do etanol em fluido oral foi igual a 0,05 g/L, com precisão 11,91% e exatidão 106,00%, ambos dentro dos limites preconizados pelo guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos (BRASIL, 2003). O limite de detecção, estimado através da relação sinal ruído 3:1 (BRASIL, 2003) foi 0,019 g/L. Quando comparado com trabalhos publicados na literatura científica, o método proposto neste trabalho obteve limite de quantificação tão sensível quanto aos já publicados (Feltraco, Antunes, Linden, 2009 e YONAMINE *et al*, 2003), porém com método de extração do analito mais simples e barato.

A curva de calibração (Figura 2) representa a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito. Deve-se gerar uma curva de calibração para cada corrida analítica, a qual será usada para calcular a concentração do analito nas amostras, utilizando-se a mesma matriz biológica proposta para o estudo (BRASIL, 2003). A linearidade corresponde à capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração o analito de estudo. Como critério mínimo aceitável, utiliza-se o coeficiente de correlação (r^2),

que deve ser = 0,99. Conforme pode ser observado na Tabela 1, todas as curvas de calibração obtidas estiveram em acordo com o preconizado por Brasil, 2003.

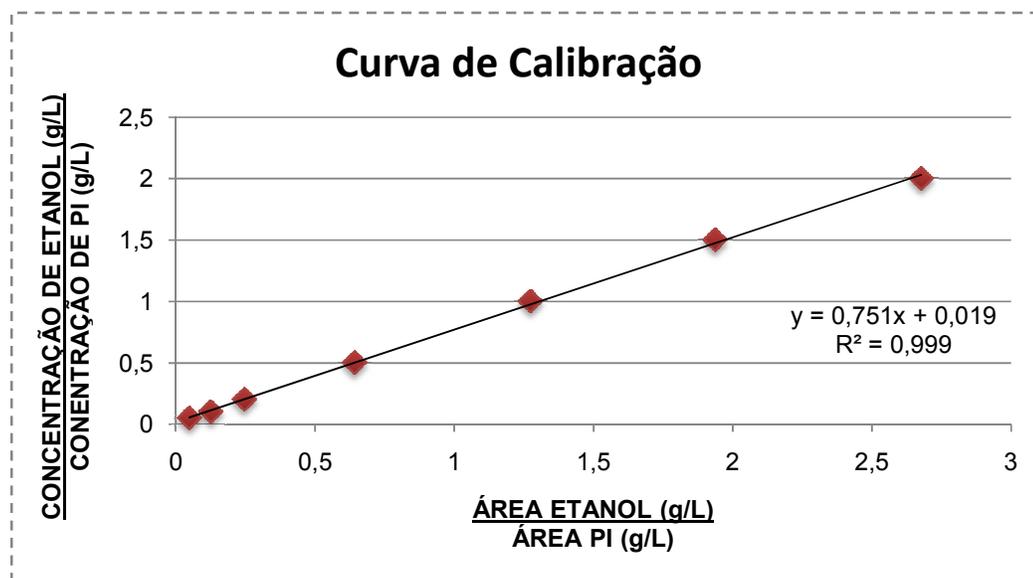


Figura 2. Representação gráfica da curva de calibração do dia 1.

Tabela 1. Resultados obtidos no ensaio de linearidade.

	DIA 1	DIA 2	DIA 3
r^2	0,999	0,997	0,997
Equação	$y = 0,751x + 0,019$	$y = 0,702x + 0,028$	$y = 0,723x + 0,024$

A precisão representa o grau de repetibilidade entre os resultados de análises individuais, obtida dos resultados de uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (BRASIL, 2003; BAZARELLA, 2010). Segundo Brasil, 2012, o ensaio de precisão está aprovado quando os resultados apresentarem valores máximos de CV calculados de até 15%, exceto para o LIQ, para o qual se admite valores menores ou iguais a 20%.

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (BRASIL, 2003; BAZARELLA, 2010). Conforme Brasil, 2012, o ensaio de exatidão encontra-se em conformidade quando encontrados os valores de EPR, dentro de uma faixa de $\pm 15\%$, exceto para o LIQ, onde a faixa admitida é de $\pm 20\%$. Como pode ser

observado na Tabela 2, os resultados obtidos pelos ensaios propostos nesta validação estão em acordo com o preconizado por Brasil, 2012.

Tabela 2. Resultados obtidos nos ensaios de precisão e exatidão.

	0,05 (g/L)		0,1 (g/L)		0,5(g/L)		1,0 (g/L)		1,5 (g/L)	
	(n=5)		(n=5)		(n=5)		(n=5)		(n=5)	
	CV*	EPR**	CV*	EPR**	CV*	EPR**	CV*	EPR**	CV*	EPR**
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Intradia***	2,51	92,00	4,15	106,00	4,22	98,60	2,05	97,20	4,97	103,60
Interdia****	11,91	106,00	2,15	107,00	3,45	95,00	0,86	96,67	5,41	98,60

*CV: Coeficiente de variação, para avaliar a precisão. **EPR: Erro Padrão Relativo, para avaliar a exatidão. ***Intradia: Análise de 5 amostras distintas na mesma concentração no em um dia. ****Interdia: Análise de 15 amostras distintas na mesma concentração em 3 dias distintos, 5 amostras por dia.

O efeito matriz é o efeito na resposta do analito ou PI causado por componentes da matriz biológica (BRASIL, 2012). Este efeito pode ocorrer devido à presença de substâncias inerentes a matriz biológica, pois estas substâncias não monitoradas, que coeluem da matriz, podem afetar a detecção dos analitos comprometendo a eficiência de detecção dos mesmos, caracterizando assim o efeito matriz (CASSIANO *et al*, 2009). Neste ensaio, a média de todas as amostras analisadas (Tabela 3) estiveram em acordo com o preconizado em Brasil, 2012. Este estudo permitiu concluir que o fluido oral não apresentou interferência com o analito em estudo.

Tabela 3. Resultados obtidos no ensaio de efeito matriz.

0,1 (g/L)	FMN*	COEFICIENTE DE	1,5 (g/L)	FMN*	COEFICIENTE DE
(n=3)		VARIAÇÃO (%)	(n=3)		VARIAÇÃO (%)
0,15	0,65	6,53	1,38	1,09	5,49

*FMN: Fator de matriz Normalizado por Padrão Interno.

A estabilidade consiste na propriedade em que o analito e também a metodologia, devem possuir em resistir a condições normalmente exigidas durante a análise (BAZARELLA, 2010). As condições de realização dos ensaios de estabilidade devem reproduzir as reais condições de manuseio e análise das amostras (BRASIL, 2003), como demonstrado na Tabela 4.

Tabela 4. Resultados obtidos nos ensaios de estabilidade.

ESTABILIDADE	0,1 (g/L) (n=3)	DESVIO PADRÃO EM RELAÇÃO AO VALOR NOMINAL (%)	1,5 (g/L) (n=3)	DESVIO PADRÃO EM RELAÇÃO AO VALOR NOMINAL (%)
(4 horas - 20 °C)	0,11	111,99	1,50	99,81
(16 horas - 20 °C)	0,11	114,84	1,49	99,22
(24 horas - 4 °C)	0,11	111,98	1,51	100,55
(48 horas - 4 °C)	0,18	176,38	1,55	103,27
(3 ciclos de congelamento e descongelamento de 12 horas - 4 °C)	0,16	162,46	1,55	103,30
(24 dias - 4 °C)	0,14	135,31	0,92	61,19

A estabilidade das amostras avaliadas nas condições pós-processamento (4 e 16 horas - 20 °C) e as amostras avaliadas na condição de curta duração (24 horas - 4 °C) após o preparo demonstraram resultado dentro de 15%, estando assim, em acordo com Brasil, 2012. No entanto, as amostras submetidas às condições de análise de curta duração (48 horas - 4 °C), submetidas ao processo de congelamento e descongelamento e as amostras de longa duração (24 dias - 4 °C) apresentaram resultado superior a 15%. Portanto, apresentaram-se instáveis quando submetidas a estas condições de análise, sendo assim, impróprias para análise quando expostas a tais condições.

O efeito gerado pelo aparecimento ou aumento do sinal do analito ou PI causado por contaminação proveniente de amostras analisadas anteriormente processadas chama-se efeito residual (BRASIL, 2012). Esta contaminação pode

ocorrer devido a resíduos que podem ficar retidos em alguns componentes do cromatógrafo, como o *liner*, injetor, coluna, seringa e detector (BRASIL, 2003). Como pode ser visto na Tabela 5, neste trabalho houve a presença de efeito residual no tempo de retenção do analito. Apesar de o efeito residual estar dentro do limite permitido (20%) (BRASIL, 2012), medidas para diminuir o efeito residual das análises foram tomadas. Como suspeitou-se que o efeito residual ocorria em decorrência de resíduos na seringa após as injeções de LSQ, adotou-se a medida de sempre passar duas amostras sem adição de etanol e *n*-propanol após a injeção de uma amostra LSQ, afim de limpar a seringa, solucionando o efeito residual. Portanto, recomenda-se que esta medida seja adotada em análises de rotina.

Tabela 5. Resultados obtidos no ensaio de efeito residual.

		EFEITO RESIDUAL (%)
Etanol 2,0 (g/L) (n=3)	Antes da injeção (1ª amostra)	-
	Depois da injeção (2ª amostra)	19,51
	Depois da injeção (3ª amostra)	17,74
Padrão Interno 1,0 (g/L) (n=3)	Antes da injeção (1ª amostra)	-
	Depois da injeção (2ª amostra)	-
	Depois da injeção (3ª amostra)	-

O ensaio de seletividade foi realizado com amostras de fluido oral de 8 indivíduos não expostos ao etanol, sem adição de etanol e PI. Estas amostras foram processadas e então foi avaliada a presença de picos interferentes na corrida analítica. Como resultado do estudo, foi observado ausência de picos interferentes próximos ao tempo de retenção do etanol nas amostras de voluntários.

O ensaio de especificidade trata da habilidade do método bioanalítico de medir e diferenciar o analito de componentes que possam estar presentes na amostra, tais como metabólitos, impurezas, compostos de degradação ou componentes da matriz (BRASIL, 2003; BAZARELLA, 2010).

Foram selecionados alguns solventes que também apresentam relevância toxicológica. O metanol e o isopropanol, com níveis tóxicos inferiores ao etanol, também são depressores do sistema nervoso central, responsáveis por diversas

intoxicações fatais (FELTRACO, ANTUNES, LINDEN, 2009). Os outros solventes utilizados foram escolhidos por serem utilizados como solventes inalantes, podendo causar interferência nas análises de triagem por etilômetro (bafômetro). No Brasil, alguns destes solventes são fabricados clandestinamente ou contrabandeados para fins de abuso, como é o caso do lança-perfume (cloreto de etila) e do “cheirinho da loló” (mistura de éter etílico, etanol e clorofórmio) (BRASIL, 2010; SCHNEIDER, 2010). Outro composto importante utilizado como solvente inalante é a cola de sapateiro (mistura de tolueno, n-hexano, metiletilcetona e acetato de etila) (PEDROZO, 2008; SCHNEIDER, 2010) Estas substâncias voláteis, quando aspiradas pelo nariz ou pela boca, também são depressores do sistema nervoso central, podendo provocar sonolência, confusão mental, cefaleia, até depressão respiratória, coma e morte (PEDROZO, 1989; SCHNEIDER, 2010) Como pode ser observado na Tabela 6 e Figura 3, todos os solventes avaliados apresentaram boa separação cromatográfica em relação ao analito em estudo, etanol.

Tabela 6. Tempo de retenção do analito em estudo, etanol, dos analitos do estudo de especificidade, e do padrão interno utilizado, *n*-propanol.

	ANALITO	TEMPO DE RETENÇÃO
1.	Metanol	1.654
2.	Etanol	2.023
3.	Isopropanol	2.414
4.	Diclorometano	2.789
5.	<i>n</i> -propanol	3.175
6.	Clorofórmio	4.419
7.	Acetato de Etila	4.811
8.	Butanol	5.639
9.	Tolueno	9.746

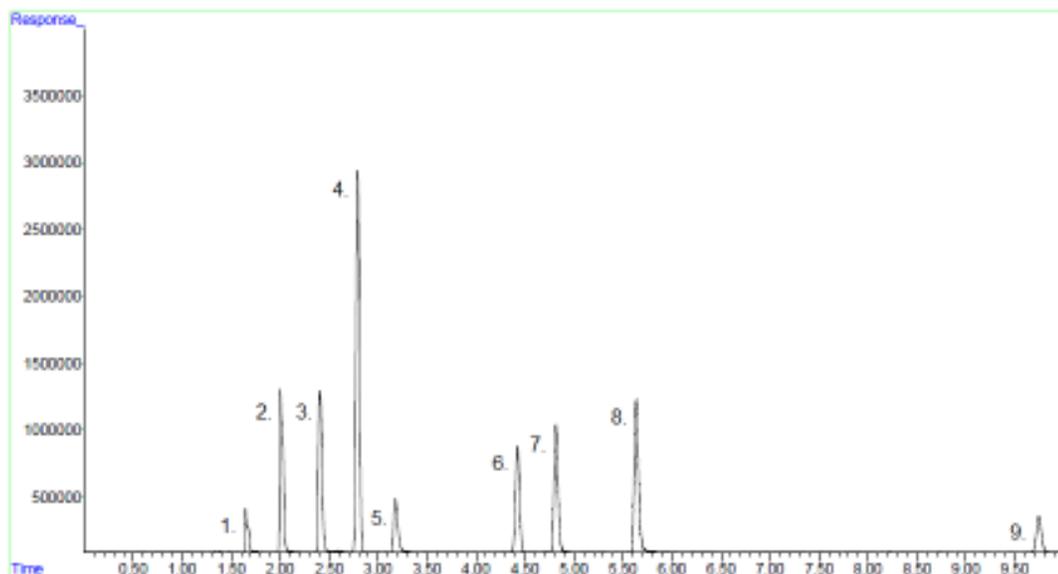


Figura 3. Separação cromatográfica do etanol (2), dos analitos do estudo de especificidade: metanol (1), isopropanol (3), diclorometano (4), clorofórmio (6), acetato de etila (7), butanol (8) e tolueno (9) e do padrão interno *n*-propanol (5).

O ensaio de recuperação (Tabela 7) trata da eficiência de extração do método analítico na amostra biológica, dentro de um limite de variação, expressa como a porcentagem. Resultados próximos a 100% são desejáveis, porém, admitem-se valores menores, desde que a recuperação seja precisa e exata (BRASIL, 2003; BAZARELLA, 2010).

Tabela 7. Resultados obtidos no ensaio de recuperação.

	RECUPERAÇÃO 0,1 (g/L) (%) (n=3)	RECUPERAÇÃO 0,5 (g/L) (%) (n=3)	RECUPERAÇÃO 1,5 (g/L) (%) (n=3)
<u>Etanol em Fluido Oral</u>	95,14	100,54	103,37
Etanol em Solução Aquosa			

Cabe aqui ressaltar que os ensaios: *Limites de Detecção e Quantificação*, *Recuperação* e *Especificidade*, não estão presentes na Resolução nº 27 da ANVISA, de 17 de maio de 2012, porém, encontram-se presentes na Resolução nº 899 da ANVISA, de 29 de maio de 2003, sendo avaliados segundo estes parâmetros.

4 CONCLUSÃO

O método para a determinação de etanol, em fluido oral, por *headspace* em cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (HS/CG-DIC) apresentou-se está em acordo com as especificações estabelecidas pela RDC nº 27 de 2012, que dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos e também pela RE nº 27 de 2003, Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Apesar de a metodologia validada por *headspace* em cromatografia gasosa com detector de massas (HS/CG-EM) apresentar-se mais sensível em validação realizada no mesmo laboratório, é importante ressaltar que o HS/CG-DIC é o equipamento usualmente utilizado na maioria dos laboratórios de rotina forense. Além disso, a matriz biológica fluido oral, escolhida para validação do método, facilita a coleta por não necessitar de mão de obra especializada, também, pelo fato da coleta não ser invasiva e pela possibilidade da amostra ser coletada no local onde o indivíduo for abordado. Posteriormente, na fase pré-analítica, o preparo da amostra para posterior análise apresentado é muito fácil e de rápido preparo, facilitando o trabalho em uma situação hipotética de rotina intensa, ou ainda, na falta de mão de obra especializada.

5 REFERÊNCIAS

ALIYEV, V.; *et al.* Simultaneous headspace-GC-FID analysis for methanol and ethanol in blood, saliva and urine: validation of method and comparison of specimens. **LCGC Europe**, v. 24, n. 6, p. 292, 2011.

BAZARELLA, R. B. **Desenvolvimento de metodologia analítica para a investigação de anfetaminas em amostras de saliva, empregando cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas.** Dissertação (Mestrado). 2010. Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto, SP.

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 empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. In: **Diário Oficial da União**, Brasília, 22 mai. 2012.

BRASIL. Presidência da República. Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas. **Drogas: cartilha sobre maconha, cocaína e inalantes.** Brasília: Presidência da República, Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas, 2010. 48 p. : il.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. In: **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 jun. 2003.

CASIANO, M. N. *et al.* Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Quim. Nova**, v.32, n. 4, p. 1021-1030, 2009.

CONE, E. J.; HUESTIS, M. A. Interpretation of Oral Fluid Tests for Drugs of Abuse. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1098, n. 1, p. 51-103, 2007.

FELTRACO, L. L.; ANTUNES, M. V.; LINDEN, R. Determinação de etanol e voláteis relacionados em sangue e fluido oral por microextração em fase sólida em *headspace* associada à cromatografia gasosa com detector de ionização em chama. **Quim. Nova**, v. 32, n. 9, p. 2401-06, 2009.

GUBALA, W.; ZUBA, D. Saliva as an Alternative Specimen for Alcohol Determination in the Human Body. **Pol. J. Pharmacol**, v. 54, p. 161-65, 2002.

IPEA. INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA. **Impactos Sociais e Econômicos dos Acidentes de Trânsito nas Aglomerações Urbanas.** BRASÍLIA: IPEA, 2012. Disponível em: <http://www.ipea.gov.br>. Acesso em 17/01/2013.

LIMBERGER, R. P.; *et al.* Testes toxicológicos para aferição de substâncias psicoativas em condutores. In: PECHANSKY F; ARRUDA PCV; DE BONI RB (org). **Uso de bebidas alcoólicas e outras drogas nas rodovias brasileiras e outros estudos**, Porto Alegre: Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas; 2010. 121 p.

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **International Guide for Monitoring Alcohol Consumption and Related Harm**, Department of Mental Health and Substance Dependence Noncommunicable Diseases and Mental Health Cluster. Geneva: 2000.

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Global Status Report on Road Safety: Time for action**, Geneva: 2009.

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Global Status Report on Alcohol and Health**, Geneva: 2011.

PEDROZO, M. F. M; JESUS, M. G. S. de. Inalantes. In: OGA, S; CAMARGO, M. M. A; BATISTUZZO, J. A. O. (eds.) **Fundamentos de toxicologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 677 p, il.

PEDROZO, M. F. M; SIQUEIRA, M. E. P. B. de. Solventes de cola: abuso e efeitos nocivos à saúde. **Rev. Saúde Pública**. v. 23, n. 4, p. 336-340, 1989.

SANTIAGO, E. F. **Alcoolemia em vítimas fatais de acidentes de trânsito no Rio Grande do Norte empregando cromatografia em fase gasosa – head space**. 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, p. 389-403, 2008.

SENAD. Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas. **VI Levantamento Nacional sobre o Consumo de Drogas Psicotrópicas entre Estudantes do Ensino Fundamental e Médio das Redes Pública e Privada de Ensino nas 27 Capitais Brasileiras – 2010**, Brasília, 2010.

SCHNEIDER, J. **Análise do uso de substâncias psicotrópicas no Brasil: Uma revisão da literatura**. (Trabalho de conclusão de curso) 2010. Universidade regional de Blumenau. Blumenau, SC.

UNODC. UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. **World Drug Report 2012**, Nova York: United Nations Publication, Sales No. E.12.XI.1, 2012.

YONAMINE, M.; *et al.* Solid-phase micro-extraction–gas chromatography–mass spectrometry and headspace-gas chromatography of tetrahydrocannabinol, amphetamine, methamphetamine, cocaine and ethanol in saliva samples. **J. Chromatogr. B**, v. 789, p. 73–78, 2003.