

Jéssica Priscila de Souza

Egressa do Curso de Biomedicina, UNILUS.
Pós graduada em Histopatologia e Biologia Forense pelo
HCFMUSP e Instituto Oscar Freire
jessicapricilaso@hotmail.com

Edgar Matias Bach Hi

Professor responsável pelo Núcleo de Estudos e
Pesquisas em Bioquímica Experimental
(NABEX-UNILUS) e professor dos cursos de
biomedicina, medicina
edgarbach@gmail.com

Fabiana Gaspar Gonzalez

Professora Dra. dos Cursos de Biomedicina,
Enfermagem, Fisioterapia, Medicina e Radiologia,
UNILUS – Santos. Núcleo Acadêmico de Farmacologia e
Toxicologia em Drogas Sintéticas e Naturais
(NAFT-UNILUS)
bibagonzalez@hotmail.com

REVISÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DO CONSUMO AGUDO DE ÁLCOOL EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

RESUMO

O uso de bebidas alcoólicas começou há muitos anos, e desde então o consumo de álcool é admitido pela sociedade e hoje é uma das drogas mais utilizada pelo homem. O etanol é um composto capaz de provocar surtos psicóticos, alucinações e delírios, por ser um depressor do sistema nervoso central e exercer uma ação tóxica principalmente nos sistemas hepático e nervoso central. As principais manifestações clínicas apresentadas após o consumo do etanol são perda de inibição, prolongamento do tempo de reação, nistagmo, diplopia, disatria e ataxia. O etanol é absorvido principalmente através da via digestiva, por difusão simples, e a sua distribuição é rápida para os tecidos; o nível de etanol no sangue depende principalmente de alguns fatores como a dose ingerida, a velocidade de absorção no trato digestivo, a ingestão ou não de alimentos antes da ingestão da bebida, alterações enzimáticas em diferentes etnias e a capacidade de eliminação do organismo através da biotransformação e excreção, determinando assim a biodisponibilidade do etanol. Nos casos de intoxicação aguda, as alterações psicológicas e neurológicas vão aumentando conforme o aumento da ingestão da substância levando, por fim, à depressão respiratória. Ainda não são completamente elucidados os mecanismos moleculares atuantes na intoxicação aguda por etanol, mas discute-se que um dos seus efeitos é a interação com o receptor GABAérgico, ativando um canal de cloro que acarreta em hiperpolarização neuronal. As dosagens do etanol podem ser realizadas de várias formas, sendo feita a pesquisa do próprio álcool ou de outros marcadores, através dos testes de triagem, que podem ser bafômetro, colorimétricos e cromatografia em camada delgada ou os testes de confirmação que podem ser cromatografia gasosa, cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Os principais biomarcadores do consumo agudo, ou seja, de consumo de álcool a curto prazo, podem ser etil glicuronídeo (EtG), etil sulfato (EtS), e ainda uma proporção entre os metabólitos da serotonina 5-HTP/5-HIAA, sendo 5-HIAA o ácido 5-hidroxi-indolacético e 5-HTP o 5-hidroxitriptofol.

Palavras-Chave: [Álcool, Dosagem, Etanol, Marcadores, Toxicologia.

ABSTRACT

The use of alcoholic beverages began many years ago, and since then the consumption of alcohol is admitted by society and today it is the most used drug by man. The ethanol is a compound capable of causing psychotic episodes, hallucinations and delusions, as a central nervous system depressant and exerts a toxic action mainly in the liver and central nervous systems. The main clinical manifestations after consumption of ethanol are loss of inhibition, prolonged reaction time, nystagmus, diplopia, disatria and ataxia. Ethanol is primarily absorbed through the digestive tract by simple diffusion and its distribution to tissues is rapid, the ethanol level in the blood mainly depends on such factors as the ingested dose, the rate of absorption in the digestive tract, the food ingestion or not, prior to drink ingestion and the capacity of elimination from the body via the biotransformation and excretion, enzymatic changes in different ethnicities, thereby determining the bioavailability of ethanol. In cases of acute intoxication, neurological and psychological changes keep increasing with the substance intake increasing, leading ultimately to respiratory depression. The molecular mechanisms in acute intoxication by ethanol are still not completely elucidated, but it is argued that one of its effects is the interaction with the GABA receptor, activating a chloride channel that leads to neuronal hyperpolarization. Dosages of ethanol can be performed in many ways, making the research of alcohol itself or other markers, through the screening tests, which can be breathalyzer, colorimetric and thin layer chromatography or confirmation tests, which can be gas chromatography, liquid high performance chromatography and gas chromatography coupled to mass spectrometry. Biomarkers of acute and chronic consumption of alcohol may be useful in monitoring alcohol consumption. The main biomarkers of acute consumption, or short term consumption, may be ethyl glucuronide (EtG), ethyl sulfate (EtS), and also a ratio between serotonin metabolites 5-HTP/5-HIAA, being 5-HIAA the 5-hydroxy-indoleacetic acid and 5-HTP the 5-hydroxytryptofol.

Keywords: Alcohol, Dosing, Ethanol, Markers, Toxicology

INTRODUÇÃO

Há indícios do uso de bebidas alcoólicas desde 6000 a.C. Acredita-se que o seu início foi na Índia, posteriormente chegando ao Egito e Grécia, expandindo até a civilização mediterrânea e atingindo todo o Império Romano; e desde então o consumo de álcool é admitido e até mesmo incentivado pela sociedade (Carvalho & Sousa, 2010).

O etanol, álcool etílico, é a droga mais utilizada pelo homem e o seu consumo quando moderado é aceito pela sociedade. É um composto dito psicodisléptico, ou seja, modifica a atividade mental normal, sendo capaz de provocar surtos psicóticos, alucinações e delírios. As principais manifestações clínicas apresentadas após o consumo do etanol são perda de inibição, prolongamento do tempo de reação, nistagmo, diplopia, disatria e ataxia (Bogliolo, 2011).

Dentre as substâncias depressoras do SNC, as principais são etanol, barbitúricos, metaqualona, glutetímida, anestésicos e solventes; os seus graus de dependência variam de moderada a forte. O consumo de álcool, sendo ele regular ou não, é prevalente na população urbana brasileira (Bastos *et al*, 2008).

Em termos legais, no Brasil, atualmente está em vigor a Lei Nº 12.760/2012 também conhecida como nova Lei Seca. Esta lei diz que dirigir sob a influência de álcool ou de qualquer outra substância psicoativa é uma infração gravíssima, que terá como penalidade uma multa e como medidas administrativas a suspensão do direito de dirigir e a retenção do veículo (Brasil. Lei n. 12.760 de 20 de dez. de 2012).

Alguns estudos que mostram que o risco relativo de se envolver em acidente de trânsito fatal entre motoristas com alcoolemia de 0,5-0,79 gramas de álcool por litro de sangue é no mínimo sete vezes maior do que entre motoristas que não possuem álcool no organismo (Fell & Voas, 2013).

Existem questionamentos quanto ao consumo de alimentos ou medicamentos que tenham álcool na sua composição e também quanto ao uso de antissépticos bucais que contenham a substância. Se o teste para a detecção do teor alcoólico no organismo de uma pessoa for realizado através do etilômetro, a presença da substância pode provocar um resultado positivo, desde que o teste seja realizado imediatamente após o consumo (DPRF, 2013).

De acordo com relatórios da Organização Mundial de Saúde de 2011, o uso prejudicial do álcool resulta em cerca de 2.5 milhões de mortes todos os anos. Aproximadamente 320.000 jovens entre 15 e 29 anos morrem de causas relacionadas com o álcool, resultando em 9% das mortes neste grupo. O álcool é o terceiro maior causador de doenças no mundo, o primeiro no Pacífico Ocidental e nas Américas e o segundo maior na Europa (OMS, 2011).

O álcool contribui fortemente na etiologia e manutenção de vários problemas sociais, econômicos e de saúde enfrentados em nosso país (Galduróz & Caetano, 2004).

De acordo com o relatório mais recente da Organização Mundial de Saúde em relação ao consumo de álcool ao redor do mundo, o consumo adulto (acima de 15 anos) geral de álcool, registrado ou não, *per capita* de álcool puro no Brasil é de 9,16 litros (OMS, 2011).

Álcool, cetamina, tabaco e solventes foram classificadas como mais prejudiciais do que LSD, ecstasy, e sua variante 4-MTA (todas as drogas de classe A), sendo o álcool considerado umas das drogas que mais causam prejuízos físicos, dependência e danos sociais (Nutt *et al*, 2007).

TEOR ALCOÓLICO

O teor alcoólico expresso em porcentagem por volume (% vol) é um dos parâmetros mais utilizados. Criado por Gay-Lussac, foi instituído na França em 1884. A tabela 1 mostra a quantidade de álcool em alguns tipos de bebida (Lachenmeier *et al*, 2010).

Tabela 1 - Quantidade de álcool (em porcentagem) de alguns tipos de bebidas.

Tipos de bebidas	Porcentagem de álcool (%)
Cerveja	3,2 – 4,0
Licor	3,2 – 7,0
Saquê	14,0 – 16,0
Vinho de mesa	7,1 – 14,0
Vinho frisanete	8,0 – 14,0
Vinhos fortificados	14,0 – 24,0
Vinhos aromatizados	15,5 – 20,0
Brandies	40,0 – 43,0
Whiskies	40,0 – 75,0
Pinga	40,0 – 50,0
Vodkas	40,0 – 50,0
Gim	40,0 – 48,5
Rum	40,0 – 95,0
Tequila	45,0 – 50,5

Fonte: Adaptado de Carvalho & Sousa, 2010.

ANÁLISE TOXICOLÓGICA

A investigação toxicológica geralmente é realizada em casos de morte violenta que podem ser acidentes, homicídios, suicídios ou averiguação para diagnóstico médico-legal de intoxicação exógena. No diagnóstico médico-legal são realizados exames em indivíduos vivos, vítimas de acidentes de trânsito e de trabalho, agressões, e naqueles que são acusados de praticar algum tipo de delito (Chasin, 2008).

O álcool está no topo da lista de substâncias tóxicas encontradas na toxicologia forense pela simples razão de que indivíduos que ingerem álcool e estão embriagados estão envolvidos em muitos acidentes fatais, mortes traumáticas, suicídios, crimes violentos e comportamento antissocial em geral. (Kassasbeh et al, 2011).

O nível de etanol no sangue depende principalmente de três fatores, a dose ingerida, a velocidade de absorção no trato digestivo e a capacidade de eliminação do organismo através da biotransformação e excreção; determinando assim a biodisponibilidade do etanol (Chasin, 2008).

A velocidade de absorção também depende de alguns fatores, e podem influenciar esta absorção, a quantidade de álcool ingerido, a ingestão ou não de alimentos antes da ingestão da bebida, a massa corporal, entre outros (França, 2008).

No Brasil, a realização das análises toxicológicas com fins forenses em fluidos biológicos, é feita em laboratórios que pertencem às Secretarias de Segurança Pública e nos Institutos Médico-Legais (IML) dos respectivos estados. É importante levar em consideração não só a toxicocinética (absorção, distribuição, biotransformação e excreção) e a toxicodinâmica (mecanismo de ação) da substância a ser analisada, mas também o histórico, para que a escolha do material seja adequada, e sejam feitas as pesquisas de xenobióticos (compostos químicos estranhos ao organismo) ou dos produtos originados da sua biotransformação (Chasin, 2008; Oga, 2008).

O etanol é absorvido principalmente através da via digestiva (20%) e intestino delgado (80%), por difusão simples, e a sua distribuição é rápida para os tecidos. Tanto a absorção quanto a metabolização do álcool dependem de diversos fatores, como sexo, peso corporal, diferença étnica e ingestão de alimentos (Corrêa, 2008; Bogliolo, 2011; DPRF, 2013).

REVISÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DO CONSUMO AGUDO DE ÁLCOOL EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

A concentração plasmática chega ao máximo após 30 a 90 minutos após a ingestão. Esta janela no tempo e velocidade de absorção é devido a vários fatores como tempo de esvaziamento gástrico e início da absorção intestinal (Corrêa, 2008).

Cerca de 2% do etanol ingerido, geralmente é excretado inalterado, através principalmente dos rins e pulmões. Em caso de consumo de doses mais altas, esse valor pode se elevar para até 10% (Braathen, 1997; Corrêa, 2008).

A sua metabolização é feita principalmente no fígado e no tubo gastrintestinal. A metabolização hepática é descrita por duas vias:

- 1ª: pela ação da enzima álcool desidrogenase presente no citosol, essa enzima vai oxidar o álcool e formar acetaldeído, que irá ser oxidado por outra enzima chamada aldeído desidrogenase e formar acetato;

- 2ª: através de um sistema microssômico onde haverá a oxidação do etanol (MEOS - Sistema Microsomal Oxidante de Etanol), que utiliza o citocromo P450IIEI (cit P 450 induzível pelo etanol), em ambas as reações serão consumidos NAD e gerados NADH. (Corrêa, 2008; França, 2008; Bogliolo, 2011).

O processo de eliminação, tanto pelos pulmões, quanto pelo sistema urinário, é responsável por eliminar aproximadamente 10% do álcool ingerido. Já o processo de metabolização, é responsável pela oxidação dos outros 90%. Essa oxidação realizada é considerada lenta, o produto desta oxidação vai ser catalisado por algumas enzimas específicas (Braathen, 1997).

Quanto à toxicodinâmica, o álcool etílico é um depressor do sistema nervoso central. Na intoxicação aguda, as alterações psicológicas e neurológicas vão aumentando conforme o aumento da ingestão da substância, levando por fim, a depressão respiratória, que ocorre com concentrações plasmáticas próximas a 500 mg/dL, sendo assim, fatal (Neres, 2004; Souza et al, 2013).

AMOSTRAS UTILIZADAS

Em indivíduos vivos, os fluidos biológicos mais utilizados são sangue e urina, mas não são os únicos, também podem ser utilizados suor, saliva, cabelo e etc (Moreau & Siqueira, 2008).

É dada a prioridade para a amostra que seja obtida de um método menos invasivo possível, portanto a mais utilizada é a urina na verificação de uso recente, porém, em alguns casos são necessários os teores sanguíneos para determinar a relação entre a substância a ser analisada e a causa de intoxicação. (Moreau & Siqueira, 2008).

Em casos de análise post mortem, onde é conhecido o histórico da intoxicação, é obtida a amostra de acordo com a disposição (distribuição e armazenamento) da substância pesquisada no organismo. Já nos casos onde não é conhecido o histórico, são feitas coletas de várias amostras para que seja possível encontrar, quando presente, praticamente todos os xenobióticos conhecidos envolvidos em intoxicações agudas. (Chasin, 2008).

A SOFT (Society of Forensic Toxicologists ou Sociedade de Toxicologistas Forenses) sugeriu quais os tipos de materiais e a sua respectiva quantidade que devem ser coletadas nestes casos sem histórico. Sugerem que sejam coletados 50g do cérebro, 50g do fígado, 50g do rim, 25mL de sangue cardíaco, 10mL de sangue periférico e todo o conteúdo disponível de humor vítreo, bile, urina e conteúdo gástrico (SOFT & AAFS, 2006).

MÉTODOS ANALÍTICOS

ETILÔMETRO (“BAFÔMETRO”)

O consumo de bebidas alcoólicas por motoristas é uma das principais causas de acidentes nas estradas brasileiras. Isso fez com que o poder público buscasse iniciativas para prevenir o consumo desta substância, colocando em prática o uso do etilômetro, popularmente chamado de 'bafômetro' (Braathen, 1997; DPRF, 2013).

O etilômetro identifica, através de uma análise rápida e adequada do ar expelido pelos pulmões, a presença e quantidade de álcool no organismo, fornecendo resultados equivalentes aos valores encontrados no ar alveolar. A maioria destes equipamentos chegam bem próximos da precisão e da exatidão, podendo ser utilizados como testes de triagem ou confirmatório da intoxicação (Braathen, 1997; Carvalho & Leyton, 2000).

Este tipo de aparelho possui um sistema medidor/detector eletroquímico, onde o etanol é oxidado na presença de um catalisador. A concentração de álcool presente no ar expirado será proporcional a corrente elétrica que

será produzida, e assim, será lida em uma escala proporcional ao teor alcoólico no sangue (Braathen, 1997; Carvalho & Leyton, 2000).

A intoxicação gerada pelo consumo de bebidas alcoólicas pode levar desde uma leve euforia até estados mais graves. Sendo assim, o indivíduo terá sua coordenação motora e reflexos afetados, comprometendo a sua capacidade de conduzir um veículo (Braathen, 1997).

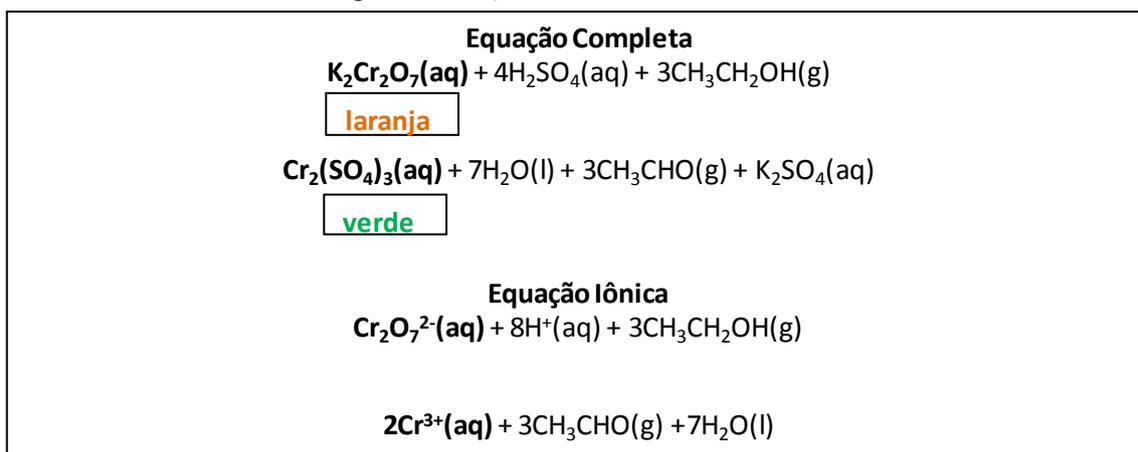
Existem questionamentos quanto ao consumo de alimentos ou medicamentos que tenham álcool na sua composição e também quanto ao uso de antissépticos bucais que contenham a substância. Se o teste para a detecção do teor alcoólico no organismo de uma pessoa for realizado através do etilômetro, a presença da substância pode provocar um resultado positivo, desde que o teste seja realizado imediatamente após o consumo (DPRF, 2013).

A concentração de álcool no sangue (CAS) representa a quantidade de etanol em uma determinada quantidade de sangue é conhecida como 'peso por volume'. A tabela abaixo lista a CAS máxima em alguns países para condução de acordo com sua respectiva legislação, expresso em miligramas de etanol por milímetro de sangue (mg/ml) (ICAP, 2013).

Os etilômetros descartáveis são mais simples, e a sua estrutura é formada de um pequeno tubo que contém uma mistura sólida de solução aquosa de dicromato de potássio e sílica, umedecida com ácido sulfúrico. Ocorre então a oxidação do álcool que vai ser transformado em aldeído e a redução do dicromato a cromo (II) ou (III), sendo que o (III) é mais estável. Inicialmente aparece uma coloração amarelo-alaranjada, devido a presença do dicromato, e após a reação, aparece uma coloração verde-azulada, devido a presença de cromo (III) que possui coloração verde, e o cromo (II) que possui coloração azul (Braathen, 1997).

Nas Figuras 1 e 2 seguem a reação do etilômetro descartável e a imagem do tubo, respectivamente.

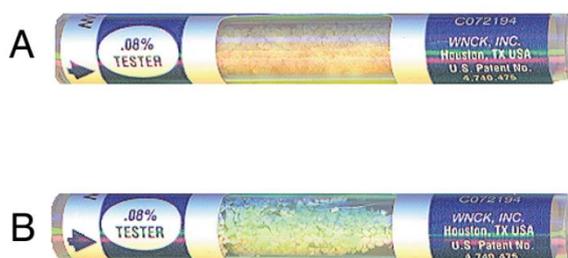
Figura 1 - Reações do etilômetro descartável.



Fonte: Braathen, 1997.

Figura 2 - Etilômetro descartável: a foto A mostra o tubo após o teste de uma pessoa que não ingeriu álcool. A foto B mostra o tubo após o teste de uma pessoa intoxicada e, conseqüentemente, sem condições para conduzir um veículo.

Os etilômetros descartáveis ilustrados pela foto são fabricados pela companhia americana AKERS BIOSCIENCES (antiga WNCK, Inc.), mas outras empresas fabricam dispositivos similares.

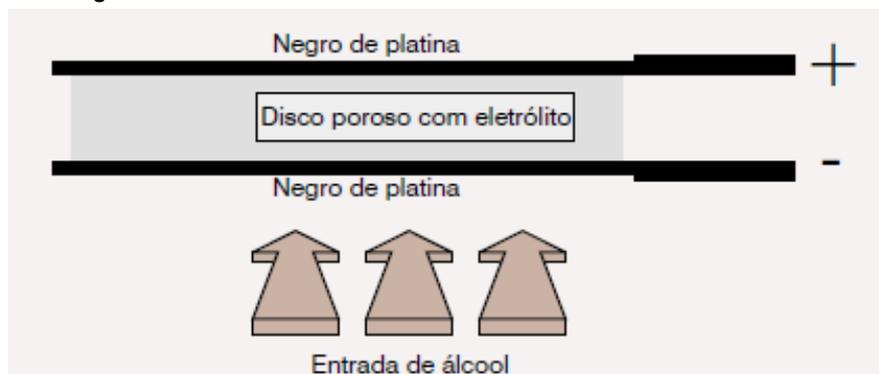


Fonte: Braathen, 1997.

Entretanto os instrumentos utilizados pela polícia ao redor do mundo, incluindo o Brasil, são mais sofisticados; o indivíduo sopra através de um tubo descartável, que leva o ar expelido até o aparelho, que basicamente oxida o etanol a etanal, também denominado acetaldeído (Braathen, 1997).

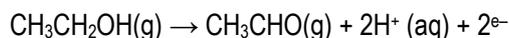
Essa oxidação ocorre sobre um disco plástico poroso umedecido com ácido sulfúrico. Este disco é coberto com uma camada de pó de platina, o qual serve de catalisador na reação. Dois eletrodos conectados ao disco produzem uma corrente elétrica que será traduzida em escala proporcional ao teor alcoólico no sangue. Esta reação está esquematizada na Figura 3 (Braathen, 1997).

Figura 3 - Funcionamento do etilômetro baseado no sistema de disco.

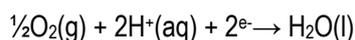


Fonte: Braathen, 1997.

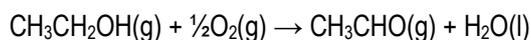
Quimicamente o sistema funciona da seguinte maneira: no ânodo (eletrodo negativo) ocorre a oxidação, catalisada pela platina, conforme a semi-reação a baixo:



No cátodo (eletrodo positivo), ocorre a redução do oxigênio, presente no ar, como demonstra a semi-reação:



Portanto, representando uma combustão incompleta do etanol, a equação completa do sistema será:



A quantidade de acetaldeído gera uma corrente elétrica que será traduzida em teor alcoólico pelo aparelho (Braathen, 1997).

COLORIMÉTRICOS

A determinação quantitativa do álcool tem aplicações na investigação básica, descoberta de medicamentos, estudos clínicos e na indústria alcoólica. Procedimentos simples, diretos e automatizados para medir a concentração de etanol são muito desejáveis (Bioassay Systems, 2007).

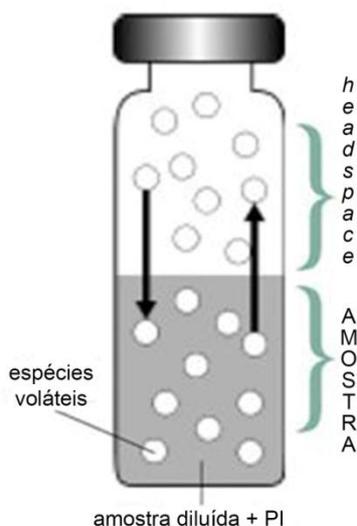
Atualmente no mercado, existe o kit de ensaio enzimático colorimétrico EnzyChrom™, este é baseado na oxidação catalisada do etanol pela enzima álcool desidrogenase, em que o NADH formado é acoplado ao cromógeno formazan (MTT). A intensidade da cor do produto, medida a 565 nm, é proporcional à concentração de etanol na amostra. As amostras utilizadas podem ser soro, plasma, urina e saliva, é um teste sensível e preciso. O limite de detecção é de 0,0008% vol (140 µM ou 8ppm), linearidade até 0,1% de etanol em 96 poços da placa de ensaio (Bioassay Systems, 2007).

CROMATOGRAFIA GASOSA (CG)

Ao contrário dos outros métodos que analisam a reação da enzima álcool desidrogenase ou seu produto acetaldeído, este método quantifica diretamente o etanol na amostra. É obtida a dosagem de etanol a partir da separação do álcool da matriz biológica, pelo processo chamado headspace (Figura 4). O princípio da técnica é pelo aumento de temperatura, tempo e um compartimento fechado, onde as substâncias voláteis vão se deslocar da matriz para o espaço de gás disponível. É utilizado sulfato de sódio para aumentar o coeficiente de voláteis dos compostos em solução e conseqüentemente a concentração na fase de vapor, chamada de salting-out (Yonamine, 2003; Corrêa, 2008).

A substância padrão-interna que é analisada é o n-propanol. Utilizamos este solvente por pertencer ao mesmo grupo químico da substância em questão, não está originalmente presente na amostra e ter o tempo de retenção próximo do pico de interesse (Corrêa, 2008).

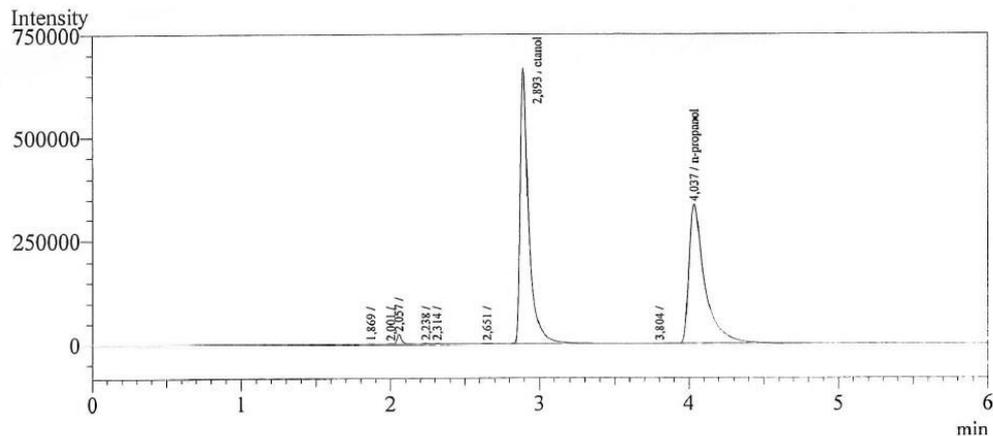
Figura 4 - Esquema do sistema *headspace*.



Fonte: Adaptado de LABHUT, 2014.

Após ser realizado este procedimento, o gás obtido será injetado em um cromatógrafo, onde o mesmo realizará a separação das substâncias voláteis presentes na amostra. É realizada a quantificação do álcool através de uma curva-padrão de etanol, onde será comparada a concentração de etanol (g/L) com a relação de área do etanol/padrão interno (n-propanol) (Corrêa, 2008). As figuras 5 e 6 mostram dois cromatogramas exemplificando esta quantificação (gentilmente cedidos pelo perito criminal Dr. Erasmo Silva, Polícia Técnico Científica – SP).

Figura 5 - Cromatograma de quantificação de etanol em amostra de sangue periférico, com resultado de 3,193 g/L.

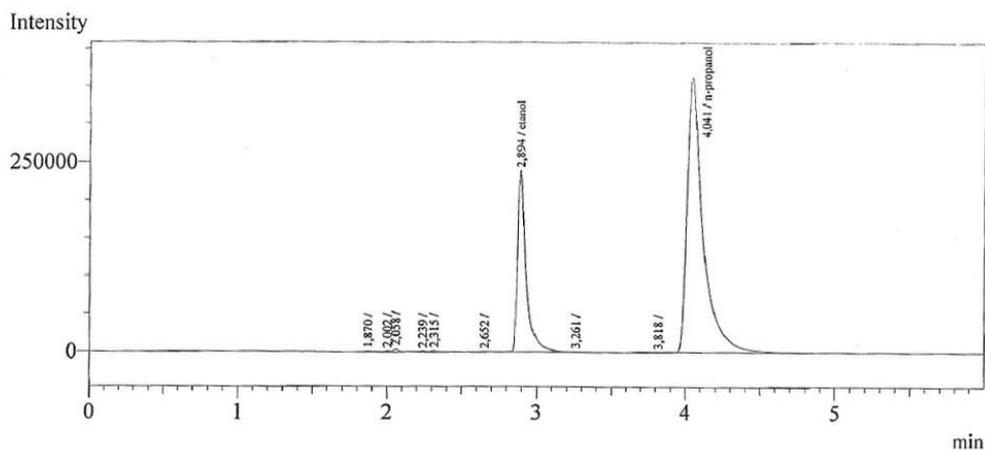


Resultados Quantitativos - Channel 1

ID#	Name	Ret.Time	Area	Height	Conc.	Units
1	etanol	2.893	2691111	663352	3.193	g/L
2	n-propanol	4.037	2498876	337222	0.000	g/L

Fonte: Silva, 2012.

Figura 6 - Cromatograma de quantificação de etanol em amostra de sangue periférico, com resultado de 1,051 g/L.



Resultados Quantitativos - Channel 1

ID#	Name	Ret.Time	Area	Height	Conc.	Units
1	etanol	2.894	966437	237980	1.051	g/L
2	n-propanol	4.041	2717408	362542	0.000	g/L

Fonte: Silva, 2012.

Preferencialmente é utilizada amostra de sangue total coletado a vácuo em um tubo contendo fluoreto de sódio a 1% (tubo fluoretado) visando suas propriedades anticoagulante e conservante. Não se deve realizar a assepsia do local com álcool 70%, para evitar a contaminação da amostra; a assepsia deve ser feita com água e sabão (Corrêa, 2008).

A amostra deve ser armazenada em uma geladeira com uma temperatura de 4°C, por no máximo 5 dias. O transporte deve ter a temperatura controlada, geralmente é utilizado gelo reciclável, mas o mesmo não pode entrar em contato direto com o tubo, pois pode ocorrer hemólise da amostra (Corrêa, 2008).

Quando utilizada a urina como amostra, a coleta deve ser feita em frascos de polietileno com fluoreto de sódio a 1%, que servirá como conservante. O transporte deve ser feito da mesma forma da amostra sanguínea e o armazenamento em um freezer a -20°C, por no máximo 30 dias (Corrêa, 2008).

METABÓLITOS DO ETANOL

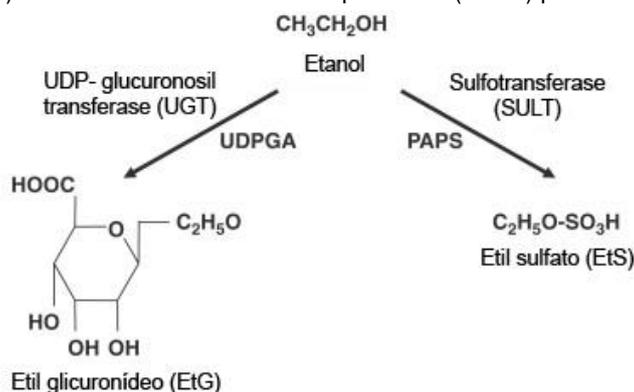
Existem várias situações onde o monitoramento do consumo de álcool de uma pessoa é desejável. Para este propósito, biomarcadores de consumo agudo e crônico de álcool podem ser úteis. Os biomarcadores do álcool podem ser divididos em dois principais grupos: aqueles usados para a detecção de consumo crônico (marcadores de longo prazo) e aqueles usados para detectar ingestão recente (marcadores de curto prazo) (Høiseth et al, 2008).

Os marcadores de curto prazo podem revelar até uma única ingestão de álcool, que pode ser relevante em pacientes álcool-dependentes em tratamento de abstinência (detecção de recaída), testes em ambientes de trabalho, ou em programas de controle de bebida entre mulheres grávidas. A forma padrão para detectar a ingestão do álcool ou monitoramento de abstinência é pela detecção da quantidade de álcool na expiração, sangue ou urina. Como o etanol é excretado de forma rápida do organismo, esse método é limitado para detectar apenas o consumo recente, e tem uma necessidade para biomarcadores de curto prazo sensíveis com maior tempo de detecção, como Etilglicuronídeo (EtG) e Etilsulfato (EtS) (Figura 7) (Høiseth et al, 2008).

Etilglicuronídeo (EtG) é o menor metabólito não ativo do etanol formado pela glucuronidação, catalisado pela UDP-glucuronosil-transferase. Numerosos estudos têm indicado que a presença do EtG em uma amostra urinária é um indicador específico e sensível de ingestão recente de álcool, com um tempo de detecção abrangente até vários dias após ingerir grandes quantidades (Sarkola et al, 2003; Høiseth et al, 2008).

Outro metabólito não oxidativo pequeno do etanol, Etilsulfato (EtS), que é formado pela conjugação do sulfato através da ação da sulfotransferase citosólica. EtS parece ter potencial similar ao EtG como um marcador de recaída (Høiseth et al, 2008).

Figura 7 - Vias enzimáticas para a conjugação de etanol com ácido UDP-glucurônico (UDPGA) para formar etilglicuronídeo (EtG) e com 3'-fosfoadenosina5'-fosfosulfato (PAPS) para formar etilsulfato (EtS).



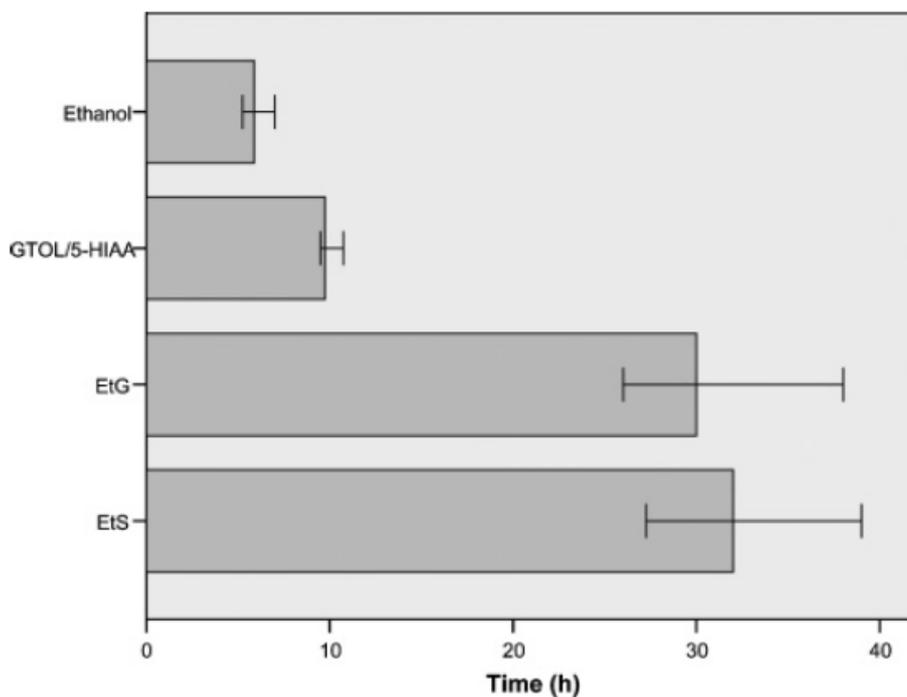
Fonte: Helander, 2008.

Como terceiro biomarcador de consumo de álcool a curto prazo utilizamos um cálculo de proporção entre os metabólitos da serotonina. Durante o metabolismo do etanol, o metabolismo da serotonina é deslocado da formação de ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) em direção a 5-hidroxitriptofol (5-HTOL); assim a razão 5-HTOL/5-HIAA aumenta consideravelmente. Pode também ser determinado na urina um metabólito do 5-HTOL, o glicuronídeo de 5-HTOL (GTOL), com resultados similares a determinação direta de 5-HTOL (Sarkola et al, 2003; Høiseth et al, 2008).

Até o momento apenas um experimento controlado comparando os três biomarcadores do álcool foi publicado na Noruega. O objetivo deste estudo controlado foi comparar a sensibilidade e os tempos de detecção do etanol, EtG, EtS e GTOL/5-HIAA na urina após a ingestão de uma única dose de álcool, e para determinar o quanto da dose administrada é excretada como EtG e EtS (Sarkola et al, 2003; Høiseth et al, 2008).

Este estudo demonstrou alta sensibilidade dos marcadores de curto prazo EtG, EtS e GTOL/5-HIAA. Em relação ao tempo de detecção, foi possível detectar GTOL/5-HIAA em aproximadamente 5 horas, enquanto os marcadores EtG e EtS com tempos maiores a 25 horas (Figura 8) (Høiseth et al, 2008).

Figura 8 - O tempo médio de detecção de etanol, EtG, EtS e GTOL/5-HIAA (n=10) nas amostras de urina após a ingestão de 0.5g/kg de etanol em jejum. As barras de erro representam um desvio padrão de 95%.



Fonte: Høiseth et al., 2008.

DISCUSSÃO

O etanol, por ser uma substância lipossolúvel, pode causar lesões no sistema nervoso central. São produzidas várias toxinas com a metabolização do etanol, como o acetaldeído, sendo eliminado através da sua quebra (pela enzima aldeído desidrogenase) e posterior eliminação na forma de CO₂ e H₂O.

De acordo com as literaturas revisadas, os marcadores EtG (Etilglicuronídeo), EtS (Etilsulfato) e 5-HTOL/5-HIAA (5-hidroxitriptofol e ácido 5-hidroxi-indolacético respectivamente) são os mais utilizados como marcadores de consumo a curto prazo. A presença destes marcadores foi relatada positiva em até 48 horas, principalmente EtG e EtS, após o consumo de uma única dose; e após um consumo maciço foi descrita uma detecção dos mesmos marcadores após 8 dias (Høiseth et al, 2008).

Atualmente não existe uma metodologia de análise padrão exigida pelo poder judiciário para a verificação ou determinação dos níveis de álcool nos fluidos biológicos, porém a mais utilizada, por ser de fácil utilização e baixo custo, é o etilômetro. É um método eficiente, onde os poucos casos de resultados duvidosos constam no uso de antisépticos bucais e de alguns alimentos ou medicamentos que contenham na sua composição o etanol, porém somente acusam se o teste for realizado imediatamente após o consumo. Existem equipamentos mais simples que não determinam a quantidade de etanol, mas apenas determinam a presença ou não do mesmo, sendo assim não são muito utilizados. Quando são necessárias dosagens mais precisas, principalmente na toxicologia forense, são utilizados métodos mais complexos, como os colorimétricos e cromatográficos, podendo ser aplicados em uma gama de amostras, como já citado neste trabalho (SOFT, 2006).

CONCLUSÃO

Podemos concluir que, atualmente, a determinação de etanol e seus metabólitos em amostras biológicas é bem precisa e sensível.

Vários autores continuam na busca de novos marcadores, metabólitos e aplicações; entretanto todos corroboram o fato da importância de sua quantificação. Quando o consumo ou mesmo a intoxicação é comprovada pelos testes rápidos ou laboratoriais, sérias consequências são geradas ao usuário.

Como o objetivo principal era realizar um levantamento sobre as metodologias disponíveis atualmente, ressaltamos a importância da aplicação cada vez maior dos testes, evitando assim consequências catastróficas.

REFERÊNCIAS

Bastos FI, Bertonil N, Hacker MA. Consumo de álcool e drogas: principais achados de pesquisa de âmbito nacional, Brasil 2005. Rio de Janeiro. Revista Saúde Pública. 2008;42(1):109-17.

Bioassay Systems (Comp.). EnzyChrom™ Ethanol Assay Kit (ECET-100). Califórnia, 2007. Disponível em: http://www.bioassaysys.com/file_dir/ECET.pdf. Acesso em: 20 fevereiro de 2012.

Bogliolo GB. Patologia. 8. ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2011:9,270-271,824-825.

Braathen C. O princípio químico do bafômetro. Química Nova Escola. 1997;5:3-5.

Brasil. Lei n. 12.760 de 20 de dez. de 2012. Altera a lei 9503, de 23 de setembro de 2007, que institui o Código de Trânsito Brasileiro, e a lei 9.294, de 15 de julho de 1996 [...]. Diário Oficial da União, Brasília-DF, 20 de jun. de 2008.

Carvalho DG, Leyton V. Avaliação das concentrações de álcool no ar exalado: considerações gerais. Revista de Psiquiatria Clínica 2000;27(2):76-82.

Carvalho JMR, Sousa RS. Tese. A importância da família na recuperação do alcoolista. 2010. Disponível em: <http://br.monografias.com/trabalhos3/importancia-familia-recuperacao-alcoolista/importancia-familia-recuperacao-alcoolista2.shtml>. Acesso em: 1 de agosto de 2012.

Chasin AAM. Análises Forenses. In: Moreau RLM, Siqueira MEPB. Toxicologia Analítica. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2008:7,70 –76.

Corrêa CL. Etanol: determinação de etanol em sangue por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama. In: Moreau RLM, Siqueira MEPB. Toxicologia analítica. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2008. 248-252.

Departamento de Polícia Rodoviária Federal (DPRF). Conhecendo a lei seca. Disponível em: <https://www.prf.gov.br/PortalInternet/LeiSeca.faces>. Acesso em: 20 de fevereiro de 2014.

Fell JC, Voas RB. The effectiveness of a 0.05 blood alcohol concentration (BAC) limit for driving in the United States. Maryland - EUA. Addiction. 2013.

França GV. Medicina Legal. 8. ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2008. 16,333-335.

Galduróz JCF, Caetano R. Epidemiologia do uso de álcool no Brasil. São Paulo. Rev Bras Psiquiatr 2004;26(Supl I):3-6

Helander ABO. Analytical markers of acute and chronic alcohol consumption. Suécia. Handbook of Analytical Separations. 2008:6,567-588.

Høiseth G, Bernard JP, Stephanson N, Normann PT, Christophersen AS, Mørland J, Helander A. Comparison between the urinary alcohol markers EtG, EtS, and GTOL/5-HIAA in a controlled drinking experiment. Stockholm, Suécia. Alcohol & Alcoholism. 2008:187-191.

REVISÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DO CONSUMO AGUDO DE ÁLCOOL EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

International Center For Alcohol Polices (ICAP). Blood Alcohol Concentration Limits Worldwide: Drinking and Driving. Acesso em: Out 2013. Disponível em: <<http://www.icap.org/PolicyIssues/DrinkingandDriving/BACTable/tabid/199/Default.aspx>>.

Kassasbeh ET, Abdallat EM, Hadidi MS. Prevalence of alcohol in autopsied medico-legal cases at the National Institute of Forensic Medicine, Jordan. Jordânia. Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences. 2011. 3(9):264-270.

Lachenmeier DW, Godelmann R, Steiner M, Ansay B, Weigel J, Krieg G. Rapid and mobile determination of alcoholic strength in wine, beer and spirits using a flow-through infrared sensor. Chemistry Central Journal. 2010;4:5.

LABHUT. Basic principles of headspace analysis. SMI-Labhut Ltd. Disponível em: <http://www.labhut.com/education-centre/headspace-gas-chromatography/basic-principles-of-headspace-analysis.html>. Acesso em: 20 de junho de 2014.

Moreau RLM, Siqueira MEPB. Toxicologia Analítica. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2008.

Neres CS. Tese. Toxicologia forense: etanolemia por abuso de álcool. 2004. 14-17, 32-35.

Nutt D, King LA, Saulsbury W, Blakemore C. Development of a rational scale to assess the harm of drugs of potential misuse. Lancet. 2007;369:1047-53.

Oga S, Camargo MMA, Batistuzzo JAO. Fundamentos de Toxicologia. 3ª Ed. Atheneu, 2008.

Organização Mundial de Saúde (OMS). 2011. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs349/en/index.html>>

Sarkola T, Dahl H, Eriksson CJ, Helander A. Urinary Ethyl Glucuronide and 5-Hydroxytryptophol Levels During Repeated Ethanol Ingestion in Healthy Human Subjects. Noruega e Suécia. Alcohol & Alcoholism. 2003;38(4):347-351.

Silva E. Cromatogramas de quantificação de etanol pelo método CG-headspace (gentilmente cedidos). Polícia Técnica Científica de Estado de São Paulo. 2012.

Society of Forensic Toxicologists & American Academy of Forensic Sciences (SOFT & AAFS). Forensic Toxicology Laboratory Guidelines. 2006. Disponível em http://www.soft-tox.org/files/Guidelines_2006_Final.pdf. Acessado em: 1 de agosto de 2012.

Souza JP, Hi EMB, Souza TA. Marcadores de consumo agudo de álcool (etanol) encontrados em amostras biológicas. Santos – SP. Revista UNILUS Ensino e Pesquisa. 2013;10,30

Yonamine M, Tawil N, Moreau RLM, Silva OA. 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 2003;789(1):73-8.