

MARCOS VINICIUS PINTO VENTORIN

**RELAÇÃO ENTRE A DOSAGEM DE ETANOL NO
SANGUE E NA SALIVA.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Mestre em Odontologia Legal e Deontologia.

PIRACICABA
2004

MARCOS VINICIUS PINTO VENTORIN

**RELAÇÃO ENTRE A DOSAGEM DE ETANOL NO
SANGUE E NA SALIVA.**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Odontologia de Piracicaba, da
Universidade Estadual de Campinas,
para a obtenção do título de Mestre
em Odontologia Legal e Deontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria da Luz Rosário de Sousa.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Eduardo Daruge
Prof. Dr. Luís Renato da Silveira Costa
Profa. Dra. Maria da Luz Rosário de Sousa

PIRACICABA
2004

Ficha Catalográfica

V566r Ventorin, Marcos Vinicius Pinto.
Relação entre a dosagem de etanol no sangue e na saliva. /
Marcos Vinicius Pinto Ventorin. – Piracicaba, SP: [s.n.], 2004.
ix, 85f.: il.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria da Luz Rosário de Sousa.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Cromatografia gasosa. 2. Bebidas alcoólicas. I. Sousa,
Maria da Luz Rosário de. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8–6159, da
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.

Folha de Aprovação – fornecida pela CCPG

Dedico este trabalho aos meus pais, Ângelo e Silésia, pelos ensinamentos e por me mostrarem os caminhos do que é correto, a meus irmãos por apoiarem e colaborarem para que este trabalho obtivesse êxito e à Scheila, por compreender as ausências em muitos momentos e por nunca deixar de incentivar-me e especialmente a Deus, sempre presente e luz na caminhada.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, na pessoa de seu Magnífico Reitor, Prof.Dr. Carlos Henrique de Brito Cruz e a Faculdade de Odontologia de Piracicaba – FOP na pessoa do Diretor Prof. Dr. Thales Rocha de Mattos Filho.

Ao prof. Eduardo Daruge, pela sólida amizade, pela oportunidade de realizar este trabalho com total apoio e por ampliar generosamente meus conhecimentos.

A profa. Maria da Luz Rosário de Sousa, pela participação de forma sábia, inteligente sempre serena e compreensiva, na condução deste trabalho.

Ao prof. Ronaldo Seichi Wada, pela participação na banca de qualificação e pela ajuda na análise e interpretação dos resultados.

Ao prof. Eduardo Daruge Júnior, pelo constante apoio e amizade estando sempre a disposição em todos momentos e pela participação na qualificação do trabalho.

Ao prof. Dr. Luís Renato da Silveira Costa pela amizade e grande contribuição dada desde o início a esta pesquisa.

Ao prof. Dr. Romildo Rabbi, pela amizade, auxílio e disponibilidade incondicional, que possibilitaram que este trabalho fosse realizado.

À Profa. Gláucia M. Bovi Ambrosano, pelo auxílio na análise estatística dos dados.

A todo Departamento de Odontologia Social, em especial aos professores da Odontologia Legal e Deontologia que estiveram sempre presentes nesta jornada.

Aos amigos da Pós-Graduação, em especial ao amigo Célio Spadácio, agradeço a participação, não só neste trabalho, mas na influência positiva que todos tiveram.

A todos funcionários do Departamento de Odontologia Legal, em especial Célia e Cidinha e do setor de Biblioteca, e demais funcionários da FOP.

Ao Laboratório Central de Polícia Técnica da Bahia, na pessoa do diretor Djalma C. Luz e ao prof. Luiz C.C. Galvão, pela análises das amostras.

A todos os voluntários, por compreenderem a importância deste estudo e colaborarem de livre e espontânea vontade.

À CAPES , pela concessão da bolsa de Mestrado.

A meu pai Ângelo e minha mãe Silésia, por sempre estarem ao meu lado e sempre compreensivos me ajudarem em todas as etapas da vida.

Às irmãs, Jacqueline e sua família pela presença desde o início dos trabalhos, e Sandra pela lição de garra que inspirou a minha caminhada.

Aos irmãos Saulo e Ricardo por estarem sempre presentes, e ao amigo Erik que sabemos que ainda está entre nós.

Agradeço em especial a meu irmão Saulo e a meu pai Ângelo, por me ajudarem na formação dos grupos de voluntários e por estarem sempre presentes nesta difícil fase do trabalho.

À Scheila pelo encanto que trouxe à minha vida, que com sua paciência e amor, estando sempre ao meu lado, soube entender a importância deste trabalho.

A Deus, que foi fonte de inspiração durante a caminhada e conforto nas horas difíceis, sem Ele nada seria possível, somente tenho a agradecer-lo.

"Depois de algum tempo você aprende a construir todas as suas estradas no hoje,
porque o terreno do amanhã é incerto demais para os planos, e o futuro tem o
costume de cair em meio ao vão.
E aprende que não importa o quanto você se importe, algumas pessoas
simplesmente não se importam...
Aprende que, ou você controla seus atos ou eles o controlarão, e que ser flexível
não significa ser fraco ou não ter personalidade, pois não importa quão delicada e
frágil seja uma situação, sempre existem dois lados".

(W. Shakespeare)

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	01
LISTA DE ABREVIATURAS	02
RESUMO	03
ABSTRACT	04
1 INTRODUÇÃO	05
2 REVISÃO DA LITERATURA	07
2.1 O ETANOL	07
2.1.1 <i>O ETANOL E A CLASSIFICAÇÃO DE BEBIDAS ALCOÓLICAS</i>	07
2.1.2 <i>METABOLISMO DO ETANOL</i>	08
2.1.2.1 <i>Introdução e absorção do etanol no organismo</i>	08
2.1.2.2 <i>Distribuição do etanol</i>	09
2.1.2.3 <i>Oxidação e excreção do etanol</i>	10
2.1.3 <i>FATORES QUE INFLUENCIAM A ABSORÇÃO DO ETANOL</i>	12
2.1.4 <i>INTOXICAÇÃO ALCOÓLICA</i>	13
2.1.5 <i>DOSES TÓXICAS</i>	15
2.1.6 <i>LEGISLAÇÃO E ETANOL</i>	16
2.2 - PROPRIEDADES DA SALIVA	19
2.2.1 - <i>ANATOMIA E FISILOGIA DAS GLÂNDULAS SALIVARES BASES E FORMAÇÃO DA SALIVA.</i>	21
2.2.2 - <i>COMPONENTES INORGÂNICOS</i>	23
2.2.3 - <i>COMPONENTES ORGÂNICOS</i>	23
2.2.4 - <i>MECANISMO DE EXCREÇÃO DE DROGAS PELA SALIVA.</i>	24
2.3 - CROMATOGRAFIA GASOSA NA ANÁLISE DE ETANOL	25
2.4 - RELAÇÃO DO ETANOL NO SANGUE E NA SALIVA	27
3 PROPOSIÇÃO	37
4 MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 MATERIAL	38
4.2 MÉTODOS	39

4.2.1	METODOLOGIA	39
4.2.2	FASE LABORATORIAL	49
4.2.2.1	Tratamento das Amostras	49
4.2.2.2	Reagentes e Soluções de Trabalho	50
4.2.2.3	Análise e Condições Cromatográficas	50
4.2.2.4	Validação do Método Proposto	51
4.2.2.5	Linearidade	52
4.2.2.6	Limite de Detecção (LD)	52
4.2.2.7	Protocolos de Bio-segurança	52
5	RESULTADOS	53
6	DISCUSSÃO	59
7	CONCLUSÃO	67
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
	ANEXOS	77
	Anexo 1 Termo de consentimento livre e esclarecido.	77
	Anexo 2 Questionário sobre estado geral de saúde - voluntários.	78
	Anexo 3 A tabela indicativa da classificação do IMC: Fonte: OMS (1998).	79
	Anexo 4 Modelo de formulário de pesagem de amostras para a dosagem do nível de etanol no sangue (LCPT-Ba).	80
	Anexo 5 Determinação da Linearidade do FID CG-90 do LCPT-Ba (Cálculo por regressão linear).	81
	Anexo 6 Curva de calibração do CG-90/ Limite de Detecção LCPT-Ba. (Cálculo por regressão linear).	82
	Anexo 7 Tabela corresponde à ingestão de 80 ml de bebida alcoólica e coleta de amostras em 1 hora.	83
	Anexo 8 Tabela de resultados da avaliação do Índice de Massa Corporal (IMC) para voluntários da pesquisa.	84
	Anexo 9 Certificado de Aprovação no comitê de ética em pesquisa. (CEP)	85

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Curva alcoolêmica.	12
Tabela 1 - Estatística descritiva segundo altura, peso e idade em adultos, Vitória, ES, 2003.	53
Tabela 2 - Estatísticas descritivas da quantificação de etanol em amostras de sangue e saliva em adultos, Vitória, ES, 2003.	54
Figura 2- Box Plot do sangue e saliva após a ingestão de 80ml de bebida alcoólica.	54
Figura 3 - Média e Desvio Padrão do sangue e saliva após a ingestão de 80ml de bebida alcoólica	54
Figura 4 - Quantidade de álcool do sangue após a ingestão de 80ml de bebida alcoólica.	55
Figura 5 - Quantidade de álcool da saliva após a ingestão de 80ml de bebida alcoólica.	55
Tabela 3 - Correlação entre a quantificação de etanol em amostras de sangue e saliva após a ingestão de 80ml de bebida alcoólica, altura, peso e idade.	56
Figura 6 - Diagrama de Dispersão (concentração de etanol sangue x concentração de etanol saliva).	56
Figura 7 - Diagrama de Dispersão (concentração de etanol sangue x peso).	56
Figura 8 - Diagrama de Dispersão (concentração de etanol saliva x peso).	57
Figura 9 - Diagrama de Dispersão (concentração de etanol sangue x idade).	57
Figura 10 - Diagrama de Dispersão (concentração de etanol sangue x idade).	57
Tabela 4 - Teste t-pareado (estatística teste e p).	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

“	-	Polegada (s).
°C	-	Graus Celcius ou graus centígrados.
µL	-	Microlitro (s).
µV	-	Microvolt (s).
FID	-	Detector de ionização de chama (flame ionization detector).
g	-	Gramma (s).
GC	-	Cromatografia Gasosa ou Cromatógrafo de fase Gasosa.
HS	-	<i>Headspace</i> .
id	-	Diâmetro interno.
Kg	-	Quilograma.
L	-	Litro (s).
LCPT-Ba	-	Laboratório Central de Polícia Técnica da Bahia.
m	-	Metro (s).
min	-	Minuto (s).
mL	-	Mililitros.
mm	-	Milímetro (s).
sa	-	Saliva.
seg	-	Segundo (s).
sg	-	Sangue.

RESUMO

O uso excessivo de bebidas alcólicas pode causar uma intoxicação aguda e um quadro de perturbação física e mental conhecido como embriaguez alcoólica, que envolve questões de ordem social, jurídica e médico-legal. Geralmente o exame para se detectar o nível total de álcool no paciente se procede com amostra de sangue coletada do indivíduo; entretanto outras matrizes biológicas podem ser utilizadas para análise, como a urina, o ar expirado e a saliva. Os métodos analíticos para a quantificação do etanol são diversos, sendo os métodos cromatográficos de aplicação mais prática e fidedigna. O objetivo deste trabalho foi verificar a utilização da saliva como matriz alternativa ao sangue na pesquisa dos níveis de álcool no organismo, através de método prático e de resultados confiáveis, em casos de ingestão de bebidas alcólicas. A avaliação foi feita em amostras de saliva coletadas em trinta voluntários que ingeriram 80ml de bebida alcólica sob jejum de três horas e período de abstinência de 48 horas para o uso de bebidas alcólicas e drogas em geral. Os voluntários responderam um questionário sobre condições de saúde e assinaram um termo de consentimento esclarecido. As amostras vaporizadas (*headspace*) de sangue e saliva foram analisadas por cromatografia gasosa. Para análise estatística foram utilizadas a Correlação de Pearson e o teste-t pareado com 5% de significância. Houve uma perda de três amostras, e os resultados se referem a 27 amostras. A média de etanol no sangue foi de 0,2641 com desvio padrão de 0,12004 sendo na saliva de 0,2322 e 0,11154 respectivamente. Houve forte correlação positiva mostrando comportamento similar do etanol nas amostras de sangue e saliva ($r=0,810$; $p<0,01$), entretanto as médias de etanol no sangue e na saliva foram diferentes ($p=0,029$). Os dados deste estudo indicam que a saliva apresentou valores de etanol inferiores ao que o sangue indica.

ABSTRACT

The excessive use of alcoholic drink can cause a acute intoxication and a list of physical and mental disturbances know as acoholic intoxication, that involves subjects of juridical and forensic order. Usually the exam to detect the total level of alcohol in the patient is proceeded with the individual's sample of blood collected, however another biological matrix can be used for analysis, as the urine, breath or saliva. There are several analytical methods for the quantification of the ethanol, being the chromatographic methods furthermore pratical and trustworthy aplication. The purpose of this study was to verify the use of the saliva as alternative matrix to the blood in research for the blood alcohol concentration through pratical method with reliable results, in cases of ingestion of alcoholic drinks. The evaluation was made in saliva samples collected in thirty volunteers that ingested 80ml of alcoholic drink under fast of three hours and period of abstinence of 48 hours for the use of drunk alcoholic and drugs in general. There were completion a questionnaire of health and signature of the consent term. The vaporized samples (headspace) of blood and saliva were analyzed by gas chromatographic. For the statistical analysis they were used Pearson's correlation and the test-t pair with $p < 0.05$. There was a loss of three samples, and the results refer to 27 samples. The ethanol average in the blood was 0.2641 with the standart deviation 0.12004 being respectively in the saliva 0.2322 and 0.11154. There was strong positive correlation showing similar behavior of the ethanol in the samples of blood and saliva ($r=0.810$ $p < 0.01$), however the ethanol averages in the blood and saliva were different ($t=0.029$ $p < 0.05$). The data of this study indicate that the saliva presented inferior values of ethanol than that blood indicates.

1 INTRODUÇÃO

O consumo crescente de bebidas alcoólicas é um fenômeno mundial largamente aceito pela maioria das sociedades organizadas. No entanto, o freqüente abuso no consumo dessas substâncias pode causar grandes transtornos sociais, familiares, econômicos, legais, e constitui-se em um problema de saúde pública de grande relevância, como afirmam Mendenhall (1980), Fortes (1991), Rouquayrol (1993), Bates (1993) e Griffith (1998).

Segundo Galvão, 1996, o uso excessivo ou imoderado de bebidas alcólicas causa uma intoxicação aguda conduzindo a um estado de perturbação física e mental conhecido como embriaguez alcoólica e esta se constitui em um problema social, médico, jurídico e de saúde pública.

As questões médico-legais relacionadas à embriaguez alcoólica estão ligadas em geral à agressões físicas que têm, como conseqüência, lesões corporais de toda natureza, tanto na vítima quanto no agressor, podendo, não raramente, levar à morte. Ainda com relação aos aspectos médico-legais, temos as infrações cometidas no trânsito por condutores de veículos automotores, e outras situações nas quais a autoridade judiciária ou policial necessita de informações relativas ao nexo causal (Xavier Filho, 1998).

As questões de natureza jurídica que envolvem o consumo de álcool se relacionam diretamente ou indiretamente com o Código Penal, o Código de Trânsito Brasileiro (CTB), a Lei das Contravenções Penais, o Código Civil e a Consolidação das Leis de Trabalho (Vargas, 1990).

Para atender às necessidades jurídicas no estabelecimento do nexo causal entre o comportamento agressivo e o álcool se faz necessário que o acusado seja devidamente avaliado com o objetivo de se constatar ou não a presença do quadro de embriaguez alcoólica. E, para tal, o perito deverá valer-se do exame clínico e do exame laboratorial. O exame clínico é feito pelo médico perito através da análise de sinais e sintomas, bem como por meio da aplicação de testes psicomotores aplicados ao examinando. Quanto aos testes laboratoriais,

estes são realizados para a detecção do nível total de álcool no sangue, ou seja, a alcoolemia. Geralmente o exame se procede por meio de uma amostra de sangue coletada do examinando, mas, eventualmente outras matrizes biológicas poderão ser utilizadas para análise, como a urina, o ar expirado e a saliva (Kidwell, 1998). Os métodos analíticos para a quantificação são diversos, sendo que os métodos cromatográficos são de aplicação mais recente, de maior fidelidade, praticidade e versatilidade (Henry, 1991).

Alguns problemas ainda ocorrem, com relação à coleta das amostras de sangue, em virtude da objeção manifestada por parte de alguns pacientes, que entendem ser esta coleta um procedimento invasivo. Em outras situações, a coleta é prejudicada em função da impossibilidade da obtenção do material pela falta de pessoas qualificadas para tal (Peel, 1984; Urbansky, 1990; Corrêa, 1997). Assim, a busca por amostras alternativas obtidas por métodos práticos e não invasivos que reproduzam de maneira fiel os níveis de álcool etílico encontrados no sangue, têm encorajado novas pesquisas (Macchia, 1995).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a possibilidade da utilização da saliva como matriz alternativa para a verificação e quantificação de etanol em casos de suspeita de ingestão de bebidas alcoólicas. A avaliação de amostras obtidas em 30 voluntários e das relações entre os valores obtidos na dosagem por cromatografia gasosa em amostras de sangue e saliva foram analisados, visando estabelecer a real importância e a aplicabilidade desse método e com o objetivo de considerar a possibilidade da utilização da saliva como matriz alternativa para a dosagem das concentrações dos níveis de etanol no sangue. A finalidade prática é a de contribuir com a sociedade fornecendo subsídios à Justiça, para que esta, de forma segura e precisa, tenha elementos probantes para julgar os diversos tipos de delitos, com a garantia de que os procedimentos analíticos toxicológicos adotados são seguros.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ETANOL

2.1.1 O ETANOL E A CLASSIFICAÇÃO DE BEBIDAS ALCOÓLICAS

Quimicamente o etanol (também chamado de álcool etílico), com fórmula molecular C_2H_5OH , é classificado como monoálcool de baixo peso molecular, saturado, e altamente miscível em água, sendo que suas moléculas ligam-se entre si através das pontes de hidrogênio. Possui ponto de solidificação em torno de $-114, 5^{\circ}C$ e ponto de ebulição a $78, 33^{\circ}C$.

Dentre os diversos tipos de álcoois existentes, o álcool etílico, ou etanol, é o constituinte essencial das bebidas alcoólicas, no entanto, com relativa frequência surgem outros álcoois como o álcool metílico, ou metanol, e outras substâncias químicas estranhas ao álcool etílico como essências, éteres, aldeídos, sulfitos, ácido salicílico, conservantes e corantes (Almeida Júnior, 1979).

As bebidas alcoólicas são divididas em bebidas fermentadas, destiladas e bebidas alcoolizadas (Xavier Filho, 1998; Arbenz, 1988). As bebidas fermentadas são aquelas obtidas por fermentação natural de substâncias ternárias como amido e outros açúcares, geralmente possuem baixo teor alcoólico e são conhecidas desde a antigüidade. Como exemplos deste tipo de bebida podemos citar o vinho e a cerveja (França, 1998; Croce, 1998).

Já as bebidas destiladas são de história mais recente e são obtidas pela destilação das bebidas fermentadas. Em geral, a gradação alcoólica destas bebidas é elevada podendo atingir mais de 60% em álcool e temos como exemplos populares, a aguardente e o uísque. (Silva Júnior, 1969; Croce, 1998).

As bebidas alcoolizadas ou alcoólicas de mistura são aquelas que após a fermentação se carregou artificialmente na dose de álcool, sendo, portanto, uma mistura de líquidos alcoólicos. Sua gradação alcoólica é variável por depender da

adição artificial de álcool ao produto a ser obtido mas, normalmente são elevadas. São exemplos os vinhos do Porto, os vinhos Madeira e os licores. (Arbenz, 1988).

2.1.2 METABOLISMO DO ETANOL

2.1.2.1 Introdução e absorção do etanol no organismo

A introdução do álcool no organismo humano pode se dar por diversas maneiras: pelas vias aéreas superiores, através da inalação dos vapores do álcool nos casos de infortúnio do trabalho; por via endovenosa como nas medidas terapêuticas ou anestésicas; por absorção cutânea pela passagem do álcool através da pele, por absorção retal, dentre outras. Porém estas formas são bem menos comuns do que a absorção pela via digestiva (Calabuig, 1992).

A ingestão oral é a primeira etapa do processo mais comum de intoxicação. A bebida ingerida normalmente fica pouco tempo em contato com a cavidade oral, passando rapidamente pela orofaringe e esôfago chegando ao estômago e daí seguindo para o intestino; a passagem da bebida é tão mais rápida quanto menor for o conteúdo destas cavidades. Enquanto estiver nestes locais, o álcool não causa nenhum efeito embriagante (Almeida Júnior, 1979).

A partir do tubo digestivo o álcool passa para o sangue por difusão dando início ao fenômeno da absorção. Em geral a absorção do álcool se inicia no estômago (Maranhão, 2000), local onde as paredes absorvem em média 20 a 30% do etanol ingerido e a absorção se completa principalmente no intestino delgado. O tempo gasto para se completar a absorção é de duas a seis horas, a depender de fatores que retardem ou acelerem o processo (Ferreira, 1962; Xavier Filho, 2000).

O processo de absorção no intestino delgado é bem mais rápido e independe da concentração da bebida ou da presença de alimentos, o que não acontece no estômago, onde o conteúdo gástrico (plenitude, ou vacuidade gástrica) influi diretamente na absorção do etanol (Galvão, 1996; Ravel, 1995).

2.1.2.2 Distribuição do etanol

Uma vez absorvido, o etanol é distribuído por todo organismo de forma mais ou menos uniforme. Pela absorção gástrica e intestinal ele vai diretamente ao sistema porta-hepático e daí à circulação sangüínea e linfática, e já na primeira passagem pelo fígado uma parte é oxidada. Uma vez vencida esta barreira o etanol vai ser distribuído pelos tecidos em geral (Silva Júnior, 1969; Brito Filho, 1988; França, 1998).

Quando o etanol chega ao sangue e é distribuído, ele se difunde para os tecidos e espaços intra e extra-celulares em função da riqueza de água nos tecidos. Ocorre posteriormente um momento em que se produz um ponto de equilíbrio, chamado de equilíbrio de difusão. Em função deste equilíbrio de difusão que se alcança entre o sangue e os tecidos, é possível conhecer a concentração do álcool no sangue, após ter se estabelecido o equilíbrio de uma dose única de álcool (Henry, 1991).

O etanol então distribui-se por todo o organismo, para praticamente todos os órgãos (cérebro, glândulas genitais etc.), vísceras (fígado, rins), tecidos, humores (líquido céfalo-raquidiano, amniótico etc.), secreções e excreções (leite, saliva, esperma, urina) (Galvão, 1996; Brito Filho, 1988; Maranhão, 2000). O etanol se distribui em maiores concentrações nos tecidos mais ricos em água; da mesma forma, quanto mais gordura apresentar o tecido, menos álcool será depositado nele (Ferreira, 1962; Arbenz, 1988). Esta relação entre a quantidade de etanol e o peso é bem caracterizada em função do índice de massa corporal (IMC) de cada indivíduo, guardando estreito relacionamento na medida em que se aumenta o índice, quando a tendência da concentração de etanol no sangue é diminuir.

2.1.2.3 Oxidação e excreção do etanol

O processo de catabolismo oxidativo do etanol pode realizar-se através de várias rotas metabólicas. Em sua oxidação, o etanol passa primeiro a aldeído acético (etanal ou acetaldeído) e pode seguir três diferentes vias. A via da álcool desidrogenase; a via metabólica representada pelo sistema mitocondrial de oxidação do etanol, (segundo Calabuig, 1992, um processo não específico para o etanol, pois é utilizado para a oxidação de outros álcoois e drogas) e a terceira via chamada via das catalases, representadas por enzimas presentes em diversos tecidos orgânicos, em especial no tecido hepático (esta via também não é específica para o etanol, podendo atuar também sobre outros álcoois).

A via metabólica da álcool-desidrogenase, ou ADH, é provavelmente a via mais importante, sendo realizada por uma enzima que está presente em vários tecidos orgânicos, principalmente no fígado, e é responsável pela reação catalítica de transformação do etanol (C_2H_5OH) em aldeído acético (C_2H_4O). Esta via metabólica por processos enzimáticos é utilizada como reação para métodos de quantificação do etanol (Henry, 1991; Ravel, 1995).

O destino do acetaldeído formado é ser metabolizado a ácido acético numa reação catalisada pela enzima acetaldeído-desidrogenase ou ALDH. O ácido acético (ácido etanóico) sofre os fenômenos oxidativos até ser convertido em água e gás carbônico (Arbenz, 1988). Esta oxidação não é um processo imediato, mas sim, contínuo e lento onde se queima por hora uma quantidade variável de calorias para cada pessoa; mas, de modo geral, esta velocidade pode ser estimada em 10 a 20ml/hora (Dreisbach, 1975), com um máximo de 400 a 500ml de oxidação por dia (Brito Filho, 1988) ou ainda, segundo Xavier Filho, 1998, uma queima de 10g/hora com uma variação de mais ou menos 2 g.

Quanto à eliminação, uma pequena parte do etanol ingerido é eliminada pelos pulmões, em geral, cerca de 2 a 4% (Maranhão, 2000). Isto é possível graças à volatilidade do etanol e segue um processo inverso ao da absorção por inalação, ou seja, através da difusão do produto volátil durante a hematose.

Apesar de pequeno, esse valor é analiticamente de grande interesse por representar uma possibilidade de análise alcoólica incruenta.

Em seguida, os rins entram na escala gradativa de eliminação, com uma percentagem um pouco maior no processo, normalmente cerca de 3 a 5%. A ação conjunta destes dois órgãos (rins e pulmões) pode chegar a perfazer até 15% do total de eliminação da dose ingerida (Almeida Júnior, 1979).

Apenas uma pequena parte do etanol é eliminada pela pele através do suor, pelos produtos das glândulas salivares, lacrimais e mamárias e pela placenta (Calabuig, 1992; Ferreira, 1962), no entanto as concentrações de etanol se mantêm constantes, em geral sendo eliminadas na sua forma básica. A eliminação pela saliva é feita em pequenas quantidades, no entanto também possui grande valor de interesse analítico, sendo também uma via incruenta de análise (Girja, 2002).

Os rins e pulmões juntamente com a pele e as glândulas citadas acima conferem um total de eliminação, que em geral, atinge cerca de 10% da dose ingerida, e excepcionalmente em torno de 15% da eliminação. Assim o restante do etanol ingerido é processado mediante a oxidação no sangue pelas rotas metabólicas perfazendo um total superior 85% (Almeida Júnior, 1979; Arbenz, 1988).

Como conseqüência destes fenômenos de oxidação e excreção é possível determinar que em até 11 horas após a ingestão, há uma eliminação de cerca de 70% e que a totalidade da eliminação ocorra em torno das 24 horas subseqüentes à ingestão da dose álcool (Silva Júnior, 1969; Galvão, 1996; Maranhão, 2000). Com base nos fenômenos descritos observa-se que o metabolismo do etanol obedece a seguinte seqüência: depois de algum tempo após a ingestão da bebida alcoólica, o álcool aparece no sangue e o seu teor vai aumentando gradativamente, formando uma curva ascendente. A fase ascendente chega a um pico máximo e torna-se estável, para em seguida começar a declinar, originando uma fase descendente. Entre o máximo da fase ascendente e o início

da desintoxicação por oxidação do etanol, pode decorrer um certo tempo em que se origina um período estável ou platô (Calabuig, 1992; Maranhão, 2000).

Graficamente, assim se representa as fases ascendentes, de platô e a fase descendente com a curva do nível de concentração do etanol no sangue:

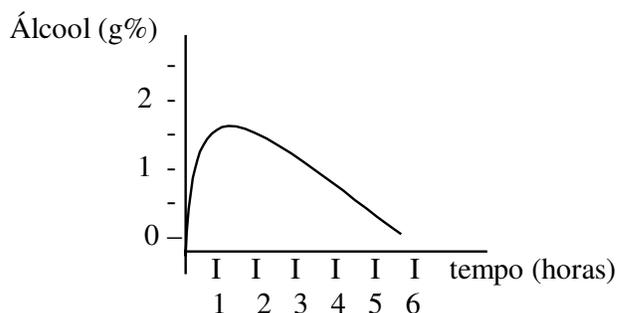


Figura 1 – Curva alcoolêmica. Porcentagem de etanol em gramas pelo tempo em horas.

Fonte: Calabuig, 1992, p.654.

2.1.3 FATORES QUE INFLUENCIAM A ABSORÇÃO DO ETANOL

Existem diversas circunstâncias que influenciam o ritmo da absorção do etanol, podendo retardar ou acelerar a mesma. Os principais fatores são: a vacuidade gástrica, a diluição da bebida, a velocidade da ingestão, o peso do indivíduo, a temperatura ambiente (Almeida Júnior, 1979; Gomes, 1992; Ravel, 1995).

O estado de plenitude ou vacuidade gástrica é influenciado pela presença ou não de alimentos no estômago. O etanol é mais lentamente absorvido após refeições do que quando ingerido com o estômago vazio. Assim, a absorção das bebidas alcoólicas ingeridas em jejum é mais rápida e mais uniforme, guardadas as devidas variações orgânicas inerentes a cada indivíduo (Ferreira, 1962).

Quanto à diluição, quanto maior a gradação da bebida alcoólica, mais concentrada ela é, e assim maior será a quantidade de etanol que passará para o sangue quando a dose ingerida for absorvida. Em relação à velocidade de ingestão, temos que, quanto mais rapidamente se der a ingestão de bebidas alcoólicas, mais depressa o álcool será absorvido e sua taxa se elevará mais rapidamente na corrente sanguínea (Calabuig, 1992).

Também é sabido que nos dias mais frios, a absorção do etanol é menor. E, por fim, com relação ao peso do indivíduo; quanto maior for o peso, menor será a quantidade de etanol no sangue, indicando que apesar da absorção não ser afetada pelo peso, o etanol absorvido distribui-se uniformemente por todo o organismo, e conseqüentemente serão menores as taxas observadas no sangue.

2.1.4 INTOXICAÇÃO ALCOÓLICA

A ingestão das bebidas alcoólicas pode causar diversos níveis de intoxicação a depender da quantidade de etanol ingerido, ritmo da ingestão, vacuidade gástrica e da tolerância individual, podendo ser mais ou menos grave para cada pessoa. Assim teremos as intoxicações alcoólicas agudas ou crônicas (Vargas, 1990).

Como formas de intoxicação alcoólica temos: a embriaguez simples, a embriaguez patológica, a embriaguez crônica que às vezes desencadeia a dipsomania e o *delirium tremens*. A embriaguez simples ou aguda é a mais comumente observada. Ela se caracteriza a partir do momento que o indivíduo se encontra com um grau de intoxicação a ponto de prejudicar sensivelmente a sua conduta. É a forma de embriaguez de maior relevância médico-legal, e possui uma evolução no seu quadro que abrange três fases ou períodos. Essas fases são: a de excitação, a de confusão e a do sono ou torpor.

A primeira fase, eufórica ou de excitação, é o primeiro período onde o quadro clínico se faz bem característico: o indivíduo se apresenta inquieto, loquaz, eufórico e com a consciência ainda freando-lhe os atos, determinando pois, um comportamento social adequado. Nesta fase ocorre uma exacerbação das idéias, uma maior disposição aparente e uma pequena alteração nos reflexos. Nesta fase pode ser observado hálito etílico e mucosas hiperemiadas.

A segunda fase, de confusão ou de agitação, é a fase de maior interesse médico-legal, pois neste período há uma grande tendência a agressões por parte do usuário da droga, além de perturbações psicossensoriais profundas, alterações das funções intelectuais e do juízo crítico (Maranhão, 2000; França, 1998). Observa-se que nesta fase o hálito continua etílico, os reflexos encontram-se mais comprometidos e pode ser observado o Sinal de Romberg¹, que trata-se de uma das provas de equilíbrio mais comumente utilizadas na análise desta etapa da embriaguez alcoólica. Se a personalidade básica do indivíduo era agressiva, com a liberação do controle, ele passa a criar situações conflitantes e a instigar outros indivíduos precipitando-os para a violência.

A terceira fase é chamada de fase comatosa, do sono ou torpor, e se manifesta como estado paralisiforme. A marcha, nesta etapa, é cambaleante (marcha ebriosa), o indivíduo permanece na posição em que é deixado, a voz fica arrastada e freqüentemente ocorre disartria (dificuldade para articulação das palavras). Os reflexos encontram-se enormemente alterados e o Sinal de Romberg tem sua percepção dificultada pelo fato de que o indivíduo dificilmente consegue manter-se de pé. Nesta fase, o indivíduo geralmente só reage a estímulos violentos (Maranhão, 2000; Arbenz, 1988; Croce, 1988; Almeida Júnior, 1979; França, 1998; Vargas, 1990; Gomes, 1992; Silva Júnior, 1969).

Deve-se levar em consideração que a duração das fases acima descritas varia para cada indivíduo e carece de limites precisos entre si. Em

1- Sinal de Romberg- sinais característicos para as alterações do equilíbrio que podem ser verificados no indivíduo de pé, livre de apoio e com olhos fechados, porque a ataxia estática aumenta quando falta o recurso da visao. (FRANCA, 1998; CROCE, 1998.)

alguns indivíduos não se observa esta evolução no desenvolvimento da embriaguez alcoólica, confundindo-se pois alguns dos fenômenos que habitualmente ocorrem em uma fase e que se manifestam em outra, diversa daquela na qual normalmente se apresentariam (Vargas, 1990).

2.1.5 DOSES TÓXICAS

Os valores relativos às doses tóxicas do álcool etílico servem como orientação, mas não podem ser considerados igualmente para todos os casos, uma vez que os efeitos das doses são diferentes para cada indivíduo, especialmente nos casos relativos ao hábito do consumo freqüente do etanol (Ferreira, 1962).

Em aproximadamente 75% das pessoas a embriaguez se manifesta com a ingestão de 1, 20 a 1, 50 gramas de etanol por quilograma de peso, e quando esta proporção atinge entre 5, 0 a 6, 0 gramas por quilograma de peso a intoxicação pode ser mortal (Henry, 1991; Brito Filho, 1988).

Segundo Calabuig, 1992, a ingestão de 0.75g de álcool etílico por quilograma de peso induz a transtornos de conduta em funções tidas como delicadas; quantidades de 1, 50 a 2, 35g de etanol por quilograma de peso provocam certo grau de embriaguez especialmente nos indivíduos não habituados ao seu uso; níveis acima de 2, 35g de etanol produzem embriaguez, inclusive nos bebedores habituais. Doses próximas de 3, 15g por quilograma de peso os fenômenos da embriaguez tornam-se mais graves, e entram na escala das doses consideradas potencialmente letais.

Segundo França, 1998, deve-se considerar que para um nível de concentração de etanol no sangue inferior a 0, 5g por 1.000ml há uma intoxicação inaparente, entre 0, 5 e 2, 0 g por 1.000ml há a presença de distúrbios tóxicos e acima de 2, 0g por 1.000ml, o estado de embriaguez alcoólica se faz característico.

É de suma importância lembrar que indivíduos podem apresentar uma taxa elevada de etanol no sangue e permanecerem em condições psíquicas e neurológicas sem as características de embriaguez sendo que o inverso também é verdadeiro. O diagnóstico da embriaguez pode ser baseado nos sinais clínicos observados pelos médicos peritos. No entanto, algumas legislações, como o Código de Trânsito Brasileiro, valorizam também o achado laboratorial (dosagem do nível de concentração de etanol no sangue) e o exame da dosagem do álcool através da análise do ar expirado (etilômetro) (Gomes, 1992; Vargas, 1990).

2.1.6 LEGISLAÇÃO E ETANOL

De fato, a embriaguez está relacionada a vários preceitos estabelecidos em lei, direta ou indiretamente. Os mais importantes aspectos são os relacionados ao Código Penal Brasileiro, no que tange à responsabilidade criminal e ao Código de Trânsito Brasileiro, mas devemos considerar que, de uma forma ou de outra, também há referências à embriaguez na Lei de Contravenções Penais, no Código Penal Militar, no Direito do Trabalho e no Regimento dos Servidores Públicos Civis da União.

Quanto ao Direito Penal, o diploma legal brasileiro faz várias referências à embriaguez. Inicialmente os artigos 26 e 28, II, § 1º e § 2º dispõem sobre a imputabilidade penal e a embriaguez pelo álcool ou substância de efeitos análogos. Os artigos 59 e 61 do referido código dispõem sobre as circunstâncias agravantes e atenuantes relativas ao estado de embriaguez (Carvalho, 1992).

O Decreto Lei N. 3.688 de 03.10.1941 que instituiu a Lei das Contravenções Penais cita em seu artigo 62 o estado de embriaguez e as relações sociais. E no artigo 63, estabelece a proibição de servir bebidas alcoólicas a menores de 18 (dezoito) anos e também a quem se acha em estado de embriaguez (Panasco, 1976).

O Código Civil em seu artigo 4^º dispõe sobre a incapacidade relativa dos indivíduos em exercer pessoalmente os atos da vida civil, estabelecendo uma relação implícita com os transtornos de natureza psíquica que podem ser causados pelo uso do álcool.

Quanto às questões relativas ao Direito do Trabalho, Croce, 1998, reconhece a responsabilidade do empregador por danos ocorridos aos funcionários que se encontrarem embriagados na empresa. Também a jurisprudência nacional responsabiliza os patrões por danos e acidentes dos empregados, mesmo quando estes se encontram em estado de embriaguez (França, 1998; Vargas, 1990).

O Código Penal Militar comporta-se de forma semelhante ao Código Penal, ou seja, dirime ou atenua a pena em alguns casos e em outras situações a agrava, em se tratando de embriaguez de seus tutelados (Croce, 1998).

Constantemente caracteriza-se a embriaguez em condutores de veículos automotores que são submetidos a exames no local das infrações ou de fiscalização ou naqueles que são conduzidos aos serviços médico-legais. O Código de Trânsito Brasileiro (CTB) estabelece em seus artigos 165, 269, 276, 277 e 306 as circunstâncias consideradas infrações, as medidas a serem tomadas e as penalidades a serem aplicadas, relativas ao uso de álcool e ao uso de outras substâncias que causam dependência física ou psíquica.

O legislador, no artigo 165 do CTB delimita os parâmetros quantitativos para os níveis de concentração de etanol no sangue, estabelecendo que dirigir sob a influência de álcool, em nível superior a seis decigramas por litro de sangue constitui infração. Assim também o artigo 276 do CTB cita a concentração de seis decigramas de álcool por litro de sangue estabelecendo que, com esta taxa de álcool no sangue o condutor se achará impedido de dirigir veículo automotor, cabendo ao Conselho Nacional de Trânsito (CONTRAN) estabelecer os índices equivalentes para os testes realizados com as demais drogas.

O artigo 277 do CTB, por sua vez, dispõe que todo condutor de veículo automotor, envolvido em acidente de trânsito ou que for alvo de fiscalização de

trânsito, sob suspeita de haver excedido os limites previstos no artigo anterior, será submetido a testes para verificação dos níveis de concentração do etanol no sangue, exames clínicos, perícia, ou outro exame que por meios técnicos ou científicos, em aparelhos homologados pelo CONTRAN, permitam certificar seu estado. Nota-se nesse artigo que o legislador preconiza que o suspeito de infração seja submetido a testes para verificação da dosagem dos níveis de etanol no sangue, não especificando qual tipo de substrato será utilizado para análise, ressaltando que poderá ser feito por “outro exame que por meios técnicos ou científicos, permitam certificar seu estado”, com a ressalva em relação aos aparelhos utilizados, os quais deverão ser homologados pelo CONTRAN.

Em vista disso, entende-se que os problemas jurídicos e médico-legais que normalmente envolvem as pessoas embriagadas ou suspeitas de embriaguez, exigem comprovação para a aplicação das sanções previstas. Logo, a análise clínica feita pelo médico é de suma importância para estabelecer como o indivíduo se comportava no momento da ação, ato ou omissão (França, 1998), e a dosagem laboratorial da droga, por sua vez, dará suporte aos dados encontrados no exame clínico, cabendo aos laboratórios dos Serviços de Toxicologia Forense, através de métodos de confiança executados pelos peritos, a elaboração dos laudos periciais que darão embasamento às decisões judiciais (Silva Júnior, 1969; Vargas, 1990).

Particularmente, as legislações especiais, como é o caso do Código de Trânsito Brasileiro, exigem uma quantificação determinada; neste caso, de 6dg (seis decigramas) de etanol por litro de sangue, para assim justificar o estado de embriaguez do indivíduo e encaixá-lo na norma adequada ao ato. Assim posto, vê-se que a dosagem do nível de álcool no sangue por métodos laboratoriais se faz imprescindível.

Com a amostra sangüínea podem ser executados exames por diversos métodos analíticos quantitativos, e como exemplo temos: reação de Nicloux, reação do Iodofórmio (Titulometria Volumétrica) (Brito Filho, 1988; Dreisbach, 1975), testes enzimáticos (Ravel, 1995; Annino, 1978), técnicas de oxidação eletroquímica (Henry, 1991), testes colorimétricos (Rodenberg, 1990), tiras

reagentes (Lima, 1992) ou ainda exames de espectrofotometria e cromatográficos, representativos do conteúdo total do etanol no sangue circulante.

A espectofotometria-enzimática e a cromatografia gasosa são atualmente os procedimentos mais empregados para a pesquisa das concentrações de etanol no sangue. Mendenhall, 1980, cita numerosos métodos para dosagem dos níveis de concentração do etanol no sangue e dentre estes, dispositivos de análise do ar expirado, dispositivos enzimáticos, calorimétricos, fotométricos e técnicas fluorométricas, ressaltando que, de todos os métodos disponíveis, o cromatográfico é o mais sensível, específico e de realização mais fácil.

Pellegrino, 1999, relata que a quantificação de etanol no sangue através de fluidos alternativos como a saliva tem mostrado um papel importante em pesquisas de cunho administrativo, clínico e médico-legal, em particular para atender às leis de trânsito. Lima, 1992, descreve alguns tipos de exames para determinar a dosagem do nível de concentração do etanol no sangue, com o uso da saliva como veículo para determinar as taxas de etanol, assim como Laposata, 1999, e Macchia, 1995, que assinalam a importância da saliva como meio alternativo para a quantificação de etanol no sangue.

2.2 PROPRIEDADES DA SALIVA

Como se pode observar, as tradicionais amostras de tecidos e fluidos biológicos (sangue, plasma e urina) utilizadas nas pesquisas quantitativas e qualitativas do etanol e muitas outras drogas e seus metabólitos, estão, aos poucos, cedendo espaço para fluidos alternativos como é o caso da saliva e do suor. O sangue permite boa estimativa da concentração das substâncias que estão presentes na corrente sanguínea, sendo a matriz, geralmente, selecionada para pesquisas de drogas e suas ações.

Nas análises da concentração do etanol, os estudos envolvendo o uso de amostras de saliva, como uma técnica não invasiva para testes qualitativos e quantitativos, têm se tornado muito importantes. Sendo rapidamente acessível e coletada, a saliva pode mostrar diversas vantagens sobre os fluidos biológicos clássicos como o sangue e a urina. Esse fato tem aumentado o interesse pela saliva nas pesquisas e monitoramento de diversas drogas.

A saliva vem atraindo a atenção no campo das pesquisas interessadas em determinar as concentrações de drogas no organismo há vários anos, alguns pesquisadores sugeriam que a saliva seria um substituto para o sangue nas áreas de estudo da farmacocinética, no monitoramento do uso de drogas, em casos forenses variados e acompanhamento de pacientes em tratamento crônico de drogas. Em 1982, Idowu e Caddy, ressaltaram essa idéia sobre a utilidade da saliva.

Algumas novas técnicas para a coleta e análise da saliva, bem como para a identificação de componentes que afetam a concentração das drogas neste fluido têm sido discutidas na tentativa de identificar claramente quais os seus papéis. Devido a esse incompleto conhecimento sobre a saliva como amostra biológica, os níveis de drogas nela encontrados são geralmente usados concomitantemente com os valores encontrados em outros fluidos, como por exemplo, o sangue.

No entanto, já se pode notar uma grande contribuição da saliva nas práticas forenses nos casos de pesquisas de drogas e no uso da amostra de saliva como meio para pesquisas sobre DNA (Walsh, 1992). Publicações feitas à comunidade científica têm mostrado claramente que, para o monitoramento de muitas drogas, a saliva tem se comportado como uma alternativa real que permite determinar, com acuridade, níveis plasmáticos dessas substâncias. Porém o mecanismo correto da secreção de drogas pela saliva e suas relações com as variações orgânicas individuais ainda não está completamente estabelecido.

2.2.1 ANATOMIA E FISIOLOGIA DAS GLÂNDULAS SALIVARES BASES DE FORMAÇÃO DA SALIVA.

As glândulas salivares compreendem uma massa de tecido que normalmente despeja seu conteúdo dentro da cavidade oral. Dentre as principais funções da secreção salivar no homem temos as de: umidificar as mucosas e membranas que recobrem a boca e a porção superior do trato digestivo, a fim de facilitar a fala e permitir um controle sobre a flora bacteriana da boca; fornecer enzimas que se destinam ao início da digestão do bolo alimentar na boca; produzir hormônios e outros componentes farmacologicamente ativos (Martinez-Madrigal & Micheau, 1989).

A saliva é um fluido complexo que é descarregada dentro da cavidade oral dos vertebrados mamíferos, produzido por um número variável de glândulas especializadas. A maior parte da saliva é produzida pelas glândulas salivares maiores (parótida, submandibular, e sublingual), mas uma pequena contribuição é dada por numerosas glândulas menores com localização labial, bucal, e palatal (Vining & McGinley, 1985).

O volume total da saliva produzido a cada dia, em adultos, é de 500 a 1500 ml. A saliva misturada consiste basicamente do conjunto das secreções das principais glândulas, submandibulares (65%), parótidas (23%), e sublinguais (4%), e das demais glândulas restantes (8%) formadas pelas numerosas glândulas menores. A saliva misturada é mais facilmente obtida e freqüentemente usada para análise de drogas e monitoramentos clínicos. (Caddy, 1984).

Essas proporções variam em função do tipo, intensidade e duração dos estímulos. Um estímulo importante para a secreção é a exposição e ingestão de alimentos; a quantidade e qualidade da secreção, que por sua vez, varia com a natureza da nutrição. A larga variação em alguns constituintes da saliva é resultado das diferentes técnicas de coleta, dos diferentes dispositivos utilizados e dos níveis de fluxo (Ritschel & Thompson, 1983).

A morfologia detalhada das glândulas salivares é descrita segundo Junqueira & Carneiro (1985). Quando se analisa a estrutura das glândulas observa-se que elas são formadas por unidades morfofuncionais chamadas adenômeros e cada unidade é constituída por uma porção secretora formada por células epiteliais glandulares e por ductos intercalares, estriados e excretorios. Na base das células epiteliais glandulares e do ducto intercalar nota-se a presença de células mioepiteliais. As glândulas salivares maiores não são apenas um agregado de adenômeros, apresentam constituição mais complexa com tecido conjuntivo, vasos sangüíneos, linfáticos e nervos, sendo revestidas por uma cápsula de tecido conjuntivo de onde partem os septos interlobulares que dividem a glândula. Os vasos e nervos entram nas glândulas por uma região chamada de hilo e daí se ramificam, formando uma rica rede capilar. Os ductos intercalares são pouco desenvolvidos, formados por epitélio simples cúbico e estão entre os ácinos e os ductos intralobulares, sendo formados por epitélio simples prismático cujas células têm características de células transportadoras de íons.

Os ductos estriados fundem-se para formar ductos maiores, os interlobulares ou excretorios, que se caracterizam por apresentarem epitélio de revestimento prismático estratificado que gradualmente se transforma em epitélio estratificado pavimentoso (ou bucal). Envolvendo estes ductos encontramos uma camada bem desenvolvida de tecido conjuntivo. As glândulas salivares possuem um elevado fluxo sangüíneo, proveniente da artéria carótida externa que penetra nas glândulas submandibular e sublingual em companhia dos ductos principais e nervos que no interior da glândula se subdividem. Quanto à função nervosa a secreção salivar é uma resposta reflexa controlada pelos nervos secreto-motores dos sistemas simpático e parassimpático (Haeckel, 1990).

2.2.2 COMPONENTES INORGÂNICOS

A água é o componente inorgânico predominante na saliva constituindo aproximadamente mais que 99,1% da composição total do fluido o que confere a saliva uma densidade equivalente a 1,008. Em geral, a saliva contém os eletrólitos usuais apresentados nos demais fluidos corporais, sendo os principais íons, o sódio, potássio, cloreto e bicarbonato. Os íons em geral são provenientes do sangue como resultado da diferença de pressão osmótica entre o sangue e o fluido e são ativamente secretados dentro da saliva.

As concentrações de íons potássio, cloreto e bicarbonato também mostram uma notável dependência sobre o nível do fluxo. A concentração de bicarbonato da saliva é altamente dependente do tipo de glândula, da natureza da estimulação e do nível de fluxo; desta forma podemos ter concentrações na saliva maiores ou menores que as concentrações do plasma. Como resultado de um aumento na concentração de bicarbonato há também um aumento do pH salivar, elevando os níveis de secreção. O pH da saliva pode alcançar valores entre 6,2 a 7,4 (Drobitch e Svesson, 1992; Harper, 1982).

2.2.3 COMPONENTES ORGÂNICOS

A saliva fornece enzimas para a digestão e outras proteínas, incluindo glicoproteínas, específicas da saliva. Quase todos os componentes orgânicos do plasma como hormônios, imunoglobulinas, enzimas, DNA e vírus podem ser detectados na saliva mesmo em pequenas quantidades (Vining & McGinley, 1985).

O risco potencial para a saúde das pessoas envolvidas na pesquisa com amostras de saliva parece não ser notavelmente grande quando comparados com amostras de sangue ou urina, exceto as amostras de saliva contaminadas com agentes patogênicos que podem ser associadas a um risco de infecção. Isto

não quer dizer que a saliva possui uma ampla atividade de espectro anti-viral. Por exemplo, citomegalovírus, Epstein-Barr vírus, e o vírus da hepatite B sobrevivem na saliva misturada (Fox, Wolff, Yeh, Atkinson & Baum, 1988).

Amostras de sangue devem ser manipuladas com cuidado, particularmente as amostras provenientes de toxicômanos, amostras estas com alta prevalência do vírus da hepatite B e do vírus da imunodeficiência humana (HIV). Como uma técnica não invasiva, a coleta e a análise de saliva parece ser particularmente atrativa em pacientes de alto risco onde a rotina de obtenção de sangue é muitas vezes dificultada devido a veias de difícil acesso ou trombose venosa. (Wolff & Hay, 1991).

2.2.4 MECANISMO DE EXCREÇÃO DE DROGAS PELA SALIVA.

Garret, 1998, ressalta que, no final do século XVII, Antonius Nuck injetou substâncias marcadoras dentro das glândulas salivares, via vasos sangüíneos e introduziu uma nova palavra para ilustrar seus resultados: a “sialografia”. O mesmo autor cita que, em 1856, Claude Bernard quantificou o movimento dos marcadores solutos do sangue para a saliva e vice-versa, percebendo que existe uma barreira de permeabilidade nas glândulas, uma vez que algumas substâncias passavam prontamente para dentro a saliva ao passo que para outras substâncias esta passagem era dificultada.

Langley, 1898, observou que o azul de metileno podia passar do sangue para a saliva e Krause, 1902, estudou a transferência do índigo carmine do sangue para a saliva nas glândulas submandibulares de cães. Krause considerava que o transporte ocorria via canalículos secretores. Nos anos 30, Amberson & Höber mostraram que para solutos não ionizados havia uma relação entre a lipossolubilidade e a permeabilidade na saliva. Garret e colaboradores, 1980, injetaram uma enzima dentro de artérias fornecedoras de suprimento sangüíneo para as glândulas submandibulares de coelhos e cães e estudaram a

função da barreira histológica. Assim como Claude Bernard ele encontrou certas barreiras de permeabilidade nas glândulas (Garret, 1998).

As drogas circulantes no plasma passam através da parede capilar, da membrana basal e a da membrana das células epiteliais glandulares. Princípios físico-químicos estabelecem que, para a passagem ocorrer, a droga deve mostrar um grau de lipofilicidade, ou seja, ser miscível em gordura. Isto sugere acertadamente que a saliva não é um simples ultrafiltrado do plasma, como as vezes se tem sugerido, mas ao contrário, um complexo fluido formado por diferentes mecanismos: por processos de difusão passiva, por processos ativos contra um gradiente de concentração, por ultrafiltração pelos poros da membrana ou ainda por pinocitose. Um mecanismo de transporte opera claramente por meio de muitos eletrólitos e por algumas proteínas como a IgA. Um mecanismo de transporte ativo tem também sido sugerido para algumas drogas. No entanto, estes não estão bem esclarecidos e carecem de muitos estudos (Garret, 1998).

2.3 CROMATOGRAFIA GASOSA NA ANÁLISE DE ETANOL

Dentre os métodos de análise para amostras alternativas ao sangue, a cromatografia destaca-se por sua facilidade em permitir a separação, identificação e quantificação das espécies químicas por si mesmas ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise como a espectrofotometria ou espectrometria de massa (Collins, 1997).

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, feito através da distribuição destes componentes em duas fases que estão em contato íntimo. Uma destas fases é chamada fase estacionária e a outra fase móvel. Durante a passagem da fase móvel para a fase estacionária, no interior de uma coluna, os componentes são distribuídos de modo que cada um seja seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em

migrações diferenciadas para cada componente da mistura, em tempos distintos (Skoog, 1992; Robinson, 1994).

Os critérios mais comumente usados para a classificação dos diferentes tipos de cromatografia se relacionam com a técnica empregada, o mecanismo de separação envolvido e os diferentes tipos de fase utilizados (Sawyer, 1984; Zyka, 1991; Schomburg, 1990).

A cromatografia gasosa é uma técnica atualmente bem comum nos laboratórios de análise química e possui um excelente poder de resolução, possibilitando muitas vezes a análise de dezenas de substâncias de uma mesma amostra em um único exame. (Day, 1991; Skoog, 1992; Robinson, 1994; Collins, 1997).

Na cromatografia gasosa a amostra é introduzida no aparelho através de um sistema de injeção e por meio de micro-seringas. A partir deste ponto a amostra é levada para a coluna cromatográfica pela fase móvel que é um gás que se move ao longo de todo o sistema e serve para arrastar a amostra pela coluna, quando a substância não estiver interagindo com a fase estacionária, e conduzi-la até o detector. Estes dispositivos transformam num sinal elétrico adequado a variação da composição do gás de arraste ao sair da coluna cromatográfica, esses sinais podem ser processados em integradores ou microcomputadores acoplados ao detector que, além de apresentarem os cromatogramas, registram os tempos de retenção e as áreas de pico. Os microcomputadores apropriadamente programados podem fornecer outros dados calculados a partir do cromatograma (Christian, 1994; Schomburg, 1990).

Christmore, 1984, afirma que o método de escolha para analisar o álcool na clínica e nos casos forenses seria a Cromatografia Gasosa (GC), sendo que a técnica do *headspace* ou HS, método pelo qual a amostra líquida da matriz escolhida e um padrão interno, adicionado a amostra, que geralmente é um outro álcool, são aquecidos e alguns de seus constituintes são volatilizados, servindo de veículo para a investigação de componentes da amostra (Schomburg, 1990), é uma das mais eficientes.

2.4 RELAÇÃO DO ETANOL NO SANGUE E NA SALIVA

Acoplado ao *headspace* (HS), e também a algumas técnicas instrumentais de análise como por exemplo, a espectrometria de massa, a cromatografia gasosa se tornou um elemento precioso em diversos ramos científicos e em especial nas pesquisas da toxicologia forense.

A cromatografia gasosa (GC) e o *headspace* (HS) foram inicialmente desenvolvidos para o uso em anestesiologia (Purchase, 1963), toxicologia (Dominguez, 1959) e na ciência dos alimentos (Bassette, 1962).

Duritz, 1964, descreveu o uso da injeção do material volátil dentro do GC, para a quantificação simultânea de acetaldeído e etanol em amostras de sangue.

Mather, 1965, detectou e identificou substâncias voláteis, como acetona e álcoois comuns por GC. Com a vantagem da rapidez e simultaneidade da quantificação de substâncias em misturas exigindo volumes pequenos da amostra em relação à pesquisa calorimétrica por oxidação do dicromato.

Larsson, 1965, usou GC para análise de componentes da saliva, verificando que o etanol normalmente ocorre em todos indivíduos em concentrações acima de 1.5mg/L de sangue (0, 0015g/L). Segundo ele a saliva tem sido usada para a pesquisa da determinação do álcool no sangue, no entanto somente a saliva coletada na saída das glândulas na cavidade conferia esta vantagem.

Em 1967, Iribe et al., sugeriram que a mensuração de etanol na saliva permitia acuricidade e a possibilidade de um método não invasivo para a determinação das concentrações de etanol no sangue.

Larsson, 1969, descreveu método para a determinação de substâncias voláteis através de HS e GC em amostras de saliva. O método utilizando detector de ionização de chama e coluna Porapak Q®, foi aplicado em casos clínicos com o objetivo de se verificar as atividades bioquímicas na cavidade oral.

Karnitis, 1971, relacionou a identificação e quantificação do etanol no sangue por GC, e sua utilidade na clínica forense, particularmente em casos de motoristas embriagados. Sugeriu que a pesquisa do etanol poderia ser feita em outros fluídos biológicos em amostras vaporizadas como a técnica do HS.

Jones, 1978, aplicou a técnica do HS utilizando uma pequena amostra de saliva adaptada a um detector eletroquímico. Ele verificou também que o etanol é distribuído entre vários fluidos biológicos e mostrou que a proporção saliva/sangue em relação ao etanol possui uma baixa variação inter e intra-individual confirmada em 20 voluntários homens (média de idade de 42 anos) e de peso entre 65 a 90Kg que estavam jejum de 30 min e algumas de suas relações. As amostras analisadas eram coletadas após a ingestão do equivalente a duas doses de uísque. O volume de saliva usada não foi mensurado, mas estava em torno de 1ml. Jones cita que a precisão da técnica do HS usada em saliva para a quantificação de álcool é claramente estabelecida em laboratório, demonstrando inclusive que amostras de saliva de indivíduos saudáveis que não ingeriram álcool, parecem não detectar presença de álcool e nem de outros constituintes da saliva que influenciem no processo de quantificação do etanol para práticas forenses.

McColl, 1979, avaliou a concentração de etanol em 12 homens (idade entre 20 e 35 anos) pelo sangue e pela saliva misturada (saliva homogênea obtida a partir da produção das glândulas salivares em conjunto) ou não misturada, antes e depois de terem lavado e enxaguado a boca, e após terem ingerido 100ml ou 200ml de vodca em no máximo de 15 minutos. A saliva misturada era obtida diretamente pela deposição do humor salivar dentro de um tubo de teste de plástico e armazenadas a 4°C e as concentrações de etanol foram analisadas por cromatografia gás-líquida (GLC) segundo metodologia preconizada por Cooper, 1971. Ainda de acordo com este autor, de 20 minutos a 4 horas depois da completa ingestão da bebida houve uma correlação alta e significativa, sendo que o pico máximo do etanol no sangue estava entre 30 e 60 minutos após completada ingestão e que o aumento de etanol no sangue foi inversamente

proporcional ao peso corporal. McColl, concluiu que os exames feitos, entre saliva misturada obtida 20 minutos após a completa ingestão, são altamente acurados para a determinação das concentrações de etanol no sangue como método não invasivo.

Jones, 1979, avaliou as variações intra e inter-individuais na proporção saliva/sangue (distribuição de etanol entre saliva misturada e sangue) calculadas em 48 homens após a ingestão de 0,72g de etanol (uísque) por quilograma de peso corpóreo, após pequeno tempo para o consumo e analisadas por meio do método enzimático com a álcool desidrogenase. Não foi encontrada uma variação sistemática ao longo de todo o metabolismo do etanol, na absorção, distribuição e eliminação. Alguns autores confirmam uma alta correlação entre as concentrações saliva/álcool e sangue /álcool (Coldwell & Smith, 1959) e a proporção se mantém constante por toda a biotransformação do etanol usando métodos enzimáticos para a pesquisa do etanol (Jones, 1979). O autor ressalta que apesar de não invasivo o método de colher a amostra depende de uma certa cooperação do paciente.

Tonnellier, 1980, constatou que o fluxo salivar tem realmente uma diminuição em pessoas que fizeram uso de bebidas alcoólicas, dificultando a coleta de amostras, mas não a impossibilitando, a depender da colaboração dos pacientes.

Mendenhall, 1980, descreve um método GC para detecção simultânea de etanol e acetaldeído cujas vantagens são a simplicidade, rapidez e alta acuridade possibilitando resultados simultâneos na pesquisa de álcool etílico e acetaldeído (metabólito do etanol), usando isopropanol como padrão interno e coluna Porapak Q®.

Anthony, 1980, analisou através de GC e HS, substâncias como etanol, metanol e acetaldeído verificando boas correlações na quantificação de etanol nos fluídos biológicos analisados.

Jones, 1983, avaliou por GC e HS, os coeficientes de partição líquido/ar determinados em soluções de etanol em água, sangue e plasma com coluna

Porapak Q® e detector de ionização de chama, sugerindo que o etanol equilibra-se livremente entre as frações de água dos fluidos biológicos e as fases de gás.

Stone, 1984, avaliou a concentração post-mortem de amostras alternativas de bile, urina e humor vítreo e sangue, para etanol. Seu estudo descartou a possibilidade de amostras de saliva em eventos post-mortem.

Peel, 1984, verificou a detecção de drogas em 56 motoristas alterados com amostras de 1 a 2ml de saliva como matriz para análise de drogas ácidas, básicas ou neutras. O método imunoenzimático usado foi (EMIT®), e confirmado por GC detector de ionização de chama e coluna Porapak Q® acoplada a espectrometria de massa (GC/MS). O autor concluiu que é possível obter e analisar amostras de saliva em pessoas suspeitas de estarem dirigindo embriagadas ou sob efeito de outras drogas, demonstrando a versatilidade do uso da saliva como uma técnica não invasiva para determinar a ocorrência do uso de drogas. Complementando seu raciocínio, Peel ressalta que fatores como pH da saliva, fluxo salivar e características orgânicas individuais de cada droga afetam a concentração da droga na saliva, no entanto a razão dos valores saliva/sangue são relativamente constantes entre os indivíduos para uma mesma droga.

Christmore, 1984, apresenta soluções para dois freqüentes problemas na técnica automática do HS e GC em 30 amostras, a oxidação catalítica do etanol em oxiemoglobina e a falta de agentes conservantes adequados, descrevendo três processos pelos quais as amostras de sangue poderiam ter sua quantidade de álcool diminuída. O primeiro seria a contaminação e o crescimento de microorganismos, prevenido com adição de fluoreto de sódio. O segundo seria a perda do álcool por evaporação nos casos em que os frascos não fossem bem tampados. E por fim o álcool poderia ser perdido por oxidação química em um processo que dependeria da presença de hemoglobina (não ocorrendo por exemplo no soro e no plasma, nem na saliva ou urina).

Vogel-Sprott, 1984, demonstrou em seu estudo que os níveis de absorção e eliminação são influenciados pela idade e pelo peso, observando que

quanto mais idoso for o indivíduo maior será o nível etílico, ocorrendo o inverso com relação ao peso dos indivíduos.

McBay, 1988, cita que dentre os possíveis fluídos corporais como urina, sangue, soro e plasma, a saliva também pode ser um veículo para a pesquisa de várias drogas inclusive canabinóides.

Pikaar, 1988 , avaliou os principais fatores que influenciam os níveis de etanol no sangue (o sexo, a concentração da bebida, os exercícios físicos feitos após a ingestão e o consumo de alimentos antes e após a ingestão) relatando os efeitos de cada uma dessas variáveis.

Senkowski, 1990, analisou o etanol em amostras de sangue coagulado através da técnica do HS e GC com detector de ionização de chama e coluna Porapak Q®, obtendo boas correlações em suas amostras.

Urbansky, 1990, relata que a saliva pode ser um adequado material biológico para as pesquisas dos níveis de etanol, em particular nos pacientes que por várias razões, recusam-se a permitir a coleta das amostras de sangue. Comparações feitas em pacientes revelam que os níveis obtidos em alguns eram idênticos, e que as diferenças encontradas entre o sangue e a saliva analisados eram mínimas diferindo apenas entre os componentes do grupo devido a caracteres individuais. Segundo o autor, essas diferenças podem ser negligenciáveis considerando os resultados obtidos em outros fluidos biológicos.

Haeckel, 1992, refere que a razão saliva/plasma para o etanol demonstrou boa correlação entre as amostras de sangue e saliva analisadas a partir de voluntários detidos em “blitz” de trânsito. O autor relata que além dos bons resultados obtidos nas mensurações, o método que utiliza a saliva possui a conveniência de não necessitar de pessoal médico para a coleta e não fere a integridade física dos suspeitos.

Christopher, 1992, analisou por métodos enzimáticos a concentração de etanol no sangue e na saliva de 42 voluntários após a ingestão de bebidas alcoólicas diversas. Os testes enzimáticos foram comparados com os feitos em

GC e demonstraram boas correlações entre os níveis de etanol encontrados no sangue e na saliva.

Kiesow, 1993, pesquisou em 56 amostras a praticabilidade do uso de amostras de saliva para determinar quantitativamente o etanol no sangue através de GC demonstrando uma alta correlação, comprovando que a concentração do etanol tanto no sangue quanto na saliva é máxima após uma hora da ingestão da dose, sugerindo que em algumas situações pode-se eliminar a necessidade de coletas de sangue para esta verificação.

Jones, 1993, determinou o perfil dos tempos de concentração do etanol em amostras de sangue, ar expirado e saliva de 21 voluntários após a ingestão de etanol, demonstrando que existem mínimas variações entre as amostras de um mesmo indivíduo e que por vezes, as variações entre indivíduos diferentes podem ser grandes devido a variáveis orgânicas como idade e peso.

Rainey, 1993, faz uma comparação entre as quantidades de etanol no sangue e no plasma e ressalta que os procedimentos legais indicam que a intoxicação deve ser indicada pela concentração do álcool no sangue total ou por seu representativo em outras amostras.

Markelov, 1993, apresenta a técnica de evaporação total da amostra como alternativa para procedimentos cromatográficos, sendo uma variante da técnica do HS que pode ser usada em amostras alternativas inclusive matrizes orgânicas.

Jones, 1994, discute a aceitação e os benefícios do fluoreto de sódio (NaF) como conservante do sangue para análise do etanol em GC. Solanky, 1994, relaciona as quantidades de NaF usados como conservantes e conclui que o NaF não aumenta a concentração de etanol quando determinado por HS e GC.

Mirand, 1994, demonstrou em seu estudo, que o tecido adiposo é um dos fatores determinantes para a distribuição do etanol no organismo, e que se relaciona com o volume de água corporal. Relata que os indivíduos jovens apresentam menores níveis de etanol quando comparados aos mais idosos quando da ingestão de doses iguais.

Macchia, 1995, determinou o etanol em diferentes fluidos biológicos por HS e GC, ressaltando a importância de fluidos biológicos disponíveis como o sangue, soro, plasma, urina e saliva e que a escolha pode ser feita de acordo com a disponibilidade e a praticabilidade da coleta, uma vez que os resultados obtidos nas análises das amostras foram fielmente próximos àqueles representativos da concentração do sangue, sendo a saliva um bom representante deste quantitativo.

Conigrave, 1995, analisa os marcadores do consumo de etanol entre os alcoolistas crônicos utilizando-se o sangue como matriz usada nos testes, e constata que recentemente os laboratórios têm usado amostras alternativas ao sangue como meio de investigação mensurados por GC ou por cromatografia líquida (LC).

Livesey, 1995, desenvolveu uma técnica rápida, com sensibilidade para quantificar simultaneamente etanol, metanol, isopropanol, acetona e etileno glicol pelo soro, através de GC.

Bosan, 1995, analisou amostras de saliva pelo método enzimático para determinação das concentrações de etanol com verificação pelo soro por GC. O autor relata que algumas vezes um aumento da viscosidade da saliva causada pela desidratação aguda provocada pela bebida alcoólica e a pouca cooperação dos examinados pode agravar a performance dos testes com saliva mas não os invalidam.

Chasin, 1996, relatou as diferentes formas de integração do etanol com a cocaína incluindo a formação de derivados que pudessem afetar as concentrações daquela droga no organismo. Esta técnica foi padronizada no Serviço de Toxicologia Forense do IML - São Paulo, como HS e GC em amostras de sangue.

O'Neal, 1996, utilizou GC para a determinação de etanol em amostras de sangue post-mortem, com padrões internos alternativos ao n-propanol conforme sugere Wigmore, 1993.

Schuberth, 1996, propôs uma modificação na técnica de evaporação total da amostra para se obter o HS, analisando por GC para diversos compostos

inclusive etanol. As suas amostras eram de sangue e tecidos coletados em cadáveres.

Bates, 1997, ressalta a importância forense da utilização de métodos confiáveis para a determinação dos níveis de etanol no sangue e que sejam não invasivos. Seu estudo em 39 voluntários, com a utilização de métodos enzimáticos, demonstrou a boa confiabilidade que possui a saliva quando comparados com os resultados obtidos no sangue.

Bendtsen, 1999, testou amostras de saliva por meios enzimáticos comparando-as com outros fluidos biológicos (por HS e GC) na pesquisa dos níveis de concentração de etanol encontrados no sangue. A pesquisa, realizada em 28 voluntários, considerou a saliva como amostra satisfatória para o teste enzimático, relatando problemas com as quantidades disponíveis, o que em alguns casos inviabilizou o exame por esta via de análise.

Suzuki, 1999, determinou o etanol no sangue em 15 voluntários através de um método ultra-sensitivo de GC e HS, para avaliar a concentração de etanol endógeno em pessoas normais e que estavam em abstenção do uso de bebidas alcólicas. Ressaltou que o método não é conveniente para as análises de rotina, sendo mais útil em casos forenses quando os peritos dispõem de volumes muito pequenos de amostras, como por exemplo, a pesquisa de saliva em um pedaço de cigarro.

Pellegrino, 1999, aplicou a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) em 56 amostras com a finalidade de determinar o etanol em fluidos corporais, relatando que seria necessária uma derivação para obter a fase reversa para que se executassem as análises em HPLC. As amostras foram comparadas com as análises em GC para confirmação, e o autor obteve altas correlações entre as matrizes orgânicas comparadas e entre os métodos utilizados (HPLC e GC).

Laposata, 1999, apresenta marcadores do consumo de etanol e analisa os métodos e as matrizes usadas, considerando que os fluidos para a mensuração do etanol incluem sangue, saliva, urina e o humor vítreo e que o GC é o método padrão para a quantificação de etanol em fluidos corporais especialmente no

sangue. A quantificação de etanol pela saliva oferece as vantagens de maior facilidade de coleta que o sangue e oferece uma imediata quantificação.

Lucey, 1999, relata que há diferença na distribuição e metabolismo do álcool com relação a idade, baseado na comparação do grupo estudado (idade 21-40 anos) com outro grupo de idade acima de 60 anos. O autor observou que as concentrações de etanol são significativamente mais altas em idosos que nos jovens. Relata também que há diferenças entre o metabolismo do etanol em homens e mulheres, o que também foi constatado por Gartner et al. 1996.

Smolle, 1999, comparou as concentrações de etanol no sangue e na saliva e relatou os benefícios da saliva como amostra não invasiva, demonstrando que esta matriz traz resultados com valores correlatos para as análises da concentração dos níveis etanol no sangue. Seus testes utilizaram métodos enzimáticos.

Williams, 2000, desenvolveu um método rápido, preciso e de confiança para a determinação de etileno glicol, metanol, etanol, acetona e isopropanol por GC e injeção direta da amostra, mostrando uma boa detecção e quantificação dos materiais analisados.

Oneta, 2001, afirma que existem diferenças consideráveis no metabolismo do etanol entre grupos de pessoas com faixas etárias mais altas e mais baixas em suas análises por GC.

Yacoubian, 2001, cita que a mensuração de drogas em amostras de fluidos como saliva e urina tem sido usada com vantagens para estimar o uso de drogas ilícitas. O uso de testes pela saliva vem ganhando espaço como uma alternativa às amostras de urina, no entanto, a eficácia do uso de amostras de saliva para a detecção e quantificação de drogas requer ainda muitas pesquisas.

Engelhart, 2001, avaliou o dispositivo QED² na mensuração, *post-mortem*, de etanol em 50 amostras de saliva e humor vítreo comparando com amostras de sangue em análise por GC e HS. Os resultados mostraram uma pobre relação entre o fluido oral (mensurado por QED) e os resultados obtidos

pela análise do sangue por HS e GC concluindo então que o QED para testes de álcool na saliva não parece muito útil para determinar níveis de etanol no sangue *post-mortem*.

Kuo, 2002, verificou a detecção e quantificação de metabólitos do tabaco na saliva e na urina comparando suas concentrações através de GC, cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e um teste imuno-enzimático (ELISA). Sua experiência serviu para comprovar a versatilidade da saliva como matriz alternativa para pesquisa de drogas ou seus metabólitos.

Gubala, 2002, comparou amostras de saliva, ar expirado e sangue em 49 voluntários, aplicando HS e GC para a pesquisa de etanol e verificou boa precisão, concluindo que o método e a técnica aplicados para saliva é específico, e mostra boa resolução na apresentação dos resultados.

Parlesak, 2002, confirma que a idade é fator de influência direta na distribuição das concentrações de etanol, em especial quando comparadas diferentes faixas etárias, relatando também sobre a influência do fator peso nas concentrações de etanol no sangue.

Gubala, 2003, analisou por GC e HS o nível de etanol na saliva e no sangue de voluntários (homens e mulheres), após a ingestão de bebida alcoólica. Encontrou alta correlação (0,944), entre as matrizes utilizadas, relacionado os efeitos para ambos sexos e suas respectivas concentrações encontradas. Concluiu que a saliva pode ser utilizada como alternativa ao sangue para estimar o etanol, com alta confiabilidade.

Assim, tendo em vista a grande relevância da matéria relatada nos trabalhos acima em relação aos aspectos forenses na busca de novas matrizes alternativas ao sangue para a pesquisa de drogas em geral, optamos pelo desenvolvimento do tema por entendermos ser de suma importância para a toxicologia forense, medicina e odontologia legal.

² QED – Quantitative Ethanol Detector. Dispositivo enzimático para quantificação de etanol.

3 PROPOSIÇÃO

O número relativamente limitado de trabalhos publicados, bem como as observações feitas ao tema, levaram aos objetivos desta pesquisa, no intuito de verificar a possibilidade do uso da saliva como amostra alternativa ao sangue para dosagem da concentração dos níveis de etanol no sangue, visando contribuir com a sociedade dando subsídios à Justiça de forma segura e precisa, para que ela julgue os diversos tipos de delitos envolvendo o consumo de álcool, com garantias de que os procedimentos analíticos toxicológicos são seguros.

Para tanto, o objetivo deste trabalho foi verificar se os níveis de etanol na saliva relacionam-se com os níveis de etanol encontrados no sangue de voluntários, que fizeram prévia ingestão de bebida alcoólica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Foram utilizados os seguintes materiais:

- Bebida alcoólica fermentada e destilada de gradação alcoólica a 39% vol., composta de álcool etílico, malte uísque, destilado alcoólico de cereais e corante;

- pedras de gelo de água;

- frascos de polietileno com capacidade de 40ml, para depósito da saliva;

- seringas plásticas com capacidade de 10 ml e agulhas descartáveis para a coleta de sangue;

- frascos de vidro com septos de borracha e lacres de alumínio, com capacidade de 10ml para armazenar sangue;

- fluoreto de sódio 0, 25g em pó;

- alicate lacrador;

- refrigerador Electrolux ® R360, com temperatura entre 0°C e 4°C;

- caixas térmicas de isopor com tampa e vedamento, com capacidade para 7 L;

- gelo sintético em gel (gelo reciclável);

- micro-pipeta automática de 500µL;

- balança analítica;

- reagentes padrões de isopropanol P.A. e etanol P.A.

- sistema de aquecimento para formação de *headspace* com banho de glicerina;

- seringas hipodérmicas de 1 mL;

- cromatógrafo a gás Modelo CG-90 equipado com detetor de ionização de chama (FID) (CG Instrumentos Científicos LTDA);

- coluna empacotada medindo 1, 86m X 1/8" (id) e fase estacionária Porapak Q;
- integrador/Processador eletrônico Modelo CG-300.
- cilindro de Nitrogênio de alta pureza (White Martins);
- cilindro de Hidrogênio de alta pureza (White Martins);
- cilindro de ar sintético de alta pureza (White Martins);

4.2 MÉTODOS

4.2.1 METODOLOGIA

Para a quantificação de etanol em amostras de saliva e de sangue, foi necessária a participação de 30 voluntários que após a leitura e assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO I), preenchimento de um questionário sobre o estado geral de saúde (ANEXO II), e informados sobre as condições de pré-ingestão da bebida alcoólica, tempo de espera e período de coleta das amostras.

Os voluntários foram reunidos e esclarecidos quanto aos objetivos, métodos e inconvenientes da pesquisa, para que pudessem optar ou não por continuar colaborando. Os voluntários que concordaram foram orientados com relação aos procedimentos de pré-ingestão da bebida, procedimentos estes que deveriam ser obedecidos no dia da coleta das amostras.

Os possíveis voluntários menores de 18 anos foram automaticamente excluídos da pesquisa, em respeito ao Decreto Lei nº 3688, de 03.10.1941- Lei das Contravenções Penais, artigo 63 inciso I, que proíbe servir bebidas alcoólicas a menores.

O questionário individual sobre o estado geral de saúde continha quesitos básicos acerca da saúde de cada voluntário, e se constituía de um cabeçalho contendo informações a respeito do indivíduo como nome, idade, peso

e altura e de perguntas que podiam ser avaliados sob dois aspectos, sob o ponto de vista clínico e sob o ponto de vista farmacológico.

A respeito das circunstâncias clínicas, os voluntários deveriam informar sobre tratamentos médicos recentes e patologias cardíacas, vasculares, renais, digestivas, hepáticas, sangüíneas, DST, neurológicas, psiquiátricas descrevendo-as quando existentes.

Pessoas com história de alcoolismo crônico atual não foram aceitas por poderem apresentar comprometimento dos processos metabólicos, em virtude de doenças como cirrose hepática (Rouquayrol, 1993; Griffith, 1998) e também os alcoolistas crônicos em recesso, a fim de evitar o desencadeamento de novas crises e do retorno ao seu estado anterior (Stanley, 1991; Marlatt, 1993).

Sobre o aspecto farmacológico as questões estavam voltadas para o uso de medicamentos e sua freqüência, além do uso de drogas ilícitas, bebidas alcoólicas e tabagismo, bem como sua freqüência.

O questionário visou também avaliar os possíveis estágios de tratamento medicamentoso ou uso de fármacos a que pudesse estar submetido algum voluntário, de modo a preservar a integridade do participante e não alterar os resultados, uma vez que diversos fármacos poderiam interagir com o etanol ou com subprodutos de seu metabolismo influenciando as concentrações de etanol no sangue e na saliva (Roine, 1990; Dziekan, 1997; Kechagias, 1997).

Substâncias como nicotina foram toleradas desde que não houvesse seu uso pelo período mínimo de duas horas antes da ingestão da bebida, e principalmente durante o tempo de espera para a coleta do material, a fim de evitar a minimização do fluxo salivar que ocorre por ação do uso do tabaco e de seus subprodutos e ainda possíveis alterações do pH da saliva (Maier, 1988; Trudgill, 1998; Tomar, 1997; Chen, 2001).

Foram rejeitados indivíduos que fizessem uso freqüente de drogas ilícitas tais como a cocaína (Chasin, 1996) devido às interações que poderiam surgir quando do uso concomitante ao etanol afetando sua concentração no sangue e na saliva.

Pessoas que faziam uso diário de bebidas alcoólicas não foram admitidas para que não houvesse um possível efeito cumulativo de etanol no organismo (Almeida Júnior, 1979; Brito Filho, 1988;) levando a um possível resultado falso positivo devido à acumulação.

O questionário foi preenchido individualmente com o responsável pela pesquisa, sendo explicado cada tópico a ser respondido, esclarecendo-se as dúvidas surgidas e exemplificando quando necessário. Os casos isolados eram atendidos quando solicitado, preservando o sigilo das informações que assim deveriam permanecer.

Uma vez preenchido, o questionário foi analisado, sendo excluídos os indivíduos que apresentavam qualquer alteração que pudesse comprometer seu estado de saúde, interagir com fármacos ativos no organismo, ou ainda modificar os padrões de análise por interagir com etanol ou algum de seus subprodutos metabólicos.

De posse dos questionários devidamente respondidos, os dados relativos a altura e peso de cada participante foram avaliados para que houvesse o cálculo do índice de massa corporal (I.M.C.) e assim estabelecer se o indivíduo poderia ou não ser voluntário de acordo com o índice de normalidade estabelecido pelo I.M.C. (entre os valores de 18, 5 a 24, 9). (ANEXO III).

Os voluntários considerados acima do índice normal estabelecidos foram descartados, uma vez que o nível de concentração de etanol no sangue é claramente influenciado pelo peso em especial quando associado ao tecido adiposo. Esta relação (peso e concentração de etanol no sangue) é relatada por autores como Vogel-Sprott, 1984; Mirand, 1994 e Oneta, 2001.

Como forma de manter um grupo homogêneo, também não foram admitidos participantes do sexo feminino, uma vez que publicações científicas relatam que existem diferenças no metabolismo entre homens e mulheres de mesma faixa etária para uma mesma quantidade de dose alcóolica ingerida, sugerindo que possam, desta forma, haver diferentes níveis de concentrações de

etanol no sangue e também para as taxas de concentração de etanol na saliva (Pikaar, 1988; Lucey, 1999; Gubala, 2003).

Com relação aos voluntários considerados aptos após a análise dos questionários de saúde, foi confirmado se as três condições pré-estabelecidas anteriores ao exame foram cumpridas. As condições chamadas de “condições de pré-ingestão da bebida alcoólica” foram: jejum alimentar por período de três horas; não uso de bebidas alcoólicas por pelo menos 48 horas antecedentes ao exame e não uso outras drogas ou fármacos, condições semelhantes às preconizadas por Suzuki, 1999 e Cobaugh, 1999.

O jejum alimentar de três horas garantiria um esvaziamento gástrico satisfatório e mais igualitário entre os componentes da amostra. O esvaziamento gástrico seria uma forma de certificar que o processo de absorção e conseqüente distribuição do etanol pelo organismo seria mais uniforme entre os voluntários.

O uso de novas doses de bebidas alcoólicas no período inferior ao de 24 horas é fator que influencia diretamente no metabolismo do etanol, uma vez que ocorre em torno de 400 a 500ml de oxidação por dia (Brito Filho, 1988). Com isso, o tempo de 48 horas de abstinência alcoólica garantiria um efeito não cumulativo no organismo evitando influências indesejáveis no resultado. Assim como a bebida alcoólica, outras drogas também poderiam interagir com o etanol provocando alterações no metabolismo do etanol levando a uma não uniformidade nas amostras de sangue e saliva dos voluntários.

Os indivíduos que faziam, naquele período, uso de drogas ilícitas e que informaram devidamente nos questionários, foram advertidos quanto ao tempo de abstinência ao qual deveriam estar submetidos para adequarem-se à condição de voluntário. Uma vez que houvesse consonância por parte do voluntário em não fazer uso de tais produtos, e desde que não houvesse outro excludente eram então aceitos.

Os critérios acima estabelecidos visaram a padronização das condições individuais de tal forma que cada voluntário tivesse as mesmas condições pré-ingestão, deixando apenas que as características relativas à fisiologia do

organismo de cada um respondesse sem interferências exógenas. Isto objetivou igualar ao máximo as condições orgânicas individuais e também garantir o bem estar e saúde de cada participante e o bom desempenho da pesquisa.

Após a análise do questionário sobre saúde, os voluntários selecionados receberam o termo de consentimento livre e esclarecido, contendo a identificação do voluntário, dados a respeito da pesquisa, do pesquisador e a identificação do curso e da instituição. Este termo foi preenchido após esclarecimento sobre os objetivos do trabalho e seus inconvenientes, bem como os direitos dos participantes, inclusive o de abandonar a experiência a qualquer tempo, em respeito à Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

De forma livre, espontânea e declarando-se devidamente esclarecido, o voluntário se comprometeu a participar de acordo com os padrões estabelecidos e a não dirigir veículo automotor nas seis horas subseqüentes à ingestão da bebida alcoólica, cedida para efeitos do exame, em respeito às normas vigentes do Código Nacional de Trânsito.

Uma vez preenchido o questionário e o termo de compromisso os voluntários foram informados sobre os tempos estipulados para a ingestão da bebida, tempo de espera até o momento da coleta dos materiais e sua forma de coleta.

A ingestão correspondeu a 80 ml da bebida e então foram coletadas as amostras. A bebida foi padronizada e dosada em um frasco graduado para o valor de 80 ml o que corresponderia à média em torno de 0,90ml a 1,48ml de bebida alcoólica por quilograma de peso. Os voluntários tiveram de 0 a 15 minutos para a completa ingestão da bebida, (McColl, 1979).

Os tempos de cada voluntário foram marcados e anotados seguindo a ordem de término. Após a ingestão, cada voluntário foi instruído a ficar em repouso relativo, a fim de evitar perdas do etanol por processos metabólicos não normais (Pikaar, 1988; Stanley, 1991; Fortes, 1991), sem ingerir qualquer tipo de

líquidos, inclusive novas doses da bebida, sem fazer uso de drogas, tabaco e sem fazer ingestão de alimentos durante o período de espera de 60 minutos.

O período de espera de 60 minutos corresponde ao pico máximo de etanol no sangue e na saliva (Kidwell, 1999, Kiesow, 1993). Seguindo a ordem cronológica do término da ingestão, o sangue de cada voluntário foi coletado por meio de seringas plásticas descartáveis de capacidade para 10 ml, retirando uma quantidade de 5ml como amostra para análise.

O sangue da seringa era imediatamente depositado no frasco de vidro individual, que continha fluoreto de sódio em pó na quantidade de 0,25g para 5ml de sangue. O frasco então era tampado com o septo de borracha e agitado de modo a homogeneizar o fluoreto de sódio ao sangue e em seguida eram vedados com lacres de alumínio e rotulados para identificação durante a análise.

O fluoreto de sódio foi usado como sal conservante para o sangue a fim de evitar a coagulação e sua deterioração, tendo ação estável durante as análises cromatográficas (Christmore, 1984; Jones, 1984, Stone, 1984, Senkowski, 1990, Jones, 1994). Segundo o protocolado pelo Laboratório Central da Polícia Técnica do Estado da Bahia (LCPT-Ba), este sal também é usado para análises de sangue em pesquisas de etanol por cromatografia gasosa.

A saliva foi coletada pelo próprio voluntário, que a depositou diretamente no interior de um frasco de polietileno, (capacidade de 40ml) com tampas de vedamento rosqueável. A saliva coletada foi a considerada saliva misturada onde não houve qualquer preparação preliminar da cavidade oral sendo um produto resultante da produção das glândulas salivares em conjunto (McColl, 1979). A quantidade de saliva foi estimada entre 1 a 4ml, e o tempo para que a operação fosse completada era o menor tempo hábil possível, conforme sugere Peel, 1984.

Para as amostras de saliva não foi necessário qualquer adição de conservantes, apenas o congelamento das amostras. Esta quantidade de saliva foi suficiente para pesquisa cromatográfica, uma vez que a quantidade real utilizada foi de 500 μ L em função da metodologia analítica preconizada.

O restante da amostra de sangue e de saliva foi descartado após as análises, mas poderiam ser armazenados como contra prova para futuros exames, ou mesmo para outras análises quando necessário, desde que acondicionados de forma correta. Senkowski, 1990, relata que amostras de saliva podem ser armazenadas a 4°C por período de três semanas e segundo Macchia, 1995, por período de até dois anos quando conservados a temperatura de -20°C.

Após a coleta das amostras os frascos foram rotulados com nome do voluntário e data do exame. Os frascos de sangue e de saliva foram acondicionados em uma caixa de isopor com gelo sintético devidamente tampada e que foi transportada do local da coleta até o refrigerador para então serem enviadas ao laboratório para as análises. O refrigerador manteve temperatura aproximadamente entre 0°C e 4°C.

O traslado aéreo das amostras do local da coleta, em Vitória-E.S., até o laboratório onde se procedeu a análise do material, em Salvador-BA, foi feito em caixas de isopor tampadas e lacradas, com as amostras compartimentadas. Gelo sintético estabilizou a temperatura no interior da caixa de isopor, que nas condições de pesquisa normais levou em média 6 horas para chegar ao laboratório.

As amostras foram enviadas ao LCPT-Ba para serem analisadas no setor de cromatografia. Após o recebimento do material, os frascos foram desembalados e colocados em refrigerador à temperatura em torno de 0°C a 4°C (McColl, 1979; Stone, 1984) até o momento das análises.

No momento da análise os frascos eram descongelados à temperatura ambiente ao abrigo da luz e do calor, conforme os preceitos seguidos como norma do laboratório.

Para as amostras de saliva a técnica seguida foi a estabelecida por Macchia, 1995, observando algumas variações de modo a se enquadrarem na aparelhagem cromatográfica e condições laboratoriais disponíveis. As variações tomadas a efeito, que não se enquadravam na metodologia descrita por Macchia,

1995, foram devidamente amparadas na literatura científica, como descrito a seguir.

De acordo com os objetivos preconizados pelo trabalho a quantificação de etanol na saliva deveria ser executada por um método apropriado para as amostras, que pudesse assegurar a precisão das mensurações, que fosse prático, rápido e de fácil execução. Para satisfazer a essas condições o método de escolha que melhor preencheu esses requisitos foi o cromatográfico.

Conforme assinalou Pellegrino em 1999, dentre os métodos cromatográficos disponíveis na atualidade, o da cromatografia gasosa (GC) é mais amplamente descrito na literatura para a investigação da dosagem de álcool no sangue e em outros fluidos biológicos disponíveis ou mesmo matrizes alternativas que possam substituir o sangue em casos necessários nas práticas médico-legais ou clínicas.

A técnica de escolha para o tratamento da amostra foi a técnica do *headspace* (HS) que consiste em aquecimento e evaporação da amostra analisada contida no interior do frasco de vidro no qual está condicionada a amostra. Com o aquecimento há a formação de vapores que são colhidos com uma seringa própria que introduzirá o representativo da amostra no interior da coluna cromatográfica (Bertholf, 2000).

Esta técnica permite uma série de vantagens sobre a injeção direta do material, no que se refere ao método de injeção do *headspace* (HS) são de que se prolonga a vida útil das colunas e elimina a formação de resíduos em seu interior que podem contaminar as amostras seguintes a serem analisadas. Por serem mais limpas, as injeções de vapores se mostram mais seguras e menos deteriorantes para a coluna cromatográfica. Além de representar rapidez e pouca complexidade a técnica mostra alta precisão (Karnitis, 1971; Schomburg, 1990).

Os volumes de amostras experimentados por Macchia, 1995, estavam entre 0.1ml e 10.0ml de amostra, sendo que o volume de 1, 0ml de amostra foi considerado com resultados bem satisfatórios. Pela metodologia preconizada, a quantidade de vapor produzida pelo HS que era injetada na coluna foi de 1, 0ml.

Esta quantidade foi considerada suficiente para que houvesse uma perfeita análise da amostra para o etanol e o padrão interno usado segundo especificações do fabricante da coluna cromatográfica (SUPELCO®).

Em virtude destas vantagens e oportunamente como se procede nos exames de rotina para a quantificação de etanol no sangue pelo laboratório onde foram analisadas as amostras (LCPT-Ba), a técnica de escolha foi a do HS assim como descrito para os procedimentos feitos na quantificação de etanol na saliva por GC e HS. (Gubala, 2002; Suzuki, 1999; Livesey, 1995 e Christmore, 1984).

Para que a quantificação satisfizesse o alvo objetivado pela pesquisa foi necessária a escolha de uma coluna cromatográfica que apresentasse especificidade para as substâncias pesquisadas. Esta escolha da coluna na qual seriam injetadas as amostras de saliva, foi feita baseando-se na sua fase estacionária e seguindo os propósitos para o qual se destinava o trabalho. Como os materiais a serem analisados eram compostos orgânicos volatilizados (álcool etílico e iso-propílico) a coluna Porapak Q® (com fase estacionária co-polímero estireno-divinilbenzeno) se mostrava suficiente para a pesquisa, podendo ser também utilizada para as análises simultânea destes álcoois (etanol e isopropanol) e outros compostos orgânicos como o acetaldeído, nas amostras de sangue e de saliva.

A literatura descreve a utilização desta mesma coluna em alguns experimentos para a quantificação de etanol em amostras de sangue e saliva como nos trabalhos de Larsson em 1969, Mendenhall, 1980, Jones, 1983, Senkowski, 1990, dentre outros. No entanto variados tipos de colunas cromatográficas com fases estacionárias diferentes podem ser utilizadas com possível obtenção de resultados semelhantes ou mesmo superiores ao encontrados quando utilizados a Porapak Q.

Seto, 1994, ressalta que um dos mais importantes componentes do GC para que haja uma perfeita execução do método proposto se refere a escolha do detector para a verificação da composição do gás de arraste ao sair da coluna cromatográfica. Também de acordo com essa idéia Collins, 1997 e Skoog, 1992

ressaltam que o detector mais apropriado para fornecer a resposta adequada aos componentes da mistura de álcoois que foram analisados seria o detector de ionização de chama (FID).

Uma das propriedades mais importantes desse detector, que se baseia na combustão dos compostos em uma chama, é a de ser altamente sensível a compostos orgânicos (exceto ácido fórmico e formaldeído) e incapaz de detectar compostos inorgânicos tais como a água, sendo um dos sistemas de detecção de compostos orgânicos mais empregados em GC conforme afirma Skoog, 1992, Robinson, 1995 e Christian, 1994.

O reagente utilizado como padrão interno é um composto que é adicionado à amostra que contém os componentes que se quer determinar a concentração, não devendo ser encontrado na amostra, proporcionar pico bem resolvido dos outros picos e ser adicionado em concentrações similares aos compostos analisados. Para o estudo da concentração de etanol no sangue e na saliva alguns tipos específicos de padrões internos podem ser utilizados como citados na revisão da literatura.

O padrão interno utilizado neste trabalho foi o isopropanol (álcool isopropílico), que além de estar com freqüência, descrito na literatura por autores como Mendenhall, 1980, Macchia, 1995, como padrão interno usado em diversas pesquisas para a dosagem das concentrações de etanol no sangue foi usado também em amostras de fluidos alternativos como urina e saliva, se mostrando de acordo com as características exigidas para que uma substância seja adequada como padrão interno.

Assim como a escolha da coluna, do detector e dos reagentes, outros acessórios que se compõem o aparato cromatográfico foram selecionados de acordo com a literatura científica publicada e dentro dos padrões protocolados no Laboratório de Polícia Técnica do Estado da Bahia (LCPT-Ba), de forma que se pudesse enquadrar a metodologia aplicada nas amostras de sangue e nas amostras de saliva.

4.2.2 FASE LABORATORIAL

4.2.2.1 Tratamento das Amostras

Um frasco de vidro de capacidade para 10ml previamente lavado e seco era pesado (P_1), e adicionava-se 500 μ L da amostra a ser analisada pesando novamente obtendo o peso da amostra mais o frasco (P_2). Era adicionado 500 μ L da solução de padrão interno (isopropanol) e pesado, obtendo o valor do peso do padrão mais amostra mais o frasco (P_3).

Os cálculos referentes à análise do sangue se processavam da seguinte forma:

$$\text{Massa de sangue (g)} = P_2 - P_1 \Rightarrow M_{\text{amostra}}$$

$$\text{Massa de Padrão Interno (g)} = \frac{(P_3 - P_2) \times 0,1560 \times d}{10}$$

Foi feita a correção com a densidade (d) para que o resultado obtido através do integrador fosse expresso em grama por litro (g/L), já que o equipamento utilizado (CG300) trabalha com %_p. Caso a densidade encontrada para o sangue fosse superior a 1,08g/cm³ (que equivale a massa de amostra igual a 0,54g) devia considerá-la igual a 1 (um), portanto o cálculo passava a ser feito da seguinte forma:

$$\text{Massa de Padrão Interno (g)} = \frac{(P_3 - P_2) \times 0,1560}{10}$$

10

Para as amostras de saliva o procedimento era o mesmo e a densidade da saliva considerada estava entre 1.002 e 1.008g/cm³ (Harper, 1982) procedendo-se os mesmos cálculos com os pesos (P_1 , P_2 , P_3) e a correção feita

com a densidade encontrada. As medidas encontradas eram anotadas com os valores referentes a análise da amostra conforme o mostrado no ANEXO IV.

Era aplicada à amostra a técnica de *headspace* (HS), aquecendo a 82°C (± 2 °C), durante 8 minutos e então aspirado 1mL da fase vapor formada com seringa hipodérmica e injetado no cromatógrafo.

4.2.2.2 Reagentes e Soluções de Trabalho

Foram utilizadas os reagentes: Etanol P.A.*, Isopropanol P.A., e as soluções: solução estoque de etanol 15, 52g/L; solução padrão de Etanol a 0, 1552%; solução padrão de Isopropanol 0, 1560%.

(*P.A.- para análise).

4.2.2.3 Análise e Condições Cromatográficas

Para a pesquisa foi empregado um cromatógrafo a gás Modelo CG-90 equipado com detetor de ionização de chama (FID) (CG Instrumentos Científicos LTDA) e coluna empacotada de fase estacionária co-polímero estireno-divinilbenzeno medindo 1, 86m X 1/8" (id) (Porapak Q® - SUPELCO) e um integrador/processador eletrônico Modelo CG-300.

As condições estabelecidas para a análise das amostras (segundo o Protocolo para a determinação de alcoolemia por GC do LCPT-Ba) foram as seguintes:

Cromatógrafo:

Temperatura da coluna: 195°C (isotérmica)

Temperatura do injetor: 200°C

Temperatura do detetor: 200°C

Gás de Arraste:

Gás de arraste: Nitrogênio
Vazão do gás de arraste: 40mL/min
Integrador:
Atenuação: 2
Width (seg): 5
Slope ($\mu\text{V}/\text{min}$): 250
Área mínima (μV): 200
Stop time (min): 8
Speed (mm/min): 3
Drift ($\mu\text{V}/\text{min}$): 0

4.2.2.4 Validação do Método Proposto

A calibração do aparelho é feita de acordo com os padrões estabelecidos pelo Laboratório onde se procederam as análises. As soluções de calibração (amostra sintética) eram preparadas da seguinte forma:

Pesou-se um frasco de “penicilina” previamente lavado e seco (P_1) e adicionou-se 500 μL da solução de etanol 0, 1552g/L; pesou-se novamente obtendo o peso do frasco + solução de etanol (P_2); adicionou-se 500 μL da solução de padrão interno (isopropanol); pesou-se novamente, obtendo-se o peso do frasco + solução de etanol + solução de isopropanol (P_3) e então lacrou-se o frasco. Aplicou-se a técnica de *headspace* (HS) à solução de calibração preparada, aquecendo a $82^\circ\text{C} \pm 2$, durante 8 minutos e injetou-se 1mL da fase vapor. A concentração de Etanol obtida deveria ser a mesma da solução padrão (0, 1552g/L). Para a identificação dos analitos nas condições acima estabelecidas foram considerados os tempos de eluição do Etanol e do Isopropanol que foram respectivamente de $\cong 2.12$ e $\cong 3.29$ min.

4.2.2.5 Linearidade

A linearidade é definida como a capacidade do método de gerar resultados proporcionais da espécie em estudo, foi avaliada através do coeficiente de determinação da curva obtida (Anexo V). O procedimento foi executado conforme protocolo de procedimentos internos para GC e HS do LCPT-Ba.

4.2.2.6 Limite de Detecção (LD).

O método utilizado, aplica-se à determinação do teor de álcool etílico em sangue humano na faixa de concentração de 0,01 a 6,00 g/L., em função da linearidade do detector. O limite de detecção é estabelecido como sendo a menor concentração, calculada através da curva de calibração, capaz de ser detectada pelo GC em função de seu detector (Anexo VI).

4.2.2.7 Protocolos de Bio-segurança

Os protocolos de segurança no preparo das amostras, a técnica de uso dos materiais e da bio-segurança para as análises das amostras de saliva, foram seguidos da mesma forma que procedem rotineiramente para as amostras de sangue que são analisadas no LCPT-Ba, com a finalidade de quantificar os níveis de álcool etílico no sangue.

5 RESULTADOS

O quadro ANEXO VII mostra os valores correspondentes aos níveis de etanol encontrados no sangue e na saliva dos voluntários pelo exame de cromatografia gasosa e a respectiva idade, peso e estatura de cada um dos participantes.

As Tabelas 1 e 2 e as Figuras 1, 2, 3 e 4 a seguir, apresentam estatísticas descritivas (mínimo, máximo, média e desvio padrão) da quantificação de etanol em amostras de sangue e saliva após a ingestão de 80ml de bebida alcoólica e do peso, altura e idade dos 27 voluntários. Destaca-se, na Figura 1, a presença de pontos discrepantes referentes à variável saliva após a ingestão de 80ml de bebida alcoólica.

Tabela 1 - Estatística descritiva segundo altura, peso e idade em adultos, Vitória, ES, 2003.

Variáveis	Quantidade de etanol				
	n	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
Altura (m)	30	1,64	1,95	1,758	0,073
Peso (Kg)	30	54	98	70,13	9,801
Idade (anos)	30	18	36	24,7	6,176

Tabela 2- Estatísticas descritivas da quantificação de etanol em amostras de sangue e saliva em adultos, Vitória, ES, 2003.

Amostra	Quantidade de etanol				
	n	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
Sangue após a 80ml de bebida	27	0,06	0,51	0,2641	0,12004
Saliva após a 80ml de bebida	27	0,04	0,54	0,2322	0,11154

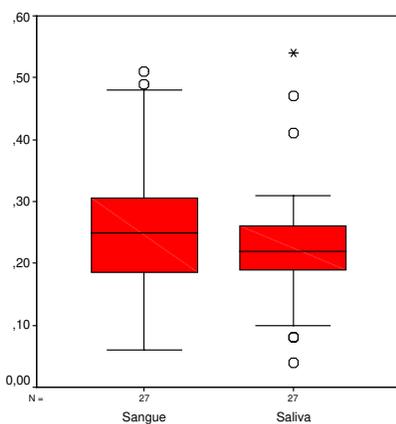


Figura 2 - Box Plot do sangue e saliva após a ingestão de 80ml de bebida alcoólica. Vitória, ES, 2003.

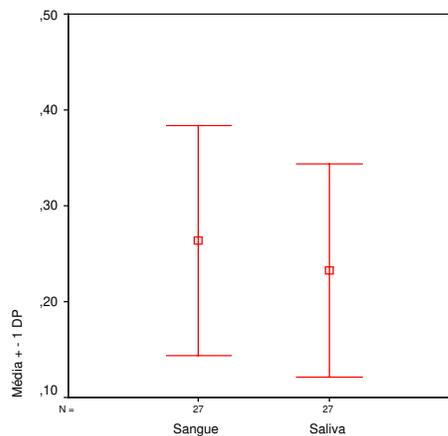


Figura 3 - Média e Desvio Padrão do sangue e saliva após a ingestão de 80ml de bebida alcoólica. Vitória, ES, 2003

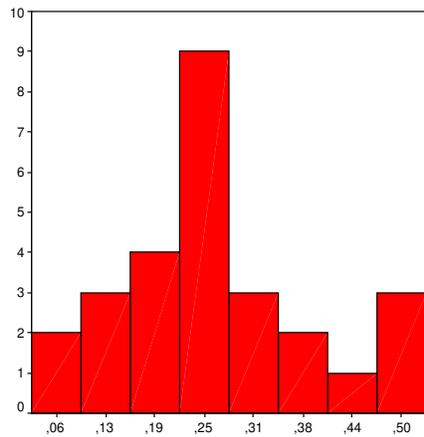


Figura 4 - Quantidade de álcool do sangue. Após a ingestão de 80ml de bebida alcoólica. Vitória, ES, 2003.

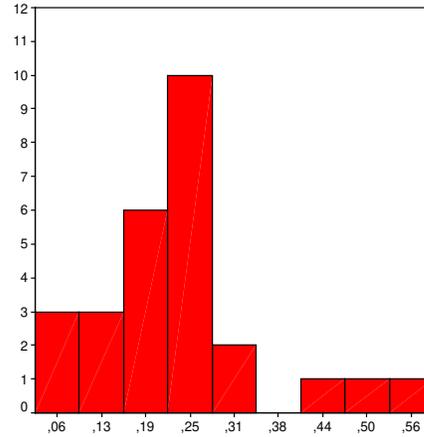


Figura 5 - Quantidade de álcool da saliva. Após a ingestão de 80ml de bebida alcoólica. Vitória, ES, 2003.

A Tabela 3 e as Figuras 6, 7 e 8 a seguir, mostram como as variáveis estão relacionadas. Pode-se observar que a quantificação de etanol em amostras de sangue após a ingestão de 80ml de bebida alcoólica está correlacionada positivamente com as amostras de saliva sendo o coeficiente de correlação (0,810) altamente significativa ($p < 0,01$). A variável sangue está correlacionada, porém negativamente, com a variável peso, apresentando coeficiente de correlação (-0,438) assim como a variável saliva em relação ao peso (-0,477) ($p < 0,05$) ao nível de 5%. Houve correlação negativa entre as variáveis sangue e saliva com a variável idade porém esta não foi estatisticamente significativa.

Tabela 3 - Correlação entre a quantificação de etanol em amostras de sangue e saliva após a ingestão de 80ml de bebida alcoólica, altura , peso e idade. Vitória, ES, 2003.

		Sangue (80ml)	Saliva (80ml)	Altura	Peso	Idade
Sangue	Correlação	-	0,810	-0,183	-0,438	-0,095
	Sg. (2-	.	0,000	0,946	0,022	0,639
	n	27	27	27	27	27
Saliva	Correlação	0,810	1	-0,317	-0,477	-0,056
	Sg. (2-	0,000	.	0,402	0,012	0,780
	n	27	27	27	27	27

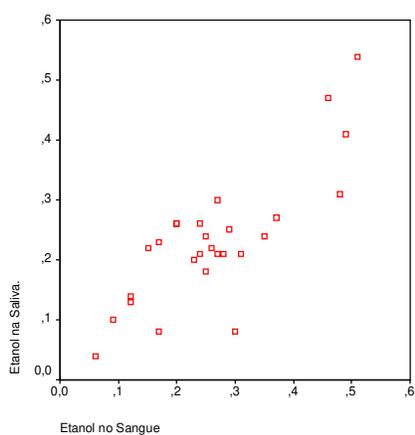


Figura 6 - Diagrama de Dispersão (concentração de etanol no sangue x concentração de etanol saliva). Vitória, ES, 2003.

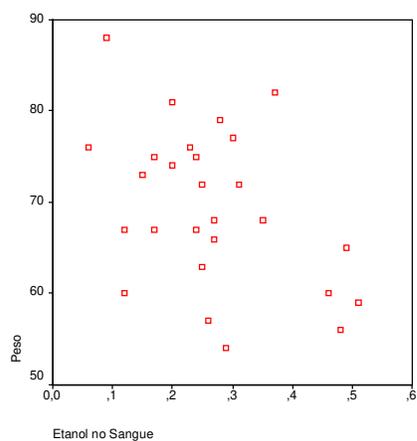


Figura 7 - Diagrama de Dispersão (concentração de etanol sangue x peso). Vitória, ES, 2003.

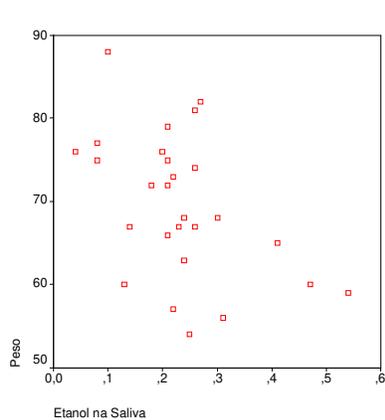


Figura 8 - Diagrama de Dispersão (concentração de etanol na saliva x peso). Vitória, ES, 2003.

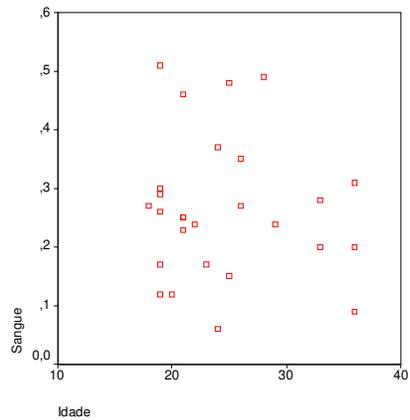


Figura 9 - Diagrama de Dispersão (concentração de etanol sangue x idade). Vitória, ES, 2003.

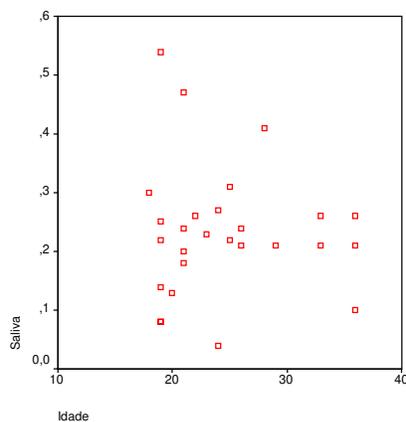


Figura 10 - Diagrama de Dispersão (concentração de etanol saliva x idade). Vitória, ES, 2003.

Utilizou-se o teste t para amostras pareadas a fim de comparar as médias de duas variáveis para um único grupo, calculando-se as diferenças entre os valores das duas variáveis e testando-se se a diferença entre as médias difere de 0.

Na Tabela 4 é apresentado o valor da estatística teste e sua significância para a diferença testada.

Tabela 4 - teste t-pareado para os resultados de etanol no sangue e saliva. Vitória, ES, 2003.

	Média	Desvio Padrão	95% Intervalo Confiança Diferença		t	Sig. (2-caudas)
			Inferior	Superior		
Sangue (80ml) - Saliva (80ml)	0,0319	0,07179	0,0035	0,0603	2,305	0,029

Pode-se observar que a média da diferença entre a quantificação de etanol nas amostras de sangue e saliva após a ingestão de 80ml de bebida alcoólica é significante valor de $p = 0,029$, isto é, a quantidade de etanol no sangue é maior que na saliva ($p < 0,05$).

6 DISCUSSÃO

De acordo com os objetivos deste trabalho, a quantificação de etanol na saliva e no sangue deveria ser executada por um método apropriado para as amostras, que pudesse assegurar a precisão das mensurações e fosse prático, rápido e de fácil execução. Assim o método da cromatografia gasosa, segundo a literatura consultada, é o mais confiável para a investigação da dosagem de álcool no sangue e em outros fluidos biológicos disponíveis em especial nas práticas forenses.

O incremento na aparelhagem e nas técnicas cromatográficas permitiu que as dosagens executadas por cromatografia gasosa (GC) em amostras de sangue e outros fluidos ganhasse mais praticidade e fidelidade. Outros métodos cromatográficos como a HPLC (cromatografia líquida de alta performance) já são utilizados em pesquisas para a verificação dos níveis de concentração de etanol no sangue como opção alternativa para as tradicionais técnicas de pesquisa em GC conforme sugerem Robinson, 1995 e Skoog, 1992. Também estudos como o de Bates, 1997 e Bosan, 1995 e mais recentemente Smolle, 1999; Bendtsen, 1999 e Yacoubian, 2001; têm apontado sobre os dispositivos QED para análise de etanol em amostras orgânicas, principalmente na saliva, mas que ainda carecem de muitas pesquisas e aprimoramento, para seu melhor desempenho.

Conforme assinalou Pellegrino em 1999, dentre os métodos cromatográficos disponíveis na atualidade, o da GC é mais amplamente descrito na literatura para a investigação da dosagem de álcool no sangue e em outros fluidos biológicos disponíveis ou mesmo matrizes alternativas que possam substituir o sangue em casos necessários nas práticas médico-legais ou clínicas.

O'Neal, 1996, ressalta que o uso da GC para investigação dos níveis de álcool na saliva tem sido largamente estudado desde a década de 60. Larsson em 1965 já utilizava o GC na identificação e detecção de substâncias voláteis na saliva sugerindo que a quantificação de etanol em amostras de saliva poderia ser

usada para a determinação da quantidade de álcool no sangue com ênfase nas pesquisas forenses.

Com isso pode-se notar que o método da cromatografia vem sendo largamente usado e aprimorado ao longo da história das pesquisas para quantificação de etanol no sangue e fluidos biológicos obtendo bons resultados, o que nos motivou a seguir a linha de pesquisa neste campo.

O escolha pelo método da GC também foi motivado não só pela sua confiabilidade e praticidade, mas também pela maior disponibilidade deste tipo de equipamento nos Institutos de Toxicologia Forense e nos laboratórios de análises, os quais por vezes estão acopladas aos espectrômetros de massa (MS) que auxiliam na pesquisa e quantificação de inúmeras outras drogas de detecção mais complexas que o etanol.

Zyka, 1991 e O'Neal, 1996, demonstraram que das principais técnicas de tratamento das amostras disponíveis para a quantificação de etanol em matriz sangüínea e outras matrizes biológicas nas pesquisas por GC, as mais encontradas na literatura científica são duas: a formação e injeção de vapores por aquecimento da amostra ou a injeção direta do material no interior do GC.

Assim, como a opção pelo método da cromatografia gasosa, a escolha dos acessórios como a coluna, o detector, os reagentes e outros componentes do aparato cromatográfico foram selecionados de acordo com a literatura científica publicada e dentro dos padrões protocolados no Laboratório de Polícia Técnica do Estado da Bahia (LCPT-Ba).

Uma vez selecionados o método e a técnica para o cumprimento dos objetivos estabelecidos para a pesquisa, a quantificação de etanol foi executada em 30 amostras de saliva e de sangue de voluntários que colaboraram segundo a metodologia descrita no item 6.2.1.

Com relação aos componentes que integraram o grupo de voluntários para a pesquisa, de acordo com a Tabela 1, pode-se observar que a média relativa à variável peso se encontra próxima ao valor de 70 quilogramas. Isto deve-se especialmente à limitação imposta durante a fase de seleção aos

indivíduos de que não possuíssem uma composição fora dos padrões normais estabelecidos pela tabela de I.M.C. (Índice de Massa Corporal), que relaciona idade e altura com o peso do indivíduo no momento do exame. Esta medida foi tomada com base nas descrições de autores como Vogel-Sprott, 1984; Arbenz, 1988; Mirand, 1994; Oneta, 2001, que tratam da influência exercida pelo peso na distribuição do etanol em pessoas com índice corporal maior que o ideal para sua altura.

A média calculada para a variável peso foi de 70, 1 Kg, com desvio padrão de 9, 8 Kg. O I.M.C. foi calculado para cada participante como pode-se observar na tabela do ANEXO VII, verificando-se que apenas um indivíduo, de número 18, estava pouco acima do I.M.C considerado ideal (3%), o que não motivou exclusão deste voluntário da pesquisa baseado neste aspecto.

Com os resultados observados na Tabela 3, pôde-se constatar que o peso correlaciona-se de forma negativa com as concentrações de etanol no sangue (-0, 438), assim também pode-se observar que de forma semelhante está a correlação para a variável peso em função da concentração de etanol encontrada na saliva (-0, 477).

Estes achados corroboram os descritos na literatura que sugerem que a concentração de etanol no sangue está correlacionada negativamente com o peso, e este é influenciado pela quantidade de tecido adiposo e de água presentes no organismo. Não foram encontrados, na vasta literatura científica pesquisada, dados relativos que correlacionassem a concentração de etanol na saliva e a variável peso.

Ainda relacionado à Tabela 1, pode-se constatar que a população estudada foi formada por indivíduos jovens com média de idade de 24 anos (desvio padrão de 6, 1). Este fato se deve a maior facilidade de acesso a este grupo de pessoas, uma vez que a obtenção do consentimento para a participação voluntária na pesquisa em adultos mais velhos se tornava mais complexa, além disso, a incidência de patologias ou fatores adversos a participação dos

voluntários eram menos predispostos a acontecerem com indivíduos de faixa etária mais baixa.

Conforme citado na literatura por diversos autores como, Vogel-Sprott, 1984; Gartner et al. 1996; Lucey, 1999 e Parlesak, 2002; a idade é fator de grande relevância na distribuição e metabolismo do etanol, sendo que, em indivíduos de faixa etária mais elevada, há uma tendência em se encontrar um maior nível de concentração de etanol no sangue, quando comparados a indivíduos de faixa etária mais baixa. Através do gráfico de dispersão (Figuras 9 e 10) observou-se que a distribuição dos pontos foi similar para os indivíduos de faixa etária equivalente.

Os achados relativos às variáveis peso e idade quando correlacionados com as concentrações de etanol encontrados nas matrizes de sangue e saliva utilizadas na amostra, são de grande relevância para estudos farmacocinéticos deste álcool, pois, além de serem escassas as citações literárias a respeito deste assunto, as correlações encontradas, quando se comparam às duas matrizes, revelam um alto grau de semelhança em função da variável peso e idade. Estes achados serão de grande interesse para os futuros entendimentos da dinâmica do etanol e de outras drogas quando da passagem destas do sangue para a saliva através das barreiras orgânicas em novos estudos.

Autores como Pikaar, 1988; Lucey, 1999; Gubala, 2003; confirmam a idéia de que existem diferenças entre o sexo masculino e feminino, da mesma faixa etária, em relação ao metabolismo (distribuição e eliminação) do etanol, cujas variações podem ser vistas através dos níveis de concentração de etanol no sangue.

Vale ressaltar que, como estabelecido na metodologia da pesquisa, com a finalidade de homogeneizar a amostragem, não foram admitidas a participação de mulheres no grupo de voluntários. Segundo Conigrave, 1995, as mulheres realmente têm sido menos estudadas que os homens, uma vez que é menor a prevalência de problemas com bebidas envolvendo mulheres, e também

há uma certa dificuldade em se obter voluntárias aptas a este tipo de exame, por motivos variados.

Conforme os achados da literatura, a amostra utilizada neste estudo pareceu ser suficiente quanto ao número de voluntários. Trabalhos comprovam que o número de voluntários variava de 12 (McColl, 1979) a 100 pessoas (Smolle, 1999), sendo que em alguns casos a amostra utilizada chegou a 450 voluntários (Jones, 2002). Porém em boa parte dos estudos pode-se verificar uma amostra que em geral variava entre 30 a 60 voluntários e o número de amostras de sangue e de saliva também estava contida nesta faixa de valores, já que cada voluntário geralmente cedia apenas uma amostra de cada matriz. De fato, em alguns trabalhos como o de McColl, 1979, apesar da quantidade pequena de voluntários, a amostra foi considerável pois cada voluntário cedeu em torno de 12 amostras para que fossem feitas as análises, ou seja, foram utilizadas aproximadamente 144 amostras.

O resultado descritivo com a identificação numérica para os voluntários participantes e os respectivos valores da concentração de etanol encontrados nas matrizes de sangue e saliva respectivamente, obtidos pela quantificação em CG e HS segundo a metodologia preconizada, podem ser analisados conforme o quadro (ANEXO VII).

Das trinta amostras coletadas no nosso estudo, três foram descartadas. Duas destas amostras (números 27 e 28) foram desprezadas durante a fase de estatística pela análise crítica dos resultados, por apresentarem resultados expressos apenas como o limite de detecção do aparelho cromatográfico, para valores achados nas amostras de saliva. Apenas estas duas amostras, provenientes de lotes diferentes, apresentaram esta falha idêntica na quantificação. Uma provável explicação para este fato pode ser decorrente de falha humana durante o processo de manuseio da amostra.

Outra possível explicação que pode ser sugerida, é semelhante à que relata Christmore, 1984, onde os frascos não tampados corretamente podem

perder etanol e outras substâncias voláteis durante o acondicionamento ou manuseio das amostras. Também cita este autor que os frascos de maiores dimensões, estão mais propensos à formação de quantidades maiores de vapores dos produtos voláteis, o que tornaria a posterior quantificação prejudicada, o que não ocorreu neste trabalho pois, os frascos utilizados em todas as amostras foram padronizados.

O terceiro caso, descrito pelo número 18, corresponde a um achado cujo valor no cromatograma foi altamente desconexo com o valor possível de ser obtido. A avaliação do sangue mostrou um valor de aproximadamente 5,16g de etanol por litro de sangue, o que é incompatível com a dose ingerida pelo voluntário. Por ter sido a primeira amostra a ser injetada no cromatógrafo após certo período de não operação do aparelho, supõe-se que houve uma interação com algum remanescente residual do interior da coluna cromatográfica. A amostra deste voluntário foi descartada e prosseguiu-se à leitura das demais amostras, após a eluição de uma quantidade de ar sintético puro pela coluna.

Pelos resultados finais, como pode ser observado no quadro (ANEXO VII), constata-se que uma quantidade correspondente a 59,26% das amostras de saliva subestimaram a quantidade de etanol encontrada no sangue e o restante correspondente a uma quantidade de 40,74% de amostras que superestimaram os valores da quantificação encontrada no sangue. Deste total, nenhuma das amostras demonstraram resultados idênticos no sangue e na saliva. Os resultados que superestimaram e subestimaram a quantidade de etanol encontrada na saliva comparada com aquela encontrada no sangue eram esperados e vieram a corroborar os achados descritos na literatura como os citados por Smolle, 1999 e McColl, 1979, que encontraram um resultado maior na quantificação de etanol no sangue que na saliva, em aproximadamente 80% de amostras.

A Tabela de número 2 descreve os valores máximo e mínimo encontrados pela análise das amostras de sangue e saliva, e nela observa-se a relativa proximidade das médias e do desvio padrão dos valores obtidos.

O teste estatístico sobre o coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para demonstrar as possíveis correlações existentes entre as variáveis que compõem a amostra. A análise dos dados encontra-se expressa na Tabela 3.

Ainda na Tabela 3 pode-se observar que os níveis de etanol encontrados no sangue e na saliva possuem uma elevada correlação positiva (0,810), para um $p < 0,01$, o que vem a corroborar os resultados encontrados nos trabalhos de Bates, 1997 (0,94); Kiesow, 1993 (0,974); Haeckel, 1992 (0,98) e Jones, 1979 (0,962) e de outros, que também mostram uma significativa distribuição desta correlação entre as amostras.

Pode-se também, como já foi observado, ressaltar a existência de correlação entre a variável peso e a variável nível de etanol no sangue. Mostrando uma correlação negativa com coeficiente de -0,438, que indica que, à medida que se aumenta o peso a tendência da quantidade de etanol no sangue é de diminuir. Este achado é encontrado nas citações médico-legais de Xavier Filho, 1998 e Arbenz, 1988.

De forma semelhante está o comportamento da variável nível de etanol na saliva em relação à variável peso. O coeficiente da correlação de Pearson encontrado mostra a existência de correlação, também negativa, entre essas duas variáveis, à semelhança do que ocorre com o nível de etanol no sangue. De fato, a saliva, como sugere Garret, 1998, representa um complexo fluido orgânico e não apenas um ultra-filtrado do sangue, porém, o fato de que drogas circulantes na corrente sangüínea são, em boa parte delas, secretadas na saliva, sugere que poderiam ser correlacionados os níveis de distribuição do etanol no sangue, à semelhança do que ocorre na saliva. Logo, poderia-se esperar que, uma vez que houve uma correlação negativa do nível de etanol no sangue com o peso corporal dos indivíduos, esta correlação se repetiria de forma correlata também para a variável nível de etanol na saliva. A correlação encontrada conforme expresso na Tabela 3 foi de (-0,477). Este dado, apesar de significativo, não foi encontrado especificado na literatura pesquisada. É de se supor que, por estar relacionada analogamente com o que acontece com o nível de etanol no sangue, este fato não

é relatado nos trabalhos publicados; porém, entende-se que este fato é relativamente importante para futuros entendimentos do comportamento da cinética do etanol na saliva humana.

O teste t para dados pareados foi realizado para verificar se os níveis de etanol no sangue e na saliva para o grupo apresentava diferença ou não entre as médias.

A Tabela 4 apresenta os valores da estatística teste e sua significância para a diferença testada. O resultado obtido mostra um valor de p igual a 0,029, o que demonstra que a quantificação de etanol nas amostras de sangue e saliva após a ingestão de 80 ml de bebida alcóolica diferem significativamente para um $p < 0,05$.

Este resultado alcançado difere daqueles encontrados na literatura científica consultada, uma vez que grande parte dos trabalhos disponíveis relata uma alta confiabilidade do método e com resultados obtidos na saliva altamente próximos àqueles obtidos no sangue.

7 CONCLUSÃO

- Houve uma forte correlação positiva apontando comportamento similar do etanol nas amostras de saliva e sangue.
- Foi possível constatar que as amostras de saliva analisadas pelo método proposto apresentaram uma tendência a subestimar as concentrações de etanol encontradas no sangue, conforme se pode constatar na literatura especializada.
- A forte correlação positiva encontrada para as concentrações de etanol nas amostras de saliva e sangue demonstra que, qualitativamente a saliva possui grande valor analítico constituindo-se em uma via para detecção do etanol em indivíduos que fizeram uso desta droga.
- Os dados deste trabalho indicam valores diferentes de etanol na saliva dos encontrados no sangue. Mesmo podendo ser considerada, a saliva, como um bom indicador para os níveis da concentração de etanol no sangue, há a necessidade de que novos trabalhos a respeito do tema sejam feitos, com casuística mais expressiva.

REFERÊNCIAS*

1. Almeida Júnior A. ***Lições de medicina legal***. 4.ed. Rio de Janeiro: Editora Nacional de Direito; 1979.
2. Annino JS, Giese RW. ***Química clínica*** – princípios e métodos. 4.ed. São Paulo: Marale; 1978.
3. Anthony RM, Sutheimer CA, Sunshine I. Acetaldehyde, methanol e ethanol analysis by *headspace* gas chromatography. ***J Anal Toxicol***. 1980; 4: 43-5.
4. Arbenz GO. ***Medicina legal e antropologia forense***. São Paulo: Livraria Atheneu; 1988.
5. Bassette R, Ozeris S, Whitnah CH. HS in food science research. ***Anal Chem***. 1962; 34: 1540.
6. Bates ME, Brick, J., White, H.R. The correspondence between saliva and breath estimates of blood alcohol concentration: advantages and limitations of the saliva method. ***J Stud Alcohol***. 1993; 54(1): 17-22.
7. Bates ME, Martin CE. Immediate, quantitative estimation of blood alcohol concentration from saliva. ***J Stud Alcohol***. 1997; 58(5): 531-8.
8. Bendtsen P, Hultberg J, Carlsson M, Jones AW. Monitoring ethanol exposure in a clinical setting by analysis of blood, breath, saliva and urine. ***Alcohol Clin Exp Res***. 1999; 23(9): 1446-51.
9. Bertholf RL. Gas chromatography and mass spectrometry in clinical chemistry. *In: Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Florida: R.A. Meyers, Jonh Wiley & Sons Ltd, Chichester; 2000. p.1314-36.
10. Bosan-Kilibarda I, Rumenjak V, Cipric M, Macan D. The Q.E.D. test possibility for rapid determination of ethanol levels in saliva. ***Lijec Vjesn***. 1995; 117(2): 109-11.
11. Brito Filho D. ***Toxicologia geral e humana***. São Paulo: Atheneu; 1988.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

12. Caddy,B. Saliva as a specimen for drug analysis. In R. C. Baselt. **Adv Anal Toxicol.** 1984; 1: 198-254.
13. Calabuig JAG. **Medicina legal y toxicología.** 4.ed. Barcelona: Ediciones Cientificas y Técnicas S.A.; 1992.
14. Carvalho H.V. et al. **Compêndio de medicina legal.** 2.ed. atual. São Paulo: Saraiva; 1992.
15. Chasin AAM, Mídio AF. Aspecto Toxicológico da Overdose de Cocaína. **Rev Fac Farm Bioquim Univ Sao Paulo.** 1994; 27(1): 1-27.
16. Chasin AAM. **Cocaína e Cocaetilen- influência do etanol nas concentrações de cocaína em sangue de humano post mortem** [Tese Doutorado). São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo; 1996.
17. Christian GA. **Analytical chemistry.** 5.ed. New York: John Wiley & Sons; 1994.
18. Christmore DS, Kelly RC, Doshier LA. Improved recovery and stability of ethanol in automated *headspace* analysis. **J Forensic Sci.** 1984; 29(4): 1038-44.
19. Christopher TA, Zeccardi JA. Evaluation of the Q.E.D. Saliva Alcohol Test: a new, rapid, accurate device for measuring ethanol in saliva. **Ann Emerg Med.** 1992; 21(9): 1135-7.
20. Collins CH, Braga GL, Bonato PS. **Introdução a métodos cromatográficos.** 7.ed. São Paulo: Editora Unicamp; 1997.
21. Conigrave KM, Saunders JB, Whitfield JB. Diagnostic tests for alcohol consumption. **Alcoh Alcohol.** 1995; 30(1): 13-26.
22. Croce D, Croce Júnior D. **Manual de medicina legal.** 4.ed. São Paulo: Saraiva; 1998.
23. Day RA, Underwood AL. **Quantitative analysis.** 6.ed. New Jersey: Simon & Schuster; 1991.

24. Dominguez AM, Christensen HE, Goldbaum LR, Stembridge VA. The HS and GC method in toxicology. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1959; 1: 135.
25. Dreisbach RH. *Manual de envenenamentos -diagnóstico e tratamento* São Paulo: Atheneu; 1975.
26. Drobitch RK, Svensson CK. Therapeutic drug monitoring in saliva. An update. *Clin Pharmacokin.* 1992; 23: 365-79.
27. Duritz G, Truitt EB. A rapid method for the simultaneous determination of acetaldehyde and ethanol in blood using gas chromatography. *Quart J Studies Alc.* 1964; 25: 498-504.
28. Dziekan G, Contesse J, Werth B, Schwarzer G, Reinhart WH. Cisapride increases peak plasma and saliva ethanol levels under fasting conditions. *J Intern Med.* 1997; 242(6): 479-82.
29. Engelhart DA, Jenkins AJ. Evaluation of an onsite alcohol testing device for use in postmortem forensic toxicology. *J Anal Toxicol.* 2001; 25(7): 612-5.
30. Ferreira AA. *Da técnica médico-legal na investigação forense.* São Paulo: Revista dos Tribunais LTDA.; 1962. v.2
31. Fortes JRA, Cardo WN. *Alcoolismo: diagnóstico e tratamento.* São Paulo: Sarvier; 1991.
32. Fox PC, Wolff A, Yeh CK, Atkinson JC, Baum BJ. Saliva inhibits HIV-1 infectivity. *J Am Dental Assoc.* 1988; 116: 635-7.
33. França G.V. *Medicina legal.* 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998.
34. Galvão, L.C.C. *Estudos médico-legais.* Porto Alegre: Sagra Luzzatto; 1996.
35. Garrett JR, Ekstrom J, Anderson LC. *Glandular mechanism of salivary secretion.* 10.ed. Basel: Karger-Switzerland; 1998.
36. Girja KP, Sundharam BS, Krishnan PA, Devi CS. Biochemical changes of saliva in tobacco chewers tobacco smokers, alcohol consumers, leukoplakia and oral cancer patients. *Indian J Dent Res.* 2002; 13(2): 102-7.
37. Gomes H. *Medicina legal.* 28.ed. Rio de Janeiro: Freitas Bastos; 1992.

38. Griffith E. ***A política do álcool e o bem comum.*** Porto Alegre: Artes Médicas; 1998.
39. Gubala W, Zuba D. Saliva as an alternative specimen for alcohol determination in the human body. ***Pol J Pharmacol.*** 2002; 54(2): 161-5.
40. Gubala W, Zuba D. Gender differences in the pharmacokinetics of ethanol in saliva and blood after oral ingestion. ***Pol J Pharmacol.*** 2003; 55: 639-44.
41. Haeckel R, Bucklitsch I. The comparability of ethanol concentrations in peripheral blood and saliva. The phenomenon of variation in saliva to blood concentration ratios. ***J Clin Chem Clin Biochem.*** 1987; 25: 199-204.
42. Henry JB. ***Clinical & diagnosis management by laboratory methods.*** 18.ed. New York: WB Saunders Company; 1991.
43. Idowu OR, Caddy BJ. A review of the use of the saliva in the forensic detection of drugs and other chemicals. ***Forensic Sci Soc.*** 1982; 22: 123-35.
44. Jones AW. A rapid head-space method for ethil alcohol determination in saliva samples. ***Anal Biochem.*** 1978; 86: 589-96.
45. Jones AW. Inter- and Intra-Individual variations in the saliva/blood alcohol ratio during ethanol metabolism in man. ***Clin Chem.*** 1979; 25(8): 1394-8.
46. Jones AW. Determination of liquid/air partition coefficients for dilute solutions of ethanol in water, whole blood and plasma. ***J Anal Toxicology.*** 1983; 7: 193-7.
47. Jones AW. Pharmacokinetics of ethanol in saliva: comparison with blood and breath alcohol profiles, subjective feelings of intoxication, and diminished performance. ***Clin Chem.*** 1993; 39(9): 1837-44.
48. Jones AW. Salting-out effect of Sodium Flouride and its influence on the analysis of ethanol by *headspace* gas chromatography. ***J Anal Toxicology.*** 1994; 18: 292-3.
49. Junqueira LC, Carneiro J. ***Histologia básica.*** 6ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1985.

50. Karnitis L, Porter LJ. A gas chromatographic method for ethanol determination in vapors of biological fluids. **J Forensic Sci.** 1971; 318-22.
51. Kiesow LA, Simons CT, Long W.B. Quantitative determination and comparasion of ethanol in saliva samples of unknown volumes with blood ethanol levels in human test subjects following ethanol ingestion. **Ann N Y Acad Sci.** 1993; 694: 293-5.
52. Kuo HW, Yang JS, Chiu MC. Determination of urinary and salivary cotidine using gas and liquid chromatography and enzyme-linked immunosorbent assay. **J Chromatogr B.** 2002; 768: 297-303.
53. Laposata M. Assessment of ethanol intake – current tests and new assays on the horizon. **Am J Clin Pathology.** 1999; 12(109): 443-50.
54. Larsson BT. Gas chromatography analysis in saliva. **Acta Chem Scand.** 1965; 19: 159.
55. Larsson BT, Widmark G. A gas chromatographic method for analysis of volatiles in saliva samples. **Acta Pharm Suecica.** 1969; 6: 479-88.
56. Lima AO, Soares JB, Greco JB, Galizzi J, Cancado JR. **Métodos de laboratório aplicados à clínica (técnica e interpretação).** 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1992.
57. Livesey JF, Perkins SL, Tokessy NE, Maddock MJ. Simultaneous determination of alcohols and ethylene glycol in serum by packed or capillary-column gas chromatography. **Clin Chem.** 1995; 41(2): 300-5.
58. Macchia T, Mancinelli R, Gentili S, Lugaresi EC, Raponi A, Taggi F. Ethanol in Biological Fluids: *headspace* GC Measurement. **J Anal Toxicol.** 1995; 19: 241-6.
59. Maier H, Born IA, Mall G. Effect of chronic ethanol and nicotine consumption on the function and morphology of the salivary glands. **Klin Wochenschr.** 1988; 66(11): 140-50.
60. Maranhão OR. **Curso básico de medicina legal.** 8.ed. São Paulo: Malheiros Editores LTDA; 2000.

61. Markelov M, Guzowski Jr TP. Matrix independent *Headspace* gas chromatographic analysis. The full evaporation technique. ***Anal Chim Acta***. 1993; 276: 235-45.
62. Marlatt GA, Gordon JR. ***Prevenção da recaída: estratégias de manutenção no tratamento do comportamento adictivo***. Porto Alegre: Artes Médicas Sul; 1993.
63. Martinez-Madrigal F, Micheau C. Histology of the major salivary glands. ***Am J Surgic Pathol***. 1989; 13: 879-99.
64. Mather A, Assimios A. Evaluation of Gas-Liquid Chromatography in Assays for Blood Volatiles. ***Clin Chem***. 1965; 2(2): 1023-35.
65. Mendehall CL, Macgee J, Green ES. Simple rapid and sensitive method for the simultaneous quantitation of ethanol and acetaldehyde in biological materials using *headspace* gas chromatography. ***J Chromatogr***. 1980; 190: 197-200.
66. McBay AJ. Interpretation of blood and urine cannabinoid concentrations. ***J Forensic Sci***. 1988; 33(4): 875-82.
67. McColl KEL, Whiting B, Moore MR, Goldberg A. Correlation of ethanol concentrations in blood and saliva. ***Clin Sci***. 1979; 56: 283-6.
68. O'Neal CL, Wolf CE, 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 Sci Int***. 1996; 83: 31-8.
69. Panasco WL. ***Medicina legal***. Rio de Janeiro: Eldorado Tijuca LTDA; 1976.
70. Peel HW, Perrigo BJ, Mikhael NZ. Detection of drugs in saliva of impaired drivers. ***J Forensic Sci***. 1984; 29(1): 85-9.
71. Pellegrino S, Bruno FS, Petrarulo M. Liquid chromatographic determination of ethyl alcohol in body fluids. ***J Chromatogr B***. 1999; 729: 103-10.
72. Purchase IFH. HS use in anesthesiology. ***Nature***. 1963; 198: 895.
73. Rainey PM. Relation between serum and whole-blood ethanol concentrations ***Clin Chem***. 1993; 39(11): 2288-92.

74. Ravel R. **Laboratório clínico** - aplicações clínicas dos dados laboratoriais. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1995.
75. Ritschel WA, Thompson GA. Monitoring of drug concentrations in saliva: a non-invasive pharmacokinetic procedure. **Methods Fin Exp Clin Pharmacol.** 1983; 5: 511-525.
76. Robinson JW. **Undergraduate instrumental analysis.** 5.ed. New York: Marcel Dekker; 1995.
77. Rodenberg HD, Bennett JR, Watson WA. Clinical utility of a saliva alcohol dipstick estimate of serum ethanol concentrations in the emergency department. **DICP.** 1990; 24(4): 358-61.
78. Roine RP, Eriksson CJP, Ylikahri R, Pentilla A, Salaspuro M. Methanol as a marker of alcohol abuse. **Alcohol Clin Exp Res** 1989; 13: 172-5.
79. Rouquayrol MZ. **Epidemiologia e saúde.** 4.ed. Rio de Janeiro: MEDSI; 1993.
80. Sawyer DT, Heineman WR, Beebe JM. **Chemistry experiments for instrumental methods.** New York: John Wiley & Sons; 1984.
81. Schomburg G. **Gas chromatography: a practical course.** Verlagsgesellschaft H, Weinheim (Federal Republic of Germany): VCH; 1990.
82. Schuberth J. A full evaporation *headspace* technique with capillary CG and ITD: a means for quantitating volatile organic compounds in biological samples. **J Chromatog Sci.** 1996; 34: 314-9.
83. Senkowski CM, Thompson KA. The accuracy of blood alcohol analysis using *headspace* gas chromatography when performed on clotted samples. **J Forensic Sci.** 1990; 35(1): 176-80.
84. Silva Júnior EL. **Manual de medicina legal.** 4.ed. São Paulo: Sugestões Literárias; 1969.
85. Skoog DA, Learv JJ. **Principles of instrumental analysis.** 4.ed. Florida: Saunders College Publishing; 1992.

86. Smolle KH, Hofmann G, Kaufmann P, Lueger A, Brunner GQED. 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 Med.*** 1999; 25(5): 492-5.
87. Solanky AA. Effect of different concentrations of Sodium Fluoride on blood alcohol determination by *headspace* gas chromatography using the internal standard method. ***J Anal Toxicology.*** 1994; 18: 63.
88. Stanley EG, Peyser HS. ***Alcoolismo:*** um guia prático de tratamento. Porto Alegre: Artes Médicas; 1991
89. Stone BE, Rooney PA. A study using body fluids to determine blood alcohol. ***J Anal Toxicology.*** 1984; 8: 95-6.
90. Strobel HA, Heinemam WR. ***Chemical instrumentation:*** a sistematic approach. 3.ed. New York: John Wiley & Sons; 1989.
91. Suzuki KW, Seno H, Ishii A, Kumazawa T, Suzuki O. Ultra-sensitive method for determination of ethanol in whole blood by *headspace* capillary CG with cryogenic oven trapping. ***J Chromatography B.*** 1999; 727: 89-94.
92. Tomar SL, Henningfield JE. Review of the evidence that pH is a determinant of nicotine dosage from oral use of smokeless tobacco. ***Tob Control.*** 1997; 6(3): 219-25.
93. Tonnellier P, Klein P, Faure C. Les bouches seches des alcooliques. ***Fran Rev Alcool.*** 1980; 26(4): 219-26.
94. Trudgill NJ, Smith LF, Kérshaw J, Riley SA Impact of smoking cessation on salivary function in healthy volunteers. ***Scand J Gastroenterol.*** 1998; 33(6): 568-71.
95. Urbansky A. Determination of levels of ethyl alcohol in saliva as an important biological material. ***Soud Lek.*** 1990; 35(3): 33-8.
96. Vargas HB. ***Manual de psiquiatria forense.*** Rio de Janeiro: Freitas Bastos; 1990.
97. Vining RF, McGinley RA. Hormones in saliva. ***Crit Rev Clin Lab Sci.*** 1985; 23: 95-146.

98. Walsh DJ, Corey AC, Cotton RW, Forman L, Herrin GL, Word C *et al.* Isolation of deoxyribonucleic acid (DNA) from saliva and forensic science samples containing saliva. ***J Forensic Sci.*** 1992; 37: 387-95.
99. Wigmore JG. The distribution of ethanol in postmortem blood samples. ***J Forensic Sci.*** 1993; 38: 1019-20.
100. Williams RH, Shah SM, Maggiore JA, Erickson TB. Simultaneous detection and quantification of diethylene glycol, ethylene glycol, and the toxic alcohols in serum using capillary column gas chromatography. ***J Anal Toxicol.*** 2000; 24: 621-6.
101. Wolff K, Hay A. Methadone in saliva. ***Clin Chem.*** 1991; 37: 1297-8.
102. Xavier Filho EF. ***Rotina médico legal.*** 2ed. Porto Alegre: Sagra Luzzatto; 1998.
103. Yacoubian Jr GS, Wish ED, Perez DM. A comparison of saliva testing to urinalysis in an arrestee population. ***J Psychoactive Drugs.*** 2001; 33(3): 289-94.
104. Zarzuela JL, Aragão RF. ***Química legal e incêndios.*** Porto Alegre: Sagra Luzzatto; 1999.
105. Zyka IJ. ***Instrumentation in analytical chemistry.*** England: Ed Chief. Ed. Ellis Horwood; 1991.

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Eu, brasileiro, (estado civil)....., nascido em de de, residente à (ao)....., abaixo assinado, fui informado sobre os objetivos da pesquisa “QUANTIFICAÇÃO DE ETANOL EM AMOSTRAS DE SALIVA EM COMPARAÇÃO COM AMOSTRAS DE SANGUE POR MEIO DE CROMATOGRRAFIA GASOSA”, a ser realizada pelo pesquisador Marcos Vinicius Pinto Ventorin, aluno do curso de Pós-Graduação a nível de mestrado em Odontologia Legal e Deontologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas (FOP-UNICAMP) matrícula n.º 013927, bem como sobre os inconvenientes da mesma e pelo presente afirmo meu consentimento para participar de forma livre, espontânea declarando-me devidamente esclarecido.

Fui informado sobre o direito que tenho de abandonar a experiência a qualquer tempo, em respeito à resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

Vitória dede 2002.

Obs.: Comprometo-me a não dirigir veículo automotor nas seis horas subsequentes à ingestão da droga cedida para efeitos da pesquisa (álcool etílico), em respeito às normas vigentes do Código Nacional de Transito.

Ass.: _____

ANEXO 2

QUESTIONÁRIO SOBRE ESTADO GERAL DE SAÚDE-VOLUNTÁRIOS

Nome: _____ idade: ____ peso ____ altura _____

Está ou esteve sobre tratamento médico? Quando e porque?

Possui alguma dessas enfermidades:

Doenças cardíacas ? _____

Hipertensão arterial ? _____

Doenças renais ? _____

Distúrbios digestivos ? _____

Doenças hepáticas ? _____

Distúrbios sangüíneos ? _____

Doenças sexualmente transmissíveis ? _____

Distúrbio neurológico ? _____

Distúrbios psiquiátricos ? _____

Usou ou usa algum medicamento ? qual e freqüência ? _____

Faz uso freqüente de bebidas alcoólicas ? _____

Faz uso de algum outro tipo de droga ilícita ? _____

Hábito de fumar ? _____

ANEXO 3

O Índice de Massa Corporal (IMC) é usado para avaliar o peso (kg) em relação à sua estatura (m).

$$\text{IMC} = \text{peso atual (kg)} / \text{Estatura}^2 \text{ (m)} = \text{Kg/m}^2$$

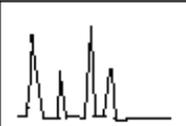
A tabela abaixo indica a classificação do IMC:

IMC	Classificação
Abaixo do peso	Menor que 18, 5
Peso Normal	18, 5 – 24, 9
Pré Obesidade	25, 0 – 29, 9
Obesidade Grau I	30, 0 – 34, 9
Obesidade Grau II	35, 0 – 39, 9
Obesidade Grau III	Acima de 40, 0

Fonte: OMS (1998).

ANEXO 4

MODELO DE FORMULÁRIO DE PESAGEM

 L.C.P.T.	FORMULÁRIO PARA PESAGEM DE AMOSTRAS PARA ALCOOLEMIA	 Seção de Análise Instrumental
------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Data: ___/___/___

Nome:		Nº
P ₁ =	M _{amostra} (g) =	
P ₂ =	d (g/cm ³) =	
P ₃ =	M _{padrão} (g) =	
Massa IP-OH (g) =	C _{IP-OH} =	
Massa total (g) =	C _{Et-OH} =	

Legenda do ANEXO III.

P₁ - Peso um (1)

P₂ - Peso dois (2)

P₃ - Peso três (3)

Massa IP-OH (g) - Massa do isopropanol.

M_{amostra} (g) - Massa da amostra.

d - densidade (g/cm³).

M_{padrão} (g) - Massa padrão.

C_{IP-OH} - Concentração do isopropanol.

C_{Et-OH} - Concentração do etanol.

ANEXO 5

Seção de Análise Instrumental – Determinação da Linearidade do FID CG-90 do LCPT-Ba (Regressão Linear).

FUNÇÃO LINEAR

(Rel. Área)	Rel. %peso
0	0

0,3443	1,002961
0,8101	2,073404
0,9679	2,457528
1,5302	4,666144
1,7503	4,953687

Área Et-OH	Área Prop-OH	% Et-OH	%Prop-OH	(Pto da Curva)
29005	84241	0,07791	0,0777	1 0,15%
46955	57961	0,15835	0,0764	2 0,32%
67592	69832	0,1895	0,0771	3 0,35%
144456	94406	0,32705	0,0701	4 0,67%
120911	69082	0,3872	0,0782	5 0,78%

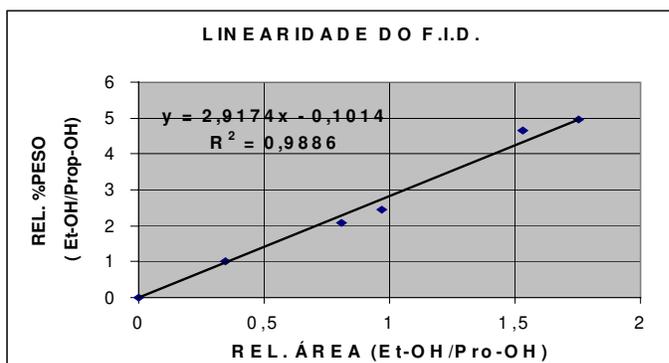
Área Et-OH na Am.	Área Padrão Na Am.	Volumes (mL)	Massa (g) Amostra	Massa (g) Padrão
12422	29104	0,50	0,5070	#####

Nom: Erinaldo Moreira Camurca Rg310

Densidade =

1,014g/mL

Conc. Etanol= 2,04 g/L



ANEXO 6

Coordenação de Análise Instrumental Curva de Calibração do CG-90 (etanol) LCPT-Ba.

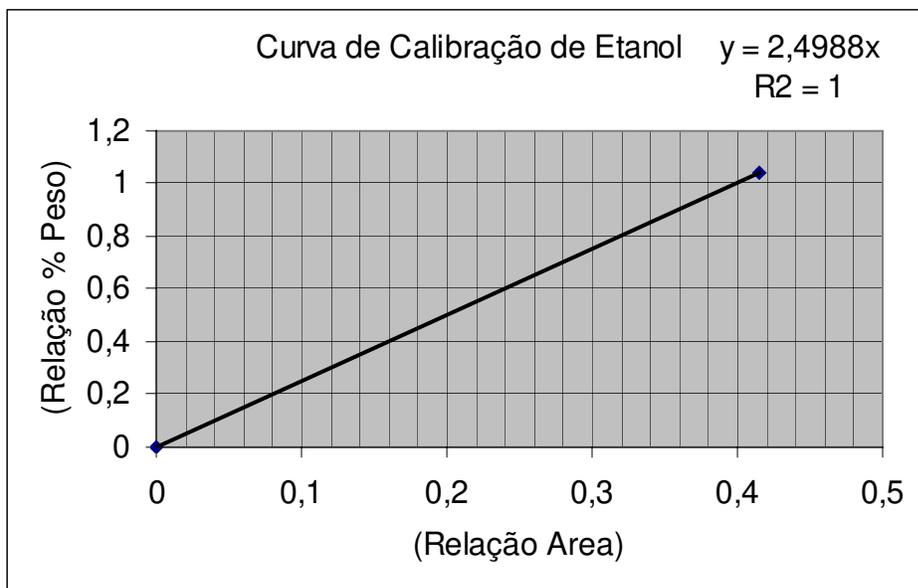
Regressão Linear

FUNÇÃO LINEAR

(Rel. Area)	Rel. %peso	y=	2,4988	X +	0	b=	0
0,4157	1,038653	R2 =	1	R2=	1	a=	2,499

Área Et-OH	Área Prop-OH	% Et-OH	%Prop-OH	(Pto da Curva)
51197	123168	0,07927	0,0763	1
				2
				3

Área Et-OH na Am.	Área Padrão na Am.	Volumes (mL)	Massa (g) Amostra	Massa (g) Padrão
51197	123168	0,50	0,5186	#####
	Amostra Sintética	Nome:	Densidade =	1,0372 g/mL
			Conc.Etanol= 1,55 g/L	



ANEXO 7

Tabela que relaciona a qualificação dos voluntários com os resultados obtidos em coleta feita 1 hora após à ingestão de 80 ml de bebida alcoólica. Vitória, ES, 2003.

Voluntário	Idade	Peso (Kg)	Altura (m)	Sangue	Saliva
1) R.	33	81	1,82	0.20	0.26
2) A.	26	68	1,70	0.35	0.24
3) J.	19	59	1,72	0.51	0.54
4) B.	21	63	1,78	0.25	0.24
5) W.	21	72	1,76	0.25	0.18
6) I.	19	67	1,73	0.12	0.14
7) G.	23	67	1,69	0.17	0.23
8) M.	20	60	1,70	0.12	0.13
9) B.	18	68	1,80	0.27	0.30
10) W.	22	67	1,75	0.24	0.26
11) A.	25	56	1,66	0.48	0.31
12) J.	24	76	1,75	0.06	0.04
13) W.	25	73	1,72	0.15	0.22
14) F.	21	76	1,79	0.23	0.20
15) S.	28	65	1,80	0.49	0.41
16) C.	21	60	1,70	0.46	0.47
17) M.	26	66	1,71	0.27	0.21
18) A. #	38	98	1,95	5.16	não executado
19) E.	29	75	1,75	0.24	0.21
20) R.	36	72	1,70	0.31	0.21
21) I.	24	82	1,84	0.37	0.27
22) J.	19	77	1,90	0.30	0.08
23) V.	36	74	1,74	0.20	0.26
24) F.	33	79	1,78	0.28	0.21
25) M.	19	57	1,77	0.26	0.22
26) W.	36	88	1,88	0.09	0.10
27) A. #	23	65	1,72	0.63	0.01
28) E. #	18	64	1,66	0.10	0.01
29) J.	19	75	1,83	0.17	0.08
30) D.	19	54	1,64	0.29	0.25

Excluídos da análise.

ANEXO 8

Tabela de resultados da avaliação do Índice de Massa Corporal (IMC) para voluntários da pesquisa. Vitória, ES, 2003

Voluntário	Altura(m)	Peso(Kg)	Idade	IMC
1-	1, 82	81	33	24, 45
2-	1, 7	68	26	23, 52
3-	1, 72	59	19	19, 94
4-	1, 78	63	21	19, 89
5-	1, 76	72	21	23, 22
6-	1, 73	67	19	22, 38
7-	1, 69	67	23	23, 45
8-	1, 7	60	20	20, 76
9-	1, 8	68	18	20, 98
10-	1, 75	67	22	21, 87
11-	1, 66	56	25	20, 32
12-	1, 75	76	24	24, 81
13-	1, 72	73	25	24, 67
14-	1, 79	76	21	23, 71
15-	1, 8	65	28	20, 06
16-	1, 7	60	21	20, 76
17-	1, 71	66	26	22, 57
18- #	1, 95	98	38	25, 72
19-	1, 75	75	29	24, 48
20-	1, 7	72	36	24, 91
21-	1, 84	82	24	24, 22
22-	1, 9	77	19	21, 32
23-	1, 74	74	36	24, 44
24-	1, 78	79	33	24, 71
25-	1, 77	57	19	18, 19
26-	1, 88	88	36	24, 89
27- #	1, 72	65	23	21, 77
28- #	1, 66	64	18	23, 22
29-	1, 83	75	19	22, 39
30-	1, 64	54	19	20, 53

Excluídos da análise.

ANEXO 9

Certificado de Aprovação - Comitê de Ética em Pesquisa Escola de Medicina da Santa Casa de Misericórdia de Vitória – ES. (CEP- EMESCAM).