UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, INOVAÇÃO E TECNOLOGIA PARA A AMAZONIA – CITA

INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO, VOLUME DA AMOSTRA E DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO NA PERDA DE ETANOL EM AMOSTRAS DE SANGUE TOTAL *ANTE MORTEM*

GIULLIANO SCARANTE CEZAROTTO

RIO BRANCO, AC
JULHO DE 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, INOVAÇÃO E TECNOLOGIA PARA A AMAZÔNIA – CITA

Giulliano Scarante Cezarotto

Influência da concentração, volume da amostra e do tempo de armazenamento na perda de etanol em amostras de sangue total *ante mortem*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, da Universidade Federal do Acre, como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Inovação Tecnológica**.

Orientador: Prof. Dr. Delcio Dias Marques

RIO BRANCO, AC
JULHO DE 2017

C425i Cezarotto, Giulliano Scarante, 1979-

Influência da concentração, volume da amostra e do tempo de armazenamento na perda de etanol em amostras de sangue total *ante mortem* / Giulliano Scarante Cezarotto. -- Rio Branco: Universidade Federal do Acre, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia - CITA, 2017.

56f.; 30 cm.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia da Universidade Federal do Acre, como requisito parcial para a obtenção do grau de *Mestre em Ciência e Inovação Tecnológica*.

Orientador: Prof.° Dr. Delcio Dias Marques

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA INOVAÇÃO E TECNOLOGIA PARA A AMAZÔNIA - CITA

Influência da concentração, volume da amostra e do tempo de armazenamento na perda de etanol em amostras de sangue total *ante mortem*

Giulliano Scarante Cezarotto

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: _____

_____

Prof. Dr. Delcio Dias Marques (Orientador)
Universidade Federal do Acre

_____

Prof. Dr. Carlos Eduardo Garção de Carvalho
Universidade Federal do Acre (Membro)

_____

Dr. Leandro Junior Baginski
Polícia Técnico-Científica do Estado do Acre

As mulheres da minha vida:

Minha mãe amada por sempre estar ao meu lado, e mesmo nos momentos mais difíceis, sempre se fez presente, amando, ensinando e orientando. A você devo a minha vida e eterna gratidão;

Meu amor e esposa Leticia, pelo companheirismo, amizade, cumplicidade e paciência;

Minha amada filha Alice, por transformar meu mundo e me ensinar o verdadeiro sentido da vida.

Meu querido pai, cuja breve passagem neste mundo foi suficiente para deixar o mais rico exemplo de caráter e retidão.

A vocês dedico esta obra.

AGRADECIMENTOS

À Deus, a minha mãe Jumara, a minha esposa Letícia e amada filha Alice, aos meus irmãos queridos Giovanno e Fabrizzio, ao meu padrasto e amigo Luiz, à Universidade Federal do Acre por possibilitar a minha formação a nível de pós-graduação. Ao orientador Delcio Dias Marques, ao qual agradeço especialmente, a todos os docentes do Programa de Pós-Graduação em Ciência Inovação e Tecnologia para a Amazônia - CITA, ao Departamento de Polícia Técnico Científica do Estado do Acre, na figura do seu Diretor Haley Marcio Vilas Bôas da Costa, ao Diretor do Instituto de Análises Forenses Mario Sandro Martins de Souza e colegas de trabalho, aos amigos e colegas do CITA, especialmente a amiga Ludimila Kipplel Aguiar, a amiga Nathalia May de Rose e todos aqueles que de alguma maneira tornaram tudo possível.

RESUMO

As bebidas alcoólicas são produzidas e consumidas pelos seres humanos desde a antiguidade. Há uma importante relação entre o abuso das bebidas alcoólicas e a ocorrência de problemas sociais, como violência doméstica, suicídios, homicídios, estupros e acidentes de trânsito. O exame de dosagem alcoólica, ou simplesmente exame de alcoolemia, é uma importante ferramenta forense, pois viabiliza a elucidação de crimes, como a direção de veículos sob a influência de álcool, até a comprovação da *causa mortis*, em um possível coma alcoólico. O sangue utilizado no exame de alcoolemia sofre a perda de etanol durante o período de armazenamento, e por este motivo, faz-se necessário o estudo dos fatores envolvidos neste fenômeno. Com o sangue de três voluntários foram construídas três soluções de etanol nas concentrações de 10, 20 e 40 dg L^{-1}. As soluções foram distribuídas em tubos de coleta a vácuo de sangue nos volumes de 4, 2 e 1 mL, e metade dos frascos foram abertos antes do armazenamento a 4ºC, sendo então analisados por cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas e injeção por *headspace*. As amostras foram analisadas semanalmente até 150 dias de armazenamento. Nenhuma amostra da solução de 40 dg L^{-1} teve perda percentual superior a 5% durante o experimento, entretanto, nas soluções de 10 e 20 dg L^{-1} foram observadas perdas superiores e 5%. A análise fatorial revelou que os fatores concentração inicial, volume de amostra e abertura prévia dos frascos não influenciaram significativamente na perda de etanol durante o período de armazenamento.

Palavras chave: Exame de alcoolemia. Perda de etanol. Período de armazenamento. Espectrometria de massas. Forense.

ABSTRACT

Alcoholic beverages are produced and consumed by humans since antiquity. There is an important relationship between the abuse of alcoholic beverages and the occurrence of social problems, such as domestic violence, suicides, homicides, rapes and traffic accidents. Alcohol dosage examination or alcohol analysis, it's an important forensic tool, once it supports crimes elucidation such as driving vehicles under alcohol influence as to determine the *mortis causa* in a likely alcoholic coma. The blood samples used in the alcohol test has loss of ethanol during the storage period and, for this reason, it is necessary to study the factors involved in this phenomenon. From blood sample of three volunteers, three ethanol solutions were developed in concentrations of 10, 20 and 40 dg L^{-1}. The solutions were distributed in blood vacuum tubes in the volumes of 4, 2 and 1 mL and, half of them, were opened before storage at 4ºC, and then analyzed by gas chromatography with mass spectrometry and headspace injection for up to 150 days of storage. None of the 40 dg L^{-1} solution samples had alcohol loss greater than 5% during the experiment, however, in the solutions of 10 e 20 dg L^{-1}, losses higher than 5% were observed. The factorial analysis revealed that the initial concentration factors, sample volume and pre-opening the vials did not have significantly influence in the loss of ethanol during the storage period.

Keywords: Ethanol analysis. Loss of ethanol. Storage period. Mass Spectrometry. Forensic.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 1	Prevalência de consumo de etanol por região geográfica do Brasil	18
Gráfico 2	Número de óbitos absolutos nos sexos masculinos e femininos no período de 2006-2009 por doença alcoólica do fígado	19
Quadro 1	Sinais e sintomas normalmente observados em relação à concentração de etanol no sangue.	25
Figura 1	Representação da separação em três etapas de uma mistura de três substâncias no interior da coluna de uma cromatógrafo gasoso	26
Figura 2	Cromatograma do etanol e isopropanol com os respectivos tempos de retenção	27
Figura 3	Representação simplificada de um equipamento de cromatografia gasosa com espectrometria de massas de ionização eletrônica	28
Figura 4	Espectro de massas do etanol: razão massa/carga (*m/z)* no eixo X e suas respectivas abundâncias no eixo Y	28
Figura 5	Resultado de comparação entre o espectro de massa do etanol registrado conforme TIC e os registrados nas bibliotecas de espectros com o uso do software *NIST MS Search 2.0*	29
Figura 6	Divisão dos tubos de acordo com a concentração e volume após o processo de aliquotagem das amostras	38
Figura 7	Divisão dos tubos de acordo com a concentração e volume após o processo de aliquotagem das amostras	39
Gráfico 3	Concentração de etanol em função do tempo de armazenamento - solução de 40 dg L^{-1} nos volumes de 4 mL (A), 2 mL (B) e 1 mL (C)	43
Gráfico 4	Concentração de etanol em função do tempo de armazenamento - solução de 20 dg L^{-1} nos volumes de 4 mL (A), 2 mL (B) e 1mL (C)	45
Gráfico 5	Concentração de etanol em função do tempo de armazenamento - solução de 10 dg L^{-1} nos volumes de 4 mL (A), 2 mL (B) e 1mL (C)	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Produção de bebidas alcoólicas no Brasil de acordo com o tipo de bebida, percentual de produção e região do país	17
Tabela 2	Comportamento dos motoristas entrevistados, em relação ao consumo de etanol e fatores relacionados ao perfil como condutor	21
Tabela 3	Prevalência de álcool no mês da entrevista entre os estudantes da rede pública de ensino de Porto Alegre	22
Tabela 4	Solução de 40 dg L^{-1}: resultados das análises, perdas acumuladas em dg L^{-1} e percentuais nos tubos lacrados e não lacrados, nos volumes de 4, 2 e 1 mL, durante o período de armazenamento	44
Tabela 5	Solução de 20 dg L^{-1}: resultados das análises, perdas acumuladas em dg L^{-1} e percentuais nos tubos lacrados e não lacrados, nos volumes de 4, 2 e 1 mL, durante o período de armazenamento	46
Tabela 6	Solução de 10 dg L^{-1}: resultados das análises, perdas acumuladas em dg L^{-1} e percentuais nos tubos lacrados e não lacrados, nos volumes de 4, 2 e 1 mL, durante o período de armazenamento	47

LISTA DE ABREVIATURAS

a.C. – antes de Cristo.

CG – cromatografia gasosa.

IC – intervalo de confiança.

dg L^{-1} – decigramas por litro.

DIC – detector por ionização de chamas.

DNA – ácido desoxirribonucleico.

DUI – *driving under influence*.

EM – espectrometria de massas.

FID – *flame ionization detector*.

g/L – gramas por litro.

HS – *headspace*.

IE – ionização eletrônica.

mL – mililitros.

m/z – razão carga/massa.

NaF – fluoreto de sódio.

p. ex. – por exemplo.

RT- *retention time* (tempo de retenção).

TIC – *total ion count*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 16
2.1 Consumo de Etanol: Aspectos Gerais e Sociais 16
2.2 Exame de Alcoolemia: Técnicas e Matrizes Biológicas 26
2.3 Exame de Alcoolemia: Estabilidade das Amostras 32
3. MATERIAL E MÉTODOS 36
3.1 Comitê de Ética 36
3.2 Coleta das amostras 36
3.3 Preparação das Soluções de Etanol e Aliquotagem das Amostras 36
3.4 Controle negativo 39
3.5 Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrômetro de Massa (CG/EM) 40
3.6 Curva de calibração 40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 42
4.1 Controle Negativo 42
4.2 Análise das amostras 42
5. CONCLUSÕES 51
6. REFERÊNCIAS 52

1. INTRODUÇÃO

Antes mesmo da idade moderna as bebidas alcoólicas fermentadas já eram produzidas por diversas sociedades tribais, exceto na Austrália, Oceania e América do Norte (WHO, 2014). A produção de bebidas alcoólicas fermentadas era realizada em escala artesanal nas comunidades onde os excedentes agrícolas estavam disponíveis (WHO, 2014).

Acredita-se, entretanto, que antigas civilizações já consumiam bebidas alcoólicas milhares de anos antes de Cristo. Conforme as tecnologias analíticas vão evoluindo, novos métodos e técnicas estão possibilitando realizar análises mais precisas nos artefatos provenientes das descobertas arqueológicas. No campo da genética, por exemplo, a detecção, amplificação e sequenciamento do material genético encontrado no interior de um dos antigos jarros egípcios que se tem conhecimento, revelou a presença de DNA ribossomal de *Saccharomyces cerevisiae,* um fungo (levedura) fermentador com importante papel nos processos de panificação e produção de cervejas e vinhos (CAVALIERI et al., 2003).

Análises químicas realizadas em artefatos egípcios, como vasos e ânforas, datados de mais de 3.500 a.C., detectaram a presença de ácido tartárico/tartarato de cálcio e de resinas de árvores, indicando que esta antiga civilização provavelmente já produzia e consumia vinho com ervas e resina vegetais (vinhos herbais) em sua medicina tradicional (MCGOVERN et al., 2008).

O consumo de bebidas alcoólicas faz parte de muitas culturas e o seu abuso está comprovadamente relacionado a problemas de saúde e desordens sociais, que atingem não somente o dependente, mas todas as pessoas ao seu redor (WHO, 2014).

Segundo o Primeiro Levantamento Nacional Sobre os Padrões do Consumo de Álcool na População Brasileira, o consumo de álcool nas menores faixas etárias é cada vez mais precoce, sendo que entre os jovens já pode ser considerado um problema de saúde pública (BRASIL, 2007).

De acordo com Wasfi et al., (2004) e Kocak et al., (2015), há uma relação direta entre a quantidade de álcool ingerido e a ocorrência de acidentes. O governo brasileiro estima que anualmente ocorram mais de 350 mil acidentes com vítimas nas

estradas brasileiras, destes, aproximadamente trinta e cinco mil com vítimas fatais e 315 mil com pessoas feridas (BRASIL, 2007). Por outro lado, o pequeno número de pesquisas e a falta de dados estatísticos atualizados sobre o tema, não permite saber com exatidão o número de acidentes de trânsito relacionados ao consumo de bebidas alcoólicas.

Uma pesquisa realizada no Brasil, entretanto, obteve resultados preocupantes: 46,5% dos homens e 13,6% das mulheres informaram ter consumido bebida alcoólica e dirigido ao menos uma vez no último ano, sendo que entre os homens, 8,2% informaram quase sempre dirigir após consumir bebida alcoólica (BRASIL, 2007).

Por ser uma das substâncias mais consumidas ao redor do mundo, razão pela qual é frequente a sua detecção nas análises toxicológicas (ENGELHART; JENKINS, 2001; LEVINE; CAPLAN, 2006).

O exame de quantificação da concentração de etanol no sangue, chamado de exame de dosagem alcoólica ou simplesmente exame de alcoolemia, é utilizado para esclarecer fatos de extrema importância nos casos forenses, que vão desde a comprovação da *causa mortis* (p. ex. coma alcoólico), até a constatação de infrações administrativas e penais, como a direção de veículos sob a influência de álcool (KOCAK et al., 2015).

A Cromatografia Gasosa (CG) acoplada ao detector por ionização de chamas (DIC), ou do inglês FID (*Flame Ionization Detector*), é considerada a técnica "*gold standard"* para o exame de alcoolemia e de outros solventes voláteis em amostras biológicas. O uso do detector por espectrometria de massas (EM), por sua vez, garante bons resultados, com a vantagem de possibilitar a identificação inequívoca das substâncias (WASFI et al., 2004).

A cromatografia gasosa é uma técnica que possibilita analisar misturas com dezenas de substâncias, mesmo que estejam em concentrações muito baixas (COLLINS et al., 2014). Quando utilizada a extração por *headspace* (HS), sistema de injeção que promove a extração das substâncias mais voláteis por aquecimento controlado da amostra, a cromatografia gasosa permite a análise do etanol e outros compostos voláteis com rapidez e simplicidade (BORDIN et al., 2015).

Na rotina forense as amostras periciadas devem ser armazenadas como contraprova (BRASIL, 1941). Nas perícias laboratoriais em amostras biológicas, restrições decorrentes dos procedimentos de coleta, assim como a própria condição

do periciado, sejam em cadáver ou vivo, por vezes impõem limitações que resultam na obtenção de pequeno volume de sangue e outras matrizes biológicas.

Entretanto, mesmo quando o volume disponível de amostra é pequeno e não há disponibilidade exclusiva para a contraprova, o analista deve realizar os exames e em seguida armazenar o material periciado. Em teoria, caso seja solicitada a reanálise do material, este deve estar em condições para que os resultados obtidos inicialmente possam ser confirmados.

As matrizes biológicas (sangue, urina e fluidos corporais), por se tratarem de compostos perecíveis, estão sujeitos a diversos fenômenos naturais que resultam em sua degradação, e por consequência, podem prejudicar o exame de contraprova.

Estudos sobre o tempo e temperatura de armazenamento das amostras biológicas demonstraram que as variáveis pré-analíticas exercem influência significativa na diminuição da concentração de etanol com o passar do tempo. (OLSEN; HEARN, 2003; PETKOVIC et al., 2008; KOCAK et al., 2015).

A maioria dos pesquisadores, entretanto, avaliou a perda de etanol em amostras biológicas armazenadas em longo ou curto período de tempo, sem considerar de maneira controlada a influência de variáveis comuns observadas na rotina forense, a citar, o volume de amostra armazenada e a concentração inicial de etanol.

No estado do Acre, assim como em diversos estados brasileiros, a realização do exame de alcoolemia é um procedimento operacional padrão em todos os cadáveres, independentemente da causa da morte. Vítimas de estupro, pessoas envolvidas em acidentes de trânsito e outros, também realizam o exame de alcoolemia quando há a solicitação judicial e o consentimento do periciado. Ainda que a legislação brasileira determine a guarda de amostra para o exame de contraprova, não existe regulamentação oficial quanto ao período de estocagem destas amostras.

O desconhecimento da influência que algumas variáveis exercem sobre a perda de etanol durante o período de armazenamento, tem forçado alguns laboratórios forenses a armazenar as amostras do exame de dosagem alcoólica por longos períodos de tempo, mesmo após não estarem mais viáveis analiticamente.

Em razão do exposto, torna-se importante a realização de uma pesquisa que possibilite determinar o período de viabilidade das amostras de sangue armazenadas como contraprova para o exame de alcoolemia. Para tanto, neste estudo serão consideradas as influências de variáveis comuns observadas no Instituto de Análises

Forenses – IAF do Departamento Técnico Científico da Polícia Civil do Estado do Acre, além de outras ainda pouco estudadas, como a concentração inicial de etanol e o volume de amostra, sobre a perda de álcool etílico durante o período de armazenamento.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Consumo de Etanol: Aspectos Gerais e Sociais

O etanol ou álcool etílico é uma substância utilizada ao redor do mundo para as mais diversas finalidades. De produção relativamente simples, o etanol pode ser obtido por meio da fermentação do mosto da cana de açúcar, milho, beterraba, batata e outros produtos de origem vegetal ricos em carboidratos. Com o avanço da biotecnologia também se demonstrou ser possível produzir etanol até mesmo a partir da celulose (YANASE et al., 2010).

O uso do etanol como combustível é de grande importância comercial e ecológica, mercado no qual o Brasil se destaca como um dos maiores produtores mundiais. Visando reduzir o gasto com a produção de gasolina, em meados da década de 1970 o governo brasileiro lançou o Programa Nacional do Álcool, ou Proálcool, que atraiu investimentos do setor privado e viabilizou a produção de álcool em escala comercial. A motivação do governo para lançar o Proálcool foi o alto custo do petróleo, cuja importação na época representava mais de 80% do petróleo consumido (LEITE; LEAL, 2007).

A produção das bebidas alcoólicas mais tradicionais também é um processo que envolve a fermentação de carboidratos. A etapa de fermentação é um procedimento realizado com o uso de microrganismos fermentadores, normalmente cepas selecionadas de uma das leveduras mais estudadas no mundo, o *Saccharomyces cerevisiae.* No processo de fermentação, as células da levedura metabolizam açúcares, como glicose e maltose, e produzem dióxido de carbono e álcool etílico (PALMER, 2006).

Inúmeros tipos de bebidas classificadas como bebidas alcoólicas, destiladas e não destiladas, possuem álcool etílico em sua composição, em percentuais que podem variar, segundo a legislação brasileira, de 0,5% até mais de 54% de etanol (BRASIL, 2009).

As bebidas alcoólicas de maior concentração passam por processo de destilação após o processo fermentativo, cujo objetivo é separar o etanol da água para se obter um produto com a concentração adequada do álcool. Em geral as

cervejas apresentam concentração alcoólica entre 4% e 6%, os vinhos entre 10% e 15% e as bebidas destiladas em torno de 40% (GOODMAN; GILMAN, 2010).

A produção de bebidas no Brasil apresenta números expressivos, representando um importante setor na economia do país. A produção de cerveja é o segundo maior do segmento, ficando atrás somente dos refrigerantes (CERVIERI JUNIOR et al., 2014).

Um fator que contribuiu com a expansão da indústria de bebidas no Brasil foi a grande disponibilidade de água, importante matéria prima na produção das bebidas. Este fato permitiu a fabricação destes produtos em todas as regiões do território nacional (Tabela 1), viabilizando a construção das fábricas próximas de seus principais mercados consumidores (CERVIERI JUNIOR et al., 2014).

Tabela 1 - Produção de bebidas alcoólicas no Brasil de acordo com o tipo de bebida, percentual de produção e região do país

Segmentos	**Produção Regional (%)**					**Total (%)**
	Norte	**Nordeste**	**Sudeste**	**Sul**	**Centro-Oeste**	
Fabricação de aguardentes e outras bebidas destiladas	0	54	38	6	1	99
Fabricação de vinho	2	13	25	60	0	100
Fabricação de malte, cervejas e chopes	5	23	48	10	14	100
Fabricação de águas envasadas	6	36	37	12	9	100
Fabricação de refrigerantes e de outras bebidas não alcoólicas	8	24	44	12	11	99

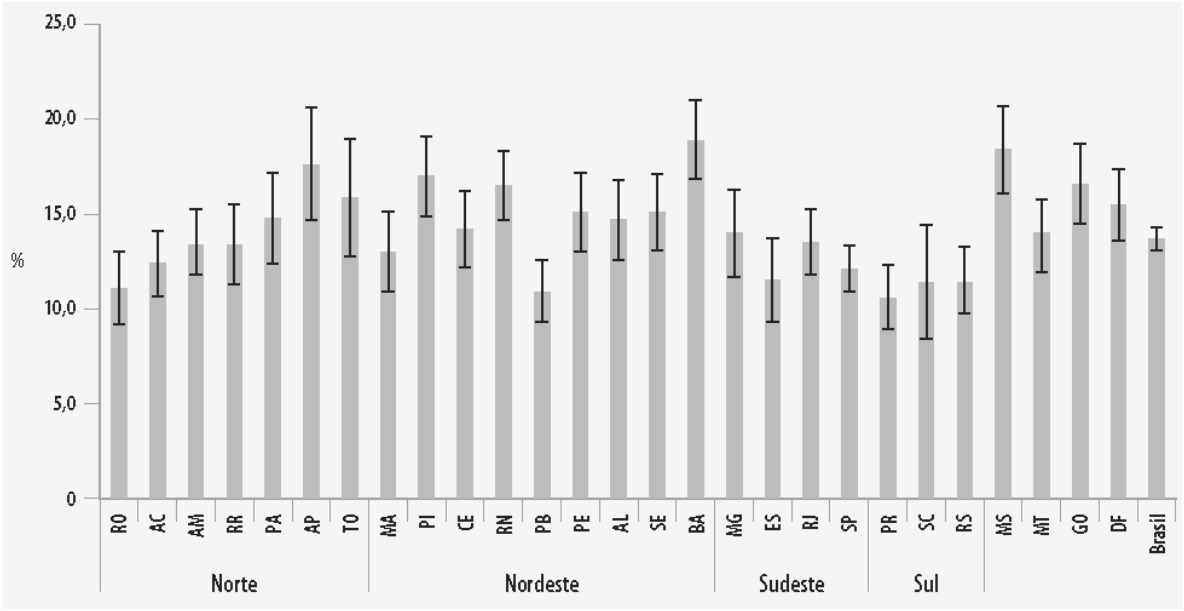
Fonte: (adaptação de CERVIERI JUNIOR et al., 2014).

No Brasil o consumo e comércio de bebidas alcóolicas são permitidos por lei, e em razão disso, as bebidas estão amplamente disponíveis para todos os cidadãos maiores de 18 anos de idade.

Embora o etanol tenha inúmeras aplicações, com destaque como combustível, principalmente para o uso em veículos automotores, seu uso como alimento, na forma de bebidas alcoólicas, talvez seja o mais conhecido e ao mesmo tempo controverso, em razão dos problemas sociais relacionados ao uso abusivo das bebidas alcoólicas.

Garcia e Freitas (2015) realizaram um estudo com a população brasileira adulta onde avaliaram a prevalência do consumo abusivo de álcool (consumo abusivo: ≥ 30 gramas/dia para os homens e ≥ 24 gramas/dias para as mulheres). Os autores constataram que 13,7% dos entrevistados se classificavam na faixa de consumo abusivo, com prevalência mais elevada entre os adultos jovens, afrodescendentes ou indígenas, fumantes, e, curiosamente, pessoas que avaliaram sua própria saúde como boa ou muito boa. Quando avaliado o perfil do consumo por regiões, as unidades da federação com maior prevalência de consumo foram: Bahia, Mato Grosso do Sul e Amapá (Gráfico 1).

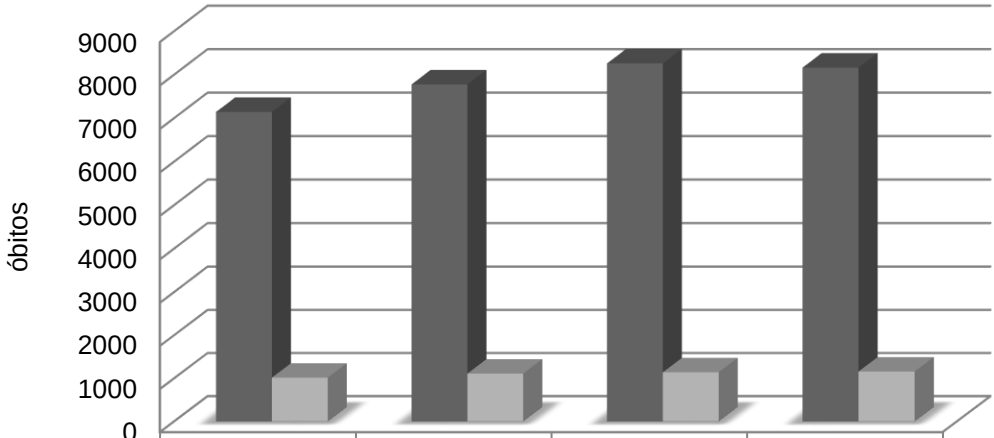
Gráfico 1 – Prevalência de consumo de etanol por região geográfica do Brasil



Fonte: (GARCIA; FREITAS, 2015).

Estudos indicam que a taxa de mortalidade relacionada ao abuso de álcool entre os homens é muito superior ao das mulheres. No Brasil, entre os anos de 2006 a 2009, se considerados somente os óbitos decorrentes de doença alcóolica do fígado, a taxa de mortalidade média entre os homens foi de 4,2 para cada 100.000 habitantes, enquanto que entre as mulheres a taxa foi de 0,6/100.000 (ACSELRAD et al., 2012). Em números absolutos, conforme Acselrad et al., (2012), no mesmo período, a média de óbitos decorrente de doença alcóolica hepática foi de 7.833±506 homens e 1.104±64 mulheres (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Número de óbitos absolutos nos sexos masculino e feminino no período de 2006-2009 por doença alcoólica do fígado



	2006	2007	2008	2009
Homens	7141	7774	8256	8159
Mulheres	1013	1108	1138	1156

Fonte: (ACSELRAD et al., 2012).

O abuso de álcool também está associado com a ocorrência de centenas de doenças, além de outros problemas, dos quais podemos citar lesões não intencionais e intencionais, incluindo-se aquelas decorrentes de acidentes de trânsito, violências e suicídios (GARCIA; FREITAS, 2015).

A influência do álcool sobre o risco de lesões varia de acordo com o sexo, quantidade consumida, idade e até mesmo com o tipo de injúria. O risco das lesões aumenta com o aumento da idade, visto que entre os mais velhos, as lesões mais comuns associadas ao consumo de álcool, são os acidentes de trânsito e quedas (CLAUSEN et al., 2015).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (2006), o consumo de álcool em grandes concentrações é o principal motivador de violência entre parceiros íntimos. As mulheres vítimas de violência doméstica sofrem sérios problemas de saúde além do próprio dano físico, podendo levar a complicações na gravidez e até abortos, mas também, problemas emocionais, como depressão e até mesmo a indução do suicídio (WHO, 2006).

O consumo abusivo de álcool e outras drogas estão comprovadamente relacionados com o comportamento suicida. Pesquisas realizadas no Brasil e em diversos outros países estimaram que aproximadamente 1/3 dos suicidas apresentaram resultados positivos no exame de alcoolemia (JONES et al., 2013; GONÇALVES et al., 2015). Em estudo retrospectivo de 10 anos (2001 a 2010),

realizado por Jones et al., (2013), a presença de álcool no sangue dos suicidas foi positivo em 30% dos casos de suicídio por enforcamento e 36% dos casos de suicídio por envenenamento.

Campos et al., (2013) realizaram um estudo com 4.182 motoristas da região Sudeste do Brasil, onde destes, mais de um terço dos entrevistados relatou já ter se envolvido em um acidente de trânsito. Curiosamente, a mesma proporção dos entrevistados, ou seja, um terço deles, também relatou ter consumido bebida alcoólica no dia da entrevista. No mesmo estudo, aproximadamente metade dos motoristas informou beber semanalmente ou diariamente. A tabela 2 resume o comportamento dos motoristas entrevistados em relação ao consumo de bebidas alcoólicas.

Tabela 2 - Comportamento dos motoristas entrevistados, em relação ao consumo de etanol e fatores relacionados ao perfil como condutor

Variável	N = 4.182 Indivíduos		95% IC[1]
	Respostas	N (%)	
Bebeu no dia da entrevista	Sim	1232 (29,5)	28,5-31,7
	Não	2921 (70,4)	59,0-71,8
Acidente de trânsito	Sim	1404 (33,7)	32,3-35,1
	Não	2757 (55,3)	54,9-57,7
Bebe com que frequência	Nunca	1081 (25,7)	0,3-0,3
	Diariamente	121 (3,0)	2,5-3,5
	Toda semana	1848 (45,5)	44,1-47,1
	Todo mês	252 (5,2)	5,5-5,9
	Esporadicamente	747 (18,4)	17,2-19,5
Bebidas	Cerveja	2259 (54,3)	52,8-55,8
	Vinho	429 (10,3)	9,4-11,2
	Destilados	215 (5,2)	4,5-5,9
	Cachaça	98 (2,3)	1,8-2,8
	Drinks (batidas)	4,8 (1,1)	0,8-1,4
Infrações de trânsito	Avançar sinal vermelho	409 (9,9)	9,0-10,8
	Acima do limite de velocidade	488 (11,8)	10,8-12,8
	Influência de álcool	2809 (57,9)	55,5-59,3
	Sem equipamento de segurança	58 (1,5)	1,2-2,0
	Manobra perigosa	170 (4,1)	3,5-4,7
	Dirigir no acostamento	1,9 (0,5)	0,3-0,7
	Veículo em más condições	5,7 (1,5)	1,2-2,0
	Outras	108 (2,5)	2,1-3,1
Dirigir após beber	Dirijo após beber um café	151 (4,5)	3,9-5,1
	Dirigir após beber não é um problema	314 (8,9)	8,0-9,8
	Dirijo melhor após beber álcool	55 (1,5)	1,2-2,0
	Não dirijo	739 (20,9)	19,7-22,1
	Peço para outra pessoa dirigir	1448 (40,9)	39,4-42,4
	Dirijo devagar	183 (5,2)	4,5-5,9
	Nunca bebo muito	572 (15,1)	15,0-17,2
	Outras	71 (2,0)	1,5-2,4
Atitude diante do teste do bafômetro	Favorável	3809 (91,8)	91,0-92,5
	Não favorável	339 (8,2)	7,4-9,0
Avaliação do entrevistador quanto a condição do entrevistado	Normal	3455 (85,1)	84,0-85,2
	Sob influência de álcool, mas não bêbado	415 (10,2)	9,3-11,1
	Bêbado	191 (4,7)	4,1-5,3

[1]IC – Intervalo de confiança

Fonte: (adaptação de CAMPOS et al., (2013).

O consumo de etanol entre as crianças e adolescentes também é motivo de preocupação no Brasil. Conforme Moreira et al., (2008) verificaram, por meio de uma pesquisa realizada em escolas públicas da região de Porto Alegre, o álcool era utilizado por mais de 50% dos adolescentes com faixa etária entre 14 e 19 anos e por quase 20% dos adolescentes com faixa etária entre 10 a 13 anos (Tabela 3).

Tabela 3 - Prevalência de álcool no mês da entrevista entre os estudantes da rede pública de ensino de Porto Alegre

Característica	Geral (n = 1830)	Meninas (n= 968)	Meninos (n= 862)
Faixa etária dos adolescentes			
10 a 13 anos	818 (45%)	451 (47%)	367 (43%)
14 a 19 anos	1.012 (55%)	517 (53%)	495 (57%)
Escolaridade			
Ensino fundamental	1.314 (72%)	685 (71%)	629 (73%)
Ensino médio	516 (28%)	283 (29%)	233 (27%)
Infraestrutura do bairro			
Boa	826 (45%)	425 (44%)	401 (47%)
Ruim	1.004 (55%)	543 (56%)	461 (54%)
Vitimização moderada[1,2]			
Sim	712 (43%)	327 (37%)	385 (50%)
Não	951 (57%)	564 (63%)	387 (50%)
Vitimização grave[1,3]			
Sim	168 (10%)	74 (8%)	94 (11%)
Não	1.459 (90%)	807 (91%)	652 (76%)
Uso de álcool no mês[1]			
Sim	705 (39%)	379 (40%)	326 (38%)
Não	1.094 (61%)	572 (60%)	522 (61%)
Embriaguez no mês[1]			
Sim	214 (12%)	114 (12%)	100 (12%)
Não	1.598 (88%)	850 (88%)	748 (88%)

[1]Alguns entrevistados não responderam às questões referentes às variáveis vitimização moderada e grave, uso de álcool e embriaguez no mês.

[2]Vitimização moderada refere-se a "eu estava em casa quando alguém a invadiu; eu fui apanhado, detido ou levado pela polícia; eu fui ameaçado com dano físico grave por alguém; eu apanhei ou fui assaltado".

[3]Vitimização grave refere-se a "eu fui sexualmente atacado ou molestado; eu fui atacado ou apunhalado com uma faca ou machucado em incidente de violência; eu recebi um tiro de revólver".

Fonte: (MOREIRA et al., 2008).

Entre o grupo de estudantes que relataram consumir bebida alcoólica, constataram-se duas vezes mais chances de vitimização grave quando comparado

ao grupo que relatou não consumir bebida alcoólica. Considerou-se vitimização grave os episódios de violência sexual e violência física com o uso de arma de fogo e arma branca. Os dados apresentados foram coletados no ano de 2003, durante o V Levantamento Nacional Sobre Uso de Drogas Psicotrópicas.

2.2 Farmacologia e toxicologia do etanol

O etanol, ou álcool etílico, é um líquido miscível em água, límpido, incolor, higroscópico, altamente inflamável, com ponto de ebulição em torno de 78ºC (CLARKE´S, 2005). Apresenta estrutura química formada por grupo polar (hidroxila - OH) na região terminal e um grupo apolar formado de dois átomos de carbono, sendo, portanto, um álcool primário.

O uso crônico de bebidas alcoólicas está relacionado com diversos problemas de saúde, muitos deles irreversíveis mesmo com a interrupção do consumo. Os efeitos farmacológicos mais importantes do etanol são observados sobre os sistemas nervoso central, cardiovascular e gastrintestinal, e não por acaso, são nesses sistemas onde ocorre a maioria das doenças (GOODMAN; GILMAN, 2010).

Após o consumo, o etanol é prontamente absorvido pelo estômago e intestino delgado, sendo a concentração máxima sanguínea obtida aproximadamente meia hora após a ingestão (GOODMAN; GILMAN, 2010).

A presença de alimentos no estômago reduz a velocidade de absorção do etanol. Neste aspecto, é necessária a ingestão de grandes quantidades para a produção de efeitos fisiológicos, fazendo com que as bebidas alcoólicas sejam consumidas mais como alimento que como droga (GOODMAN; GILMAN, 2010).

De maneira geral o etanol é consumido como estimulante, e embora exerça efeito em diversos sistemas do organismo, seu efeito principal é de depressor do sistema nervoso central (GOODMAN; GILMAN, 2010; RANG et al., 2012).

Os primeiros efeitos da ingestão de etanol podem ser observados com concentração plasmática de apenas 0,46 dg L^{-1}, mas pode ser fatal em concentração 10 vezes superior (RANG et al., 2012). Talvez a maior problemática dos efeitos do etanol sobre o corpo humano seja a alteração dos controles motor e cognitivo,

entretanto, os indivíduos alcoolizados geralmente não percebem o comprometimento dos sentidos (RANG et al., 2012).

Apesar de apresentar ação menor e menos consistente que o dos benzodiazepínicos, o etanol apresenta efeito semelhante, pois potencializa o efeito do neurotransmissor ácido gama-aminobutírico (GABA) sobre os receptores $GABA_A$ (RANG et al., 2012).

Os efeitos da intoxicação aguda por etanol são bem conhecidos (Quadro 1), caracterizando-se por alterações comportamentais e físicas, que variam de indivíduo para indivíduo. Com o aumento da concentração sanguínea, os efeitos comportamentais vão da euforia e extroversão, a melancolia, submissão, agressividade, etc. (GOODMAN; GILMAN, 2010; RANG et al., 2012). A intoxicação aguda por etanol apresenta grande potencial letal por parada respiratória quando a concentração plasmática atinge em torno de 50 dg L^{-1} (RANG et al., 2012).

Quadro 1 – Sinais e sintomas normalmente observados em relação à concentração de etanol no sangue

DOSAGEM ALCOOLICA (dg L^{-1})	SINAIS E SINTOMAS
1,0-5,0	Comprometimento leve da fala, memória, atenção e coordenação; Sonolência leve; Sensação de relaxamento.
6,0-15,0	Aumento da sensação de relaxamento; Aumento do risco de agressividade; Alteração na fala, memória, coordenação, e equilíbrio moderadamente prejudicados; Perda significante da habilidade de dirigir; Aumento do risco de se machucar ou machucar a outras pessoas.
16,0-30,0	Comprometimento severo da memória, coordenação, atenção, tempo de reação e equilíbrio; Perda severa da habilidade de dirigir; Capacidade de julgamento e tomada de decisões severamente prejudicadas; Amnésia; Vômitos e outros sinais de intoxicação por etanol; Perda da consciência.
31,0-45,0	Perda da consciência; Risco de intoxicação fatal; Risco de parada respiratória; Coma e morte.

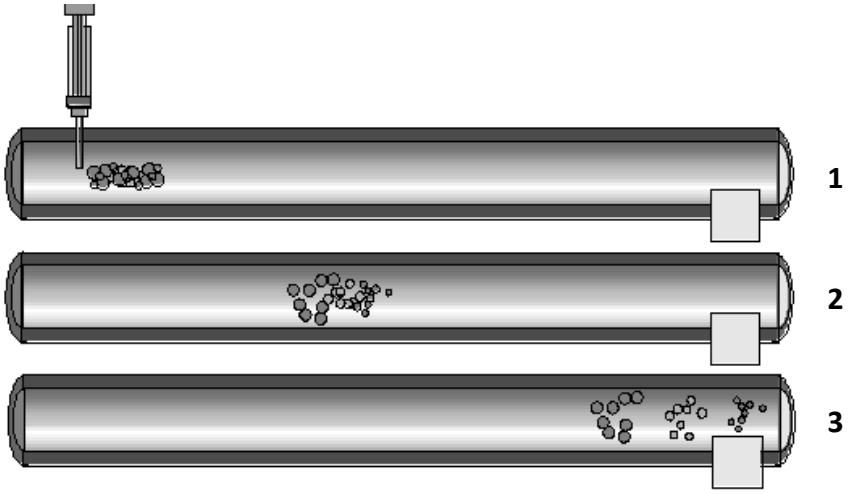
Fonte: (adaptação de NIAAA, 2015).

2.2 Exame de Alcoolemia: Técnicas e Matrizes Biológicas

A cromatografia gasosa (CG) é uma técnica analítica aplicável a um enorme número de substâncias na indústria farmacêutica, na toxicologia, química, em análises ambientais, entre outras áreas (CLARKE´S, 2006). Trata-se de uma técnica com alto poder de resolução e alta sensibilidade, que em alguns casos, possibilita a separação e análise de misturas com dezenas de substâncias (COLLINS et al., 2014).

A separação das misturas é realizada em uma coluna cromatográfica, que contém em seu interior uma fase estacionária, por onde flui continuamente a fase móvel, normalmente um gás inerte como o hélio ou hidrogênio (POOLE, 2003; CLAKE´S, 2006; COLLINS et al., 2014). O esquema apresentado na Figura 1 demonstra simplificadamente o processo de separação por cromatografia gasosa em três etapas (1- injeção; 2- separação das substâncias; 3- substâncias separadas).

Figura 1 - Representação da separação em três etapas de uma mistura de três substâncias no interior da coluna de uma cromatógrafo gasoso



Fonte: (http://chemsite.lsrhs.net/Intro/chromatography.html).

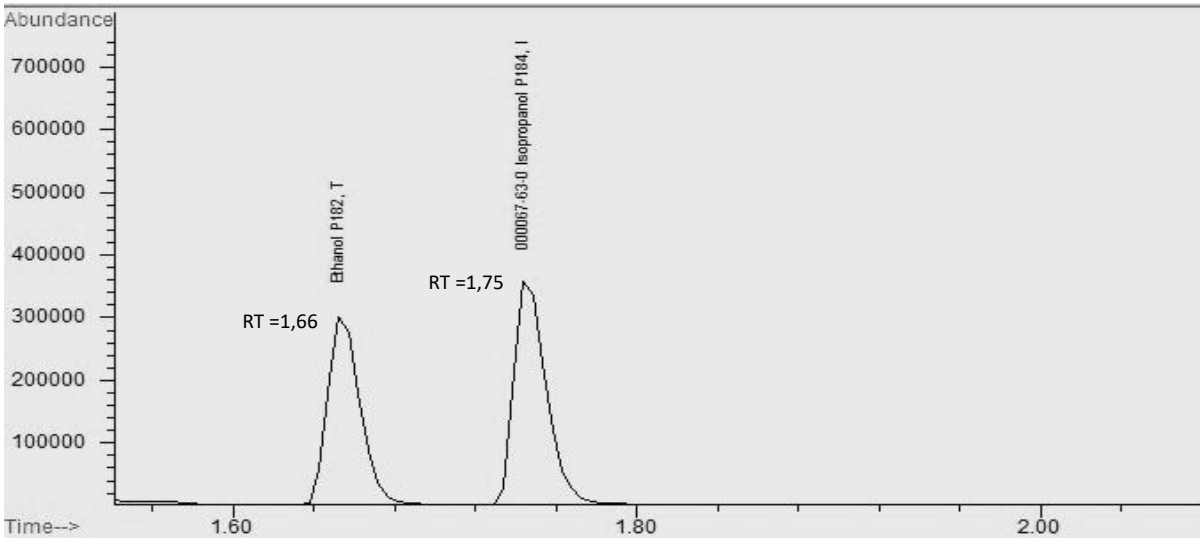
Quando uma mistura de substâncias é analisada por CG, cada componente, devido as interações químicas, “divide-se” entre a fase estacionária e a fase móvel, enquanto é arrastada para o detector. Substâncias que têm maior afinidade química com a fase estacionária passam mais tempo retidas no interior da coluna, e, consequentemente, levam mais tempo para chegar ao detector (CLARKE´S, 2006).

O tempo que uma substância consome para percorrer a coluna cromatográfica e chegar ao detector é denominado de “Tempo de Retenção” (RT –

do inglês *Retention Time*). O detector produz um sinal proporcional à quantidade de substância que passa através dele, e este sinal é processado e apresentado na forma de um gráfico, denominado cromatograma (CLARKE´S, 2006). É importante ressaltar que o tempo de retenção de uma substância, ainda que repetidamente injetada em um mesmo sistema, sofre a influência de inúmeras variáveis, especialmente do tipo de injeção, pressão ou fluxo do gás de arraste, temperatura, entre outras.

Na Figura 2 é possível visualizar o cromatograma do etanol e isopropanol no exame de dosagem alcóolica.

Figura 2 - Cromatograma do etanol e isopropanol com os respectivos tempos de retenção



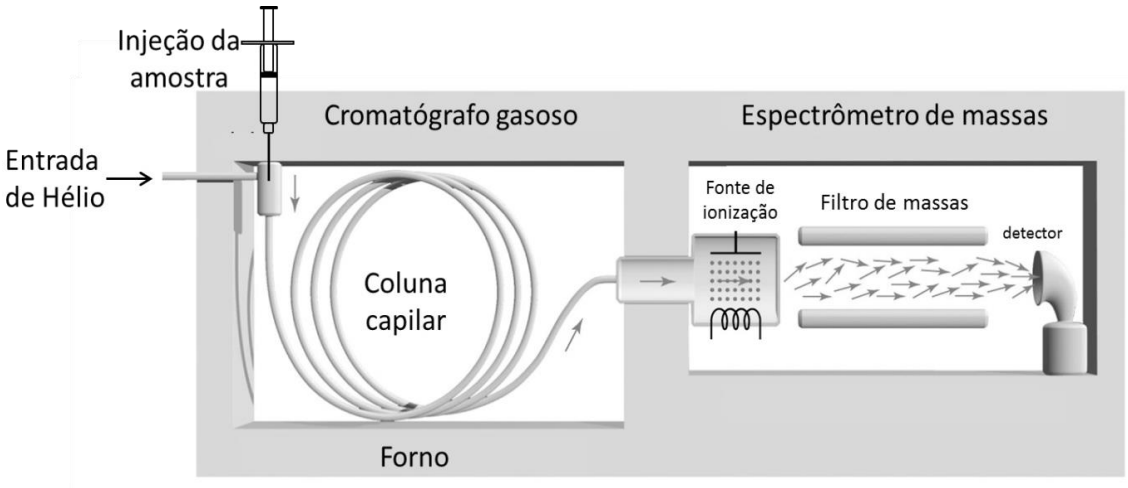
Fonte: (produção própria).

Quando a CG está acoplada ao detector por ionização de chamas (FID), é considerada a técnica de escolha para o exame de alcoolemia, pois apresenta excelente sensibilidade e repetibilidade dos resultados (WASFI et al., 2004). A utilização do detector por Espectrometria de Massas (EM) acoplada a cromatografia gasosa (Figura 3), apesar de ainda pouco utilizado para esta finalidade, em razão do alto custo de aquisição e manutenção do equipamento, apresenta excelentes resultados com algumas vantagens sobre o FID.

Normalmente os espectrômetros de massas de baixa resolução promovem a ionização das moléculas por dois processos: reação química ou por impacto de elétrons, este também conhecido por ionização eletrônica (IE). A IE ocorre por meio

de um filamento de tungstênio ou rênio aquecido, geralmente fornecendo energia na ordem de 70 eV (Figura 3) (COLLINS, 2014).

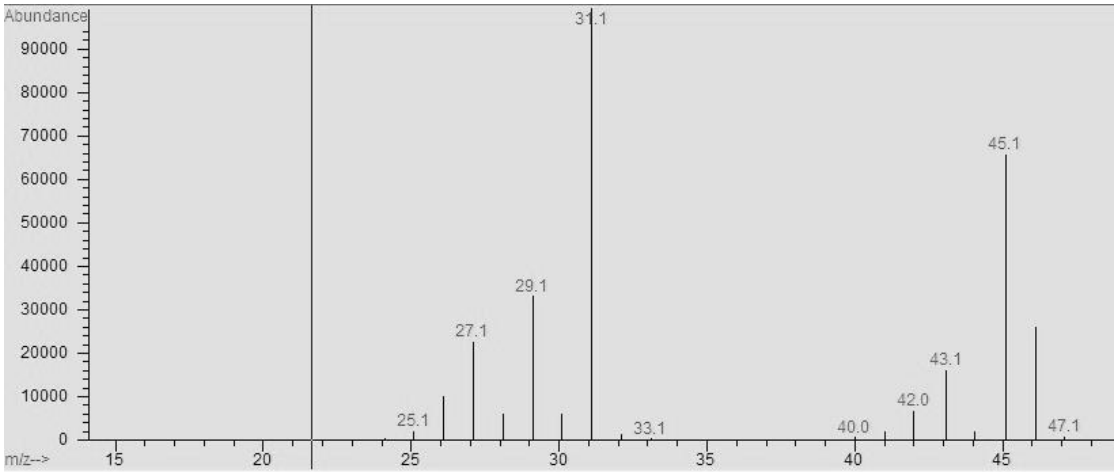
Figura 3 - Representação simplificada de um equipamento de cromatografia gasosa com espectrometria de massas de ionização eletrônica



Fonte: (adaptação de http://chemsite.lsrhs.net/Intro/chromatography.html)

Ao final do processo de ionização, os íons são identificados e quantificados no detector utilizando a relação carga/massa (*m/z*) que são registrados em um gráfico de TIC (*total ion current, total ion count* ou *total ion chromatogram).* O software transforma o gráfico TIC em outro, denominado de espectro de massa, expressando no eixo X a razão massa/carga (*m/z*) dos íons e no eixo Y as respectivas abundâncias, como mostra a figura 4 do espectro de massas do etanol.

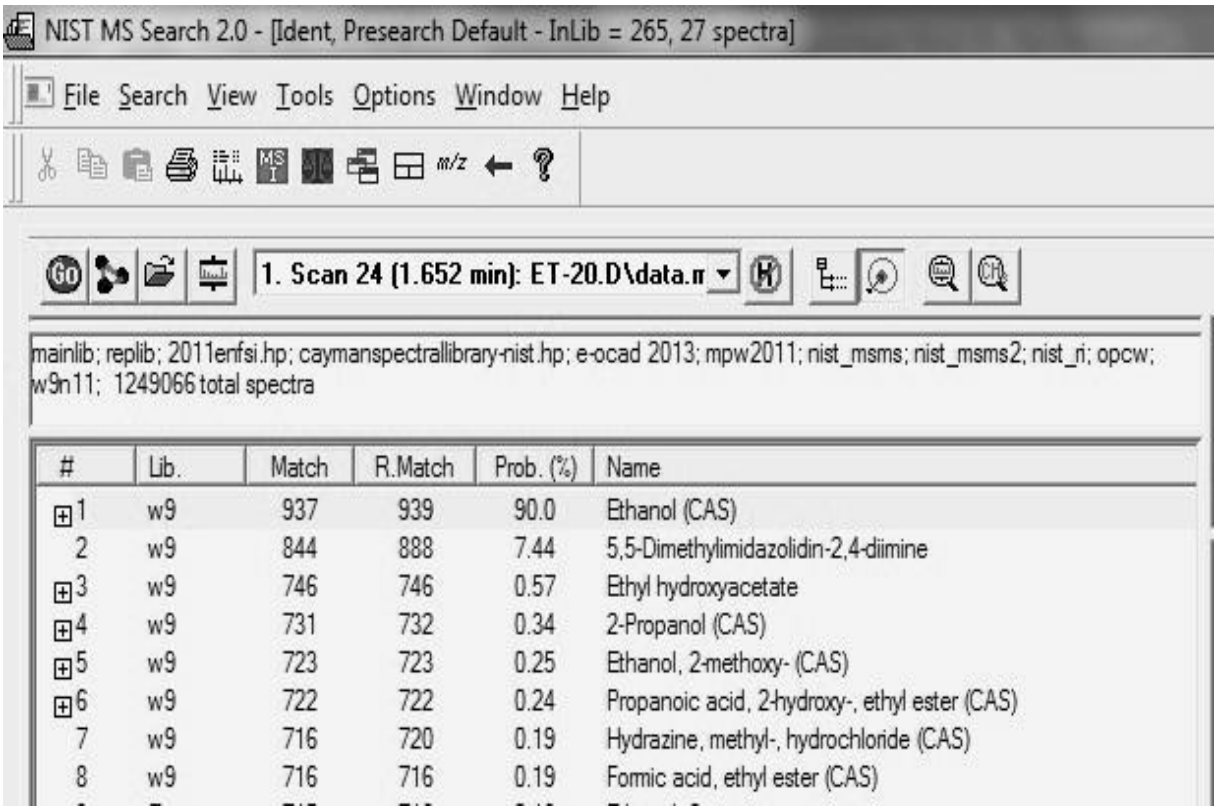
Figura 4 – Espectro de massa do etanol: razão massa/carga (*m/z)* no eixo X e suas respectivas abundâncias no eixo Y



Fonte: (produção própria).

Após a obtenção do gráfico TIC, é possível fazer a comparação com uma ou mais bibliotecas de espectros de massas. As bibliotecas estão disponibilizadas na forma de bancos de dados, e permitem a comparação dos resultados das análises com os arquivos da biblioteca, com o intuito de realizar a identificação das substâncias analisadas. A figura 5 mostra o resultado da comparação do gráfico TIC do etanol com algumas bibliotecas, utilizando o software *NIST MS Search 2.0*.

Figura 5 - Resultado de comparação entre o espectro de massa do etanol registrado conforme TIC e os registrados nas bibliotecas de espectros com o uso do software *NIST MS Search 2.0*



#	Lib.	Match	R.Match	Prob. (%)	Name
1	w9	937	939	90.0	Ethanol (CAS)
2	w9	844	888	7.44	5,5-Dimethylimidazolidin-2,4-diimine
3	w9	746	746	0.57	Ethyl hydroxyacetate
4	w9	731	732	0.34	2-Propanol (CAS)
5	w9	723	723	0.25	Ethanol, 2-methoxy- (CAS)
6	w9	722	722	0.24	Propanoic acid, 2-hydroxy-, ethyl ester (CAS)
7	w9	716	720	0.19	Hydrazine, methyl-, hydrochloride (CAS)
8	w9	716	716	0.19	Formic acid, ethyl ester (CAS)

Fonte: (produção própria).

As bibliotecas são produzidas por instituições que visam gerar padrões analíticos de espectros de massas, como a *National Institute of Standards and Technology* (NIST) e a Cayman Chemical. A comparação com as bibliotecas de espectros possibilita que o analista identifique, mesmo que preliminarmente, boa parte das substâncias analisadas. Levando-se em conta somente o exame de alcoolemia, isso significa que outras substâncias voláteis de interesse forense (além do próprio etanol) podem ser detectadas simultaneamente, sem a necessidade de análises complementares.

Wasfi et al., (2004) desenvolveram um método de análise quantitativa de etanol e identificação de inalantes orgânicos em amostras biológicas por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas. O método desenvolvido com injeção por *headspace* (HS) obteve coeficiente correlação de 0,99 na curva padrão (pontos de 5, 50, 100 e 150 mg dL^{-1}) e não sofreu qualquer tipo de interferência com metabólitos endógenos presentes no sangue. Além disso, apresentou excelente resolução de separação do etanol e outros solventes orgânicos voláteis, como acetaldeído, metanol, acetona e n-propanol, demonstrando ser um método robusto e muito eficiente para o propósito.

Tiscione (2011) desenvolveu outro método de análise quantitativa de etanol em amostras de sangue utilizando cromatografia gasosa e dois tipos de detectores, FID (*Flame Ionization Detector* ou Detector por Ionização de Chama) e EM (Detector de Massa) simultaneamente. O método desenvolvido trouxe a vantagem da identificação inequívoca do álcool etílico em apenas uma etapa, visto que após a injeção por *headspace* a amostra foi dividida em duas alíquotas, que seguiram separadas por duas colunas cromatográficas de polaridade diferentes, uma acoplada ao FID e outra ao EM.

O exame de dosagem alcoólica pode ser realizado em diversas matrizes biológicas (PAPIERZ et al., 2004). Na rotina forense, determinadas situações requerem a análise em diferentes fluidos corpóreos, seja pela indisponibilidade ou inviabilidade da análise em sangue, ou para comparação dos resultados. Em análises de matrizes biológicas coletadas *post mortem,* por exemplo, a presença de putrefação ou mesmo a indisponibilidade de sangue no cadáver, obrigam o analista a realizar as análises em matrizes alternativas, como humor vítreo, líquor, urina (análise qualitativa), entre outras.

Gubala e Zuba (2002) realizaram a análise comparativa da alcoolemia na saliva, sangue e ar pulmonar por CG/FID, verificando boa correlação entre a concentração de etanol na saliva e sangue arterial.

Estudos prévios realizados por Engelhart e Jenkins (2001), entretanto, encontraram baixa correlação entre os resultados obtidos por cromatografia gasosa e o dispositivo QED®[1] em saliva, sangue e humor vítreo. Talvez a descoberta mais importante da pesquisa não tenha sido a baixa correlação entre as diferentes técnicas

[1] QED é um dispositivo de análise quantitativa de etanol na saliva de baixa resolução, de metodologia baseada na atividade da enzima álcool desidrogenase.

avaliadas, mas sim a impossibilidade da realização da análise na saliva de 23 dos 50 cadáveres utilizados no estudo, visto que em razão do alto grau de desidratação da mucosa oral, não havia amostra suficiente para as análises.

A urina é uma matriz importante na toxicologia forense, normalmente utilizada para pesquisa de venenos e drogas. Em razão da baixa correlação entre a concentração de etanol no sangue e urina, o resultado da análise nesta matriz não deve ser utilizado como substituto ao exame de alcoolemia sanguínea (JONES; ERICSSON, 2016). Por este motivo, normalmente o exame de alcoolemia na urina tem caráter apenas qualitativo. Trata-se, entretanto, de uma matriz de difícil contaminação, com menor possibilidade de formação de etanol *post mortem*, mas devida à baixa correlação com a alcoolemia sanguínea, a análise nesta matriz serve apenas como indicativo do consumo e da fase de metabolização do álcool *ante mortem*.

A análise de alcoolemia em humor vítreo é a mais estudada depois do sangue. O humor vítreo é uma matriz periférica presente no olho, de fácil obtenção e pouco susceptível a contaminação, entretanto, por razões obvias, tem importância somente em análises *post mortem*: não há maneira segura de coletar essa matriz em indivíduos vivos sem o comprometimento dos olhos.

Papierz (2004) realizou estudos comparativos da concentração de álcool etílico em humor vítreo, sangue e urina. As amostras de humor vítreo, sangue e urina foram coletadas de cadáveres durante o procedimento da autópsia e então analisadas por cromatografia gasosa. Os resultados obtidos neste estudo reforçaram estudos anteriores, demonstrando haver grande relação entre a concentração de álcool etílico no humor vítreo e sangue. Na segunda fase do estudo, as análises em urina serviram para descobrir em que momento da metabolização do álcool se deu a morte da vítima, se na fase de absorção, final da fase de absorção e início da fase de excreção ou na fase de excreção. Uma nova análise estatística foi realizada, separando os resultados em dois grupos, em função da fase de metabolização do álcool no momento da morte da vítima, sendo n=55 da fase de absorção e n=435 da fase de excreção. 10 amostras não fizeram parte desta análise pois a concentração de álcool no sangue era a mesma da urina. A correlação na fase de absorção entre humor vítreo/sangue foi de R=0,91 e na fase de excreção R= 0,94.

Honey (2005), também realizou a análise comparativa da concentração de etanol em amostras de sangue e humor vítreo, encontrando a relação de

concentração de 1,24 para amostras de sangue coletadas da veia femoral (n=203), 1,19 para amostras de sangue coletadas do coração (n=5) e 1,18 para a amostra de sangue coletada da cavidade pleural (n=1) com coeficiente de regressão linear R^2 = 0,958.

Respeitadas as particularidades de cada tipo de amostra, ainda que a técnica do exame de alcoolemia permita a utilização de diferentes matrizes biológicas, para fins legais a análise realizada em sangue é a mais aceita nos tribunais, e a única prevista legalmente para as análises laboratoriais. A exemplo do Brasil, o limite da concentração de etanol no sangue e ar pulmonar dos condutores de veículos automotores está legalmente regulamentado, tanto para as infrações administrativas quanto criminais (BRASIL, 2013). Segundo o Código de Transito Brasileiro, condutores de veículos automotores que apresentarem resultado de alcoolemia sanguínea superior a 6 dg L^{-1} respondem criminalmente pela infração (BRASIL, 2013).

2.3 Exame de Alcoolemia: Estabilidade das Amostras

Após a coleta da amostra, o etanol presente no sangue pode ser perdido por evaporação, oxidação e/ou por atividade microbiana (GARRIOTT, 1996). A fase pré-analítica do exame de dosagem alcóolica é crítica, especialmente as etapas de coleta, transporte e armazenamento do sangue, pois exercem influência direta na qualidade das amostras, e por consequência, na confiabilidade e qualidade dos resultados (KOCAK et al., 2015, SHAN et al., 2011).

Olsen e Hearn (2003) estudaram a perda de etanol em amostras forenses *post mortem,* utilizando a relação da concentração de etanol no sangue e humor vítreo em função do tempo de armazenamento. As amostras foram armazenadas sob refrigeração e reanalisadas após 5-6 anos, revelando que o humor vítreo armazenado em fracos de 10 mL apresentou menor perda de etanol quando comparado às amostras de sangue armazenadas em frascos de 50 mL. Os autores concluíram que a perdas de etanol parecem estar relacionadas ao volume de ar (*headspace*) presente no interior dos frascos.

Ferrari et al., (2006) realizaram um estudo fatorial com amostras de sangue *post mortem*, onde avaliaram a perda de etanol em tubos com diferentes volumes de

ar (0, 5, 20, 35 e 65%), armazenadas em diferentes temperaturas (25, 4 e -10ºC). A concentração de etanol nas amostras estudadas variou entre 0,5 e 4,30 g/L. O estudo sugeriu que a perda de etanol em amostras *post mortem* é fortemente pronunciada quanto maior for o volume de ar nos tubos e a temperatura de armazenamento.

Petkovic et al., (2008) realizaram análises em amostras de sangue *ante mortem* para descobrir se as amostras armazenadas em curto período de tempo, com e sem inibidor enzimático fluoreto de sódio (NaF), sofriam acréscimo na concentração de etanol por ação fermentativa dos microrganismos. As amostras foram coletadas em frascos com e sem NaF e submetidas a diferentes temperaturas de armazenamento (4ºC e 20ºC), em diferentes tempos de armazenamento (12, 24 e 48 horas), de maneira que amostras com e sem NaF fossem experimentadas em ambas as temperaturas e em todos os períodos de armazenamento. Quando comparados os resultados com as alíquotas analisadas imediatamente após a coleta, não houve aumento na concentração de etanol em função do tempo e temperatura de armazenamento.

Anderson et al., (2010) realizaram estudos a partir de uma única amostra de sangue total, onde adicionou álcool e preparou alíquotas de 8,5 mL na concentração de 0,135 g dL^{-1} (etanol/sangue) e comparou com alíquotas de 8,5 mL sem a adição de etanol, que foram armazenadas a 4ºC e 25ºC, e então analisadas com 1, 2, 4, 8 ou 42 dias de armazenamento. Não houve perda significativa de etanol nas amostras armazenadas a 4ºC até 42º dia, entretanto, nas amostras armazenadas a 25ºC, a partir do 8º dia de armazenamento foi verificada perda sutil.

Shan et al., (2011) analisaram 32 amostras de sangue coletadas de motoristas que estavam dirigindo sob influência de álcool e compararam o resultado original, obtido logo após a coleta do sangue, com o resultado da reanálise, obtido após períodos de armazenamento que variaram de 13 a 39 meses a 4ºC. De cada voluntário foram coletados dois tubos de sangue contendo anticoagulante e inibidor NaF, sendo que um frasco foi analisado imediatamente e o outro frasco mantido lacrado durante todo o tempo de armazenamento que antecedeu a reanálise. Para avaliar o efeito do rompimento do lacre na perda de etanol, as amostras analisadas no momento da coleta também foram armazenadas para serem reanalisadas com as amostras lacradas. Os resultados demonstraram que os frascos armazenados violados sofreram maior perda de etanol quando comparados aos frascos armazenados lacrados, entretanto, houve perda significativa de etanol mesmo nos

frascos armazenados lacrados. Os resultados demonstraram ainda que o percentual de perda de etanol parecia não estar relacionado com a concentração inicial.

Sutlovic et al., (2014) analisaram amostras provenientes de cadáveres, armazenadas em frascos estéreis com adição de NaF. As amostras foram analisadas incialmente no prazo de 1 a 4 dias após a coleta, ficando neste período armazenadas a 4ºC. Posteriormente a análise inicial, as amostras foram acondicionadas a 20ºC e então reanalisadas em diferentes períodos de armazenamento, que variaram de 191 a 468 dias. A média de perda na concentração de etanol foi de 9,56%, entretanto, em 55 amostras das 79 analisadas, as perdas observadas variaram entre 0,3% e 60,5%. Em 12 amostras as concentrações aumentaram entre 0,45% e 56,98%. Em 12 amostras não foi observada diferença na concentração inicial e final, mas em 11 dessas amostras, a concentração inicial foi de 0 g kg^{-1}. Mudanças na concentração etanol superiores a 10% foram observadas em 39% das amostras, consideradas diferenças não aceitáveis em se tratando de amostras forenses.

Kocak, et al., (2015) avaliaram o efeito do tempo de armazenamento em amostras de plasma na temperatura de -20ºC. Neste estudo apenas amostras ideais foram avaliadas, sendo desprezadas as coaguladas, hemolisadas, coletadas em frascos inadequados ou com maior ou menor volume de sangue em relação ao indicado para o frasco de coleta. As amostras (n=80) foram separadas em 4 grupos, então analisadas em 2, 3, 4, ou 5 meses de armazenamento. Todos os grupos sofreram perda significativa de etanol de maneira tempo dependente.

Tiscione et al., (2015) analisaram 110 amostras forenses de sangue total *ante mortem* de tubos violados (amostras A) e lacrados (amostras B), respectivamente após 5,4-10,3 e 5,6-10,5 anos de armazenamento. As amostras A foram reanalisadas pelo mesmo laboratório e nas mesmas condições da análise inicial, já as amostras B foram analisadas por outro laboratório por CG-FID-EM e injeção por *headspace*, e então os resultados comparados com as análises iniciais. Todas as amostras sofreram perda de etanol em função do tempo de armazenamento, entretanto, as maiores perdas foram observadas nas amostras A (armazenadas violadas), com perda média de 34%. Em relação às amostras B (armazenadas lacradas), a perda média de etanol foi 24%, entretanto, mesmo após 6 anos de armazenamento, uma das amostras sofreu perda de apenas 1%.

Jones e Ericsson (2016) estudaram o efeito da concentração inicial e do material de confecção dos tubos de coleta (plástico e vidro) na perda etanol em

amostras produzidas a partir de uma única matriz de sangue total *ante mortem*. Foram produzidas soluções de etanol de 0,2 g/L, 1,0 g/L, 2,0 g/L e 3,0 g/L, que foram armazenadas a 4ºC e analisadas com 7, 14, 28, 91, 182 e 364 dias de armazenamento. Neste estudo os autores utilizaram um equipamento automatizado de aliquotagem das amostras, possibilitando a obtenção de pequeno desvio padrão entre as análises e, consequentemente, verificar a perda significativa de etanol com 2,9%, 1,4%, 1,2% e 1,1% de perda para as soluções de 0,2 g/L, 1,0 g/L, 2,0 g/L e 3,0 g/L respectivamente. Os autores concluíram que a perda etanol ocorreu de maneira tempo dependente, entretanto, a concentração inicial não influenciou a perda absoluta de etanol. Não houve diferença significativa na perda de etanol das amostras armazenadas em frascos de plástico e de vidro.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Comitê de Ética

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética (CEP) do Hospital das Clínicas do Acre (HCA/FUNDHACRE), pelo parecer de nº 1560684.

3.2 Coleta das amostras

As amostras de sangue periférico foram coletadas de três voluntários adultos que declararam não ter consumido bebida alcoólica nas 24 horas anteriores a coleta. Os voluntários declararam consentir com a doação da amostra e autorizaram o uso do material biológico para a realização do presente estudo.

De cada um dos voluntários foi coletado aproximadamente 500 mililitros de sangue periférico por punção venosa da região antecubital. Os sangues foram coletados em bolsa de coleta estéril, contendo anticoagulante citrato de sódio a 0,5% (m/v) ($Na_3C_6H_5O_7$), onde foi adicionado o conservante fluoreto de sódio (NaF), até se obter a concentração de 1%. A adição de NaF em amostras de sangue *ante mortem* destinadas ao exame de alcoolemia inibe a formação de álcool *in vitro* (CHANG et al.,1984, WINEK; PAUL, 1996; SHAN et al., 2011).

Os procedimentos de coleta foram realizados no Hemocentro da cidade de Rio Branco (HEMOACRE), de acordo com o procedimento padrão da instituição.

3.3 Preparação das Soluções de Etanol e Aliquotagem das Amostras

Com as amostras de sangue coletadas foram construídas três soluções com etanol, com objetivo se obter as concentrações de 10, 20 e 40 dg L^{-1}. Logo que as soluções de etanol foram construídas, três amostras de cada solução foram imediatamente submetidas ao exame de alcoolemia, sendo a média dos resultados

das triplicatas utilizada como referência da concentração inicial. A concentração inicial de cada solução foi identificada nos resultados deste estudo como “dia 0”.

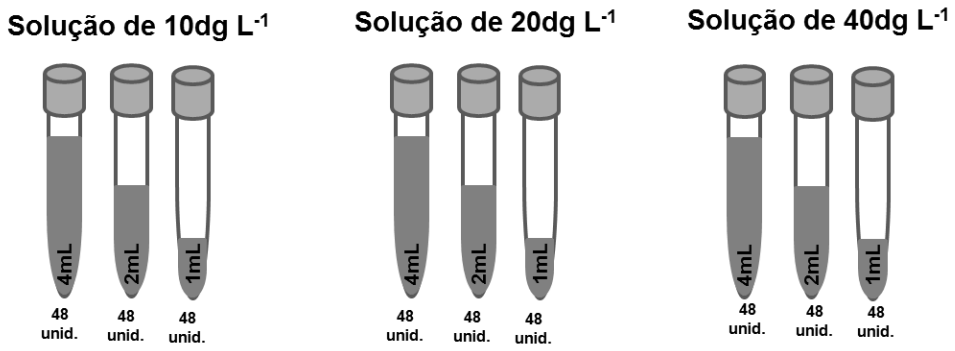
A escolha das concentrações das soluções de etanol utilizadas no presente trabalho se baseou na pesquisa realizada por Baginski (2016), onde foi constatado que a concentração média de etanol nas amostras forenses submetidas ao exame de alcoolemia no Instituto de Análises Forenses (IAF) da Polícia Civil do Estado do Acre é de aproximadamente 20 dg L^{-1}. As outras soluções, nas concentrações de 10 e 40 dg L^{-1}, foram produzidas de modo a se obter, respectivamente, amostras com a metade e o dobro da concentração média das amostras analisadas na rotina do IAF. A construção dessas soluções visou estudar a influência da concentração inicial na perda de etanol ocorrida durante o período de armazenamento das amostras.

As três soluções (10, 20 e 40 dg L^{-1}) foram distribuídas (aliquotadas) em tubos de coleta de sangue a vácuo de 13x75 mm e 4 mL, de modo a se obter tubos preenchidos com 1, 2 ou 4 mL de amostra. O enchimento com volumes variados objetivou a obtenção de tubos preenchidos com aproximadamente 25, 50 ou 100% do seu volume útil, e desta maneira, avaliar a influência do volume de amostra na perda de etanol ocorrida durante o período de armazenamento.

O enchimento (aliquotagem) dos tubos foi realizado por ação do vácuo (vácuo presente originalmente no interior dos tubos), com o uso de seringa estéril de 20 mL com agulha de 0,7x25 milímetros. Para tanto, a seringa foi preenchida com a solução de etanol e então as alíquotas foram transferidas para o interior dos tubos furando-se a rolha de borracha e aguardando o enchimento. O procedimento de enchimento seguiu a recomendação do fabricante, sendo que nenhum tubo teve sua rolha retirada para a transferência da solução de etanol.

Ao final do procedimento de aliquotagem foi obtido 48 tubos de cada uma das concentrações de etanol nas amostras (10, 20 e 40 dg L^{-1}) e volume de sangue (1, 2 e 4 mL), conforme esquematizado na Figura 6.

Figura 6 – Divisão dos tubos de acordo com a concentração e volume após o processo de aliquotagem das amostras



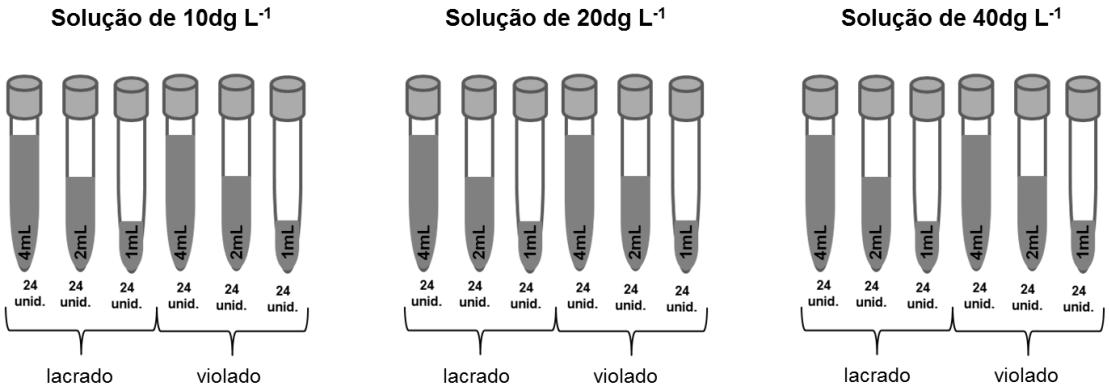
Fonte: (produção própria).

Para simular a influência da integridade do tubo na perda de etanol durante o período de armazenamento, metade dos tubos foram violados e mantidos sem as rolhas por aproximadamente 20 segundos, e então tampados e identificados como “violado”. Este procedimento objetivou simular as situações em que não é possível a coleta de amostra exclusiva para a contraprova, e o mesmo tubo de amostra utilizado para a realização do exame de alcoolemia de rotina foi armazenado após ser violado. Os demais frascos, que não tiveram suas rolhas abertas, foram armazenados e identificados como “lacrado”.

Durante os procedimentos normais da rotina do Instituto de Análises Forenses da Polícia Civil do Estado do Acre, segundo as cronometragens realizadas para efeito desse estudo, 20 segundos foi o tempo médio em que um tubo de sangue permaneceu aberto durante a aliquotagem (pipetagem da amostra) para a realização do exame de alcoolemia.

Ao final do processo de abertura, foram obtidos 24 tubos de sangue de cada concentração de etanol, volume de amostra, e situação do lacre (violado ou lacrado) (Figura 7).

Figura 7 – Divisão dos tubos de acordo com a concentração e volume após o processo de aliquotagem das amostras.



Fonte: (produção própria).

Nos dias das análises, as amostras (tubos), controle interno (soluções padrão de etanol de 10, 20 e 40 dg L^{-1}) e padrão analítico interno (solução de isopropanol 8 dg L^{-1}), foram retirados do refrigerador previamente as análises para que atingissem a temperatura ambiente. Todas as amostras foram criteriosamente homogeneizadas previamente aos procedimentos de pipetagem.

Três tubos de cada amostra foram utilizados em cada dia de análise, sendo considerado o resultado das análises a média das triplicatas. Para a realização das análises, 500 µL de amostra e 500 µL de padrão interno (isopropanol 8 dg L^{-1}) foram pipetados em *vial* de vidro para *headspace* de 20 mL e imediatamente lacrados.

3.4 Controle negativo

Parte do sangue coletado dos voluntários foi distribuído (aliquotado) em tubos de coleta de sangue a vácuo de 13x75 mm e 4 mL. Os frascos foram armazenados em refrigerador (4ºC) e analisados, também em triplicata, nos dias dos experimentos, com o objetivo de observar a formação de etanol *in vitro.* A formação de álcool *in vitro* é um indicativo da contaminação do sangue por microrganismos que realizam a fermentação alcoólica de carboidratos.

3.5 Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrômetro de Massa (CG/EM)

As medidas da concentração de álcool foram realizadas pela técnica de Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massas e Injeção por *Headspace* (CG/EM - HS), utilizando hélio padrão 5.0 como gás de arraste, no equipamento da marca Agilent (Wilmington, EUA) modelo 7890A e 5975C com pipetador automático de amostras GC Sampler 120. A utilização de um sistema automatizado de injeção permitiu uniformizar o tratamento das amostras, eliminando variações referentes ao tempo e temperatura de incubação entre as amostras. A utilização do pipetador automático garantiu também a uniformidade do volume de amostra injetada no cromatógrafo gasoso.

O cromatógrafo gasoso estava equipado com uma coluna capilar de cromatografia, modelo HP-5MS (5%-fenil-dimetilpolisoloxano), nas especificações: 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme. O método utilizado foi o recomendado pelo manual de análises forenses Agilent (modificado), previamente validado no Laboratório de Análises Forenses da Polícia Civil do Estado do Acre para o exame de alcoolemia. As amostras foram incubadas a 70°C sob agitação constante pelo tempo de 900 segundos. O volume de injeção da amostra foi de 250 µL, com programação de temperatura iniciando a rampa de aquecimento em 40°C (3 minutos), em seguida aquecendo 20°C por minuto até atingir 100°C, ficando neste patamar por 1 minuto. O modo de injeção foi *split* na razão 1:25. O espectrômetro de massas foi configurado no modo *scan,* com seleção de unidade de massas de 15-120 *m/z*. A temperatura do injetor estava configurada em 200ºC, a linha de transferência a 250ºC, fonte 230ºC e o quadrupolo a 150ºC.

3.6 Curva de calibração

A curva de calibração do método foi construída com soluções padrão de etanol nas concentrações de 2, 5, 10, 20, 40 e 60 dg L^{-1}, com uso de etanol grau analítico Labsynth (Diadema, SP, Brasil) utilizando como controle interno de corrida o álcool isopropílico grau biotecnologia Amresco (Solon, Ohio, USA) na concentração de 8 dg L^{-1}. Para a construção da curva, foi pipetado 500 µL de solução padrão de etanol e

500 µL de controle interno em tubos de *headspace* de 20 mililitros com tampa de rosca e septo de teflon. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.7 Análise Estatística

Variações na concentração de etanol superiores a 5% foram consideradas significativas.

A influência dos fatores na perda de etanol foi analisada por estatística fatorial 3x3x2: três concentrações de etanol (40, 20 e 10 dg L^{-1}), três volumes de amostra (4, 2 e 1 mL) e duas condições do tubo (violado ou lacrado). Valores de $p<0,05$ foram considerados significativos. Todas as análises foram realizadas com auxílio do software Sisvar®.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Controle Negativo

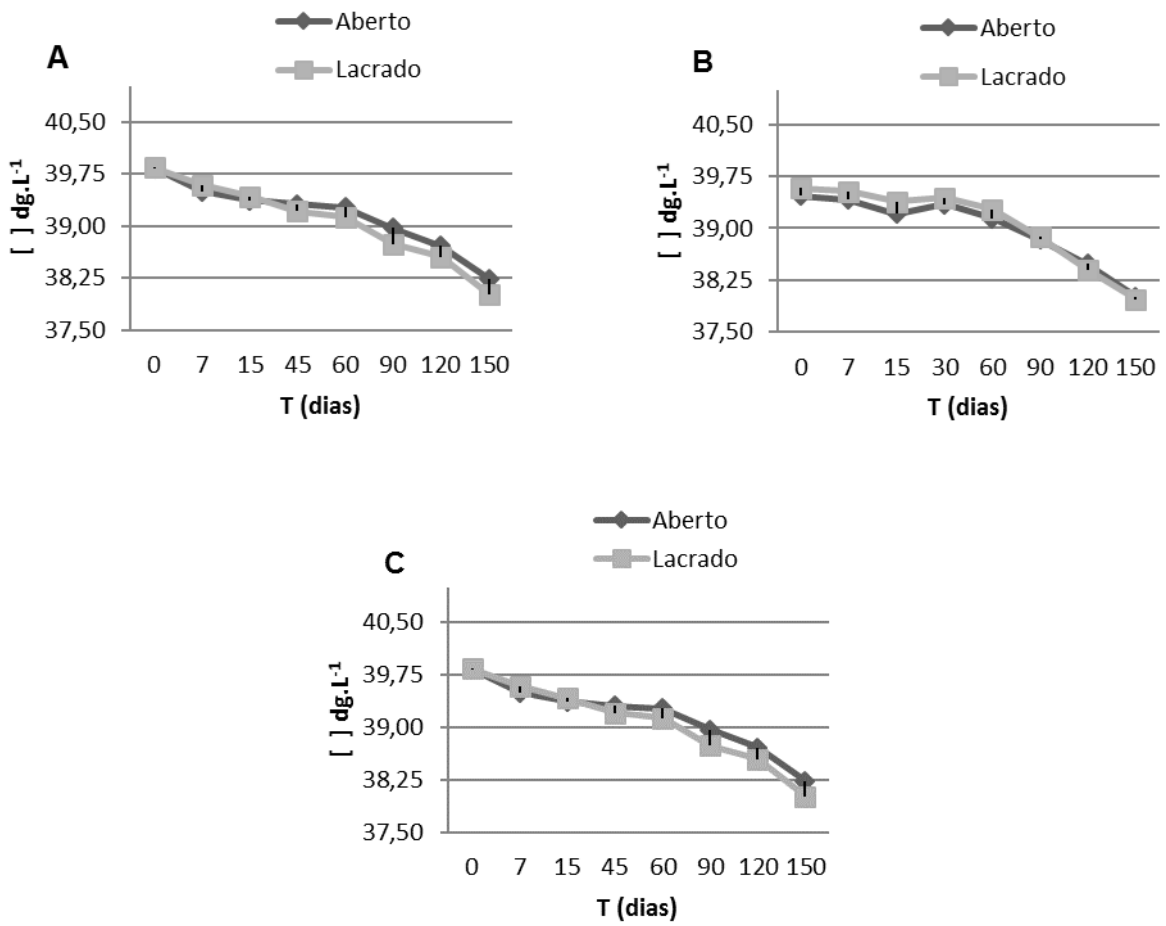
As análises realizadas nas amostras de controle permaneceram negativas durante todo o período de armazenamento, revelando não ter ocorrido formação de etanol *in vitro*. Os resultados demonstraram que as amostras não sofreram fermentação por microrganismos, e, portanto, não houve interferência na concentração de etanol em razão deste fenômeno durante o tempo de armazenamento. Os resultados dos controles negativos não estão demonstrados em tabelas ou gráficos.

Os resultados obtidos estão de acordo com os estudos realizados por Chang et al., (1984), Winek e Paul (1996) e Shan et al., (2011), onde foi demonstrado não haver formação de etanol em amostras de sangue armazenadas por curto ou longo período, quando conservadas com fluoreto de sódio (NaF). Vance et al., (2015) também observaram não ocorrer formação de álcool *in vitro* em amostras conservadas com fluoreto de sódio, mesmo quando acondicionadas em temperatura ambiente por até 60 dias. Em adição aos dados da literatura, os resultados do presente estudo comprovaram que o fluoreto de sódio, na concentração de 1%, foi eficaz em impedir a formação de etanol *in vitro* nas amostras.

4.2 Análise das amostras

Na solução de concentração de 40 dg L^{-1}, tanto nos tubos lacrados quanto violados, as perdas máximas de etanol ocorreram no período de 120 a 150 dias de armazenamento. As análises revelaram tendência de perda desde a primeira semana (Gráfico 3, página 43), entretanto, mesmo com 150 dias de armazenamento não houve perda superior a 5% em nenhuma amostra.

Gráfico 3 - Concentração de etanol em função do tempo de armazenamento - solução de 40 dg L^{-1} nos volumes de 4 mL (A), 2 mL (B) e 1 mL (C)



As perdas percentuais máximas acumuladas nas amostras lacradas foram de 4,26%, 4,38% e 4,03% para os volumes de 4, 2 e 1 mL respectivamente, enquanto nas amostras violadas, foram de 3,70% ,4,28% e 3,48%, para os volumes de 4, 2 e 1 mL respectivamente. Os resultados das análises, perdas acumuladas em dg L^{-1} e perda acumulada percentual estão presentes na Tabela 4 (página 44).

Tabela 4 – Solução de 40 dg L^{-1}: resultados das análises, perdas acumuladas em dg L^{-1} e percentuais nos tubos lacrados e não lacrados, nos volumes de 4, 2 e 1 mL, durante o período de armazenamento.

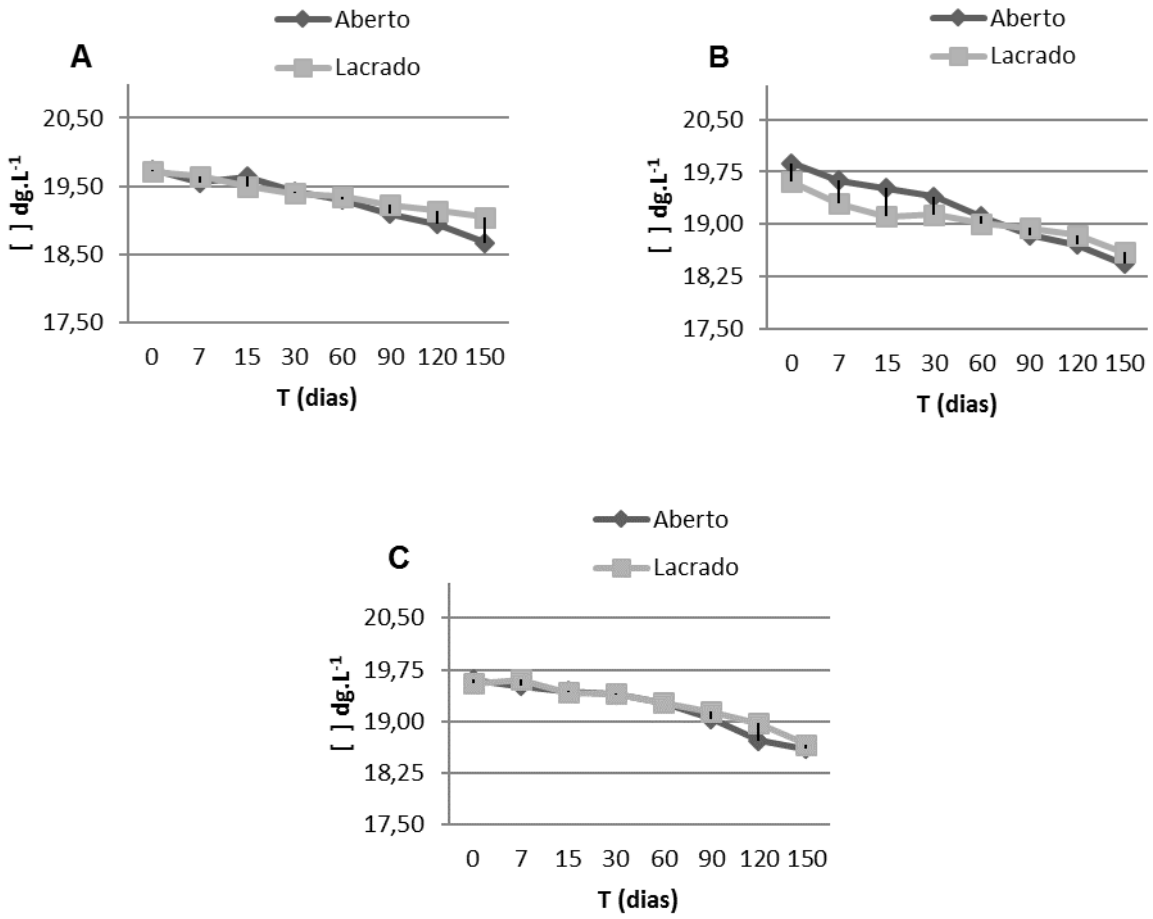
Dia	Média dos resultados (dg L^{-1})						Diferença (dg L^{-1})						Diferença %					
	LACRADA			VIOLADA			LACRADA			VIOLADA			LACRADA			VIOLADA		
	4mL	2mL	1mL	4mL	2mL	1mL	4mL	2mL	1mL	4mL	2mL	1mL	4mL	2mL	1mL	4mL	2mL	1mL
0	39,71						N/A						N/A					
7	39,84	39,58	39,88	39,83	39,47	39,65	0,13	-0,13	0,17	0,12	-0,24	-0,06	0,33	-0,34	0,43	0,30	-0,60	-0,15
15	39,59	39,53	39,70	39,50	39,41	39,68	-0,12	-0,18	-0,01	-0,21	-0,30	-0,03	-0,30	-0,46	-0,03	-0,53	-0,76	-0,08
30	39,42	39,38	39,71	39,37	39,21	39,47	-0,29	-0,33	0,00	-0,34	-0,50	-0,24	-0,73	-0,83	0,00	-0,86	-1,26	-0,60
45	39,21	39,44	39,56	39,31	39,35	39,38	-0,50	-0,27	-0,15	-0,40	-0,36	-0,33	-1,26	-0,67	-0,38	-1,01	-0,91	-0,83
60	39,13	39,27	39,40	39,27	39,14	39,31	-0,58	-0,44	-0,31	-0,44	-0,57	-0,40	-1,46	-1,11	-0,78	-1,11	-1,44	-1,01
90	38,74	38,87	39,12	38,97	38,84	39,13	-0,97	-0,84	-0,59	-0,74	-0,87	-0,58	-2,44	-2,12	-1,49	-1,86	-2,19	-1,46
120	38,55	38,40	38,77	38,71	38,48	38,62	-1,16	-1,31	-0,94	-1,00	-1,23	-1,09	-2,92	-3,30	-2,37	-2,52	-3,10	-2,74
150	38,02	37,97	38,11	38,24	38,01	38,33	-1,69	-1,74	-1,60	-1,47	-1,70	-1,38	-4,26	-4,38	-4,03	-3,70	-4,28	-3,48

Na solução de concentração de 20 dg L^{-1}, tanto nos tubos lacrados quanto violados, as perdas máximas de etanol também ocorreram entre 120-150 dias de armazenamento. As análises revelaram tendência de perda desde a primeira semana em todas amostras (Gráfico 4, página 45), e em todas as amostras, com exceção dos tubos armazenados lacrados com 4 mL, houve perda superior a 5% entre 120-150 dias de armazenamento. Nas amostras armazenadas violadas com volume de 2mL, a perda superior a 5% ocorreu a partir do período de 90-120 dias.

Nas amostras lacradas da solução de concentração de 20 dg L^{-1}, as perdas acumuladas percentuais máximas foram de 3,25%, 5,59% e 5,23 % para os volumes de 4, 2 e 1mL respectivamente, enquanto nas amostras violadas as perdas acumuladas percentuais máximas foram de 5,18%, 6,40% e 5,54%, para os volumes de 4, 2 e 1 mL respectivamente.

As análises realizadas demonstraram ainda, que apesar da tendência de perda de etanol desde a primeira semana, os tubos armazenados de maneira ideal (4 mL e não abertos), foram capazes de conferir maior estabilidade nas amostras, que sofreram perda de 3,25% durante os 150 dias de armazenamento.

Gráfico 4 - Concentração de etanol em função do tempo de armazenamento - solução de 20 dg L^{-1} nos volumes de 4 mL (A), 2 mL (B) e 1mL (C)



Os resultados das análises, perdas acumuladas em dg L^{-1} e perda acumulada percentual podem ser verificadas na Tabela 5 (página 46).

Tabela 5 - Solução de 20 dg L^{-1}: resultados das análises, perdas acumuladas em dg L^{-1} e percentuais nos tubos lacrados e não lacrados, nos volumes de 4, 2 e 1 mL, durante o período de armazenamento.

Dia	Média dos resultados (dg L^{-1})						Diferença (dg L^{-1})						Diferença %					
	LACRADA			VIOLADA			LACRADA			VIOLADA			LACRADA			VIOLADA		
	4mL	2mL	1mL	4mL	2mL	1mL	4mL	2mL	1mL	4mL	2mL	1mL	4mL	2mL	1mL	4mL	2mL	1mL
0	19,69						N/A						N/A					
7	19,71	19,61	19,55	19,74	19,87	19,61	0,02	-0,08	-0,14	0,05	0,18	-0,08	0,10	-0,41	-0,71	0,25	0,91	-0,41
15	19,65	19,29	19,61	19,55	19,62	19,51	-0,04	-0,40	-0,08	-0,14	-0,07	-0,18	-0,20	-2,03	-0,41	-0,71	-0,36	-0,91
30	19,50	19,11	19,42	19,64	19,51	19,44	-0,19	-0,58	-0,27	-0,05	-0,18	-0,25	-0,96	-2,95	-1,37	-0,25	-0,91	-1,27
45	19,39	19,14	19,40	19,42	19,39	19,39	-0,30	-0,55	-0,29	-0,27	-0,30	-0,30	-1,52	-2,79	-1,47	-1,37	-1,52	-1,52
60	19,35	19,01	19,27	19,30	19,11	19,27	-0,34	-0,68	-0,42	-0,39	-0,58	-0,42	-1,73	-3,45	-2,13	-1,98	-2,95	-2,13
90	19,22	18,94	19,14	19,09	18,84	19,04	-0,47	-0,75	-0,55	-0,60	-0,85	-0,65	-2,39	-3,81	-2,79	-3,05	-4,32	-3,30
120	19,14	18,84	18,97	18,94	18,70	18,72	-0,55	-0,85	-0,72	-0,75	-0,99	-0,97	-2,79	-4,32	-3,66	-3,81	-5,03	-4,93
150	19,05	18,59	18,66	18,67	18,43	18,60	-0,64	-1,10	-1,03	-1,02	-1,26	-1,09	-3,25	-5,59	-5,23	-5,18	-6,40	-5,54

Assim como foi observado nas soluções de 40 e 20 dg L^{-1}, na solução de 10 dg L^{-1}, tanto nos tubos lacrados quanto violados, as perdas máximas de etanol ocorreram no período de 120 a 150 dias de armazenamento. Em todas as amostras houve tendência de perda de etanol desde a primeira semana (Gráfico 5, página 47). Com exceção dos tubos armazenados violados com 4 e 1 mL, todas as outras amostras (tubos violados de 2 mL e tubos lacrados de 1, 2 e 4 mL) sofreram perda superior a 5%.

Na solução de concentração de 10 dg L^{-1}, as perdas percentuais máximas acumuladas nas amostras lacradas foram de 5,04%; 5,76% e 5,24% para os volumes de 4, 2 e 1 mL respectivamente, enquanto nas amostras violadas, as perdas foram de 4,93%; 5,55% e 4,52% para os volumes de 4, 2 e 1 mL, respectivamente (Tabela 6, página 47).

Gráfico 5 - Concentração de etanol em função do tempo de armazenamento - solução de 10 dg L^{-1} nos volumes de 4 mL (A), 2 mL (B) e 1mL (C)

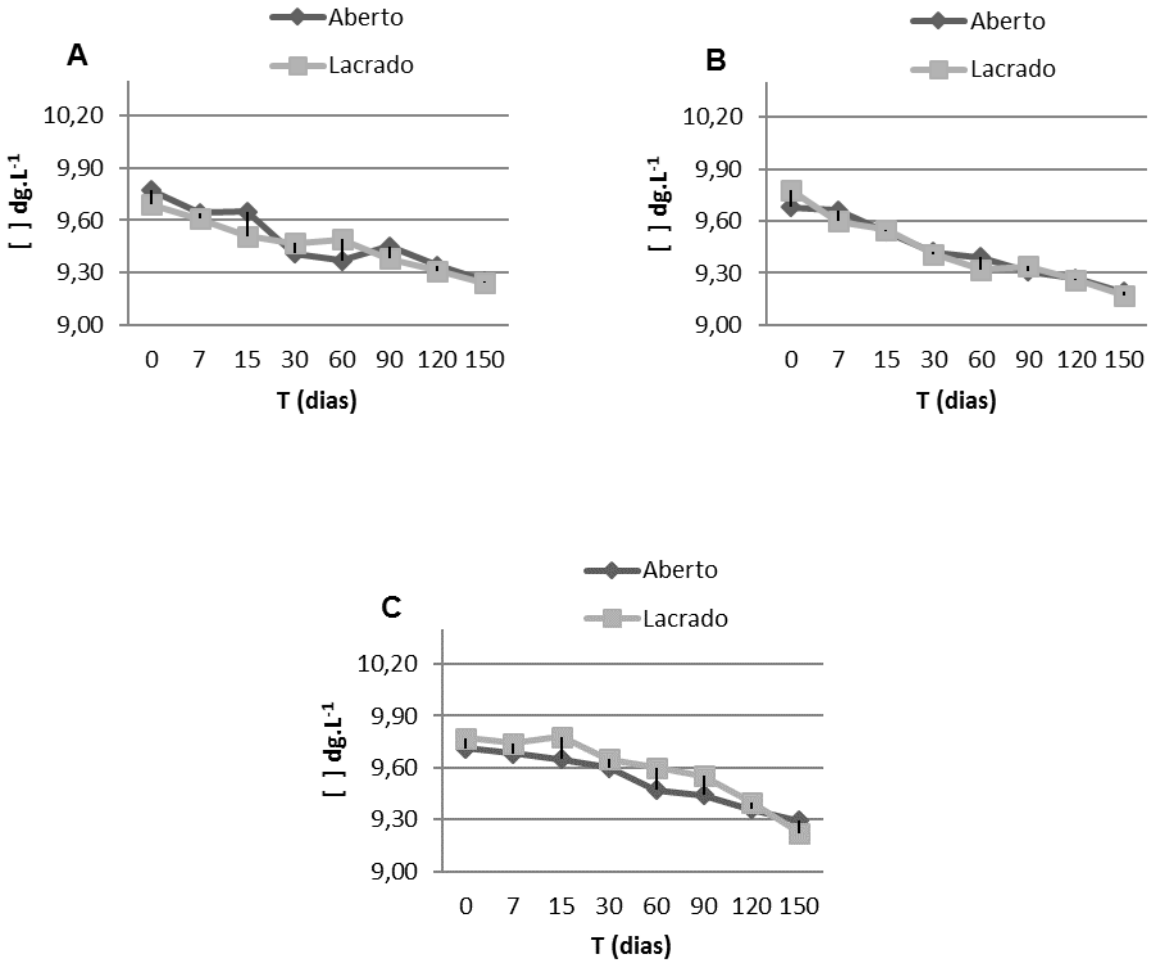


Tabela 6 – Solução de 10 dg L^{-1}: resultados das análises, perdas acumuladas em dg L^{-1} e percentuais nos tubos lacrados e não lacrados, nos volumes de 4, 2 e 1 mL, durante o período de armazenamento.

Dia	Média dos resultados (dg L^{-1})						Diferença (dg L^{-1})						Diferença %					
	LACRADA			VIOLADA			LACRADA			VIOLADA			LACRADA			VIOLADA		
	4mL	2mL	1mL	4mL	2mL	1mL	4mL	2mL	1mL	4mL	2mL	1mL	4mL	2mL	1mL	4mL	2mL	1mL
0	9,73						N/A						N/A					
7	9,69	9,78	9,77	9,77	9,68	9,71	-0,04	0,05	0,04	0,04	-0,05	-0,02	-0,41	0,51	0,41	0,41	-0,51	-0,21
15	9,61	9,60	9,74	9,64	9,66	9,68	-0,12	-0,13	0,01	-0,09	-0,07	-0,05	-1,23	-1,34	0,10	-0,92	-0,72	-0,51
30	9,51	9,55	9,78	9,65	9,54	9,65	-0,22	-0,18	0,05	-0,08	-0,19	-0,08	-2,26	-1,85	0,51	-0,82	-1,95	-0,82
45	9,47	9,41	9,65	9,41	9,42	9,60	-0,26	-0,32	-0,08	-0,32	-0,31	-0,13	-2,67	-3,29	-0,82	-3,29	-3,19	-1,34
60	9,49	9,32	9,60	9,37	9,39	9,47	-0,24	-0,41	-0,13	-0,36	-0,34	-0,26	-2,47	-4,21	-1,34	-3,70	-3,49	-2,67
90	9,38	9,34	9,55	9,45	9,31	9,44	-0,35	-0,39	-0,18	-0,28	-0,42	-0,29	-3,60	-4,01	-1,85	-2,88	-4,32	-2,98
120	9,31	9,26	9,40	9,34	9,27	9,36	-0,42	-0,47	-0,33	-0,39	-0,46	-0,37	-4,32	-4,83	-3,39	-4,01	-4,73	-3,80
150	9,24	9,17	9,22	9,25	9,19	9,29	-0,49	-0,56	-0,51	-0,48	-0,54	-0,44	-5,04	-5,76	-5,24	-4,93	-5,55	-4,52

Analisando os resultados das quantificações presentes nas tabelas é possível verificar que em alguns casos, mesmo após o período de estocagem, houve um sutil aumento na concentração de etanol. Tal constatação pode ser observado, por exemplo, na solução de 20 dg L^{-1}, onde o resultado do dia 0 foi de 19,69 dg L^{-1} e o resultado da análise da amostra violada no dia 7, tubos com 1 mL, foi de 19,87 dg L^{-1} (Tabela 5, página 46) Apesar do resultado da análise do dia 7 ser matematicamente superior ao do dia 0 em 0,91%, tal fato não indica o aumento real na concentração de etanol, mas somente a variações experimentais esperadas e aceitáveis, inferiores ao limite de significância de 5%.

Caso o fenômeno da formação de álcool *in vitro* fosse o responsável pelo aumento da concentração, tal fato seria verificado nas análises posteriores, onde possivelmente ao final do tempo de armazenamento, ao invés de perda, seria observado aumento na concentração de etanol quando comparada a análise inicial

Quanto a relação de perda de etanol em função do tempo de armazenamento, os resultados obtidos neste estudo concordam, ao menos em parte, com os resultados obtidos por Jones e Ericsson (2016). Os autores observaram perda significativa de etanol entre 14-28 dias nas amostras de sangue armazenadas a 4ºC, mas em razão do pequeno desvio padrão do método utilizado nas análises, foram consideradas significativas variações superiores a 2,9%; 1,4%; 1,2%; e 1,1% para as soluções de 0,2; 1; 2 e 3 g L^{-1}, respectivamente. Entretanto, assim como o verificado na solução de 20 dg L^{1} deste estudo, variações superiores a 5% foram visualizadas somente após 91 dias de armazenamento.

A análise estatística demonstrou que a concentração prévia das soluções utilizadas neste estudo (40, 20 e 10 dg L^{-1}) não interferiram significativamente na perda de etanol durante os 150 dias de armazenamento. Brown e Neylan (1973) assim como Jones e Ericsson (2016) concluíram em seus trabalhos, que a concentração inicial de etanol não exerceu influência na perda durante o período de armazenamento. Tiscione et al. (2015), ao reanalisaram 117 amostras de sangue armazenadas por 5,4 a 10,3 anos, também concluíram que a concentração previa de etanol não contribui para maiores perdas percentuais.

Alguns autores afirmaram que os tubos armazenados abertos e com grande volume de ar sofrem maior perda de etanol quando comparados aos fechados e com menor volume de ar (FERRATI et al., 2006; TISCIONE et al., 2015). Tal fato não foi observado neste estudo durante os 150 dias de armazenando. A análise estatística

indicou que os fatores volume de amostra e situação do lacre dos tubos (lacrados ou violados) não influenciou significativamente a perda de etanol durante os 150 dias de armazenamento. Por outro lado, no estudo de Tiscione et al. (2015), a influência do volume da amostra (ou do ar no interior do frasco) se mostrou mais significativo em longos períodos de armazenamento (5,4 a 10,3 anos).

Assim como verificado neste estudo, os dados presentes na literatura indicam que a perda de etanol em amostras de sangue *ante* e *post mortem* está, de maneira geral, comprovadamente relacionada com o tempo de armazenamento. Observa-se, entretanto, que em algumas situações, enquanto a maioria das amostras armazenadas por longo período de tempo sofre perdas significativas, outras sofrem pouca ou nenhuma perda de etanol.

Olsen e Hearn (2003) reanalisaram amostras de sangue e humor vítreo *post mortem* após 5 ou 6 anos de armazenamento, acondicionadas em frascos de 50 mL e 10 mL respectivamente. Observou-se que a variação na perda de etanol nas amostras de sangue foi de 4% a 100%. Considerando os resultados da reanálise de três amostras que apresentavam a mesma concentração inicial (0,27g/dL), a perda de etanol variou entre 15% a 59%. Neste mesmo estudo 05 amostras de sangue armazenadas em frascos de 10 mL também foram reanalisadas. Apesar de uma das amostras ter perdido 11%, outras 3 amostras não tiveram perda de etanol, indicando que é possível a conservação de amostras de sangue por longo período de tempo com pouca ou nenhuma perda de etanol. Os autores concluíram que o tempo de armazenamento e o maior volume *headspace* contribuíram para as maiores perdas de etanol.

Shan et al. (2011) reanalisaram amostras de sangue *ante mortem* após 13 a 39 meses de armazenamento. Foi verificado que a perda de etanol variou de 0,97% (21 meses) a 47,22% (27 meses) para amostras armazenadas não lacradas e 2,37% (28 meses) a 38,89% (27 meses) para amostras lacradas. No grupo das amostras não lacradas enquanto um tubo armazenado por 19 meses apresentou perda de 43,21%, outro armazenado por 21 meses apresentou perda 0,97%. Nas amostras lacradas, enquanto um tubo armazenado por 27 meses apresentou perda de 38,89%, outro armazenado por 32 meses apresentou perda de 5,90%.

Os estudos realizados em sangue de diferentes indivíduos (amostras *post mortem* ou de motoristas dirigindo sob a influência de etanol) indicam que as características individuais da amostra (p. ex. presença de hemólise e eritrócitos)

também exercem importante influência na maior ou menor perda de etanol durante o período de armazenamento. Ao incluir fatores biológicos relacionados a matriz em seu estudo fatorial, Kristoffersen et al., (2006) demonstraram que amostras hemolisadas ou com eritrócitos tendem a perder mais etanol quando comparadas a amostras de plasma submetidas as mesmas condições experimentais. Este estudo foi um bom exemplo da influência das características biológicas das amostras na perda de etanol, e explica em parte o motivo pelo qual em um mesmo estudo, amostras de sangue de origens diferentes submetidas as mesmas condições experimentais, apresentam perdas diferentes de etanol.

Por outro lado, os estudos realizados em amostras de um mesmo indivíduo (ou pool de amostras), tornam possível o entendimento dos fatores não biológicos envolvidos na perda de etanol, visto que todas as amostras, por serem do mesmo indivíduo (ou pool de amostras), contam com os mesmos fatores biológicos.

Ao que parece, as pesquisas sobre a perda de etanol em amostras de sangue de indivíduos diferentes estão sempre sujeitas a variáveis relacionadas as características da própria amostra. Amostras de indivíduos diferentes apresentam características biológicas distintas, com diferentes índices hematócrito, concentração de hemoglobina eritrocitária, índices lipídicos e etc.

As características biológicas das amostras pode ser uma explicação plausível, e parcialmente já comprovada por alguns estudos, para os resultados não concordantes dos trabalhos publicados sobre a perda de etanol em amostras de sangue total.

5. CONCLUSÕES

Na solução de 40 dg L^{-1}, tanto nas amostras violadas quanto nas lacradas, em todos os volumes de amostra (4, 2 e 1 mL), não foram observadas perdas de etanol superiores a 5% até os 150 dias de armazenamento;

Todas as amostras da solução 20 dg L^{-1}, exceto as armazenadas lacradas e com 4 mL, apresentaram perda de etanol superior a 5% entre 120-150 dias de armazenamento. As amostras violadas e com 2 mL sofreram perda superior a 5% a partir do período 90-120 dias de armazenamento;

Todas as amostras da solução de 10 dg L^{-1}, com exceção das amostras violadas com 4 e 1 mL, sofreram perda superior a 5% entre 120-150 dias de armazenamento;

Os fatores: concentração inicial, volume de amostra e abertura prévia dos frascos não influenciaram de maneira significativa na perda de etanol durante 150 dias de armazenamento;

Os resultados da pesquisa são de grande importância na rotina forense, visto que, embora o sangue seja uma matriz seja relativamente perecível, mantém-se analiticamente viável em média 5 meses para o exame de alcoolemia;

As análises realizadas para desenvolvimento deste trabalho não esgotam ou explica todos os fatores envolvidos da perda de etanol, em amostra de sangue armazenadas;

Para o melhor entendimento da influência dos fatores biológicos amostrais na perda de etanol durante o período de armazenamento, é prudente que cada laboratório desenvolva estudos de acordo com a própria realidade, incluindo em seus protocolos experimentais os fatores relativos as variáveis normalmente observadas em sua rotina.

6. REFERÊNCIAS

ANDERSON, S. G.; ALLENDER, W.; MOYNHAM, A. F.; PERL, J.; JENNINGS, S. R.; STARMER, G. A.; LEWIS, K.; BROCKLESBY, C. The effects of storage on the accuracy of blood alcohol readings. Sydney (AU): **Clinical Forensic Medicine Unit**, Sydney Police Center, 2010.

BAGINSKI, L. J.; **Análise de alcoolemia em amostras biológicas *post mortem* para uso forense no estado do acre**. 2016. 45 f. Tese (Doutorado da Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal) – Universidade Federal do Acre, Rio Branco, 2016.

BORDIN, D. C. M.; MONEDEIRO, F. F. S. S.; CAMPOS, E. G.; ALVES, M. N. R.; BUENO, L. H. P.; MARTINIS, B. S. Técnicas de preparo de amostras biológicas com interesse forense. **Scientia Chromatographica,** v. 7, p.125-143, 2015.

BRASIL. **Código de processo penal**: decreto lei nº 3.689 de 1941. Rio de Janeiro: Presidência da República, 1941.

BRASIL. **Código de trânsito brasileiro**: Resolução nº 432 de 23 de janeiro de 2013. Brasília: Conselho Nacional de Trânsito, 2013.

BRASIL. **I Levantamento Nacional dos Padrões de Consumo de Álcool na População Brasileira**. 1. ed. Brasília: Secretaria Nacional Antidrogas, 2007.

BRASIL. **Medida provisória nº 1.569-9 de 11 de dezembro de 1997. Diário oficial da República Federativa do Brasil.** Brasília, 1997.

BROWN C. A, NEYLAN D. The stability of ethanol in stored blood. Part 1. Important variables and interpretation of results. **Analytica Quimica Acta**. v. 66, p. 271-283, 1973.

CAMPOS, V. R.; SILVA, R. S.; DUAILIBI, S.; LARANJEIRA, R.; PALACIOS, E. N.; GRUBE, J. W.; PINSKY, G. I. Drinking and driving in southeastern Brazil: Results from a roadside survey study. **Addictive Behaviors**, v.38, p. 1442-47, 2013.

CAVALIERI, D.; McGOVERN, P. E.; HARTI, E. D.; MORTIMER, R.; POLSINELLI, M. Evidence for S. cerevisiae fermentation in ancient wine. **Journal of Molecular Evolution**, v. 57, sup. 1, p. 226-232, 2003.

CERVIERI JUNIOR, O.; TEIXEIRA JUNIOR, J. R.; GALINARI, R.; RAWET, E. L.; SILVEIRA, C. T. J. O setor de bebidas no Brasil. **BNDES Setorial**, n. 40, p. 93-129, 2014. Disponível em: <https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/bitstream/1408/3462/1/BS%2040%20O%20setor%20de%20bebidas%20no%20Brasil_P.pdf>. Acessado em 20 jan. 2017.

CHANG, R. B.; SMITH, W. A.; WALKIN, E.; REYNOLDS, P. C. The stability of ethyl alcohol in forensic blood specimens. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 8, p. 66-7, 1984.

CLAUSEN, T.; MARTINEZ, P.; TOWERS, A.; GREENFIELD, T.; KOWAL, P. Alcohol consumption at any level increases risk of injury caused by others: data from the study on global ageing and adult health. **Substance Abuse: Research and Treatment**, v. 9, p. 125-132, 2015.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. 1 ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2014. 203-270 p.

ENGELHART, D. A.; JENKINS, A. J. Evaluation of an onsite alcohol testing device for use in postmortem forensic toxicology. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 25, p. 612-615, 2001.

FLACSO - FACULDADE LATINO AMERICANA DE CIÊNCIAS SOCIAIS - CONSUMO DE BEBIDAS ALCOÓLICAS NO BRASIL - Estudo com base em fontes secundárias. Disponível em: <http://flacso.org.br/files/2015/02/RelatorioConsumodoAlcoolnoBrasilFlacso05082012.pdf>. Acessado em 12 fev. 2017.

GARCIA, L. P.; FREITAS, L. R. S. Consumo abusivo de álcool no Brasil: Resultados da pesquisa nacional de saúde 2013. **Epidemiologia Serviço e Saúde**, v. 24, n. 2, p. 227-237, 2015.

GARRIOTT, J. C. editor. Analysis for alcohol in postmortem specimens. In: **Medicolegal aspects of alcohol**. 3 ed. Tucson: AZ: Lawyers and Judges Co, p. 151-63, 1996.

GUBALA, W.; ZUBA, D. Gender differences in the pharmacokinetics of ethanol in saliva and blood after oral ingestion. **Polish Journal of Pharmacology**, v. 55, p. 639-44, 2003.

HONEY, D. et al. Comparative alcohol concentrations in blood and vitreous fluid with illustrative case studies. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 29, p. 365-9, 2005.

JONES, A. W.; ERICSSON, E. Decreases in blood ethanol concentrations during storage at 4 °C for 12 months were the same for specimens kept in glass or plastic tubes. **Practical Laboratory Medicine**, v. 4, p 76-81, 2016.

JONES, A. W.; HOLMGREN, A.; AHLNER, J. Toxicology findings in suicides: Concentrations of ethanol and other drugs in femoral blood in victims of hanging and poisoning in relation to age and gender of the deceased. **Journal of forensic and legal medicine**, v. 20, n. 7, p. 842-47, 2013.

KRISTOFFERSEN, L.; STORMYHR L. E.; SMITH-KIELLAND A. Headspace gas chromatographic determination of ethanol: The use of factorial design to study effects of blood storage and headspace conditions oh ethanol stability and acetaldehyde formation in whole blood and plasma**. Forensic Science International.** v. 161, p. 151-7, 2006.

KOCAK, F. E.; ISIKLAR, O. O.; KOCAK, H. MERAL, A. A comparison of blood ethanol stabilities in different storage periods. **Biochemia Medica**, v. 25, n.1, p. 57-63, 2015.

LEITE, R. C. C.; LEAL, M. R. O bicombustível no Brasil. **Novos Estudos CEBRAP**, n. 78, p. 15-21, 2006.

LEVINE, B.; CAPLAN, Y. H. Alcohol. In: **Principles of Forensic Toxicology**. 2. ed. Washington, AACC Press, p.169-184, 2006.

MCGOVERN, P. E.; MIRZOIANB, A.; HALLA, G. R. Ancient egyptian herbal wines. **PNAS**, v. 106, n. 18, p. 7361-66, 2009.

NATIONAL INSTITUTE ON ALCOHOL ABUSE AND ALCOHOLISM - NIAAA. Alcohol overdose: The dangers of drinking too much. Disponível em <https://pubs.niaaa.nih.gov/publications/alcoholoverdosefactsheet/overdosefact.htm> Acessado em 16 nov. 2016.

OLSEN, T.; HEARN, W. L. Stability of ethanol in postmortem blood and vitreous humor in long-term refrigerated storage. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 27, p. 517-9, 2003.

PAPIERZ, P. A. comparative study of the ethyl alcohol concentration in vitreous humor in relation to ethyl alcohol concentration in blood and urine. **Problems of Forensic Sciences**, v. 58, p. 34-44, 2004.

PETKOVIC, S.; SAVIC, S.; ZGONJANIN D.; SAMOJLIK, I. Ethanol concentrations in antemortem blood samples under controlled conditions. **Alcohol & Alcoholism**, v. 43, n. 6, p. 658-60, 2008.

POOLE, C.F. The essence of chromatography. 1 ed. Amsterdan: **Elsevier Science**, 2003.

SHAN, X.; TISCIONE, N. B; ALFORD, I.; YEATMAN, D. T. A study of blood alcohol stability in forensic antemortem blood samples. **Forensic Science International**, v. 211, p. 47-50, 2011.

SUTLOVIC, D.; VERSIC-BRATINCEVIC, M.; M, DEFINIS-GOJANOVIC, M. Blood alcohol stability in postmortem blood samples. **American Journal of Forensic Medical Pathology**, v. 35, n.1, p. 55-8, 2014.

TISCIONE, N. B.; VACHA, R. E.; ALFORD, I.; YEATMAN, D. T.; SHAN, X. Long-Term blood alcohol stability in forensic antemortem whole blood samples. **Journal of Analytical Toxicology Advance Access**, p. 1-7, 2015.

TISCIONE, N. B. Ethanol analysis by headspace gas chromatography with simultaneous flame-ionization and mass spectrometry detection. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 35, p. 501-11, 2011.

VANCE, C. S.; CARTER, C. R.; CARTER, R. J.; DEL VALLE, M. M.; PEÑA, J. R. Comparison of Immediate and Delayed Blood Alcohol Concentration Testing. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 39, p. 538-544, 2015.

WASFI, I. A.; AL-AWADHI A. H.; AL-HATALI, Z. N.; AL-RAYAMI, J. F.; AL KATHEERI, N. A. Rapid and sensitive static headspace gas chromatography-mass spectrometry method for the analysis of ethanol and abuse inhalants in blood. **Journal of Chromatography B**, v. 799, p. 331-336, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Intimate partner violence and alcohol 2006. Disponível em <http://www.who.int/violence_injury_prevention/violence/world_report/factsheets/fs_intimate.pdf>. Acessado em 08 fev. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Global Status Report on Alcohol and Health, 2014. Disponível em <http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/en/>. Acessado em 08 fev. 2017.

WINEK, C. L.; PAUL, L. J. Effect of short-term storage conditions on alcohol concentrations in blood from living human subjects. **Clinical Chemistry**, v. 29, n. 11, p. 1959-1960, 1983.