

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

***DETERMINAÇÃO DE ETANOL EM TRABALHADORES
DE POSTOS DE GASOLINA***

Porto Alegre, 2014

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

***DETERMINAÇÃO DE ETANOL EM TRABALHADORES
DE POSTOS DE GASOLINA***

Dissertação apresentada por **Bruna Tassi
Borille** para obtenção do GRAU DE
MESTRE em Ciências Farmacêuticas.

Orientador(a): Prof. Dr. Renata Pereira Limberger

Porto Alegre, 2014

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 29.08.2014, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Mirna Bainy Leal

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr. Tanara Rosângela Vieira Sousa

Centro de Pesquisa em Álcool e Drogas

Prof. Dr. Pedro Eduardo Froehlich

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Borille, Bruna Tassi
Determinação de etanol em trabalhadores de postos
de gasolina / Bruna Tassi Borille. -- 2014.
85 f.

Orientadora: Renata Pereira Limberger.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto
Alegre, BR-RS, 2014.

1. Etanol. 2. Fluido oral. 3. Headspace. 4.
Cromatografia em fase gasosa. 5. Detector de massas.
I. Limberger, Renata Pereira, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido sob orientação da prof. Dr. Renata Pereira Limberger, no Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, na cidade de Porto Alegre, com financiamento de agências de fomento. A autora recebeu bolsa de estudos do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a prof. Dr. Renata Pereira Limberger, pela orientação, pelo incentivo, dedicação e oportunidade, pelo aprendizado e também pela confiança depositada para realização deste trabalho.

À equipe Labtoxico, pela companhia, pelo apoio e pelo conhecimento. Em especial à Bruna Coppe, Eloisa, Taís e Ana Laura, pela colaboração na realização deste trabalho, pelos aconselhamentos, discussões e por todos os momentos juntas neste período.

Ao prof. Dr. Flavio Pechansky, atual diretor do Centro de Pesquisa em Álcool e Drogas (CPAD), e às pesquisadoras Tanara e Graciela por todas as discussões, reuniões e principalmente pelo imenso aprendizado. Também meu agradecimento à Ju, Thairys e Mayra.

Ao CNPq, pela bolsa de estudos.

Dedico este trabalho a duas pessoas sem as quais a vida não teria raízes, meus amores e irmãos, Alexandre e Eduardo.

Aos meus pais, Denise e Júnior, pelo apoio incondicional em todas as minhas escolhas, pelo carinho, pela força, amor e compreensão.

Ao meu amor, André, por tudo de bom que já vivemos juntos, inclusive a trajetória deste trabalho. Obrigada pelo apoio, amor, atenção, compreensão, paciência e incentivo.

Às minhas queridas amigas, principalmente pela imensa ausência.

A todos que de alguma forma colaboraram pelos meus dias felizes neste período
- *“Hapinnes only real when shared”*.

RESUMO

Milhões de pessoas morrem anualmente vítimas de acidentes de trânsito, sendo grande parte dos acidentes correlacionados ao ato de dirigir sob influência (DUI) de álcool ou drogas. No Brasil, os trabalhadores de postos de gasolina ficam expostos diariamente, durante a jornada de trabalho, ao etanol, presente no etanol combustível e utilizado como aditivo na gasolina. O objetivo deste trabalho foi avaliar a possível interferência do etanol presente nos combustíveis aos quais os frentistas estão expostos diariamente durante a jornada de trabalho, no teste do etilômetro e analisar amostras de fluido oral destes trabalhadores por *headspace* acoplado a cromatógrafo a gás com detector de massas (HS-CG/EM). Foram convidados a participar do estudo frentistas de 26 postos de gasolina. Primeiramente foi aplicado um questionário, na sequência realizado o teste do etilômetro e coletada amostra de fluido oral através do dispositivo de coleta QuantisalTM para posterior análise em laboratório. Todas as amostras de fluido oral foram analisadas segundo método validado. Em 100% das amostras de fluido oral foi observado presença de etanol e destas, em 72,83% havia presença de etanol em níveis acima do limite de quantificação do método. Com relação ao teste do etilômetro, apenas uma amostra de ar exalado (0,62%) apresentou resultado positivo. As diferenças de concentração de etanol nas diferentes matrizes biológicas são explicadas pelo fato da concentração de etanol ser dependente da concentração de água presente nas matrizes. Os resultados positivos nas amostras de FO e os resultados negativos nas amostras de ar exalado podem ser explicados pela possibilidade do método de análise em FO por HS-CG/EM ser mais sensível do que o teste do etilômetro.

Palavras-chave: Etanol, fluido oral, trânsito, concentração de etanol no ar exalado, concentração de etanol no sangue, trabalhadores de postos de gasolina, *headspace*, cromatografia em fase gasosa acoplada a detector de massas.

ABSTRACT

Millions of people die from traffic accidents, and a large proportion of accidents related to driving under the influence (DUI) of alcohol or drugs. In Brazil, gasoline station attendants are exposed daily during the workday, to ethanol in the fuel and ethanol used as an additive in gasoline. The aim of this study was to evaluate the possible interference of ethanol present in the fuels ethanol and gasoline, to which the attendants are exposed, through breathalyzer and oral fluid (OF) analysis by headspace gas chromatography mass spectrometry (HS-GC/MS). Gasoline stations attendants of 26 gasoline stations were invited to participate in the study. First a questionnaire was fulfilled, followed by the breathalyzer and the OF collection with Quantisal[®] device for laboratory analysis. All OF samples were analyzed by HS-GC/MS using a validated method. The presence of ethanol was found in 100% of which 72.83% had concentrations above the quantification limit of the method. Regarding the breathalyzer, only one expired air sample (0.62%) had a positive result. The differences in ethanol concentration in different biological matrices are explained by the fact that ethanol concentration is dependent on the concentration of water present in the biological matrix. The positive results in OF samples and negative results in exhaled air samples can be explained by the possibility of the OF analysis by HS-GC/MS to be more sensitive than the breathalyzer.

Keywords: Ethanol, oral fluid, traffic, expired air alcohol concentration, blood alcohol concentration, gasoline station attendants, headspace, gas chromatography coupled to mass spectrometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	<i>Status</i> da legislação sobre beber e dirigir, por país/área.....	20
Figura 2.1	Fórmula estrutural completa do etanol.....	25
Figura 2.2	Metabolismo oxidativo do etanol nas células do fígado (hepatócitos).....	27
Figura 2.3	Etilômetro Alco-Sensor IV.....	34
Figura 2.4	Dispositivo de coleta Quantisal™.....	40
Figura 2.5	Coleta de fluido oral com dispositivo de coleta Quantisal™: 1. Dispositivo de coleta e frasco com tampão conservante; 2. Insira o dispositivo coletor sob a língua; 3. Aguarde até o indicador de volume tornar-se azul; 4. Insira o dispositivo no frasco com tampão conservante; 5. Feche a tampa do frasco; 6. Após remover a haste plástica do dispositivo, insira o filtro plástico Quantisal™ para separar a solução do suab coletor.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Classificação das gasolinas comum, aditivada e <i>premiu</i>	31
Tabela 2.2	Variações das unidades de medida de alcoolemia (BAC).....	33

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO	23
2.1	Etanol	25
2.1.1	<i>Absorção</i>	25
2.1.2	<i>Distribuição</i>	26
2.1.3	<i>Metabolismo oxidativo</i>	27
2.1.4	<i>Metabolismo não-oxidativo</i>	28
2.1.5	<i>Eliminação</i>	29
2.2	Combustíveis automotivos	30
2.2.1	<i>Etanol</i>	30
2.2.2	<i>Gasolina</i>	31
2.2.3	<i>Diesel</i>	32
2.3	Monitoramento de etanol e drogas no trânsito brasileiro	32
2.4	Etilômetro	34
2.5	Fluido oral	35
2.5.1	<i>Composição</i>	35
2.6	Metodologia para análise de etanol em amostras biológicas	36
2.6.1	<i>Monitoramento de etanol em fluido oral</i>	37
2.7	Dispositivo de coleta	38
3	OBJETIVOS	41
3.1	Objetivo geral	43
3.2	Objetivos específicos	43
4	ARTIGO	45
5	DISCUSSÃO	65
6	CONCLUSÕES	71
7	REFERÊNCIAS	75

Mundialmente, os acidentes de trânsito estão entre as principais causas de morte entre pessoas de 15 a 29 anos e, dessas mortes, 90% ocorrem em países de baixa e média renda (UNODC, 2013; WHO, 2013). Ainda, conforme dados da Organização Mundial da Saúde (WHO) estima-se que mais de 1 milhão de pessoas morrem todos os anos vítimas de acidentes relacionados ao trânsito (UNODC, 2013; WHO, 2013).

O fato de dirigir sob o efeito de drogas ou álcool é um poderoso prognosticador de mortes no trânsito (UNODC, 2013; WHO, 2013). A direção começa a ficar prejudicada em níveis muito baixos de consumo de bebidas alcoólicas, aumentando rapidamente o risco de envolvimento em acidentes à medida que aumenta o consumo.

Uma grande proporção de motoristas adultos é afetada ou prejudicada com concentração de etanol no sangue (BAC) – alcoolemia – de 0,5 g/L, e em nível de alcoolemia de 1 g/dL o risco de acidente torna-se aproximadamente cinco vezes maior do que o risco de alguém com um nível de alcoolemia igual a zero (WHO, 2013).

Mundialmente, há diferentes limites de BAC que estão em vigor nos países/regiões (Figura 1.1). A definição e aplicação da legislação com limites de BAC de 0,5 g/dL podem levar a reduções significativas em acidentes relacionados com o consumo de bebidas alcoólicas. Desde 2008, tem havido avanços no reforço das leis sobre beber e dirigir e, atualmente, 89 países (66% da população mundial) possuem lei sobre beber e dirigir definida com limite de BAC de 0,5 g/L ou menos. Países de alta renda são mais propensos a ter um limite legal de alcoolemia de 0,5 g/L ou menos, em relação aos países de renda média ou baixa (Figura 1.1). Mesmo nos 17 países onde o consumo de bebidas alcoólicas é legalmente proibido, recomenda-se lei sobre beber e dirigir com base em uma BAC inferior ou igual a 0,5 g/L, que já se encontra em vigor em vários países, como o Mali, Marrocos e os Emirados Árabes Unidos. No entanto, ainda há necessidade de mais medidas, visto que 34 países em todo o mundo não têm qualquer lei sobre beber e dirigir (WHO, 2013).

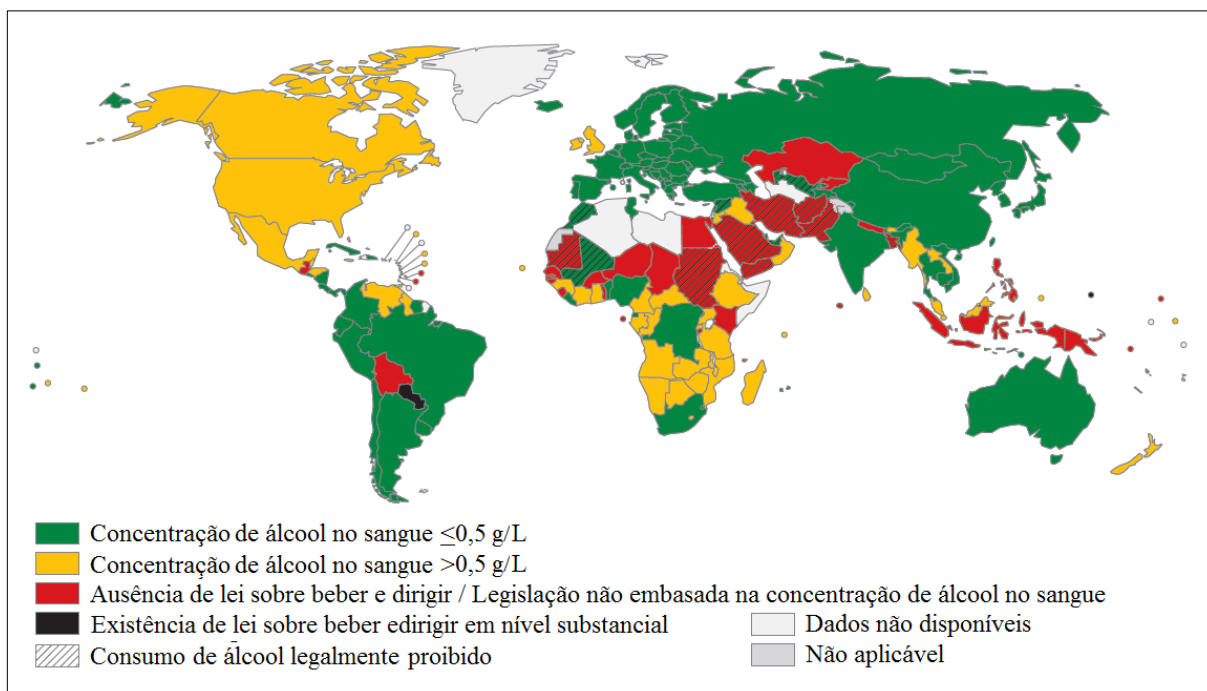


Figura 1.1 Status da legislação sobre beber e dirigir, por país/área. **Fonte:** Adaptado de World Health Organization, 2013.

A aplicação das leis sobre beber e dirigir tem se mostrado mais eficaz quando inclui o teste do etilômetro, aplicado em todos os motoristas abordados por agentes da lei, não apenas nos suspeitos de estarem alcoolizados. Além disso, as abordagens são feitas em locais e momentos mais prováveis de ocorrer os atos de beber e dirigir e esse tipo de medida acaba aumentando a percepção dos motoristas sobre a probabilidade de serem apreendidos, sendo o ponto chave para o sucesso das intervenções (RABELO, 2004; WHO, 2013; RDB, 2014). O teste do etilômetro é utilizado por 74% dos países do mundo a fim de ajudar a fazer cumprir as leis sobre beber e dirigir, mas entre esses países a proporção varia de acordo com o *status* de renda do país, sendo esta prática adotada por 88% de países com renda alta, seguido dos países de renda média (77%) e 45% dos países com renda baixa (WHO, 2013).

No Brasil, o controle do ato de dirigir sob o efeito de bebidas alcoólicas ou outra substância psicoativa que determine dependência, entre os motoristas no trânsito é realizado por pelo menos um dos procedimentos: i) BAC; ii) exames realizados por laboratórios especializados, em caso de consumo de outras substâncias psicoativas que determinem dependência; iii) Teste do etilômetro; iv) verificação dos sinais que indiquem a alteração da capacidade psicomotora do condutor (BRASIL, 2013a).

Uma das análises mais frequentes e importantes realizadas pelos laboratórios de toxicologia clínica e forense é a determinação de etanol em sangue (FELTRACO, ANTUNES, LINDEN, 2009). Embora o sangue seja a matriz preferencial para monitorar o consumo de bebidas alcoólicas entre motoristas, diversos trabalhos têm apresentado resultados com a utilização de amostras de fluido oral (FO) (GUBALA, ZUBA, 2003; YONAMINE et al, 2003; CONE, HUESTIS, 2007; FELTRACO, ANTUNES, LINDEN, 2009; ALIYEV et al., 2011; SIMONSEN et al., 2012; GJERDE et al, 2012). Portanto, a análise de etanol em amostras biológicas, como sangue, urina e FO, é frequentemente solicitada para fins legais (ALIYEV et al, 2011).

O etanol é o principal constituinte em bebidas alcoólicas. Como composto químico de baixo peso molecular ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), é polar, altamente solúvel em água (CHAPMAN, HALL, 1982; SCIVOLETTO, MALBERGIER, PILEGGI, 2008), não se liga às proteínas do plasma e se distribui facilmente por todos os tecidos do organismo, tornando-se assim um composto adequado para análise em amostras biológicas (GUBALA, ZUBA, 2003; SCIVOLETTO, MALBERGIER, PILEGGI, 2008). Devido ao fato da distribuição do etanol no organismo ser proporcional ao teor de água nos tecidos, a concentração de etanol no FO normalmente é superior à concentração encontrada no sangue (GUBALA, ZUBA, 2003; YONAMINE, 2004).

No Brasil os postos de gasolina prestam serviços aos clientes no abastecimento, limpeza e manutenção de veículos através de profissionais capacitados para estas atividades, são os trabalhadores de postos de gasolina, também chamados de “frentistas”. Estes trabalhadores encontram-se expostos diariamente aos solventes orgânicos voláteis presentes nos combustíveis durante a jornada de trabalho, sendo o etanol uma das substâncias presentes em alguns tipos de combustíveis automotivos.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a possível interferência do etanol que os frentistas ficam expostos durante a jornada de trabalho no teste do etilômetro, visto que este teste é aplicado no trânsito, o qual estes trabalhadores estão sujeitos a serem abordados a qualquer momento, inclusive logo após saírem da jornada de trabalho. Também, avaliar a efetividade do teste do etilômetro frente à análise por *headspace* acoplado a cromatografia em fase gasosa com detector de massas (HS-CG/EM) em FO desses trabalhadores.

2.1 Etanol

O etanol ou álcool etílico (Figura 2.1) apresenta-se como um líquido incolor, classificado como um monoálcool de baixo peso molecular. Possui massa molar 46,06 g mol⁻¹, pKa 15,9 e fórmula química C₂H₆O, é polar e altamente solúvel em água (CHAPMAN, HALL, 1982; SCIVOLETTO, MALBERGIER, PILEGGI, 2008).

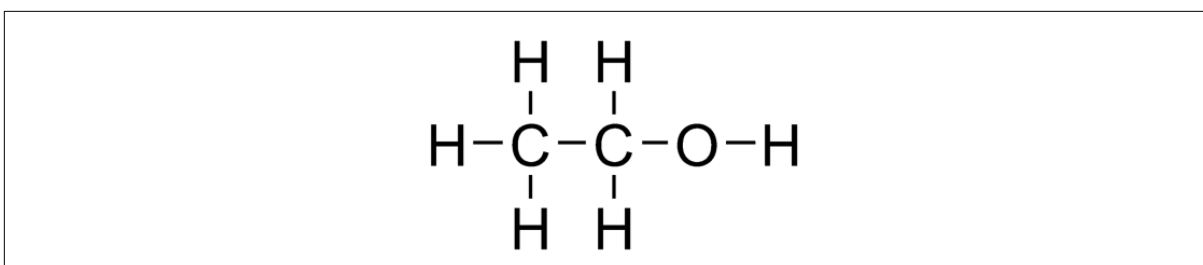


Figura 2.1. Fórmula estrutural completa do etanol. **Fonte:** Adaptado de CHAPMAN, HALL, 1982.

O etanol é o principal constituinte de bebidas alcoólicas, também utilizado como antisséptico, solvente, sedativo, na produção de produtos farmacêuticos, perfumes, combustível e como aditivo na gasolina (CHAPMAN, HALL, 1982; SCIVOLETTO, MALBERGIER, PILEGGI, 2008).

A incorporação do etanol ao organismo humano pode ser realizada por diferentes formas: pelas vias aéreas superiores, através da inalação dos vapores de etanol; por absorção cutânea, pela passagem do etanol através da pele, por absorção retal, dentre outras. Dentre estas formas considera-se a absorção pela via digestiva a mais comum (VIEIRA, 2012).

Em estudos farmacocinéticos realizados sobre o etanol, ficou demonstrado que há grandes variações individuais na sua absorção, distribuição e eliminação (VIEIRA, 2012; ELAMIN et al, 2013).

2.1.1 Absorção

Após ingestão oral o etanol é minimamente absorvido na boca e esôfago. Cerca de 20 a 70% do etanol ingerido é absorvido no trato gastrointestinal e intestino delgado proximal, respectivamente, e o restante é absorvido pelo cólon. A absorção ocorre por

difusão simples, devido ao seu pequeno tamanho molecular, solubilidade lipídica moderada, e excelente solubilidade em água (VIEIRA, 2012; ELAMIN et al, 2013).

O tempo gasto para completar a absorção é de duas a seis horas e depende de fatores que retardem ou acelerem o processo. A absorção do etanol no trato gastrointestinal depende de vários fatores que incluem esvaziamento gástrico, índice de massa corporal, sexo do indivíduo e a dosagem e concentração de etanol (VIEIRA, 2012; ELAMIN et al, 2013).

2.1.2 Distribuição

Após ser absorvido, o etanol atinge a circulação e é rapidamente distribuído por todos os fluidos do corpo, com a taxa de distribuição relacionada, principalmente, ao conteúdo de água dos tecidos e órgãos (SCIVOLETTO, MALBERGIER, PILEGGI, 2008; VIEIRA, 2012; ELAMIN et al, 2013). Através da absorção pelo trato gastrointestinal o etanol vai diretamente ao sistema porta-hepático e daí à circulação sanguínea e linfática, e já na primeira passagem pelo fígado uma parte é oxidada. Uma vez vencida esta barreira o etanol é distribuído pelos tecidos em geral. Quando chega ao sangue e é distribuído, se difunde para os tecidos e espaços intra e extracelulares em função da riqueza de água nos tecidos. Na sequência, ocorre 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 de etanol no sangue (VIEIRA, 2012).

O etanol se distribui por todo o organismo, para praticamente todos os órgãos (cérebro, glândulas genitais etc.), vísceras (fígado, rins), tecidos, humores (líquido cefalorraquidiano, amniótico etc.), secreções e excreções (leite, saliva, esperma, urina), sendo encontrado em maiores concentrações nos tecidos mais ricos em água. Portanto, no íleo terminal e no cólon, as concentrações de etanol se aproximam daquelas no sangue (SCIVOLETTO, MALBERGIER, PILEGGI, 2008; VIEIRA, 2012).

2.1.3 Metabolismo oxidativo

Embora a maior parte do etanol absorvido (90-98%) seja biotransformada no fígado (hepatócitos), também ocorre biotransformação nos tecidos do trato gastrointestinal, incluindo a cavidade oral, esôfago, estômago e intestinos delgado e grosso. O etanol é oxidado a acetaldeído, principalmente através da enzima álcool desidrogenase (ADH), localizada no citosol dos hepatócitos; pelo sistema mitocondrial de oxidação do etanol (MEOS) através do citocromo P450 2E1 (CYP2E1), nos microsomas, e pela catalase, no interior dos peroxissomos dos hepatócitos (Figura 2.2) (VIEIRA, 2012; ELAMIN et al, 2013).

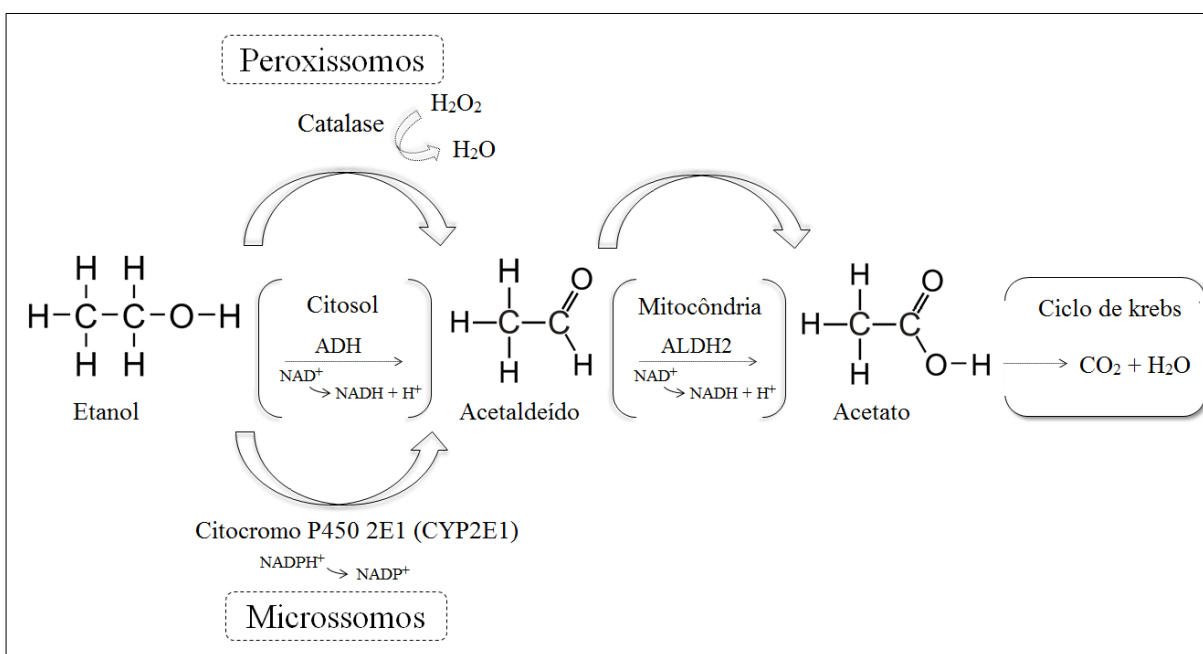


Figura 2.2 Metabolismo oxidativo do etanol nas células do fígado (hepatócitos). **ADH:** Álcool desidrogenase. **ALDH2:** Acetaldeído desidrogenase 2. **Fonte:** Adaptado de ELAMIN et al, 2013.

A ADH é a principal enzima envolvida na biotransformação do etanol e 10 isoenzimas (agrupadas em 5 classes) com diferentes propriedades cinéticas, substratos, especificidades, e distribuições de tecido têm sido relatadas (VIEIRA, 2012; ELAMIN et al, 2013). A classe I é composta pelas isoenzimas ADH1, ADH2*1, ADH2*2, ADH2*3, ADH3*1 e ADH3*2; a classe 2 pela isoenzima ADH4, a classe III pela isoenzima ADH5, a classe IV pela isoenzima ADH7 e a classe V pela isoenzima ADH6 (ELAMIN et al, 2013).

A via de biotransformação do etanol MEOS, dependente da CYP2E1, está presente em diferentes células, incluindo hepatócitos, e é responsável por menos de 10% da biotransformação do etanol sob condições normais. O MEOS torna-se ativo somente quando altas concentrações de etanol (K_m - concentração para a qual a velocidade da reação enzimática é metade da velocidade máxima- 7-10 mM) estão presentes, e a atividade desta via de biotransformação torna-se aumentada durante o consumo crônico de etanol (VIEIRA, 2012; ELAMIN et al, 2013).

A enzima catalase também é capaz de oxidar o etanol gerando acetaldeído e água, na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), sendo esta via limitada pela produção endógena deste. É considerada a via com menor participação, porém, embora a atividade da catalase tenha sido observada na mucosa gástrica e intestinal humana, não existem dados de estudos em humanos *in vivo* disponíveis sobre o seu papel na biotransformação do etanol (SCIVOLETTO, MALBERGIER, PILEGGI, 2008; VIEIRA, 2012; ELAMIN et al, 2013).

O acetaldeído, produto da oxidação do etanol, é rapidamente reoxidado no fígado e, em menor grau, na cavidade oral, esôfago, estômago, intestino, pâncreas, pela enzima aldeído desidrogenase (ALDH), a ácido acético. O acetato formado é então conjugado para formar a acetil coenzima A e em seguida é reoxidado, principalmente nos músculos esqueléticos, formando CO_2 e H_2O_2 (SCIVOLETTO, MALBERGIER, PILEGGI, 2008; VIEIRA, 2012; ELAMIN et al, 2013). Até agora, 10 isoenzimas ALDH foram caracterizadas. A classe I é composta pela isoenzima ALDH1; a classe II pela isoenzima ALDH2; classe III pela isoenzima ALDH3; classe IV pela isoenzima ALDH4; classe V pela isoenzima ALDH5; classe VI pela isoenzima ALDH6; classe VII pela isoenzima ALDH7; classe VIII pela isoenzima ALDH8; classe IX pela isoenzima ALDH9; e classe X pela isoenzima ALDH10 (ELAMIN et al, 2013).

2.1.4 Metabolismo não-oxidativo

Embora a maioria dos estudos concentra-se nos processos oxidativos, o etanol também pode ser biotransformado por pelo menos duas vias não-oxidativas. O etanol pode reagir com os fosfolipídios de membrana através da enzima Fosfolipase D,

formando fosfatidiletanol, um fosfolipídio anormal. Por não ser um constituinte normal das membranas, o fosfatidiletanol é pouco degradado e, após a acumulação intracelular interrompe a sinalização celular que normalmente limita a proliferação em diferentes tecidos, incluindo as células epiteliais intestinais. Ainda, este fosfolipídio anormal pode ser detectado no sangue podendo ser considerado um biomarcador sensível ao consumo em longo prazo e também ao consumo moderado e excessivo (CEDERBAUM, 2012; ELAMIN et al, 2013).

Outra via de biotransformação não-oxidativa consiste na reação do etanol com os ácidos graxos livres, catalisada pelas enzimas ácido graxo etil éster sintase e colesterol esterase, gerando ácidos graxos etil éster. Esse produto de biotransformação também pode ser gerado por transesterificação do etanol e ácido graxo acil-coenzima A, numa reação catalisada pela acil-coenzima A formando etanol *o*-aciltransferase. Ácidos graxos etil éster foram detectados em cabelo, coração, leucócitos, cérebro, tecido adiposo, e mecônio. No trato gastrointestinal, ácidos graxos etil éster foram encontrados acumulados no pâncreas e no fígado, uma vez que os ácidos graxos e o etanol são absorvidos pela mucosa intestinal, o intestino também é considerado um local onde a síntese de ácidos graxos etil éster pode ocorrer (CEDERBAUM, 2012; ELAMIN et al, 2013).

2.1.5 Eliminação

A maioria das isoenzimas - ADH - presentes no processo de biotransformação do etanol possuem K_m baixo (cerca de 1 mM) e as ADH's encontram-se saturadas em baixas concentrações de etanol, assim, a eliminação do etanol apresenta cinética de ordem zero, ou seja, o etanol possui uma eliminação global com uma taxa constante, independente da concentração e segue uma velocidade máxima. Contudo, não é observada linearidade em baixas concentrações de etanol visto que as isoenzimas não encontram-se saturadas. Neste caso, a eliminação do etanol segue cinética de primeira ordem e a taxa de eliminação depende da concentração de etanol (JONES, 2010; CEDERBAUM, 2012).

Além disso, a biotransformação do etanol pode ocorrer pela CYP2E1 e por algumas isoenzimas ADH que possuem K_m elevado para o etanol. Nesses casos a taxa

de eliminação é dependente da concentração de etanol, apresentando elevadas taxas de eliminação em concentrações mais altas de etanol no sangue. Devido a esta dependência da concentração, não é possível estimar uma única taxa de biotransformação do etanol (CEDERBAUM, 2012).

Cerca de 90 a 98% do etanol é biotransformado e 2 a 10% é eliminado em sua forma inalterada, pelo ar exalado, urina ou suor (SCIVOLETTO, MALBERGIER, PILEGGI, 2008; JONES, 2010; VIEIRA, 2012; ELAMIN et al, 2013). Embora as taxas variem, a capacidade média metabólica para eliminar o etanol é cerca de 170 a 240 g/dia para uma pessoa com um peso corporal de 70 kg. Esta capacidade é equivalente a uma taxa metabólica média de cerca de 7 g/h, o que se traduz em cerca de um *drink*/ hora (CEDERBAUM, 2012).

Outros fatores como sexo, idade, raça, ingestão ou não de alimento ao consumir bebidas alcoólicas, exercícios físicos, ser alcoolista e alguns medicamentos podem aumentar de 3 a 4 vezes a variabilidade da taxa de eliminação do etanol (VIEIRA, 2012; CEDERBAUM, 2012).

2.2 Combustíveis automotivos

2.2.1 Etanol

Etanol anidro combustível (EAC) é o álcool etílico anidro combustível destinado ao distribuidor para compor mistura com gasolina A na formulação da gasolina C, em proporção definida por legislação aplicável. Etanol hidratado combustível (EHC) é o álcool etílico hidratado combustível destinado à venda no posto revendedor para o consumidor final.

A Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) regulamenta que, no Brasil, no etanol hidratado combustível (EHC), destinado à venda no posto revendedor para o consumidor final, fica regulamentado teor de etanol mínimo de 94,5%, em volume, e teor de água máximo de 4,9%, em volume (BRASIL, 2011; BRASIL, 2013b). Segundo a legislação vigente, é proibida a adição de metanol tanto no EAC como no EHC, sendo o teor máximo permitido de 0,5%, em volume, sendo considerado contaminante (BRASIL, 2013b).

2.2.2 Gasolina

A ANP, classifica a gasolina automotiva em 2 tipos: A gasolina A: combustível produzido a partir de processos utilizados nas refinarias, nas centrais de matérias-primas petroquímicas e nos formuladores, destinado aos veículos automotivos dotados de motores de ignição por centelha, isento de componentes oxigenados; e a gasolina C: combustível obtido a partir da mistura de gasolina A e etanol anidro combustível, nas proporções definidas pela legislação em vigor (BRASIL, 2013b). Porém, no mercado brasileiro a gasolina apresenta outra classificação, sendo diferenciada em gasolina comum, gasolina aditivada e gasolina *premium* (Tabela 2.1) (PETROBRAS, 2014).

Tabela 2.1 Classificação das gasolinas comum, aditivada e *premium*.

	Comum	Aditivada	<i>Premium</i>
Índice Antidetonante / Octanagem (IAD)	87	87	95 (no mínimo 91)
Aditivo	-	Detergentes/dispersantes que mantêm limpo os bicos injetores e as válvulas do motor	Detergentes/dispersantes que mantêm limpo o sistema de combustão, evitando formação de depósitos no motor
Teor de enxofre(ppm)	50	50	30

Fonte: Petrobras, 2014.

A ANP e o Ministério do Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) regulamentam que, no Brasil, tanto na gasolina comum como na gasolina *premium*, ambas do tipo A, fica proibida a adição de etanol, devendo ser realizada medição quando houver dúvida quanto a ocorrência de contaminação, com limite máximo aceitável de 1% em volume. Com relação à gasolina comum e gasolina *premium*, do tipo C, produzidas a partir da mistura da gasolina do tipo A e EAC, o teor

de EAC está fixado obrigatoriamente em 25%, em volume, conforme legislação vigente (BRASIL, 2011; BRASIL, 2013b; BRASIL, 2013c).

Quando se trata de metanol, fica proibida a adição deste em todos os tipos de gasolina, sendo o teor máximo permitido de 0,5%, em volume, sendo considerado contaminante (BRASIL, 2013b).

2.2.3 Diesel

O óleo diesel de uso rodoviário classifica-se em: Óleo diesel A: combustível produzido nas refinarias, nas centrais de matérias-primas petroquímicas e nos formuladores, ou autorizado, destinado a veículos dotados de motores do ciclo Diesel, de uso rodoviário, sem adição de biodiesel; Óleo diesel B: óleo diesel A adicionado de biodiesel no teor estabelecido pela legislação vigente (BRASIL, 2013d).

2.3 Monitoramento de etanol e drogas no trânsito brasileiro

Há alguns anos veem sendo adotadas medidas para melhorar o monitoramento do consumo de etanol e drogas entre os motoristas no trânsito brasileiro. Em 2008, foram realizadas alterações no Código de Trânsito Brasileiro (CTB) através da Lei nº 11.705 de junho de 2008, “Lei Seca”, a fim de inibir o consumo de bebida alcoólica por condutor de veículo automotor (BRASIL, 2008). Em 2012 a Lei 12.760 de dezembro de 2012, “Nova Lei Seca” entra em vigor a fim de inibir ainda mais os riscos e danos à vida relacionados a acidentes de trânsito (BRASIL, 2012). Atualmente, o Conselho Nacional de Trânsito (CONTRAN) dispõe sobre os procedimentos a serem adotados pelas autoridades de trânsito e seus agentes na fiscalização do consumo de álcool ou de outra substância psicoativa que determine dependência no país através da Resolução nº 432 de janeiro de 2013 do (BRASIL, 2013a). Esta resolução determina que, quando o motorista abordado apresenta concentração de etanol no ar exalado (BrAC) igual ou superior a 0,05 mg/L ou exame de sague que apresente BAC em qualquer concentração, são aplicadas penalidade e medidas administrativas previstas. Nos casos em que são constatados BAC igual ou

superior a 6 dg/L ou BrAC igual ou superior a 0,34 mg/L, caracteriza-se crime de trânsito (BRASIL, 2013a).

Mundialmente, a unidade de medida utilizada para reportar a BAC é g/dL, porém, há outras unidades passíveis de serem adotadas que podem gerar confusão no momento da análise e interpretação de um resultado, como por exemplo a legislação brasileira, que apresenta os valores de BAC na unidade dg/L. Devido às variações nas unidades de medida, abaixo (Tabela 2.2) apresenta-se algumas possibilidades que podem ser encontradas na literatura.

Tabela 2.2 Variações das unidades de medida de alcoolemia (BAC).

Unidade	g/L*	g/dL**	dg/L***
	0,5	0,05	5

*g/L: gramas por litro; **gramas por decilitro; ***decigramas por litro.

2.4 Etilômetro

Etilômetros são utilizados por agentes da lei para determinar com precisão a BrAC, esta que, por sua vez, se correlaciona com a BAC (CARAVATI, ANDERSON, 2010). Os etilômetros podem apresentar diferentes tipos de detectores, sendo os principais os detectores de infravermelho, presentes nos dispositivos portáteis e de bancada, os detectores baseados em oxidações químicas ou eletroquímicas, os semicondutores e os que possuem duplos sensores, que utilizam a associação do detector de infravermelho e das células eletroquímicas (CARAVATI, ANDERSON, 2010; PASSAGLI, MARINHO, 2011).

No Brasil, um dos aparelhos do teste do etilômetro mais utilizado para fiscalizar o trânsito brasileiro, da marca Alco-Sensor IV (Figura 4), com bocais descartáveis, apresenta detector baseado em sensor de célula eletroquímica (célula de combustão) com programação de integração do sinal, gerando uma resposta eletrônica que é proporcional à BrAC na amostra captada (RBD, 2014). Assim, quando há presença de

etanol no ar exalado pelo indivíduo, juntamente com oxigênio e um catalisador, ocorrem reações químicas com liberação de elétrons (oxidação), gerando uma corrente elétrica que é mensurada, fornecendo o resultado do teste (ROSSY, VASCONCELOS, 2014).



Figura 2.3 Etilômetro Alco-Sensor IV. **Fonte:** Ribco do Brasil, 2014.

A conversão dos valores obtidos em miligrama de álcool por litro de ar exalado, para o equivalente à concentração de etanol no sangue total, é baseada nos princípios da Lei de Henry, que estabelece a relação da concentração de etanol no sangue e a concentração no ar exalado como 1/2000, ou seja, 2 litros de ar exalado contém aproximadamente a mesma quantidade de etanol que um mililitro de sangue (PASSAGLI, MARINHO, 2011).

Algumas questões devem ser discutidas com relação ao uso do etilômetro, por exemplo, a sua incapacidade de reportar com precisão a presença de componentes orgânicos voláteis interferentes, fornecendo uma leitura falsamente positiva (reação cruzada) (RABELO, 2004; CARAVATI, ANDERSON, 2010). O Isopreno, produzido endogenamente, em elevadas concentrações pode ser encontrado na respiração (BUCKLEY et al, 2001). Outros compostos voláteis como metano, acetona, acetaldeído, metanol, isopropanol, monóxido de carbono, tolueno, acetato de etila, metano e éter dietílico também podem interferir na leitura do equipamento, produzindo resultados falso-positivos (BUCKLEY et al, 2001; RABELO, 2004; SPINELLI, 2004;

ROSSY, VASCONCELOS, 2014). Além dos corpos cetônicos produzidos em jejum prolongado, em dietas específicas e em indivíduos diabéticos (RABELO, 2004; SPINELLI, 2004; CARAVATI, ANDERSON, 2010; ROSSY, VASCONCELOS, 2014), pode haver também a presença residual de etanol na boca, podendo alterar a relação sangue/ar exalado, levando a resultados falsamente elevados na leitura do equipamento quando do consumo recente (RABELO, 2004; BUENO et al, 2014). Há também o fato do equipamento se basear na medida do teor alcoólico apenas ao longo do aparelho respiratório através do ar exalado e não na corrente sanguínea (RABELO, 2004).

2.5 Fluido oral

2.5.1 Composição

O termo “fluido oral” refere-se à matriz biológica constituída de saliva pura excretada pelas glândulas salivares juntamente com fluido crevicular gengival (exsudato gengival), transudato da mucosa oral, fragmentos celulares, microorganismos e resíduos de alimentos (SOUZA, 2011; ÁLAMO et al, 2012; LANGEL, et al, 2013).

A saliva é formada pelas secreções de três pares de glândulas principais: submandibulares, parótidas e sublinguais, além de outras glândulas menores (DRUMMER, 2006; SOUZA, 2011, CARPENTER, 2013; BUENO et al, 2014). Apresenta caráter de um fluido viscoso e incolor, composta por 99% de água, 0,3% de enzimas, 0,3% de glicoproteínas e o restante por eletrólitos, imunoglobulinas, albumina e outras proteínas e peptídeos (DRUMMER, 2006; SOUZA, 2011, CARPENTER, 2013). O pH do FO encontra-se na faixa de 6,2 a 7,4, (CROUCH, 2005; COMIRAN et al, 2012), podendo aumentar quando sua produção é estimulada (CROUCH, 2005; DRUMMER, 2006).

A transferência de substâncias do sangue para o FO ocorre principalmente por difusão passiva (SOUZA, 2011; COMIRAN et al, 2012; MALATHI, MYTHILI, VASANTHI, 2014) e é dependente de inúmeros fatores, incluindo as propriedades químicas da substância (lipofilicidade, pKa, tamanho molécula), pH do sangue e do

FO, a concentração de substância não-ionizada (substância ionizada não difunde passivamente através das membranas celulares) e de proteínas de ligação (somente a fração livre pode difundir). Portanto, este tipo de transporte só ocorre com moléculas não-ionizadas e não ligadas a proteínas plasmáticas, as quais conseguem atravessar livremente as membranas a favor do gradiente de concentração. Devido às glândulas salivares serem altamente perfundidas, a transferência de substâncias do sangue para o FO ocorre rapidamente (SOUZA, 2011; COMIRAN et al, 2012).

Ainda, compostos básicos que apresentam constantes de pKa elevadas apresentam maior ionização no sangue (pH 7,4) do que compostos com constantes de pKa inferiores; e compostos ácidos que apresentam constantes de pKa inferiores apresentam maior ionização no sangue (pH 7,4) do que compostos com constantes de pKa mais elevados. O pKa interfere na transferência de compostos básicos do sangue para o FO e do FO para o sangue. Sendo assim, o caráter ácido do FO permite a acumulação de substâncias básicas em concentrações maiores do que substâncias neutras ou ácidas (CONE, HUESTIS, 2007; SOUZA, 2011).

2.6 Metodologia para análise de etanol em amostras biológicas

É possível realizar análise de FO, urina ou sangue, por cromatografia em fase gasosa (CG), utilizando a técnica de câmara de expansão ou *headspace* (HS) (BUENO, 2014), que consiste em submeter determinada amostra a uma temperatura e agitação pré-estabelecidas, no interior de um frasco de vidro equipado com uma tampa seladora e um septo. Os analitos volatilizam no interior do frasco até atingir equilíbrio, formando uma fase de vapor chamada HS. Por fim, o septo é perfurado com uma seringa e realiza-se a coleta o analito, livre de interferentes da amostra (GOBATO, LANÇAS, 2001; BERNAL, 2012; RESTEK, 2014; BUENO et al, 2014).

O HS tem sido associado à CG para fins de análise de compostos orgânicos voláteis, considerada uma técnica simples e direta que evita o preparo das amostras e proporciona desta forma, menor custo e rapidez das análises. Como a técnica de HS leva à concentração dos compostos voláteis presentes na amostra, garante uma maior

sensibilidade nas análises (BERNAL, 2012; RESTEK, 2014), além de prolongar a vida útil da coluna e também prevenir à contaminação do injetor do cromatógrafo a gás (DE MARTINIS, RUZZENE, MARTIN, 2004).

Assim, a preparação de amostras biológicas, como o FO, para determinação de etanol por HS não exige procedimentos complexos, o etanol evapora facilmente sob ligeiro aquecimento e agitação, e a fase de vapor resultante sem interferentes pode ser injetada diretamente no cromatógrafo a gás (GOBATO, LANÇAS, 2001; BERNAL, 2012; RESTEK, 2014; BUENO et al, 2014).

2.6.1 Monitoramento de etanol em fluido oral

Nos últimos anos o emprego do FO para monitorar o consumo de etanol e outras drogas teve aumento significativo em vários países do mundo (GUBALA, ZUBA, 2002; CONE, HUESTIS, 2007; DRUMMER et al, 2007; BOSKER, HUESTIS, 2009; GJERDE et al, 2011; CHU et al, 2012; ZANCANARO et al, 2012). Esta matriz biológica apresenta inúmeras vantagens frente ao sangue, matriz usualmente empregada e tida como padrão-ouro para análise confirmatória da concentração de etanol no organismo de motoristas, como o fato da coleta não ser invasiva, de fácil aplicação, rápida e assistida, o que dificulta a adulteração da amostra por parte do doador (GUBALA, ZUBA, 2003; YONAMINE, 2004; GJERDE et al, 2011; CHU et al, 2012; ZANCANARO et al, 2012; LANGEL, et al, 2013; BUENO et al, 2014).

A concentração de etanol no FO apresenta-se superior à plasmática devido ao seu maior conteúdo de água e menor concentração de lipídeos (GUBALA, ZUBA, 2003; YONAMINE, 2004). Gubala, Zuba (2002) analisaram de forma controlada as concentrações de etanol no FO e no plasma após a ingestão de bebidas alcoólicas e obtiveram uma relação média entre FO/plasma de 1,08. Jones (1993) encontrou uma razão média FO/plasma de 1,094, sendo esta razão constante durante as fases de absorção, distribuição e eliminação do etanol pelo organismo.

A fim de verificar se a concentração de etanol no FO e no ar exalado, e no FO e na urina se correlacionavam, Bueno e colaboradores (2014) observaram uma associação linear existente entre as concentrações de FO e ar exalado e FO e urina

utilizando a correlação de Pearson (F). O FO correlacionou-se significativamente tanto com a urina (F = 0,93 – mulheres; F = 0,91 – homens) como com o ar exalado (F = 0,88 – mulheres; F = 0,96 – homens).

2.7 Dispositivo de coleta

A coleta de FO pode ser realizada por diferentes maneiras (BOSKER, HUESTIS, 2009; BUENO et al, 2014). Uma alternativa é que o FO flua a partir da cavidade oral para um recipiente, aspirando à amostra através de um tubo de vácuo, ou colocando um pequeno dispositivo de algodão na boca do indivíduo para estimular a formação de fluido oral e reter o líquido (BUENO et al, 2014). A coleta pode ser realizada também através da técnica de baba passiva ou da expectoração. Apesar das coletas de FO realizadas sem dispositivo de coleta ser consideradas mais úteis, o processo de coleta é constrangedor tanto para o doador como para o coletador. Diante da situação, hoje em dia os coletadores fazem uso de algum dispositivo para a coleta de FO (BOSKER, HUESTIS, 2009).

Além do dispositivo de algodão, outros estimulantes podem ser utilizados a fim de aumentar a excreção de saliva, como a mastigação de parafina ou a incorporação de ácido cítrico ou outras substâncias químicas nos dispositivos de coleta (BOSKER, HUESTIS, 2009; BUENO et al, 2014). No entanto, a estimulação deve ser realizada apenas em circunstâncias especiais (BOSKER, HUESTIS, 2009) visto que existem vários problemas potenciais associados com a estimulação da produção de saliva (CROUCH, 2005).

Uma das limitações mais importantes dos dispositivos de coleta é a adsorção de substâncias no dispositivo, que muitas vezes leva a resultados de testes falso-negativos (BOSKER, HUESTIS, 2009). A parafina contém compostos que podem afetar a precisão de análises cromatográficas de drogas. A estimulação da salivação pode alterar a composição da saliva, afetando as concentrações de drogas no FO. A estimulação com ácido cítrico muda o pH do FO, podendo alterar as concentrações das substâncias nele presentes (CROUCH, 2005). Alguns dispositivos de coleta contêm tampão e surfactantes que podem interferir nas técnicas de injeção direta dos métodos,

aumentando o efeito de matriz, além da recuperação do método poder apresentar problemas (BOSKER, HUESTIS, 2009).

Geralmente, cerca de 1 mL de FO é coletado, sendo o baixo volume de amostra e a variabilidade da quantidade de FO coletada uma das principais desvantagens reportadas (BOSKER, HUESTIS, 2009; BUENO, et al 2014). Alguns dos dispositivos de coleta têm indicadores de volume, facilitando a coleta adequada. Com o uso desses indicadores, o coletador pode manter o dispositivo na boca do doador o tempo que for necessário para a coleta do volume adequado. Outra abordagem é a determinação gravimétrica pesando o dispositivo antes e depois da coleta do FO (BOSKER, HUESTIS, 2009).

O dispositivo escolhido para a coleta das amostras de FO dos frentistas neste estudo foi o QuantisalTM (Figura 5) (Immunoanalysis Corporation, Pomona, California) por possuir indicativo do volume de coleta (1 mL), facilitando assim a obtenção de volumes homogêneos de amostras de FO além de possuir tampão conservante. Também, pelo fato de já ter sido previamente utilizado e validado pelo nosso grupo de pesquisa, a exemplo dos trabalhos realizados por SOUZA et al (2011), ZANCANARO et al (2012), COMIRAN et al, (2012) e SANTOS, et al (2014). Alguns fabricantes já oferecem garantias do grau de variabilidade da coleta, sendo relatada variabilidade menor do que 10% para o dispositivo de coleta QuantisalTM (BOSKER, HUESTIS, 2009). Na Figura 6 está representada ilustrativamente a metodologia de coleta utilizando o dispositivo QuantisalTM:



Figura 2.4 Dispositivo de coleta Quantisal™. **Fonte:** Immualysis corporation, 2014).

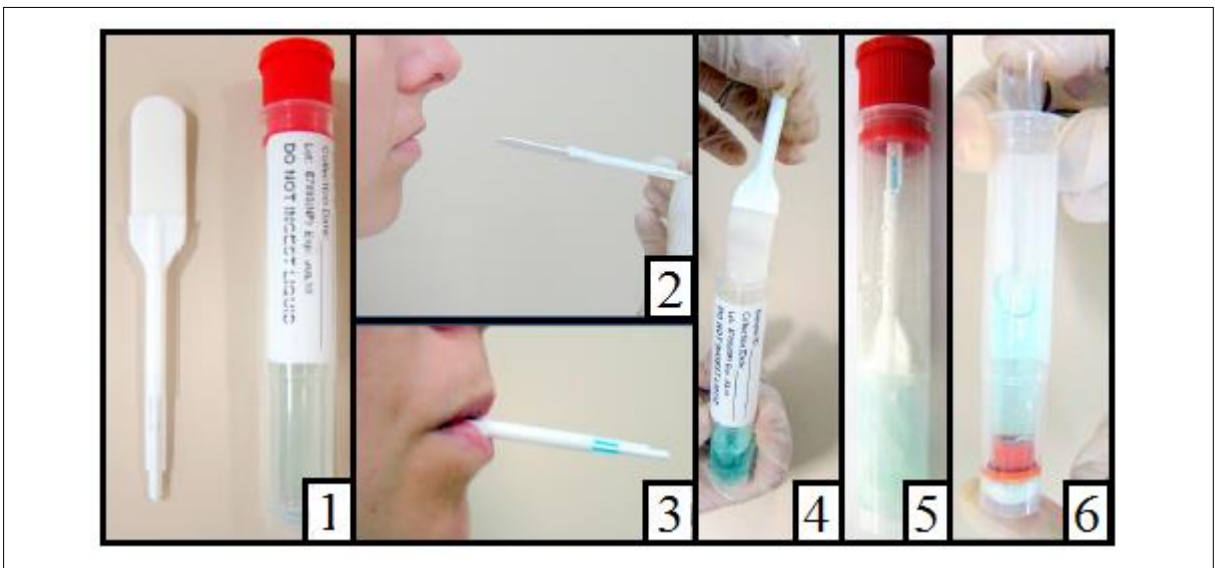


Figura 2.5 Coleta de fluido oral com dispositivo de coleta Quantisal™: 1. Dispositivo de coleta e frasco com tampão conservante; 2. Insira o dispositivo coletor sob a língua; 3. Aguarde até o indicador de volume tornar-se azul; 4. Insira o dispositivo no frasco com tampão conservante; 5. Feche a tampa do frasco; 6. Após remover a haste plástica do dispositivo, insira o filtro plástico Quantisal™ para separar a solução do suab coletor.

3.1 Objetivo geral

Determinar etanol em trabalhadores de postos de gasolina.

3.2 Objetivos específicos

- i. Analisar através do teste do etilômetro a exposição ao etanol em trabalhadores de postos de gasolina;
- ii. Analisar qualitativamente e quantitativamente a exposição ao etanol, em fluido oral de trabalhadores de postos de gasolina, por *headspace* acoplado a cromatografia em fase gasosa com detector de massas;
- iii. Avaliar a efetividade do teste do etilômetro frente à análise por *headspace* acoplado a cromatografia em fase gasosa com detector de massas, em fluido oral de trabalhadores de postos de gasolina.

Resumo dos resultados submetidos à publicação em Revista Científica:

Amostras pareadas de ar exalado e FO ($n = 162$) foram coletadas de atendentes de postos de gasolina em 26 postos de gasolina distintos, localizados nas seguintes cidades do sul do Brasil: Porto Alegre (7), Canoas (9), Eldorado do Sul (2), Guaíba (1), Osório (3), Portão (1) e São Leopoldo (1).

A população foi constituída, em média, por jovens ($31,7 \pm 10,7$ anos), a maioria era do sexo masculino (70,99%) e tanto os homens ($26,6 \pm 4,90$) como as mulheres ($26,2 \pm 4,29$) estavam acima do peso, considerando o índice de massa corporal (IMC). Do total, 4,3% dos participantes relataram ter diabetes e 45,8% relataram ter um ou mais parentes com a doença.

O comportamento dos trabalhadores de postos de gasolina sobre beber e dirigir foi avaliado através do questionário aplicado. Mais da metade dos atendentes de postos de gasolina (63,3%) relataram dirigir carro ou moto todos os dias. Quando questionados sobre ingerir bebidas alcoólicas em qualquer quantidade no último ano, 128 indivíduos (79%) responderam sim. Do total de trabalhadores de postos de gasolina que responderam ter ingerido bebidas alcoólicas no último ano e dirigir (87), 29,9% responderam ter consumido bebidas alcoólicas imediatamente antes de dirigir. Quando questionado a população total sobre ter sofrido acidentes de trânsito, 35,8% dos indivíduos responderam sim. Do total de indivíduos que dirige, ingeriu bebidas alcoólicas no último ano e já sofreu acidentes de trânsito (50), 94% responderam ser o motorista no momento do acidente e destes 6,38% responderam estar sob efeito de bebidas alcoólicas no momento do acidente.

Do total de amostras de ar exalado (162), apenas uma apresentou resultado positivo (0,03 mg/L) para o teste do etilômetro, enquanto que todas as amostras de FO apresentaram resultado positivo para etanol, estando acima do limite de detecção do método (0,005 g/L).

Entre as amostras de FO com resultado positivo, 72,83% apresentaram concentrações acima do limite de quantificação do método, porém, abaixo do limite de quantificação da curva de calibração ($\sim 0,0125$ -0,05 g/L), exceto uma amostra de FO quantificável, com resultado 0,05 g/L.

A amostra de ar exalado positiva tratava-se do mesmo indivíduo que apresentou concentração de etanol quantificável na amostra de FO. Porém, como apenas um trabalhador de postos de gasolina apresentou resultado positivo para o teste do etilômetro, e apenas uma amostra de FO foi quantificada, os resultados não apresentaram variabilidade, portanto, não foi possível aplicar testes estatísticos para grupos pareados.

Das 162 amostras positivas para o etanol em FO, 70,99% dos indivíduos eram do sexo masculino e 29,01% eram do sexo feminino. Quando analisados por idade, a maior proporção de etanol positivo nas amostras de FO foram de indivíduos com 25-36 anos de idade (35,19%), seguido de 18-25 anos (33,95%).

Mundialmente, a definição e aplicação de limites de alcoolemia de 0,5 g/L podem levar a reduções significativas em acidentes relacionados ao consumo de bebidas alcoólicas. Desde 2008 tem havido progressos no reforço leis sobre beber e dirigir e atualmente 89 países, já possuem legislação sobre DUI de álcool com um limite de BAC de 0,5 g/L ou menos, sendo considerado como um limite adequado visto que o risco de acidentes aumenta significativamente com BAC acima dessa concentração (WHO, 2013; GJERDE et al, 2014).

Atualmente a técnica mais utilizada para a confirmação da BAC em laboratórios forenses é a técnica de *headspace* acoplada a cromatografia em fase gasosa acoplada a detector de ionização em chama (HS-GC/FID), porém, esta permite a ocorrência de resultados falsos positivos com outros álcoois e compostos voláteis tais como metanol e outros solvents voláteis. Assim, o uso da técnica de HS-CG/EM, capaz de distinguir com alta confiabilidade os diferentes tipos de álcoois, pode ser considerada "padrão ouro" para confirmação dos resultados inequívocos.

O FO provou ser uma ótima opção de amostra biológica para a coleta no local da abordagem. Neste trabalho, além de fácil e rápida realização, as coletas foram assistidas, sem possibilidade de adulteração. Também não houve constrangimento por parte dos frentistas. Além disso, não houve a necessidade de profissional especializado para a realização das coletas.

As análises de FO por HS-CG/EM apresentaram mais resultados positivos em relação ao teste do etilômetro para análise de etanol. Enquanto apenas uma amostra de ar exalado (0,62%) apresentou resultado positivo (0,03 mg/L), todas as amostras de FO (100%) apresentaram resultado positivo para o etanol por HS-CG/EM. Destas amostras positivas, 72,83% (118 amostras) estavam acima do limite de quantificação do método, porém, abaixo do limite inferior de quantificação da curva de calibração do mesmo, sendo, portanto amostras semiquantificáveis.

Embora uma amostra tenha apresentado resultado positivo para o teste do etilômetro, a leitura do teste encontrava-se abaixo do limite de erro máximo admissível preconizado, gerando incerteza com relação ao resultado do teste e demonstrando assim, a importância da realização de análise confirmatória, e da necessidade da amostra ser coletada em período mais próximo possível da realização do teste.

Apesar das baixas concentrações encontradas no FO dos trabalhadores de postos de gasolina, a concentração de etanol nesta matriz é dependente da concentração de etanol no sangue. Porém, em algumas legislações de trânsito o limite permitido de etanol em sangue de motoristas é igual à zero, de forma que qualquer nível de etanol detectado pode vir a gerar complicações legais para o motorista.

Diferentes concentrações de etanol nas diferentes matrizes biológicas são explicadas pelo fato do etanol ser distribuído no organismo por difusão passiva, ou seja, depende da concentração de água presente nos tecidos (COMIRAN et al, 2012; MALATHI, MYTHILI, VASANTHI, 2014). Além disso, a diferença de pH nas matrizes biológicas também pode influenciar na concentração das substâncias (CONE, HUESTIS, 2007). Portanto, a concentração de etanol encontrada no FO é normalmente superior à encontrada no sangue (GUBALA, ZUBA, 2003; YONAMINE, 2004). Baseada na Lei de Henry, a conversão da concentração de etanol no ar exalado e no sangue estabelecida é que 2 litros de ar exalado contém aproximadamente a mesma concentração do que um mililitro de sangue (PASSAGLI, MARINHO, 2011). Em relação ao estudo, os resultados positivos nas amostras de FO e os resultados negativos nas amostras de ar exalado podem ser explicados pelo fato da concentração de etanol no ar axalado ser mais baixa em relação à concentração de etanol no FO. Também, pela possibilidade do método de análise em FO por HS-CG/EM ser mais sensível do que o teste do etilômetro.

Uma importante vantagem do FO em relação ao sangue, é que o FO pode ser coletado no próprio local da abordagem, imediatamente após a realização do teste do etilômetro. Além disso, para a realização da coleta de sangue é necessário deslocar o indivíduo até o laboratório e, dependendo da demora, é possível passar do período da janela de detecção ou também, encontrar concentrações bem distintas do equivalente à concentração de etanol que o indivíduo apresentava no momento da abordagem.

A frequência de amostras positivas para o etanol foi maior entre indivíduos de 25-36 anos, mesma faixa etária da população mais envolvida em acidentes, conforme demonstrado em vários estudos, inclusive no Brasil (NERY-FILHO et al, 1997; CARVALHO et al, 2002; MURA et al, 2003; PEREIRA et al, 2011; SCHNEIDER et al, 2012; GJERDE et al, 2013).

Devido à discussão sobre a incapacidade do teste do etilômetro em reportar a presença de componentes orgânicos voláteis interferentes (RABELO, 2004; CARAVATI, ANDERSON, 2010) como os corpos cetônicos produzidos em jejum prolongado, em dietas específicas e em indivíduos diabéticos (RABELO, 2004; SPINELLI, 2004; CARAVATI, ANDERSON, 2010; ROSSY, VASCONCELOS, 2014), esta população foi estratificada e avaliada. Apesar de 4,3% dos frentistas ter relatado ser diabético e 45,8% reportar que algum familiar próximo é portador da doença, contudo, nenhuma interferência foi observada no estudo.

Estudos relatam que há diferenças na eliminação do etanol entre o sexo feminino e masculino devido às mulheres ter maior porcentagem de gordura e menos água no corpo, por kg de peso corporal, em relação aos homens. Diante das diferenças apresentadas entre os sexos, a taxa de eliminação do etanol torna-se mais rápida em mulheres (JONES, 2010; CEDERBAUM, 2012). Embora a eliminação do etanol seja diferente entre homens e mulheres, neste estudo, todos os indivíduos, tanto do sexo masculino (70,99%) como do sexo feminino (29,01%), apresentaram resultados positivos para o etanol.

Neste trabalho foi possível analisar a presença de etanol em trabalhadores de postos de gasolina pelo teste do etilômetro e também qualitativamente e quantitativamente através da análise em fluido oral por *headspace* acoplado a cromatografia em fase gasosa com detector de massas.

Os resultados deste trabalho demonstram que o teste do etilômetro seja menos efetivo quando comparado à análise de fluido oral por *headspace* acoplado a cromatografia em fase gasosa com detector de massas, demonstrando a importância da análise confirmatória do teste do etilômetro.

Assim como tem sido demonstrado em diversos estudos, no presente trabalho o FO demonstrou ser uma amostra cada vez mais promissora para análises forenses, em particular para análises em que há necessidade da matriz biológica ser coletada no próprio local da abordagem.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram a necessidade de maiores estudos tanto com relação à exposição ocupacional ao etanol e a gasolina pelos trabalhadores de postos de gasolina, como com relação à efetividade dos testes realizados com etilômetros, principalmente quando se trata de legislações de trânsito que utilizam este teste para avaliar motoristas no trânsito e que consideram limite de tolerância igual à zero para concentrações de etanol no sangue, como por exemplo, a legislação brasileira.

ÁLAMO, S. M; FRANCH, A. M; GAMARRA, C. M; FABUEL, L. C. Saliva as a diagnostic fluid. Literature review. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, v. 4, n. 4, p. 237-243, 2012. Review.

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

BERNAL, E. Gas Chromatography in Plant Science, Wine Technology, Toxicology and Some Specific Applications; Salih, B.; Çelikbıçak, O. eds.; **InTech**: México, cap. 10, 2012.

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

BRASIL. Lei nº 11.705, de 19 de junho de 2008. In: **Diário Oficial da União**, Brasília, 20 de junho de 2008.

BRASIL. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Resolução ANP nº 7, de 9 de fevereiro de 2011. In: **Diário Oficial da União**, Brasília, 10 de fevereiro de 2011.

BRASIL. Lei nº 12.760, de 20 de dezembro de 2012. In: **Diário Oficial da União**, Brasília, 21 de dezembro de 2012.

BRASIL. Conselho Nacional de Trânsito (CONTRAN). Resolução nº432, de 23 de janeiro de 2013. Dispõe sobre os procedimentos a serem adotados pelas autoridades de trânsito e seus agentes na fiscalização do consumo de álcool ou de outra substância psicoativa que determine dependência, para aplicação do disposto nos arts. 165, 276,

277 e 306 da Lei nº 9.503, de 23 de setembro de 1997 – Código de Trânsito Brasileiro (CTB). In: **Diário Oficial da União**, Brasília, 28 de janeiro de 2013a.

BRASIL. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Resolução ANP nº 40, de 25 de outubro de 2013. In: **Diário Oficial da União**, Brasília, 28 de outubro de 2013b.

BRASIL. Ministério do Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria MAPA nº 105, de 28 de fevereiro de 2013. In: **Diário Oficial da União**, Brasília, 01 de março de 2013c.

BRASIL. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Resolução ANP nº 50, de 23 de dezembro de 2013. In: **Diário Oficial da União**, Brasília, 24 de dezembro de 2013d.

BUCKLEY, T. J; JOACHIM, D. P; BOWYER, J. R; DAVIS, J. M. Evaluation of methyl *tert*-butyl ether (MTBE) as an interference on commercial breath-alcohol analyzers. **Forensic Science International**, v. 123, p. 111-118, 2001.

BUENO, L. H. P; DA SILVA, R. H. A; AZENHA, A. V; DIAS, M. C. DE S; DE MARTINIS, B. S. Oral fluid as an alternative matrix to determine ethanol for forensic purposes. **Forensic Science International**. v. 242, p. 117-122, 2014.

CARVALHO, C. G; CONTRIM, B. C; SILVA, A.O; SAUAIA, N. Blood alcohol content prevalence among trauma patients seen at a level 1 trauma center, **Revista de Saúde Pública**. v. 36, n. 1, p. 47-54, 2002.

CARAVATI, E. M; ANDERSON, K. T. Breathalyzer Mistakes Methanol Poisoning for Alcohol Intoxication. **Annals of Emergency Medicine**, v. 55, n. 2, p. 198-200, 2010.

CARPENTER, G. H. The Secretion, Components, and Properties of Saliva. **The Annual Review of Food Science and Technology**, v. 4, p. 267–276, 2013.

CEDERBAUM, A. I. Alcohol Metabolism. **Clinics In Liver Disease**, v. 16, p. 667-685, 2012.

CHAMPMAN; HALL. **Dictionary of organic compounds**. 5ª edição, New York, London, Toronto: Chapman, 1982, v. 5, p :il.

COMIRAN, E; SOUZA, D. Z; BOEHL, P. O; MARIOTTI, K. C; PECHANSKY, F; DUARTE, P. A. V; DE BONI, R. B; FRÖEHLICH, P. E; LIMBERGER, R. P. Fenproporex and Amphetamine Pharmacokinetics in Oral Fluid After Controlled Oral Administration of Fenproporex. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 0, n. 0, p. 1-9, 2012.

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

CHU, M.; GEROSTAMOULOS, D.; BEYER, J.; RODDA, L.; BOORMAN, M.; DRUMMER, O. H. The incidence of drugs of impairment in oral fluid from random roadside testing. **Forensic Science International**. v. 215, p. 28-31, 2012.

CROUCH, D. J. Oral fluid collection: The neglected variable in oral fluid testing. **Forensic Science International**, v. 150, p. 165–173, 2005.

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

DRUMMER, O. H. Drug Testing in Oral Fluid. **The Clinical Biochemist Reviews**, v. 27, p. 147-159, 2006. Review.

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

ELAMIN, E. E; MASCLEE, A. A; DEKKER, J; JONKERS, D. M. Ethanol metabolism and its effects on the intestinalepithelial barrier. **Nutrition Reviews**, v. 71, n. 7, p. 483–499, 2013.

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

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

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

GJERDE, H; CHRISTOPHERSEN, A. S; NORMANN, P. T; MØRLAND, J. Associations between substance use among car and van drivers in Norway and fatal injury in road traffic accidents: A case-control study. **Transportation Research Part F**, v. 17, p. 134-144, 2013.

GJERDE, H; SOUSA, T. R; DE BONI, R; CHRISTOPHERSEN, A. S; LIMBERGER, R. P; ZANCANARO, I; ØIESTAD, E. L; NORMANN, P. T; MØRLAND, J; PECHANSKY, F. **International Journal of Drug Policy**, v. 25, p. 393-400, 2014.

GOBATO, E. A. A. F.; LANÇAS, F. M. Comparação entre injeção na coluna (“on-column”) e headspace dinâmico na determinação de benzeno, tolueno e xilenos (BTX) em amostras de água. **Química Nova**, v. 24, n. 2, p. 176-179, 2001.

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

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

IMMUNALYSIS CORPORATION. **Quantisal™ - Oral Fluid Collection Device**. Disponível em: <<http://immunalysis.com/oral-fluid/quantisal>>. Acesso em: 13 de Junho de 2014.

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

JONES, A. W. Evidence-based survey of the elimination rates of ethanol from blood with applications in forensic casework. **Forensic Science International**, v. 200, p. 1-20, 2010.

LANGEL, K.; GJERDE H.; FAVRETTO, D.; LILLSUNDE, P.; ØIESTAD, E. L.; FERRARA, S. D.; VERSTRAETE, A. G. Comparison of drug concentrations between whole blood and oral fluid. **Drug Testing and Analysis**. 2013.

MALATHI, N; MYTHILI, S; VASANTHI, H. R. Salivary Diagnostics: A Brief Review. **ISRN Dentistry**, v. 2014, p. 1-8, 2014. Review.

MURA, P; KINTZ, P; LUDES, B; GAULIER, J.M; MARQUET, P; MARTIN-DUPONT, S; VINCENT, F; KADDOUR, A; GOULLÉ, J.P; NOUVEAU, J; MOULSMA, M; TILHET-COARTET, S; POURRAT, O. Comparison of the prevalence of alcohol, cannabis and other drugs between 900 injured drivers and 900 control subjects: results of a French collaborative study, **Forensic Science International**, v. 133, p. 79-85, 2003.

NERY-FILHO, A; MEDINA, M.G; MELCOP, A. G; OLIVEIRA, E. M. **Impacto do uso do álcool e outras drogas em vítimas de acidentes de trânsito**. Associação Brasileira dos Departamentos Estaduais de Trânsito (ADBETAN), Brasília (DF), 1997.

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

PEREIRA, R. E; PERDONA, G. S. C; ZINI, L. C; CURY, M. B. S; RUZZENE, M. A. M; MARTIN, C. C. S; DE MARTINIS, B. S. Relation between alcohol consumption and traffic violations and accidents in the region of Ribeirão Preto, São Paulo State. **Forensic Science International**, v. 207, p. 164-169, 2011.

PETROBRAS. Produtos Automotivos. **Gasolina Petrobras**. Disponível em: <<http://www.br.com.br/>>. Acesso em: 13 de Junho de 2014.

RBD. Ribco do Brasil. Equipamentos para Segurança. **Etilômetro Alco-Sensor IV**. Disponível em: <<http://www.ribcodobrasil.com.br/index.php/etilometro-alco-sensor-iv>>. Acesso em: 17 de Junho de 2014.

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

RESTEK. **A Technical Guide for Static Headspace Analysis Using GC**. Disponível em: <<http://www.restek.com/pdfs/59895B.pdf>>. Acesso em: 31 de janeiro de 2014.

ROSSY, J; VASCONCELOS, J. Etilômetro: História, características técnicas, mecanismos de análises, verdades, mitos e curiosidades. In. PECHANSKY, P; VON DIEMEN, L; GONÇALVES, V. M.. **Aperfeiçoamento em técnicas para fiscalização do uso de álcool e outras drogas no trânsito brasileiro**. 2ª edição, Brasília:Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas-SENAD, 2014, 248 p :il.

SANTOS, M. K; BORILLE, B. T; CRUZ, G. N. F; COPPE, B. C; COMIRAN, E; KAISER, S; FROEHLICH, P. E; LIMBERGER, R. P. Extraction optimization using Box–Behnken design and method validation for ethanol in oral fluid. **Analytical Methods**, v. 6, p. 6095-6104, 2014.

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

SCHNEIDER, W. H; SAVOLAINEN, P. T; BOXELA, D. V; BEVERLEY, R. Examination of factors determining fault in two-vehicle motorcycle crashes. **Accident Analysis and Prevention**, v. 45, p. 669- 676, 2012.

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

SOUZA, D. Z; **Determinação de estimulantes anfetamínicos no fluido oral: Especificidade dos métodos de triagem e análise confirmatória.** Dissertação (Mestrado). 2010. Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

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

UNODC. United Nations Office on Drugs and Crime. **World Drug Report 2012.** Nova York: United Nations Publication, Sales No. E.13.XI.6, 2012.

VIEIRA, J. M. F. **Metabolismo do etanol.** Tese (Doutorado). 2012. Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa.

WHO. World Health Organization. **Global status report on road safety 2013.** Geneva, 2013.

YONAMINE, M; TAWIL, N; MOREAU, R. L. M; SILVA, A. O. Solid-phase micro-extraction–gas chromatography–mass spectrometry and headspace-gas chromatography of tetrahydrocannabinol, amphetamine, methamphetamine, cocaine and ethanol in saliva samples. **Journal of Chromatography B**, v. 789, n. 1, p. 73-78, 2003.

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

ZANCANARO, I; LIMBERGER, R. P; BOHEL, P. O; SANTOS, M. K; DE BONI, R. B; PECHANSKY, F; CALDAS, E. D. Prescription and illicit psychoactive drugs in

oral fluid-LC-MS/MS method development and analysis of samples from Brazilian drivers. **Forensic Science International**, v. 223, n. 1-3, p. 208-216, 2012.