



**Determinação de Etanol e Metanol em Sangue por Hs/Gc-Fid nos  
Casos Atendidos Pelo Centro de Controle de Intoxicações de  
São Paulo**

**Determination of Ethanol and Methanol in Blood Hs/Gc-Fid in Cases Attended  
by the Poison Control Center of Sao Paulo**

Sarah C. W. S. E. Franco de Oliveira<sup>1\*</sup>, Alexandre D. Zucoloto<sup>2</sup>, Carolina D. R. de Oliveira<sup>2</sup>, Edna M. M. Hernandez<sup>2</sup>, Ligia V. G. Fruchtengarten<sup>2</sup>, Mauricio Yonamine<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas,  
Universidade de São Paulo*

<sup>2</sup> *Centro de Controle de Intoxicações de São Paulo, Prefeitura de São Paulo*

\* E-mail: [sarahcarobini@hotmail.com](mailto:sarahcarobini@hotmail.com)

26 July 2016

**Resumo:** Para o adequado diagnóstico e tratamento no pronto-socorro, muitas vezes é necessário saber se a condição de um paciente pode ser elucidada pela intoxicação com algum agente exógeno. Assim, a análise toxicológica é normalmente conduzida quando o paciente apresenta-se sintomático, com histórico de ingestão de determinada substância ou quando a equipe médica necessitar de diagnóstico diferencial. Geralmente, o sangue representa a matriz de escolha para essas análises, pois os efeitos farmacológicos e tóxicos podem ser, na maioria das vezes, correlacionados com a concentração do analito no organismo. O objetivo deste estudo foi a determinação de etanol e metanol em amostras provenientes de pacientes atendidos pelo Centro de Controle de Intoxicações da cidade de São Paulo. Do total de amostras analisadas (n = 151), 31 apresentaram resultados positivos para etanol, sendo 25 com concentração superior a 0,5 g.L<sup>-1</sup>. Conclui-se que a técnica de preparo de amostra utilizada é relativamente barata, fácil e rápida, o que reitera a aplicabilidade do método nas análises toxicológicas de emergência.

**Palavras-chave:** Análises toxicológicas de emergência; Etanol; Sangue; GC-FID.

**Abstract:** For proper diagnosis and treatment in the emergency department, it is often necessary to know if the condition of the patient can be elucidated by intoxication with any exogenous agent. Thus, the toxicological analysis is conducted when the patient presents with a history of symptomatic, ingestion of substance or when medical staff need a differential diagnosis. Generally, blood is the matrix of choice for these analyzes because of the pharmacological and toxic effects may be, in most cases, correlated with the analyte concentration in the body. The objective of this study was the determination of ethanol and methanol in samples from patients seen by the Poison Control Center of the city of São Paulo. Of the total samples analyzed ( $n = 151$ ), 31 showed positive results for ethanol, 25 of these with alcohol level exceeding  $0.5 \text{ g L}^{-1}$ . Concluded that the sample preparation technique used is relatively cheap, quick and easy, which confirms the applicability of the method in the toxicological analysis of emergency.

**Keywords:** Emergency toxicological analysis; Ethanol; Blood; HS/GC-FID.

## 1. Introdução

Segundo o último relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2012, cerca de 3,3 milhões de mortes foram associadas ao consumo de etanol. Este número corresponde a 5,9% de todas as mortes ou uma em cada vinte mortes no mundo no respectivo ano. Esse valor é superior, por exemplo, à proporção de mortes por HIV/AIDS (2,8%), mortes por causas violentas (0,9%) ou tuberculose (1,7%). O consumo crônico de etanol também tem sido relacionado com o suicídio e a violência e é um fator causal identificado em mais de 200 formas distintas de patologias e injúrias, incluindo manifestações neuropsiquiátricas, doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral isquêmico, doença isquêmica do coração, doenças do aparelho digestivo e diabetes, além de ser considerado um fator de risco em certos tipos de câncer. Estima-se que no ano de 2012, 5% da carga global de doenças e lesões (139 milhões de anos de vida ajustados por incapacidade) são atribuíveis ao consumo de etanol<sup>1-4</sup>.

A intoxicação aguda por etanol promove diminuição da consciência, cognição, percepção do comportamento e coordenação motora, sendo a mais frequente ocorrência atendida em serviços de emergência. As manifestações clínicas e a intensidade dos sintomas apresentam forte correlação com a concentração de etanol no sangue; contudo, outros elementos como a condição genética do indivíduo e sua associação com outras substâncias podem influenciar a suscetibilidade do paciente intoxicado, sendo a contaminação com metanol (proveniente de bebidas adulteradas)

um bom exemplo. A intoxicação por metanol geralmente ocorre devido à ingestão de bebidas adulteradas contendo concentrações elevadas dessa substância<sup>5</sup>. Os principais sintomas decorrentes do consumo de metanol incluem cefaleia, vertigem, dor abdominal, diarreia, náuseas e vômitos até cegueira parcial ou total e morte<sup>6</sup>.

Assim, considera-se fundamental o diagnóstico laboratorial para a constatação da intoxicação por etanol e metanol, representando importante ferramenta para a equipe médica no que se refere ao tratamento do paciente bem como no acompanhamento da sua evolução clínica<sup>4,7,8</sup>.

Métodos para a identificação e correta quantificação de álcoois por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC-FID) já estão bem estabelecidos na literatura e devido à sua sensibilidade, precisão e relativa especificidade, esta metodologia foi selecionada para a realização das análises de álcoois descritas neste trabalho<sup>9-12</sup>. A implementação da técnica analítica e a sua utilização na rotina das análises de emergência exige um processo de validação para garantir a confiabilidade do método. Desta maneira, objetivou-se validar um método para a determinação de etanol e metanol em amostras de sangue empregando a técnica de extração por headspace e análise por GC-FID (HS/GC-FID). Após validado, o método foi aplicado com sucesso em amostras de pacientes atendidos pelo Centro de Controle de Intoxicações da cidade de São Paulo (CCI – SP).

## **2. Material e métodos**

### **2.1 Reagentes e materiais**

Todas as substâncias empregadas neste trabalho foram de alta pureza. Etanol e metanol foram obtidos da empresa Merck (>99.9%; Darmstadt, Alemanha), padrão interno n-propanol da empresa Sigma-Aldrich (>99%; St. Louis, EUA). A água utilizada foi deionizada em um sistema Milli-Q da empresa Millipore (Bedford, EUA).

### **2.2 Análise instrumental e aquisição de dados**

As análises foram realizadas em equipamento de cromatografia gasosa série 6890 (Hewlett Packard, EUA), com detector de ionização em chama (GC-FID). A seguinte condição cromatográfica foi utilizada para as análises: coluna Poraplot-Q (10m x 0,32 mm x 5µm); gás de arraste: hidrogênio, a um fluxo de 1,5 mL.min<sup>-1</sup>; temperatura do injetor: 250 °C; temperatura do detector: 280 °C; temperatura do forno: 120 °C (modo de operação isotérmica). Tempo total de corrida: 15 minutos. As injeções foram

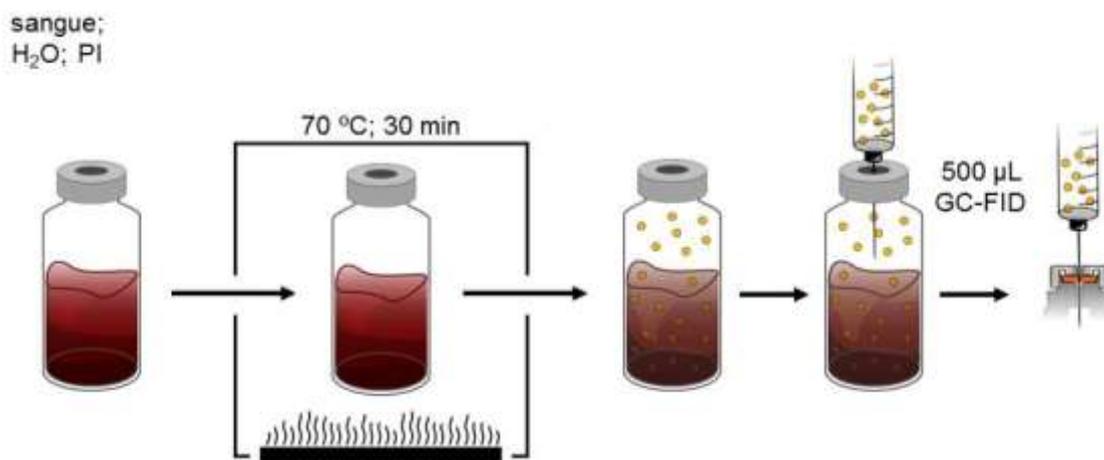
realizadas manualmente com uma seringa “gas-tight” de 500 µL (Hamilton, EUA). Os dados foram processados utilizando o software HPCHEM (Hewlett Packard, EUA). Para a obtenção dos cromatogramas, os dados brutos foram extraídos dos softwares de cada equipamento e plotados no programa Microsoft Excel® 2010.

### **2.3 Amostras**

Amostras de sangue negativas (branco) foram obtidas de voluntários que declararam a não ingestão de etanol e metanol. Para verificar a ausência desses compostos, uma alíquota de cada amostra foi analisada de acordo com o método proposto. Este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Bioética em Medicina do Hospital participante (protocolo nº 018/CEM/HMARS-2014) e também pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP (protocolo nº 902.088). As amostras biológicas (sangue) foram coletadas de pacientes com suspeita de intoxicação, passíveis de análises toxicológicas, atendidos pelo CCI – SP, alocado no Hospital Municipal Dr. Arthur Ribeiro de Saboya. Durante o atendimento foi aplicado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e, somente após a autorização do paciente, as amostras foram incluídas no estudo. Pacientes com idade inferior a 18 anos e/ou em estado inconsciente somente foram incluídos no estudo mediante a autorização de um responsável legal. Após a coleta, as amostras de sangue (aproximadamente 3 mL, em tubos Vacutainer® com EDTA) foram encaminhadas ao Laboratório de Análises Toxicológicas da Universidade de São Paulo e armazenadas em freezer à – 20 °C.

### **2.4 Preparo da amostra**

Uma alíquota de 500 µL da amostra de sangue total foi transferida para um frasco de “headspace” de 10 mL, onde foram adicionados 500 µL de água deionizada e 1000 µL de n-propanol 0,6 g.L<sup>-1</sup> como padrão interno. O frasco foi lacrado utilizando tampa de alumínio com septo de borracha e colocado na estufa a 70 °C durante 30 minutos. Após esse período recolheu-se, com o auxílio de uma seringa gas-tight, 500 µL do vapor e injetou-se diretamente no equipamento GC-FID, descrito anteriormente. O método descrito para determinação de etanol e metanol em sangue está ilustrado na Figura 1.



**Figura 1.** Método de extração de etanol e metanol em sangue por headspace com análise por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (HS/GC-FID). PI, padrão interno (n-propanol).

## 2.5 Validação do método

O método foi validado, estabelecendo-se os parâmetros de limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), linearidade, exatidão e precisão intra e inter-dia de acordo com guias nacionais e internacionais<sup>13-17</sup>. Foi calculada ainda a incerteza de medição do método proposto.

## 3. Resultados e discussão

### 3.1 Validação do método

Os valores de LOD e LOQ encontrados no método para determinação de etanol em sangue foram de 0,005 g.L<sup>-1</sup> e 0,1 g.L<sup>-1</sup> respectivamente. Para o metanol, o LOD e LOQ encontrados foram 0,01 e 0,1 g.L<sup>-1</sup>. Os limites foram determinados pelo método empírico, que consiste em analisar uma série de amostras fortificadas com concentrações decrescentes dos analitos estudados e os resultados avaliados em relação ao coeficiente de variação entre as replicatas. A linearidade foi determinada utilizando amostras de sangue negativo (isento dos analitos de interesse) adicionadas de padrões analíticos em seis diferentes concentrações, dentro da faixa de trabalho de 0,1 a 5 g.L<sup>-1</sup> para os dois analitos estudados. A análise foi realizada em seis replicatas para cada concentração. Foi obtido um valor de coeficiente de determinação (r<sup>2</sup>) maior que 0,99, para os dois analitos estudados.

Na faixa de concentração estipulada para a curva de calibração do etanol e do metanol, o método foi considerado linear e os parâmetros avaliados estavam de

acordo com os critérios de aceitação da ANVISA<sup>14</sup>, que estipula desvio menor ou igual a 20% em relação à concentração para o LOQ, desvio menor ou igual a 15% em relação às outras concentrações da curva de calibração e o coeficiente de correlação linear igual ou superior a 0,98.

Na faixa de concentração da curva de calibração (0,1 a 5 g.L<sup>-1</sup>), foi apresentado o fenômeno de heteroscedasticidade. Usando os mínimos quadrados ponderados de regressão linear, a soma do percentual de erro relativo ao longo de todo o intervalo indicado de "melhor ajuste", na avaliação da eficácia do fator de ponderação utilizada foi  $1/y^2$  para o etanol e  $1/y$  para o metanol; assim as equações da regressão linear encontradas para os dois analitos, etanol e metanol, foram respectivamente:  $y = 0,3914x - 0,0013$ ,  $r^2 = 0,9938$  e  $y = 0,1684x - 0,0008$ ,  $r^2 = 9979$ . A precisão do método foi avaliada por meio da determinação do coeficiente de variação (CV%) das áreas relativas (razão entre área absoluta do analito e a área absoluta do padrão interno) exibido entre as replicatas (n = 6) preparadas em três diferentes concentrações e em três dias consecutivos para cada analito estudado. A precisão intradia e a precisão inter-dia foram calculadas pela análise de variância (ANOVA) usando "dia" como variável agrupadora.

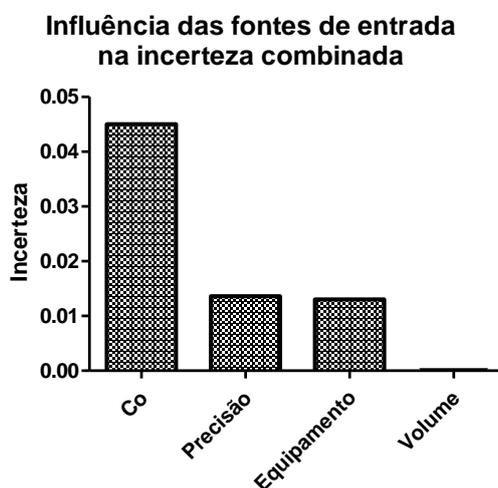
O ensaio de exatidão foi realizado utilizando três diferentes concentrações, com seis replicatas por concentração. Os valores encontrados estão de acordo com as normas adotadas para validação de métodos onde a exatidão do método deve estar entre  $\pm 20\%$  para a concentração baixa e  $\pm 15\%$  para as concentrações média e alta. Os resultados dos parâmetros avaliados estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Precisão e exatidão do método para determinação de etanol e metanol em amostras de sangue.

Parâmetros		Resultados	
		Etanol	Metanol
Precisão intra-dia (CV%)	C1	2,3	6,5
	C2	7,3	10,7
	C3	6,6	3,2
Precisão inter-dia (CV%)	C1	5,6	12,8
	C2	13,5	12,9
	C3	11,9	7,4
Exatidão (%)	C1	110,0	80,6
	C2	93,0	88,6
	C3	99,0	95,6

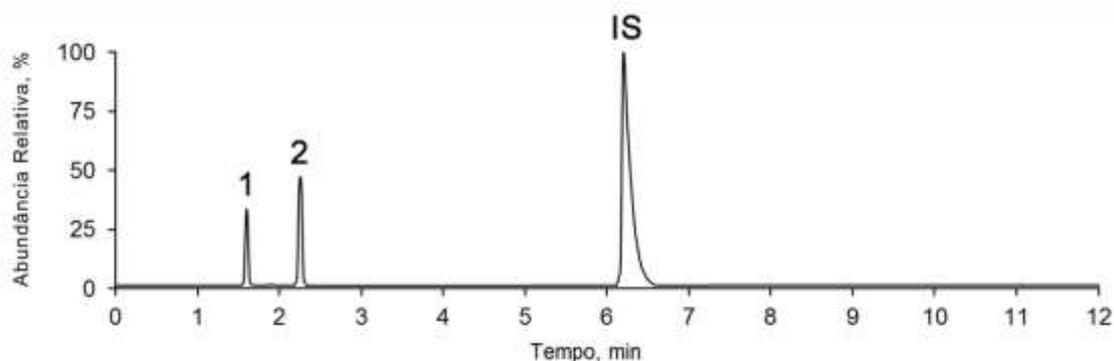
CV% coeficiente de variação, C1 0,1 g.L<sup>-1</sup>, C2 2 g.L<sup>-1</sup>, C3 4 g.L<sup>-1</sup>.

A estimativa da incerteza de medição foi realizada de acordo com o Guia EURACHEM/CITAC<sup>18</sup> e o "Guia para a expressão da incerteza de medição"<sup>19</sup>. Resumidamente, para calcular a incerteza expandida, possíveis fontes de incerteza (volume de amostra, concentração do analito na amostra, precisão do método e incerteza do equipamento) foram identificadas utilizando o diagrama de Ishikawa, também conhecido como diagrama causa e efeito. A incerteza padrão (uc) de cada estimativa de entrada foi determinada e, em seguida, calculou-se a incerteza combinada, que consiste na soma quadrática das diversas incertezas padrão apresentadas. Finalmente, a incerteza expandida foi determinada pela multiplicação da incerteza combinada por um fator de abrangência apropriado obtido a partir da tabela de distribuição t-Student. Em ordem de importância, os fatores mais cruciais para o cálculo de incerteza do método foram: concentração de analito, precisão do método, incerteza do equipamento e volume da amostra (Figura 2). Valores médios para a incerteza combinada das amostras analisadas mantiveram-se em cerca de 6,0%. Este valor de incerteza de medição está de acordo com as normas e referências internacionais o que confirma que o método é aplicável e os resultados gerados possuem confiabilidade e qualidade.



**Figura 2.** Contribuição de diferentes fontes de entrada no cálculo da incerteza padrão combinada para o método de detecção de etanol em sangue. Co, concentração.

Na Figura 3 é apresentado o cromatograma obtido com a análise por HS/GC-FID de uma amostra de sangue negativo adicionada com metanol e etanol na concentração de 2 g.L<sup>-1</sup>.



**Figura 3.** Cromatograma obtido com a análise por headspace e GC-FID de sangue adicionado de metanol (1,59 min) e etanol (2,36 min) na concentração de 2 g.L<sup>-1</sup>. IS, padrão interno n-propanol (6,20 min).

Após a validação do método, o mesmo foi aplicado em amostras (n = 151) provenientes do CCI – SP. Do total de amostras analisadas, 31 apresentaram resultados positivos para etanol, sendo que 25 dessas apresentaram concentrações superiores a 0,5 g.L<sup>-1</sup>, concentração sanguínea onde são observadas alterações iniciais da intoxicação por etanol<sup>20</sup>. Em 13 amostras a intoxicação foi considerada leve, 8 amostras com intoxicação moderada e 4 com intoxicação grave, sendo a maior concentração de etanol encontrada de 4,8 g.L<sup>-1</sup><sup>21</sup>. Não foram encontrados resultados positivos para metanol, considerando o LOD de 0,01 g.L<sup>-1</sup>. Os resultados podem ser visualizados na Tabela 2.

Avaliando os dados obtidos a partir da ficha de atendimento hospitalar e correlacionando-os com as amostras positivas, é possível traçar um perfil preliminar das intoxicações por etanol registradas durante o período estudado nos pacientes do CCI – SP. As intoxicações foram predominantes nas faixas etárias de 20 – 29 anos (46,6%) e 30 – 39 anos (33,3%). Do total de casos avaliados, foi observada uma diferença significativa entre os gêneros (homens 86% e mulheres 14%). Considerando a circunstância da exposição, foi verificado que 58% dos casos ocorreram por abuso de etanol e 14% em tentativa de suicídio. Através de procedimentos de triagem e empregando métodos imunoenzimáticos realizados pelo laboratório do CCI – SP, foi constatado que 86% dos casos positivos de intoxicação por etanol apresentaram associação com outras drogas de abuso, sendo a cocaína a de maior prevalência (40% das amostras).

**Tabela 2.** Concentrações das amostras positivas e grau de intoxicação.

Grau de intoxicação	Concentração de etanol detectada (g.L <sup>-1</sup> )
Leve	0,5
	0,5
	0,5
	0,6
	0,6
	0,6
	0,7
	0,9
	1,0
	1,1
	1,2
	1,3
	Moderada
1,6	
2,0	
2,0	
2,1	
2,3	
2,6	
Grave	2,9
	3,3
	3,4
	3,9
	4,8

#### 4. Conclusão

Nesse estudo foi aplicado um método para determinação de etanol e metanol em amostras de sangue e o método foi validado considerando parâmetros de linearidade, precisão, exatidão e incerteza de medição. Todos os valores obtidos estão de acordo com os critérios de aceitação predefinidos pelos guias nacionais e internacionais de validação de métodos. Assim, conclui-se que a técnica de preparo de amostras

utilizada é relativamente barata, fácil e rápida, o que confirma a aplicabilidade do método nas análises toxicológicas de emergência.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo FAPESP nº 2014/05877-0) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES Pró-Forenses AUXPE 3419/2014). Os autores também agradecem ao Dr. Tiago Franco de Oliveira pelas ilustrações e a toda a equipe do Centro de Controle de Intoxicações de São Paulo (CCI-SP) pela coleta das amostras.

### **Referências**

1. Rehm J, Kanteres F, Lachenmeier DW. Unrecorded consumption, quality of alcohol and health consequences. *Drug Alcohol Rev.* 2010 Jul;29(4):426-36. <https://doi.org/10.1111/j.1465-3362.2009.00140.x>
2. Macdonald S, Greer A, Brubacher J, Cherpitel C, Stockwell T, Zeisser C. Alcohol consumption and injury. In: Boyle P, Boffetta P, Lowenfels AB, Burns H, Brawley O, Zatonski W et al., editors. *Alcohol: science, policy and public health*. Oxford: Oxford University Press; 2013. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199655786.003.0019>
3. Shield KD, Parry C, Rehm J. Chronic diseases and conditions related to alcohol use. *Alcohol Res.* 2013; 35(2):155-73.
4. Organização Mundial da Saúde, OMS. *Global status report on alcohol and health*. Genebra, 2014.
5. Kruse JA. Methanol and ethylene glycol intoxication. *Crit Care Clin.* 2012 Oct;28(4):661-711. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2012.07.002>
6. Wax PM. Toxicologic plagues and disasters in history. In: Nelson L, Goldfrank LR, Lewin N, Howland M, Hoffman R, Goldfrank L, Flomenbaum N. *Goldfrank's toxicologic emergencies*. Maidenhead: McGraw-Hill Medical; 2011. p. 1109-1114.
7. Casenave SOS, Chasin AAM. Análises toxicológicas e a questão ética. *RevInter.* 2009; 2(2):5-17.
8. Taylor B, Irving HM, Kanteres F, Room R, Borges G, Cherpitel C, et al. The more you drink, the harder you fall: a systematic review and meta-analysis of how acute alcohol consumption and injury or collision risk increase together. *Drug Alcohol Depend.* 2010 Jul 1;110(1-2):108-16. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2010.02.011>
9. Feltraco LL, Antunes MV, Linden R. Determinação de etanol e voláteis relacionados em sangue e fluido oral por microextração em fase sólida em Headspace associada à

cromatografia gasosa com detector de ionização em chama. *Quím. Nova.* 2009; 32(9): 2401-2406. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000900031>

10. Pontes H, Pinho PG, Casal S, Carmo H, Santos A, Magalhães T, Remião F, Carvalho F, Bastos ML. GC Determination of Acetone, Acetaldehyde, Ethanol, and Methanol in Biological Matrices and Cell Culture. *J Chromatogr Sci* (2009) 47 (4): 272-278. <https://doi.org/10.1093/chromsci/47.4.272>

11. Tiscione NB, Alford I, Yeatman DT, Shan, X. Ethanol Analysis by Headspace Gas Chromatography with Simultaneous Flame-Ionization and Mass Spectrometry Detection. *J Anal Toxicol* (2011) 35 (7): 501-511. <https://doi.org/10.1093/anatox/35.7.501>

12. Monteiro C, Franco JM, Proença P, Castañera A, Claro A, Vieira DN, Corte-Real F. Qualitative and quantitative analysis of a group of volatile organic compounds in biological samples by HS-GC/FID: application in practical cases. *Forensic Sci Int.* 2014 Oct;243:137-43. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.07.016>

13. Peters FT, Maurer HH. Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology – A review. *Accredit Qual Assur.* 2002; 7: 441-449. <https://doi.org/10.1007/s00769-002-0516-5>

14. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA; RE nº 899 de 29/05/2003: Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, Ministério da Saúde: Brasil 2003.

15. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro); Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos; DOG-CGCRE-008. Revisão 2, 2007.

16. Peters FT, Drummer OH, Musshoff F. Validation of new methods. *Forensic Sci Int.* 2007 Jan 17;165(2-3):216-24. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.05.021>

17. United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC); Guidance for the validation of analytical methodology and calibration of equipment used for testing of illicit drugs in seized material and biological specimens. Laboratory and Scientific Section, Vienna. Website: [http://www.unodc.org/documents/scientific/validation\\_E.pdf](http://www.unodc.org/documents/scientific/validation_E.pdf), Published 2009, Accessed May 02, 2016.

18. Instituto Nacional de Metrologia. Normatização e Qualidade Industrial (INMETRO); Guia para a expressão da incerteza de medição; ISO GUM, 2a ed., Rio de Janeiro, 2005.

19. Eurachem. EURACHEM/CITAC Guide. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. 2a ed. (2010). <http://www.citac.cc/QUAM2000-1.pdf>14. Acesso em Maio de 2015.

20. Malbegier A, Pileggi A, Scivoletto S. Etanol. In: Oga Seizi, Camargo MMA, Batistuzzo JAO. Fundamentos de Toxicologia, 4 ed, p. 400 – 410. São Paulo: Atheneu; 2014.

21. Goldfrank LR, Flomenbaum NE, Lewin NA, Weisman RS, Howland MA, Hoffman RS. Goldfrank's Toxicologic emergencies. 6th. Ed. Stamford, Connecticut, Appleton & Lange; 1998.