

Comparação dos métodos de Atenuação de Energia Radiante e Titulométrico para a determinação de Etanol no sangue

Miguel Machinski Junior* e Paula Nishiyama

Departamento de Análises Clínicas, Laboratório de Toxicologia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil. *Autor para correspondência.e-mail: mmjunior@uem.br

RESUMO. A determinação de álcool no sangue foi avaliada através da comparação de duas técnicas analíticas, o método de atenuação de energia radiante (AER) e o método titulométrico (TIT). A sensibilidade do AER foi de 0,4g/L e por TIT de 0,1g/L. A curva padrão de etanol foi linear até 2,5g/L e 4,0g/L para os métodos AER e TIT, respectivamente. O coeficiente de variação intra-série foi de 1,5% a 3,9% e de 0,6% a 3,2%, sendo que o coeficiente de variação inter-série foi de 2,5% a 12,8% e de 0% a 3,3% para os métodos AER e TIT, respectivamente. Os testes de recuperação apresentaram os seguintes resultados, 105% para o método AER e 88% para o método TIT. Em 70 amostras estudadas, o coeficiente de correlação (r) foi de 0,9681 e o resultado do teste- t de Student foi de -1,294, demonstrando que os métodos se correlacionam bem.

Palavras-chave: etanol, atenuação de energia radiante, titulometria, análises toxicológicas.

ABSTRACT. A comparison of Radiative Energy Attenuation and Titrimetric methods for the analysis of ethanol in blood. The alcohol determination in the blood was evaluated through the comparison of two analytical techniques, the method of radiative energy attenuation (REA) and the chemical titration method (TIT). The sensibility of REA was 0.4g/L and of TIT was 0.1g/L. The curve standard of ethanol was linear up to 2.5g/L and 4.0g/L for methods REA and TIT, respectively. The coefficient of variation was 1.5% to 3.9% and 0.6% to 3.2% in the same day, and day-to-day coefficient of variation was 2.5% to 12.8% and 0% to 3.3% for methods REA and TIT, respectively. The tests of recovery presented the following results, 105% for REA and 88% for TIT. In 70 studied samples, the coefficient of correlation (r) was 0.9681 and the result of the test- t of Student was -1.294.

Key words: ethanol, radiative energy attenuation, chemical titration, toxicological analyses.

Introdução

O álcool é uma das drogas de abuso mais utilizada, e Garriot e Latman (1976) verificaram que, nos ensaios toxicológicos, o etanol é significativamente encontrado em acidentes de trânsito, além de estar associado com outras drogas de uso ilícito. A quantificação de etanol no sangue, portanto, é frequentemente requerida em laboratórios clínicos, toxicológicos e de caráter forense (Prencipe *et al.*, 1987; Sutheimer *et al.*, 1992).

Os métodos para dosagem alcoólica são: (1) os que envolvem a oxidação simples que requerem a separação do etanol através de destilação ou microdifusão, seguido pela titulação ou espectrofotometria (Brandenberger, 1974); (2) os métodos enzimáticos que utilizam as enzimas álcool desidrogenase (ADH), na qual a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) é

produzida e lida espectrofotometricamente na região ultravioleta (UV) (Prencipe *et al.*, 1987), ou os que utilizam a álcool oxidase. Em ambos os métodos pode-se realizar a determinação da concentração de etanol pela diferenciação de pH, utilizando um potenciômetro (Rovida *et al.*, 1984); (3) os métodos de atenuação de energia radiante baseiam-se no princípio que a intensidade de fluorescência medida de uma solução contendo um fluoróforo e um cromógeno está relacionada com a absorção da solução, ou seja, quando uma reação reagente-analito gera um cromógeno na presença de um fluoróforo, é observada uma atenuação da intensidade de fluorescência que é inversamente proporcional à absorvância do cromógeno presente (Caplan e Levine, 1986; Cary *et al.*, 1984; Sharma e Quantrill, 1994); e (4) os métodos que utilizam a cromatografia em fase gasosa (Taylor *et al.*, 1984).

No Brasil, o método de escolha para análise de etanol em sangue se dá pela cromatografia em fase gasosa, mas a maioria dos laboratórios nacionais utiliza a separação por destilação e quantificação por titulometria (oxidação simples), por não disporem de tal equipamento. Entretanto, os métodos titulométricos, cromatográficos e enzimáticos possuem como desvantagens as etapas de desproteínização, os longos períodos de incubação e os equipamentos de alto custo.

Os hospitais e os laboratórios que oferecem serviços de emergência devem utilizar métodos rápidos, simples e eficazes na determinação de etanol no sangue. Devido a esse fato, os métodos rápidos, como os ensaios imunoenzimáticos e a atenuação de energia radiante, têm ocupado um papel importante por satisfazerem as características para uma análise de urgência, utilizarem um pequeno volume de amostra e equipamentos simples (Sadeg e Fourcalt-Eddi, 1994).

Neste estudo, o objetivo foi comparar técnicas de quantificação de etanol no sangue: o método de atenuação de energia radiante e o método titulométrico (oxidação simples) em relação a sensibilidade, a reprodutibilidade, a exatidão, a linearidade e a facilidade de execução.

Material e métodos

Equipamentos

- (a) TDxFLx System Abbott Laboratories;
- (b) balança analítica Metler mod. H31;
- (c) manta aquecedora;
- (d) destilador (balão e condensador);
- (e) bureta de vidro, cap. 25 e 50mL;
- (f) micropipetas automáticas Eppendorf capacidade de 100 e 200µL.

Reagentes

- (a) etanol absoluto p.a. Merck;
- (b) Kits reagente, controle e calibrador (Abbott);
- (c) solução saturada de ácido pícrico;
- (d) solução de iodeto de potássio 1%;
- (e) solução de tiosulfato de sódio 0,01 N;
- (f) solução nitrocromica (dicromato de potássio 0,05 N em ácido nítrico concentrado);
- (g) goma de amido.

Amostras

Foram coletadas amostras de sangue total de 10 voluntários para o estudo da sensibilidade, precisão, exatidão e linearidade dos métodos titulométricos e atenuação de energia radiante, nas

quais foram adicionadas quantidades conhecidas de etanol absoluto em um *pool* de sangue. Para a comparação das metodologias, foram usadas amostras de 70 indivíduos envolvidos em acidentes de trânsito ou internados no Hospital Universitário de Maringá, estado do Paraná, durante os períodos de outubro/94 a outubro/95. Utilizou-se como anticoagulante o citrato de sódio e as amostras foram armazenadas a -20°C até o momento da análise.

Atenuação de energia radiante

O aparelho TDxFLx da Abbott® foi utilizado para a análise através do método da atenuação de energia radiante. O equipamento foi calibrado com soluções padrões adquiridos da Abbott®. Foram utilizados 100µL da amostra para a análise. Os parâmetros do instrumento foram os seguintes:

1.Unidades	mg/mL
2.Volume da Amostra	2.0
3.Leitura de amostra	1
4.Volume de calibração	2.0
5.Leitura para calibração	1
6.Concentração A	0.00
7.Concentração B	25.00
8.Concentração C	50.00
9.Concentração D	100.00
10.Concentração E	200.00
11.Concentração F	300.00
12.Desvio máximo	4.0
13.Polarização mínima	1.0
14.Ruído máximo	19000.00

Titulometria

O método titulométrico baseia-se na reação com dicromato de potássio em ácido nítrico, no qual o etanol é oxidado a ácido acético e o excesso de dicromato de potássio oxida o iodeto para iodo que é titulado com a solução de tiosulfato de sódio, usando a goma de amido com indicador. Primeiramente o etanol é separado dos outros constituintes do sangue através de uma destilação simples (Cavett, 1938).

A destilação do etanol foi feita adicionando-se 12mL de água deionizada e 6mL de solução de ácido pícrico saturada a 3mL de sangue total, recolhendo-se 12mL de destilado. Uma quantidade de 500µL do destilado foi adicionada a 1.000µL de solução nitrocromica (dicromato de potássio 0,05 N em ácido nítrico concentrado), após 10 minutos foi adicionado 12,5mL de água e 5mL de solução de iodeto de potássio 1%. Após um minuto, o iodo liberado foi titulado com tiosulfato de sódio 0,01 N, usando a goma de amido como indicador. A determinação foi acompanhada com um branco de reativos. A concentração de etanol foi calculada

baseada na equivalência que 0,115mg de etanol corresponde a 1,0mL de tiosulfato de sódio 0,01 N.

Estudo da linearidade e da sensibilidade dos métodos

O estudo da linearidade foi baseado na análise de regressão dos mínimos quadrados (Wilson, 1974). Para este estudo, foram analisadas vinte e duas amostras de sangue adicionadas com etanol em diferentes concentrações: 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,08; 0,10; 0,12; 0,15; 0,20; 0,40; 0,60; 0,80; 1,00; 1,50; 1,60; 2,00; 2,50; 3,20; 4,00; 5,00 e 6,00g/L. As amostras foram quantificadas pelos métodos AER e TIT, e a sensibilidade ou o limite de quantificação foi definido como a menor concentração precisamente medida, ou seja, com coeficiente de variação inferior ou igual a 10% nas determinações alteradas (Taylor, 1987).

Estudo da precisão dos métodos (Taylor, 1987)

A precisão dos dois métodos foi avaliada através da determinação do etanol, em dias diferentes (inter-ensaio), de cinco alíquotas de sangue com quantidades conhecidas de etanol adicionado e através da análise de alíquotas intra-ensaio para as concentrações de 0,4; 0,8; 1,6; 2,5 e 3,2g/L.

Estudo da recuperação dos métodos

É utilizado para avaliar a exatidão do método, ou seja, a concordância entre o valor real da substância na amostra e o estimado pelo processo analítico (Wilson, 1974). Para este estudo, foram analisadas vinte e cinco amostras, em cinco diferentes concentrações de etanol (0,4; 0,6; 0,8; 1,6 e 2,0g/L). As amostras foram testadas pelos métodos AER e TIT.

Comparação dos métodos Atenuação de Energia Radiante e Titulometria

Os resultados da dosagem alcoólica das 70 amostras coletadas durante o período de outubro/94 a outubro/95 foram comparados por meio da determinação do coeficiente de correlação (r) e o teste de Student ao nível de 5% de probabilidade.

Resultados e discussão

As boas práticas de laboratório são elementos essenciais na condução da metodologia analítica em laboratórios de análises toxicológicas (Cembrowski, 1990), principalmente quando o resultado da análise possui envolvimento médico-legal, como a determinação de etanol em sangue de indivíduos envolvidos em acidentes de trânsito, pois, dependendo da concentração de etanol encontrada, irá decidir a culpa ou a inocência do indivíduo (Ziporvn, 1985).

Foram avaliados os seguintes parâmetros analíticos: linearidade, sensibilidade, precisão intra e inter-série, e exatidão do etanol no sangue para os métodos de Atenuação de Energia Radiante (AER) e Titulometria (TIT).

No estudo da linearidade (Figuras 1 e 2; Tabela 1) observou-se que ambas as curvas apresentaram boa correlação linear positiva entre as variáveis X e Y, com coeficiente de correlação igual a 0,9985, sendo que a curva padrão foi linear de 0,4 a 2,5 e 0,1 a 4,0g/L para o método AER e TIT, respectivamente. A vantagem que o método titulométrico apresenta neste estudo é uma maior faixa linear em relação ao método AER. Para as concentrações de etanol acima de 2,5g/L, se faz necessário realizar a diluição da amostra.

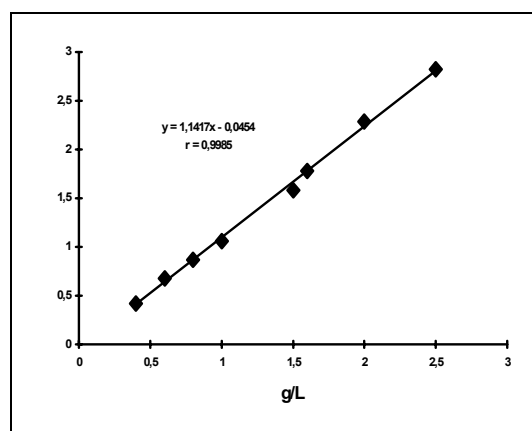


Figura 1. Regressão linear para a determinação da alcoolemia por Atenuação de Energia Radiante em amostras adicionadas com concentração conhecida de etanol.

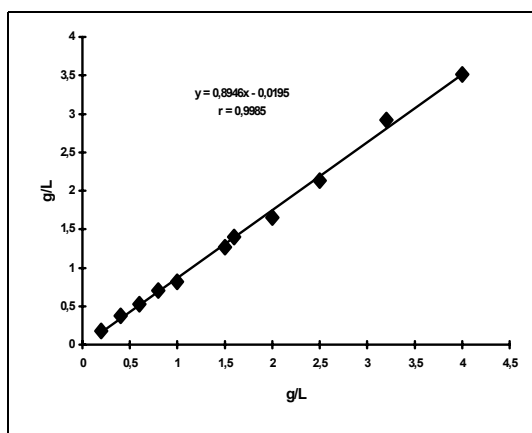


Figura 2. Regressão linear para a determinação da alcoolemia por Titulometria em amostras adicionadas com concentração conhecida de etanol.

Tabela 1. Estudo da linearidade dos métodos de Atenuação de Energia Radiante e Titulometria.

Conc. etanol (g/L)	Tamanho da amostra (n)		Médias		Desvio padrão		Coeficiente de Variação (%)	
	AER	TIT	AER	TIT	AER	TIT	AER	TIT
0,01	1	2	nd ¹	nd	-	-	-	-
0,02	1	2	nd	nd	-	-	-	-
0,03	3	2	nd	nd	-	-	-	-
0,04	3	2	nd	nd	-	-	-	-
0,05	3	2	nd	nd	-	-	-	-
0,08	3	2	0,0485	nd	0,0376	-	77,5	-
0,10	3	2	0,0810	0,0890	0,0493	0,0000	60,9	0
0,12	4	2	0,1217	0,1334	0,0482	0,0000	39,6	0
0,15	4	2	0,1283	0,1779	0,0581	0,0000	45,3	0
0,20	4	5	0,2491	0,1848	0,0657	0,0197	26,4	10,0
0,40	4	5	0,4232	0,3788	0,0537	0,0236	10,0	6,2
0,60	4	2	0,6870	0,5338	0,0632	0,0000	9,2	0
0,80	4	5	0,8661	0,7050	0,0224	0,0000	2,6	0
1,00	4	2	1,0619	0,8230	0,0946	0,0315	8,9	3,8
1,50	4	2	1,5768	1,2677	0,0840	0,0314	5,3	2,5
1,60	4	5	1,7843	1,3960	0,0623	0,0089	3,5	0,6
2,00	4	2	2,2935	1,6500	0,0797	0,0000	3,5	0
2,50	4	2	2,8181	2,1250	0,2037	0,0354	7,2	1,7
3,20	1	5	HI ²	2,9158	-	0,0975	-	3,3
4,00	1	2	HI	3,5091	-	0,1934	-	5,5
5,00	1	2	HI	HI	-	-	-	-
6,00	1	2	HI	HI	-	-	-	-

1. Não detectado; 2. Alta concentração, sendo necessário realizar diluições para detectar com segurança o analito.

A sensibilidade foi de 0,4 e 0,1g de etanol/L de sangue para os métodos AER e TIT, respectivamente, por apresentarem coeficiente de variação inferior ou igual a 10%, conforme descrito na Tabela 1.

A precisão dos resultados analíticos foi considerada satisfatória de acordo com o objetivo do trabalho, pois em cinco replicatas em concentrações diferentes (0,4; 0,8; 1,6; 2,5 e 3,2g/L) em um mesmo dia e dias diferentes, o coeficiente de variação na análise intra-série e inter-série foi considerado satisfatório para os métodos AER e TIT, conforme demonstram as Tabelas 2 e 3. Como se esperava, a maior variação ocorreu na concentração de 0,4g de etanol/L de sangue.

Tabela 2. Estudo da precisão dos métodos de Atenuação de Energia Radiante e Titulometria (intra-série) em vinte e cinco amostras adicionadas de etanol em cinco diferentes concentrações (n=5).

Conc. (g/L)	Médias		Desvio Padrão		Coeficiente de Variação (%)	
	AER	TIT	AER	TIT	AER	TIT
0,4	0,4543	0,3788	0,0101	0,0236	2,2	6,2
0,8	0,7852	0,7050	0,0119	0,0000	1,5	0
1,6	1,5768	1,3960	0,0444	0,0089	2,8	0,6
2,5	2,5376	2,0750	0,0994	0,0120	3,9	0,6
3,2	3,4240*	2,8080	0,1012	0,0402	3,0	1,4

* Amostras diluídas 1:2.

Na Tabela 4, encontram-se os dados relativos ao estudo da recuperação de ambos os métodos. A recuperação está relacionada com a exatidão dos métodos. Pelos dados observamos uma boa recuperação para ambas as metodologias, sendo que (a) método de AER, nota-se uma tendência positiva,

pois a recuperação média (105%) foi superior a 100%, que provavelmente se deve ao “background” do aparelho, pois a tecnologia de AER utiliza a técnica de diluição da amostra para minimizar essa interferência (Cary *et al.*, 1984); (b) o método TIT apresentou uma recuperação de 88%, que se deve aos procedimentos como a destilação e diluições que favorecem a perda do analito (etanol).

Os métodos AER e TIT foram comparados segundo Westeard e Hunt (1973) e demonstrou-se que não existe diferença estatisticamente significativa nas determinações de etanol em 70 amostras analisadas no presente estudo. Os nossos resultados foram semelhantes aos descritos por outros autores (Hancock *et al.*, 1971; Castagnou *et al.*, 1972; Cary *et al.*, 1984; Taylor *et al.*, 1984; Caplan e Levine, 1986; Sadeg e Fourcault-Eddi, 1994). O coeficiente de correlação foi de 0,9681, com uma equação de regressão $y \text{ (AER)} = 1,18 \times \text{(TIT)} + 0,023$, conforme demonstra a Figura 3. Além do mais, o resultado do teste-*t* de Student ($t = -1,294$) indica que os métodos apresentam boa correlação, segundo a Tabela 5.

Tabela 3. Estudo da precisão dos métodos de Atenuação de Energia Radiante e Titulometria (inter-série) em vinte e cinco amostras adicionadas de etanol em cinco diferentes concentrações (n=5).

Conc. (g/L)	Médias		Desvio Padrão		Coeficiente de Variação (%)	
	AER	TIT	AER	TIT	AER	TIT
0,4	0,4716	0,3530	0,0603	0,0000	12,8	0
0,8	0,7788	0,5800	0,0501	0,0000	6,4	0
1,6	1,6445	1,3220	0,0405	0,0409	2,5	3,1
2,5	2,7008	2,2222	0,1229	0,0635	4,6	2,9
3,2	3,3535*	2,9158	0,1442	0,0975	4,3	3,3

* Amostras diluídas 1:2.

Tabela 4. Estudo da recuperação dos métodos de Atenuação de Energia Radiante e Titulometria.

Conc. (g/L)	Médias		Recuperação (%)	
	AER	TIT	AER	TIT
0,4	0,42	0,38	104,8	94,7
0,6	0,64	0,53	107,3	88,0
0,8	0,80	0,71	100,0	88,1
1,6	1,63	1,40	101,7	87,3
2,0	2,24	1,65	112,1	83,0
Recuperação Média			105%	88%

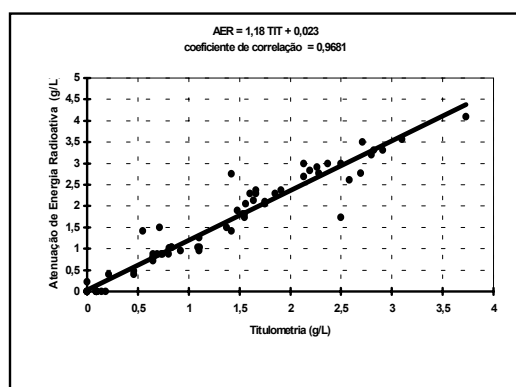


Figura 3. Correlação entre os métodos Atenuação de Energia Radiante e Titulometria para 70 amostras de sangue total.

Tabela 5. Análise estatística segundo Westgard e Hunt (1973) das determinações de alcoolemia referentes a pacientes envolvidos em acidentes de trânsito ou internados no Hospital Universitário de Maringá (Brasil) durante o período de outubro/94 e outubro/95 utilizando os métodos AER e TIT.

	Médias		Desvio padrão		valor de t	Probabilidade
	AER	TIT	AER	TIT		
AER vs. TIT	1,2028	1,4373	0,9682	1,1673	-1,294	0,1979

O método AER apresenta como vantagens: não exige a etapa de pré-tratamento das amostras; um grande número de amostras pode ser processado ao mesmo tempo, diminuindo, assim, o tempo gasto por análise e o pequeno volume de sangue requerido para a análise; enquanto o método titulométrico possui como vantagens o baixo custo e a maior faixa de linearidade.

Conclusão

Os métodos de AER e TIT que se prestam à determinação de etanol em sangue são simples, precisos, sensíveis e exatos, e o método de AER também é rápido. Ambos os métodos apresentaram excelente correlação, o coeficiente (r) foi de 0,9681 e o resultado do teste-t de Student foi de -1,294,

permitindo, ao analista, a determinação do etanol em um intervalo compreendido entre 0,4 a 2,5 e 0,1 a 4,0g/L, para o método AER e TIT, respectivamente.

Referências

- BRANDENBERGER, H. Forensic alcohol analysis. In: CURTIUS, H. C.; ROTH, M. (Ed.). *Clinical biochemistry: principles and methods*. New York: Walter de Gruyter, 1974. vol. 2, p. 1435-1438.
- CAPLAN, Y. H.; LEVINE, B. The analysis of ethanol in serum, blood, and urine: A comparison of the TDxREA ethanol assay with gas chromatography. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v. 10, p. 49-52, 1986.
- CARY, P. L. *et al.* Abbott radiative energy attenuation method for quantifying ethanol evaluated and compared with gas-liquid chromatography and the Du Pont aca. *Clin. Chem.*, Winston-Salem, v. 30, p. 1867-1870, 1984.
- CASTAGNOU, R. *et al.* Valeurs comparatives des alcoolemies determinées par les methodes officielles et enzymatique. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, Saint-Christoly, v. 111, p. 45-54, 1972.
- CAVETT, J. W. (1938). *Apud*: CLARKE, E. G. C. *Isolation and Identification of Drugs*. London: The Pharmaceutical Press, 1974. v. 1, p. 332-333.
- CEMBROWSKI, G. S. The pursuit of quality in clinical laboratory analyses. *Clin. Chem.*, Winston-Salem, v. 36, p. 1602-1604, 1990.
- GARRIOTT, J. C.; LATMAN, N. Drug detection in cases of "driving under the influence". *J. Forensic Sci.*, Philadelphia, v. 21, n. 2, p. 398-415, 1976.
- HANCOCK, J. A. *et al.* - Comparison of blood ethanol levels by gas-liquid chromatography, chemical titration, and enzymatic oxidation. *Clin. Toxicol.*, New York, v. 4, n. 2, p. 217-224, 1971.
- PRENCIPE, L. *et al.* Enzymic assay: a new colorimetric method based on measurement of hydrogen peroxide. *Clin. Chem.*, Winston-Salem, v. 33, n. 4, p. 486-489, 1987.
- ROVIDA, E.; *et al.* The determination of ethanol in whole blood by differential pH measurements. *Scand. J. Clin. Lab. Investig.*, Oslo, v. 44, p. 617-621, 1984.
- SADEG, N.; FOURCAULT-EDDI, M. Détermination de l'alcoolémie par la méthode Emit ST® comparaison avec la méthode de chromatographie en phase gazeuse. *Ann. Biol. Clin.*, Paris, v. 52, n. 6, p. 463-465, 1994.
- SHARMA, A.; QUANTRILL, N. S. M. Measurement of ethanol using fluorescence quenching. *Spectrochim. Acta*, London, v. 50A, n. 6, p. 1161-1177, 1994.
- SUTHEIMER, C. A. *et al.* Evaluation of the Syva ETS-plus ethyl alcohol assay with application to the analysis of antemortem whole blood, routine postmortem specimens, and synovial fluid. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v. 16, p. 119-124, 1992.
- TAYLOR, G. F. *et al.* Blood alcohol analysis: a comparison of the gas-chromatography assay with an enzymatic assay, *Pathology*, Adelaide, v. 16, n. 2, 157-159, 1984.

TAYLOR, J. K. *Quality assurance of chemical measurements*. Chelsea: Lewis Publishers, 1987.

WESTEARD, J. O.; HUNT, M. R. Use and interpretation of common statistical tests in method-comparison studies. *Clin. Chem.*, Winston-Salem, v. 19, p. 49-57, 1973.

WILSON, A. L. The performance characteristics of analytical methods - IV. *Talanta*, London, v. 21, n. 10, p. 1109-1121, 1974.

ZIPORVN, T. - Definition of impairment essential for prosecuting drunken drivers. *J. Am. Med. Assoc.*, Washington, DC, v. 253, p. 3509-3517, 1985.

Received on May 08, 2003.

Accepted on November 25, 2003.