

INTRODUÇÃO

O etil-glucuronídeo (EtG) e o etil-sulfato (EtS) são biomarcadores do consumo de etanol. Estes compostos são metabolitos específicos do etanol resultantes da sua conjugação com uridina-5 difosfo ácido glucurónico e com a 3-fosfoadenosina 5-fosfosulfato, respetivamente. A sua determinação analítica revela-se uma mais-valia em contexto forense, uma vez que estes compostos permanecem detetáveis, em amostras biológicas, durante um período de tempo mais alargado do que o etanol.

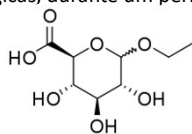


Figura 1– Estrutura química do Etil-glucuronídeo

Desta forma, a sua análise poderá ver vantajosa em casos de alcoolismo, em situações em que é necessário verificar a abstinência do consumo de etanol, em contextos laborais e, em situações *post-mortem*, auxiliando na distinção entre a ingestão e a formação *post-mortem* de etanol.

Neste trabalho foi desenvolvido um método para a deteção e quantificação dos biomarcadores etil-glucuronídeo e etil-sulfato, em amostras de sangue e de urina.

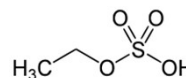


Figura 2– Estrutura química do Etil-sulfato

MATERIAL E MÉTODOS

O método apresentado foi desenvolvido num equipamento de LC-MS/MS (UPLC) da Waters, tendo as amostras sido previamente submetidas a procedimento de precipitação proteica com acetonitrilo. A separação cromatográfica foi efetuada recorrendo a uma coluna Acquity UPLC HSS T3 (2,1x 100 mm; 1,8 µm de tamanho de partícula), usando como fase móvel uma mistura de ácido fórmico 0,1% e acetonitrilo, em gradiente. A deteção dos compostos foi efetuada por MRM, tendo a ionização sido feita por *electrospray*, em modo negativo.

Tabela 1 – Condições analíticas do sistema UPLC-MS/MS

Coluna cromatográfica	Acquity UPLC HSS T3 (2,1 mm i.d. x 100 mm; 1,8 µm)
Temperatura de operação	40 °C
Volume Injeção	10 µL
Ionização	Electrospray Negativo
Modo de aquisição	MRM (multiple reaction monitoring)
Capilar	1,5 KV
Cone	55 V
Temperatura Fonte	150°C
Temperatura Dessolvatação	350°C
Fluxo Gás Dessolvatação	900 L/h
Transições MRM	ETG: 221 > 84,9 (35V; 15 ev); 221 > 74,9 (35V; 18 ev) ETS: 124,9 > 96,9 (26V; 26 eV) 124,9 > 80,1 (26V; 18 eV)

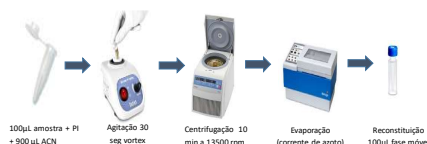


Figura 3– Preparação da amostra por Precipitação Proteica



Figura 4– Sistema de UPLC-MS/MS

Tabela 2 – Gradiente da Fase Móvel (UPLC-MS/MS)

Fase Móvel	Ác. Fórmico 0,1%:Acetonitrilo (gradiente)
Fluxo	0,3 ml/min

Tempo (min)	% Ácido Fórmico 0,1%	% Acetonitrilo 100%
0	99	1
2,80	99	1
2,81	5	95
3,00	5	95
3,01	99	1
6,00	99	1

RESULTADOS

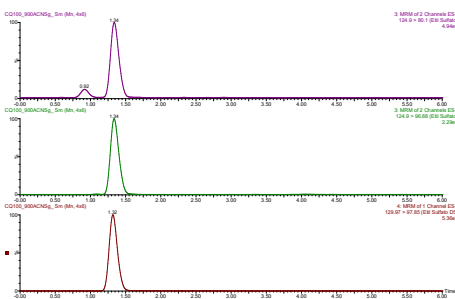


Figura 5- Cromatograma em modo MRM do ETS (100 ng/mL) e do padrão interno (ETS-D₃) em amostra de sangue

Foram selecionadas duas transições para cada um dos compostos (Etil-glucuronídeo: 221>74,9; 221>84,9; Etil-Sulfato; 124,9>80,1; 129,9>96,9) e uma para o correspondente composto deuterado.

O método revelou-se rápido, com apenas 6 minutos de análise cromatográfica e de fácil preparação da amostra, permitindo detetar concentrações na ordem dos 100 ng/mL, para ambos os compostos, em amostras de sangue e de urina. As curvas de calibração foram efetuadas com concentrações entre 100 e 10.000 ng/mL, com coeficientes de correlação superiores a 0,99.

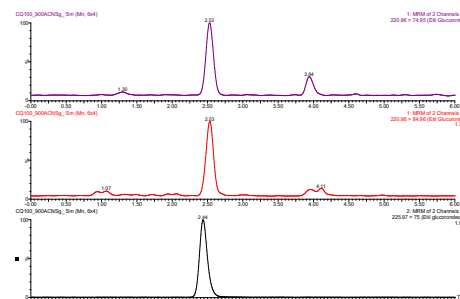


Figura 6- Cromatograma em modo MRM do EtG (100 ng/mL) e do padrão interno (EtG-D₃) em amostra de sangue

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A deteção de etanol é das análises mais importantes em termos forenses. Uma vez que o etanol é rapidamente eliminado do organismo, revela-se vantajosa a criação de metodologia para a deteção dos seus biomarcadores. Os biomarcadores de etanol são indicadores fisiológicos de exposição ou ingestão de álcool etílico e podem indicar consumo de álcool a nível crónico e/ou agudo.

Foi desenvolvido um método rápido para análise dos biomarcadores, EtG e ETS em amostras de sangue e de urina. Após a necessária validação e participação adequada em ensaios interlaboratoriais, este método poderá ser utilizado como resposta a questões médico-legais relacionadas com o consumo de etanol.