
NOTA TÉCNICA SOBRE DETERMINAÇÃO DE METANOL E ÁCIDO FÓRMICO EM SANGUE ANTE-MORTEM E POST-MORTEM PARA AUXÍLIO NO DIAGNÓSTICO DE INTOXICAÇÕES

Casos recentes de intoxicação por metanol têm sido reportados em diferentes estados do Brasil, frequentemente associados à ingestão de bebidas adulteradas. O metanol, quando ingerido, é rapidamente biotransformado pela enzima álcool desidrogenase em formaldeído e, subsequentemente, em ácido fórmico, composto responsável pelos principais efeitos tóxicos, como acidose metabólica severa, alterações visuais (que podem evoluir para cegueira irreversível) e falência multissistêmica.

A confirmação laboratorial da presença de metanol no sangue é essencial para orientar o tratamento, incluindo o uso de etanol ou fomepizol como antídotos e a indicação de hemodiálise. Nesse contexto, laboratórios forenses e clínicos devem estar preparados para detectar e quantificar metanol e seus produtos de biotransformação de forma precisa, rápida e reprodutível, a fim de subsidiar decisões médicas emergenciais e investigações toxicológicas *post-mortem*.

Finalidade da Nota Técnica

Diante do aumento de casos de intoxicação por metanol e dos frequentes questionamentos encaminhados à Sociedade Brasileira de Toxicologia (SBTox) sobre como realizar as análises laboratoriais, esta Nota Técnica tem como finalidade apresentar métodos padronizados e recomendados para a determinação de metanol e ácido fórmico em amostras de sangue, tanto em contextos clínicos (*ante-mortem*) quanto forenses (*post-mortem*). As informações aqui descritas **servem como sugestão de referência técnica** para aplicação em laboratórios clínicos, hospitalares, de referência toxicológica e de perícia oficial, contribuindo para a harmonização das práticas analíticas e para o fortalecimento da resposta frente a emergências toxicológicas no país.

Determinação analítica

Diversos métodos analíticos têm sido aplicados para a detecção de metanol, etanol e ácido fórmico, incluindo colorimetria, voltametria, eletroquímica, eletroforese capilar, fluorometria e, principalmente, cromatografia gasosa (GC). Dentre as técnicas citadas, a GC é considerada o “padrão-ouro” para análise de álcoois voláteis em matrizes biológicas, podendo empregar detector de ionização em chama (FID) ou acoplada à espectrometria de massas (MS).

O sangue total é a matriz preferencial para análise, e o método de extração por *headspace* (HS) é amplamente utilizado pela sua rapidez, simplicidade e custo reduzido. O princípio baseia-se na volatilização controlada dos álcoois presentes no sangue e subsequente injeção da fase de vapor no cromatógrafo, evitando contato direto da amostra líquida com o sistema cromatográfico.

A implementação de protocolos padronizados e validados para a determinação de metanol em sangue é fundamental para garantir rapidez, confiabilidade e comparabilidade entre diferentes laboratórios. O uso de HS-GC-FID e HS-GC-MS fornece uma abordagem robusta para apoiar decisões médicas e legais. Dessa forma, fortalece-se a resposta frente a emergências toxicológicas e promove-se maior segurança à saúde pública.

Coleta de sangue

A coleta adequada da amostra é essencial para garantir a confiabilidade dos resultados na determinação de metanol e ácido fórmico. Recomenda-se seguir os seguintes procedimentos, conforme a **Diretriz Técnica SBTox DT02-2020**:

- **Tipo de tubo:** utilizar tubo de tampa cinza, contendo fluoreto de sódio (inibidor glicolítico) e EDTA (anticoagulante);
- **Preenchimento:** o tubo deve ser preenchido até pelo menos 75% do seu volume, evitando excesso de espaço vazio que favorece a volatilização dos álcoois;
- **Assepsia:** realizar a limpeza da pele sem uso de antissépticos alcoólicos, utilizando apenas soluções isentas de etanol, como clorexidina degermante ou iodóforo aquoso;
- **Identificação:** rotular imediatamente após a coleta, com nome, data, hora e tipo de amostra.
- **Armazenamento:** manter a amostra refrigerada entre 2 °C e 8 °C até a análise. Se houver atraso prolongado, armazenar congelada a -20 °C.
- **Amostras *post-mortem*:** preferencialmente coletar sangue da veia femoral externa antes da abertura das cavidades, evitando amostras contaminadas por líquidos cavitários.
- **Janela de detecção ideal:** até 72 horas da exposição ao metanol.

1. Protocolo recomendado para determinação de METANOL em sangue total:

1.1 Preparo de amostras:

- Transferir 500 µL de sangue total para um frasco *headspace*.
- Adicionar 500 µL de água deionizada e 1 mL de padrão interno (n-propanol 0,6 g/L).
- Selar o frasco com tampa metálica e septo em PTFE/silicone.
- Aquecer a 70 °C por 30 min para promover o equilíbrio de fases.
- Recolher 500 µL da fase gasosa e injetar diretamente no GC-FID.

1.2 Condições cromatográficas HS-GC-FID:

- Coluna Poraplot-Q (10 m × 0,32 mm × 5 µm); gás de arraste H₂ (1,5 mL/min); injetor 250 °C; detector 280 °C; forno isotérmico 120 °C; tempo total de análise de 15 min.
- **Interferentes potenciais:** Álcoois como etanol, isopropanol e n-butanol podem coeluir se a separação cromatográfica não for adequada, especialmente quando for empregada análise com o uso de apenas uma coluna e/ou de coluna não apropriada; por isso, é recomendada a utilização de colunas polares (como Poraplot-Q, DB-WAX, VF-624, BAC ou ALC).
- **Observação:** Para a determinação do ácido fórmico (formiato) é necessária uma etapa prévia de derivatização (esterificação) para formar o derivado éster (formiato de isopropila), pois o ácido fórmico não é suficientemente volátil para ser detectado diretamente por GC. Uma proposta de método analítico para determinação de ácido fórmico será demonstrada a seguir.
- Para laboratórios com infraestrutura de maior complexidade, recomenda-se a confirmação da identificação do metanol por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). A análise por HS-GC-MS oferece maior especificidade e sensibilidade, permitindo confirmar a presença de metanol e do produto de derivatização do ácido fórmico.

2. Protocolo recomendado para determinação de ÁCIDO FÓRMICO em sangue total:

2.1 Preparo da solução de derivatização (Isopropanol 10% em meio ácido):

- Para preparo da solução de derivatização, esta solução deve ser preparada na concentração de isopropanol 10% em meio ácido;
- Identificar adequadamente o frasco com capacidade para 25 mL;
- Com auxílio de uma micropipeta, transferir 10 mL de água ultrapura para um balão volumétrico de capacidade de 25 mL;
- Adicionar, com auxílio de micropipeta, 2,5 mL de isopropanol (pureza maior ou igual a 99%);
- Adicionar, com auxílio de pipeta volumétrica, 1,5 mL de Ácido Sulfúrico (pureza maior ou igual a 95%);
- Completar o volume do balão volumétrico para 25 mL com água ultrapura;
- Fechar o frasco e homogeneizar a solução por inversão 10 vezes;
- Fechar o frasco com tampa rosqueável adequada;
- Transferir a solução para frasco de vidro adequado para o armazenamento, previamente identificado
- Armazenar em refrigerador (4 – 8°C), até seu respectivo período de validade;

2.2 Preparo de solução de trabalho para o limite de detecção (LD):

- A partir de uma solução estoque padrão (10 g/L) de ácido fórmico, devem ser realizadas diluições para o preparo do limite de detecção (LD). Cada solução de trabalho deve ser preparada individualmente, em frasco de vidro com capacidade de 10 mL, tampa rosqueável e devem ser previamente identificados.
- Adicionar, com auxílio de micropipeta, o volume de água ultrapura descrito na tabela abaixo (Tabela 1);
- Adicionar, com auxílio de micropipeta, o volume da solução padrão estoque, indicado para cada nível de concentração testado, conforme Tabela 1;
- Fechar o frasco com tampa de rosca;

Tabela 1. Preparo do limite de detecção a partir de solução estoque (10 g/L)

Identificação	Volume solução estoque (µL)	Volume água (µL)	Concentração (mg/L)
LD	25	9,975	0,025

2.3 Preparo da amostra biológica (sangue total):

- Identificar previamente vial *headspace* de capacidade para 20 mL, com a identificação de cada amostra;
- Adicionar, com auxílio de micropipeta, 100 µL da solução de derivatização (isopropanol 10% em meio ácido);
- Adicionar, com auxílio de micropipeta, 20 µL de padrão interno (acetato de etila 5 g/L);
- Adicionar, com auxílio de micropipeta, 100 µL da amostra (individualmente);
- Fechar com tampa rosqueável metálica contendo septo de silicone;
- Homogeneizar gentilmente;

2.4 Condições cromatográficas HS-GC-FID ou HS-GC-MS.

- As condições cromatográficas apresentadas anteriormente para determinação de metanol podem ser as mesmas empregadas para determinação éster de ácido fórmico, desde que alguns parâmetros de separação sejam devidamente ajustados para a identificação desse analito;
- Condições específicas do método analítico, a exemplo do tipo de gás de arraste compatível com o sistema cromatográfico (H₂, N₂ ou He), podem ser ajustadas de acordo com a estrutura disponível no laboratório;
- Colunas cromatográficas polares como Poraplot-Q, DB-WAX, VF-624, BAC ou ALC, podem ser empregadas no método analítico para determinação do éster de ácido fórmico;
- Os métodos analíticos desenvolvidos em HS-GC-MS devem incluir parâmetros específicos para identificação por espectrometria de massas (faixa de *m/z*);

3. Interpretação de resultados em análises de sangue *ante-mortem*:

- A análise de amostras de sangue *ante-mortem* é fundamental para o diagnóstico e manejo da intoxicação por metanol, permitindo definir a necessidade de uso de antídoto e de hemodiálise.
- O uso de antídoto (etanol ou fomepizol) é indicado quando a concentração de metanol ≥ 20 mg/dL ou quando há suspeita clínica acompanhada de acidose metabólica.
- A hemodiálise deve ser iniciada em casos de $\text{pH} \leq 7,15$, acidose metabólica grave ou quando a concentração de metanol ≥ 40 mg/dL.
- Concentrações de metanol acima de 50 mg/dL estão geralmente associadas à toxicidade significativa, enquanto valores superiores a 100 mg/dL são potencialmente fatais, especialmente na ausência de tratamento.
- O ácido fórmico (formiato), principal metabólito tóxico do metanol, correlaciona-se diretamente com a gravidade clínica:
 - 100 a 200 mg/L – níveis associados a sintomas visuais e acidose leve;
 - > 500 mg/L – níveis associados a toxicidade grave e risco de óbito.

4. Interpretação de resultados em análises de sangue *post-mortem*:

- A interpretação adequada da possível intoxicação devido à ingestão de metanol requer a consideração das concentrações de metanol e ácido fórmico;
- Em casos onde houve atendimento hospitalar, as concentrações *post-mortem* de metanol e ácido fórmico podem ser inferiores às concentrações normalmente associados à toxicidade fatal;
- A análise de amostras de sangue coletadas no momento da admissão na unidade hospitalar (*ante-mortem*) é importante para auxiliar na interpretação dos resultados toxicológicos;
- Concentrações de metanol (8,4 – 54,3 dg/L ou 84 - 543 mg/dL) e de ácido fórmico (6,4 – 11 dg/L ou 640 - 1100 mg/L) em sangue *post-mortem* foram relatadas em casos de intoxicação fatal por ingestão de metanol;
- Entretanto, em casos onde houve atendimento hospitalar, as análises de sangue *post-mortem* resultaram em concentrações mais baixas ou indetectáveis para metanol (0 – 4,9 dg/L ou 49 mg/dL) e ácido fórmico (0 – 4,8 dg/L ou 480 mg/L);

Outubro de 2025.

Sociedade Brasileira de Toxicologia - SBTox
Grupo Especializado de Toxicologia Analítica (GETox-Analítica)
Grupo Especializado de Toxicologia Forense (GETox-Forense)

Referências

1. Barceloux DG, et al. (2002). American Academy of Clinical Toxicology Ad Hoc Committee on the Treatment Guidelines for Methanol Poisoning. American Academy of Clinical Toxicology practice guidelines on the treatment of methanol poisoning. J Toxicol Clin Toxicol. 2002;40(4):415-46. <https://doi.org/10.1081/clt-120006745>
2. Bursová, M., et al. (2015). Determination of formic acid, methanol and ethanol in postmortem samples by GC-MS after derivatization. Forensic Sci Int, 248, 115-120. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.12.034>
3. Cerioni A., et al. (2024). Validation of a Headspace Gas Chromatography with Flame Ionization Detection Method to Quantify Blood Alcohol Concentration (BAC) for Forensic Practice. Chemosensors. 2024; 12(7):133. <https://doi.org/10.3390/chemosensors12070133>
4. Extrip Workgroup (2015); StatPearls - Methanol Toxicity (2023); WHO - Methanol Poisoning: Outbreaks and Management (2018). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482121/>
5. Ferrari, L.A., et al. (2003). Toxicological and chemical analysis of methanol poisoning: a review. Forensic Sci Int, 133(1-2), 67-73. [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(03\)00008-7](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(03)00008-7)
6. Franco de Oliveira, S.C.W.S.E., et al. (2016). Determinação de Etanol e Metanol em Sangue por HS/GC-FID nos Casos Atendidos pelo Centro de Controle de Intoxicações de São Paulo. Brazilian Journal of Forensic Sciences, Medical Law and Bioethics, 6(1), 61-71. [https://doi.org/10.17063/bjfs6\(1\)y201661](https://doi.org/10.17063/bjfs6(1)y201661)
7. Ghorbani, M., et al. (2018). Simultaneous determination of formic acid, methanol and ethanol in biological samples by headspace GC-FID following derivatization. J. Occup. Med. Toxicol., 13, 6. <https://doi.org/10.1186/s12995-017-0184-3>

8. Ross JA, et al. (2022) Toxic Alcohol Poisoning. Emerg Med Clin North Am. 2022 May;40(2):327-341. <https://doi.org/10.1016/j.emc.2022.01.012>
9. SBTTox - DT02-2020 – Diretrizes para o Exame Toxicológico de Quantificação de Etanol em Sangue (Alcoolemia). <https://doi.org/10.55592/sbtox.DT02-2020>
10. Tian M, et al. (2022) Fatal methanol poisoning with different clinical and autopsy findings: Case report and literature review. Leg Med (Tokyo). 2022 Feb;54:101995. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2021.101995>
11. Wu S. et al., (2024). Simultaneous determination of formic acid, methanol and ethanol in vitreous and blood samples of postmortem by headspace GC-FID. Microchemical Journal, 201, 110621, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2024.110621>
12. Watterson J. et al. (2008). Formic Acid and Methanol Concentrations in Death Investigations. Journal of Analytical Toxicology, Vol. 32, 2008
<https://doi.org/10.1093/jat/32.3.241>