UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

“Exposição fetal: determinação de drogas de abuso em mecônio empregando a técnica de extração em fase sólida modificada e cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas”

Dayanne Cristiane Mozaner Bordin

**Ribeirão Preto
2013**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

“Exposição fetal: determinação de drogas de abuso em mecônio empregando a técnica de extração em fase sólida modificada e cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas”

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientada: Dayanne Cristiane Mozaner Bordin

Orientador: Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Toxicologia em 11/07/2013. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

**Ribeirão Preto
2013**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Bordin, Dayanne Cristiane Mozaner

Exposição fetal: determinação de drogas de abuso em mecônio empregando a técnica de extração em fase sólida modificada e cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas. Ribeirão Preto, 2013.

85 p.: II; 30 cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis

1. Nicotina. 2. Cocaína. 3. Mecônio. 4. Cromatografia em fase gasosa. 5. Espectrometria de massas.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Dayanne Cristiane Mozaner Bordin

Título do trabalho: “Exposição fetal: determinação de drogas de abuso em mecônio empregando a técnica de extração em fase sólida modificada e cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas.”

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientador: Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela proteção e força em todos os momentos;

Aos meus pais Dorival e Márcia e minha irmã Aryanne que sempre foram fontes de incentivo, dedicação, paciência e amor;

Ao Prof. Bruno Spinosa De Martinis pela confiança depositada, paciência, amizade, ensinamentos e orientação durante esses anos;

Aos grandes amigos toxicologistas e incentivadores Silvia Cazenave, Sueli Moreira de Mello, Paula Soubhia e Rafael Lanaro, por todo auxílio, ensinamentos e amizade, serei eternamente grata à vocês;

Aos amigos e colegas de laboratório Marcela, Mariana, Lidiane, Thiago, Laís, Fabiana, Eduardo, Bruno; por toda ajuda, amizade e paciência;

À toda equipe da Maternidade do Complexo do Aeroporto (MATER) pela disponibilização e colaboração na coleta das amostras;

Às mães que aceitaram participar da pesquisa e doaram as amostras de mecônio dos seus filhos;

Ao amigo Oscar Cabrices pelo auxílio no desenvolvimento do trabalho e doação das ponteiras DPX;

À FAPESP pelo financiamento, auxílio e suporte durante o desenvolvimento do projeto;

E a todos que de alguma forma contribuíram para a execução desse trabalho. Muito Obrigado!

*"Aos outros dou o direito de ser como são,
a mim, o dever de ser cada dia melhor."
Chico Xavier*

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

SPE	Extração em fase sólida
DPX	Disposable Pipette Extraction
GC/MS	Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa
ng/mL	Nanograma por mililitro
ng/g	Nanograma por grama
NIC	Nicotina
COT	Cotinina
OH-COT	- -hidroxicotinina
NORNIC	Nornicotina
NORCOT	Norcotinina
COC	Cocaína
BEG	Benzoilecgonina
COE	Cocaetileno
EMA	Éster Metil Anidroecgonina
COC-d3	Cocaína deuterada
MSTFA	N-Trimetilsilil-N-metil trifluoroacetamida
COT-d3	Cotinina deuterada
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Resolução
DAD	Deteção por Arranjo de Diodos
LC-MS/MS	Cromatografia Líquida / Espectrometria de Massas
GC/NPD	Cromatografia Gasosa/Detector Específico Fósforo,

	Nitrogênio
DC	Deteccção Colorimétrica
LLE	Extração Líquido- líquido
ASE	Extração Acelerada por Solvente
LOD	Limite de Deteccção
LOQ	Limite de Quantificação
PI	Padrão interno
CQ	Controle de qualidade
MATER	Maternidade do Complexo Aeroporto
SNC	Sistema nervoso central
nAChR	Receptores colinérgicos nicotínicos
CO	Monóxido de carbono
R ²	Coeficiente de determinação
CV	Coeficiente de variação
S/R	Sinal/ruído
rpm	Rotações por minuto
µL	Microlitro
µm	Micrometro
m	Metro
°C/min	Graus Celsius por minuto
UGT	UDP-glucuronosiltransferase
CYP	Citocromo P 450
FMO	Flavina monooxygenase

RESUMO

BORDIN, D.C.M. **Exposição fetal: determinação de drogas de abuso em mecônio empregando a técnica de extração em fase sólida modificada e cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas.** 2013. 85 p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

O uso de drogas por mulheres em idade reprodutiva é considerado um grave problema de saúde pública mundial. O mecônio é a primeira excreção do recém-nascido e tem sido utilizado como uma matriz alternativa em análises toxicológicas. A extração em fase sólida (SPE) é um método amplamente utilizado para a purificação e concentração dos analitos em amostras biológicas no campo da análise forense. A maioria dos produtos de SPE convencionais requerem volumes relativamente grandes de solventes levando a um custo acrescido por amostra e um aumento no tempo de processamento da amostra. As ponteiros de extração com fase sólida modificada (DPX) foram utilizadas como uma alternativa aos cartuchos SPE tradicionais. A técnica combina eficiência e rapidez no procedimento de extração, com redução significativa no consumo de solvente e na quantidade de amostra. O objetivo desse estudo foi desenvolver e validar um método para a determinação de nicotina, cotinina, cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno e éster metil anidroecgonina em amostras de mecônio usando DPX e cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC/MS). Os resultados da validação indicaram uma extração eficiente, exata e precisa, com recuperação entre 50-98%, exatidão entre 92-106%, precisão intra-ensaio 4-12% e precisão inter-ensaio 6 a 12%. As curvas de calibração foram lineares com valores de R^2 superiores a 0,99; os limites de detecção (LOD) variaram entre 2,5-15 ng/g e os limites de quantificação (LOQ) entre 10-20 ng/g. O método DPX-GC/MS mostrou ser eficaz para análise traços de drogas presentes em amostras de mecônio. Após desenvolvimento e validação, o método foi aplicado em 50 amostras de mecônio coletadas no berçário da Maternidade do Complexo Aeroporto (MATER) na cidade de Ribeirão Preto - São Paulo, Brasil.

Palavras Chave: Nicotina. Cotinina. Cocaína. Cocaetileno. Benzoilecgonina. Metil éster anidroecgonina. Mecônio. Extração em fase sólida modificada. GC/MS.

ABSTRACT

BORDIN, D.C.M. **Fetal Exposure: determination of drugs of abuse in meconium using solid phase extraction modified and gas chromatography coupled to mass spectrometry.** 2013. 85 p. Dissertation (Master). Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto - University of São Paulo, 2013.

Drug abuse by pregnant women is considered a serious public health problem worldwide. Meconium is the first excretion in newborns and has been used as an alternative matrix to evaluate in utero drug exposure. Solid phase extraction (SPE) is widely employed to prepare and cleanup samples in the field of forensic analysis. Most SPE products require large volumes of solvent, which culminates in longer sample processing times; increased cost per sample and higher limits of detection. Disposable Pipette Extraction tips (DPX) have been used as an alternative to traditional SPE cartridges. They combine efficient and rapid extraction with reduced solvent consumption. The purpose of this study was to develop and validate a method to determine nicotine, cotinine, cocaine, benzoylecgonine, cocaethylene and methyl ester anhydroecgonine in meconium using DPX and GC/MS. Validation results indicated extraction efficiency, ranged between 50-98%, accuracy 92-106%, intra-assay precision 4-12% and inter-assay precision 6 to 12%. Linear calibration curves resulted in R^2 values greater than 0.99; limits of detection ranged from 2.5 - 15 ng/g and the limit of quantitation from 10 - 20 ng/g. The DPX-GC/MS method provided to selectively analyze trace concentrations of drugs in meconium samples. Finally, the developed and validated method was applied to 50 meconium samples collected at the nursery of Maternidade do Complexo Aeroporto (MATER) in the city of Ribeirão Preto - São Paulo, Brazil.

Keywords: Nicotine. Cotinine. Cocaine. Cocaethylene. Benzoylecgonine. Methyl ester anhydroecgonine. Meconium. Modified solid phase extraction. GC/MS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Principais produtos de biotransformação da nicotina no organismo humano	14
Figura 2	Produtos de biotransformação, pirólise e transesterificação da cocaína	17
Figura 3	Amostra de mecônio coletada em fralda	21
Figura 4	Esquema resumido do procedimento analítico	33
Figura 5	Figura modificada obtida da publicação on-line da Gerstel. Esquema de purificação e concentração dos analitos com a ponteira	34
Figura 6	A) Cromatograma obtido da análise por GC/MS de uma solução padrão de COC na concentração de 50 ng/mL e B) Espectro de massas com os íons característicos da COC	44
Figura 7	A) Cromatograma obtido da análise por GC/MS de uma solução padrão de EMA na concentração de 50 ng/mL e B) Espectro de massas com os íons característicos da EMA	45
Figura 8	A) Cromatograma obtido da análise por GC/MS de uma solução padrão de COE na concentração de 50 ng/mL e B) Espectro de massas com os íons característicos da COE	46
Figura 9	A) Cromatograma obtido da análise por GC/MS de uma solução padrão de BEG na concentração de 50 ng/mL e B) Espectro de massas com os íons característicos da BEG	47
Figura 10	A) Cromatograma obtido da análise por GC/MS de uma solução padrão de NIC na concentração de 50 ng/mL e B) Espectro de massas com os íons característicos da NIC	48
Figura 11	A) Cromatograma obtido da análise por GC/MS de uma solução padrão de COT na concentração de 50 ng/mL e B) Espectro de massas com os íons característicos da COT	49
Figura 12	Cromatograma da análise de um extrato empregando a ponteira DPX de uma amostra de mecônio branco (isento dos analitos pesquisados)	50

Figura 13	Cromatograma da análise do extrato de uma amostra de mecônio fortificada com 100 ng dos padrões (EMA, COC, COC-d3, COE, BEG, NIC, COT).	51
Figura 14	Avaliação da quantidade de mecônio submetida à extração com as ponteiros DPX na eficiência de extração dos analitos	53
Figura 15	Avaliação do tempo para homogeneização da amostra de mecônio na eficiência da concentração dos analitos na fase sólida da DPX	54
Figura 16	Representação gráfica da curva de calibração da cocaína em amostra de mecônio	57
Figura 17	Representação gráfica da curva de calibração do cocaetileno em amostra de mecônio	58
Figura 18	Representação gráfica da curva de calibração da benzoilecgonina em amostra de mecônio	58
Figura 19	Representação gráfica da curva de calibração do éster metil anidroecgonina em amostra de mecônio	59
Figura 20	Representação gráfica da curva de calibração da nicotina em amostra de mecônio	59
Figura 21	Representação gráfica da curva de calibração da cotinina em amostra de mecônio	60
Figura 22	Cromatograma da análise de um extrato de uma amostra de mecônio branco (isento dos analitos pesquisados), após a injeção do ponto mais alto da curva de calibração	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Principais técnicas analíticas propostos para determinação de nicotina, cocaína e metabólitos em mecônio	22
Tabela 2	Íons selecionados para identificação e quantificação dos analitos e os respectivos tempos de retenção	36
Tabela 3	Recuperação dos CQs baixos dos analitos na presença dos interferentes	55
Tabela 4	Valores de LOD e LOQ do método proposto	55
Tabela 5	Valores da precisão intra-ensaio (%) obtido em amostras de mecônio adicionadas com três níveis de concentração de cada analito	61
Tabela 6	Valores da precisão inter-ensaio (%) obtido em amostras de mecônio adicionadas com três níveis de concentração de cada analito	61
Tabela 7	Valores de exatidão (%) obtidos nas amostras de mecônio adicionadas com três níveis de concentração de cada analito nos cinco dias de análises	62
Tabela 8	Valores de recuperação (%) obtidos nas amostras de mecônio adicionadas com três níveis de CQs de cada analito	63
Tabela 9	Valores obtidos dos ensaios da estabilidade pós-processamento	65
Tabela 10	Informações obtidas, através do questionário aplicado sobre hábito de uso de drogas, das 100 mães que aceitaram participar da pesquisa	67
Tabela 11	Dados médios de peso e tamanho dos recém-nascidos de mães que aceitaram participar da pesquisa	67
Tabela 12	Resultados das concentrações (ng/g) obtidas através das análises toxicológicas nas amostras de mecônio de recém-nascidos da MATER	68
Tabela 13	Classificação das 5 categorias (A, B, C, D e X), de acordo com os fatores de riscos à gestação, de acordo com o FDA	71

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	Estatísticas do uso de substâncias	11
1.2	Tabaco	13
1.2.1	Tabaco e gestação	15
1.3	Cocaína	16
1.3.1	Cocaína e gestação	18
1.4	Métodos de diagnóstico para verificação da exposição fetal	19
1.5	Análises toxicológicas: amostras biológicas utilizadas para verificar exposição fetal	19
1.5.1	Amostra biológica alternativa de escolha: Mecônio	20
1.6	Métodos utilizados para análises toxicológicas em mecônio	21
1.6.1	Extração em fase sólida com dispositivo DPX	23
2	ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA	26
3	OBJETIVOS	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1	MATERIAIS	30
4.1.1	Padrões e reagentes utilizados	30
4.1.2	Equipamentos e acessórios	30

4.1.3	Preparo de soluções e reagentes	31
4.1.3.1	Soluções padrão	31
4.1.3.2	Solução de ácido clorídrico 0,1 M	31
4.1.3.3	Solução de acetonitrila 30% (V/V)	31
4.1.4	Amostras de mecônio	32
4.1.4.1	Amostras de mecônio branco	32
4.1.4.2	Amostras de mecônio selecionadas para análises toxicológicas	32
4.2	MÉTODOS	33
4.2.1	Procedimento experimental	33
4.2.2	Condições cromatográficas	35
4.2.3	Otimização do método	36
4.2.3.1	Estudo da influência da massa de mecônio para análise	36
4.2.3.2	Estudo do tempo para homogeneização da amostra com a fase sólida da ponteira DPX	37
4.2.4	Validação do método	37
4.2.4.1	Parâmetros utilizados na validação do método	37
4.2.4.1.1	Seletividade	37
4.2.4.1.2	Limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ)	38
4.2.4.1.3	Linearidade	38

4.2.4.1.4	Recuperação	39
4.2.4.1.5	Precisão	39
4.2.4.1.6	Exatidão	40
4.2.4.1.7	Carry over	41
4.2.4.1.8	Estabilidade	41
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1	Separação cromatográfica obtida nas condições padronizadas	50
5.2	Otimização do método	52
5.2.1	Estudo da influência da massa de mecônio para análise	52
5.2.2	Estudo do tempo para homogeneização do extrato da amostra de mecônio com a fase sólida ponteira DPX	53
5.3	Validação do método	54
5.3.1	Seletividade	54
5.3.2	Limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ)	55
5.3.3	Linearidade	56
5.3.4	Precisão	60
5.3.5	Exatidão	63
5.3.6	Recuperação	63
5.3.7	Carry over	64

5.3.8	Estabilidade	65
5.4	Dados obtidos através da aplicação dos questionários e resultados das análises toxicológicas em amostras de mecônio	66
6	CONCLUSÕES	74
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
	APÊNDICE 1	81
	APÊNDICE 2	83
	ANEXO 1	85

INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

O consumo de drogas por mulheres em idade reprodutiva é considerado um importante problema de saúde pública no mundo devido ao crescente número de usuárias e aos danos causados durante a exposição fetal a essas substâncias (CARLINI *et al.*, 2006; FARST *et al.*, 2011).

As complicações induzidas pelo uso de substâncias durante a gravidez são inúmeras e multifatoriais e podem apresentar repercussões indesejáveis e efeitos deletérios, sendo uma das causas do grande número de gestações mal sucedidas. Para a mãe, elas vão do retardo no crescimento intrauterino até aborto espontâneo. Os efeitos para o feto variam de acordo com o tipo de substância utilizada, os principais são: baixo peso, microcefalia, hipoxemia, anomalias congênitas, tremores, deficiências neurológicas, alterações comportamentais, retardo no desenvolvimento, arritmias cardíacas, hipertensão arterial e síndrome da morte súbita em neonatos (COSTA, 1998).

Desta forma, a detecção da exposição fetal a drogas de abuso é de fundamental importância para determinar a intervenção médica e psicossocial apropriada, garantir assistência completa e necessária para manutenção da saúde da mãe e do recém-nascido.

1.1- Estatísticas do uso de substâncias psicoativas

As informações a respeito da magnitude do problema podem ser obtidas através de levantamentos recentes. De acordo com o Relatório Mundial sobre Drogas 2012, publicado pela *United Nations Office on Drugs and Crime* (UNODC), cerca de 230 milhões de pessoas, aproximadamente 5% da população mundial, o que representa 1 a cada 20 pessoas na faixa etária entre 15 a 64 anos, fez uso de alguma droga ilícita pelo menos uma vez no ano de 2010. Na mesma faixa etária, cerca de 27 milhões de pessoas, 0,6% da população mundial, são usuárias e/ou dependentes de alguma substância. As médias das taxas globais em 2010 de prevalência do consumo de drogas foram: *Cannabis* 3,9%; anfetaminas 0,75%; opióides 0,7% e cocaína 0,4% (UNODC, 2012).

As estimativas globais permaneceram estáveis nos últimos cinco anos, no entanto observou-se um aumento no consumo de cocaína e tabaco no Brasil. Outra característica que chama atenção no relatório é consumo de drogas ilícitas pela população feminina brasileira, que é aproximadamente um terço do uso entre os homens, enquanto em outros países essa taxa é de um décimo (UNODC, 2012).

No Brasil, o Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID) realizou em 2005, o segundo levantamento domiciliar do uso de drogas dos brasileiros entre 12 e 65 anos, em 108 municípios com mais de 200 mil habitantes, tais municípios representam 41,3% da população total do Brasil. Segundo o levantamento, aproximadamente 20% dos entrevistados já fizeram uso de alguma substância. Das nove drogas mais utilizadas no país (álcool, tabaco, maconha, solventes, benzodiazepínicos, orexígenos, estimulantes, cocaína e xarope de codeína), o tabaco corresponde a 41,1% do consumo, a maconha 8,8%, e a cocaína 2,9%, dessas estatísticas o sexo feminino corresponde a 36,3%; 5,1% e 1,2%; respectivamente (CARLINI *et al.*, 2006).

Nos EUA, uma pesquisa mostrou que a prevalência de uso de cocaína entre mulheres grávidas é de 0,9%, o que significa que cerca de 45.000 bebês são expostos anualmente à cocaína (SCHILLER *et al.*, 2005). Outro estudo europeu revelou através da análise de líquido meconial durante consultas de pós natal, que 7,9% das gestantes tinham sido expostas a substâncias psicoativas, sendo que em 4,4% a exposição foi exclusivamente a cocaína (PICHINI *et al.*, 2005).

Em um estudo realizado na cidade de Ribeirão Preto, no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto–USP, com 479 gestantes, através de entrevistas e análises toxicológicas, observou-se a incidência de uso de cocaína em 6% das mães e de tabaco em 31% durante a gestação (MARTINIS-CELINI, 2001).

A partir destes estudos e levantamentos, pode-se observar a dimensão do problema do consumo de drogas pela população e em particular, a população feminina.

1.2- Tabaco

O tabagismo foi introduzido na sociedade moderna com a chegada da Revolução Industrial e teve seu ápice com o fim das Grandes Guerras. O hábito de fumar surgiu inicialmente entre os homens e, somente após a década de 50, tornou-se comum

entre as mulheres. Atualmente, é um dos principais problemas de saúde pública, sendo a segunda causa de morte no mundo, perdendo apenas para a hipertensão. Estima-se que cerca de um bilhão da população mundial é usuária de tabaco, com consumo médio diário de 5,5 cigarros por habitante. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostram que o tabaco é responsável por cinco milhões de óbitos por ano, um milhão deles ocorrem nas Américas (GALVÃO *et al.*, 2008; UTAGAWA *et al.*, 2007).

O tabaco é uma planta anual da família das Solanáceas e apresenta diversas variedades; a principal e mais utilizada é a *Nicotiana tabacum* L. Em sua composição química pode haver mais de 500 constituintes, variando de acordo com a sazonalidade da região de cultivo, coleta e armazenamento. A nicotina, um alcaloide encontrado nas folhas da planta, é o seu principal componente ativo. No entanto, quando o tabaco é fumado, além da nicotina são administradas ao organismo milhares de substâncias tóxicas. Dessas substâncias, já foram detectadas cerca de 6.700, das quais 4.720 foram identificadas quimicamente, entre elas o benzopireno, nitrosaminas, benzeno, amônia, metais pesados como chumbo e cádmio, arsênio e formol (CARVALHO, 2000; GALVÃO *et al.*, 2008; VALLE *et al.*, 2007).

A nicotina é prontamente absorvida pelo trato respiratório, mucosas orais e pele, é transportada pela corrente sanguínea exercendo seus efeitos em até 7 segundos. Cerca de 80 a 90% são metabolizados principalmente no fígado, mas também ocorrem transformações pulmonar e renal. A cotinina é o principal metabólito, sendo encontrada em altas concentrações, enquanto a nicotina-1'-N-óxido e 3-hidroxicotinina e os metabólitos conjugados são encontrados em menores quantidades (Figura 1). A eliminação ocorre rapidamente por via renal. Apresenta baixa ligação com as proteínas plasmáticas, sendo distribuída rapidamente. Possui meia-vida plasmática de 30 a 60 minutos. Por ser uma molécula lipossolúvel é capaz de atravessar a barreira placentária, trazendo prejuízos ao feto (CARVALHO, 2000; FURTADO, 2002; GALVÃO *et al.*, 2008; Sant'Anna, 2010).

CYP- Citocromo P450

UGT- UDP-glucuronosiltransferase

FMO – Flavina monooxigenase

Figura 1: Principais produtos de biotransformação da nicotina no organismo humano (TRICKER, 2003).

A nicotina pode atuar como agonista ou antagonista dos receptores nicotínicos da acetilcolina, exercendo ação estimulante e depressora ganglionar dose-dependente. Sua ação farmacológica ocorre quando ela liga-se a receptores colinérgicos nicotínicos (nAChR) presentes nos gânglios autonômicos, junção neuromuscular e sistema nervoso central (SNC). Diferentes combinações dessas subunidades estão dispostas na membrana celular, formando um canal iônico; quando a nicotina liga-se aos receptores promove alterações conformacionais na célula ocorrendo a abertura desses canais, o que promove o influxo de cátions (Na^+ e Ca^{2+}). No Sistema Nervoso Central (SNC), a nicotina exerce seus efeitos interagindo com nAChRs pré-sinápticos localizados nos terminais dos axônios, estimulando esses receptores, resultando no aumento da liberação de vários neurotransmissores (FURTADO, 2002; PICCIOTTO *et al.*, 2000).

1.2.1- Tabaco e gestação

O uso de tabaco durante a gravidez acarreta sérios prejuízos e riscos para mãe e consequências nocivas ao feto. O feto é um ser altamente vulnerável e quando é exposto aos componentes do cigarro todo seu desenvolvimento pode ser comprometido. No terceiro trimestre de gestação ocorre o maior risco de prematuridade e baixo peso ao nascer, sendo que esse risco aumenta proporcionalmente ao número de cigarros fumados (LAW *et al.*, 2003; MELLO *et al.*, 2001).

Os componentes do cigarro atravessam a barreira placentária, alterando a oxigenação e o metabolismo placentário. Dentre os vários componentes do tabaco que interferem na evolução da gravidez, destacam-se a ação da nicotina e do monóxido de carbono (CO). A nicotina age no sistema cardiovascular, provocando liberação de catecolaminas na circulação materna ocorrendo taquicardia, vasoconstrição periférica e aumento da pressão sanguínea. Como resultado disso, ocorre a redução do fluxo sanguíneo placentário e da perfusão útero placentária com consequente má oxigenação e nutrição fetal; esses mecanismos são responsáveis pela restrição do crescimento fetal (ALIYU *et al.*, 2010; LAW *et al.*, 2003; MELLO *et al.*, 2001).

A hemoglobina possui afinidade pelo CO cerca de 220 vezes maior que pelo oxigênio. O CO liga-se à hemoglobina materna e fetal, diminuindo a capacidade de transporte do oxigênio sanguíneo, ocasionando hipóxia tecidual em ambos, podendo levar ao quadro de hipoxemia crônica no feto e, em casos mais graves, ao aborto (GALVÃO *et al.*, 2008; MELLO *et al.*, 2001).

Sastry *et al.* (1999) verificaram que a cotinina, o principal metabólito da nicotina, facilita a ação vasoconstritora da prostaglandina E2 e o acúmulo desse metabólito na circulação fetal pode contribuir para a indução do trabalho de parto prematuro e do aborto espontâneo em fumantes.

A ocorrência da síndrome da morte súbita infantil, está em alguns casos associada à exposição fetal aos constituintes do tabaco, também foram observados em estudos mais recentes o aumento do risco de ocorrerem má formação congênita cardíaca, redução do perímetro cefálico, infecções pós-natal em prematuros e nascimento prematuro (GRAY *et al.*, 2008; MITCHELL e MILERAD, 2006).

1.3- Cocaína

O efeito estimulante da cocaína é conhecido há mais de 3000 anos na História da Humanidade, quando os nativos da América do Sul mascavam suas folhas. Na cultura Inca, a planta de coca era considerada de origem divina e chamada de “presente do Rei Sol” (JOHANSON e FISCHMAN, 1989).

Levantamentos sobre uso de drogas mostram que o consumo mundial de cocaína tem diminuído, no entanto, no Brasil o consumo da droga aumentou, sendo atualmente o segundo maior mercado consumidor de cocaína das Américas. As regiões sul e sudeste do país são as áreas que possuem maior atividade de grupos ligados ao tráfico e onde há maior consumo da droga (UNODC, 2012).

A cocaína é um dos alcalóides presentes nas folhas da planta do gênero *Erythroxylum coca*. A pasta base de coca, que constitui a forma traficada da droga, é obtida submetendo as folhas a um processo de maceração. Através do tratamento da pasta base com ácido clorídrico, é obtido o cloridrato de cocaína, a cocaína em pó, comumente traficada nas ruas. E, para obtenção da cocaína na forma de base livre, o *crack*, são adicionadas ao cloridrato de cocaína sob altas temperaturas, amônia ou bicarbonato de sódio e água (ALVES, 2010; CHASIN e SILVA, 2008).

As vias de administração da cocaína são nasal (IN), intravenosa (IV), oral (VO) ou pulmonar (VP). As vias nasal e pulmonar são as mais utilizadas pelos usuários devido à facilidade de administração e a velocidade e a intensidade dos efeitos proporcionados (CHASIN e SILVA, 2008; ISENCHMID, 1999).

A cocaína liga-se às proteínas plasmáticas apresentando alta afinidade pela α -1-glicoproteína ácida, seu caráter lipofílico facilita sua passagem pela barreira hematoencefálica e seu acúmulo no SNC. O tempo de meia-vida da cocaína é dose-dependente podendo variar de 45 a 90 minutos. A duração dos efeitos estimulantes da droga está relacionada às vias de administração, por via venosa os efeitos duram de 30 a 45 minutos e por via nasal entre 60 a 90 minutos. Já os efeitos do *crack* (via pulmonar) tem duração de 15 a 20 minutos, no entanto, apesar de ter um tempo de ação menor, essa forma da droga chega com maior intensidade e velocidade no SNC, o que justifica seu alto grau de abuso e dependência (ALVES, 2010; CHASIN e SILVA, 2008; WILLS, 2002).

A biotransformação da cocaína ocorre principalmente no fígado, as enzimas que participam desse processo são as esterases e as pseudocolinesterases, hepáticas e

plasmáticas. Os três principais metabólitos formados são a benzoilecgonina, ecgonina e éster metil ecgonina (Figura 2). A benzoilecgonina é o principal metabólito da cocaína, cerca de 50% deste metabólito é excretado pela urina. Quando há o consumo do *crack*, ocorre formação do produto de transformação éster metil anidroecgonina. Com a administração concomitante da cocaína com bebidas alcoólicas ocorre a produção de outro metabólito, o cocaetilen, resultante da transesterificação da cocaína. A eliminação ocorre por via renal, é predominantemente controlada pela biotransformação da droga, que devido às características da molécula, é muito extensa, sendo apenas pequenas quantidades excretadas inalteradas na urina (CHASIN e SILVA, 2008; ISENCHMID, 1999; WILLS, 2002).

Figura 2: Produtos de biotransformação, pirólise e transesterificação da cocaína (Modificado de CONE *et al.*, 1994).

A cocaína tem ação estimulante do SNC, atua inibindo a receptação dos neurotransmissores presentes na membrana plasmática dos neurônios pré-sinápticos: dopamina, noradrenalina e serotonina. O acúmulo de noradrenalina é responsável pelos efeitos adrenérgicos observados no uso da cocaína, como a midríase, vasoconstrição, hipertensão, taquicardia e taquipnéia. As alterações comportamentais parecem ser mediadas pela dopamina e serotonina, além de efeitos como intensa euforia, aumento da excitação sexual e da autoconfiança. Os

efeitos indesejáveis incluem paranóia, alucinações e disforia. A estimulação central (*rush*) é seguida pela depressão (*crash*). O reforço positivo do *rush* versus o reforço negativo do *crash* é a principal razão para o abuso crônico da cocaína (CHASIN e SILVA, 2008; ISENCHMID, 1999; WILLS, 2002).

1.3.1- Cocaína e gestação

O uso de cocaína no período gestacional é responsável por sérios prejuízos para mãe e para o feto. De maneira geral, as grávidas usuárias, não fazem acompanhamento correto do pré-natal, apresentando maiores chances de contraírem doenças sexualmente transmissíveis. Dados atuais indicam um aumento do consumo de drogas por mulheres em idade reprodutiva. Um estudo realizado pela Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, mostrou um aumento em 91% das internações femininas nos últimos 3 anos devido ao uso de cocaína (ALVES, 2010; SÃO PAULO, DIÁRIO OFICIAL DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2009).

A vulnerabilidade do feto aumenta quando exposto à cocaína, pois todo seu desenvolvimento pode ser comprometido. Durante a gestação, esse consumo provoca vaso espasmos, aumento do ritmo cardíaco e hipertensão materna, gerando vasoconstrição uterina e redução do fluxo sanguíneo para o útero, resultando em uma diminuição do transporte de nutrientes e oxigênio para o feto. Esses fatores estão associados ao rompimento e hemorragias placentárias, parto prematuro e aborto. Defeitos estruturais e malformações, também estão associados à redução do fluxo sanguíneo uterino, placentário e fetal causados pela droga (ALVES, 2010; MOORE, 1998; WOODS, 1997).

A síndrome de abstinência é outro potencial de complicação que deve ser encarado com cuidado nos três primeiros dias após o parto. Os principais sintomas observados são: sucção deficiente, problemas na amamentação, irritabilidade, hipertonia, bocejos e espirros (ABP, 2005; CHASIN & SILVA, 2008).

1.4- Métodos de diagnóstico para verificação da exposição fetal

Para uma intervenção médica e psicossocial apropriada, com o propósito de garantir a assistência completa e necessária para manutenção da saúde da mãe e

do recém-nascido, o diagnóstico da exposição fetal após uso materno de drogas é essencial.

A detecção e o diagnóstico da exposição fetal a drogas de abuso, pode ser realizada, direta ou indiretamente, por meio de análise de amostras biológicas (avaliando a presença de marcadores biológicos) e aplicação de questionários (MOORE, 1998; Sant'Anna, 2010).

O problema mais frequente associado à realização de entrevistas é a veracidade das informações prestadas, muitas mães omitem o uso de drogas devido ao sentimento de culpa, o medo de sofrer punições ou sanções legais. Em muitos trabalhos, são observados resultados desconexos entre os percentuais de mães que afirmam o uso de alguma substância durante a aplicação dos questionários com os resultados analíticos (GRAY *et al.*, 2008; Sant'Anna, 2010).

Por isso, é de fundamental importância a combinação do histórico materno, com as informações adquiridas em entrevistas e os resultados analíticos de amostras biológicas para não subestimar a incidência de exposição às substâncias *in útero*, possibilitando à equipe de saúde estender o tempo de hospitalização e, conseqüentemente, tratar os sintomas da síndrome de abstinência ou os efeitos que podem vir a se manifestar após o nascimento da criança (ALVES, 2010; Sant'Anna, 2010).

1.5- Análises toxicológicas: amostras biológicas utilizadas para verificar exposição fetal

As análises toxicológicas envolvem detecção, identificação e quantificação das substâncias relevantes do ponto de vista toxicológico, a fim de ser estabelecida a relação de causa e efeito, apresentando resultados inequívocos (DE MARTINIS *et al.*, 2012). As amostras amplamente utilizadas para essas análises de drogas de abuso são sangue e urina. No entanto, quando é necessário verificar a exposição fetal essas matrizes biológicas não são adequadas, pois fornecem dados de exposições recentes (96 a 120 horas após o último uso), além disso, outro ponto que deve ser levado em consideração é a dificuldade da coleta da urina do recém-nascido (GRAY *et al.*, 2008; Sant'Anna, 2010).

A verificação do consumo materno de drogas mais específico pode ser realizada utilizando-se matrizes biológicas alternativas ou não convencionais, como: mecônio, unhas ou cabelo (ALVES, 2010; DE MARTINIS *et al.*, 2012).

A formação das unhas inicia-se durante a 10ª semana gestacional, enquanto o mecônio forma-se entre a 10ª a 12ª semana e o cabelo inicia seu crescimento durante os últimos três meses de gestação (DE MARTINIS *et al.*, 2012; TOLEDO, 1999). O cabelo e a unha são amostras que muitas vezes não estão disponíveis em quantidade suficiente e, além disso, a coleta do cabelo do bebê representa uma dificuldade adicional no uso desta matriz, originada por motivo estético e/ou cultural (GRAY *et al.*, 2007).

O mecônio (Figura 3), matriz de escolha para o desenvolvimento do trabalho, tem sido apontado em diversos trabalhos sobre análise da exposição uterina a drogas de abuso, devido à disponibilidade da amostra, facilidade na coleta e capacidade de identificar a exposição fetal a partir do primeiro trimestre de gravidez (BIELAWSKI *et al.*, 2005; DE MARTINIS *et al.*, 2012).

1.5.1- Amostra biológica alternativa de escolha para análises toxicológicas:

Mecônio

O mecônio consiste na primeira excreção do recém-nascido. É uma matriz extremamente complexa, apresenta coloração verde escura a negra e não possui o odor característico, geralmente presente nas fezes. É composto por água, células epiteliais descamadas do trato gastrointestinal e da pele, ácido e sais biliares, colesterol, precursores do esterol, substâncias do grupo sanguíneo, enzimas, mucopolissacarídeos, açúcares, proteínas, traços de metais, várias secreções pancreáticas, intestinais e resíduos de líquido amniótico deglutido (ALVES, 2010; BIELAWSKI *et al.*, 2005; DE MARTINIS *et al.*, 2012).

Figura 3: Amostra de mecônio coletada em fralda

Assim como os nutrientes, as diversas substâncias utilizadas pela mãe durante a gestação, inclusive as drogas de abuso, são transferidas por difusão passiva através dos vasos sanguíneos da placenta para o feto. Essas substâncias se acumulam no intestino e são eliminadas através do mecônio. Portanto, o mecônio é uma boa matriz para a verificação das substâncias armazenadas e dos prejuízos causados ao recém-nascido (ALVES, 2010; BIELAWSKI *et al.*, 2005; DE MARTINIS *et al.*, 2012; GARERI *et al.*, 2006).

Estudos utilizando zinco coproporfirina, pigmento biliar mecônio-específico, como marcador mostraram que o mecônio é completamente evacuado até 125 horas após o nascimento. Depois desse período, já é observada a formação de uma matriz de transição entre o mecônio e as fezes (DE MARTINIS *et al.*, 2012; GARERI *et al.*, 2006).

1.6- Métodos utilizados para análises toxicológicas em mecônio

Na literatura, o número de trabalhos encontrados com mecônio, para determinação de nicotina, cocaína e seu metabólitos é relativamente restrito. Na Tabela 1 estão relacionadas algumas técnicas de extração e de detecção de nicotina, cocaína e seus metabólitos em amostras de mecônio, bem como seus limites de detecção e de quantificação.

Tabela 1: Principais técnicas analíticas propostas para determinação de nicotina, cocaína e metabólitos em mecônio.

Analitos	Extração	Deteção	LOD	LOQ	Referência
NIC; COT	SPE	HPLC/DAD	10 ng/g	10 ng/g	Baranowski <i>et al.</i> , 1998
NIC; COT; OH-COT; NORNIC e NORCOT	Hidrólise Enzimática/ SPE	LC-MS/MS	1,25; 1,25; 1,25; 5,0 e 1,25 ng/g	5,0; 1,25; 1,25; 5,0 e 5,0ng/g	Gray <i>et al.</i> , 2008
NIC; COT; OH-COT	LLE/SPE	HPLC/DC	3,25; 3,50 e 3,85 ng/g	3,25; 3,50 e 3,85 ng/g	Kohler <i>et al.</i> , 2007
NIC; COT	ASE/SPE	GC/NPD	3 e 30 ng/g	5 e 40 ng/g	Sant'Anna, 2010
COC, BEG	LLE/SPE	GC/MS	30 e 40 ng/g	30 e 40 ng/g	López <i>et al.</i> , 2007
COC; BEG; COE e EMA	LLE/SPE	GC/MS	6,52; 5,94; 6,02 e 23,42 ng/g	13,66; 9,38; 9,53 e 71,97 ng/g	Abusada <i>et al.</i> , 1993
COC; BEG; COE e EMA	LLE/SPE	GC/MS	10; 30; 20 e 40 ng/g	20; 40; 20 e 60 ng/g	Alves, 2010
COC; BEG; COE; NIC e COT	LLE/SPE	LC/MS	0,5; 1; 0,5; 2,5 e 0,5 ng/g	1; 1; 1; 2,5 e 1 ng/g	Gray, 2009

NIC, Nicotina; COT, Cotinina; OH-COT, - *-hidroxicotinina*; NORNIC, Nornicotina; NORCOT, Norcotinina.

COC, Cocaína; BEG, Benzoilecgonina; COE, Cocaetileno; EMA, Éster Metil Anidroecgonina

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Resolução

DAD – Deteção por Arranjo de Diodos

LC-MS/MS - Cromatografia Líquida / Espectrometria de Massas

GC/MS - Cromatografia Gasosa / Espectrometria de Massas

GC/NPD- Cromatografia Gasosa/Detector Específico Fósforo, Nitrogênio

DC – Deteção Colorimétrica

LLE- Extração Líquido- líquido

ASE- Extração Acelerada por Solvente

SPE - Extração em fase sólida

LOD - Limite de Deteção

LOQ - Limite de Quantificação

1.6.1- Extração em fase sólida com dispositivo DPX

Apesar de todas as vantagens apresentadas para a realização das análises toxicológicas em mecônio para detecção de exposição fetal às drogas de abuso, a matriz apresenta como principal desvantagem a complexidade e heterogeneidade, exigindo etapas adicionais de preparo, purificação e concentração dos analitos (BARROS, 2011; MOORE *et al.*, 1998; SALEM *et al.*, 2001). A efetividade dos resultados e a garantia da qualidade das análises dependem desses passos intermediários, principalmente na GC/MS, na qual a sensibilidade e especificidade são grandemente influenciadas pelo ruído de base (GALLARDO e QUEIRÓZ, 2008).

Para essa etapa crucial no procedimento analítico o procedimento amplamente utilizado é a extração em fase sólida (SPE). Tradicionalmente, a técnica de SPE mais utilizada são cartuchos com fase sólida compacta essa exige o uso de quantidades significativas de solventes orgânicos, alguns inclusive, tóxicos, além de exigir etapas adicionais, a fim de concentrar os analitos de interesse e atingir os limites de detecção desejáveis (ABUSADA *et al.*, 1993; DPX, 2008; KOLE *et al.*, 2010; GUAN *et al.*, 2010).

A técnica de extração em fase sólida modificada com ponteiros descartáveis DPX (*Disposable Pipette Extraction*) é uma variável da SPE tradicional, no entanto essa tecnologia de preparo de amostra é simples, exige uso mínimo de solvente. A DPX em sua forma original caracteriza-se por ser uma ponteira de 1,0 mL apresentando fase sólida dispersa, na qual os analitos entram em contato constante. As ponteiros DPX oferecem grandes vantagens por ser um método de extração miniaturizado em fase sólida utilizado para extrações rápidas em amostras em solução, que promove um rápido equilíbrio entre a fase sorvente e a amostra a ser purificada, promovendo a sorção do analito pela fase estacionária, a qual possui um polímero ligado a grupamentos sulfônicos, próprio para extração por troca catiônica. A utilização desse dispositivo combina rapidez, uso reduzido de solventes e de amostra, com alta recuperação e eficiência de extração, gerando produtividade e rendimento no procedimento analítico (ABUSADA *et al.*, 1993; DPX, 2008; KOLE *et al.*, 2010; GUAN *et al.*, 2010).

A literatura do uso da DPX é restrita, não há até o momento nenhum trabalho utilizando o dispositivo em mecônio, tratando-se, portanto, de uma técnica inovadora para análises em mecônio. GUAN *et al.* (2010) realizou uma pesquisa utilizando

dispositivos DPX para extração de praguicidas em frutas e vegetais. As análises foram realizadas sem processo de evaporação do solvente e mostraram viabilidade e rapidez na realização do procedimento. Ao avaliar os resultados, concluiu que o método é extremamente rápido e sensível para análise de praguicidas polares, apresentando recuperações superiores a 72% e desvios-padrão inferiores a 10%.

ELLISON *et al* (2009) analisaram a presença de drogas de abuso em sangue e urina utilizando os dispositivos DPX. Após realizarem uma série de testes concluíram que a utilização da DPX foi ideal para procedimento de extração devido ao modo misto de troca catiônica e suas características de fase reversa. O procedimento apresentou uma alta qualidade de extração minimizando a presença de interferentes, sendo realizado em um curto período de tempo.

***ASPECTOS ÉTICOS DA
PESQUISA***

2- ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

A ética da pesquisa com seres humanos deve resguardar a integridade dos envolvidos, envolvendo questões sobre a preservação da privacidade, a minimização de riscos e desconfortos, a busca de benefícios para sociedade e proteção dos grupos envolvidos. Nesse contexto é utilizado o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e a avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa para proteção dos indivíduos envolvidos. O TCLE permite a compreensão dos procedimentos, riscos, desconfortos, benefícios e direitos, com principal objetivo de permitir uma decisão autônoma do indivíduo participar da pesquisa (GOLDIM *et al.*, 2003).

Atendendo à Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, este projeto foi encaminhado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP (Anexo 1) – CEP/FCFRP número 256 e pelo comitê de ética da Maternidade e Centro de Referência da Saúde da Mulher (MATER) do Complexo do Aeroporto de Ribeirão Preto.

OBJETIVOS

3- OBJETIVOS

Os objetivos do trabalho foram:

- 1) Desenvolvimento e validação de um método analítico para identificação de nicotina, cotinina, cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno e éster metil anidroecgonina em mecônio empregando a extração em fase sólida modificada DPX para purificação e concentração da amostra e cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS).
- 2) Aplicar o método desenvolvido e validado em amostras de mecônio coletadas de neonatos do berçário da Maternidade do Complexo Aeroporto (MATER).
- 3) Avaliar a correlação entre as informações obtidas na entrevista materna e a presença dos biomarcadores pesquisados nas amostras de mecônio.

MATERIAIS E MÉTODOS

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1-MATERIAIS

4.1.1- Padrões e reagentes utilizados

Os padrões analíticos certificados, cocaína (COC), benzoilecgonina (BEG), cocaetileno (COE), metil éster anidroecgonina (EMA), nicotina (NIC) e cotinina (COT), e os padrões internos deuterados, cocaína-d3 (COC-d3) e cotinina-d3 (COT-d3), foram obtidos da Cerilliant (EUA) na concentração de 1 mg/mL.

Metanol, acetonitrila, ácido clorídrico, diclorometano e acetato de etila foram obtidos da JT Baker (EUA); 2-propanol e hidróxido de amônio, da Mallinkrodt (EUA) e N-Trimetilsilil-N-metil trifluoroacetamida (MSTFA), da Sigma- Aldrich (EUA). As ponteiras de extração modificadas (DPX-CX 1) foram adquiridas da Gerstel (EUA). Todos os solventes utilizados eram grau HPLC, e todos os reagentes eram grau ACS (American Chemical Society).

4.1.2- Equipamentos e acessórios

Para a realização das análises das amostras de mecônio, foi utilizado um Cromatógrafo em fase gasosa série 7890A, com amostrador automático 7693, acoplado a um espectrômetro de massas 5975C (Agilent, EUA); coluna capilar HP-5MS (30 m x 250 µm x 0,25 µm de espessura de filme); cilindro de gás Hélio 5.0 analítico (White Martins, Brasil); seringa de injeção cromatográfica (Hamilton, EUA); centrífuga universal 32 (Hettich, Alemanha); concentrador de amostras Caliper LifeScience Turbo Vap (LP, EUA); banho seco TE- 021 (Tecnal, Brasil); agitador TE-140 (Tecnal, Brasil); vórtex AP-56 (Phoenix, EUA); balança analítica BL 1500S (Sartorius, EUA) e deionizador de água (Simplicity, Millipore, EUA)

4.1.3- Preparo de soluções e reagentes

4.1.3.1- Soluções padrão

Soluções padrão de referência de cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno, éster metilanidroecgonina, nicotina e cotinina foram obtidas em uma concentração inicial de 1 mg/mL. A partir dessas soluções foram preparadas soluções de trabalho nas concentrações de 1, 2 e 10 µg/mL, todas diluídas em metanol, exceto a solução de cocaína, que foi diluída em acetonitrila. As soluções de padrão interno cocaína-d3 e cotinina-d3 foram preparadas apenas na concentração de 10 µg/mL.

As diluições foram realizadas da seguinte forma: 100 µL da ampola de 1 mg/mL foram transferidos para um balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com o solvente adequado originando a solução de concentração 10 µg/mL. Partindo dessa solução de 10 µg/mL, foi transferido 1 mL para outro balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume para obtenção da solução com concentração de 1 µg/mL. Para preparo da solução de concentração final de 2 µg/mL, foi transferido 1 mL da solução de concentração de 10 µg/mL para um balão volumétrico de 5 mL e completado o volume com solvente.

Todas as soluções preparadas foram devidamente identificadas, armazenadas na geladeira a 2° C, em frascos com tampa rosqueável, *parafilm* e envolvidos por papel alumínio.

4.1.3.2- Solução de ácido clorídrico 0,1 M

Foram pipetados 8,4 mL de ácido clorídrico concentrado (36,5%) e adicionados lentamente em um béquer contendo 500 mL de água deionizada sob agitação constante, após completa diluição a solução foi transferida para balão volumétrico de 1.000 mL e completou-se o volume com água deionizada.

4.1.3.3- Solução de acetonitrila 30% (V/V)

A solução de acetonitrila 30% (v/v) foi utilizada para condicionamento da fase sólida das ponteiros DPX-CX1. Foram transferidos 30 mL de acetonitrila para um balão volumétrico de 100 mL e, em seguida, o volume foi completado com água deionizada.

4.1.4- Amostras de mecônio

As 100 amostras de mecônio utilizadas na pesquisa foram coletadas de recém-nascidos de mães que aceitaram participar da pesquisa, responderam o questionário e assinaram o TCLE (apêndice 1 e 2). Essas amostras foram coletadas durante as primeiras 24 horas de vida, de forma consecutiva e aleatória, sem restrição quanto ao sexo, raça, tipo de parto, características de crescimento intra-útero e/ou idade gestacional.

As coletas das amostras foram realizadas no berçário da Maternidade do Complexo Aeroporto (MATER) em Ribeirão Preto, São Paulo, e duraram cerca de três meses (janeiro a março de 2012). O mecônio era coletado diretamente da fralda, com auxílio de espátula de plástico, colocado em frasco coletor universal sem a adição de conservante e armazenado a – 20°C no *freezer* do laboratório. As amostras eram descongeladas à temperatura ambiente no momento da análise.

4.1.4.1- Amostras de mecônio branco

As amostras de mecônio branco (controle negativo) foram selecionadas para serem utilizadas na validação do método. Essas amostras, previamente selecionadas após aplicação dos questionários, foram submetidas ao procedimento de extração descrito no procedimento experimental em 4.2.1 e analisadas por GC/MS pelo método proposto, garantindo assim a isenção dos analitos na mesma e, consequentemente, os resultados quantitativos obtidos durante a validação do método.

4.1.4.2- Amostras de mecônio selecionadas para análises toxicológicas

Foram selecionadas para análises toxicológicas 50 amostras de mecônio de recém-nascidos de mães que afirmaram durante a aplicação do questionário o uso de drogas pelo menos uma vez na vida.

4.2- MÉTODOS

4.2.1- Procedimento experimental

O método adaptado e desenvolvido para extração e identificação da cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno, éster metilanidroecgonina, nicotina e cotinina em mecônio foi desenvolvido a partir dos métodos propostos por Oyler *et al.* (1996), Abusada *et al.* (1993), Clark *et al.* (1992), Joya *et al.* (2010) e segue esquematizado na Figura 4:

Figura 4: Esquema do procedimento analítico.

Preparo da amostra e procedimento de extração: 0,3 g ($\pm 0,005$ g) de mecônio foram pesados em um tubo de vidro e fortificados com 200 ng/g dos padrões internos. Foram adicionados 2 mL de metanol e submetidos a agitação vigorosa sob vortex e, em seguida, a agitação horizontal por cerca de 20 minutos a 200 rpm. Posteriormente, a amostra foi centrifugada por 20 minutos a 2800 rpm, o sobrenadante (fase orgânica metanólica) foi transferido para um tubo de vidro limpo contendo 100 μ l de HCl 0,1M para a realização do procedimento de extração.

Procedimento de purificação e concentração dos analitos com a ponteira DPX: a representação esquemática do procedimento está apresentada na Figura 5. As ponteiras DPX-CX1 foram condicionadas com uma solução de acetonitrila (30%, v/v) e, em seguida a amostra foi aspirada e mantida em contato com a fase sólida por noventa segundos, permitindo uma entrada de ar constante, afim de que a amostra entre em contato com o polímero sulfonado presente na fase sólida da ponteira e a concentração dos analitos seja realizada com sucesso. Após esse período, prosseguiu-se com a lavagem da ponteira, realizada com 1 mL de água deionizada. Para a eluição dos analitos foi utilizada uma solução de diclorometano: isopropanol: hidróxido de amônia (78:20:2), realizando três vezes o procedimento afim de garantir a retirada dos analitos retidos na fase sólida da ponteira. O eluato foi evaporado a 45°C no concentrador de amostras.

Figura 5: Figura modificada obtida da publicação on-line da Gerstel.

Esquema de purificação e concentração dos analitos com a ponteira (DPX, 2008).

Derivatização: o resíduo seco foi reconstituído com 80 µL de acetonitrila e 60 µL foram transferidos para *insert* em um *vial* com 20 µL N-Metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA) agitado em vortex por 10 segundos, em seguida, colocado por 20 minutos à 60°C no banho seco. Após atingir temperatura ambiente, 1 µL foi injetado no GC/MS.

4.2.2- Condições cromatográficas

A separação dos analitos (COC, COE, BEG, EMA, NIC, COT) nas amostras de mecônio foi realizada por uma coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (30 m x 250 µm x 0,25 µm de espessura de filme). As injeções foram feitas no modo *splitless*. Para determinação e identificação utilizou-se um GC/MS operado por impacto de elétrons com detector de massas operado selecionando os íons no modo *Selected Ion Monitoring* (SIM). Inicialmente, os espectros de massas dos analitos e padrões deuterados foram determinados no modo *full scan* (m/z 80-400) para identificar seus respectivos tempos de retenção e as características de fragmentação. A programação da temperatura do forno do cromatógrafo foi a seguinte: 70°C (2 minutos), aumentando a 30°C/min para 160°C (5 minutos), 5°C/min para 170°C, 20°C/min para 200°C, 10°C/min para 220°C e por último um aumento de 30°C/min rampa para 320°C (3 minutos). A temperatura do injetor e da interface foi de 280°C, do quadrupolo 150°C e do *transfer line* 230°C. Hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 0,8 ml/min.

Para validação do método, foram monitorados 3 fragmentos característicos no modo SIM. Os íons monitorados (qualificadores e quantificadores) e os tempos de retenção dos analitos são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2: Íons selecionados para identificação e quantificação dos analitos e os respectivos tempos de retenção.

<i>Analito</i>	<i>Íons de identificação e quantificação (m/z)</i>	<i>Tempo de retenção (min)</i>
NIC	84, 133, <u>161</u>	7,13
EMA	<u>152</u> , 166, 181	7,69
COT	<u>98</u> , 118, 176	13,11
COT –d3	<u>101</u> , 118, 179	13,17
COC	82, <u>182</u> , 303	17,89
COC – d3	85, <u>185</u> , 306	17,87
COE	82, <u>196</u> , 317	18,16
BEG – TMS	82, <u>240</u> , 361	18,23

Os íons sublinhados foram os selecionados para serem utilizados na quantificação.

4.2.3- Otimização do método

Antes de iniciar os ensaios necessários para validação, foram realizados testes para verificar a situação ótima para os parâmetros que compõem o método. Cada um desses parâmetros foi analisado em triplicata, observando a abundância absoluta obtida no GC/MS.

4.2.3.1- Estudo da influência da massa de mecônio para análise

Alíquotas de amostra de mecônio de massa igual a 0,3 g; 0,5 g e 0,7 g foram fortificadas com 100 ng de cada analito de interesse (COC, COE, BEG, EMA, NIC, COT) e os padrões internos (COC-d3 e COT-d3) e submetidas ao procedimento experimental descrito em 4.2.1. Para cada período de tempo determinado, análises foram conduzidas em triplicata.

4.2.3.2- Estudo do tempo para homogeneização da amostra com a fase sólida da ponteira DPX

Alíquotas de amostra de mecônio (0,3g) foram fortificadas com 100 ng de cada analito de interesse (COC, COE, BEG, EMA, NIC, COT) e os padrões internos (COC-d3 e COT-d3) e submetidas ao método descrito em 4.2.1, variando-se o tempo de contato do extrato metanólico com a fase sólida da ponteira em 40, 60 ou 90 segundos. Para cada período de tempo determinado, as análises foram conduzidas em triplicata.

4.2.4- Validação do método

A validação é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento, tem como principal objetivo demonstrar que o método é adequado ao uso pretendido garantindo a qualidade das análises e gerando resultados confiáveis, evitando assim falsas interpretações ou conclusões errôneas. (MARTINS, 2008). Após desenvolvimento e otimização da técnica de extração e do método de análise no GC/MS foi realizada a validação do método.

4.2.4.1- Parâmetros utilizados na validação do método

Os parâmetros utilizados para validação da metodologia foram os recomendados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) apresentados na resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003 e RE nº 27 de 17 de maio de 2012. Os cálculos foram realizados utilizando o software fornecido pelo fabricante (Agilent Chemstation) e o programa Microsoft® Excel® 2004.

4.2.4.1.1- Seletividade

Define-se como a habilidade que o método possui de identificar e quantificar os analitos com ou sem a presença de interferentes (componentes endógenos ou exógenos). Foram adicionados às amostras, drogas comumente usadas pela população de estudo.

O parâmetro foi determinado fortificando-se amostras de mecônio com o controle de qualidade baixo (CQ1) de cada um dos analitos estudados (COC: 30 ng/g; EMA, COE, BEG, COT: 40 ng/g; NIC: 150 ng/g), em triplicata, com uma concentração elevada (2 µg/g) de possíveis compostos interferentes que podem estar presentes em situações reais de análises. Os resultados de quantificação desses CQs não devem variar mais do que 20% quando calculado na presença dos interferentes investigados. Os interferentes analisados foram: ácido acetil salicílico (AAS), alprazolam, anfetamina, metanfetamina, metilenodioxianfetamina (MDMA), diazepam, bromazepam, lorazepam, flurazepam, nortriptilina, fenobarbital, cafeína, dipirona, efedrina, fenilefrina, fluoxetina, metoclopramida, sulfato de ferro e tetrahydrocannabinol (THC) (ANVISA, 2012).

4.2.4.1.2- Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) são determinados empiricamente fortificando amostras de mecônio branco com diferentes concentrações decrescentes dos padrões analíticos, em triplicata. São aceitáveis os valores estabelecidos que apresentarem sinal/ruído de pelo menos 3:1 para LOD e 10:1 para LOQ, para todos os íons (ANVISA, 2012).

4.2.4.1.3- Linearidade

Tem como finalidade avaliar a capacidade do método apresentar resultados diretamente proporcionais a concentração dos analitos na amostra, dentro de um determinado intervalo. Foi estabelecida usando 6 pontos de calibração de diferentes concentrações de cada analito. Determinada pelo coeficiente de determinação (R^2) que deve apresentar valor maior ou igual 0,99 com a equação de regressão linear calculado para cada concentração dos padrões (ANVISA, 2012).

4.2.4.1.4- Recuperação

A recuperação mede a eficiência do procedimento de extração dos analitos nas amostras de mecônio dentro de um limite de variação. Porcentagens de recuperação do analito e do padrão interno próximas a 100% são desejáveis, embora admita-se valores menores, desde que o método seja preciso e exato (ANVISA, 2012).

Foi determinada utilizando os três controles de qualidade (baixo, médio e alto), em quintuplicata de cada analito comparando-se os resultados de quantificação de amostras que foram fortificadas antes e depois das extrações. Os padrões internos foram adicionados anteriormente à extração nas duas situações, de forma que os resultados de quantificação obtidos pudessem avaliar a capacidade do solvente de extrair os analitos das amostras de mecônio quando comparados com uma situação que, teoricamente, equivale a 100% de eficiência de extração (ANVISA, 2012).

4.2.4.1.5- Precisão

A precisão avalia a proximidade dos resultados obtidos, quando o procedimento é aplicado diversas vezes em uma mesma amostra homogênea, em idênticas condições de ensaio, representando o grau de dispersão dos resultados entre os ensaios, determinando assim, a repetibilidade do método. É determinada utilizando-se, no mínimo três concentrações (alta, média e baixa), contemplando o intervalo adotado na curva de calibração de maneira uniforme, realizando-se, no mínimo, cinco determinações por concentração. Foram considerados dois níveis da precisão:

Precisão intra-ensaio: é a concordância entre os resultados obtidos em análises dentro de um curto período de tempo, com o mesmo analista e mesma instrumentação.

Precisão inter-ensaio: é a concordância entre os resultados obtidos pelo mesmo laboratório em dias diferentes. Recomenda-se dois dias de diferença entre as análises.

Pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV) de uma série de medidas, em que o limite inferior de quantificação deve apresentar valores inferiores a 20% e os demais pontos valores inferiores a 15%. O DPR pode ser calculado segundo a fórmula:

$$\text{DPR} = (\text{DP}/\text{CMD}) \times 100$$

Onde:

DPR= Desvio padrão relativo

DP= Desvio padrão

CMD= Concentração média determinada

A validação desse parâmetro foi realizada em 5 dias, avaliando-se as precisões intra e inter-ensaio de cada um dos 3 CQs (alto, médio e baixo) em quintuplicata (ANVISA, 2012).

4.2.4.1.6- Exatidão

A exatidão avalia a proximidade e o grau de concordância dos resultados obtidos da análise em relação ao valor verdadeiro. É calculada pela fórmula:

$$\text{Exatidão} = (\text{CME}/\text{CT}) \times 100$$

Onde:

CME= Concentração média experimental

CT= Concentração Teórica

Esse parâmetro é determinado utilizando-se no mínimo três concentrações (alta, média e baixa), ao longo da faixa de variação da curva de calibração, em quintuplicata de cada concentração. Os valores são obtidos pela conversão dos valores das áreas relativas em valores de concentração através das equações de regressão linear das curvas analíticas. Os controles de qualidade inferiores para serem considerados aceitáveis devem estar dentro do intervalo de 80% a 120% e os controles intermediários e superiores dentro do intervalo de 85% a 115%. A exatidão é avaliada juntamente com a precisão, aplicando-se o cálculo nas médias das

concentrações dos cinco dias de análises para cada controle de qualidade (ANVISA, 2012).

4.2.4.1.7- Carry over

Este parâmetro tem como finalidade avaliar se os analitos de uma análise anterior pode interferir na próximo, assim, o *carry over* foi avaliado injetando uma amostra livre de analitos, mecônio branco, imediatamente após a injeção do ponto mais alto da curva de calibração (ANVISA, 2012).

4.2.4.1.8- Estabilidade

Esse parâmetro avalia o comportamento do analito nas condições exigidas durante todo processo analítico na matriz biológica. Os ensaios de estabilidade realizados foram:

Estabilidade de curta duração: avalia a variação da concentração do analito na amostra biológica exposto à temperatura ambiente, em um período de 24 horas.

Estabilidade de pós-processamento: avalia a variação da concentração do analito cerca de 8 horas após a amostra ser processada. Foi determinada através da reinjeção do controle de qualidade baixo (CQ1) e alto (CQ3) 8 horas após a primeira injeção (ANVISA, 2012).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

As Figuras 6 a 10 apresentam os cromatogramas e espectros de massas de cada analito estudado, com as abundâncias de cada um dos íons selecionados.

Figura 6: A) Cromatograma obtido da análise por GC/MS de uma solução padrão de COC na concentração de 50 ng/mL e B) Espectro de massas com os íons característicos da COC.

Figura 7: A) Cromatograma obtido da análise por GC/MS de uma solução padrão de EMA na concentração de 50 ng/mL e B) Espectro de massas com os íons característicos da EMA.

Figura 8: A) Cromatograma obtido da análise por GC/MS de uma solução padrão de COE na concentração de 50 ng/mL e B) Espectro de massas com os íons característicos da COE.

B)

Figura 9: A) Cromatograma obtido da análise por GC/MS de uma solução padrão de BEG na concentração de 50 ng/mL e B) Espectro de massas com os íons característicos da BEG.

A)

Figura 10: A) Cromatograma obtido da análise por GC/MS de uma solução padrão de NIC na concentração de 50 ng/mL e B) Espectro de massas com os íons característicos da NIC.

Figura 11: A) Cromatograma obtido da análise por GC/MS de uma solução padrão de COT na concentração de 50 ng/mL e B) Espectro de massas com os íons característicos da COT.

5.1- Separação cromatográfica obtida nas condições padronizadas

Inicialmente, para o desenvolvimento do método foram otimizadas as condições cromatográficas, possibilitando uma boa separação e resolução dos picos. O tempo empregado para cada análise foi de 22 minutos.

A Figura 11 apresenta um cromatograma da extração de uma amostra de mecônio branco (isento dos analitos pesquisados) utilizando a ponteira DPX, comprovando a complexidade da matriz e a presença de interferentes endógenos. No entanto, apesar dessa complexidade da amostra de mecônio a presença desses interferentes não modificam os tempos de retenção dos analitos pesquisados; além disso, a presença do detector de massas fornecendo o espectro de massas, garante os resultados analíticos.

Figura 12: Cromatograma da análise de um extrato empregando a ponteira DPX de uma amostra de mecônio branco (isento dos analitos pesquisados).

Na Figura 13 é apresentado um cromatograma da análise do extrato de uma amostra de mecônio fortificada com os analitos na concentração de 100 ng/g.

Figura 13: Cromatograma da análise do extrato de uma amostra de mecônio fortificada com 100 ng dos padrões (EMA, COC, COC-d3, COE, BEG, NIC, COT).

O processo de derivatização da benzoilecgonina foi realizado utilizando o agente derivatizante MSTFA (N-Metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida). A derivatização é uma reação química que altera os compostos orgânicos melhorando sua estabilidade e consequentemente suas propriedades cromatográficas, permitindo a detecção por cromatografia em fase gasosa (ALVES, 2010). Caracteriza-se por ocorrerem reações de substituição no grupo polar do composto, nesse caso reações de sililação, na qual o hidrogênio mais instável é substituído pelo grupo trimetilsilil (TMS), reduzindo-se a polaridade do composto. O derivado sililado é, assim, mais volátil e mais estável, consequentemente sua detecção é aumentada.

5.2- Otimização do método

Na otimização das condições do método, foram avaliadas as seguintes variáveis: quantidade de amostra submetida à extração e tempo de extração.

5.2.1- Estudo da influência da massa de mecônio para análise

A influência da quantidade de mecônio utilizada para extração na eficiência de processo pode ser visualizada na Figura 14. A otimização dessa etapa garante uma técnica analítica miniaturizada de preparo da amostra, garantindo a rapidez do processo, simplicidade e praticidade, menor manipulação da amostra e o baixo consumo de solventes orgânicos.

Observou-se que a eficiência da extração com a ponteira DPX decresce com o aumento da quantidade de amostra. Avaliando-se a resposta de área absoluta proporcionalmente à quantidade avaliada, selecionou-se a massa de 0,3 g. Como o objetivo da técnica é o consumo mínimo de solventes orgânicos, mantendo-se o volume de metanol (2 mL), foram testadas as diferentes massas. Observou-se que quanto maior a massa de amostra maior o número de interferentes no extrato, e esses inviabilizavam o processo, pois obstruíam a ponteira e o processo de homogeneização para purificação da amostra e concentração dos analitos era prejudicado. O fluxo do solvente na DPX é bidirecional, significa que são introduzidos e removidos da ponteira pelo mesmo local, quando o procedimento é otimizado esse fator é responsável por acelerar o processo de extração, no entanto se houver obstrução na ponta não haverá garantia do processo. Outro ponto importante é a menor manipulação da amostra biológica pelo analista, reduzindo riscos de contaminação.

Figura 14: Avaliação da quantidade de mecônio submetida à extração com as ponteiros DPX na eficiência de extração dos analitos.

5.2.2- Estudo do tempo para homogeneização do extrato da amostra de mecônio com a fase sólida da ponteira DPX

Foi avaliada e otimizada a influência do tempo de homogeneização da amostra com a fase sólida da DPX na eficiência da purificação da amostra e concentração dos analitos. Os resultados obtidos são observados na Figura 15. Ao entrar em contato com as soluções extraídas, o sorvente presente na fase sólida da DPX-CX se assemelha a um gel, proporcionando alta eficiência para a extração. Para garantir essa eficiência, é muito importante que esse tempo de contato com os analitos seja otimizado durante o procedimento, a fim de alcançar a repetibilidade esperada do processo. Nessa etapa a otimização foi realizada a partir dos tempos já descritos na literatura: 40, 60 e 90 segundos (DPX, 2008; KOLE *et al.*, 2010; GUAN *et al.*, 2010; ELLISON *et al.*, 2009). Encontrou-se o tempo ideal de 90 segundos, onde obteve-se um extrato limpo com a maior concentração de analitos.

Figura 15: Avaliação do tempo para homogeneização da amostra de mecônio na eficiência da concentração dos analitos na fase sólida da DPX.

5.3- Validação do método

5.3.1- Seletividade

Na Tabela 3, estão apresentados os valores das concentrações dos controles de qualidade baixos obtidos no parâmetro de especificidade. O método mostrou ser seletivo e específico para o objetivo de análise proposto. Forneceu resposta aos analitos pesquisados sem alteração nos tempos de retenção, foi capaz de detectar e quantificar os analitos na presença dos interferentes mantendo as concentrações dentro do intervalo aceitável, ou seja, de 80 a 120%. Os interferentes analisados foram: ácido acetil salicílico (AAS), alprazolam, anfetamina, metanfetamina, metilenodioxianfetamina (MDMA), diazepam, bromazepam, lorazepam, flurazepam, nortriptilina, fenobarbital, cafeína, dipirona, efedrina, fenilefrina, fluoxetina, metoclopramida, sulfato de ferro e tetrahydrocannabinol (THC).

Tabela 3: Resultados das concentrações finais obtidas dos CQs baixos dos analitos na análise do parâmetro seletividade.

	COC 40 ng/g	EMA 40 ng/g	BEG 60 ng/g	COE 40 ng/g	NIC 150 ng/g	COT 40 ng/g
Concentração Final (ng/g)	34,50	32,75	50,25	33,6	128,42	32,2

5.3.2- Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)

A Tabela 4 apresenta os valores obtidos para LOD e LOQ do método desenvolvido.

Tabela 4: Valores de LOD e LOQ do método proposto.

Analito	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)
COC	2,5	10
EMA	6	10
COE	8	10
BEG	10	15
NIC	15	20
COT	5	10

Os LOD e LOQ do método foram considerados satisfatórios e adequados para o propósito do estudo, uma vez que resultados similares são apresentados na literatura por outros pesquisadores em análises de amostras de mecônio.

Alves (2010) em sua pesquisa obteve valores superiores aos encontrados no presente trabalho para LOD e LOQ em mecônio, foram de 40 e 60 ng/g para EMA, 10 e 20 ng/g para COC, 20 e 20 ng/g para COE e 30 e 40 ng/g para BEG, respectivamente. Gray (2009) utilizando um LC/MS obteve valores próximos, mas inferiores aos encontrados, para LOD e LOQ foram 0,5 e 1 ng/g para COC, 1 e 1 ng/g para BEG, 0,5 e 2,5 ng/g para COE, 2,5 e 2,5 ng/g para NIC e 0,5 e 1 ng/g para

COT. Essa diferença nos valores pode ter ocorrido pelo tipo de equipamento utilizado para as análises, tipo de extração e concentração dos analitos. Em uma pesquisa de drogas de abuso em sangue utilizando a DPX, realizada pela Gerstel (DPX Labs), o LOD para COC foi de 10 ng/mL, valor inferior foi encontrado no presente trabalho em mecônio. Outros valores de LOD e LOQ encontrados na literatura estão apresentados na Tabela 1.

Durante o desenvolvimento do método observou-se que a adição da solução de ácido clorídrico (0,1M) antes do procedimento de extração e concentração dos analitos com a ponteira DPX contribuiu para obtenção de melhores resultados de sensibilidade reduzindo o LOD. Este fato pode ser explicado pela presença da resina catiônica presente na fase sólida da ponteira. O sorvente presente é formado por micro partículas, de 10 a 20 μm , o mecanismo de permuta catiônica permite extrações mais eficientes de compostos polares contendo grupamentos amina, características presentes nos analitos estudados. Outro fator importante para obtenção de LOD baixos é a etapa de eluição, que deve ser realizada com composto básico, pois as drogas básicas, ligadas por interação iônica com os grupos sulfonados do sorvente presente na fase sólida da DPX-CX, só podem ser eluídos por desprotonação das aminas.

5.3.3- Linearidade

Para estudo da linearidade, uma ampla faixa de trabalho foi utilizada, com base nas concentrações geralmente verificadas em amostras de mecônio em casos de exposição fetal ao tabaco e à cocaína relatados na literatura.

Foram obtidas curvas de calibração lineares para todos os analitos de interesse, com coeficiente de correlação maior que 0,99. Os pontos de calibração foram: 20, 50, 100, 400, 700 e 900 ng/g de mecônio para cocaína, cocaetileno, benzoilecgonina, metil éster anidroecgonina e cotinina; 100, 200, 300, 500, 800 e 1000 ng/g de mecônio para nicotina.

Lopez et al. (2007) determinaram a faixa de linearidade para a COC e BEG de 40 – 2000 ng/g; Alves (2010) determinou as seguintes faixas de linearidade 20 – 1000 ng/g para COC e COE, 40- 1500 ng/g para BEG e 60-1500 para EMA, ambos com coeficientes de variação maiores de 0,99.

Gray et al. (2008) determinaram a faixa de linearidade de 1,25 – 500 ng/g para COT e de 5 – 500 ng/g para NIC, e em um outro estudo no ano de 2009 Gray et al. utilizando um LC/MS/MS obtiveram uma faixa de linearidade de 1-500 ng/g para COT e de 2,5 – 500 ng/g para NIC, com coeficientes de variação também maiores que 0,99 para ambos analitos. Santa'anna (2010) utilizando um GC/NPD determinou a faixa de linearidade de 5 – 500 ng/g para COT e 40 – 500 ng/g para NIC, com coeficiente de variação de 0,98 para ambos.

As curvas de calibração e as equações de regressão linear dos analitos são apresentadas nas Figuras 16 a 21. O eixo Y representa a razão entre a área do padrão pela área do padrão interno e o eixo X representa a concentração do analito expressa em nanograma por grama de mecônio.

Figura 16: Representação gráfica da curva de calibração da cocaína em amostra de mecônio.

Figura 17: Representação gráfica da curva de calibração do cocaetileno em amostra de mecônio.

Figura 18: Representação gráfica da curva de calibração da benzoilecgonina em amostra de mecônio.

Figura 19: Representação gráfica da curva de calibração do éster metil anidroecgonina em amostra de mecônio.

Figura 20: Representação gráfica da curva de calibração da nicotina em amostra de mecônio.

Figura 21: Representação gráfica da curva de calibração da cotinina em amostra de mecônio.

5.3.4- Precisão

As análises foram realizadas em cinco dias diferentes. As Tabelas 5 e 6 apresentam os valores médios de precisão intra-ensaio e inter-ensaio. A precisão intra-ensaio obtida para todos os analitos apresentou uma variação de 4,21% a 12,05%, que foram os valores encontrados respectivamente para o CQ 3 (alto) da cocaína e o CQ 1 (baixo) da nicotina. Para a precisão inter-ensaio os valores médios encontrados variaram de 6,37% a 11,25%, que correspondem aos valores respectivamente do CQ 1 (baixo) do éster metil anidroecgonina e CQ 2 (médio) da nicotina. Todos os valores encontrados estavam dentro do limite de variação aceitável, até 20% para o CQ1 e até 15% para os CQ2 e CQ3.

Tabela 5: Valores da precisão intra-ensaio (%) obtido em amostras de mecônio adicionadas com três níveis de concentração de cada analito.

Analitos	CQ1 (%)	CQ2 (%)	CQ3 (%)
COC	5,50	4,67	4,21
EMA	7,86	4,46	6,25
COE	10,35	9,12	7,24
BEG	8,32	7,56	5,6
NIC	12,05	5,42	4,63
COT	7,32	5,20	4,78

CQ1 (baixo) - COC: 30ng/g; EMA, COE, BEG, COT: 40ng/g; NIC: 150ng/g.

CQ2 (médio) – COC: 200ng/g, EMA, COE, BEG, COT: 300ng/g; NIC: 500ng/g.

CQ3 (alto) – COC: 500ng/g, EMA, COE, BEG, COT: 600ng/g; NIC: 800ng/g.

Tabela 6: Valores da precisão inter-ensaio (%) obtido em amostras de mecônio adicionadas com três níveis de concentração de cada analito.

Analitos	CQ1 (%)	CQ2 (%)	CQ3 (%)
COC	8,29	9,34	7,74
EMA	6,37	7,46	8,34
COE	7,32	8,59	7,15
BEG	10,18	7,96	8,57
NIC	8,97	11,25	9,46
COT	8,44	9,23	6,69

Xia et al. (2000) destacaram em sua pesquisa que valores imprecisos são encontrados para todos os analitos com a utilização do mecônio como matriz de escolha, quando comparado com os resultados desses mesmos analitos utilizando

matrizes biológicas convencionais como sangue e urina. Isto pode ser explicado pela complexidade e heterogeneidade do mecônio, que exige etapas adicionais de preparo de amostra. Outro ponto que o trabalho chama atenção é que os dados de cada concentração foram obtidos a partir de amostras de mecônio diferentes, devendo, portanto ser considerada a variabilidade da composição das mesmas.

5.3.5- Exatidão

Nos cinco dias de análises, os controles de qualidades foram quantificados dentro dos limites de variação aceitáveis, sendo 80 a 120% para controles baixos (CQ1) e 85 a 115% para controles médios e altos (CQ2 e CQ3). Os valores de exatidão encontrados para os analitos estavam dentro dos limites aceitáveis, variaram de 92,57% (CQ 2 da cocaína) a 106,38% (CQ 1 da cotinina). A Tabela 7 apresenta os valores médios de exatidão obtidos para as amostras de mecônio nas três concentrações de CQs.

Tabela 7: Valores de exatidão (%) obtidos nas amostras de mecônio adicionadas com três níveis de concentração de cada analito nos cinco dias de análises.

Analitos	CQ1 (%)	CQ2 (%)	CQ3 (%)
COC	97,32	92,57	102,4
EMA	98,75	94,43	93,28
COE	93,27	105,33	95,24
BEG	89,67	103,57	97,42
NIC	94,37	101,24	99,47
COT	106,38	102,27	98,33

5.3.6- Recuperação

Os valores de recuperação obtidos para a determinação dos analitos em mecônio são apresentados na Tabela 8, variaram entre 50,72% (CQ 3 da nicotina) e 98,94% (CQ 1 do cocaetileno).

Tabela 8: Valores de recuperação (%) obtidos nas amostras de mecônio adicionadas com três níveis de CQs de cada analito.

Analitos	CQ1(%)	CQ2(%)	CQ3(%)
COC	97,86	84,22	73,35
EMA	98,45	93,27	84,19
COE	98,94	92,43	85,11
BEG	94,75	86,14	76,85
NIC	93,44	69,45	50,72
COT	95,33	71,02	69,9

Como já descrito anteriormente, recuperações próximas a 100% são desejáveis, mas admitem-se valores menores, desde que o método seja preciso e exato, e os limites de detecção e quantificação estejam apropriados para as análises propostas. O método desenvolvido apresentou-se preciso (item 6.3.4) e exato (item 6.3.5) e com limites apropriados (item 6.3.2).

Valores semelhantes de recuperação são encontrados na literatura usando DPX, Ellison et al. (2009) realizaram uma pesquisa de drogas em urina e obtiveram recuperação de 103,8% para COC e 88,5% para BEG. Em outro trabalho publicado pela Gerstel (DPX Labs) em 2009, onde realizaram pesquisa de drogas em sangue a recuperação para COC foi de 67,9%.

Avaliando os resultados de recuperação, os CQs baixos mostraram valores maiores comparados aos CQs altos. Fato que pode ser explicado pela reduzida quantidade de fase sólida presente nas ponteiras DPX-CX, quando comparada aos cartuchos convencionais. Baixas porcentagens de recuperação já são esperadas em amostras complexas, considerando algumas perdas atribuídas a própria amostra, ou

seja, sua complexidade, como no caso do mecônio. Entretanto, foram obtidos excelentes resultados para seletividade e sensibilidade dos analitos e uma purificação satisfatória nas amostras de mecônio utilizando as ponteiras DPX-CX.

5.3.7- *Carry over*

A avaliação do *carry over* foi realizada através da injeção de um extrato de uma amostra de mecônio branco após o ponto mais alto da curva de calibração. Não foi observado *carry over* no método após a injeção imediata de uma amostra de mecônio branco seguida do ponto mais alto da curva de calibração, como mostra a Figura 22.

Figura 22: Cromatograma da análise de um extrato de uma amostra de mecônio branco (isento dos analitos pesquisados), após a injeção do ponto mais alto da curva de calibração.

5.3.8- Estabilidade

De acordo com a literatura, a validação total do método deve incluir experimentos de estabilidade, quando os dados não estiverem disponíveis (PETERS *et al.*, 2007), por isso, foram realizados apenas os experimentos para estabilidade pós processamento. Dados da literatura mostram que a cocaína mantém-se estável em amostras de mecônio por até 24 horas em temperatura ambiente (estabilidade de curta duração), reduzindo apenas 25% da sua concentração; no entanto se houver adição de solvente orgânico, metanol por exemplo, um aumento na sua estabilidade de até 72 horas sem perdas na concentração da cocaína pode ser observado. Já a nicotina permanece estável por até 72 horas com perdas menores que 15%. Para armazenamento de longo prazo, o mecônio deve ser congelado a -15 C, assim a cocaína e a nicotina permanecem estáveis por pelo menos 9 meses (estabilidade de longa duração).

A estabilidade de curta duração pós processamento foi determinada através da reinjeção dos controles de qualidade inferiores e superiores 24 horas após a primeira injeção, em triplicata. A Tabela 9 representa os valores obtidos da estabilidade pós processamento para nicotina e cotinina.

Tabela 9: Valores obtidos dos ensaios da estabilidade pós-processamento.

Analitos	CQ1 (ng/g)	CV (%)	Exatidão (%)	CQ3 (ng/g)	CV (%)	Exatidão (%)
EMA	34,50	2,7	87,0	509,46	9,94	97,72
COC	37,08	3,8	92,71	405,50	7,45	96,16
COE	34,02	3,0	85,04	495,06	3,43	88,34
BEG	49,80	3,16	102,24	385,02	2,55	95,9
NIC	105,62	3,2	66,01	695,35	16,9	82,55
COT	32,40	5,6	103,88	395,80	8,50	103,90

5.4- Dados obtidos através da aplicação dos questionários e resultados das análises toxicológicas em amostras de mecônio

Após desenvolvimento e validação do método foram realizadas as análises toxicológicas das amostras de mecônio de recém-nascidos provenientes da MATER.

A MATER, Maternidade e Centro de Referência da Saúde da Mulher, localiza-se no Complexo do Aeroporto uma região na cidade de Ribeirão Preto, cuja população é de baixa renda, foi inaugurada em março de 1998 destinada para assistência da população feminina usuária do SUS (Sistema Único de Saúde). Atualmente a Mater realiza cerca de 120 partos mensais.

A coleta das amostras foi realizada em um período de 3 meses, com um total de 100 recém-nascidos participantes. Apesar do grande número de partos realizados, não foram coletadas muitas amostras e, algumas dificuldades foram encontradas nessa etapa do trabalho. Diferente das matrizes biológicas convencionais, que estão prontamente disponíveis, a excreção do mecônio ocorre esporadicamente a qualquer hora do dia ou da noite, necessitando da colaboração da equipe de atendentes do hospital e das mães para coleta, o que muitas vezes não ocorria. A quantidade de amostra em alguns casos era insuficiente, e, portanto tais amostragens eram desconsideradas.

Das 100 amostras coletadas, 50 foram analisadas pelo método desenvolvido e validado. Essas amostras de mecônio foram pré-selecionadas por serem provenientes de recém-nascidos de mães que admitiram o uso de alguma droga durante a vida.

Os dados obtidos sobre uso de drogas através da aplicação do questionário é apresentado na Tabela 10.

Tabela 10: Informações obtidas, através do questionário aplicado sobre hábito de uso de drogas, das 100 mães que aceitaram participar da pesquisa.

Substância utilizada durante a gravidez	Número de mães
Nenhuma	72
Álcool	2
Anfetamina	2
Cocaína	4
Maconha	3
Tabaco	14
Tabaco + Cocaína+ Álcool	2
Tabaco + Maconha	1

Em relação ao peso e a estatura do recém-nascido, não foram observados casos significativos de baixa estatura ou baixo peso, que pudessem mostrar correlação com a substância utilizada pela mãe durante a gestação. Os dados sobre essas duas variáveis são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11: Dados médios de peso e tamanho dos recém-nascidos de mães que aceitaram participar da pesquisa.

Substância utilizada	Média peso (g)	Média altura (cm)
Nenhuma	3.180	49,5
Álcool	3.370	48,0
Anfetamina	3.230	49,5
Cocaína	3.161	48,0
Maconha	3.246	49,3
Tabaco	3.025	48,0
Tabaco + Cocaína+ Álcool	3.106	49,7
Tabaco + Maconha	3.125	49,0

Das 50 amostras analisadas, em apenas 15 não foram detectados nenhum dos analitos pesquisados. Os resultados das concentrações dos analitos obtidos com a aplicação do método desenvolvido por DPX-GC/MS são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12: Resultados das concentrações (ng/g) obtidas através das análises toxicológicas nas amostras de mecônio de recém-nascidos da MATER.

Amostra	COC (ng/g)	EMA (ng/g)	COE (ng/g)	BEG (ng/g)	NIC (ng/g)	COT (ng/g)
1	nd	nd	nd	nd	nd	100,2
2	nd	nd	nd	nd	nd	90,7
3	nd	nd	nd	nd	115,5	180,3
4	nd	nd	nd	nd	nd	47,8
5	nd	nd	nd	nd	130,0	65,4
6	nd	nd	nd	nd	nd	98,0
7	nd	nd	nd	nd	nd	70,5
8	nd	nd	nd	nd	nd	40,8
9	250,5	100,7	nd	nd	nd	nd
10	nd	nd	nd	nd	nd	125,3
11	nd	nd	nd	nd	175,8	140,0
12	130,3	nd	nd	340,7	nd	205,2
13	nd	nd	nd	nd	nd	90,4
14	nd	nd	nd	nd	198,7	220
15	355,3	180,5	nd	nd	nd	nd
16	32,6	nd	nd	135,6	nd	nd
17	nd	nd	nd	nd	nd	47,6
18	391,2	nd	nd	223,8	nd	86,5
19	nd	nd	nd	nd	246,9	234,3
20	nd	nd	nd	nd	374,7	95,0

21	nd	nd	nd	nd	nd	50,8
22	nd	nd	nd	nd	457,0	345,3
23	nd	nd	nd	nd	nd	60,2
24	200,5	nd	nd	132,0	nd	nd
25	nd	nd	nd	95,6	nd	nd
26	nd	nd	nd	nd	569,8	105,0
27	nd	nd	nd	nd	nd	77,0
28	nd	nd	nd	nd	732,6	224,5
29	170,1	nd	nd	53,0	nd	nd
30	nd	nd	nd	nd	334,0	49,0
31	50,8	nd	nd	nd	nd	nd
32	137	nd	nd	nd	802,4	191,0
33	nd	nd	nd	64,0	nd	nd
34	320,0	nd	nd	187,0	nd	nd
35	97,6	nd	nd	nd	nd	nd

nd: Não Detectado

Comparando as informações obtidas através do questionário aplicado para as mães sobre o hábito de uso de drogas e as análises toxicológicas em mecônio observou-se que os resultados são divergentes. Aproximadamente 70% das mães que participaram da pesquisa relataram não terem utilizado nenhum tipo de droga durante a gestação, enquanto 30% delas admitiram o uso de alguma substância nesse período.

Dessas mães que afirmaram o uso, 40%(n=20) relataram o uso do tabaco durante a gravidez, no entanto a nicotina e/ou a cotinina foram quantificados em 50%(n=25) das amostras de mecônio analisadas. Quanto à cocaína e o crack, durante as entrevistas maternas cerca de 18%(n=9) relataram o uso, no entanto, 30%(n=15) das amostras de mecônio analisadas apresentou cocaína e/ou metabólitos mensuráveis.

Outros autores Gray *et al.*, 2008; Sant'Anna, 2010; Alves, 2010; López *et al.*,

2007 apresentaram resultados semelhantes onde as mulheres participantes do estudo não relataram o consumo e houve detecção dos analitos nas amostras de mecônio, ressaltando assim a importância das análises toxicológicas.

A cotinina foi o analito que apresentou maior frequência de detecção nas amostras de mecônio de recém nascidos de mães que relataram ou não o consumo de tabaco durante a gestação. Resultado semelhante foi encontrado por outros autores que detectaram a presença de cotinina em grande parte das amostras de mecônio analisadas, fato que pode ser explicado pela exposição passiva ao tabaco pelas mães durante a gestação, ou até mesmo proveniente do consumo de alguns alimentos vegetais da dieta que apresentam esse analito em sua composição (Sant'Anna, 2010; ROSEMBERG *et al.*, 2003).

Avaliando os resultados obtidos nas análises toxicológicas, algumas medidas necessárias devem ser tomadas, pois o risco do uso dessas substâncias é bem conhecido. A identificação dos biomarcadores de exposição em amostras biológicas fornece uma alternativa ao auto-relato, possibilitando uma avaliação dos efeitos da droga no feto e posteriormente na criança. Para uma maior compreensão e auxílio sobre o risco dessa exposição, existe uma classificação de drogas feita pelo órgão internacional FDA (*Federal Drugs and Foods Administration*). Poucos estudos citam essa classificação, e alguns profissionais da área da saúde a desconhecem.

As drogas foram classificadas pelo FDA em 5 categorias (A, B, C, D e X), de acordo com os fatores de riscos à gestação, tomando por base, predominantemente, o primeiro trimestre da gestação. A definição de cada categoria está apresentada na Tabela 13. (FDA, 2013; BRIGGS *et al.*, 2001)

Tabela 13: Classificação das 5 categorias (A, B, C, D e X), de acordo com os fatores de riscos à gestação, de acordo com o FDA.

Categoria da droga	Definição da classificação
A	Os estudos controlados em mulheres não conseguem demonstrar um risco para o feto no primeiro trimestre (e não há nenhuma evidência de um risco em trimestres posteriores), a possibilidade de danos ao feto parece remoto.
B	Os estudos realizados em animais não indicam que a substância oferece riscos para o feto, mas não há estudos controlados em humanos que mostrem efeitos adversos sobre o feto, considerando cautela no uso.
C	Os estudos em animais têm demonstrado que podem exercer efeitos teratogênicos ou tóxicos para os embriões, mas não há estudos controlados em mulheres ou não há estudos controlados disponíveis em animais nem em humanos. Podendo apresentar risco potencial para o feto
D	Existe evidência de risco para os fetos humanos, mas os benefícios em certas situações, como por exemplo, nas doenças graves ou que põem em risco a vida e para as quais não existe outra alternativa terapêutica, podem fazer com que o uso durante a gravidez esteja justificado, apesar dos riscos. Alto Risco.
X	Os estudos em animais ou humanos têm demonstrado que causa anomalias fetais ou há evidências de riscos para o feto com base na experiência em humanos ou ambos. Alto perigo.

A nicotina é classificada pelo FDA na categoria D, uma vez que estudos em animais indicam que ela afeta o desenvolvimento do SNC do feto, reduz o fluxo sanguíneo para a placenta, envolvendo nesse processo a síndrome da morte súbita infantil. Já a cocaína está incluída em duas categorias C e X, pesquisas sobre os efeitos da exposição à cocaína materna e fetal indicam que podem ocorrer anomalias, e exercer efeitos teratogênicos, além da síndrome de abstinência na qual os recém-nascidos apresentam um alto grau de irritabilidade, tremores e rigidez muscular com sintomas gastrointestinais (vômitos, diarreia) e convulsões, além do aumento na incidência de síndrome da morte súbita.

CONCLUSÃO

6- CONCLUSÃO

O método desenvolvido e validado empregando a extração em fase sólida modificada com ponteiros DPX e a GC/MS mostrou eficiência, reprodutibilidade e sensibilidade para identificação e quantificação dos analitos propostos (cocaína, cocaetileno, benzoilecgonina, metil éster anidroecgonina, nicotina e cotinina) em amostras de mecônio, podendo assim, ser empregado na rotina para identificação de mães que não admitam o uso dessas substâncias durante a gravidez auxiliando na intervenção médica rápida e precisa para o cuidado da mãe e da criança. Apesar do tempo de preparo da amostra aumentado em relação ao sangue e a urina, a ampla janela de detecção do mecônio torna a matriz ideal para determinar a exposição fetal.

Até a presente data, não há nenhum método descrito na literatura utilizando ponteiros de extração DPX em amostras de mecônio, nem o estudo com nicotina e cotinina, sendo este o primeiro estudo. A limitação na literatura científica sobre a utilização da DPX foi uma das dificuldades encontradas no desenvolvimento do trabalho, no entanto, com os dados de outros analitos estudados, o método desenvolvido em outras matrizes, e uma série de testes realizados foi possível concluir o projeto de pesquisa de forma plena.

A análise dos resultados obtidos das análises toxicológicas nas amostras de mecônio, revela que a exposição fetal a cocaína e ao tabaco é significativa. A identificação dos biomarcadores de exposição em amostras biológicas fornece uma alternativa ao auto-relato, visto que o mesmo apresenta resultados divergentes, ressaltando assim a importância das análises toxicológicas e uma avaliação mais criteriosa dos efeitos da droga no feto e posteriormente na criança.

Avaliando-se os resultados obtidos nas análises toxicológicas medidas preventivas e educacionais devem ser tomadas pela equipe de saúde, principalmente, durante o pré-natal para que as mães estejam informadas e conscientes dos riscos desse uso, principalmente, durante a gestação.

REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUSADA, G.M.; ABUKHALAF, I.K.; ALFORD, D.D.; VINZON-BAUTISTA, I.; PRAMANIK, A.K.; ANSARI, N.A.; MANNO, J.E.; MANNO, B.R. Solid-phase extraction and GC-MS quantitation of cocaine, ecgonine methyl ester, benzoylecgonine, and cocaethylene from meconium, whole blood and plasma. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 17, p. 353-358, October, 1993.

ALIYU, M. H.; LYNCH, O.; WILSON, R. E.; ALIO, A. P.; KRISTENSEN, S.; MARTY, P. J.; WHITEMAN, V. E.; SALIHU, H. M. Association between tobacco use in pregnancy and placenta-associated syndromes: a population-based study. **Archives of Gynecology and obstetrics**, Germany, mar. 2010.

ALVES, M.N.R. Desenvolvimento e validação de metodologia para análise de cocaína, derivados e metabólitos em mecônio de neonatos atendidos no HCFMRP/USP utilizando a Cromatografia em fase Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas. Ribeirão Preto, 2010, 77p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

ABP- Associação Brasileira de Psiquiatria. Disponível em <<http://www.abpbrasil.org.br/medicos/departamentos/coordenadores/coordenador/noticias/?not=82&dep=62>>. Acesso em: 02/02/2011.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL). Resolução RE nº 899, 29 de maio de 2003. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/legis>>. Acesso em: 05/02/2013.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL). Resolução RE nº 27 de 17 de maio de 2012.. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/legis>>. Acesso em: 05/02/2013.

BARROS, L.S.R. Desenvolvimento e validação de método para análise de nicotina e cotinina em amostras de mecônio utilizando a cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas, 2011, 75p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

BARANOWSKI, J., POCHOPIEN, G., BARANOWSKA, I. Determination of nicotine, cotinine and caffeine in meconium using high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 707, p. 317–321, 1998.

BIELAWSKI, D.; OSTREA Jr, E.; POSECION Jr, N.; CORRION, M.; SEAGRAVES, J. Detection of several classes of pesticides and metabolites in meconium by gas chromatography-mass spectrometry. **Chromatographia**, v. 62, n. (11-12), p. 623-629, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". Disponível em: www.anvisa.org.br. Acesso em: 20/12/2012.

BRIGGS, G.G; FREEMAN R.K.; YAFFE S.J. Drugs in Pregnancy and Lactation.

6. ed. California: Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2001.

BONATO, P.S.; COLLINS, C.H. Fundamentos de Cromatografia. 1. reimp., Campinas: Unicamp, 2007, p. 17-21.

CARLINI, E.A. et al. II Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo 108 maiores cidades do país, 2005. São Paulo: CEBRID – Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas: UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo, 2006.

CARVALHO, J.T. O tabagismo visto sob vários aspectos. Medsi Ed., Rio de Janeiro, 2000.

CLARK, G.D.; ROSENZWEIG, I.B.; RAISYS, V.A.; CALLAHAN, C.M.; GRANT, T.M.; STREISSGUTH, A.P. The analysis of cocaine and benzoylecgonine in meconium. J Anal Toxicol, v. 16, July/August, 1992.

CONE, E.J.; HILLSGROVE, M.; DARWIN, W.D. Simultaneous measurement of cocaine, cocaethylene, their metabolites and “crack” pyrolysis products by gas chromatography-mass spectrometry. **Clin Chem**, v. 40, n. 7, p. 1299-1305, 1994.

COSTA, L.M. Drogas de abuso na gestação: as orientações no pré-natal são suficientes? **Revista de Pediatria** v. 20, p. 316-322, São Paulo, 1998.

CHASIN, A.A.M.; SILVA, E.S. Estimulantes do Sistema Nervoso Central. In: OGA, S. Fundamentos de Toxicologia. 3. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2008. Cap. 4.3, p.356-371.

DEGANI, A.L.G.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia: um breve ensaio. São Paulo: Química Nova, 1998, p. 21-25.

DE MARTINIS, B.S.; DORTA, D.J.; BAZZARELLA, R.B.; ALVES, M.N.R.; PERES, M.D. Amostras biológicas alternativas para análises toxicológicas. In: Fundamentos de Química Forense. Campinas, SP: Millennium Editora, 2012. Cap.16, p.306-316.

DPX : Manual do Produto. Application Note: Analysis of Basic, Acidic and Neutral Drugs in Urine. 07/06/08.

ELLISON, S.T.; BREWER, W.T.; MORGAN, S.L. Comprehensive Analysis of Drugs of Abuse in Blood and Urine with Automated Disposable Pipette Extraction and HPLC/MS/MS. Global analytical solutions, 2009.

FARST, K.J.; VALENTINE, J.L.; HALL, R.W. Drug Testing for Newborn Exposure to Illicit Substances in Pregnancy: Pitfalls and Pearls. **International Journal of Pediatrics**, v. 2011, p.7, 2011.

FDA U.S Food and Drug Administration. 2013. Disponível em: <www.fda.gov>. Acesso em: 09/05/2013.

FURTADO, R.D. Implicações Anestésicas do Tabagismo. **Ver. Bras. Anesthesiol**,

v. 52, p. 354-367, 2002.

GALVÃO, J.F.; GALVÃO, T.F.; MOREAU, R.L.M. Tabaco. In: OGA, S. Fundamentos de Toxicologia. 3. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2008. Cap. 4.7, p.419-430.

GALLARDO, E.; QUEIROZ, J.A. The role of alternative specimens in toxicological analysis. **Biomedical Chromatography**, v. 22, p. 795-821, 2008.

GARERI, J.; KLEIN, J.; KOREN, G. Drugs of abuse testing in meconium. **Clinica Chimica Acta**, Toronto, v. 366, p. 101-111, 2006.

GOLDIM, J.R.; PITHAN, C.F.; OLIVEIRA, J.G. O processo de consentimento livre e esclarecido em pesquisa: uma nova abordagem. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 49, n. 4, p. 372-374, 2003.

GRAY, T.R., MAGRI, R., SHAKLEYA, D.M., HUESTIS, M.A. Meconium Nicotine and Metabolites by Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry: Differentiation of Passive and Nonexposure and Correlation with Neonatal Outcome Measures. **Clinical Chemistry**, v. 54, p. 2018- 2027, 2008.

GRAY, T.R.; SHAKLEYA, D.M.; HUESTIS, M.A. A liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantification of 20 drugs of abuse and metabolites in human meconium. **Anal Bioanal Chem**, v. 54, p. 2018- 2027, 2009.

GUAN, H.; BREWER, W.E.; GARRIS, S.T.; CRAFT, C.; MORGAN, S.L. Multiresidue Analysis of Pesticides in Fruits and Vegetables Using Disposable Pipette Extraction (DPX) and Micro Luke-method. **Journal of agricultural and Food Chemistry**, v.58, p. 5973-5971, 2010.

ISENCHMID, D.S. Cocaine. In: LEVINE, B. Principles of Forensic Toxicology. USA, 1999. Cap. 13, p. 221-245.

JARDIM, I.C.S.F. et al. Cromatografia líquida de alta eficiência. In: BRAGA, G.L.; BONATO, P.S.; COLLINS, C.H. Fundamentos de Cromatografia. 1. reimp., Campinas: Unicamp, 2007, p. 273-397.

JOHANSON, C.E.; FISCHMAN, M.N. The pharmacology of cocaine related to its abuse. **Pharmacol. Rev.**, Baltimore, v.41, p.3-52, 1989.

JOYA, X; PUJADAS, M.; CIVIT, E.; PICHINI, S.; LUNA, A.; TORRE, R.; VALL, O. Gas chromatography mass spectrometry assay for the simultaneous quantification of drugs of abuse in human placenta at 12th week of gestation. **Forensic Science International**, v.196, p. 38-42, 2010.

KÖHLER, E., AVENARIUS, S., RABSILBER, A., GERLOFF, C., JORCH, G. Assessment of prenatal tobacco smoke exposure by determining nicotine and its metabolites in meconium. **Human & Experimental Toxicology**, v. 26, p. 535-544, 2007

KOLE, P.L.; VENKATESH, G.; KOTECHEA, J.; SHESHALA, R. Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods. **Biomedical Chromatography**, v. 25, p. 199–217, 2010.

LAW, K. L.; STROUD, L. R.; LAGASSE, L. L.; NIAURA, R.; LIU, J.; LESTER, B. M. Smoking during pregnancy and newborn neurobehavior. **Pediatrics**, United States, v. 111. n. 6, p. 1318 – 1323, jun. 2003.

LÓPEZ , P.; BERMEJO, A.M.; TABERNERO, M.J.; FERNÁNDEZ, P.; ALVAREZ, I. Determination of cocaine and heroin with their respective metabolites in meconium by gas chromatography-mass spectrometry. **J. Appl Toxicol**, v. 27, n.5, Sep-Oct, p.464-71, 2007.

YAMAGUCHI, E.T.; CARDOSO, M.M.S.C.; TORRES, M.L.A.; ANDRADE, A.G. Drogas de abuso e gravidez. **Revista de psiquiatria clínica**, v.35, s.1, São Paulo, 2008.

MARTINS, I. Validação Analítica. In: MOREAU, R.L.M.; SIQUEIRA, M.E.P.B. Toxicologia Analítica. 1. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. Cap.3, p. 20-38.

MARTINS-CELINI, F.P. Prevalência da exposição fetal à cocaína: métodos de detecção e características maternas. Ribeirão Preto, SP. 2001. 123p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina – Universidade de São Paulo.

MELLO, P.R.B.; PINTO, G.R.; BOTELHO, C. The influence of smoking on fertility, pregnancy and lactation. **Jornal de Pediatria**, v.21, 2001.

MITCHELL, E.A.; MILERAD, J. Smoking and the sudden infant death syndrome. **Rev Environ Health**, v.21, p.81-103, 2006.

MOORE, C., NEGRUSZ, A., LEWIS, D. Determination of drugs of abuse in meconium. **Journal of Chromatography B**, v. 713, p. 137–146, 1998.

OYLER, J.; DARWIN, W.D.; PRESTON, K.L.; SUESS, P.; CONE, E.J. Cocaine disposition in meconium from newborns of cocaine-abusing mothers and urine of adult drug users. **J Anal Toxicol**, v. 20, October, 1996.

OSTREA, E.M.JR. Testing for exposure to illicit drugs and other agents in the neonate: a review of laboratory methods and the role of meconium analysis. **Current Problems in Pediatrics**, v. 29, p. 37–56, 1999.

OSTREA, et al. Estimates of illicit drug use during pregnancy by maternal interview, hair analysis and meconium analysis. **The Journal of Pediatrics**, v. 138, n. 3, p. 344-348, March, 2001.

PICHINI, S.; PUBIG, C.; ZUCCARO, P.; MARCHEI, E.; PELLEGRINI, M.; MURILLO, J.; VALL, O.; PACIFICI, R.; GARCIA-ALGAR, O. Assessment of exposure to opiates and cocaine during pregnancy in a Mediterranean city: preliminary results of the "Meconium Project". **Forensic Sciences International**. v.4, p. 59-65, 2005.

PICCIOTTO, M.R.; CALDERONE, B.J.; KING, S.L.; ZACHARIOU, V. - Nicotine Receptors in Brain: Links between Molecular Biology and Behavior. **Neuropsychopharmacology** 22: 451-64, 2000.

ROSEMBERG, J.; ROSEMBERG, A.M.A.; MOARES, M.A. Nicotina: droga universal. São Paulo: Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo, 2003. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/tabagismo/publicações/nicotina.pdf> [Acesso em 10/02/2013].

SANT'ANNA, S.G. Avaliação da exposição fetal à nicotina através da análise toxicológica em mecônio. São Paulo, 2010, 93p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

SÃO PAULO (Estado). Diário Oficial do Estado. Cresce o número de mulheres internadas na rede pública por uso de cocaína. Disponível em: <http://www.jfolharegional.com.br/mostra.asp/noticias>. Acesso: 25/11/2012.

SASTRY, B.V.R.; HEMONTOLOR, M.E.; OLENICK M. Prostaglandin E2 in human placenta: its vascular effects and activation of prostaglandin E2 formation by nicotine and cotinine. **Pharmacology** 1999, 58:70-86.

SCHILLER C.; ALLEN P.J. Follow up of infants prenatally exposed to cocaine. **Pediatric Nursing** v.5, p.427-436; 2005.

TOLEDO, F.C.P. Identificação de benzoilecgonina por imunofluorescência polarizada em cabelos de usuários de cocaína. São Paulo, 1999. 97p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

TRICKER, A.R. Nicotine metabolism, human drug metabolism polymorphism and smoking behavior. **Toxicology**, v.183, p. 151-173, 2003.

UNODC - *United Nations Office on Drugs and Crime*: Relatório Mundial sobre Drogas 2012. Disponível em <http://www.unodc.org/documents/southerncone/Topics_drugs/WDR/2012/WDR_2012_Referencias_ao_Brasil_e_Cone_Sul.pdf>. Acesso em: 10/02/2013

UTAGAWA, C.Y.; SOUZA, R.A.; SILVA, C.O.M.; SILVA, M.O. Tabagismo e Gravidez: Repercussões no Desenvolvimento Fetal. Cadernos UniFOA, Volta Redonda, ano II, n. 4, 2007.

VALLE, L.B.S.; OLIVEIRA-FILHO, R.M.; DELUCIA, R. In: OGA S. Farmacologia Integrada. 3 ed, Rio de Janeiro, Editora Revinter, 2007.

XIA, Y.; WANG, P.; BARTLETT, M.G.; SOLOMON, H.M.; BUSCH, K.L. An LC-MS-MS method for the comprehensive analysis of cocaine and cocaine metabolites in meconium. *Anal Chem*, v. 72, p. 764-771, 2000.

WILLS, S. Drugs of abuse. 3 ed. Cambridge: The Pharmaceutical Press, 2002. Cap. 5, p. 48-60.

WOODS, J.R.; PLESSINGER, M.A.; CLARK, K.E. Effect of cocaine on uterine blood flow and fetal oxygenation. **JAMA**, v.257, p.957-961, 1987.

APÊNDICE 1

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TÍTULO DA PESQUISA: “Exposição fetal: determinação de drogas de abuso em mecônio empregando a técnicas de extração em fase sólida modificada e cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas”

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:

Dayanne Cristiane Mozaner Bordin, tels (16) 3602-4424, daybordin@fcrp.usp.br
Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis, CRQ N° 04.100.360 - tels (16) 3602-4424, (16) 3602-3359, martinis@usp.br
Comitê de Ética em Pesquisa em Pesquisa, tel. (16) 3602-4213, (16) 3602-4216, cep@fcrp.usp.br

PROMOTORES DA PESQUISA

Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP

Você e seu bebê estão sendo convidados para participar, como voluntários, em uma pesquisa. Após ser esclarecida sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte da pesquisa, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é dos pesquisadores responsáveis. Você é livre para não querer participar ou desistir da pesquisa a qualquer momento que desejar caso mude de idéia, você e seu bebê não serão prejudicados e o atendimento dado a vocês no hospital será o mesmo se vocês participarem ou não da pesquisa. Você tem direito a perguntar o que quiser durante a pesquisa. Você não pagará nada e também não receberá nenhum dinheiro ou benefício adicional.

MOTIVO DA PESQUISA

O objetivo dessa pesquisa é desenvolver um método de análise e detecção de drogas e/ou seus metabólitos em amostras das primeiras fezes do bebê recém nascido (mecônio). Alguns bebês sofrem complicações após o parto e o motivo muitas vezes é desconhecido e pode estar relacionado com o uso dessas substâncias.

EXPLICAÇÕES SOBRE O USO DESSAS SUBSTÂNCIAS DURANTE A GRAVIDEZ

O uso de substâncias durante a gravidez pode trazer problemas sérios tanto para a mãe quanto para o bebê que pode nascer com problemas físicos e/ou mentais, o bebê pode apresentar necessidade da substância logo após o parto e problemas respiratórios que podem aparecer durante o crescimento da criança.

PROCEDIMENTOS DA PESQUISA

Se você concordar em participar da pesquisa, será coletada uma amostra das fezes da fralda do seu bebê nos primeiros dias de vida e você será convidada a responder um questionário. Essas fezes serão examinadas para verificar a presença de cocaína e nicotina.

RISCOS E/OU DESCONFORTOS

A coleta das fezes do bebê não trará nenhum desconforto ou risco para você ou para seu bebê, já que serão retiradas diretamente da fralda sem nenhum contato com o bebê.

BENEFÍCIOS

Caso você esteja disposta a parar com o uso de tabaco, álcool e/ou drogas, a assistente social do hospital poderá encaminhá-la ao Centro de Apoio Psico Social Álcool e Drogas (CAPS), para ajudá-la a abandonar o uso dessa substância. E se você pretende ter outros filhos já vai saber que suspendendo o uso dessas substâncias a gravidez será mais tranquila e tanto a sua saúde quanto a do seu bebê serão preservadas.

CONFIDENCIALIDADE

Os seus dados e os dados do seu bebê são confidenciais. Seu bebê será identificado por um número. As informações obtidas na entrevista, o resultado da análise sobre a presença ou ausência das substâncias nas amostras de fezes do seu bebê serão mantidos em segredo. Você e seu bebê não serão identificados em nenhum trabalho que possa resultar dessa pesquisa.

PROBLEMAS OU PERGUNTAS

Se você tiver alguma pergunta ou qualquer dúvida sobre essa pesquisa, entre em contato com **Dayanne Cristiane Bordin** pelos telefones: (16) 3602-4424, ou endereço Avenida Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto-SP.

Ou entre em contato com o Comitê de ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas pelos telefones: (16) 3602-4213, (16) 3602-4216, ou endereço Avenida do Café s/nº, Monte Alegre, Ribeirão Preto-SP.

ASSINATURAS

Se tiver lido o consentimento livre e esclarecido, tiver entendido a informação e concorda voluntariamente em permitir que seu(ua) filho(a) recém nascido(a) participe desse estudo, por favor, assine abaixo:

_____	_____	_____
Nome do voluntário (mãe)	Assinatura do voluntário (mãe)	Data

_____	_____	_____
Nome da testemunha	Assinatura da testemunha	Data

Eu expliquei o propósito desse estudo à voluntária. Estou certo de que ela entendeu o propósito, os procedimentos, riscos e benefícios desse estudo.

Nome do pesquisador: _____

Assinatura: _____ Data: _____

APÊNDICE 2

PROTOCOLO DE ESTUDO: QUESTIONÁRIO PARA APLICAR NA MÃE

DATA: ____/____/____

NÚMERO DA AMOSTRA: ____

INFORMAÇÕES DO PACIENTE :

Código do Paciente: _____

Data de Nascimento: ____/____/____

Peso: _____ Sexo: ☐ Fem ☐ Masc Tamanho: _____Parto: ☐ Normal ☐ Cesariana _____ Semanas**QUAL SEU ESTADO CIVIL?**☐ Casada ☐ Solteira ☐ Separada ☐ Divorciada ☐ Viúva**POSSUI QUANTOS FILHOS?**☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ou mais**UTILIZOU CIGARRO ALGUMA VEZ NA VIDA?**☐ Sim ☐ Não**CASO JÁ TENHA EXPERIMENTADO CIGARRO, QUANDO FOI A ÚLTIMA VEZ QUE FUMOU?**☐ 1 dia atrás ☐ Alguns dias atrás ☐ Semanas atrás ☐ Meses atrás☐ 1 ano atrás ☐ Mais de 1 ano ☐ Outro _____**SE FAZ O USO DE CIGARRO, QUANTOS COSTUMA FUMAR POR DIA?**☐ Entre 1 e 10 ☐ Entre 11 e 20 ☐ Mais de 20**PAROU DE FUMAR DURANTE A GRAVIDEZ? QUANDO ISSO ACONTECEU?**☐ Não ☐ Sim, 1º, 2º ou 3º mês ☐ Sim, 4º, 5º ou 6º mês
☐ Sim, 7º, 8º ou 9º mês**UTILIZOU BEBIDA ALCOÓLICA DURANTE A GRAVIDEZ?**

☐ Sim ☐ Não

SE FAZ O USO DE BEBIDA ALCOÓLICA, COM QUE FREQUÊNCIA COSTUMA BEBER?

☐ Todo dia ☐ No final de semana ☐ 2 vezes na semana
☐ 1 vez na semana ☐ A cada 15 dias ☐ 1 vez por mês
☐ Outro _____

JÁ EXPERIMENTOU ALGUMA DROGA NA SUA VIDA?

☐ Sim ☐ Não

CASO JÁ TENHA EXPERIMENTADO, QUAL/QUAIS USOU?

☐ Maconha ☐ Cocaína ☐ Crack ☐ LSD ☐ Ecstasy
☐ Solventes ☐ Outras _____

QUANDO FOI A ÚLTIMA VEZ QUE USOU ESSA DROGA?

☐ 1 dia atrás ☐ Alguns dias atrás ☐ Semanas atrás ☐ Meses atrás
☐ 1 ano atrás ☐ Mais de 1 ano ☐ Outro _____

COM QUE FREQUÊNCIA UTILIZA ESSA DROGA?

☐ Todos os dias ☐ No final de semana ☐ 2 vezes na semana
☐ 1 vez por semana ☐ A cada 15 dias ☐ 1 vez por mês
☐ Outro _____

COMO FEZ O USO DESSA DROGA?

☐ Inalou ☐ Fumou ☐ Injetou ☐ Ingeriu ☐ Outra forma _____

PAROU DE USAR ESSA DROGA DURANTE A GRAVIDEZ? QUANDO ISSO ACONTECEU?

☐ Não ☐ Sim, 1º, 2º ou 3º mês ☐ Sim, 4º, 5º ou 6º mês
☐ Sim, 7º, 8º ou 9º mês

RECEBEU INFORMAÇÕES QUE O USO DE CIGARRO, BEBIDA ALCOÓLICA OU DROGAS PODE PREJUDICAR O DESENVOLVIMENTO DO BEBÊ?

☐ Não ☐ Sim